

AUS DEM ZENTRUM FÜR OPERATIVE MEDIZIN I  
DER PHILIPPS - UNIVERSITÄT MARBURG  
GESCHÄFTSFÜHRENDER DIREKTOR:  
PROF. DR. MED. B. L. BAUER

KLINIK FÜR UNFALLCHIRURGIE  
LEITER: PROF. DR. MED. L. GOTZEN

Pharmakologische Osteoinduktion durch lokal applizierten  
Blutgerinnungsfaktor XIII

Eine tierexperimentelle Studie am Modell der  
Distractionsosteosynthese des Kaninchenfemurs

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Axel Suhrborg

aus Trier

Marburg 1996

**Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg**

**am**

**gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches**

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Renschmidt

Referent: Privatdozent Dr. med. R. G. K. Schlenzka, Klinik für Unfallchirurgie

Correferent: Prof. Dr. med. Peter Griss, Klinik für Orthopädie

*meinen Eltern für ihre liebe Unterstützung gewidmet*

**PROLOG**

Habe nun, ach! Philosophie,  
Juristerei und Medizin,  
Und leider auch Theologie!  
Durchaus studiert, mit heißem Bemühn.  
Da steh ich nun ich armer Tor!  
Und bin so klug als wie zuvor;  
Heiße Magister, heiße Doktor gar  
Und ziehe schon an die zehen Jahr,  
Herauf, herab und quer und krumm  
Meine Schüler an der Nase herum -  
Und sehe, daß wir nichts wissen können!  
Das will mir schier das Herz verbrennen.  
Zwar bin ich gescheiter als alle die Laffen,  
Doktoren, Magister, Schreiber und Pfaffen;  
Mich plagen keine Skrupel noch Zweifel,  
Fürchte mich weder vor Hölle noch Teufel -  
Dafür ist mir auch alle Freud entrissen,  
Bilde mir nicht ein, was Rechts zu wissen,  
Bilde mir nicht ein, ich könnte was lehren,  
Die Menschen zu bessern und zu bekehren.  
Auch hab ich weder Gut noch Geld,  
Noch Ehr und Herrlichkeit der Welt;  
Es möchte kein Hund so länger leben!  
Drum hab ich mich der Magie ergeben,  
Ob mir durch Geistes Kraft und Mund  
Nicht manch Geheimnis würde kund;  
Daß ich nicht mehr, mit saurem Schweiß,  
Zu sagen brauche, was ich nicht weiß;  
Daß ich erkenne, was die Welt  
Im Innersten zusammenhält,  
Schau alle Wirkenskraft und Samen  
Und tu nicht mehr in Worten kramen.

*Faust des nachts in seinem Studienzimmer*

*(in J. W. von Goethes Faust, der Tragödie erster Teil)*

## INHALTSVERZEICHNIS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Einleitung</b>  | <b>8</b>  |
| 1.1. Einführung in die vorangegangene Studie der Arbeitsgruppe .....                  | 9         |
| 1.2. Knochenheilung.....  | 11        |
| 1.2.1. Modeling und Remodeling.....   | 11        |
| 1.2.2. Primäre Knochenheilung.....  | 14        |
| 1.2.3. Sekundäre Knochenheilung und Phasenmodell des<br>Distraktionscallus.....       | 14        |
| 1.2.4. Knochen und das Blutorgan.....   | 20        |
| 1.3. Ansätze zur pharmakologischen Osteoinduktion - osteoinduktive<br>Substanzen..... | 22        |
| 1.4. Lokale Applikation an Knochengewebe .....  | 28        |
| 1.4.1. Technische Möglichkeiten .....   | 28        |
| 1.5. Das Marburger Callotasis-Modell .....  | 29        |
| 1.6. Klinische Relevanz von Faktor XIII.....  | 30        |
| 1.6.1. Anwendung bei verschiedenen Krankheiten .....                                  | 30        |
| 1.6.2. Klinische Anwendung mit dem Ziel der Osteoinduktion .....                      | 30        |
| 1.7. Ziel und Fragestellung der vorliegenden Studie.....                              | 32        |
| <br>  |           |
| <b>2. Material und Methodik</b>   | <b>33</b> |
| 2.1. Kurzbeschreibung des Versuchs.....   | 33        |
| 2.2. Tierversuchsgenehmigung.....   | 34        |
| 2.3. Die Versuchstiere .....  | 34        |
| 2.3.1. Auswahl .....  | 34        |
| 2.3.2. Markierung.....  | 35        |
| 2.3.3. Haltung.....   | 35        |
| 2.4. Der Fixateur Externe .....   | 37        |
| 2.5. Das Intraport-Kathetersystem.....  | 38        |
| 2.6. Die Blutgerinnungsfaktor XIII- und Placebo-Präparation .....                     | 41        |
| 2.7. Die Operation .....  | 42        |
| 2.7.1. Operationsvorbereitungen.....  | 42        |
| 2.7.2. Narkose .....  | 42        |
| 2.7.3. Operationsablauf.....  | 44        |
| 2.7.4. Postoperative Nachsorge.....   | 48        |
| 2.8. Versuchsablauf .....   | 49        |
| 2.8.1. Applikation .....  | 49        |
| 2.8.2. Distraction.....   | 50        |
| 2.8.3. Antibiose .....  | 52        |
| 2.8.4. Versuchskontrolle und Messungen .....  | 52        |
| 2.8.5. Explantation und Obduktion .....   | 52        |
| 2.8.6. Komplikationen.....  | 53        |
| 2.9. Dokumentation .....  | 56        |
| 2.10. Blutplasmabestimmungen von Blutgerinnungsfaktor XIII .....                      | 56        |
| 2.11. Röntgenverlaufskontrollen .....   | 58        |
| 2.12. Histologie .....  | 60        |
| 2.12.1. Die unentkalkte Knochenhistologie.....  | 60        |
| 2.12.2. Fixierung.....  | 61        |

|   |            |
|---|------------|
| 2.12.3. Einbettung .....  | 61         |
| 2.12.4. Schneiden .....   | 62         |
| 2.12.5. Färbung .....   | 65         |
| 2.13. Auswertung .....  | 79         |
| 2.13.1. Bestimmung der Volumendichte des mineralisierten Osteoids .....                           | 84         |
| 2.13.2. Bestimmung des Verhältnisses von verkalkter zu unverkalkter Osteoidstruktur .....         | 85         |
| 2.13.3. Bestimmung des Osteblastenumfangs. ....   | 89         |
| 2.13.4. Bestimmung der Umfangdichte der Trabekel .....  | 89         |
| 2.13.5. Bestimmung des Flächenanteils der Kollagenfasern. ....                                    | 90         |
| 2.13.6. Bestimmung der Anisotropie der Trabekelstruktur .....                                     | 90         |
| <b>3. Ergebnisse</b>  | <b>92</b>  |
| 3.1. Auswahl der Präparate .....  | 92         |
| 3.2. Statistische Berechnungen .....  | 95         |
| 3.3. Bestimmung der Volumendichte des mineralisierten Osteoids .....                              | 97         |
| 3.3.1. Bestimmung in zentraler Ebene .....  | 97         |
| 3.3.2. Bestimmung in katheter- und kortikalisnaher Ebene .....                                    | 99         |
| 3.4. Verhältnis von verkalkter zu unverkalkter Osteoidstruktur .....                              | 100        |
| 3.5. Osteblastenumfang .....  | 101        |
| 3.6. Umfangdichte der Trabekel .....  | 103        |
| 3.7. Flächenanteil der Kollagenfasern .....   | 104        |
| 3.8. Ausrichtung der Osteoidstruktur (Anisotropie) .....  | 105        |
| 3.9. Faktor-XIII-Plasma-Spiegel .....   | 107        |
| 3.9.1. Die Faktor-XIII-Plasmaspiegel der Parallelstudie zur systemischen Applikation .....        | 110        |
| 3.10. Körpertemperaturkurve .....   | 111        |
| 3.11. Gewichtsverlauf .....   | 113        |
| <b>4. Diskussion</b>  | <b>115</b> |
| 4.1. Diskussion der histologischen Präparate .....  | 115        |
| 4.1.1. Die Rolle des intermediären, osteochondroiden Gewebes im Callotasis-Regenerat .....        | 115        |
| 4.1.2. Mineralisation und Konsolidierung .....  | 120        |
| 4.1.3. Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten .....   | 124        |
| 4.2. Lokale Osteoinduktion .....  | 126        |
| 4.2.1. Knocheneigene, osteogene Faktoren .....  | 126        |
| 4.2.2. Lokale Applikation mit dem Ziel der Osteoinduktion .....                                   | 127        |
| 4.3. Faktor XIII .....  | 129        |
| 4.3.1. Physiologie und Biochemie .....  | 129        |
| 4.3.2. Experimentelle Erkenntnisse hinsichtlich der Osteoinduktivität von Faktor XIII .....       | 135        |
| 4.4. Diskussion der Ergebnisse .....  | 139        |
| 4.4.1. Der Abfall der Faktor-XIII-Plasma-Spiegel während der Distraction .....                    | 139        |
| 4.4.3. Der Unterschied der Flächenanteile des verkalkten zu denen des unverkalkten Osteoids ..... | 145        |

|  |            |
|--|------------|
| 4.4.4. Unterschiede in der Ausrichtung der verkalkten Osteoidtrabekel .....                                | 146        |
| 4.4.5. Betrachtungen über die Diffusion von Faktor-XIII im Callusgewebe .....                              | 148        |
| 4.4.6. Zahl der Osteoblasten (Deckzellen) auf den Trabekeln (Osteoblastenumfang) .....                     | 148        |
| 4.4.7. Geometrische Komplexität (Umfangdichte) der Trabekel .....  | 149        |
| 4.4.8. Flächenanteil an Kollagenfasern .....   | 151        |
| 4.4.9. Die Körpertemperatur .....  | 152        |
| 4.4.10. Das Körpergewicht .....  | 152        |
| 4.5. Kritik des Versuchsdesigns und Ausblick .....   | 153        |
| <b>5. Zusammenfassung</b>  | <b>155</b> |
| <b>6. Tabellen</b>   | <b>157</b> |
| 6.1. Verlaufsberichte .....  | 157        |
| 6.2. Volumendichte des mineralisierten Osteoids (in Kossa, 63-fache Vergrößerung) .....                    | 166        |
| 6.2.1. Zentrale Ebene .....  | 166        |
| 6.2.2. Katheternahe (kortikalisnahe) Ebene .....   | 167        |
| 6.3. Verhältnis von verkalkter zu unverkalkter Osteoidstruktur (in Carstairs, 63-fache Vergrößerung) ..... | 168        |
| 6.4. Osteoblastenumfang (in Trichrom-Goldner, 250-fache Vergrößerung) .....                                | 169        |
| 6.5. Umfangdichte der Trabekel (in Kossa, 63-fache Vergrößerung) .....                                     | 171        |
| 6.6. Flächenanteil der Kollagenfasern (in Azan, 63-fache Vergrößerung) .....                               | 172        |
| 6.7. Anisotropie der Trabekel (in Kossa, 63-fache Vergrößerung) .....                                      | 173        |
| 6.8. Faktor-XIII-Plasmaspiegel .....   | 174        |
| 6.9. Körpertemperatur .....  | 175        |
| 6.10. Körpergewicht .....  | 177        |
| <b>7. Literaturverzeichnis</b>   | <b>179</b> |
| 7.1. nach Folge der Erwähnung (nach numerischer Reihenfolge) .....   | 179        |
| 7.2. nach alphabetischer Folge .....   | 188        |
| <b>8. Abbildungsverzeichnis</b>  | <b>197</b> |
| <b>9. Tabellarischer Lebenslauf</b>  | <b>204</b> |
| <b>10. Danksagung</b>  | <b>207</b> |
| <b>11. Ehrenwörtliche Erklärung</b>  | <b>210</b> |

## 1. EINLEITUNG

Die durch den Arzt gesteuerte Neogenese verlorengegangenen, menschlichen Gewebes beschäftigt schon lange nicht nur die menschliche Phantasie in Romanen oder der Filmbranche hinsichtlich der 'Schöpfung neuen Lebens', sondern auch ganz alltägliche Belange der Chirurgie. Behandlungsmethoden erschöpfen sich allzu oft in der ersatzlosen Entnahme krankhaften Gewebes oder einer nichtphysiologischen Versorgung der entstehenden Defekte. Das Optimum der Restitutio ad integrum wird selten erreicht.

Auch die Innere Medizin vermag oft funktionelle Defekte des Stoffwechsels beispielsweise nur zu substituieren, Autoimmunkrankheiten mit Immunsuppressiva zu unterdrücken, Neoplasien mit Cytostatika in die Remission zu drängen. Neben diesen eher palliativen Maßnahmen sind wahre kausale Behandlungsmethoden eher selten und beispielsweise der Therapie von Infektionskrankheiten kurativ mit Antibiotika oder prophylaktisch mit Impfseren beschieden.

Die Defektversorgung im chirurgischen Bereich wird bisher oft durch künstliches Material wie Prothesen oder Gelenkersatz, durch heterologes Gewebe in der Transplantationschirurgie oder autologes, jedoch heterotopes Gewebe erreicht. Hier stellen sich Nachteile wie Materialverschleiß, Nebenwirkungen der notwendigen Immunsuppressiva, Abstoßungsreaktionen oder Mangel an autologem Material ein. Wäre es hier nicht hoch interessant, noch verbliebenes, isotopes Gewebe zur Proliferation anzuregen, um den Defekt auf elegante und natürliche Weise zu füllen?

Der Zellbiologie und Biochemie sind seit längerem schon Wachstumsfaktoren, wie der NGF, EGF, PDGF, TGF etc. bekannt, die in vitro erstaunliche Wirkungen zeigen. Für die in-vivo-Situation der Chirurgie jedoch bleibt die Anwendung größtenteils schwierig, wie die enttäuschenden Ergebnisse der Anwendung von NGF beispielsweise bei der Wiederherstellung von peripherem Nervengewebe zeigten. Doch frei nach Goethe: Willst Du immer weiter schweifen, sieh das Gute liegt so nah: Im Gegensatz zu gänzlich ausdifferenziertem Nervengewebe besitzt Knochen schon physiologischerweise die Fähigkeit, unter bestimmten Umständen aus bereitstehenden Präkursorzellen funktionell vollwertiges Ersatzgewebe zu bilden, welches nach Abschluß der Heilung nicht von dem Ursprungsgewebe zu unterscheiden ist. Dieses Potential läßt sich nun, wie im Folgenden zu sehen, therapeutisch nutzen, um größere Knochendefekte, die die Natur ohne ärztlichen Eingriff nicht beherrschen würde, zu füllen.



Von dem russischen Chirurgen ILIZAROV wurde ab den 50er Jahren in umfangreicher Grundlagen- und klinischer Forschung eine Methode weiterentwickelt, Röhrenknochendefekte sehr elegant durch Dehnung eines Callus (Tension stress effect) zu schließen, die sich diese Regenerationspotenz des Knochens zunutze machte. Auch Plattenknochendefekte der Schädelkalotte oder Hautdefekte konnten durch einfachen Zug an den Wundrändern mit dieser Methode versorgt werden. Die Idee und Durchführung der Kallusdistraktion sind nicht neu. Bereits 1903 berichtet CODIVILLA<sup>1,2</sup> über die Callusdistraktion. BIER<sup>3</sup> beschreibt 1923 über sieben Beinverlängerungen: Nach Osteotomie der Femora stellte er die Osteotomieenden zunächst 3 bis 5 Tage wieder zusammen, um sie dann mit großen Gewichten (bis zu 30 kg) wieder auseinanderzuziehen. Zur dosierbaren Steuerung der Distraktion waren jedoch einfache Drahtextensionen nicht ausreichend. Ein von BLOCK<sup>4</sup> 1923 erfundenes Gerät sollte dieses Manko beheben. Der von KLAPP<sup>5</sup> 1930 vorgestellte Apparat erinnert mit seinen Halbringen bereits an den heutigen Ilisarov-Fixateur, der von WITTMOSER (1953)<sup>6</sup> ist mit dem heutigen Ringfixateur fast identisch. Die durch den sogenannten Tension-stress-effect<sup>7</sup> hervorgerufenen, biologischen Reaktionen, sei es biochemischer, mechanischer oder elektrischer Natur, sind seitdem u. a. Gegenstand der Bindegewebsforschung und bilden einen neuen Ansatz, Wachstumsprozesse hauptsächlich mesenchymalen Gewebes zu untersuchen. Die hierbei untersuchten Wachstumsfaktoren und Mediatoren lassen hoffen, auf elegantere Weise, gezielt Wachstumsprozesse therapeutisch zu induzieren und zu steuern. So ließen sich verzögerte Heilungsverläufe komplizierter Frakturen, chronischer Osteomyelitiden, daraus sich entwickelnde Pseudarthrosen, Zustände nach Neoplasie-Resektionen oder langdauernde Verlängerungen zu kurzer Extremitäten günstig beeinflussen und beschleunigen. Häufige Komplikationen, wie Embolien, Pneumonien, Dekubitalulcera oder symptomatische Depressionen, könnten ebenso gesenkt werden wie die hohen Liegedauern mitsamt der hohen Behandlungskosten.

### **1.1. Einführung in die vorangegangene Studie der Arbeitsgruppe**

Encouragiert durch die wenigen Versuche, die bisher in der Literatur<sup>204,206</sup> beschrieben wurden, und den in der Arbeitsgruppe vorangegangenen Versuch von PISTOR (1992)<sup>58</sup>, der die Wirkung von Faktor XIII auf die Knochenheilung in systemischer Applikation, ebenfalls im Callotaxisversuch an Kaninchen, untersuchte, wurde der vorliegende Versuch zur lokalen Applikation von Blutgerinnungsfaktor XIII mit dem Ziel der Osteoinduktion geplant. Pistor gab je 80 I. E./kg Körpergewicht Faktor XIII in der letzten von drei Versuchswochen an sechs Tagen. Distrahiert wurde mit

gleicher Distraktionsgeschwindigkeit ab Tag 8 p. o. während 10 Tagen mit einer anschließenden Konsolidierungsphase von 4 Tagen. Ausgewertet wurden in ERÖS gefärbte, entkalkte, in Paraffin eingebettete Präparate von insgesamt 18 Tieren annähernd gleichen Alters und Gewichts mit Rasterokkular nach traditionellen, histomorphometrischen Methoden. Die Färbung nach ERÖS (1928)<sup>8</sup> ermöglicht trotz Entkalkung eine Identifikation der ehemals verkalkten Strukturen. Statistisch verifiziert wurden die Ergebnisse mit dem Student-t-Test. Pistor konnte mit diesem Versuchsdesign bei der Verumgruppe (21,81 Flächenprozent) eine um 42 % höhere Bildung kalzifizierten Osteoids gegenüber der Kontrollgruppe (15,35 Flächenprozent) nachweisen. Die Zahl der Osteoprogenitorzellen lag im definierten Auszählungsbereich der Verumgruppe mit durchschnittlich 93,1 Zellen um 19 % höher als in der Kontrollgruppe mit 78,0 Zellen.

Das oben skizzierte Versuchsdesign der Vorgängerstudie (PISTOR 1992)<sup>58</sup> wurde aus mehreren Gründen nicht genau übernommen. Da in dieser Arbeit nur in der letzten Woche Faktor XIII appliziert wurde, konnten lediglich Aussagen über eine Wirkung von Faktor XIII auf den bereits organisierten Distraktionscallus, weniger jedoch auf die Phase der Frakturhämatom- und Fibringerinnbildung getroffen werden. Genau diese Wirkung sollte jedoch u. a. in der vorliegenden Studie untersucht werden, da klinische Studien bereits einen positiven Effekt auf die Knochenheilung bei früher systemischer Applikation von Blutgerinnungsfaktor XIII aufwiesen (SCHLENZKA 1993)<sup>43</sup>. Zudem sollte die Frage nach Optimierbarkeit der osteogenen Potenz des Blutgerinnungsfaktors durch frühere und längere Gabe geprüft werden. Somit wurde schon am ersten Tag post operationem, also noch vor Distraktionsbeginn, mit der Wirkstoffapplikation begonnen und eine vergleichbare Einzeldosis insgesamt 10 mal über den gesamten Versuchszeitraum von 21 Tagen gegeben.

Überdies wurden methodische Ungenauigkeiten der Vorgängerstudie durch andere Verfahren ersetzt, bzw angewandte Vorgehensweisen optimiert. So konnte das gewonnene Präparat ohne vorhergehende Entkalkung geschnitten, gefärbt und untersucht werden. Diese Methode der unentkalkten Knochenhistologie stellt den 'state of the art' dar und ist genauer als die durch höhere Gewebsschrumpfung belastete Methode der entkalkten Knochenhistologie, die nur indirekt Mineralisation nachweist. Auch die histomorphometrischen Meßtechniken der automatischen Bildanalyse gewähren durch die hohe Zahl an Erhebungsdaten sowie exakter Vermessung der Flächen, Umfänge und Ausrichtungstendenz der Trabekel eine höhere Präzision, Objektivität und Reproduzierbarkeit bei größerer Bandbreite an möglichen, zu erhebenden Parametern.

Zur statistischen Evaluation der Daten wurde nicht wie bei PISTOR (1992)<sup>58</sup> der Student-t-Test, sondern der verteilungsfreie U-Test nach MANN-WHITNEY<sup>94</sup> herangezogen. Ersterer kann ohne den Beweis der Normalverteilung für eine kleine Stichprobenzahl, wie sie in der vorliegenden, wie der vorangegangenen Studie vorlag, nicht verwendet werden.

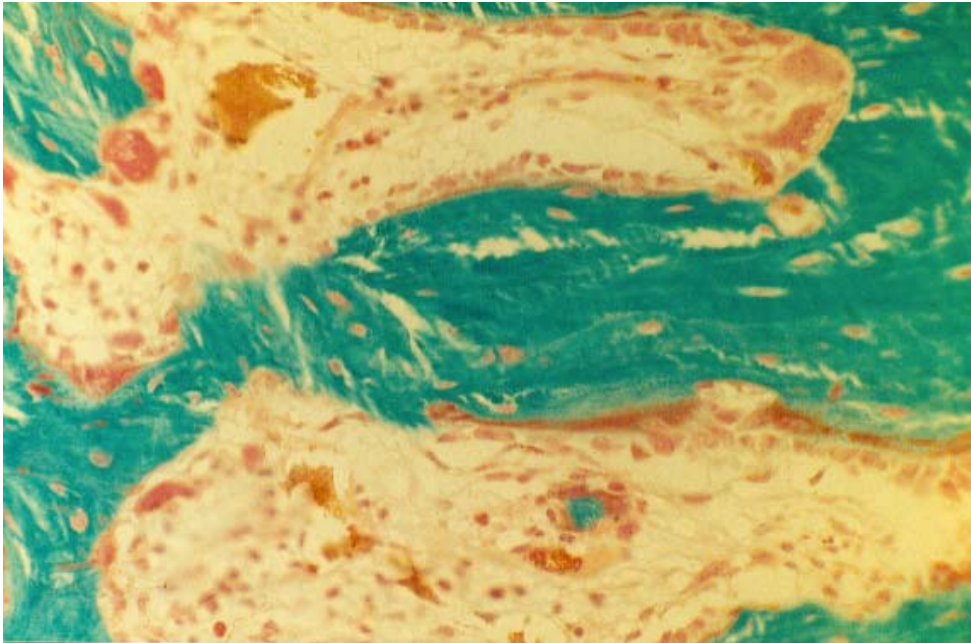
## 1.2. Knochenheilung

### 1.2.1. Modeling und Remodeling

Grundlage dieser Regeneration ist das sogenannte physiologische 'Modeling' und 'Remodeling' des Knochens, ein Vorgang, der auch in der pathologischen Situation der Frakturheilung zum Tragen kommt. Unter 'Modeling' ist die eigentliche Organogenese des Knochens zu verstehen, in der genetisch determiniertes Ursprungsgewebe unter dem Einfluß von Wachstumsfaktoren, der Muskelkraft und der statischen Belastung (Gravitationskraft), der daraus resultierenden Information in Form elektromagnetischer Felder und biochemischer Signale durch sich differenzierende Stammzellen in das Funktionsgewebe Knochen umgewandelt wird. Beispiele dieses Modelings sind die Osteogenese eines Fötus, bzw. Embryos. Hier werden die sich aus dem Mesoderm differenzierenden Somiten und Sklerotome in Knorpelinseln umgewandelt, welche als Rohmodelle des sich später ausbildenden Knochens dienen. An den gelenknahen Epiphysenfugen beginnt der Knorpel exakt gesteuert in Längsrichtung, oder besser in Haupttrichtung der einwirkenden Kräfte, säulenartig zu proliferieren, um in gleicher Ausrichtung Knorpelgrundsubstanz zu produzieren, welche verkalkt und das Fundament für die folgende Osteoidanlagerung darstellt. Diese erfolgt durch in oder an<sup>18</sup> einwachsenden Kapillaren einwandernde Osteoblasten. Durch diesen Vorgang entstehen Primärtrabekel, welche z. T. im Kern aus verkalkter Knorpelgrundsubstanz, z. T. aus verkalktem Osteoid bestehen. Hierbei spielen die Knorpelzellen die entscheidende Rolle als Schaltstelle, die die eingehenden Information in Längswachstum und 'Baustoffsynthese' umwandeln und die Struktur des Primärtrabekels bestimmen. Diese Knochenentstehung wurde enchondrales oder indirektes Knochenwachstum genannt. Orthogonal zur Wachstumsrichtung und Hauptkrafteinwirkung, und dort, wo bei Biegungen die größten Zugkräfte auftreten, entsteht Knochen auf eine andere Weise. Stammzellen aus dem Perichondrium, bzw. späteren Periost, lagern unmittelbar Kollagenfasern und Knochengrundsubstanz an das bestehende Gewebe an und formen eine Knochenmanschette um den sich bildenden Knochen. Hier stellen also unmittelbar Osteoblasten der Kambiumschicht des Peri- oder Endostes, welche im übrigen ebenfalls dem Mesoderm entspringen, die 'Schaltstelle'

dar, an der die Information eines spezifischen Reizes (mechanisch, elektrisch, biochemisch) in gerichtete Knochenapposition umgewandelt wird. Diese, hier das Dickenwachstum fördernde Knochenbildung wurde desmales oder direktes Knochenwachstum genannt. Letztere Knochenbildung spielt im Verlauf des Modelings auch eine Rolle bei der Entstehung der knöchernen Insertionen von Muskelsehnen im Knochen.

Das so entstandene Knochengewebe, also Primärtrabekel und 'Primärkompakta', stellt Faser- oder Geflechtknochen dar, der aus ungeordneten, verkalkten Kollagenfasern bestehend, noch nicht den statischen und dynamischen Beanspruchungen genügt. Er wird im Folgenden dem Prozeß des sogenannten 'Remodelings' oder, deutscher, 'Haverschen Umbaus' unterzogen, der dem hierdurch entstehenden Lamellenknochen sowohl bezüglich des Aufbaus, als auch der Belastbarkeit annähernd Eigenschaften von Stahlbeton bei jedoch geringerer Dichte verleiht. Hierbei penetrieren, der örtlichen Zugbelastungsrichtung folgend, sogenannte 'Bone Remodeling Units', 'Bone Metabolizing Units' oder 'Basic Multicellular Units' (BMU's)<sup>9</sup>, bestehend aus einem Osteoklasten als 'Bohrkopf' und Kapillarendothel, perikapillären Zellen, sowie Osteoblasten im Gefolge, die Knochensubstanz (siehe auch folgende Abbildung 1).



*Abbildung 1: Eine Bone metabolizing Unit (BMU) am Werke: Ein Osteoklasten-Bohrkopf bahnt sich seinen Weg durch die alte Kompakta, Kapillarendothel und Osteoblasten folgen ihm in einem definierten Abstand und bilden konzentrisch neues Osteoid. Ein neues Haversches System ist 'geboren'. (Trichrom Goldner, 200 fache Vergrößerung, Präparat L0/6 re T)*

Die Osteoblasten lagern konzentrisch Knochen an und werden dabei selber während ihrer Metamorphose zu Osteozyten 'begraben'. Das entstehende Gebilde stellt das Grundelement des Lamellenknochens, das Osteon, dar. Es besteht aus einer Kapillare im Zentralkanal, die aus den Gefäßen der Volkmannschen Kanäle gespiesen und zentrifugal von Knochenlamellen umgeben wird, deren Kollagenfasern spiralgig und antiparallel gewunden sind. Interessanterweise haben Osteone eine konstante Dicke von ca. 200  $\mu\text{m}$  welches der später noch erwähnten 'Jumping Distance' der primären Knochenheilung entspricht. Diese Distanz scheint eine limitierende Größe der Diffusionskapazität für Stoffwechselprodukte und Gasaustausch zu sein<sup>10</sup>, da die eingemauerten Osteozyten nur über eine durch Gap-Junctions<sup>11</sup> verbundene Zellkette und den feinen perizellulären Raum miteinander und mit dem Zentralgefäß verbunden sind. Die Osteozytengemeinschaft eines Osteons stellt gewissermaßen einen 'natürlichen Kommunismus'<sup>12</sup> des Stoffwechsels dar. Sowohl in der späteren Kompakta, wie auch der Spongiosa stellen diese, den Lamellenknochen ausmachenden Osteone das Grundelement für den trajectoriellen Aufbau des Knochens dar. Das ständige Remodeling durch die BMU's sichert die Plastizität der funktionellen Adaptation des lebendigen Knochengewebes und beugt Alterungserscheinungen durch Mikrofrakturen oder Mikroinfarkte vor.

### 1.2.2. Primäre Knochenheilung

Kommt es nun zu einer Fraktur, so sind therapeutisch hinsichtlich des Heilungsverlaufes prinzipiell zwei Wege offen. Bei stabiler Osteosynthese durch Kompressionsplatten beispielsweise, kommt es zur sogenannten primären, direkten Knochenheilung. An den Kontaktstellen der Knochenfragmente kann der Spalt direkt von den BMU's überspannt werden, so als ob gar keine Fraktur vorläge (Kontaktheilung). Ist ein Spalt bis zu ca. 200  $\mu\text{m}$  ('Jumping-Distance' der direkten, lamellären Spaltheilung) vorhanden, wird er durch einwandernde Osteoblasten mittels Anlagerung lamellären Knochens auf die nicht vorher durch Osteoklasten resorbierten Frakturflächen<sup>61</sup> aufgefüllt und anschließend durch Haverschen Umbau stabilisiert (Spaltheilung). Größere Spalten bis zu höchstens einem Millimeter ('Osteogenetic Jumping Distance') werden zunächst innerhalb von vier bis sechs Wochen durch Faserknochen überbrückt und anschließend 'remodeled'. Übersteigt der Defekt diese kritische Distanz bei stabiler Fixierung der Fragmentenden, so nimmt die Konsolidierung wesentlich mehr Zeit in Anspruch<sup>13</sup> oder es resultiert eine Pseudarthrose.

### 1.2.3. Sekundäre Knochenheilung und Phasenmodell des Distraktionscallus

Bei instabiler, beispielsweise mit Fixateur Externe oder Gips behandelter Fraktur oder gar natürlicher Frakturheilung kommt es erst über den Umweg der Callusbildung zur 'sekundären, indirekten Knochenheilung'. Hier schient die Natur, die Fraktur sukzessive mittels immer stabilerer Gewebe (siehe Abbildung 2).

| <b>Gewebe</b>      | <b>Maximale Dehnung</b> | <b>Deformationswinkel</b> |
|--------------------|-------------------------|---------------------------|
| Granulationsgewebe | 100 %                   | 40°                       |
| Bindegewebe        | 5-17 %                  | -                         |
| Faserknorpel       | 10-13 %                 | 5°                        |
| Kompakter Knochen  | 2 %                     | 0,7°                      |

*Abbildung 2: Die Verformungstoleranz interfragmentärer Gewebe wird immer geringer, die Stabilität des Frakturcallus höher. (aus SCHENK (1992)<sup>95</sup>)*

Die Osteogenese des Callus zeigt dabei interessante Parallelen zum enchondralen Knochenwachstum der Epiphysenfuge. Auch hier wird ein Vorgang des 'Modeling' sichtbar, der stufenweise, nebeneinander Osteogenesevorgänge, ähnlich des

enchondralen Knochenwachstums der Epiphysenfuge und des desmalen Knochenwachstums, zeigt und gewissermaßen die Ontogenese des Knochens wiederholt. Bei der Verlängerungsosteosynthese wird dieser Callus gedehnt (Callotaxis), wodurch das Modeling im Sinne des Tension-Stress-Effektes<sup>7</sup> massiv vorangetrieben wird. Vom mikroskopischen Aspekt her zeigt das Callusgewebe ein 'dynamischeres' Bild gegenüber dem eher statisch anmutendem Wachstumsmuster der Epiphysenfuge oder des ruhenden Callus (siehe auch Abb. 85 und 86, Seite 123 und 124). Der Wachstumsprozeß an sich kann jedoch als analog angesehen werden. Einwandernde Osteoklasten 'frischen' hier die Frakturflächen durch partielle Resorption an (siehe folgende Abbildung 3).

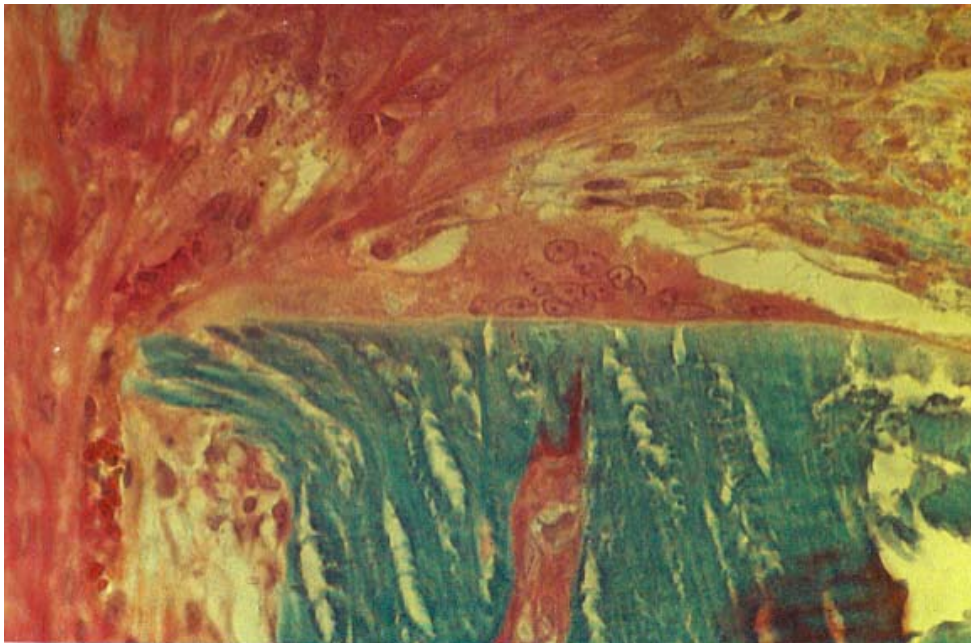
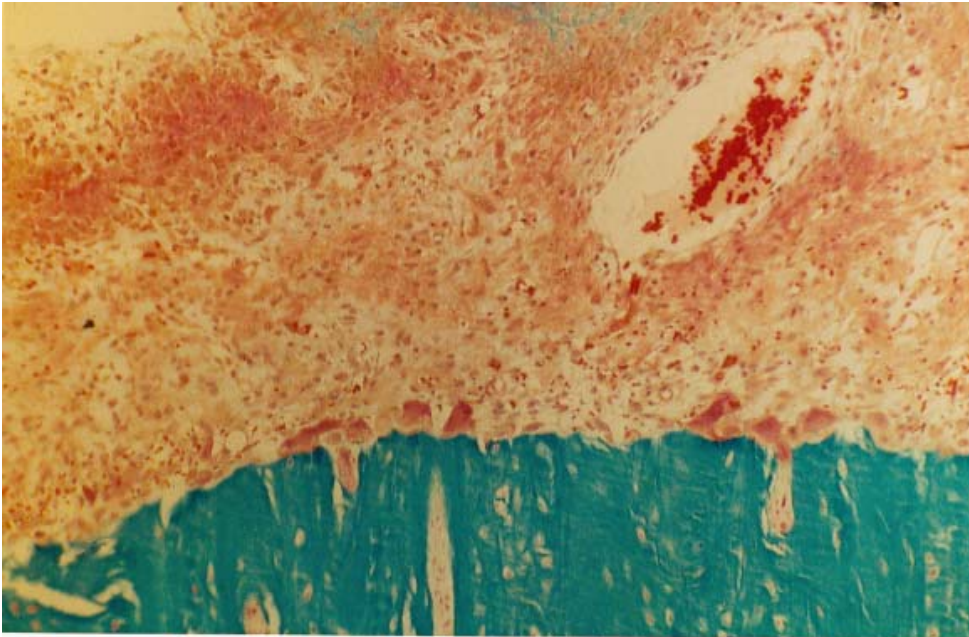


Abbildung 3: Ein eingewanderter Osteoklast überdeckt die Osteotomie-Schnittfläche der Kortikalis und 'frischt' die Oberfläche an. (Trichrom Goldner, 400 fache Vergrößerung, Präparat L1/8 li)



*Abbildung 4: Die von Osteoklasten vorbereiteten Oberflächen der Osteotomie werden von eingewanderten Osteoblasten besiedelt. Man beachte die in die Kortikalis eindringenden Osteoklasten, die hierdurch die Retention des neu entstehenden Callusgewebes mit der Kortikalis erhöhen. (Trichrom Goldner, 100fache Vergrößerung, Präparat L0/13 li T)*

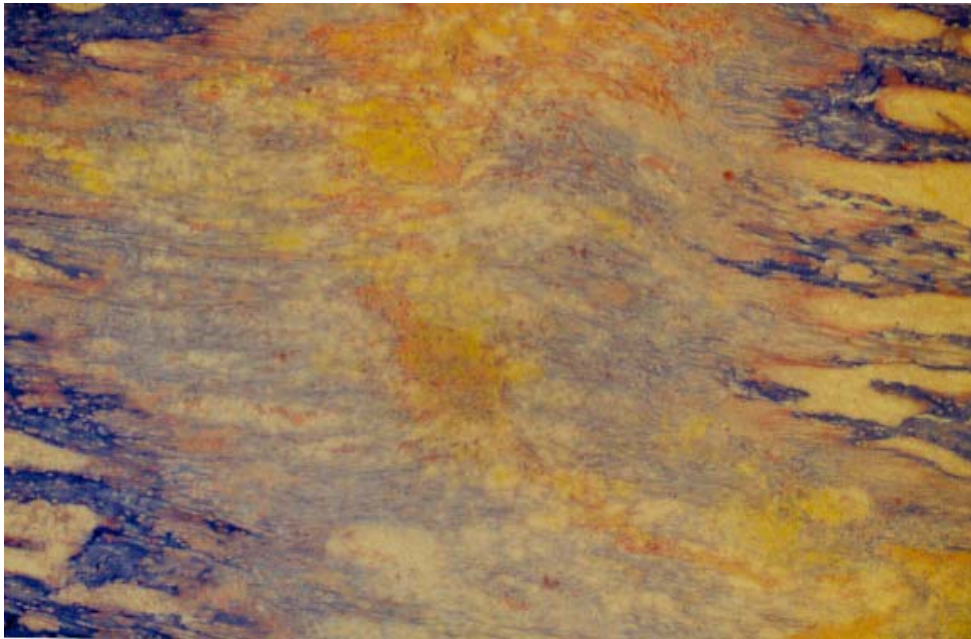
Die in einem ruhenden Callus zeitlich aufeinander folgenden Umstrukturierungs- und Konsolidierungsphasen lassen sich aufgrund der Mikrotraumatisierung der täglichen Distraction der Callotaxis räumlich in einem Zonenmodell aufgliedern, welches den zeitlichen Phasen entspricht (vergleiche auch die histologische Übersichtsaufnahme in Abbildung 91, Seite 144).

In der **ersten Phase** des durch Distraction-Mikrotraumatisierung entstandenen Hämatoms zeigen sich Erythrozytenansammlungen und Fibrinablagerungen (vergleiche auch Abbildung 43, Seite 92). Nach Stabilisierung durch Blutgerinnungsfaktor XIII dient das Fibringerinnsel erstens der Einwanderung von Entzündungszellen zum Zwecke des Abbaus von Gewebedetritus und zweitens als Leitstruktur für die von Endost und Periost einwandernden Osteoprogenitoren.

Die **zweite Phase** wird durch die Strukturierung des Hämatoms durch einwandernde spindelförmige, undifferenzierte Osteoprogenitorzellen mit hoher mitotischer Aktivität und Makrophagen, gefolgt von Kapillaren, bestimmt (vergleiche auch Abbildung 44, Seite 93). Es handelt sich um eine sterile Entzündungsreaktion der unspezifischen Abwehr analog zur Ausbildung eines Granulationsgewebes der Wundheilung.



In der **dritten Phase** differenzieren sich die eingewanderten Osteoprogenitorzellen zunehmend und nehmen die Synthese von Kollagen und Interzellulärsubstanz zu Ungunsten ihrer mitotischen Aktivität auf.



*Abbildung 5: Die Phasen 1 bis 6 in einem Übersichtsbild. Man erkennt mittig die gelben Erythrozyten, das gelb-rötlich angefärbte Fibrin, blaues Kollagen, Osteochondroblastensäulen und dunkelblaue Primärtrabekel. (Carstairs, 40 fache Vergrößerung, Präparat L0/9 li)*

Die **vierte Phase** ist durch die Ausbildung von chondroidem Gewebe gekennzeichnet. Wie die PAS-Reaktion der Alzianblau-PAS Färbung dokumentiert, steht die Synthese und Glukuronidierung der Interzellulärsubstanz im Vordergrund. Die osteochondroblastären Zellen erscheinen im Vergleich zu den anderen Zonen maximal groß und zeigen zum Teil Zeichen des Zelluntergangs wie Kernpyknosen und Nukleoklasie.

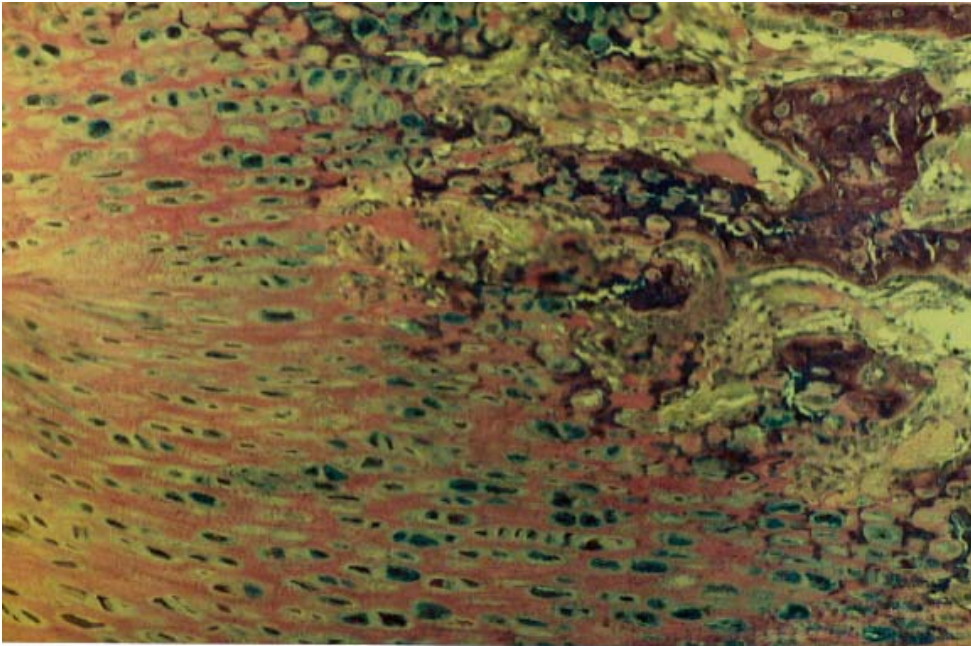


Abbildung 6: Osteochondroblastäre Zellen mit gut sichtbarem, türkisblauen Cytoplasma (Granula), das als histologisches Korrelat der intrazellulären Proteinsynthese und -Glukuronidierung anzusehen ist. Unten mittig sind Zellen eines 'Chondrons' nach einer Mitose zu sehen. Im rechten Bildabschnitt sind schon von verkalkender Grundsubstanz eingeschlossene Zellen mit Kernpyknosen sichtbar. (Alzanblau-PAS, 100 fache Vergrößerung, Präparat L0/5 li T)

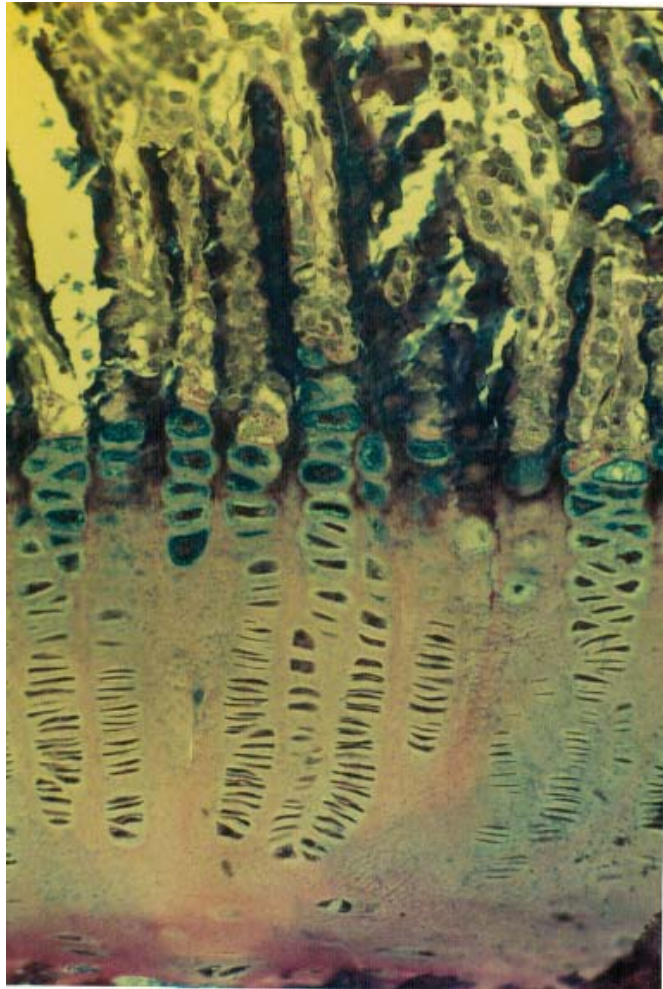


Abbildung 7: Die Epiphysenfuge als Pendant der obigen Abbildung 6. Auch hier sind deutlich PAS-positive Granula im Zellplasma der hypertrophen Chondroblasten der Säulenknorpelzone zu erkennen. (Alzanblau-PAS, 200 fache Vergrößerung, Präparat L1/14)

Durch die ungenügende Stoffwechsellage und die beschränkt auftretenden Zelluntergänge der nicht kapillarisierten Osteochondroblastenzone werden Osteoklasten aus dem Knochenmark chemotaktisch angezogen und eröffnen - ähnlich der Aufschließungszone der Epiphysenfuge das Gewebe. Die ihnen folgenden Gefäße rekapillarisieren das unterversorgte Gewebe und ermöglichen eine Weiterdifferenzierung der osteochondroblastären Zellen. Es handelt sich bei dieser **fünften Phase** also im Gegenteil zur Aufschließungszone der Epiphysenfuge nicht um einen vollständigen Ersatz untergegangenen Knorpelgewebes, sondern um die Realisation eines, die Weiterdifferenzierung ermöglichenden Anschlusses an die Blutversorgung des restlichen Knochenorgans.

Die *sechste Phase* ist gekennzeichnet durch inzwischen zu Osteoblasten umgeformte Zellen, welche durch Anlagerung von Osteoid an die interkolumnalen Septen die Primärspungiosa bilden.

In der letzten, *siebten Phase* werden der Kortikalis anliegende Faserknochenbälkchen im Haverschen Umbau von den BMU's erfaßt und in den tragfähigeren Lamellenknochen umgebaut.

Die genauen Vorgänge auf zellulärer und biochemischer Ebene sind u. a. Hauptgegenstand der Promotionsarbeit meines Condoktoranden Björn BIRKENHAUER<sup>14</sup>, die sich näher mit den Fragen der zellulären Interaktion samt Regelung durch Cytokine befaßt.

#### 1.2.4. Knochen und das Blutorgan

Die Osteogenese und Frakturheilung stellt einen komplexen, mit vielerlei, zunächst einmal nicht 'zur Sache gehörig' scheinenden, körperlichen Regulationssystemen interagierenden Vorgang dar. So kommt es bei der Fraktur sofort zu einer Blutung, deren Stillung durch Plättchenaggregation und die bekannte Gerinnungskaskade den Grundstein zur späteren Gewebeformation legt. Schon 1905 wies übrigens BIER<sup>15</sup> auf die Bedeutung des Frakturhämatoms hin. Er hatte Pseudarthrosen durch lokale Bluteinspritzung behandelt. TASHIBANA et al. (1991)<sup>16</sup> zeigten einen deutlich proliferativen Effekt eines Frakturhämatom-Extraktes auf osteogene Stammzellen.

Durch das entstehende Fibringerinnsel wird die Fraktur erstmals stabilisiert und eine Struktur für die folgende Einwanderung von Osteoprogenitorzellen und Entzündungszellen geschaffen. Die unspezifische Entzündung geht mit der Freisetzung einer Reihe von Cytokinen einher, die eine chemotaktische und proliferative Wirkung auf Osteoprogenitoren und Kapillarzellen in der Frühphase und auf Osteoklasten, Osteoblasten sowie Kapillarzellen in der Spätphase der Konsolidierung ausüben. Somit sind Blutzellen, Zellen der unspezifischen Abwehr des MPS, eminent wichtig zur Einleitung der weiteren Osteogenese. So verstärkt Interleukin 1 die Knochenresorption, die Osteoblastenreplikation und die Kollagensynthese der Osteoblasten. TNF  $\beta$  veranlaßt Osteoblasten zur Vermehrung, vermindert jedoch deren Kollagensynthese. CSF (Colony Stimulating Factor) bewirkt eine Vermehrung der Osteoklasten, was durch PTH noch verstärkt wird und Interferon (INF  $\gamma$ ) inhibiert die Osteoblastenproliferation, die Knochenresorption sowie die Kollagensynthese<sup>27</sup>.

Die Rolle von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren bei der Osteogenese spiegelt ein Experiment von GAZIT et al. (1990)<sup>17</sup> wieder. Eine Knochenmarksentfernung an beliebiger Stelle beschleunigte deutlich die knöchernen Heilung, was auf eine systemische Freisetzung osteomyelotoper, osteogenetischer Wachstumsmediatoren hinweist.

URIST (1983)<sup>18</sup> beschreibt die durch BMP induzierte Zelldifferenzierung von perivaskulären Mesenchymzellen zu Osteoprogenitorzellen. Interessanterweise kommt es bei durch BMP heterotop, in Muskelgewebe induziertem Knochenwachstum<sup>18</sup> nicht nur zur Fibrosierung, und anschließenden Bildung von Knorpel und Knochengewebe, sondern zentral auch zur Bildung von hämatopoetischem Knochenmark, womit sich der Kreis bildlich gesprochen wieder schließt. Es besteht also auch hier wieder eine enge Beziehung zum Blutorgan, man könnte im Ganzen nicht nur von der Osteogenese im Speziellen, sondern von der Organogenese des Organs Knochen sprechen. Somit wird hier die Bedeutung eines Blutgerinnungsfaktors und des Zusammenspiels von Cytokinen der unspezifischen Immunabwehrzellen bei der Osteogenese dokumentiert.

### 1.3. Ansätze zur pharmakologischen Osteoinduktion - osteoinduktive Substanzen

Substanzen oder andere situative oder funktionelle Einflußgrößen, die Knochenmetabolismus und -wachstum direkt oder indirekt beeinflussen, sind in der Literatur zahlreich beschrieben. Eine nach Ort und Art der Wirkung gegliederte Übersicht gibt Abbildung 8.

| Lokale Wachstumsfaktoren   | Systemische Wachstumsfaktoren                    |  |
|--|--|--|
| Bone morphogenetic protein (BMP)   | Epidermal growth factor (EGF)                    |  |
| Skeletal growth factor (SGF)   | Fibroblast growth factor (FGF)                   |  |
| Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )                                  | Plateled-derived growth factor (PDGF)            |  |
| Tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ )  | Insulin-like growth factors (IGF, Somatomedin C) |  |
| Osteoclast activating factor (OAF, IL-1 $\beta$ )                                    |  |  |
| Bone derived growth factor (BDGF entspricht $\beta_2$ -Mikroglobulin <sup>19</sup> ) |  |  |
| Cartilage-derived factor   |  |  |
| Prostaglandine (PgE <sub>2</sub> )   |  |  |
| Plateled-derived growth factor (PDGF)  |  |  |

| Hormone, Vitamine                  | Lokale Umgebung                                    | Andere Faktoren          |
|------------------------------------|--|--------------------------|
| Somatotropin (STH, hGF)            | Extrazelluläre Matrix                              | Elektomagnetische Kräfte |
| Insulin                            | Plasma Proteine (Fibrin, Fibronectin, Faktor XIII) | Mechanische Kräfte       |
| Glukocorticoide                    | Durchblutung, metabolische Versorgung              | Gravitationskräfte       |
| Schilddrüsenhormone                | Zellmetabolismus                                   | Virale Beeinflussung     |
| Parathormon (PTH)                  |  | Alter                    |
| Calcitonin                         |  | Metabolismus des Körpers |
| Östrogene, Progesterone, Androgene |  |                          |
| Vitamin D, A, K                    |  |                          |

Abbildung 8: Einige Faktoren, die das Knochenwachstum beeinflussen (ergänzt nach Triffitt (1987)<sup>20</sup>)

Sekretions- und Angriffsort der Faktoren sowie Kybernetik der Regelkreise sind zum großen Teil noch Gegenstand der Forschung und sollen hier nicht ausführlich

besprochen werden. An dieser Stelle möchte ich nochmals auf die Arbeit meines Kollegen Björn BIRKENHAUER<sup>14</sup> verweisen, der sich näher mit der Interaktion zwischen Zellen der Osteogenese und immunkompetenten Zellen mittels Cytokinen auseinandersetzt.

Zielzellen der Steuerungsvorgänge sind Osteozyten, bzw. Osteoblasten und ihre Vorläuferzellen auf der 'Habenseite' der Knochenumbau Bilanz und Osteoklasten auf der 'Saldoseite'. Auf- und Abbau von Knochensubstanz müssen jedoch in einem sinnvollen Zusammenhang stehen, was einen weiteren Regelmechanismus erfordert. Nach der 'Coupling-Hypothese'<sup>21</sup> wird dies von einem oder mehreren 'Coupling-Faktoren' bewerkstelligt, über die sich die beiden Antagonisten-Zellgruppen auf unterschiedlicher Regulationsebene und in unterschiedlichem Aktivierungsgrad (Proliferation, Differenzierung, Funktionsaktivierung und -hemmung) beeinflussen. Hypothetische Couplingfaktoren und Substanzen, die während dieser Aktivierungsgrade auf die Zellen einwirken, sind in Abbildung 9 ohne Anspruch auf Vollständigkeit aufgeführt.

| <b>Steuerung der Osteoblasten</b> |                        |   |                         |
|-----------------------------------|------------------------|---|-------------------------|
| <i>Proliferation</i>              | <i>Differenzierung</i> | <i>Funktionsaktivierung</i>                 | <i>Funktionshemmung</i> |
| TNF                               | <b>PTH</b>             | 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>        | PTH                     |
| <b>BDGF</b>                       | <b>BMP</b>             | IGF (hGH, T <sub>3</sub> , T <sub>4</sub> ) | Glukokortikoide         |
|                                   |                        | <b>TGF<sub>β</sub></b>                      | TNF <sub>α</sub>        |
|                                   |                        | PDGF  | <b>TGF<sub>α</sub></b>  |

| <b>Steuerung der Osteoklasten</b>        |                                      |  |                         |
|--|--------------------------------------|--|-------------------------|
| <i>Proliferation von Vorläuferzellen</i> | <i>Fusion und Differenzierung</i>    | <i>Funktionsaktivierung</i>  | <i>Funktionshemmung</i> |
| <b>TGF<sub>α</sub></b>                   | 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> | <b>PgE<sub>2</sub></b> } Sekretion d.<br><b>TGF<sub>β</sub></b> } PTH-aktiv.<br><b>IL-1</b> } Osteoblasten | Calcitonin              |
| EGF                                      |                                      | <b>TGF<sub>α</sub></b>   |                         |
| Kollagen I                               |                                      | OAF (IL-1 <sub>β</sub> )   |                         |
| <b>Osteokalzin</b>                       |                                      | FGF  |                         |

Abbildung 9: Aufführung einiger Mediatoren und Hormone, die Osteoblasten und -klastenaktivität steuern. Die am 'Coupling' beteiligten, auto, bzw. parakrinen Mediatoren und PTH sind fett gedruckt. (nach A. Schulz<sup>22</sup>)

Es ist hier jedoch zu einfach, den Osteoklasten nur eine katabole Rolle in der Osteogenese zuzuschreiben. Nebst ihrer Rolle im Abbau von nekrotischem Knochenmaterial sind sie Wegbereiter der Rekapillarisation des sich konsolidierenden

Callusgewebes und damit indirekt an höchst anabolen Vorgängen in der Osteogenese beteiligt. Hier wird auch deutlich, daß Faktoren und Cytokine der Angiogenese wie der Endothelzell-stimulierende Angiogenese Faktor (ESAF) (TAYLOR et al. 1993<sup>23</sup>), der während der unspezifischen Entzündung ausgeschüttet wird, indirekt an der Osteogenese beteiligt sein müssen. Wie schon erwähnt verbildlicht diesen biochemisch kompliziert geregelten Zusammenhang die funktionelle Trias der BMU im Remodeling-Vorgang: Ein Osteoklast resorbiert, von lokalen Mediatoren angezogen, defekte Knochensubstanz, ermöglicht aber so das Eindringen von Osteoblasten und zur Versorgung nötigen Kapillaren und damit die Bildung neuen Knochengewebes. Er ist also sehr wohl indirekt an anabolen Vorgängen in der Knochenhomöostase beteiligt. Auf biochemischer Ebene bedeutet dies, daß es jeweils Mediatoren in der ruhenden Knochensubstanz geben muß, die bei deren Alteration frei werden (Sekretionsprodukte der Osteozyten oder matrixeigene Mediatoren) und Osteoklasten chemotaktisch anlocken und aktivieren. Die Interaktion zwischen diesen Osteoklasten und den einwandernden Kapillarendothelzellen und den Osteoblasten erfordert wiederum Mediatoren wie Cytokine, die die Osteoblastenproliferation -migration und -proteinsynthese steuern, sowie Angiogenesefaktoren zur Steuerung der Endothelzellproliferation (siehe Abbildung 10). Für die Osteogenese des Distraktionssegmentes sind ähnliche Regulationsmechanismen anzunehmen.

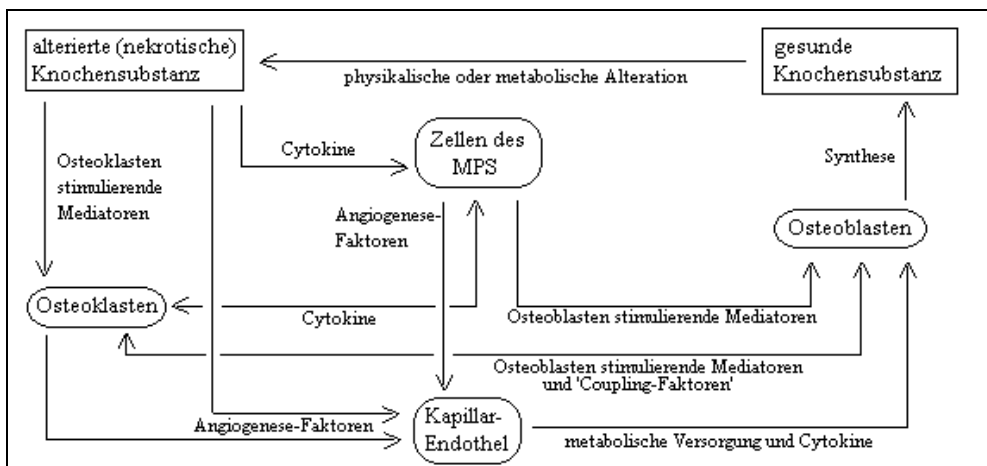


Abbildung 10: Darstellung der vielfältigen Interaktion der an der Osteogenese beteiligten Zellgruppen mittels lokaler Mediatoren. Obwohl die Abbildung keinen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt und zeitliche Zusammenhänge nicht berücksichtigt, gibt sie einen groben Überblick über mögliche Vorgänge sowohl des Remodelings wie der Neoosteogenese während der Frakturheilung oder der Callotaxis.



Betrachtet man speziell das Geschehen während der Frakturheilung, so lassen sich bestimmte Mediatoren den verschiedenen Heilungsphasen zuordnen und hier eine, das Knochenwachstum beeinflussende Rolle postulieren. Abbildung 11 zeigt eine Aufstellung über während der verschiedenen Osteogenesephasen freigesetzte und auf verschiedene Zellpopulationen wirkende Mediatoren.

### Knochenfördernde Mediatoren auf dem Weg vom Hämatom zum Knochen

#### ① Gerinnungsphase

*Mediatoren des Blutes, welche sich auf die Osteogenese auswirken*

- **Faktor XIII:**
  - Stabilisierung des Fibringerinnsels
  - Migration von Fibroblasten in Fibringerinnsel
  - Crosslinking von Fibronectin an Fibrinogen, Fibrin und Collagen
  - Fibronectin an denaturiertes wie natives Collagen gebunden wirkt chemotaktisch auf Fibrozyten
- **Fibronectin:** entspricht **Osteonectin**<sup>24</sup>, postulierter Mediator der Kalzifizierung des Kollagen<sup>112</sup>
- **Scatter Factor:** funktionell analog dem Plasminogen entspricht er dem Hepatocyte Growth Factor (HGF), einem Breitspektrummitogen und Angiogenesefaktor<sup>25</sup>
- **Fibrinspaltprodukte:** haben eine angiogenetische Wirkung<sup>26</sup>
- **PDGF:** Von degranulierenden Thrombozyten freigesetzt, steigert es die Vaskularisation des Knochens und die Kollagensynthese von Osteoblasten, sowie die Vermehrung von Osteoklasten und Osteoblasten<sup>27</sup>

#### ② Phase der unspezifischen Entzündung und Rekapillarisierung

*Von immunkompetenten Zellen freigesetzte Mediatoren, welche die Osteogenese regulieren*

- **ESAF:** Endothelzell-stimulierender Faktor wirkt mitogen und angiogen<sup>23</sup>
- **IL-1:** proliferative Wirkung auf Osteoblasten<sup>22</sup>
- **IL-8:** von Zellen des MPS sezerniertes Interleukin 8 wirkt angiogenetisch<sup>28</sup>
- **PgE<sub>2</sub>:** steigert die Kollagensynthese von Osteoblasten und wird autokrin auch von diesen freigesetzt<sup>27</sup>
- **TGF<sub>β</sub>:** steigert osteoblastäre Synthese von Kollagen, Osteonectin, alk. Phosphatase, Osteopontin und Osteocalcin<sup>27</sup>.
- **TNF<sub>β</sub>:** von aktivierten Makrophagen sezerniert, steigert es die Osteoblasten-Proliferation, hemmt jedoch die Kollagensynthese<sup>27</sup>
- **FGF:** von verletzten Endothelien sezerniert steigert er Kollagen- und Osteocalcinsynthese<sup>27</sup> und die Angiogenese<sup>29</sup>

*Fortsetzung nächste Seite*

### Knochenfördernde Mediatoren auf dem Weg vom Hämatom zum Knochen

#### ③ Phase der Osteoprogenitorzelleinwanderung und Differenzierung

*Mediatoren, welche von Knochenzellen sezerniert oder von der Matrix freigesetzt werden*

- **BMP:** Bone Morphogenetic Proteine als Teil der nicht kollagenösen Knochengrundsubstanz induziert Zelldifferenzierung zu Osteoblasten<sup>18</sup>, wirkt proliferativ auf osteogene und chondrogene Stammzellen und forciert den Matrixaufbau<sup>30</sup>
- **BDGF:** regt Proliferation von Osteoblasten an<sup>18</sup>
- **Osteocalcin:** Chemotaktische Wirkung auf Osteoklasten, sezerniert durch Osteoblasten<sup>22</sup>
- **OIF:** Der in mineralisierter Matrix enthaltene Osteoinductive Factor steigert TGF- $\beta$ -abhängig die osteoblastäre alkalische Phosphatase und hemmt Osteoklastenvorläufer<sup>31</sup>
- **IGF-I und IGF-II:** von Knochenzellen sezerniert steigern die Insulin-like-Growth-Factors Proliferation, Differenzierung und Matrix- sowie Kollagensynthese der Osteoprogenitorzellen<sup>32</sup>
- **TGF $\beta$ :** inhibiert überschießende Proliferation osteogener Zellen bei gleichzeitiger Steigerung der Kollagensynthese. Die Gruppe dieser Cytokine werden vom Knochen sezerniert und in der Matrix gespeichert<sup>32</sup>
- **FGF:** von Osteoblasten in die Matrix sezerniert, stimuliert er Migration, Proliferation und Differenzierung osteogener Zellen<sup>32</sup>
- **PDGF:** als Matrix-Protein wirkt der Faktor als Mitogen auf alle Zellen des Knochenstoffwechsels<sup>33</sup>

#### ④ Phase der Remodelierung durch vom Mark einwandernde Osteoklasten

*nebst der nicht aufgeführten Interaktionen von Osteoklasten mit Gefäßendothelien beeinflussen sich Osteoklasten und -blasten gegenseitig*

- **JE:** Osteoblasten bilden unter dem Einfluß von PDGF oder IL-1 $\beta$  Monocyte chemoattractant protein-1 (JE), welches auch auf Osteoklasten chemotaktisch wirkt<sup>34</sup>
- **ORSA:** Osteoclast resorption stimulating activity wird von Osteoblasten synthetisiert und steigert die Osteoklastenvorläufer-Proliferation<sup>35</sup>
- **BGF:** Osteoklasten bilden einen Bone Growth Factor, der einen mitogenen Effekt auf Osteoblastenvorläufer hat<sup>36</sup>
- **IL-1:** proliferative Wirkung auf Osteoblasten<sup>22</sup>

*Abbildung 11: Übersicht über die während der verschiedenen Frakturheilungsphasen freigesetzten Mediatoren und ihre Wirkung*

Obgleich viele der regelnden Zusammenhänge noch nicht verstanden sind, wurden bereits *in vitro* wie *in vivo* zahlreiche Versuche hinsichtlich der Osteoinduktion durchgeführt. Hierbei wurden zahlreiche Cytokine und lokale Mediatoren hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Osteogenese untersucht. Es ergibt sich ein kompliziertes, bisher nur in Ansätzen verstandenes, kaskadenartiges Regelsystem auf lokaler, zellulärer Ebene durch Cytokine, das zudem noch Regelmechanismen durch systemische Hormone der Calciumhomöostase und der Wachstumsbeeinflussung unterworfen ist. So ist die theoretische Wirkung eines therapeutisch eingesetzten Cytokins von Ort und Zeitpunkt in der Osteogenese, sowie von Wechselwirkung mit anderen, lokalen Mediatoren und der hormonellen Gesamtsituation des Organismus abhängig und stellt nur eine Stufe der Regelkaskade dar. Zudem stehen Cytokine wie Interleukine und Prostaglandine im Dienste des gesamten Immunsystems und sind bei therapeutischer Gabe mit z. T. massiven Nebenwirkungen vergesellschaftet.

Um nun sinnvoll in die Osteogenese einzugreifen, erscheint es naheliegend und unkomplizierter, entweder systemische Hormone, wie Calcitonin, Vitamin D oder Parathormon, welche die Osteogenese auf höherer Ebene, jedoch mit relativ indirekter Kybernetik regeln, zu untersuchen, oder lokale Mediatoren einzusetzen, die spezifisch der Osteogenese eigen sind.

#### **1.4. Lokale Applikation an Knochengewebe**

##### **1.4.1. Technische Möglichkeiten**

Die einfachste Möglichkeit der lokalen Applikation stellt die Injektion des Wirkstoffes in das Distractionssegment dar. Aufgrund des hohen Infektionsrisikos bei täglicher Behandlung und der Unsicherheit der korrekten Platzierung der Nadelspitze sollte es hier jedoch bei der theoretischen Überlegung bleiben. In der Unfallchirurgie haben sich bei der Osteomyelitis-Therapie PMME-Ketten<sup>44</sup>, mit dem Therapeutikum beladen, verdient gemacht. Diese müssen allerdings nach einiger Zeit entfernt werden und hinterlassen einen Hohlraum, der infektionsgefährdet und im Distractionssegment nicht erwünscht ist. Vorteilhafter wären hier resorbierbare Träger aus D,L-Milchsäure-Oligomer<sup>45</sup> oder Polyorthoester<sup>46</sup> in Kugel- oder Granulatform. Eine weitere Möglichkeit der kontinuierlichen, lokalen Gabe sind epifaszial zu positionierende Miniatur-Pump-Systeme, welche entweder elektrisch oder über einen osmotischen Druckgradienten (z. B. Alzet® Modell 2ML4, Fassungsvermögen 2,2 ml)<sup>48</sup> betrieben werden. Hier könnte jedoch das Fassungsvermögen gerade für die Behandlung mit Faktor XIII limitierend sein. Die nebst resorbierender Träger wohl praktikabelste Lösung besteht in der Verwendung eines Intraport-Systems, wie sie beispielsweise bei

der Schmerzbehandlung von Tumorkranken verwendet werden. Sie wurden auch in diesem Tierversuch verwandt, können beliebig perkutan punktiert und befüllt werden und obliegen einer geringen Infektionsgefahr. Über einen kleinen, exakt positionierten Katheter läßt sich die Distraktionszone gut lokal behandeln.

### **1.5. Das Marburger Callotasis-Modell**

Mit dem in der Faktor-XIII-Arbeitsgruppe<sup>58</sup> vormals erarbeiteten, monolateralen Miniatur-Fixateur-Externe wurde es möglich, an kleinen Versuchstieren, wie Kaninchen eine Verlängerungsosteosynthese, auch Callotasis genannt, durchzuführen. Das erzeugte Distraktionssegment kann z. T. hinsichtlich seiner Morphologie mit einer embryonalen Wachstumsfuge verglichen werden und weist alle Stadien der Osteogenese und des Knochenwachstums auf. Betrachtet man das Segment in Längsrichtung, so kann eine zeitliche Zonengliederung vorgenommen werden (siehe auch Seite 144, Abbildung 90), da Veränderungen nach der jüngsten Distraktion sich in der mechanisch noch instabilen Mitte des Präparates niederschlagen, während die älteren Segmente sich, zeitlich gemäß der Distraktionsintervalle aufgereiht, bilateral, von der Mitte abgewandt wiederfinden. Somit sind der Auswertung bestimmter Strukturen während bestimmter Zeitintervalle große Variationsmöglichkeiten gegeben und nicht nur wie bei Bohrlochversuchen z. B. statische, sondern auch dynamische Betrachtungen des Knochenwachstums an einem Präparat möglich.

## 1.6. Klinische Relevanz von Faktor XIII

### 1.6.1. Anwendung bei verschiedenen Krankheiten

Bisher wurde Faktor XIII bei zwei großen Gruppen von Störungen angewendet:

Bei den *kongenitalen*, autosomal rezessiv vererbten Faktor-XIII-A-Defizienzen mit konsekutivem Mangel der B-Untereinheit ( $\beta_2$ ), welche durch die Konzentration der A-Untereinheit ( $\alpha_2$ ) in ihrer Expression geregelt wird<sup>135</sup>, kommt es häufig zu der bekannten verzögerten Blutung, zu Aborten, Wundheilungsstörungen oder intracraniellen Hämorrhagien. Ein neuerlich beschriebener kongenitaler Mangel der B-Untereinheit<sup>148</sup> geht mit ähnlichen Symptomen einher, wie der bekanntere Faktor-XIII-A-Mangel (Mangel der A-Untereinheit), da die B-Untereinheit das aktive Dimer vor dem proteolytischen Abbau oder der Aktivierung im Plasma schützt. Auch hier wird ein autosomal-rezessiver Erbgang angenommen.

Die *erworbenen* Faktor-XIII-Mangelkrankheiten sind vielfältig und gehen meist mit einer übermäßigen, chronischen Verbrauchslage des Faktors einher. Doch hier ist es oft schwer zu entscheiden, was Ursache und Folge ist, da ein bestehender Faktor-XIII-Mangel sich selbst in einem circulus vitiosus perpetuieren kann, insofern als, einfach ausgedrückt, Blutungen durch Verlust der Blutgerinnungsfaktoren wiederum Blutungen hervorrufen. So stehen hier die disseminierte, intravasale Gerinnung besonders im septischen Schock, die postoperative Phase größerer Operationen, thrombohämorrhagische Störungen bei beispielsweise Subarachnoidealblutungen oder chronischem Ulcus cruris im Vordergrund.

Doch auch Störungen der Proteinsynthese wie Leberkrankheiten, Leukämien und andere Malignome, und chronisch entzündliche Prozesse, die u. a. mit einer Funktionsstörung der Kapillarwände im Sinne einer zu hohen Permeabilität einhergehen, wie Cholangitis ulcerosa, Morbus Crohn, Vaskulitiden wie der Purpura Schönlein-Henoch, Kollagenosen wie der Sklerodermie und Rheumatoide Arthritis, weisen erniedrigte Aktivitäten auf und können mit Faktor XIII behandelt, bzw. substituiert werden<sup>37</sup>.

Ebenfalls Wundheilungsstörungen nach Irradiation, bei Tumor- oder Diabetes-Mellitus-Patienten lassen sich durch Gabe von Faktor XIII günstig beeinflussen<sup>38</sup>.

### 1.6.2. Klinische Anwendung mit dem Ziel der Osteoinduktion

LANG (1978)<sup>39</sup> zeigt an Fallbeispielen die positive Wirkung von Faktor XIII auf die Heilungsverläufe von Frakturen. SALZMANN (1976)<sup>40</sup> beschreibt einen Fall eines

Patienten mit mehrfachen Frakturen beider unterer Extremitäten, dessen Plattenosteosynthese selbst nach mehrfacher Reoperation und Gipstutor stetig instabil wird und intraoperativ keinerlei Bindegewebsreaktion zeigt. Die Faktor-XIII-Spiegel sind normal. Zwei Wochen nach Faktor-XIII-Gabe und drei Wochen nach der letzten Operation wird bei der Röntgenkontrolle erstmals Kallus beschrieben. Nach 11½ Wochen kann der Patient schließlich nachhause entlassen werden.

GERNGROSS (1991)<sup>41</sup> beschreibt die positive Wirkung auf den Konsolidierungsvorgang bei Pseudoarthrose-Patienten. Hierbei bezieht er sich auf eine prospektive, kontrolliert, randomisiert durchgeführte Studie von 1987<sup>42</sup>, in der standardisiert operierte Pseudoarthrose-Patienten über die erste Woche p. o. zweimal täglich 1250 I. E. Faktor XIII (Fibrogammin HS®) i.v. erhielten. Die Faktor-XIII-Plasma-Spiegel der Kontrollgruppe fielen von Tag 1 bis 3 nicht signifikant, um ab Tag 5 wieder normale Spiegel zu erreichen, während die Verumgruppe in der ersten Woche stetig steigende Spiegel aufwies. Die Auswertung des klinischen Verlaufs und der Röntgenbilder ergab für die Faktor-XIII-behandelten Patienten eine frühere Vollbelastung der operierten Pseudoarthrose, eine Verminderung der Reoperationshäufigkeit, sowie einen früheren knöchernen Durchbau, der mit durchschnittlich 16 Wochen signifikant vor der Kontrollgruppe mit 24 Wochen erreicht war.

SCHLENZKA et al. (1993)<sup>43</sup> beschreiben in einer klinischen Studie eine signifikante Beschleunigung der knöchernen Heilung durch frühe systemische Gabe von Faktor XIII.

### **1.7. Ziel und Fragestellung der vorliegenden Studie**

Die bisherigen Ausführungen über die Knochenheilung, insbesondere deren Regulation durch biochemische Signale lassen auf die Möglichkeit einer therapeutischen Intervention mit dem Ziel der Osteoinduktion und damit der Beschleunigung von Knochenheilungsvorgängen schließen. Unter der Vielzahl theoretisch denkbarer Wirkstoffe wurde neben den schon oben genannten Arbeiten auch von der Marburger Arbeitsgruppe (PISTOR 1992)<sup>58</sup> Blutgerinnungsfaktor XIII als besonders aussichtsreicher Osteoinduktor in einer tierexperimentellen Studie beschrieben. Nie wurde jedoch die Möglichkeit einer lokale Applikation und deren Wirksamkeit von Faktor XIII untersucht. Vorteile wären hier doch in einer höheren lokalen Konzentrierbarkeit bei geringeren systemischen Spiegeln und niedrigerem Bedarf des teuren Blutplasmaprodukts zu erwarten. Dies galt es in der vorliegenden Studie zu untersuchen.



## 2. MATERIAL UND METHODIK

### 2.1. Kurzbeschreibung des Versuchs

Für den vorliegenden Versuch wurden insgesamt 28 Kaninchen des Stammes Chinchilla-Bastard im Alter zwischen 16 und 21 Wochen operiert. Die Tiere wurden auf zwei Gruppen à 14 Tiere - eine Verum- und eine Kontroll-Gruppe - verteilt. In einer standardisierten Osteodistraktionssynthese wurden beide Femora nach dem erforderlichen Haut- und Faszienschnitt mittels vierer Schanzscher Schrauben (Durchmesser 3 mm) gefaßt und ein eigens hierfür entwickelter Fixateur Externe, in seiner Länge stufenlos verstellbar, angebracht. Anschließend erfolgte an dem so ohne mechanisches Spiel stabilisierten Femur mittels einer Miniatur-Trennscheibe aus der Dental-Technik unter Wasserkühlung eine Gewebe-schonende Osteotomie. Ein Intra-Port-Katheter-System wurde subcutan an den Rücken des Tieres gelegt und ermöglichte über das am Osteotomiespalt liegende Katheterende eine keimfreie lokale Applikation von Blutgerinnungsfaktor XIII.

Die Versuchsdauer betrug insgesamt 21 Tage. Während jeden zweiten Tag Faktor XIII appliziert wurde, distrahierte ich lediglich die letzten zwei Wochen. Vor der Operation, sowie an den Tagen 2, 4, 14 und 20 p. o. wurden zusätzlich die Blutplasmaspiegel von Faktor XIII bestimmt.

Die explantierten Distraktionszonen wurden mittels unentkalkter PMME-Kunststoff-Einbettung histologisch aufgearbeitet und in sechs Färbungen an dem Computer-gestützten automatischen Bildanalyse-System Quantimet 500+ der Firma Leica nach Volumendichte des verkalkten Osteoids, Mineralisationsrate des Osteoids, Umfangdichte und Ausrichtung (Anisotropie) der Trabekel, Flächenanteil der Kollagenfasern, sowie Osteoblasten-Zelldichte (Osteoblastenumfang) ausgewertet.

Die statistische Evaluierung erfolgte mittels des verteilungsfreien U-Test nach MANN-WHITNEY, der keine Normalverteilung der Stichproben voraussetzt.

## **2.2. Tierversuchsgenehmigung**

Die Tierversuchsgenehmigung gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes wurde durch den Regierungspräsidenten in Gießen am 29.01.93 unter dem Aktenzeichen 17a - 19c 20 - 15 (1), Tagebuchnummer MR 38 - 1/93 für 80 Kaninchen, mit dem Bescheid auf ein Tierzahlerhöhungsgesuch vom 29.06.93 um weitere 10 Tiere, für somit 90 Tiere bewilligt.

## **2.3. Die Versuchstiere**

### 2.3.1. Auswahl

Gemäß Tierschutzgesetz sollten für Tierversuche möglichst die in der Fauna niedrigst eingestufteten Arten verwandt werden. Zwar handelt es sich bei Blutgerinnungsfaktor XIII um ein phylogenetisch sehr altes Funktionsprotein<sup>135</sup>, Maßgaben an die Vergleichbarkeit mit dem menschlichen Organismus zwangen jedoch dazu, sich für ein warmblütiges Versuchstier zu entscheiden. Hinsichtlich der Operabilität bestanden überdies gewisse Anforderungen an die Größe des Tieres, was uns schließlich in Anlehnung an die in der Literatur auch sonst reichlich beschriebenen Erfahrungen mit dieser Spezies zur Entscheidung für das Kaninchen bewog.

Von Seiten der in Tierversuchen erfahrenen Mitarbeiter der Behringwerke AG wurden uns der wegen seiner Robustheit bekannte Stamm Chinchilla-Bastard empfohlen. Die Tiere beiderlei Geschlechts, welche von einem Zuchtbetrieb (Savo GmbH, Allgäu) bezogen wurden, wogen zwischen 3100 und 4500 g, waren serologisch, bakteriologisch sowie parasitologisch untersucht worden und wurden uns freundlicherweise, wie auch die gesamte Tierhaltung, Materialien und Örtlichkeiten zu den Operationen und zur Histologie, sowie notwendige Medikamente von der Behringwerke AG zur Verfügung gestellt.

### 2.3.2. Markierung

Die Tiere wurden vor der Operation mittels eines wasserfesten Filzschreibers an der Ohrinnenseite mit einer Identifikationsnummer gekennzeichnet. Hierbei gab der erste Buchstabe Auskunft über die Applikationsart (L für lokale Gabe), die zweite Ziffer stand für die zu testende Substanz (0 für die Placebo-, 1 für die Faktor-XIII-Gabe), die durch einen Schrägstrich getrennte dritte Zahl bezeichnete das Kaninchen (1 bis 14). So hieß das erste operierte Kaninchen der Kontrollgruppe, dem lokal das Placebo gegeben wurde, L0/1.

### 2.3.3. Haltung

Die Kaninchen wurden in 80 mal 50 cm großen, 40 cm tiefen Behältern aus Polyethylen, welche ursprünglich der Haltung von Meerschweinchen dienten, gehalten. Die sonst gebräuchlichen Gitterkäfige wurden wegen der Gefahr, daß die Tiere sich mit ihren seitlich abstehenden Fixateurs Externes darin verhakten, vermieden. Der Boden wurde mit mehreren Lagen Zellstoff ausgelegt.

Da die Tiere durchaus noch nach der Operation dazu imstande waren, über die Behälterwände hinweg ihren Nachbarn, den Versuch und sich selber gefährdende Besuche abzustatten, versahen wir die Käfige mit Abdeck-Gittern.

Die Behälter wurden jeweils täglich gereinigt, das ad libidum zur Verfügung gestellte Wasser und das aus in Tabletten gepreßtem Heu bestehende Futter täglich gewechselt. Zusätzlich wurden noch Zylinder aus dem gleichen Futtermaterial in den Käfig gehängt, welche den Tieren das arteigene Nagen ermöglichte.

Die Tierhaltungsräume waren voll klimatisiert, durch eine Zeitschaltuhr wurde die Beleuchtung in festen Intervallen ein- und ausgeschaltet, was einen konstanten Tag-Nacht-Rhythmus gewährleistete. Zusätzlich fiel Tageslicht von einer Fensterfront in den Raum ein.



*Abbildung 12: Operierte Kaninchen mit Fixateur Externe auf der grünen Wiese*

#### 2.4. Der Fixateur Externe

Wir übernahmen aus einem vorausgegangenen Versuch<sup>58</sup> eine monolaterale Fixateur-Externe-Konstruktion, welche sich in der Osteodistraktionssynthese des Kaninchenfemurs schon gut bewährt hatte. Zusammen mit den vier Schanzschen Schrauben wiegt der Apparat 150 g. Bei einem mittleren Tiergewicht von 4 kg und dem durchschnittlichen menschlichen Gewicht von 70 kg wöge die gleiche Konstruktion für den Menschen 2625 g. Die Tiere entwickelten schon nach kurzer Zeit eine erstaunliche Mobilität, machten 'Männchen' und sprangen in Nachbarkäfige.



Abbildung 13: Demonstration der Mobilität der bereits operierten Tiere

Die Distraction mittels des Fixateurs ist durch einen axialen Gewindestangen-Mechanismus (Ganghöhe des Gewindes 0,7 mm), der die ineinander geschobenen Halterungsrohre gegeneinander bewegt, möglich. Die Gewindestange ist an dem Schraubenkopfende in einem kegelförmigen Lager aufgehängt, dessen Reibung eine Dejustierung der vorgenommenen Drehung und damit Distraction verhindert. Auf diesen Achsrohren sind nun Klemmen, längs und in axialer Drehung frei einstellbar, angebracht, auf deren konisch gedrehten Backenhaltern zwei tellerförmige Klemm-Backen, um ihre Achse ebenfalls frei in der notwendigen Ausrichtung einstellbar, angeklemt sind.

Die Schanzschen Schrauben werden schließlich in in den Tellerbacken eingefrästen Rinnen gehalten, Fixierung von Schrauben und Tellerbacken am Backenhalter erfolgt durch denselben Klemmechanismus.

Zur Illustration der immer schwierig in Worten zu fassenden technischen Einzelheiten siehe auch folgende Abbildung 14.

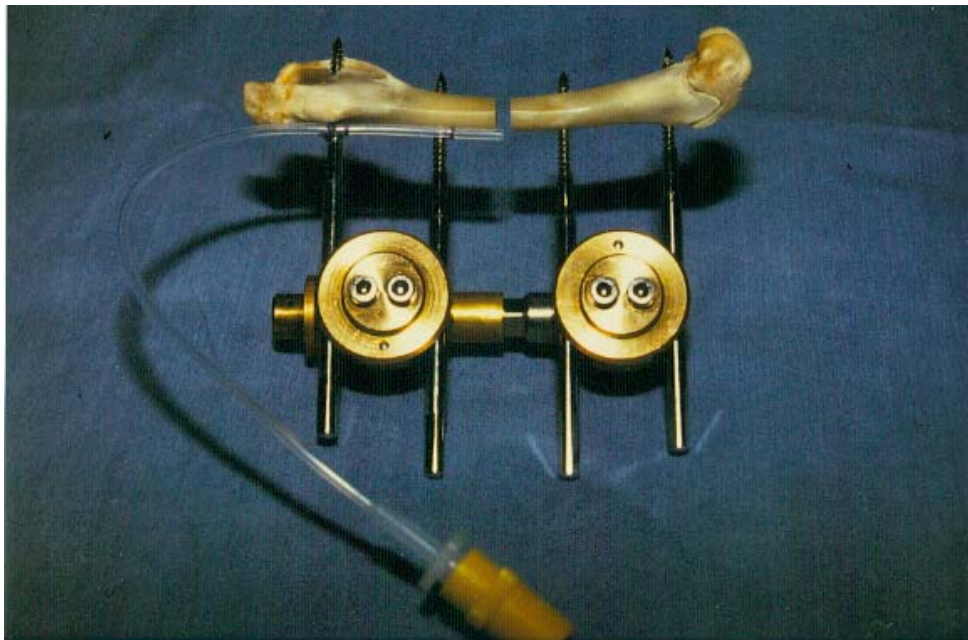


Abbildung 14: Modell des die Osteotomie stabilisierenden Miniatur-Fixateur-Externe mit am Knochen angebrachtem Intraport-Kathetersystem.

## 2.5. Das Intraport-Kathetersystem

Eine lokale Gabe hat, ohne nun auf den jeweiligen Wirkstoff eingehen zu müssen, entscheidende Vorteile gegenüber der systemischen Anwendung. Während bei der

systemischen Applikation einer bestimmten Menge Wirkstoff dieser sich über das gesamte Verteilungsvolumen des Körpers verdünnt und schließlich - von gewissen spezifischen Anreicherungsphänomenen abgesehen - nicht nur am Wirkungsort in einer entsprechend niedrigen Konzentration anfällt, sondern auch mit einer ähnlichen Konzentration und all seinen unerwünschten Nebenwirkungen an anderer Stelle ebenso auftritt, reichern sich bei lokaler Applikation der gleichen Menge Wirkstoff viel höhere Konzentrationen am gewünschten Ort an, bei gleichzeitig fehlender systemischer Nebenwirkung. Dies natürlich vorausgesetzt dem Idealfall, daß keine Resorption des Pharmakons in den Blutkreislauf auftritt.

Nach dem Dictionnaire Vidal, dem französischen Pendant der Roten Liste, ist z. B. Fibrogamine® kontraindiziert bei Thrombosen oder Zuständen der intravaskulären Gerinnung. Gerade jedoch bei lange bettlägerigen Patienten, gleich denen einer Callotaxis-Behandlung, sind Komplikationen wie gerade Thrombosen zu befürchten. Nicht nur etwaige Nebenwirkungen, sondern auch die Kostspieligkeit der Faktor-XIII-Behandlung sprechen also für eine lokale Behandlung.

Bei der Planung dieses Versuches war man nun vor das Problem gestellt, wie man am komplikationslosesten das Substrat lokal am Knochen applizieren könne.

Injektionen schieden von vornherein aus, da die Tiere viel zu unruhig sind, um genau am Osteotomiespalt wiederholbar eine definierte Menge Wirkstoff zu applizieren. Überdies sollte schon im Tierversuch eine Applikationsart gewählt werden, wie sie auch später in der Klinik am Menschen Verwendung finden könnte.

Von der Behandlung von Osteomyelitiden ist bekannt, daß das Einbringen mit Antibiotika beschickter Polymethacrylsäuremethylester (PMME)-Ketten eine Besserung der Heilungstendenz erwirkt<sup>44</sup>.

Auch resorbierbare Träger aus z. B. D,L-Milchsäure-Oligomer, beschickt mit einem Antibiotikum, zur Behandlung von Osteomyelitiden<sup>45</sup>, oder Polyorthoester, angereichert mit Indomethazin, zur lokalen Unterdrückung von heterotopen Knochenwucherungen<sup>46</sup>, wurden erfolgreich angewendet. In einer anderen Studie wurde mit humanem Wachstumsfaktor beladene PMME-Ketten in der Hüftgelenksprothetik angewandt<sup>47</sup>.

Mit Faktor XIII beschichtete Träger oder etwa Miniatur-Pumpsysteme<sup>48,49</sup> hätten jedoch den finanziellen Rahmen, wie auch den Rahmen einer Dissertation gesprengt.

Übrig blieb also nur noch die einfache Lösung durch einen Katheter. Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen<sup>48</sup>, die z. B. den Versuch unternahmen, über eine entlang eines Marknagels an die Osteotomiestelle geführten Kanüle Somatomedin C mit dem Ziel der Osteoinduktion zu applizieren, ermutigten mich zur hier verwirklichten Methode. Doch

auch hier warteten Probleme. GROSSE-SIESTRUP<sup>50</sup> beschreibt problematische Infektionen bei der Durchleitung von Kathetern durch die Haut. Nach außen geleitete Katheter sind ebenfalls nicht vor Einwirkungen durch das Tier selber gefeit<sup>51,52</sup>. BURRI<sup>53</sup> geht näher auf die Infektionsprobleme bei Kathetern ein. So kam ich zum Schluß, daß ein subcutan zu belassener Katheter, der durch die Haut, sowie eine Silikon-Membran des Katheterkopfes zu punktieren wäre, die Vorteile der Katheter-Applikation bei Minimierung der oben genannten Nachteile voll zur Geltung bringt.

Ursprünglich war geplant, von der Firma Braun Melsungen ein kommerzielles Intra-Port-System (Implantofix®) zu beziehen, welches zur Implantation in Ratten als Venacava-Katheter entwickelt worden war<sup>54</sup>. Da jedoch der Preis für die zur Durchführung des Versuchs nötigen Katheter das zur Verfügung stehende Budget unverhältnismäßig überstieg, entschied ich mich, ein solches System selbst zu entwerfen und aus billigeren Teilen zusammenzubauen.

Hierbei kam mir die freundliche Beratung der Firma Braun Melsungen AG zu Gute, die mir Literaturstellen über die Entwicklung ihres Kathetersystems angaben, nach denen ich mich im Folgenden weitgehend richtete<sup>55</sup>.

Ein Schlauch zur intraarteriellen Druckmessung (Combidyn® Druckschlauch Innendurchmesser 1 mm, Außendurchmesser 2 mm, 100 cm Länge, PVC-frei, hergestellt von der Braun Melsungen AG) wurde über seinen Luer-Lock-Ansatz mit einem IN-Stopfen (Braun Melsungen, Art. Nr.: 0423 8010, Totraumvolumen: 0,16 ml, Latex-Injektionsmembran, glatte Kontaminationsarme Oberfläche, Luer-Lock-Verschluß, PVC-frei) gekoppelt und diente somit als Intra-Port-System. Das Totraumvolumen des Katheter-Systems belief sich auf ca. 0,4 ml. Bei Funktionstests erwies sich die Latexmembran des IN-Stopfens selbst nach 100-maliger Punktion mit der zu verwendenden kleinlumigen Kanüle als dicht. Hierbei wurde das System mittels einer mit Wasser gefüllten 20-ml-Spritze mit Handkraft unter Druck gesetzt.

Trotz des relativ kleinen Kalibers und nicht vorgenommener Prophylaxe einer möglichen Verlegung des Katheters durch Blutkoagel mittels eines Heparinschlusses - Heparin beeinflusst die Knochenregeneration - blieben die Katheter während der ganzen Versuchszeit offen. Bei der Placebo-Gruppe wurde jeden Tag mit isotonomischer Kochsalzlösung gespült, während bei der Verum-Gruppe nur nach jeder Applikation entsprechend verfahren wurde.



### 2.6. Die Blutgerinnungsfaktor XIII- und Placebo-Präparation

Blutgerinnungsfaktor XIII- sowie Placebo-Präparate wurden uns eigens für den Versuch von der Hoechst AG in Frankfurt zur Verfügung gestellt.

Bei der Verum-Präparation handelt es sich um ein Faktor-XIII-Konzentrat, gewonnen aus humanem Blutplasma. Der Faktor-XIII-Gehalt unserer Präparation war gegenüber der Handelsware (Fibrogammin®) erhöht. Pro Abfüllung Trockensubstanz, deren Gehalt 1048 I.E. des Wirkstoffes entsprach, wurden kurz vor Applikation 4 ml aqua ad iniectabilia zugesetzt, wodurch die Konzentration auf 271 I. E. / ml und der pH auf 7,0 eingestellt wurde. Eine Einheit Faktor XIII entspricht der Norm-Aktivität in 1 ml Pool-Plasma. Nach RASCHE (1975)<sup>56</sup> liegt die Durchschnittskonzentration bei 20 µg/ml Plasma, demnach müßten 20 µg Faktor XIII die Aktivität einer internationalen Einheit besitzen. Die Reinheit des Konzentrates betrug überdurchschnittliche 43,75 %, im Kühlhaus betrüge die Lagerungshöchstdauer bei 2-8°C zwei Jahre.

Die Placebo-Präparation unterschied sich von der obigen Zubereitung lediglich durch das Fehlen von Blutgerinnungsfaktor XIII, wodurch eine denkbare Wirkung der Zusatzstoffe auf die Knochenheilung *lege artis* ausgeschlossen werden konnte. Bei diesen Zusatzstoffen, in beiden Präparationen gleichermaßen vorhanden, handelte es sich um Humanalbumin, Glucose und Natriumchlorid. In gleicher Abfüllungsmenge geliefert, wurde die Trockensubstanz ebenfalls mit 4 ml Wasser für Injektionszwecke gelöst und damit auf einen pH von 6,9 eingestellt.

Beide Substanzen waren auf Infektiösität getestet, sie wurden am 25.03.93 geliefert.

## 2.7. Die Operation

### 2.7.1. Operationsvorbereitungen

Nach einer kurzen, körperlichen Untersuchung, dem Wiegen und der rektalen Temperaturbestimmung wurden die Tiere mit dem von Bayer Leverkusen hergestellten Präparat Rompun® prämediziert. Nach durchschnittlich einer Viertelstunde waren die Tiere so gut sediert, daß das Freirasieren mittels eines elektrischen Schergerätes des Operationsgebietes, des Rückens, an dem später die Intraport-Systeme zu liegen kommen würden, sowie der Außenflächen der Ohren (besser Löffel), was der besseren Punktion der dort verlaufenden Gefäße diente, problemlos verlief.

Anschließend wurde die Ohrarterie punktiert, um dem Tier für die Plasmaspiegelbestimmung von Faktor XIII zweimal 1 ml Blut zu entnehmen. Eine kleinlumige Venenverweilkanüle wurde alsdann in die Ohrrandvene gelegt und mit Pflaster fixiert. Über diesen Zugang wurden nun zur perioperativen Antibiose 2 ml Cefuroxim (Zinacef®) entsprechend 150 mg der Reinsubstanz gegeben, welches uns freundlicherweise von der Firma Hoechst AG überlassen wurde. Cefuroxim ist ein Cephalosporin der zweiten Generation, welches im Gegensatz zu den Präparaten der dritten Generation den Vorteil hat, besser gegen *Staphylococcus aureus*, jedoch leider nicht gegen *Pseudomonas aeruginosa* (*Pyocyaneus*) wirksam zu sein.<sup>57</sup>

Die nun folgenden Schritte waren immer von dem Bemühen geleitet, unter möglichst keimarmen Bedingungen als ein aus nur zwei Mann bestehendem Operationsteam zu arbeiten. Während der Assistent nach chirurgischer Händedesinfektion, in sterilem Operationsmantel, sowie mit keimfreien Handschuhen, Haube und Mundschutz gekleidet, den mit einem sterilen Tuch abgedeckten Instrumententisch mit den noch vom unsterilen Operateur angereicherten Instrumenten deckte, lagerte dieser das zu operierende Tier und desinfizierte das Operationsfeld mit Polyvidonjod-Lösung (Braunoderm®). Beim Umziehen des Operateurs, deckte nun sein Compagnon das Operationsfeld mit sterilen Tüchern ab und installierte die zuvor desinfizierte Infusionszuleitung, welche der Spülung während der Osteotomie diente

### 2.7.2. Narkose

Die Prämedikation erfolgte, wie oben schon erwähnt, mit dem Präparat Rompun®, einem Sedativum, Analgetikum, Anästhetikum und Muskelrelaxans zum veterinärmedizinischen Gebrauch (Zusammensetzung: 23,32 mg des Wirkstoffes 5,6-Dihydro-2-(2,6-xylidino)-4H-1,3-thiazin (Xylazin) als Hydrochlorid und 1 mg des Adjuvans p-Hydroxybenzoesäuremethylester pro 1 ml Lösung). Bis Tier L0/8, dessen Gruppe zuerst operiert wurde, wurde eine feste Dosierung von nur 1 ml i. m. gegeben,

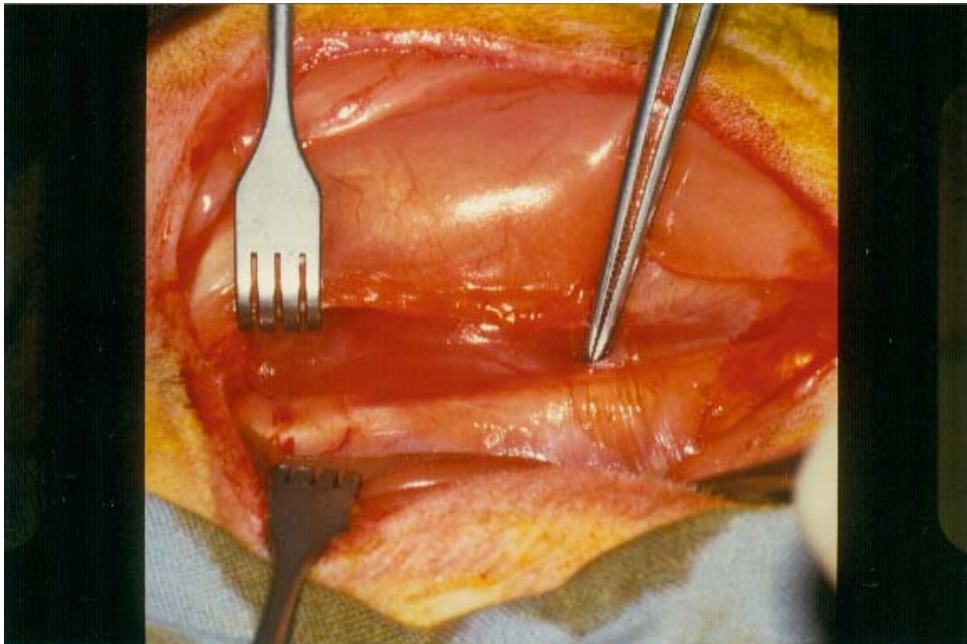
da in vorherigen Versuchen ein Tier auf die gleiche Dosis abnorm reagiert hatte und verstorben war. Die nun jedoch aufgetretenen Probleme mit der konsekutiv erforderlichen, höheren Dosierung des Narkotikums, unter welcher intolerabel oft respiratorische Depressionen auftraten, bewog uns die Dosierung der Prämedikation auf die angegebenen 1 ml/kg Körpergewicht individuell zu erhöhen, woraufhin keine Narkosezwischenfälle mehr auftraten.

Die eigentliche Narkose wurde mit Pentobarbital (Nembutal® der Firma Sanofi/Ceva, Zusammensetzung: 6 g Pentobarbital-Natrium pro 100 ml), welches mit 0,9%iger NaCl-Lösung 1:4 verdünnt war, durchgeführt. Initial wurden über ein an die Ohradvenenverweilkanüle angeschlossenes, vorher desinfiziertes Perfusionssystem, das über einen Dreiwegehahn mit 0,9%iger Kochsalzlösung zu spülen war, 3 ml dieser verdünnten Lösung (entsprechend 0,6 ml Nembutal®) gegeben, was meist für eine ausreichende Narkose reichte.

Die Narkosetiefe wurde vom Assistenten über die Atemtiefe und -frequenz, sowie das Reagieren des Tieres auf Kneifen zwischen die Zehen oder des Schwanzes beurteilt. Der Kornealreflex verschwand als letzte Reaktion des Tieres auf äußere Reize. Entsprechend dem Bedarf wurde nun unter der Operation das Barbiturat nachperfundiert.

### 2.7.3. Operationsablauf

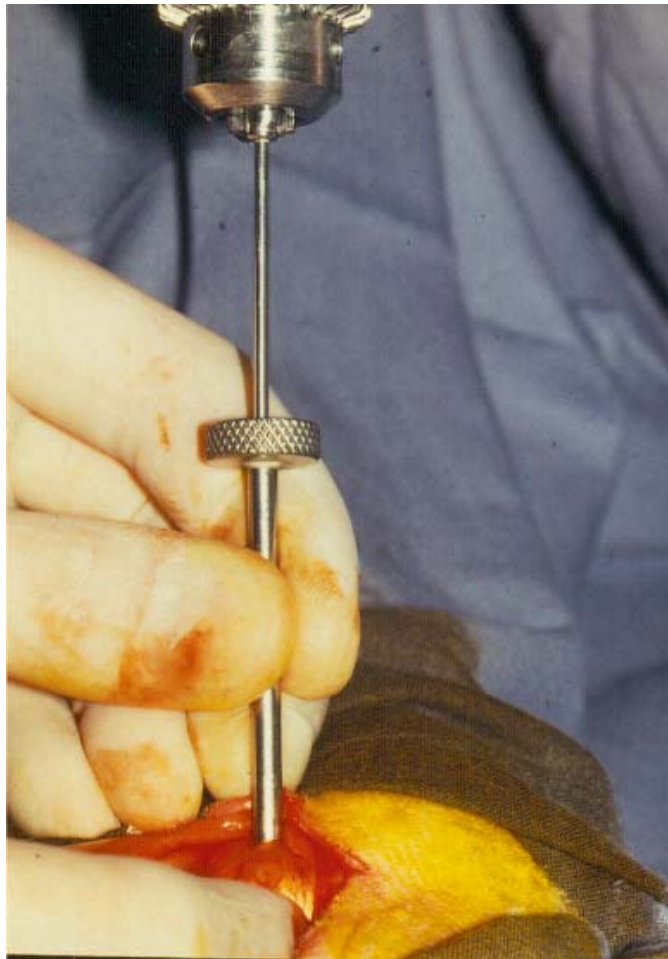
Nachdem zur Orientierung der Trochanter tertius, ein beim Kaninchen zusätzlicher, lateral unterhalb des Trochanter major gelegener Rollhügel, und das Kniegelenk getastet wurden, legte man entlang der Verbindungslinie der beiden Orientierungspunkte mit dem Skalpell einen Hautschnitt. Die nun sichtbare Fascia lata wurde nun ebenfalls scharf getrennt, um so - nun aber stumpf - die ventrale von der dorsalen Muskelgruppe entlang des Septum intermusculare laterale bis auf das Periost zu trennen.



*Abbildung 15: Sicht auf das Operationsfeld nach Durchtrennung von Haut und Fascia lata. Der Femur (die Pinzette zeigt auf ihn) stellt sich dar. Rechts läßt sich der Trochanter major vermuten, links läuft über den Knochen eine kleine Arterie, auf die beim Setzen der Schanzschen Schrauben peinlichst zu achten war.*

Mit einer einem Trocart ähnlichen Bohrhülse wurde nun, die hier liegenden Muskelinsertionen durchstehend, ein Punkt etwas medial der Verbindungslinie von Trochanter major zu Trochanter tertius aufgesucht und eine Bohrung von 2 mm Durchmesser orthogonal zur Femurachse und in 45° Neigung nach kranial zur Sagittalebene gesetzt. Die erste Schanzsche Schraube wurde nun mittels eines Bohrfutters bis kurz vor dem Verschwinden des Gewindes eingedreht. Weil der Kaninchenknochen außerordentlich spröde ist, war hier, wie auch bei jeder folgenden Manipulation am Knochen Vorsicht geboten. Da ein Ertasten der austretenden

Schraubenspitze meist nicht möglich war, wurde diese Orientierung in der Vorbereitung der operativen Technik am toten Tier ermittelt.

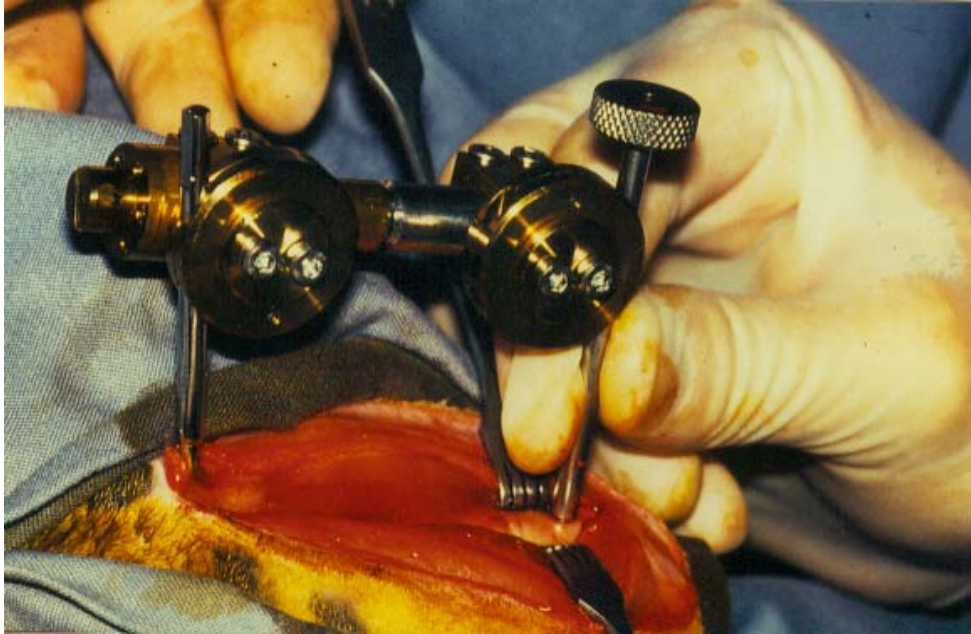


*Abbildung 16: Bohrung für die erste Schanzsche Schraube ventral an dem hier gut sichtbaren Trochanter major vorbei in den Trochanter tertius. Die Bohrhülse verhindert ein Abrutschen des Bohrers.*

Durch den an der ersten und proximalsten Schraube befestigten und parallel zum Knochen liegenden Fixateur Externe, welcher zur späteren Adaptation der Knochenenden um fünf Umdrehungen distrahiert war, wurde nun mittels Bohrhülse ein Punkt ca. 1,5 cm oberhalb der Kniegelenkspaltes möglichst ventral aufgesucht und eine Bohrung parallel zur ersten für die distale Schanzsche Schraube gesetzt. Hierbei war peinlichst auf eine das Femur oberhalb des Epicondylus lateralis kreuzende Arterie zu achten. Die möglichst ventrale Lage der ersten beiden Bohrungen war aufgrund der oft starken Antekurvatur des Kaninchenfemurs wichtig, damit die beiden mittleren

Schrauben noch mittig im Röhrenknochen zu liegen kamen. Auch eine oft extrem ausgebildete Linea aspera täuschte eine weiter distal liegende Begrenzung des eigentlichen Röhrenknochens vor, als dies reell der Fall war.

Hiermit war nun die Lage der mittleren Schrauben festgelegt, die ebenfalls nach Bohrung durch die im Fixateur befestigte Bohrhülse ihren Platz im Femur erhielten.

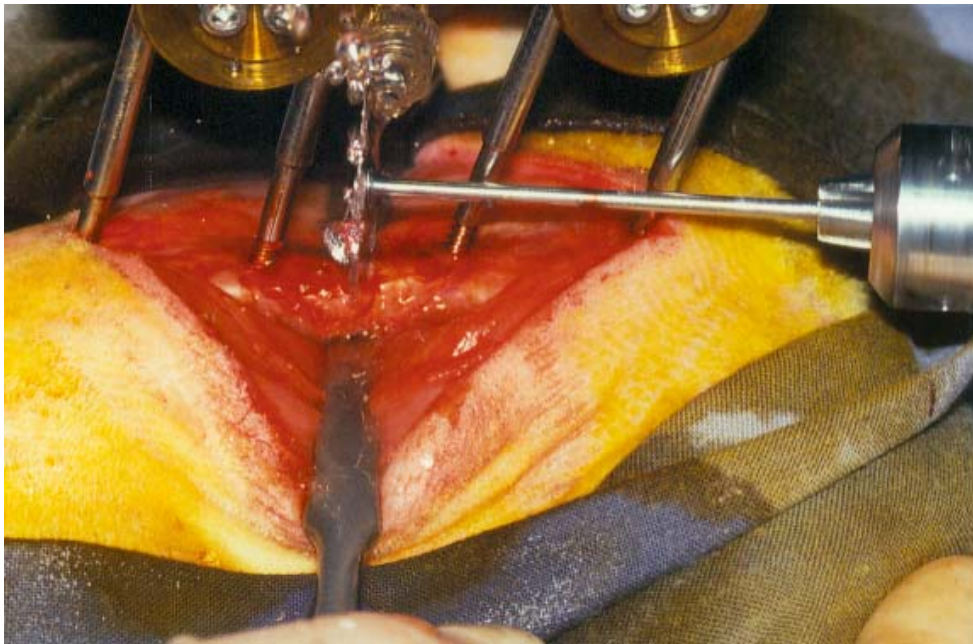


*Abbildung 17: Festlegung des Sitzes des Fixateur Externe durch die distale Bohrung. Die mittleren Schanzschen Schrauben mußten nun auf dem gekrümmten Femur Platz finden.*

Nach Kontrolle aller Feststellschrauben des Fixateurs wurde nun das Periost zwischen den beiden mittleren Schrauben längs mittels eines Skalpells geschlitzt und mit zwei kleinen Hohmann-Hebeln, welche beidseits vorsichtig unter maximaler Schonung von Periost und Muskelgewebe unter den Knochen geschoben wurden, mobilisiert. Die so zu liegen gekommenen Hebel dienten während der folgenden Osteotomie zum Schutz des umliegenden Gewebes.

Mit einer auf einem Mandrin aufgeschraubten Trennscheibe aus dem dentaltechnischen Bedarf, welche einer Miniatur-Kreissäge ähnelt, wurde nun der Knochen zwischen den mittleren Schrauben unter Wasserkühlung und geringem Druck zur Verhinderung von Knochennekrosen osteotomiert. Die Spülung durch isotonische Kochsalzlösung erfolgte mittels der steril angereicherten Infusionszuleitung. Nach

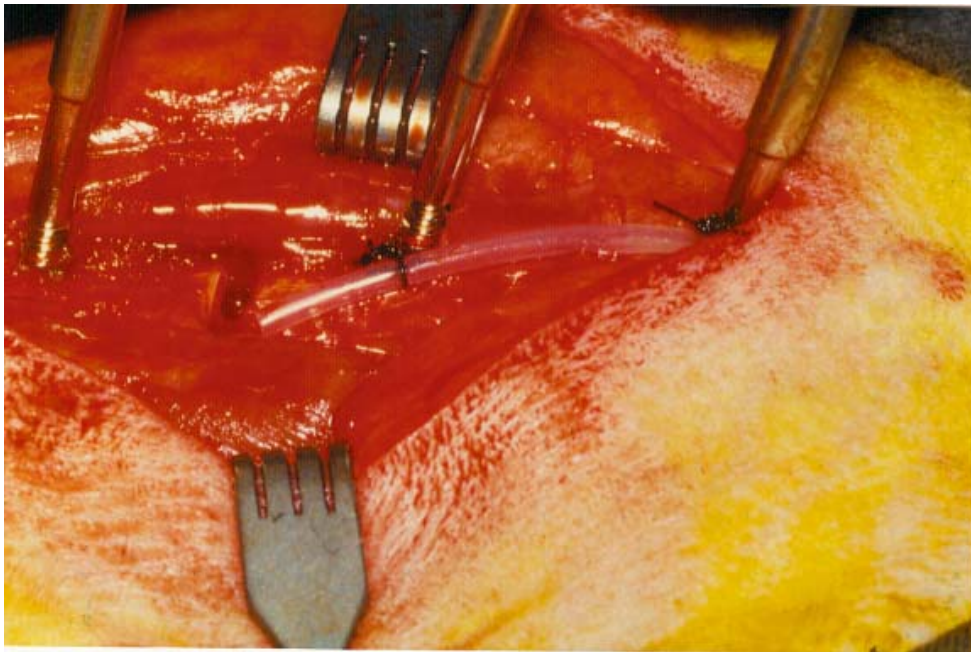
erfolgreicher Osteotomie wurden die Knochenenden adaptiert und eine leichte Kompression ausgeübt.



*Abbildung 18: Osteotomie mittels einer Trennscheibe aus dem Dentalbedarf. Zum Schutz des umliegenden Gewebes sind Homann-Helms eingesetzt. Um Hitznekrosen des Knochens zu vermeiden wird kontinuierlich mit steriler, isotonischer Kochsalzlösung gekühlt und ohne Druck osteotomiert.*

Der Nervus ischiadicus war im übrigen, in der schützenden, gut ausgeprägten dorsalen Oberschenkelmuskulatur liegend, weit von der Osteotomiezone entfernt.

Zum Einbringen des Intra-Port-Katheter-Systems wurde anschließend die Haut beginnend dorsal der proximalen Schraube bis an die Wirbelsäule ca. auf Höhe des 10. Brustwirbelkörpers mit einer Cooper-Schere stumpf mobilisiert. Der sterile Katheter mit dem Intra-Port voran wurde nun mittels einer Pinzette subcutan so in den geschaffenen Hohlraum gelegt, daß der Intra-Port gut palpabel etwas seitlich über dem genannten Wirbelkörper zu liegen kam. Das andere Ende des Katheters wurde nun in Höhe des Osteotomiespaltes abgeschnitten und mit zwei monofilen Polyester-Fäden der Stärke 0/0 (Seralon® blau, Serag-Wiessner) an den beiden proximalen Schrauben so befestigt, daß es genau über dem Spalt am Periost zu liegen kam.



*Abbildung 19: Intraoperativer Sitz des Katheters, welcher zum am Rücken epifaszial liegenden Intraport führt. Der Femur ist zur besseren Darstellung der Osteotomie einen halben Zentimeter distrahiert. Vor Fasziennaht wird die Osteotomie leicht komprimiert.*

Anschließend wurde nach Spülung und Säuberung des Operationsgebietes von Blutkoageln die Faszie mit einer durchgehenden Naht (monofiles Polyester-Nahtgut Miralene® 3/0, Braun Melsungen AG) verschlossen, die Wunde mit Braunoderm® desinfiziert und die Haut mit gleichem Material vernäht. Hierzu verwandten wir im Kniebereich und an der distalen Schraube, einem Gebiet höherer mechanischer Belastung, in dem die Nähte überdies gerne von den Tieren aufgenagt wurden, dicht gesetzte Einzelkopfnähte, im übrigen eine verlaufende Naht.

Die Wunde wurde nochmals mit Braunoderm bestrichen und ein Mullverband mit Fixomull® und Leukoplast® angelegt.

Die kontralaterale Seite wurde spiegelbildlich nach Wechsel der Rollen operiert.

#### 2.7.4. Postoperative Nachsorge

Um die Schmerzen nach dem Erwachen zu lindern, versorgten wir das Kaninchen direkt nach der Operation über den venösen Zugang mit 1 ml Metamizol (Novalgin®). Zusätzlich wurden die gleiche Menge i. m. in den proximalen Vorderlauf gegeben, um eine Depot-Langzeitwirkung zu erzielen. Im Stall wurden unmittelbar Futter und



Wasser ad libidum angeboten. Im Falle, daß das Tier ungewöhnlich lange apathisch blieb oder beim Berühren schrie oder andere Äußerungen der Angst oder des Schmerzes zeigte, wurden täglich 2 ml Metamizol i. m. gegeben.

## **2.8. Versuchsablauf**

### 2.8.1. Applikation

Eine vorausgegangene Arbeit (PISTOR 1992)<sup>58</sup>, welche die positive Wirkung von Blutgerinnungsfaktor XIII in systemischer Applikation auf die Osteogenese am Kaninchenversuch belegte, begann mit der Wirkstoffgabe erst nach einer Woche. Hiermit konnte gezeigt werden, daß Faktor XIII, auch als Fibrinstabilisierender Faktor bezeichnet, durch letztere Namensgebung nur unzureichend beschrieben wird, da er selbst noch nach der Organisation des Hämatoms, welche nach einer Woche abgeschlossen ist, eine Wirkung auf die nachfolgenden Schritte der Osteogenese haben muß.

Nachdem diese Differenzierung gemacht werden konnte, ging es nun darum, mit einer gewissen Dosis eine maximale Wirkung zu erzielen. Somit wurde die lokale Applikation direkt nach der Operation an Tag 1 p. o. begonnen und an allen ungeraden Versuchstagen bis Tag 19 fortgeführt.

Es wurden pro Femur 0,61 ml entsprechend 160 I. E. Faktor-XIII-Konzentrat gegeben. Diese Menge ( $2 \cdot 160 \text{ I. E.} = 320 \text{ I. E.}$  entsprechend 80 I. E. pro kg Körpergewicht bei angenommenen 4 kg Mittelgewicht eines Kaninchens) wurde gewählt, um sie mit einer parallel laufenden Studie meines Mitoperateurs<sup>59</sup> vergleichen zu können, in der bei sonst gleichem Versuchs-Design 80 I. E. pro Kilogramm Körpergewicht Faktor XIII systemisch verabreicht wurden. Den Tieren der Kontrollgruppe wurde entsprechend 0,61 ml des Placebos gegeben.

Die Applikationen verliefen mit einer 1-ml-Spritze und einer kleinlumigen Kanüle nach vorheriger Hautdesinfektion problemlos, die IN-Stopfen des Intra-Port-Systems waren unter der Haut gut zu fassen.



*Abbildung 20: Punktieren und Füllen des Intraport-Systems, dessen Konturen sich unter der Haut abzeichnen.*

Anfangs wurde täglich bei den Tieren L0/1 bis L0/7 je Katheter mit jeweils 1 ml isotonischer Kochsalzlösung gespült. Nachdem sich jedoch diese Menge als übertrieben erwies, z. T. entwich die Flüssigkeit durch die noch nicht dichte Hautnaht oder entlang der Schanzschen Schrauben, wurde die tägliche Spülung der restlichen Tiere der Kontrollgruppe auf 0,5 ml gesenkt. Auch hier verlegte sich der Katheter nie. Die Katheter der Verum-Gruppe wurden schließlich nur noch nach jeder Applikation mit 0,4 ml isotonischer Kochsalzlösung gespült, was dem Totraumvolumen des Kathetersystems entsprach. Auch hier blieb der Katheter entgegen aller Befürchtungen stets offen.

Bei den Tieren L0/3, L0/4, L0/6, L0/9 bis 11, L1/3, L1/4, L1/11 bis 14 entwich an einigen Tagen nach der Applikation etwas Flüssigkeit aus der Hautnaht oder entlang der Schrauben.

### 2.8.2. Distraction

Um eine Organisation des Frakturhämatoms zu gewährleisten, wurde mit der Distraction erst nach einer Woche an Tag 8 p. o. begonnen. Das Ausmaß der in der Literatur beschriebenen notwendigen bis möglichen täglichen Distraction variiert. Eine Osteodistraktionsstudie am Kaninchen unter Chemotherapie aus Nancy (PREVOT et al.

1988)<sup>60</sup> distrahierte mit Erfolg täglich um 0,5 mm<sup>60</sup>. KORKALA et al. (1988)<sup>61</sup> distrahierten die Kaninchentibia jeden zweiten Tag um 1 mm. RICHTER et al. (1992)<sup>62</sup> wagte sich nach Kortikotomie der Kaninchentibia auf zweimal 1 mm pro Tag. KOJIMOTO et al. (1988)<sup>63</sup> distrahierten die Kaninchentibia um zweimal täglich 0,25 mm nach einer Konsolidierungsphase von 10 Tagen. WHITE (1990)<sup>64</sup> verglich die Ergebnisse einer täglichen, 20 Tage dauernden Distraction über 0,5 mm der Kaninchentibia einer Gruppe, die sofort nach Operation distrahiert wurde mit denen einer Gruppe, der zunächst eine Konsolidierungsphase von 7 Tagen eingeräumt wurde. Hierbei war bei letzterer Gruppe das Callus-Volumen, bestimmt durch Mikroradiographie, 2,6 mal höher als bei unmittelbarem Distraktionsbeginn. Auch DE BASTIANI et al. (1987)<sup>65</sup> lieferten wertvolle Hinweise in Hinsicht auf die Modalitäten der Osteodistraktionssynthese am Kaninchen.

Wir entschieden uns schließlich für eine Distraction von täglich 0,7 mm, was einer Schraubenumdrehung unseres Fixateurs entsprach, über den Zeitraum von Tag 8 bis einschließlich 20 p. o.. Dies führte zu einer gesamten Femur-Verlängerung von theoretisch 9,1 mm.



Abbildung 21: Täglicher Distraktionsvorgang. Die Schraube wird eine Umdrehung gedreht, was einer Distraction von 0,7 mm entspricht.

### 2.8.3. Antibiose

Nebst der perioperativen Antibiose wurde von Tag 1 bis 7 p. o. eine postoperative Antibiose als Infektionsprophylaxe durchgeführt. Hierzu wurden zweimal 2 ml Cefuroxim (Zinacef®) entsprechend einer Tagesdosis von 300 mg Cefuroxim i. m. in die beiden proximalen Vorderläufe gegeben.

### 2.8.4. Versuchskontrolle und Messungen

Im Ein- bis Zweitagerrhythmus wurden über die gesamte Versuchszeit hin mit einem elektronischen Thermoelement-Thermometer rektal die Temperatur gemessen, das Kaninchen auf einer elektronischen Waage gewogen, die Lage der Kathetersysteme und der Sitz der Fixateure kontrolliert, die Wunde inspiziert sowie beide Oberschenkel palpirt. Auf etwaigen Flüssigkeitsaustritt an den Schrauben wurde geachtet. Überdies wurde der allgemeine Zustand des Tieres beurteilt und protokolliert.

Nebst dem Operationstag wurde noch an den Tagen 2, 4, 14 und 20, also an geraden Tagen im Interim mit den lokalen Applikationen, welche an ungeraden Tagen erfolgte, aus der Ohrmittelarterie zweimal 0,9 ml Blut abgenommen. Bei Tier L0/1 war die Arterie derart schlecht zu punktieren, daß am Operationstag und an Tag 4 p. o. auf eine intrakardiale Punktion zurückgegriffen werden mußte, die komplikationslos verliefen. Trotzdem wurde hernach in ähnlich gelagerten Fällen auf eine Herzpunktion aufgrund des hohen Risikos verzichtet.

### 2.8.5. Explantation und Obduktion

An Tag 21 p. o. wurde das Tier durch das in die Ohrtrandvene injizierte Präparat T 61® (Hoechst, Zusammensetzung: 1 ml Injektionslösung enthalten: 0,2 Embutramid (wirkt stark narkotisch sowie lähmend auf das Atemzentrum), 0,05 g Mebezoniumjodid (wirkt lähmend auf die quergestreifte Muskulatur und Atemmuskulatur und führt zu schnellem Kreislaufkollaps) und 0,0005 g Tetracainhydrochlorid in wäßriger Lösung) exzitationslos getötet. Das Gift wirkte innerhalb von 3 Sekunden überraschend schnell.

Bei der Eröffnung wurde auf die Heilung der Hautnaht, der epi- oder subfaszialen Ausdehnungen etwaiger Abszesse, der Lage und Einheilung der Katheter, bzw. der Reaktion des Gewebelagers auf diesen geachtet.

Alsdann wurden die Femora sorgsam freipräpariert, die Katheter-fernen Seiten mit Tinte markiert und die Regeneratzonen bei noch sitzendem Fixateur Externe mit einer Trennscheibe entlang der mittleren Schrauben explantiert. Beim Entfernen der

Schrauben konnte man sich in weitaus der Mehrzahl der Fälle von deren stabilen Einheilung und damit der guten Stabilisierung des Femurs überzeugen. Die Distraktionszonen waren gut durchgebaut, jedoch noch nicht starr. Der Callus war über dem Cortex-Niveau spindelförmig erweitert.

Im Folgenden zur besseren Orientierung eine Zeitskala über den Versuchsablauf:











| Zeitübersicht                     |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |   |    |   |    |   |    |   |    |   |    |    |
|-----------------------------------|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|----|
| Antibiose (300 mg Cefuroxim i.m.) | ✓  | ✓   | ✓ | ✓   | ✓ | ✓   | ✓ |   |   |   |    |   |    |   |    |   |    |   |    |   |    |    |
| Faktor XIII (160 I.E./Femur)      |    |  |   |  |   |  |   |  |   |  |    |  |    |  |    |  |    |  |    |  |    |    |
| Blutabnahmen (2 mal 0,9 ml)       | ●  |   | ● |   | ● |   |   |   |   |   |    |   |    | ●   |    |   |    |   |    |   | ●  |    |
| Distraktion (0,7 mm/Tag)          |    |   |   |   |   |   |   | ↔   | ↔ | ↔   | ↔  | ↔   | ↔  | ↔   | ↔  | ↔   | ↔  | ↔   | ↔  | ↔   | ↔  |    |
|                                   | OP |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |   |    |   |    |   |    |   |    |   | +  |    |
| Tag d                             | 0  | 1   | 2 | 3   | 4 | 5   | 6 | 7   | 8 | 9   | 10 | 11  | 12 | 13  | 14 | 15  | 16 | 17  | 18 | 19  | 20 | 21 |

Abbildung 22: Darstellung der experimentellen Manipulationen anhand einer Zeitleiste

### 2.8.6. Komplikationen

Ein Tierexperiment ist seltenst perfekt, allein durch die große Variabilität der Natur ist ein vorbereitetes Versuchsdesign oft im Einzelnen überfordert und es muß unmittelbar, und individuell Abhilfe der auftretenden Probleme geschaffen werden. Hierbei auftretende Komplikationen wurden im kleinstmöglichen Rahmen gehalten und sind im Folgenden aufgeführt.

#### 2.8.6.1. Komplikationen während der Narkose

In der Abteilung Pharmakologie/Toxikologie der Behringwerke AG ist die allgemein schwierige und komplikationsreiche Narkose von Kaninchen bekannt. Wir waren in der glücklichen Lage, auf die langjährige Erfahrung der Mitarbeiter der Abteilung zurückgreifen zu können. Trotzdem ergaben sich in der Anfangszeit einige Probleme, die wir nun auf die interindividuelle und zeitlich und situationsbedingte

intraindividuelle variable Reaktionsweise der Tiere zurückführen. Zudem stand das Barbiturat nur in größeren Abfüllmengen zur Verfügung, was eine während der Lagerung nach Anbrechen durch Lichteinfall oder Luftkontakt bedingte allmähliche Wirkungsabnahme zur Folge hatte.

So verstarb während eines Revisionseingriffes Tier L0/1 unter der zuvor bei der Operation gut vertragenen Narkose-Dosierung. Nachdem die Tiere L0/3 und L0/7 unter der Narkose bei schlechter Relaxation und Analgesie atemdepressiv geworden waren, wurde, wie im Abschnitt 2.7.2 'Narkose' bereits erwähnt, die Prämedikation erhöht, was die erwünschte Verringerung der notwendigen Barbiturat-Dosis zur Folge hatte. Die folgenden Operationen beider Gruppen verliefen nun komplikationslos.

#### 2.8.6.2. Komplikationen während der Operation

Aufgrund des sehr spröden Kaninchenknochens frakturierte der Knochen während des Eindrehens der Schanzschen Schraube bei den Tieren L0/2 links, L0/7 rechts und L0/8 links. Die Fraktur wurde mittels einer Stahldrahtcerclage versorgt, bei der weiteren Auswertung jedoch ausgeschlossen.

Bei den Tieren L0/3 und L1/3 beidseits und L1/4 nur rechts mußte aufgrund des abnormal gekrümmten Femurs eine Umstellungsosteotomie vorgenommen werden. Unter jeweils schon montiertem Fixateur wurde das Fragment des schon osteotomierten Femurs, welches aufgrund der Divergenz des geraden Fixateurs gegenüber dem gekrümmten Knochen nicht mehr von der zuletzt zu setzenden Schraube gefaßt werden konnte, um die schon gesetzte Schraube einwärts gedreht. Nun konnte die vierte Schraube gesetzt werden. Das nun dorsale Klaffen des Osteotomiespaltes wurde anschließend durch Aussägen eines Knochenkeils und anschließende planparallele Adaptation der Knochenenden korrigiert.

Tier L0/11 wurde während der Osteotomie, L0/14 während des Hautschnittes aufgrund einer plötzlichen Zuckung des Tieres eine scharfe Muskelverletzung zugefügt, die jeweils vernäht wurde.

Während der Operation von Tier L1/12 wurde die proximal des linken Kniegelenkes das Femur kreuzende Arterie angeschnitten und anschließend ligiert.

#### 2.8.6.3. Komplikationen während des Versuchsverlaufs

Von den insgesamt 28 operierten Tieren verstarben vier vor eigentlichem Versuchsende. Bei Tier L0/1 entwickelte sich ab Tag 11 p. o. ein Abszeß am rechten

Kniegelenk, der aufgrund seiner Größe (4 cm Durchmesser) eröffnet werden mußte. Nach Sedierung durch 1 ml Rompun® entwickelte das Tier nach der Gabe von 0,6 ml Nembutal®; 1 : 4 mit isotonischer Kochsalzlösung verdünnt, eine komplette Atemdepression, die auch mit einer i.-v.-Injektion von Lobelin"Ingelheim"® (BI-Vetmedica), einem Atemexzitans (Zusammensetzung: 10 mg Lobelinhydrochlorid und 5 mg Phenol (Konservierungsmittel) auf 1 ml wäßrige Injektionslösung) nicht gebessert werden konnte und unter der das Tier intra operationem an Tag 12 p. o. verstarb. L0/8 erlitt während der Röntgenkontrolle eine epikondyläre Querfraktur links distal der 4. Schraube, einer Stelle, die belastungsmechanisch einen locus minoris resistentiae darstellte. Da ein Fortführen des Versuchs nun nebst Tierschutzgesetz jeder Ethik widersprach, wurde das Tier an Tag 3 p. o. eingeschläfert. Der Allgemeinzustand von Tier L1/2 verschlechterte sich nach anfänglich (Tag 1 p. o.) entwickelter Diarrhöe an Tag 6 p. o. dramatisch. Der an den vorherigen Tagen noch unauffällige Muskeltonus der Hinterläufe und des Analsphincters (spürbar bei der rektalen Temperaturmessung) waren sehr vermindert, die Diarrhöe hatte sich nicht gebessert und es bestand eine Hypothermie von 36,1°C (Norm bei Kaninchen: 39,3°C). Das Tier hatte 13,8 % des Ausgangsgewichtes innerhalb einer Woche verloren und machte einen lethargischen Eindruck und trotz der eher verzweifelten Gabe von 2 ml Novalgin® i. m. verstarb das Tier eine Stunde später. Tier L1/5 verschlechterte sich in seinem Allgemeinzustand ebenso, doch erst gegen Ende des Versuches, und mußte, um sein Leiden zu beenden auf Anraten des Tierschutzbeauftragten an Tag 19 p. o. eingeschläfert werden. Die Präparate dieser vier Tiere wurden zur Auswertung nicht herangezogen, dienen jedoch dem Einblick in verschiedene Phasen (Tage 3, 6, 12 und 19 p. o.) der Callotasis (siehe auch Abbildung 43, Seite 92 bis Abbildung 46, Seite 95).

Aufgrund der starken Antekurvatur des rechten Femurs von Tier L0/7 war die proximale, mittlere Schanzsche Schraube sehr knapp in der Kompakta gefaßt und brach sekundär nach dorsal aus. Der Splitter wurde mit der Schraube am Knochen cercliert, wanderte jedoch während der Distraction in die Regeneratzone, welche dadurch histologisch nicht mehr auswertbar war. Mit gleichem Resultat frakturierte an der gleichen Schraube, nun aber das linke Femur von Tier L1/13 während der Distraktionsphase. Die Regeneratzone mußte ebenfalls von der Auswertung ausgeschlossen werden.

Bei vier Tieren der Kontroll-Gruppe und nur einem Tier der Verum-Gruppe trat Flüssigkeit beidseits, bei zwei der Kontroll-Gruppe und sechs der Verum-Gruppe nur einseitig durch die Schraubendurchtrittsstellen an mindestens einem Tag aus.

Eine Eiterung, welche aufgrund der örtlichen Nähe auch die Regeneratzone beeinträchtigen könnte, trat beidseits bei den Tieren L0/9, L0/10, L0/12, L1/11, L1/12 und bei Tier L1/13 nur rechts auf.

Fieber, das eine rektale Temperatur von 40°C an mindestens einem Tag erreichte oder überstieg, bekamen fünf Tiere der Kontroll-Gruppe und 12 Tiere der Verum-Gruppe. Die durchschnittliche Temperatur vor Eingriff lag bei 39,3 °C.

Eine Diarrhöe entwickelten fünf Tiere der Kontroll-Gruppe und ein Tier der Verum-Gruppe an mindestens einem Tag.

## 2.9. Dokumentation

Zur sauberen Versuchsdurchführung waren bei der Menge an zu erfassenden Manipulationen und Daten eine umfassende Dokumentation notwendig. Jedes Tier wurde mit Identifikationsnummer und Angabe über Fellfärbung und Geschlecht in die einzelnen Protokolle aufgenommen.

In ein spezielles *Operationsprotokoll* wurden Operationsdatum, -zeit und -dauer, Gewicht, Besonderheiten der körperlichen Untersuchung und rektale Körpertemperatur vor der Operation eingetragen. Ebenso wurde die perioperative Antibiose, postoperative Analgesie, die Prämedikation, die Narkose und das während der Operation notwendig gewordene, infundierte, gesamte Flüssigkeitsvolumen festgehalten. Spezielle Vorkommnisse der Operation wurden notiert.

In dem *Versuchsprotokoll* wurden für jeden Tag das aktuelle Datum, Menge der lokalen Applikation und der Katheterspülung, Distraktionsumfang, postoperative Antibiose, rektale Temperatur, Körpergewicht und spezielle Tagesnotizen über eventuelle Schmerz- oder zusätzliche Antibiotikabehandlung, Flüssigkeitsaustritt, Palpation des Hinterlaufs und der Katheterlager sowie Status der Wundnaht eingetragen. Am Ende wurde noch ein kurzer *Obduktionsbericht* hinzugefügt.

## 2.10. Blutplasmabestimmungen von Blutgerinnungsfaktor XIII

Die arteriell entnommenen Blutproben von bei der Kontrollgruppe je zweimal 0,9 ml wurden in mit 0,1 ml Natriumcitrat-Lösung (0,11 mol/l) beschickten Reaktionsgefäßen abgefüllt. Es resultierte 10%iges Citrat-Blut. Da es bei dieser Konzentration bei dem äußerst gerinnungsfreudigen Kaninchenblut zu häufig zur



Aktivierung der Gerinnung mit dem Resultat von Blutkoageln in der Probe kam, erhöhten wir bei der Verum-Gruppe die Natriumcitratmenge auf 200 µl und füllten mit 0,8 ml Blut auf insgesamt 1 ml 20%iges Citrat-Blut auf.

Nach Zentrifugation bei 3.000 U/min wurde das überstehende, in seiner Citrat-Konzentration nun vom Hämatokrit, welcher von uns als konstant angesehen wurde, abhängigen Citrat-Plasma sorgsam auf Eppendorf-Hütchen in 200-µl-Rationen aufgeteilt und bei -20°C eingefroren. Die so gelagerten Proben waren nun 2 Monate haltbar. Bei einer zwischen Verum- und Kontroll-Gruppe anzunehmenden gleichen Verteilung gleichen Mittelwertes des Hämatokrits mußte nun die mit der nachfolgend beschriebenen, auf 10%iges Citrat-Blut eingestellte Bestimmungsmethode gefundene Faktor-XIII-Aktivitäten der 20%igen Citrat-Blut-Proben nur noch mit dem Verdünnungsfaktor 1,1 multipliziert werden, um mit den 10%igen Citrat-Blut-Proben verglichen werden zu können.

Die Bestimmung der Plasma-Aktivität von Blutgerinnungsfaktor XIII mit dem photometrischem Verfahren Berichrom® F XIII wurde freundlicherweise von dem hämatologischen Labor der Abteilung Toxikologie/Pharmakologie der Behringwerke AG durchgeführt.

Die Messungsreaktion des Verfahrens läßt sich wie folgt beschreiben:

Mit einem Aktivatorreagenz wird das Citratplasma wieder gerinnbar gemacht, das in der Probe enthaltene Fibrinogen wird durch ebenfalls enthaltenes Thrombin in lösliches Fibrin umgewandelt, dieses jedoch durch ein spezielles aggregationshemmendes Peptid am Ausfallen (Clotbildung) gehindert und in Lösung gehalten. Fibrin und Thrombin aktivieren ihrerseits nun Faktor XIII, welcher in seiner Eigenschaft als Transglutaminase Glycinethylester mit einem Peptidsubstrat unter Freiwerden von Ammoniak (NH<sub>3</sub>) konjugiert. Das Ammoniak verbindet sich in einer dritten Reaktion mit α-Ketoglutarat und NADH unter Katalyse durch Glutamatdehydrogenase zu NAD<sup>+</sup> und Glutaminat.

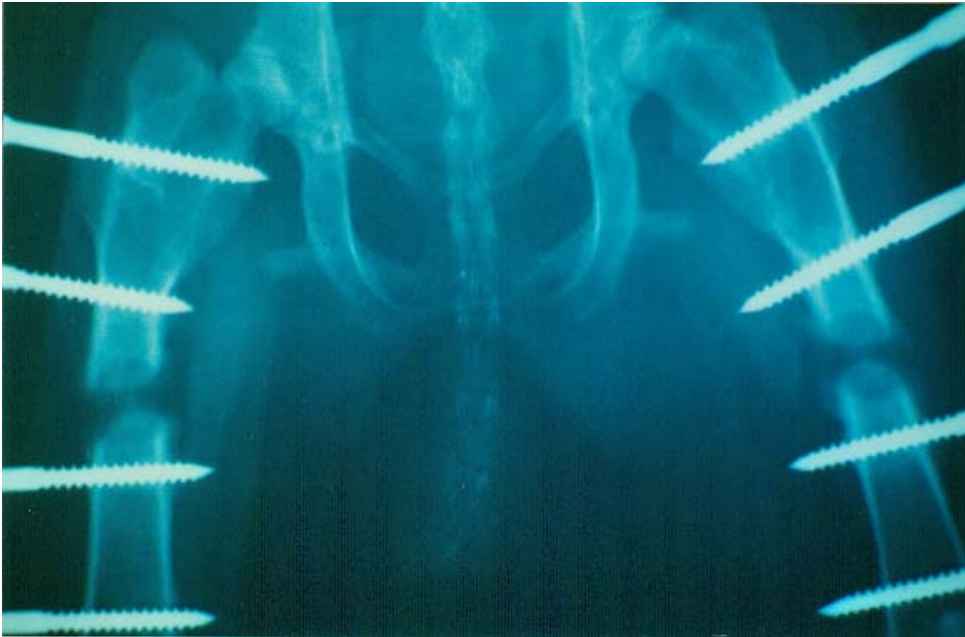
Photometrisch (mit dem automatischen Analysengerät KONE-Specific Version 3.4) läßt sich nun bei 37°C Reaktionstemperatur über die Abnahme der UV-Licht-Absorption bei 340 nm Wellenlänge eine Aussage über die Faktor-XIII-Aktivität in Prozent gegenüber der Norm eines humanen Pool-Plasmas machen. Der lineare Meßbereich des Testes liegt zwischen 0 und 150% der Norm, der Variationskoeffizient für Normalplasmen (70-140% der Norm) zwischen 1 und 5%, für pathologische Plasmen zwischen 3 und 6%. Für weitere Information siehe angeführte Literatur<sup>66,67</sup>. Die Bestimmung der Aktivität von Faktor XIII korreliert gut mit der immunochemisch bestimmten Konzentration des α<sub>2</sub>-Proteins<sup>68</sup>.

In unserem Fall wurden je 100 µl beider Proben bestimmt und die Werte gemittelt. Der bereits erfolgter Gerinnung verdächtige Proben wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

### **2.11. Röntgenverlaufskontrollen**

Nach den Operationen von 8 bis 12 Tieren wurden Röntgenverlaufskontrollen durchgeführt, die in erster Linie der Beurteilung des Operationsergebnisses dienen. Die Aufnahmen wurden in maximaler Streckung der hinteren Extremitäten durchgeführt, wobei das Tier jedoch gut mit Rompun® oder Dormicum® sediert sein mußte (siehe Abbildung 23). Da es hier oft schwierig war, den Objekt-Film-Abstand gering zu halten, wurden zusätzlich Aufnahmen in Hockstellung gemacht, auf denen das Femur zwar oft von anderen Strukturen überkreuzt wurde, die Distaktionszone jedoch immer überzeichnungsfrei und schärfer abgebildet wurde. Zudem hielt das Tier bei dieser Technik auch stiller (siehe Abbildung 24).

Eine quantitative Auswertung der Bilder wurde nicht angestrebt, da trotz der konstanten Belichtung (64 mAs, 9,5 kV bei einem Meter Kathoden-Film-Abstand und möglichst guter Abblendung) die Bildstrukturen interindividuell sehr unterschiedlich geschwärzt waren. Die jedoch z. T. gut sichtbaren Kalzifizierungen der Distaktionszone stellen illustrierend ein interessantes Pendant zur Histologie dar (siehe Abbildung 23).



*Abbildung 23: Röntgenaufnahme eines Kaninchens in maximaler Streckstellung. Über den Distractionszonen sind leichte, streifenförmige Verschattungen zu erkennen, die beginnender Mineralisation entsprechen. (Tier L1/6)*



*Abbildung 24: Röntgenaufnahme eines Kaninchens in Hockstellung (Tier L1/14)*

## 2.12. Histologie

### 2.12.1. Die unentkalkte Knochenhistologie

Die unentkalkte Knochenhistologie mittels Kunststoffeinbettung ist längst im Begriff, sich in klinischer wie experimenteller Osteologie durchzusetzen. Doch nicht nur hier, auch in der Hämatologie und bei Fragestellungen über die Pathologie von Weichgeweben hinsichtlich z. B. degenerativer, dystrophischer oder metabolischer Gewebsmineralisationen bürgert sie sich ein.

Das Problem beim Schneiden von harten Materialien wie Knochen oder auch dem Stahl von Endoprothesen in der Orthopädie beispielsweise liegt in der zu fordernden Festigkeit des Einbettmediums. Das konventionelle Paraffin würde aufgrund der Diskrepanz zwischen Festigkeit von Wachs und Apatit z. B. unweigerlich zu Zerreißen an den Grenzflächen von Medium und Objekt sowie zu Deformationen der etwaig inhomogenen Objektstruktur wie der Spongiosa durch den nicht aufgefangenen Druck des Mikrotommessers auf filigrane Strukturen führen.

PUCKET (1941)<sup>69</sup> hatte als erster den Einsatz des Kunststoffes Methacrylat als Einbettmedium beschrieben. ROOFE (1949)<sup>70</sup> und KROPP (1954)<sup>71</sup> verwandten ebenfalls Kunststoff zur Knocheneinbettung. Da das Material jedoch zu hart und spröde war, wurde es nur für die Schleiftechnik verwandt. Erst die Verwendung von Weichmachern, wie Polyethylenglykol (HIRSCH und BOELLAARD, 1958)<sup>72</sup>, Dibutylphthalat (SCHENK, 1965)<sup>73</sup> oder Plastoid-N® (BURKHARDT, 1966)<sup>74</sup>, welches heute noch die meiste Verwendung findet, machten das Einbettmedium geschmeidig genug für die Schnitttechnik.

Die Vorteile der unentkalkten Knochenhistologie bestehen in

- der geringeren Schrumpfung der Gewebe,
- der Erhaltung des zur Beurteilung essentiellen Minerals und
- dessen besseren Differenzierbarkeit gegenüber unmineralisierten Strukturen,
- der besseren Erhaltung der Weichteilstrukturen und deren Lagebeziehung zum Knochen durch die unterbleibende Entkalkung durch Säuren,
- der Möglichkeit der polychromen Fluoreszenz-Markierung, und
- der Option der gleichzeitigen Untersuchung von Hartimplantaten.

Von Nachteil sind die meist hohen Polymerisationstemperaturen, welche eine nachträgliche histochemische Untersuchung erschwert oder gar verhindert, und die wesentlich höheren Kosten.

Bei der Lösung unserer histologisch-technischen Probleme bei Einbettung und Färbung waren die Arbeit von KATTHAGEN (1985)<sup>75</sup> und das Histologie-Kompodium von ROMEIS (1989)<sup>76</sup> von großer Hilfe.

### 2.12.2. Fixierung

Sofort nach der Explantation gelangten die vom überschüssigen Weichteilgewebe gesäuberten Präparate zur Immersionsfixierung in eine gepufferte Schaffer-Lösung, wo sie maximal drei Monate verblieben. Die Pufferung ist aus dem Grunde sinnvoll, da das im Fixativ enthaltene Formaldehyd mit der Zeit zu Ameisensäure oxydiert wird und diese nun den Knochen entgegen der Intention entkalken würde. Die Schaffer-Lösung verbindet die Vorteile der reinen Ethanol- mit der reinen Formaldehyd-Fixation<sup>77</sup>.

Das von uns verwendete Schaffer-Fixativ setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 96 ml 100%iges Methanol,
- 4 ml PBS-Phosphatpuffer (Behring) pH 7,2,
- 50 ml 37%iges Formalin.

### 2.12.3. Einbettung

Zur Einbettung der durchfixierten Präparate in dem hydrophoben Monomer Methylmethacrylat (MMA) (oder nach anderer Nomenklatur Methacrylatmethylester (MME)), ist es notwendig, diese erst einmal zu dehydratisieren. Dies geschieht in einer aufsteigenden Alkoholreihe von jeweils 50%, 70%, 80%, 90%, 96% und 99,9%igem Ethanol. In jeder Küvette verblieben die in kleinen Polyethylen-Einbett-Körbchen gekennzeichneten Präparate 24 Stunden unter ständigem Rühren mittels eines Magnetrührers. Auf eine spezielle Entfettung mit Azeton wurde verzichtet.

Nach erfolgter Entwässerung begann die Infiltration der Präparate mit dem nicht entstabilisierten Monomer. (Das zur Verhinderung einer vorzeitigen Polymerisierung zugefügte Hydrochinon kann über eine CaCO<sub>3</sub>-Adsorptionssäule entzogen werden, das Methylmethacrylat muß dann jedoch im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden.). Hierzu wurden die Präparate in ein Glasgefäß zusammen mit dem Monomer gegeben, in einem Exsikkator für eine halbe Stunde unter Vakuum gesetzt, um der Flüssigkeit ihre Gasblasen zu entziehen und anschließend für zwei Tage unter ständigem Rühren durchtränkt. Im Folgenden wiederholte sich diese Prozedur einmal mit einer Monomer-Mischung, welche pro 100 ml nicht entstabilisiertes MMA 2,0 g getrocknetes Benzoylperoxid (explosiv!) als Polymerisations-Katalysator enthielt, ein zweites Mal mit einer Mischung, die sich aus 4,0 g getrocknetem Benzoylperoxid (Merck-

Schuchard, Art. Nr. 801641) und 25,0 ml des Weichmachers Plastoid-N® (Nonylphenol-polyglykol-Etheracetat, Röhm-Pharma GmbH, 64331 Weiterstadt) pro 100 ml nicht entstabilisiertem MMA zusammensetzte. Das Methylmethacrylat wurde von der Firma Merck-Schuchard (Art. Nr. 800590) bezogen. Wenn die Flasche dem Kühlschrank entnommen wurde, war darauf zu achten, sie sich erst auf Zimmertemperatur erwärmen zu lassen, um eine Kondenswasserbildung, welche bei der Polymerisation zu Blasenbildung hätte führen können, zu unterbinden.

Zur Polymerisation wurden die Präparate mit der Katheter-nahen Seite nach unten, also der Tintemarkierung nach oben, auf den Boden eines kleinen, im Durchmesser dem Halterungsfutter des Mikrotoms entsprechenden Glasgefäß gelegt, eine Markierungsfahne mit der Präparate-Identifizierung an die Wandung geklemmt und mit der dritten MMA-Mischung aufgefüllt. Hierbei mußte die Polymerisationsschrumpfung von 13 - 15% mit einberechnet werden. Die mit einem Deckel verschlossenen Gefäße wurden nun in einem Wasserbad, das der Ableitung der Reaktionswärme diente, im Brutschrank bei 35°C zur Polymerisation für ca. drei Tage belassen. Am dritten Tag konnte, um dem Auspolymerisieren der obersten kritischen Schicht 'nachzuhelfen' auf 40 - 50°C getempert werden. Führte auch dies nicht zum Erfolg, füllte man auf die oberste noch klebrige Schicht etwas Kaltpolymerisat (Technovit® 7100 und 3040 der Firma Heraeus-Kulzer), womit man das Präparat mit einem stabilen Sockel versah. Die Glasgefäße wurden vorsichtig mit einem Hammer zertrümmert, sodaß die Präparate nun zum Schneiden bereit waren.

#### 2.12.4. Schneiden

Zum besseren Schneiden ist es notwendig, die Kunststoff-Zylinder so mit einer Bandsäge zu trimmen, daß möglichst wenig überschüssiger Kunststoff um das Präparat herum verbleibt.

Wir verwendeten zum Erstellen der Schnitte ein Rotationsmikrotom der Firma Reichert-Jung (Polyvar 2050), in das ein Hartstahlmesser (Schliffart D, Schliffneigung 35°) in Neigung (wir verwendeten einen Neigungswinkel von 0°), Quer- und Längsrichtung beliebig verstellbar und schwingungsfrei eingespannt werden konnte. Das Präparat sollte in dem Haltefutter möglichst tief gefaßt werden, um Schwingungen des Hobelarmes und die dadurch entstehenden Querschredder ('shatter') zu vermeiden. Längsriefen wurden durch ein verbrauchtes Messer hervorgerufen und waren einfach durch Verschieben des Messers zu beheben. Weiterhin war darauf zu achten, daß die lange Seite des Präparates orthogonal zum Messer zu liegen kam, um ein gleichmäßigeres Schneiden zu ermöglichen. Die Schnittebene war am Futter um ca. 20° in jeder Richtung aus der rechtwinklig zum Hobelarm gelegenen Standardebene

herauszudrehen. So war eine Korrektur bei einem im Kunststoffzylinder etwas schräg zu liegen gekommenen Präparat möglich.

Das Präparat wurde bis zur gewünschten Schnittebene in schnellen Zügen bei einem Armvorschub von 15  $\mu\text{m}$  pro Umdrehung an einer stumpfen Stelle des Messers vorgeschritten. Bei großen Distanzen konnte auch ein Vorarbeiten mit der Bandsäge gewagt werden. In der Schnittebene wurde nun ein Armvorschub von 5  $\mu\text{m}/\text{U}$ . eingestellt. Für eine gute Qualität der Schnitte war es nun von Bedeutung, möglichst langsam und gleichmäßig zu schneiden. Der stufenlos einstellbare Motorantrieb war hier von Vorteil. Wurden die Schnitte zu schnell gemacht, gab es Zerreißen in der ohnehin kritisch zu schneidenden Kortikalis oder gar des gesamten Präparates, war der Schnitt in der Geschwindigkeit nicht gleichmäßig durchgeführt worden, variierte die Schnittdicke oder es kam zu Querschreddern. Für die weitere Verarbeitung war es auch wichtig, daß der Schnitt sich nicht am Messer aufrollte. Gute Dienste leistete hier eine Schneidflüssigkeit der Firma WIV (WIV-Pharma, Dürerstr. 14, 68723 Schwetzingen), mit der der Präparate-Block vor und während dem Schneiden mit einem weichen Haarpinsel benetzt wurde. Der Schnitt schwamm nun regelrecht auf dem Messer auf und konnte mit einer Splitterpinzette vorsichtig an einer Ecke gefaßt werden.

Geschnitten wurde der Knochen längs in zwei Ebenen: Eine Ebene wurde standardisiert genau an der ehemaligen Katheterlage tangential derart an den Knochen gelegt, daß beim Schneiden die Kortikalis gerade durchbrochen wurde und zwei Anschnitte der röhrenförmigen Kortikalis zu sehen waren (siehe auch Abb. 25). Die zweite Ebene wurde genau durch die Zylinderachse des Röhrenknochens und parallel zur ersten gelegt (siehe Abb. 26). Der Grund dieser Vorgehensweise bestand in der Überlegung, einen etwaigen Diffusionsgradienten von Faktor XIII, also sich in unterschiedlicher Zellproliferation und Osteoidbildung widerspiegelnde differente Konzentrationen des Wirkstoffes in den beiden Ebenen darzustellen.

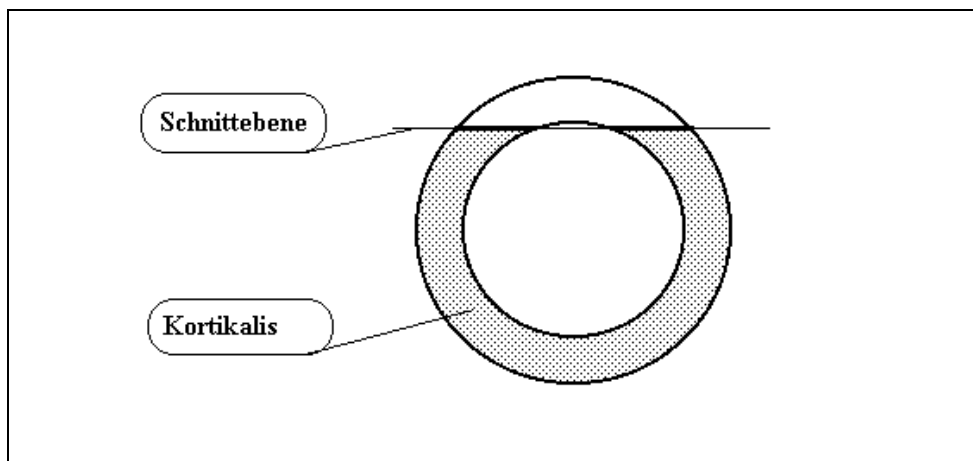


Abbildung 25: Tangentiale, katheternahe Schnitt Ebene

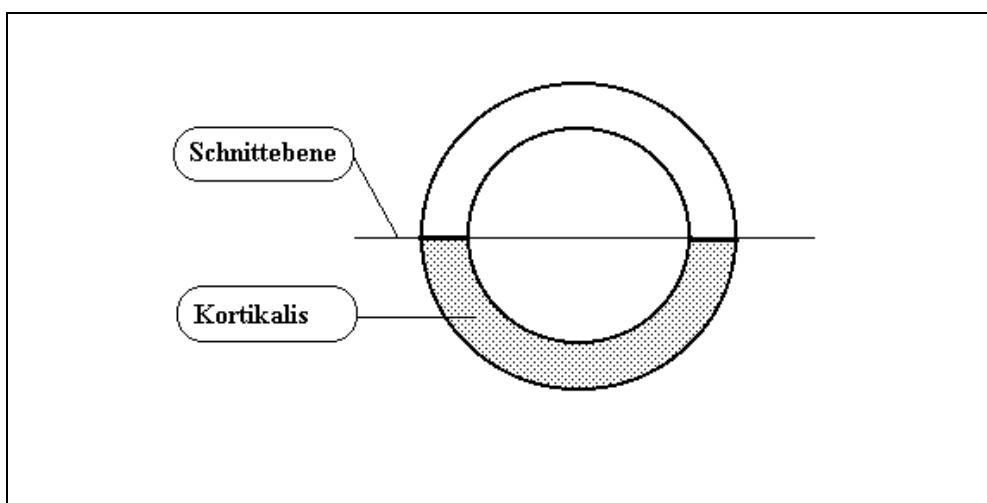


Abbildung 26: Zentrale Schnitt Ebene

So wurden von jedem Präparat zweimal 18 Schnitte angefertigt. 12 wurden gefärbt, sechs blieben als Notreserve ungefärbt.

Die Objektträger mußten vorher zur besseren Haftung der Schnitte mit Chromalaun-Gelatine beschichtet werden. Hierzu wurden die Gläser nach einer Vorschrift von KATHAGEN<sup>78</sup> zunächst 30 min. in 2%iger Salzsäure angeätzt, mit aqua destillata kurz gespült, dann 2 min. in 2%iger Natronlauge neutralisiert, kurz ab gespült und schließlich einer im Wärmeschrank auf 56°C temperierten Chromalaun-Gelatine-Lösung für 2 min. ausgesetzt. Die getrockneten und möglichst im gleichen Brutschrank aufbewahrten Objektträger waren nun gebrauchsfertig. Die Herstellung der Chromalaun-Gelatine erfolgte nach folgender Vorschrift:



Zunächst werden 4,5 g weiße Blatt-Gelatine (Merck Art. Nr. 4072) in 1 l. aqua destillata bei 75°C gelöst. Dann wird eine 4%ige Chromalaunlösung angesetzt (4 g. Kaliumbrom(III)-Sulfat in 100 ml aqua destillata gelöst) und 1 l. filtrierte Gelatinelösung mit 38,5 ml Chromalaun-Lösung und 2 Tropfen eines Detergenz (wie Spülmittel) versetzt.

Die Schnitte wurden nun mit der Pinzette auf die mit 40%igem Ethanol benetzten Objektträger aufgebracht und somit auch gleichzeitig ein wenig gestreckt. Ein zügiges Fortfahren war nötig, damit die Schnitte nicht eintrockneten. Mit einer Sonde aus dem zahnmedizinischen Bereich wurden die hauchdünnen Schnitte nun, mit einem Finger auf der einen Seite gehalten, delikaterweise an der anderen Seite gestreckt. Eine dünne Polyethylen-Folie (Kisol®-Folie, Kettenbach Dental, 35713 Eschenburg) wurde nun aufgelegt und eingeschlossene Luftblasen und Wellungen des Schnittes mit einem auf 4 mm abgeschnittenen Borstenhaarpinsel ausgestrichen. Mit nun etwas festerem Druck wurde der Schnitt schließlich auf den Objektträger 'aufgebügelt', um ein späteres Abschwimmen zu verhindern. Die Gläser wurden durch Löschblattstreifen voneinander getrennt in einer Objektträgerpresse, welche aus einer Schraubzwinge angefertigt werden konnte, komprimiert und über Nacht bei 56°C im Wärmeschrank belassen. Am Morgen konnten dann die Kisol-Folien abgezogen und die Präparate gefärbt werden.

#### 2.12.5. Färbung

Vor dem Färben mußten die Präparate entplastet, d. h. das Einbettmedium herausgelöst werden. Hierzu stellte man die Präparate unmittelbar vor dem Färben nacheinander jeweils 10 min. in mit dem organischen Lösungsmittel Methoxyethylacetat gefüllte Küvetten. Zu starkes Schwenken der Präparate hatte zu unterbleiben, um ein Abschwimmen der Schnitte zu verhindern. Abschließend wurde zur Hydratisierung die absteigende Alkoholreihe (Ethanol 99,9%, 95%, 80%, 70%, aqua destillata) durchlaufen, wenn sich kein lipophiler Färbegang anschloß.

Die Färbemethoden, welche in der unentkalkten Knochenhistologie Anwendung finden, unterscheiden sich von denen in der Paraffinhistologie. Von meinem Condoktoranden Björn Birkenhauer wurden sechs Färbungen speziell für die Anwendung an in PMMA eingebetteten Präparaten entwickelt und erprobt, welche an jedem Präparat Anwendung fanden. Im Folgenden sollen nun Technik und Aussagekraft dieser Färbungen besprochen werden.

## 2.12.5.1. Die Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner

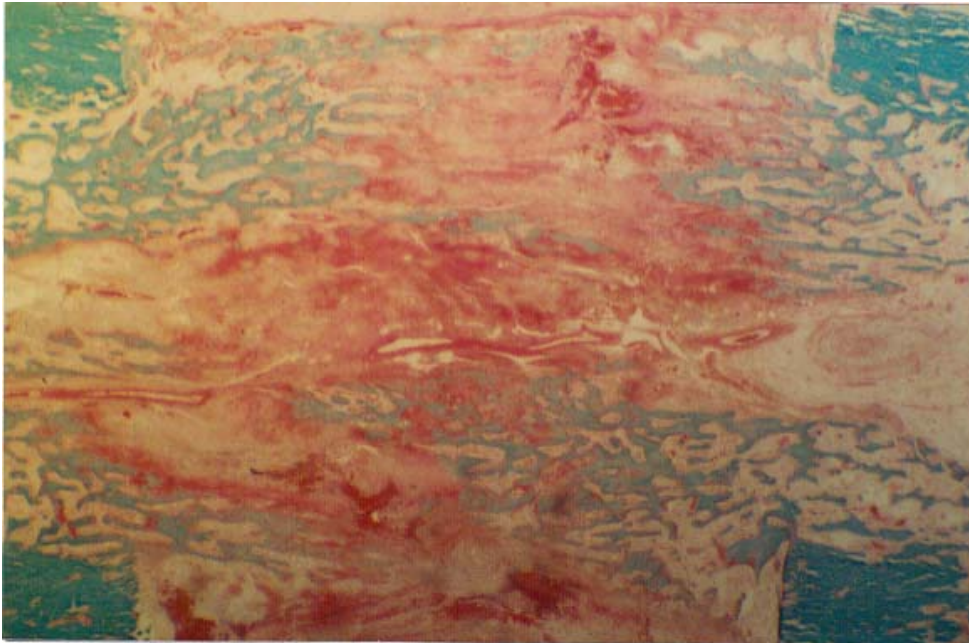


Abbildung 27: Ein histologisches Übersichtspräparat in der Trichrom-Goldner-Färbung (10 fache Vergrößerung, Präparat L0/5 re)

Diese Färbung stellt heute die Standard-Färbung in der Histomorphometrie dar, da neben guter Zellfärbung auch mineralisierte und nicht-mineralisierte Knochenmatrix gut differenziert werden können. Mineralisiertes Knochengewebe und Kollagen werden leuchtend grün, verkalkte Knorpelmatrix hellgrün, Osteoid rot, Zellkerne blauschwarz, Zytoplasma rötlich-braun und Erythrozyten orange gefärbt. Vor dem Färben stelle man sich zunächst folgende Lösungen zur Verfügung:

**Weigert's Eisenhämatoxylin: (Kernfärbung):**

Lösung a: 1 g Hämatoxylin  
100 ml 96%igem Ethanol

Lösung b: 1,16 g Eisen(III)chlorid  
100 ml aqua dest.  
1 ml 25%ige HCl

Beide Lösungen in gleichen Teilen mischen, dann jedoch innerhalb einer Woche aufbrauchen.

**Ponceau-Säurefuchsin-Lösung:**

1,0 g Ponceau de Xylidine  
0,5 g Säurefuchsin  
100 ml aqua dest.  
0,2 ml Eisessig

**Phosphorwolframsäure-Orange G:**

4 g Phosphorwolframsäure  
2 g Orange G  
100 ml aqua dest.

**Lichtgrün SF:**

0,2 g Lichtgrün SF  
0,2 ml Eisessig  
100 ml aqua dest.

Die Präparate werden nun folgendermaßen gefärbt:

- 15 min in Weigert's Eisenhämatoxylin
- Spülen mit fließend Wasser bis keine Farbwolken mehr abgehen
- 5 - 7 min Ponceau-Säurefuchsin
- 2 - 3 mal Spülen in 1%iger Essigsäure
- 7 min in Phosphormolybdän-Säure Orange G
- Spülen mit Wasser und 1%iger Essigsäure
- 15 min in Lichtgrün
- Spülen mit Wasser und 1%iger Essigsäure, anschließend wieder mit Wasser
- 3 mal in 70%igem Ethanol und
- 3 mal in 99,9%igem Ethanol eintauchen

#### 2.12.5.2. Die Kossa-Färbung

Für die automatische Bildanalyse ist die Kossa-Färbung, die Calciumsalze versilbert, hinsichtlich der Volumendichte-Bestimmung von verkalktem Osteoid prädestiniert. Vor allem calciumphosphathaltige Strukturen werden tief schwarz gefärbt, wobei allerdings die Differenzierbarkeit von Lamellen- oder Geflechtknochenstrukturen verloren geht.

Mineralisierte Knorpel- und Knochengewebe sind schwarz, Mineralisationsfronten schwarz-granuliert hervorgehoben. Das Zytoplasma erscheint orange bis rot, Erythrozyten und Osteoid leuchtend rot. Ein Übersichtspräparat wird in Abbildung 92, Seite 147 dargestellt.

Zunächst mußten erst wieder folgende Färbelösungen hergestellt werden:

#### **Silbernitrat-Lösung (5%ig):**

35 g Silbernitrat  
665 ml aqua dest.

Soda-Formol-Gemisch:

35 g Natriumcarbonat  
525 ml aqua dest.  
175 ml Formaldehydlösung 37% (wasserfrei)

#### **Natriumthiosulfat-Lösung (5%ig):**

35 g Natriumthiosulfat  
665 ml aqua dest.

#### **Ponceau de Xylidine:**

7 g Ponceau de Xylidine  
3,5 g Säurefuchsin  
700 ml aqua dest.  
2,8 ml Eisessig

**Phosphorwolframsäure Orange G:**

7 g Phosphorwolframsäure  
700 ml aqua dest.  
3,5 g Orange G

Gefärbt wurde folgendermaßen:

- 5 min Silbernitrat-Lösung
- 3 mal 3 min aqua dest.
- 3 min Soda-Formol-Gemisch
- 10 min Leitungswasser
- 5 min Natriumthiosulfat-Lösung
- 10 min Leitungswasser
- 5 min Ponceau de Xylidine
- Abspülen in 1%iger Essigsäure
- aqua dest.
- 7 min Phosphorwolframsäure Orange G
- Abspülen in 1%iger Essigsäure
- aqua dest.

## 2.12.5.3. Die Toluidinblau-Färbung

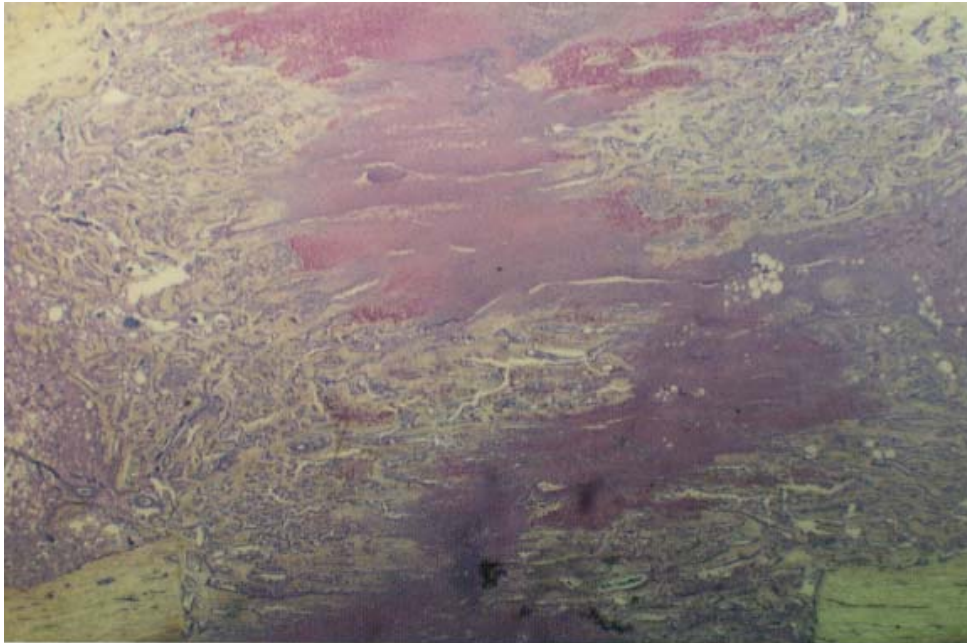


Abbildung 28: Ein histologisches Übersichtspräparat in der Toluidin-Färbung (10 fache Vergrößerung, Präparat L0/3 li)

Die einfache, schnelle Färbung bietet trotz der Verwendung nur eines Farbstoffes aufgrund metachromatischer Effekte sehr gute Differenzierungs-Möglichkeiten des Gewebes, welche durch Entfärbung in Ethanol noch verstärkt werden. Nach REVELL<sup>79</sup> erscheint die Mineralisationsgrenze als eine körnig violette Linie.

Mineralisiertes Hartgewebe wird blaßblau oder nicht gefärbt, Zellen und Weichgewebe unterschiedlich blau, Knorpelmatrix metachromatisch rot-violett, verkalkte Knorpelmatrix dunkelblau gefärbt.

Zunächst wird die **Gebrauchslösung** durch 1:4-Verdünnung aus der Stammlösung hergestellt:

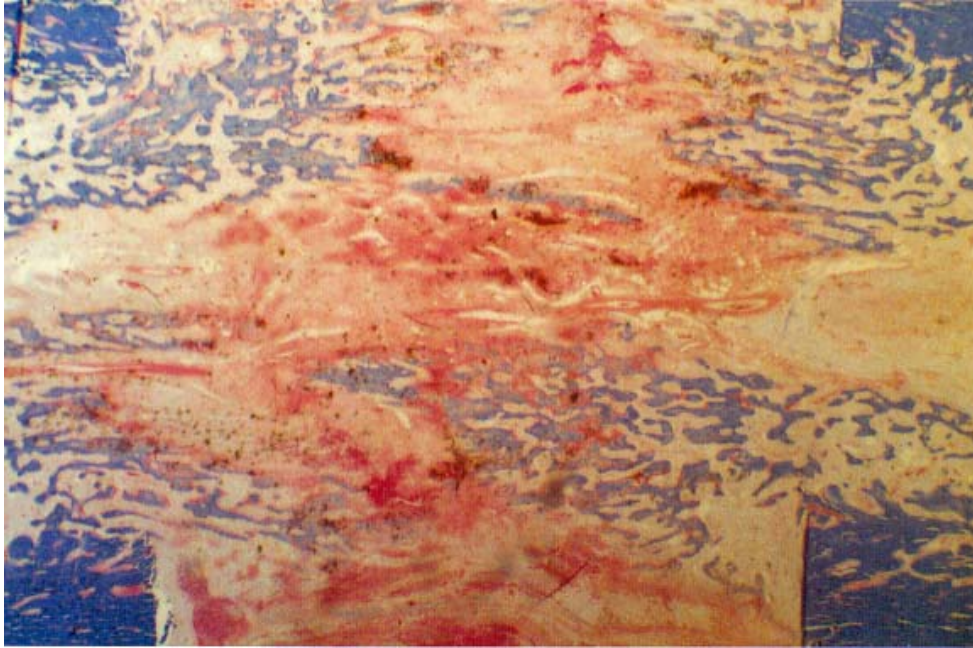
**Stammlösung:**

- 1 g Toluidinblau
- 2,54 g Natriumhydrogencarbonat
- 100 ml aqua dest.

Die Färbung erfolgte wie folgt:

- 3,5 min Toluidin-Gebrauchlösung
- Spülen in aqua dest.

#### 2.12.5.4. Die Azan-Färbung



*Abbildung 29: Ein histologisches Übersichtspräparat in der Azan-Färbung (10fache Vergrößerung, Präparat L0/5 re)*

Da die Mineralisierung keinen Einfluß auf die Färbungsintensität hat, lassen sich mineralisierte und nicht mineralisierte Substanzen nur schwer unterscheiden. Durch die selektive Blaufärbung kollagenhaltiger Elemente, fungiert die Azan-Färbung jedoch als guter Kollagenindikator.

Kollagenes und retikuläres Bindegewebe ist hellblau, Zellkerne rot, Muskelgewebe rötlich bis orange, Erythrozyten rot, saure Mukopolysaccharide blau und das Zytoplasma blaßrosa bis bläulich gefärbt.

Die Färbelösungen werden folgendermaßen angesetzt:

**Azokarmin:**

0,1 g Azokarmin G

100 ml aqua dest.

Aufkochen und filtrieren,

1 ml Eisessig zusetzen

**Anilinalkohol:**

0,1 ml Anilinöl

100 ml 90%iges Ethanol

**Eisessig-Alkohol:**

1 ml Eisessig

100 ml 96%iger Alkohol

**Azanlösung:**

0,5 g Anilinblau wasserlöslich

2 g Orange G

8 ml Eisessig

200 ml aqua dest.

**Phosphorwolfram-Lösung:**

5 g Phosphorwolframsäure

100 ml aqua dest.



Gefärbt wurde wie folgt:

- 30 min Azokarmin bei 56°C
- Spülen in Wasser
- einige Minuten differenzieren in Anilinalkohol, bis die Kerne deutlich gefärbt sind
- 2 min Eisessig-Alkohol
- 3 Stunden Phosphorwolframlösung
- Spülen in Wasser
- 4 min Azan-Lösung
- Spülen in Wasser
- Differenzieren in 96%igem Ethanol

## 2.12.5.5. Die Alzianblau-PAS-Färbung

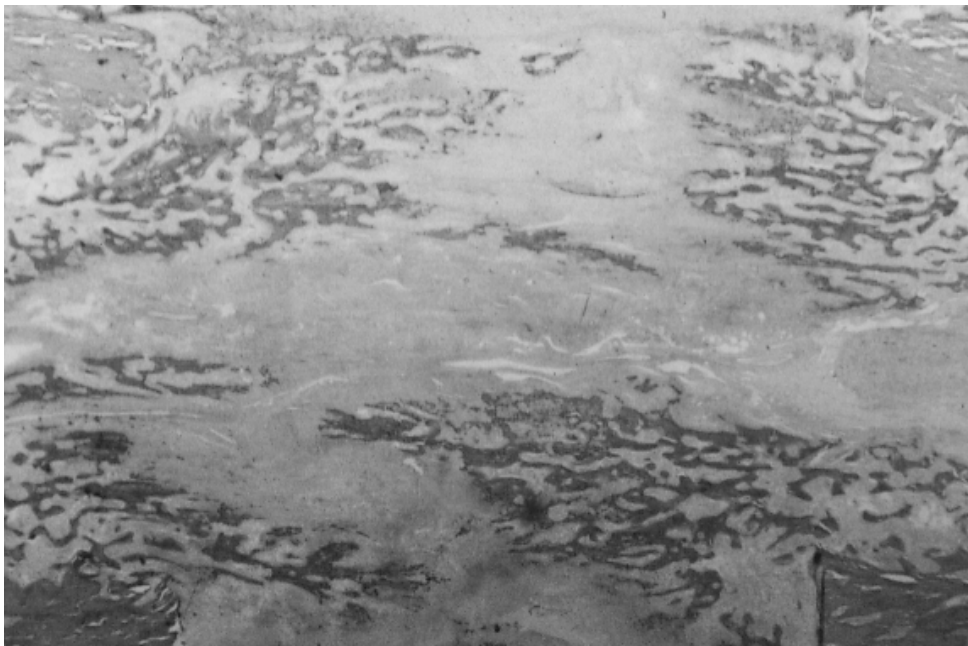


Abbildung 30: Ein histologisches Übersichtspräparat in der Alzianblau-PAS-Färbung (10fache Vergrößerung, Präparat L0/5 re)

Diese klassische Kombination erlaubt die gleichzeitige Darstellung neutraler Polysaccharide und saurer Glykosaminoglykane (z. B. bei enchondraler Ossifikation und bei Knochen- und Wundheilungsvorgängen), ist jedoch histochemisch nicht spezifisch und zudem von der Fixierung abhängig.

Zellkerne sind blau, saure Glykosaminoglykane der Knorpel- und Bindegewebsmatrix blaugrün, Osteoid und Knorpelmatrix blaßrosa, mineralisierte Hartgewebe zart rötlich, Glykogen und Glykoproteine dunkel purpurrot gefärbt. Die PAS-Reaktion umfaßt den Nachweis von Polysacchariden, neutralen Mucopolysacchariden, Muco- und Glykoproteinen, Glykolipiden, ungesättigte Fette und Phospholipide. Sie beruht darauf, daß Perjodsäure ( $\text{HJO}_4$ ) oxydierend auf 1,2-Diole - $\text{CH}(\text{OH})\text{-CH}(\text{OH})\text{-}$  wirkt. Bei dieser Reaktion entstehen Dialdehyde, die anschließend mit dem Schiffschen Reagenz nachgewiesen werden können. Die Reaktion ist also für 1,2-Diole spezifisch, welche in Kohlenhydraten, doch auch z. B. in Lipiden vorhanden sind<sup>80</sup>.

Herstellen der Färbelösungen:

**Alzianblau-Lösung:**

1 g Alzianblau-8GS  
100 ml 3%ige Essigsäure

**Schiffssches Reagenz:**

2 g basisches Parafuchsin  
400 ml aqua dest.  
heiß lösen, auf 50°C abkühlen lassen, filtrieren  
40 ml 1-normale Salzsäure  
auf 25°C abkühlen lassen  
2 g Natriumdisulfit  
24 Stunden dunkel stellen, danach mit 2 g Aktivkohle 1 Minute kräftig schütteln und  
filtrieren. Die fertige Lösung muß farblos sein. Im Kühlschrank lagern!

**0,5%ige Perjodsäure:**

0,5 g Perjodsäure  
100 ml aqua dest.  
nur einen Tag haltbar!

**Sulfitwasser:**

2,5 g Natriumdisulfit  
5 ml 1-normale Salzsäure  
495 ml aqua dest.

**Weigert's Eisenhämatoxylin (Kernfärbung):**

Lösung a: 1 g Hämatoxylin  
100 ml 96%iges Ethanol

Lösung b: 1,16 g Eisenchlorid  
1 ml 25%ige Salzsäure  
100 ml aqua dest.

Beide Lösungen sind 1:1 zu mischen, dann aber nur eine Woche haltbar.

Gefärbt wird nach folgender Vorschrift:

- 3 min 3%ige Essigsäure
- 2 Stunden Alzianblau-Lösung
- 5 min fließend Wasser
- 30 min 0,5%ige Perjodsäure
- 5 min Leitungswasser
- 30 min Schiffssches Reagenz
- 2 mal 3 min Waschen in Sulfitwasser
- 10 min fließend Wasser
- 10-15 min Weigerts Eisenhämatoxylin
- mit aqua dest. spülen bis keine Farbwolken mehr abgehen
- 10 min warmes Leitungswasser

## 2.12.5.6. Die Carstairs-Färbung



Abbildung 31: Ein histologisches Übersichtspräparat in der Carstairs-Färbung (10 fache Vergrößerung, Präparat L0/5 re)

Die von CARSTAIRS (1965) angegebene Färbung erlaubt die gleichzeitige Darstellung von Fibrin und Blutplättchen. Die Anfärbung der verschiedenen Strukturen ist von der Art und Dauer der Fixierung abhängig. Nur bei längerfristiger Fixierung auf Formalinbasis ist das angegebene Färbeverhalten zu erwarten. Die Erythrozytenfärbung hat dabei Indikatorfunktion. Bei nur kurzfristiger Formalinfixierung färben sie sich uneinheitlich gelb, rot oder grün.

Interessanterweise erwies sich diese Färbung, die sonst in der Literatur nur für die Paraffineinbettung beschrieben und ursprünglich der Darstellung von Fibrin gewidmet ist, ähnlich der Trichrom-Goldner-Färbung als farbkontrastreiche Differenzierung von mineralisiertem zu unmineralisiertem Osteoid. Der blau-rot-Kontrast dieser Färbung war zudem noch besser als der grün-rot-Kontrast der Trichrom-Färbung zur automatischen Morphometrie geeignet. Unmineralisiertes Osteoid stellt sich leuchtend rot, mineralisiertes dunkelblau dar.

Das Fibrin färbt sich hellrot, Thrombocyten graublau, kollagenes Bindegewebe blau, Muskulatur dunkelrot und die Erythrocyten gelb.

Die Färbelösungen werden wie folgt hergestellt:

**Eisenalaun-Färbelösung:**

5 mg Eisenalaun ( $\text{KFe}(\text{SO}_4)_2$ )  
100 ml aqua destillata

**Mayers Hämatoxylin (Kernfärbung):**

käufliche Färbelösung (Merck Art. Nr. 9249)

**Pikrinsäure-Orange G-Färbelösung:**

20 ml gesättigte, wäßrige Pikrinsäurelösung  
80 ml gesättigte, in Isopropanol gelöste Pikrinsäurelösung  
beide Lösungen mischen  
0,2 g Orange G

**Ponceau-Fuchsin-Färbelösung:**

0,5 g Säurefuchsin  
0,5 g Ponceau 2R  
100 ml 1%ige Essigsäure

**Anilinblau-Färbelösung:**

1 g Anilinblau  
100ml 1%ige Essigsäure

Gefärbt wird nach folgendem Arbeitsgang:

- 10 min Eisenalaun-Lösung
- 10 min Mayers Hämatoxylin
- 1-2 min fließend Leitungswasser
- 1,5 Stunden Pikrinsäure-Orange G-Färbelösung
- aqua dest.
- 10-15 min Ponceau-Fuchsin-Färbelösung
- aqua dest.
- wenige Minuten in Phosphorwolframsäure bis Muskulatur rot und Hintergrund blaßrosa
- 30-45 min Anilinblau-Färbelösung

Die sich nun im wäßrigen Medium befindlichen Präparate mußten nun zur Eindeckung mit der organischen Verbindung Xylol in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 50%, 70%, 99,9%) dehydratisiert werden. Zwei Bäder in Xylol folgten, woraufhin mit einem automatischen Eindeckgerät ( Coveraid, Fa. Vogel GmbH & Co KG, Gießen) die Deckgläser auf die Objektträger gebracht wurden. Anschließend verblieben die Präparate über Nacht bei 56°C im Trockenschrank.

### 2.13. Auswertung

Der Versuch der quantitativen Auswertung histologischer Präparate hat zur Entwicklung der Histomorphometrie geführt. Auch in der Osteologie findet sie breite Verwendung, was sich in Meßgrößen wie Bone Volume, Osteoid volume/surface, Eroded surface, Osteoclast/-blast surface/number, trabecular thickness/separation etc. widerspiegelt<sup>81</sup>.

Grundlage der Messungen ist die Stereologie, welche Überlegungen und Gesetze der Statistik mit denen der Geometrie und Mathematik vereint. Über den hier gegebenen Einblick hinaus können erschöpfende Informationen aus im Literaturverzeichnis angegebenen Veröffentlichungen<sup>82,83,84,85</sup> bezogen werden. Bezüglich der Methodik sind drei Meßverfahren zu nennen:

- Nicht automatische stereologische Methoden, bei denen mittels eines Rasterokulars über die Auszählung auf die zu messende Struktur fallender Punkte, diese durchkreuzender Linien oder nach bestimmten Regeln von dieser angeschnittener Quadrate Aussagen über deren Flächen- und Raumausdehnung gemacht werden

können. Von nur noch historischer Bedeutung, den Leser jedoch sicherlich amüsierend, sind Verfahren, bei denen das Mikroskopbild abgezeichnet oder fotografiert, die Struktur ausgeschnitten und schließlich gewogen wurde.

- Halbautomatische Bildanalysemethoden, bei denen mit einem Licht- oder Kontaktstift die zu messende Struktur auf einem Digitalisierbrett umfahren wird.
- Die immer mehr Verbreitung findenden vollautomatischen, computergestützten Bildanalyssysteme, die über eine Kamera digitalisierte Bilder in deren Grau- und neuerdings Farbabstufungen analysieren. Hier zu nennen sind z. B. das System IBAS und VIDAS von Kontron/Zeiss oder das aus dem Texturanalysesystem (TAS, Leitz) von der Firma Leica weiterentwickelte Quantimet.

Die hier vorliegende Arbeit wurde mit dem Gerät Quantimet 500+ ausgewertet, welches die Vorteile der schnellen Auswertung möglichst vieler Gesichtsfelder unter guter Standardisierung und direkter Datenverarbeitung, sowie weitgehender Unabhängigkeit vom Auswerter miteinander verband<sup>86</sup>.



*Abbildung 32: Die Kollegen Birkenhauer und Bräuer während der Auswertung an dem Quantimet 500+<sup>®</sup>. Die im Mikroskop eingestellten Bildausschnitte werden mit einer hochauflösenden CCD-Kamera aufgenommen und im Rechner digital verarbeitet.*

Voraussetzungen für die Histomorphometrie sind die gleichmäßige und konstante räumliche Verteilung der Strukturelemente<sup>87</sup>. Diese ist Voraussetzung für die statistisch abgesicherte Übertragung der von einer Fläche gewonnenen Ergebnisse auf die 3-Dimensionalität:



Das stereologische Axiom von DELESSE (1848)<sup>88</sup> besagt diesbezüglich, daß die Volumendichte ( $V_V$ ), also das Verhältnis von Elementvolumen zu Bezugsvolumen, von Strukturelementen ( $x$ ) den Anschnittsflächen ( $A$ ) dieser Elemente in einem Quadratraster pro Bezugsfläche ( $B$ ) entspricht:

$$V_V = \frac{A(x)}{A(B)}$$

Das Axiom von ROSIWAL (1898)<sup>89</sup> legt fest, dem obenem ähnlich, daß die Volumendichte ( $V_V$ ) von Strukturelementen ( $x$ ) der Gesamtlänge der Testlinien über den Anschnittsflächen der Strukturelemente bezogen auf die Gesamtlänge der Testlinien über der Bezugsfläche  $L(B)$  entspricht:

$$V_V = \frac{L(x)}{L(B)}$$

THOMSEN (1930) und GLAGOLEFF (1933)<sup>90</sup> erweiterten die Axiome um ein drittes: Die Volumendichte entspricht dem Verhältnis der auf ein Strukturelement zu den auf die Bezugsfläche treffenden Punkte ( $P$ ) eines Punkterasters:

$$V_V = \frac{P(x)}{P(B)}$$

Die in der Zweidimensionalität eines histologischen Präparates gewonnenen Werte können somit in einer Schätzung auf die dritte Dimension erweitert werden.

Wenn man nun die Dicke von Osteoidbälkchen in einem Präparat mißt, so erfaßt man bei genauerer Überlegung nicht ihre wahre Dicke, sondern die meist größere Anschittfläche. Die erfaßte Größe ist abhängig von der Ausrichtung der Strukturelemente!

Die Verhältnisgrößen, deren Bezugsgrößen (Nenner und Zähler) jedoch der gleichen Dimension angehören, wie die genannte Volumendichte und auch die Flächendichte (Strukturelementfläche pro Gesamtbezugsfläche), aus der sich mittels erstem oberen Axiom die Volumendichte herleitet, sind von einer etwaigen Ausrichtung der Strukturelemente glücklicherweise unabhängig. Die Verzerrungsfaktoren beziehen sich auf die gleiche Dimension und kürzen sich raus. Dies erklärt sich bildlich folgendermaßen:

Wird ein der Einfachheit halber als Quader (Stirnseitenkantenlänge = 1) angenommenes, im Raum ausgerichtetes 'Strukturelement' nicht orthogonal zur Achse,

sondern schräg in dem Winkel  $\alpha = 30^\circ$  von einer Schnittebene getroffen, ist zwar die Schnittfläche (zweidimensional) um  $1/\sin\alpha = 2$  vergrößert, ihr Verhältnis zur ebenfalls um den gleichen Betrag vergrößerten Gesamtbezugsfläche, d. h. dem gesamten Schnitt, (auch zweidimensional) gleich geblieben. Anders verhält es sich z. B. mit ihrem Umfang (eindimensional!): Der Umfang ( $U = 4$ ) ist durch die Verzerrung verhältnismäßig geringer angewachsen (nun  $U = 6$ ), als die verdoppelte Gesamtbezugsfläche (zweidimensional) (siehe Abb. 33). Die Ausrichtung würde sich also mit dem Ausrichtungswinkel  $\alpha$  auf die letztere Relationsgröße auswirken und müßte bei ausgerichteten Strukturen mittels eines Korrekturfaktors mit einberechnet werden.

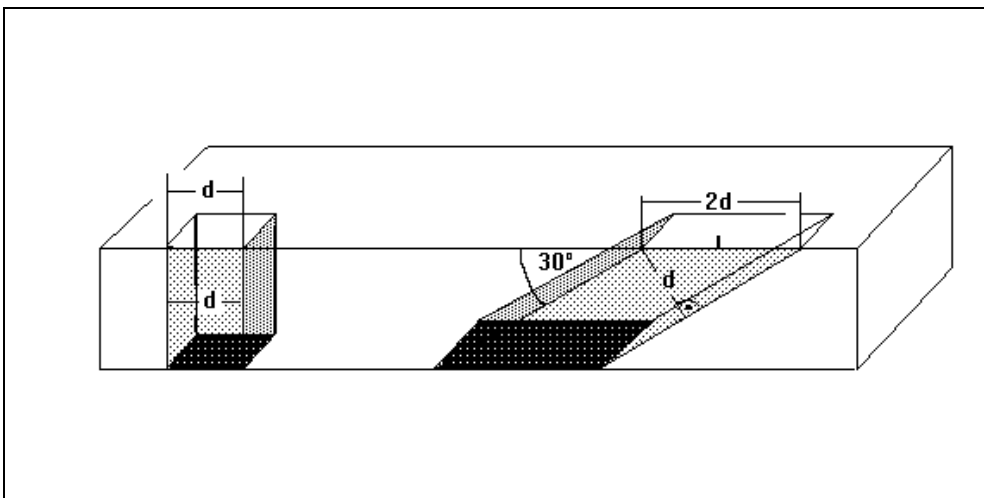


Abbildung 33: Abhängigkeit der Maße von der Ausrichtung der Strukturen

Da es sich bei Knochenbälkchen einer Distraktionszone um klar ausgerichtete Strukturen handelt, diese jedoch die Schnittebene bei den angefertigten Längsschnitten im Winkel  $\alpha = 0^\circ$  schneiden (der  $\sin \alpha = 0$  enthaltene Korrekturfaktor wäre unsinnig), d. h. parallel zur Schnittebene verlaufen, fällt hier die Bestimmung absoluter Werte anderer in der Histomorphometrie verwendeter Verhältnisgrößen, wie Oberflächenvolumen ( $\text{mm}^2/\text{mm}^3$ ), Längendichte ( $\text{mm}/\text{mm}^3$ ) oder Umfangsdichte ( $\text{mm}/\text{mm}^2$ ) aus. Lediglich ein Vergleich der gemessenen Werte zwischen Kontroll- und Verumgruppe ist hier legal, da das gesamte Vorgehen für beide Gruppen identisch ist. Vergleiche der hier angegebenen 'absoluten' Werte mit denen anderer Messungen sind für Verhältnisparameter mit Größen unterschiedlicher Dimensionen in Zähler und Nenner im Hinblick auf die 3. Dimension nicht möglich.

Ein anderer Effekt, welcher bei der Oberflächenanalyse in der Histomorphometrie zu beachten ist, besteht in der Tatsache, daß auf dicken Schnitten 'mehr' Fläche zu sehen ist, wenn Objekte schräg den Schnitt durchlaufen, als bei dünnen Schnitten (*Holmes-Effekt*, siehe Abb. 34).

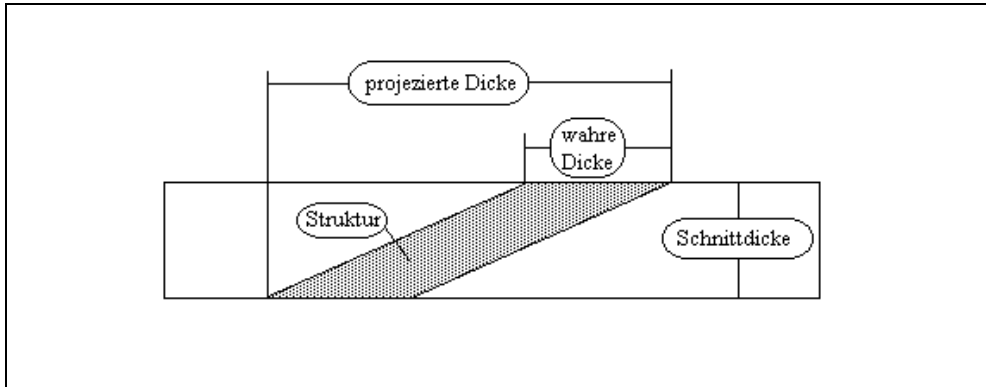


Abbildung 34: Holmes-Effekt

Da in vorliegendem vergleichendem Versuch Absolutwerte jedoch keine Rolle spielen und die Präparate sowohl der Verum-, wie der Kontrollgruppe 5 µm dick geschnitten sind, kann der Holmes-Effekt außer Acht gelassen werden. Für die Auszählung der 10-12 µm langen und 4-7 µm breiten Osteoprogenitorzellen<sup>91</sup> spielt er bei einer Schnittdicke von 5 µm zudem kaum eine Rolle.

Auch die bei Erfordernis absoluter Werte zu berücksichtigende Gewebeschrumpfung, bei der unentkalkten Knochenhistologie schon gering, braucht bei der standardisierten histologischen Aufarbeitung dieses Versuchs nicht einkalkuliert werden<sup>92</sup>.

Änderungen der Mikroskop-Vergrößerung von 25 auf 400 fache Vergrößerung wirkten sich bei einer Untersuchung<sup>93</sup> kaum auf die Volumendichte aus, die gemessene Oberflächendichte stieg jedoch systematisch an.

Die Volumendichte des mineralisierten Osteoids wurde mit Kossa-gefärbten Präparaten für die zentrale wie für die tangential, katheter- und kortikalisnahe Schnittenebene bestimmt. Das Verhältnis verkalkter zu nicht verkalkter Osteoidstruktur (Carstairs-gefärbte Präparate), der Osteblastenumfang (Präparate der Trichrom-Goldner-Färbung), die Umfangdichte (Kossa), der Flächenanteil der Kollagenfasern (Carstairs) und die Anisotropie (Kossa) wurden lediglich für die zentrale Schnittenebene bestimmt, da sich bei der Bestimmung der Volumendichte kein signifikanter

Unterschied zwischen den beiden Schnittebenen abzeichnete. Die hier verwendeten Meßgrößen richten sich nach der Vereinbarung des Histomorphometry Nomenclature Committees (PARFITT 1987)<sup>81</sup>.

### 2.13.1. Bestimmung der Volumendichte des mineralisierten Osteoids

Für ein standardisiertes Vorgehen war es wichtig, die Distraktionszone in standardisiert verteilte Gesichtsfelder einzuteilen. Hierzu wurden durch die jeweils oberen Ecken der der Distraktionszone zugewandten vier Kompakta-Anschnitte zwei Diagonalen gelegt. Nun wurden unterhalb und entlang beider Diagonalen Rahmen einer Fläche von 0,8 mm<sup>2</sup> bei 63-facher Vergrößerung ausgemessen, sodaß der erste und letzte Rahmen außerhalb, direkt an der Kompakta, jedoch noch innerhalb des Callus lag (siehe Abbildung 35). Da der Callus unterschiedlich dick war, ergaben sich somit eine Gesamtheit ausgemessener Rahmen von 15 bis 23 Rahmen. Die Meßrahmengröße wurde mittels eines Mikrometers auf die jeweilige Vergrößerung kalibriert. Das digitale Bildverarbeitungssystem berechnete nun den Flächeninhalt und Umfang der in Kossa schwarz gefärbten Osteoidbälkchen (siehe Abbildung 36). Mit dem bekannten Flächeninhalt des Meßrahmens (0,8 mm<sup>2</sup>) wurde gleichzeitig der relative Flächenanteil in Dezimalbruch und Prozentanteil angegeben, der der Volumendichte des verkalkten Osteoids entspricht.

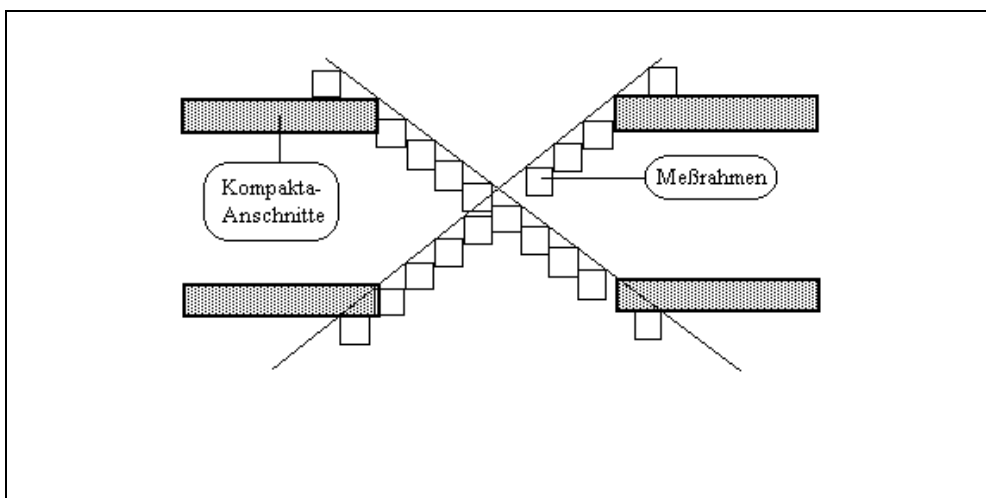


Abbildung 35: Auszählung entlang der Diagonalen

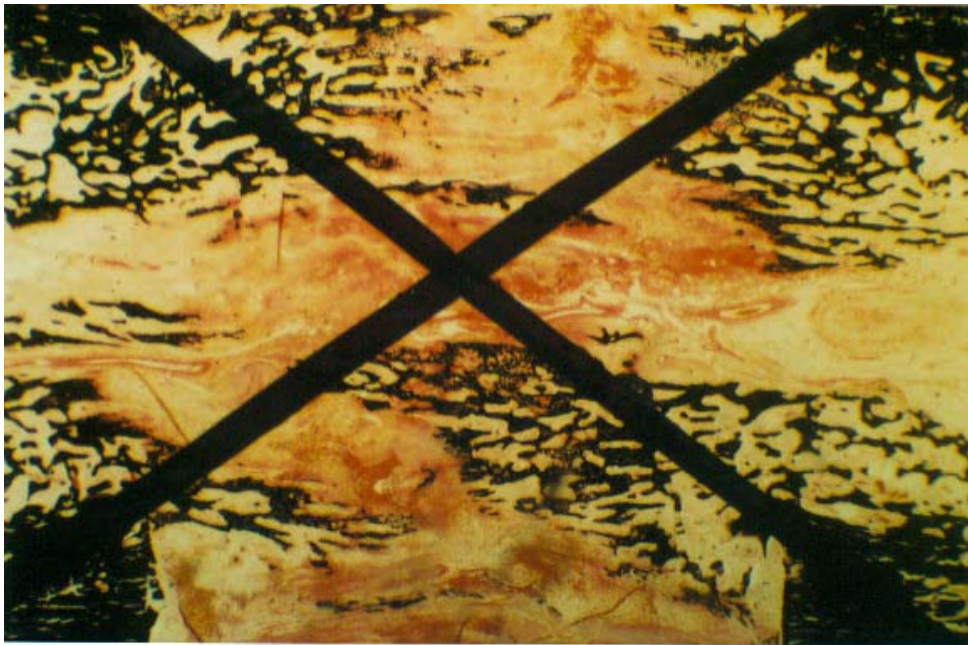


Abbildung 36: Ein Diagonalen-Zählkreuz ist in einem Präparat eingezeichnet. Das mineralisierte Osteoid der Primärtrabekel läßt sich gut von der Grundfärbung differenzieren.  
(Kossa, 10 fache Vergrößerung, Präparat L0/5 re)

#### 2.13.2. Bestimmung des Verhältnisses von verkalkter zu unverkalkter Osteoidstruktur

Präparate der Carstairs-Färbung wurden dazu herangezogen, das Verhältnis von verkalktem Osteoid zu unverkalktem Osteoid in der Distraktionszone zu bestimmen. Wie übrigens auch die Trichrom-Goldner-Färbung (siehe Abbildung 37), welche gewöhnlicherweise in der Osteologie zur Diagnose von Knochenbiopsien herangezogen wird und eine gute Differenzierung des verkalkten zum unverkalkten Osteoid und der trabekulären Oberflächen bietet (REVELL 1983)<sup>79</sup>, wurden in der Carstairs-Färbung (siehe Abbildung 38) die Übergangszonen der Kalzifizierung ebenso gut sichtbar, waren jedoch kontrastreicher und für den Digitalwandler besser zu diskriminieren.

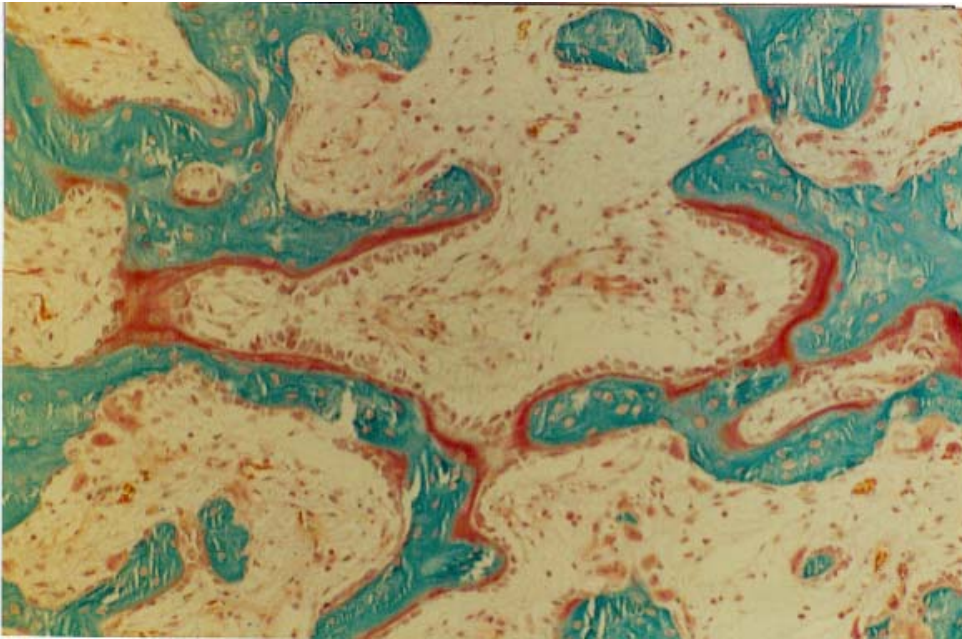
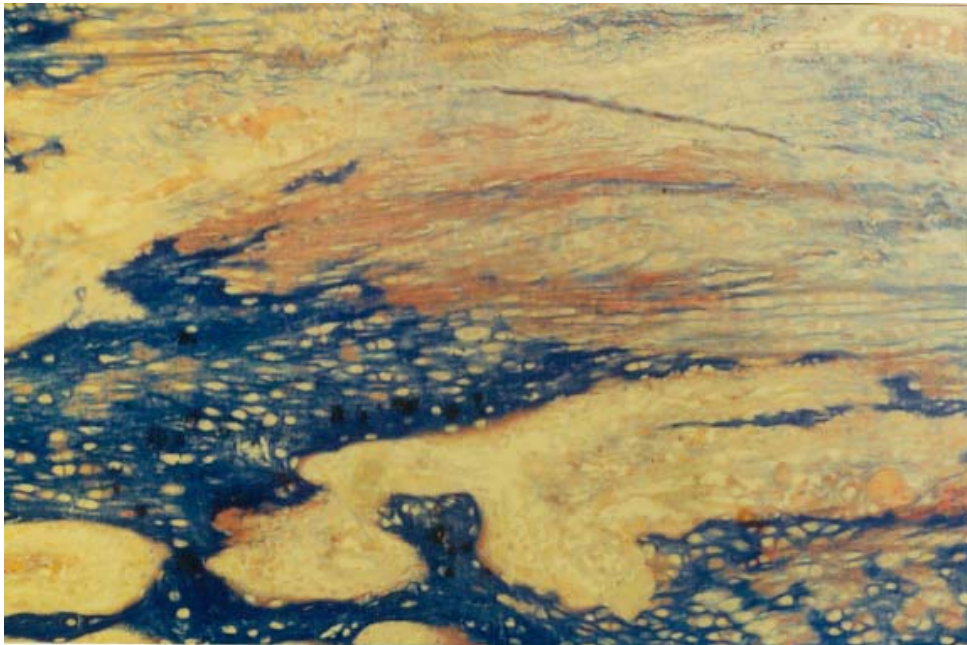


Abbildung 37: Gut zu differenzierender Übergang von unverkalktem (rot) zu verkalktem (grün) Osteoid der Marktrabekel in der Trichrom-Goldner-Färbung (100 fache Vergrößerung, Präparat L0/13 re)



Abbildung 38: Gut zu differenzierender Übergang von unverkalktem (rot) zu verkalktem (blau) Osteoid der Marktrabekel in der Carstairs-Färbung (100 fache Vergrößerung, Präparat L0/13 re)

Die Osteoid- und Primärtrabekelstruktur eines derart beschleunigt gewachsenen Knochens, wie der einer Callotasis, weist eine andere, etwas klobigere Struktur, als die des physiologisch sich umformenden Knochens auf. Während in der Spongiosa des Markes beispielsweise klar abgrenzbare, filigrane, klassische Trabekelstruktur vorherrscht, deren Mineralisationsfronten relativ glatt und stetig, die Dicke des unverkalkten Osteoids nahezu konstant sind (siehe Abbildung 38), verhält es sich in der zentralen Distraktionszone stochastischer. Zwar sind fischzugartig angeordnete Osteoprogenitorzellen und zur Zugrichtung parallel angeordnete Kollagenfasern klar zu erkennen, die Kalzifizierung der Grundstruktur ist jedoch eher fleckig und großflächiger anzutreffen (siehe Abbildung 39). Die Analogie der Anfärbbarkeit von Marktrabekeln und Verkalkungen der Distraktionszone und ihr gleichmäßiger Übergang von statischer Trabekelstruktur zu der 'dynamischen' Struktur der Distraktionszone läßt jedoch auf gleichartige Prozesse in beiden Knochenumbauzonen schließen.



*Abbildung 39: Farblich gut zu differenzierende verkalkte (blau) und unverkalkte (rot) Knochengrundsubstanz der Distraktionszone in der Carstairs-Färbung. Links unten bereits vollkommen mineralisierte, 'statisch' anmutende Primärtrabekel, die mittig in rotes, unverkalktes, eher dynamisch, sich in der Zugrichtung ausrichtendes Osteoid der Distraktionszone übergehen. Rechts Osteochondroblastensäulen in Distraktionsrichtung, oben gewellte, ebenfalls blaue Kollagenfasern. (100 fache Vergrößerung, Präparat L0/13 re)*

Eine zunächst als Färbartefakt gedeutete fleckige Rotfärbung der Kortikalis, wo keinerlei Fibrin zu erwarten ist, unterstreicht die Anwendbarkeit der Carstairs-Färbung zur Differenzierung der Mineralisation von Osteoid: Der junge, schnell heranwachsende

Knochen von Kaninchen zeigt in seiner 'Primärkompakta', also der noch fetalen, hauptsächlich noch aus nicht remodeliertem Faserknochen bestehenden Kompakta Mineralisationsstörungen und -defekte. Die nicht vollständig mineralisierten Areale färben sich hier rot an (siehe folgende Abbildung 40).



Abbildung 40: Fleckig angeordnete Mineralisationsstörungen der jungen Kaninchenkompakta färben sich in der Carstairs-Färbung rot an. Im Laufe des Heranwachsens werden diese Areale durch das 'Remodeling' durchbaut und mineralisiert. (Carstairs, 100 fache Vergrößerung, Präparat L0/14 li)

Zur Auszählung wurde diesmal ein anderes Auszählverfahren gewählt, bei dem zwei, die Kompaktaenden tangierende Orthogonalen zur Knochenachse gelegt wurden, entlang derer nun Meßrahmen an Meßrahmen, der Distaktionszone abgewandt, ausgezählt wurde (siehe Abbildung 41). Hierdurch wurden zwischen 10 und 24 Meßrahmen ausgewertet. Gemessen wurde vom Computer jeweils die Fläche verkalkter und unverkalkter Strukturen und dazu der Quotient gebildet. Verwendet wurde ein Meßrahmen einer Fläche von 0,83 mm<sup>2</sup> bei ebenfalls 63-facher Vergrößerung.



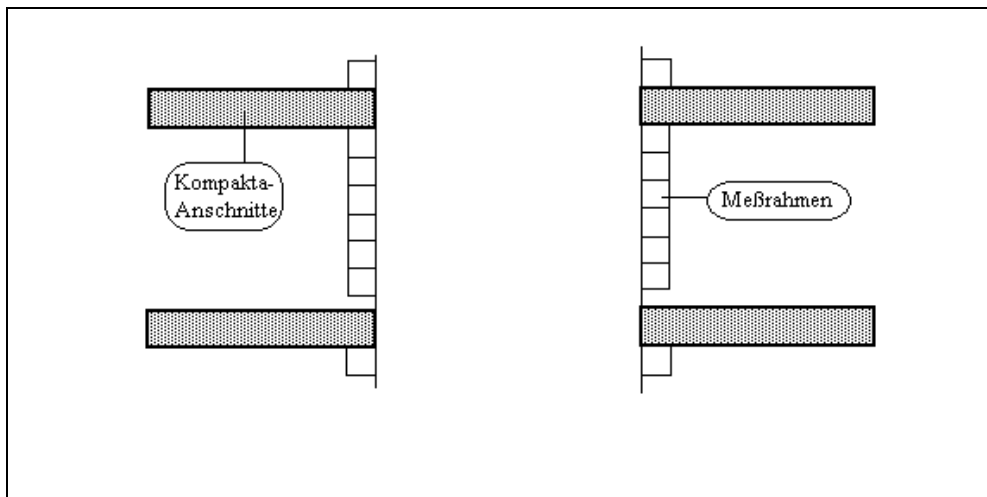


Abbildung 41: Auszählung entlang der Orthogonalen

### 2.13.3. Bestimmung des Osteoblastenumfangs.

Im nach Trichrom-Goldner gefärbtem Präparat wurden bei 250-facher Vergrößerung die die Trabekel bedeckenden Osteoblasten (siehe auch Seite 149, Abbildung 94) ausgezählt und in Relation zum mitbestimmten Umfang der Trabekel gesetzt. Die Meßrahmen der Fläche von 0,052 mm<sup>2</sup> wurden, wie bei der Bestimmung des Verhältnisses von verkalkter zu unverkalkter Osteoidstruktur, entlang einer die Kortikalisenden verbindenden, quer zur Knochenlängsachse verlaufenden Geraden ausgewählt (siehe Abb. 41). Somit wurde also der von PARFITT 1987<sup>81</sup> definierte Osteoblastenumfang 'Ob.Pm.' bestimmt, ein Maß für den Osteoblastenbesatz (keine Dimension) pro Länge des Trabekelumfangs (eindimensional). Dieses Ergebnis bezog sich nun aus oben genannten Gründen nur auf die Schnittebene des Präparates, konnte also nicht auf das umliegende Volumen geschätzt werden, da der gebildete Quotient aus Werten unterschiedlicher Dimension gebildet war.

### 2.13.4. Bestimmung der Umfangdichte der Trabekel.

Aus den Messungen der Bestimmung des Osteoidvolumens (siehe Seite 84 ff., Abbildungen 35 und 36) wurde der Quotient aus Umfang (Pm.) pro Fläche (A), die Umfangsdichte, gebildet, einer Maßeinheit der geometrischen Komplexität der Trabekel. Hierbei steht die Überlegung Pate, ein möglichst komplexes, an der Oberfläche rauhes oder vielverzweigtes Trabekel habe viel Anbaufläche für darauf befindliche Osteoblasten, stelle damit auch eine Voraussetzung für schnelles Knochenwachstum dar. In der Tat erschienen die Trabekel sehr dicht, fast maximal

besetzt, was für die Aussagekraft nicht nur des Osteblastenumfangs, sondern bei maximalem Zellbesatz gerade dieses Parameters spricht.

#### 2.13.5. Bestimmung des Flächenanteils der Kollagenfasern.

Aufgrund der guten Diskriminierbarkeit der flächenhaft angeordneten, gewellten Kollagenfasern in der Carstairs-Färbung, wurden Präparate dieser Färbung zur Messung herangezogen (siehe Abbildung 95, Seite 151). Die Meßrahmengröße betrug bei 63-facher Vergrößerung  $1,05 \text{ mm}^2$ . Gemessen wurden zwischen 9 und 15 Rahmen pro Präparat entlang einer die Distractionszone quer und mittig teilenden Gerade, da hier die Zone vermehrter Kollagenbildung anzutreffen ist (siehe Abb. 42).

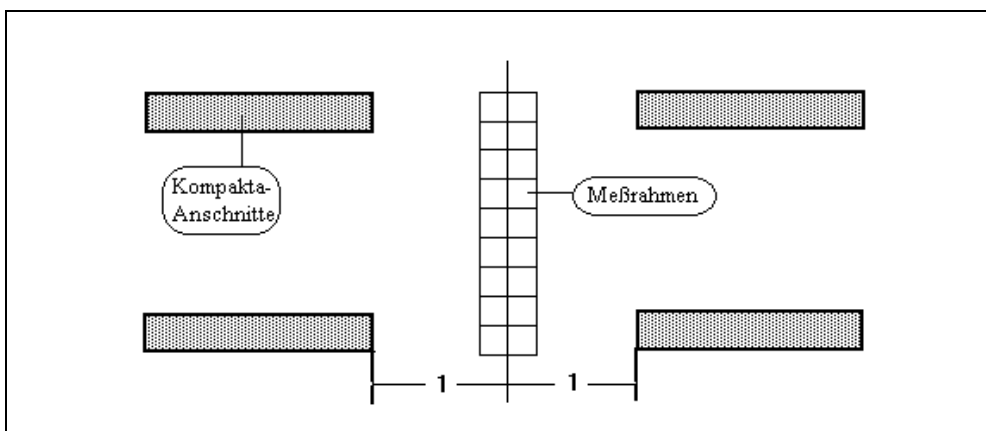


Abbildung 42: Anordnung der Meßrahmen bei der Kollagenmessung

#### 2.13.6. Bestimmung der Anisotropie der Trabekelstruktur

Unter diesem neudeutschen Begriff hat man sich eine Meßgröße vorzustellen, die Informationen über die Anzahl und die Ausrichtungstendenz der Osteoidtrabekel liefert. In praxi werden im Meßrahmen Geraden im gleichen Abstand zueinander quer und längs zur Knochenachse gelegt. Die Punkte, an denen diese 'Geraden-Grills' die Konturen der im Rahmen befindlichen Strukturen schneidet, werden nun zahlenmäßig erfaßt. Dies bedeutet nun, daß längsgerichtete Strukturen von den Geraden quer zur Achse sehr häufig getroffen werden, während die zu den Trabekeln eher parallel laufenden Geraden des zweiten Grills die Trabekelkonturen seltener schneiden. Bildet man den Quotienten aus den Parallelen-Schnittpunkten mit den Orthogonalen-Schnittpunkten erhält man einen Wert, der Auskunft über die Ausrichtung der Trabekel gibt. Auch die Zahl der beispielsweise längsgerichteten Trabekel wirkt sich auf die Zahl

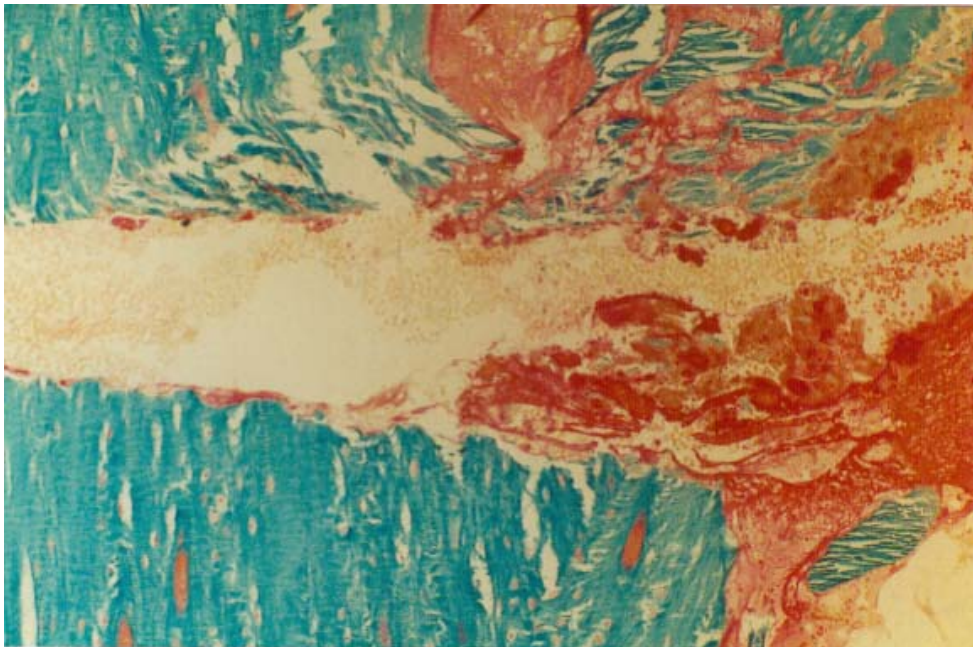
der Schnittpunkte der Orthogonalen mit den Trabekelkonturen aus, womit man nicht nur eine Aussage über die Qualität, sondern auch die Quantität der erfaßten Strukturen trifft. Ein Wert unter 1 bedeutet also eher eine Längsausrichtung, über 1 eine Querausrichtung. Längsgerichtete Osteoidstrukturen garantieren die Festigkeit der Distraktionszone, besonders deren Zugfestigkeit. Hiermit hat man nun nicht nur eine Aussage über die Zahl der Trabekel, sondern auch über deren axialen Beanspruchbarkeit. Siehe in diesem Zusammenhang auch die Veröffentlichung von CLAES et al. (1984)<sup>205</sup>. Herangezogen wurden die Daten der Osteoidvolumenbestimmung der Kossa-gefärbten Präparate.

### 3. ERGEBNISSE

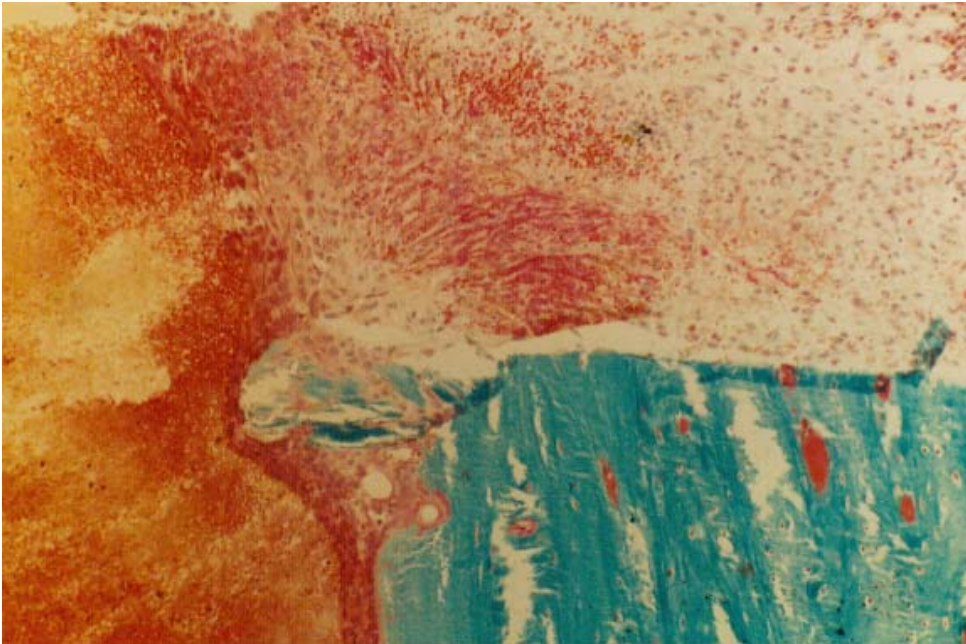
#### 3.1. Auswahl der Präparate

Selten geht ein Tierexperiment ohne Ausfälle oder Fehlschläge von statten. So mußten auch in diesem folgende Präparate von der Auswertung ausgenommen werden:

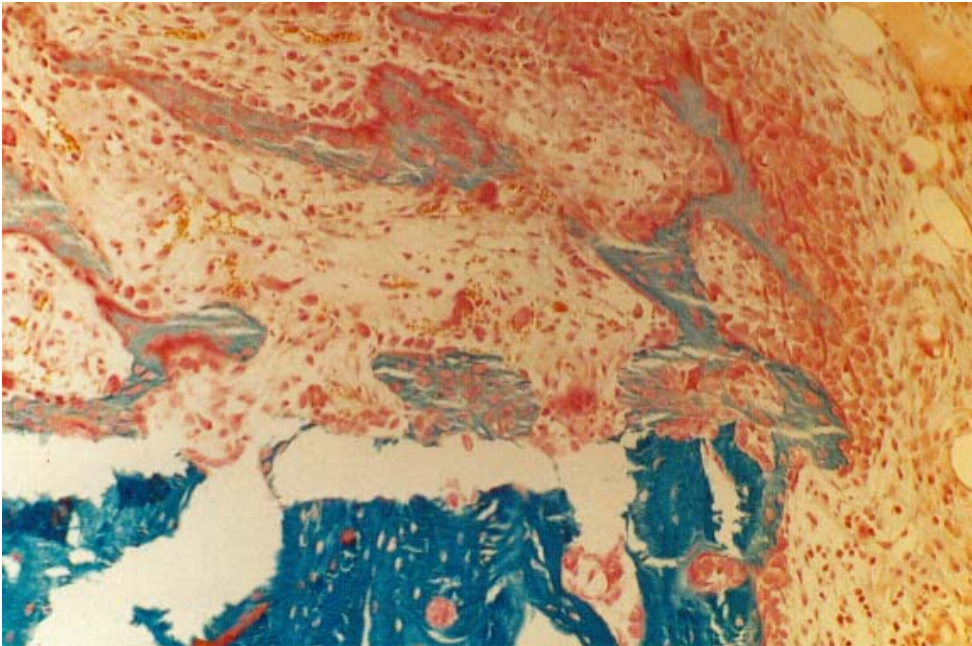
Vor Versuchsende starben die Tiere L0/1, L0/8, L1/2 und L1/5. Die näheren Umstände sind dem Kapitel 2.8.6. 'Komplikationen' zu entnehmen. Die somit nur bis zu den Tagen d3 (L0/8, Abbildung 43), d6 (L1/2, Abbildung 44), d12 (L0/1, Abbildung 45) und d19 (L1/5, Abbildung 46) distrahierten Präparate stellen gute Verlaufsaufnahmen des Distractionsvorganges dar, wurden jedoch nicht in die Auswertung aufgenommen.



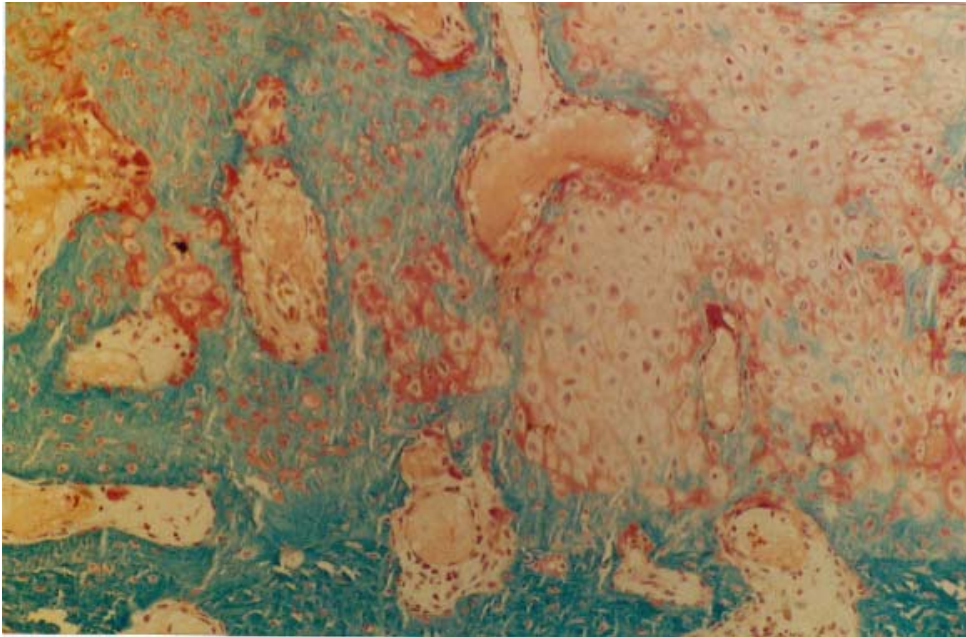
*Abbildung 43: Distractionszone an Tag 3. Kompakta-Trümmer werden von einem Fibringerinsel umgeben, Erythrozyten befinden sich noch im Osteotomiespalt, dessen Osteotomieeränder nicht vollständig adaptiert sind. Erste Zellen wandern an der Schnittfläche entlang. (Trichrom-Goldner, 100 fache Vergrößerung, Präparat L0/8 re)*



*Abbildung 44: Distractionszone an Tag 6. Recht deutlich läßt sich die Einwanderung von Osteoprogenitorzellen aus dem Periost über den Knochensplinter in die Distractionszone verfolgen. Im Spalt hat sich inzwischen ein lockeres, zellreiches Gewebe etabliert. Einzelne Erythrozyten sind vermutlich von dem pericallösen Hämatom im Callusgewebe übrig geblieben. (Trichrom-Goldner, 100 fache Vergrößerung, Präparat L1/2 li)*



*Abbildung 45: Distraaktionszone an Tag 12. Die ersten Primärtrabekel haben sich auf der Kompaktaschnittfläche im Callusgewebe gebildet. Die Oberflächen der Trabekel sind bereits von ausdifferenzierten Osteoblasten besetzt, während das übrige Callusgewebe noch aus unreiferen Osteoprogenitoren besteht. In der Nähe der Kompaktaoberfläche befindet sich auch ein Osteoklast. Leider ist die dichtere Kompakta vom weicheren Callusgewebe während des Schneidens abgerissen.  
(Trichrom-Goldner, 100 fache Vergrößerung, Präparat L0/1 re)*



*Abbildung 46: Distractionszone an Tag 19. Die Kompakta hat sich innig mit den neugebildeten Primärtrabekeln verbunden. Rechts findet sich noch Osteochondroblastäres Gewebe, welches an wenigen Stellen bereits fleckenhaft verkalkt ist (Mineralisierte Grundsubstanz: grün, nichtmineralisierte Grundsubstanz: rot, Trichrom-Goldner, 100fache Vergrößerung, Präparat L1/5 li)*

Das linke Femur von Tier L1/1 wurde nicht distrahiert, da die Schanzschen Schrauben sich während der Distraction unbemerkt um die Haltebacken des Fixateurs einwärts gedreht hatten. Bei den Tieren L0/7 und L1/13 wurde während der Distraction der cerclierte Knochensequester aus den Kortikalisenden nahe der belasteten Schrauben herausgesprengt und verlagerte sich in die Distractionszone. Diese Präparate wurden ebenfalls ausgeschlossen.

Die Präparate L0/10 rechts, L1/4 rechts und L1/6 rechts erwiesen sich bei der Auswertung als statistische Ausreißer und wurden ebenfalls nicht mit in die Auswertung mit einbezogen.

### **3.2. Statistische Berechnungen**

Für alle Messungen, außer denen des Osteoblastenumfangs, wurden die einzelnen Werte jedes Meßrahmens pro Präparat gemittelt. Da die Vorgänge in den beiden Distractionszonen eines Tieres aufgrund der 'gemeinsamen Physiologie' statistisch nicht unabhängig voneinander sind, wurden auch diese femurbezogenen Ergebnisse zu einem gemeinsamen Mittelwert zusammengezogen. Die nunmehr tierbezogenen Daten wurden

gruppenweise gemittelt und die Standardabweichung berechnet. Es wurden jeweils die arithmetischen Mittelwerte genommen.

Die Bestimmung des Osteblastenumfangs betreffend, wurden in den, wie oben beschrieben (Kap. 2.13.3.), stichprobenartig plazierten Meßrahmen die Osteoblasten (Deckzellen) ausgezählt, wobei für die Placebogruppe 48 und für die Verumgruppe 69 Rahmen ausgewertet wurden. Aus pro Rahmen ermittelter Zellzahl und Umfang wurde deren Quotient bestimmt und gruppenweise dessen arithmetisches Mittel und die Standardabweichung berechnet.

Waren die Unterschiede der Gruppen wesentlich kleiner als die jeweilige Standardabweichung, wurde *pima vista* davon ausgegangen, daß kein signifikanter Unterschied nachzuweisen ist, d. h. die Nullhypothese bei sicherlich kleinem Fehler 2. Art ( $\beta$ -Fehler) angenommen. Konnte dies jedoch in Zweifel gestellt werden, wurde ein U-Test für unabhängige Stichproben nach MANN-WHITNEY durchgeführt. Hierzu dienten die Mittelwerte der zwölf Tiere jeder Gruppe als Stichproben, welche nach aufsteigender Größe in einer Rangliste angeordnet wurden. Die Rangsummen  $T_L$  und  $T_0$  jeder Gruppe wurden zur Testgröße U, bzw. U' verrechnet und der kleinere U-Wert mit den kritischen Werten der einschlägigen Tabellen<sup>94</sup> bezüglich des vorgegebenen Fehlers 1. Art ( $\alpha$ -Fehler, Signifikanzniveau) von  $\alpha=0,05$  bei einer zweiseitigen Testung verglichen. Bei einer Stichprobenzahl von  $n=12$  in jeder Gruppe und einem Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  ergäbe sich ein kritischer U-Wert von  $U=37$  (analog  $U=42$  für  $\alpha=0,1$  und  $U=31$  für  $\alpha=0,02$ ) bei zweiseitiger Testung, der von den errechneten, kleineren U-Werten nicht überschritten werden darf, damit ein signifikantes Ergebnis angenommen werden kann. Näheres ist aus der angegebenen Literatur zu erfahren (BORTZ, 1989)<sup>94</sup>.

Dieser Test wurde gewählt, da bei der geringen Stichprobenzahl und der Varianzinhomogenität nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte, wie sie z. B. ein Student-t-Test erfordert. Der U-Test nach MANN-WHITNEY stellt ein verteilungsfreies Verfahren dar, der lediglich die ordinalen Informationen (ähnlich der Berechnung des Medians) der Werte auswertet. Somit ist diese Testform dem stärksten, jedoch an enge Bedingungen geknüpften Student-t-Test vorzuziehen, zumal der U-Test einen der effizientesten, verteilungsfreien Tests darstellt.



### 3.3. Bestimmung der Volumendichte des mineralisierten Osteoids

Der Katheter des Intraport-Systems lag, an der der Osteotomiezone zugewandten, proximalen Schraube fixiert, der Kortikalis an. Placebo oder Verum wurde damit immer an der gleichen Stelle appliziert und diffundierten ins umliegende Gewebe. Um etwaige Auswirkungen eines Konzentrationsgradienten im Callusgewebe zu erfassen, wurden alle Präparate in allen Färbungen in zwei Ebenen geschnitten (siehe auch Kapitel 2.12.4. 'Schneiden', Abbildungen 25 und 26). Die Auswertung der Volumendichte des mineralisierten Osteoids in der Kossa-Färbung ergaben jedoch weder bezüglich der Kontroll- (U=44), noch der Verumgruppe (U=61), einen signifikanten Unterschied (Signifikanzniveau  $\alpha=0,05$  im U-Test bei zweiseitiger Testung) im Vergleich der beiden Schnittebenen. Dies gab Anlaß, die Auswertungen weiterer Meßparameter im weiteren nur in der zentralen Ebene durchzuführen.

#### 3.3.1. Bestimmung in zentraler Ebene

24,3 % Volumenanteil der Placebopruppe (Standardabweichung: 0,038, entsprechend 15,8 % des Volumenanteils) gegenüber 26,0 % der Verumgruppe (Standardabweichung 0,038, entsprechend 14,6 % des Volumenanteils) ergeben einen Unterschied von nur 6,9 %. Dies entspricht auch im U-Test keiner signifikanten Zunahme (bei zweiseitiger Testung und  $\alpha=0,05$  ergibt sich U=56).

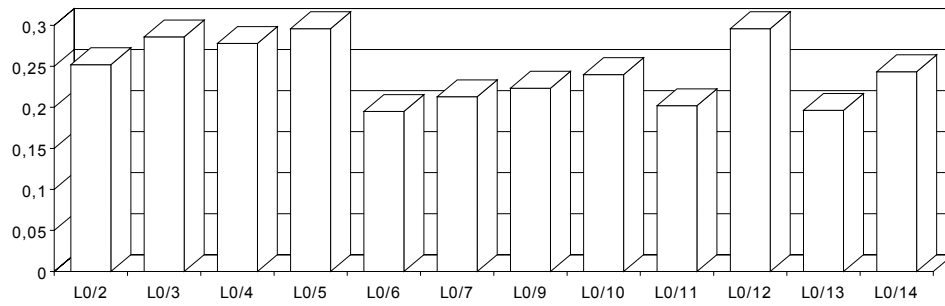


Abbildung 47: Volumendichten des verkalkten Osteoids der einzelnen Tiere der Kontrollgruppe in zentraler Schnittebene (Ordinate: Volumendichte als Dezimalbruch)

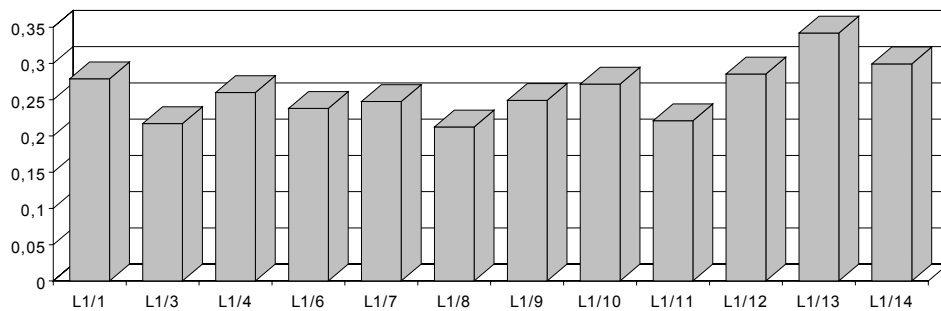


Abbildung 48: Volumendichten des verkalkten Osteoids der einzelnen Tiere der Verumgruppe in zentraler Schnittebene (Ordinate: Volumendichte als Dezimalbruch)

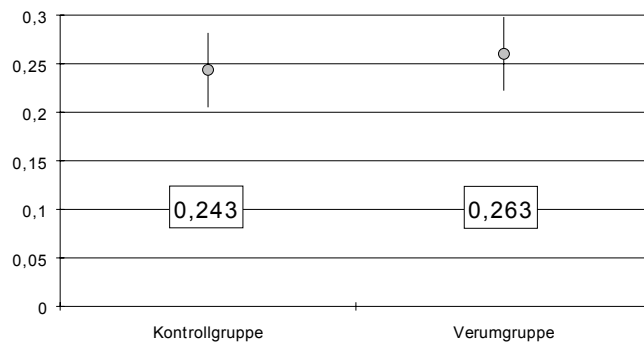


Abbildung 49: Vergleich der mittleren Volumendichten des verkalkten Osteoids (+/- Standardabweichung) der Verum- mit der Kontrollgruppe für die zentrale Ebene. Die Verumgruppe weist eine nicht signifikante Zunahme der Volumendichte um 0,017, entsprechend 6,9 % gegenüber der Kontrollgruppe auf. (Ordinate: Volumendichte als Dezimalbruch)

## 3.3.2. Bestimmung in katheter- und kortikalisnaher Ebene

Auch hier ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die Verumgruppe wies nur 1,5 % mehr Osteoidvolumendichte auf, was bei Standardabweichungen von 14,9 %, bzw. 15,6 % keinen signifikanten Zuwachs erahnen läßt. Der U-Test ergibt ebenfalls keine signifikante Erhöhung (bei zweiseitiger Testung und  $\alpha=0,05$  ergibt sich  $U=70$ ).

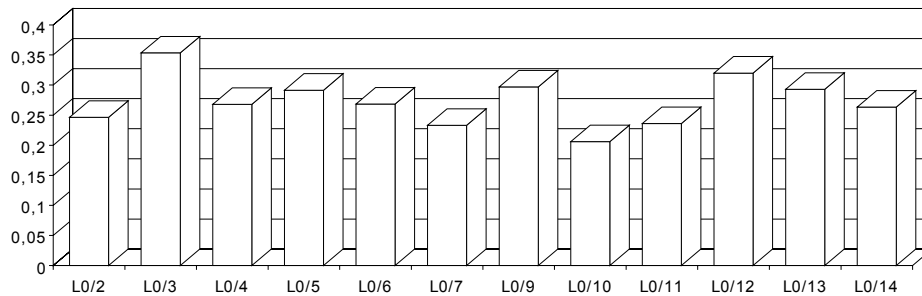


Abbildung 50: Volumendichten des verkalkten Osteoids der einzelnen Tiere der Kontrollgruppe in katheternahe Schnittebene (Ordinate: Volumendichte als Dezimalbruch)

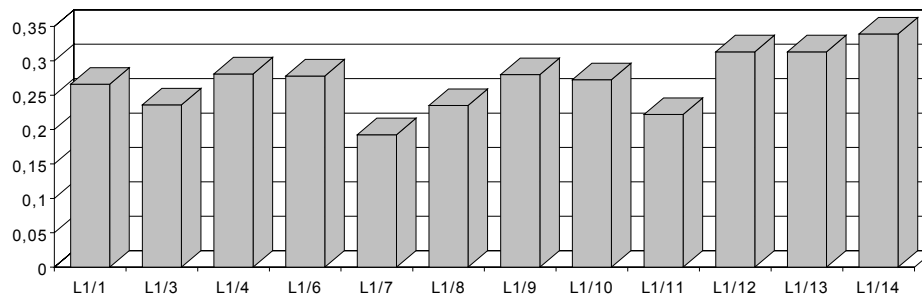


Abbildung 51: Volumendichten des verkalkten Osteoids der einzelnen Tiere der Verumgruppe in katheternahe Schnittebene (Ordinate: Volumendichte als Dezimalbruch)

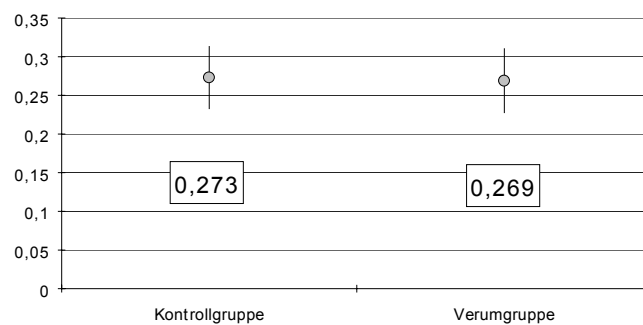


Abbildung 52: Vergleich der mittleren Volumendichten des verkalkten Osteoids (+/- Standardabweichung) der Verum- mit der Kontrollgruppe für die katheternahe Ebene. Die Verumgruppe weist eine nicht signifikante Abnahme der Volumendichte um 0,004, entsprechend 1,5 % gegenüber der Kontrollgruppe auf. (Ordinate: Volumendichte als Dezimalbruch)

### 3.4. Verhältnis von verkalkter zu unverkalkter Osteoidstruktur

Dieser Meßparameter brachte einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu Tage. Nach Durchführung des U-Tests für unabhängige Stichproben stellte sich die Zunahme des Quotienten Oberfläche des verkalkten zum nichtverkalkten Osteoid als signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha=0,05$  (5 %) heraus (U=35).

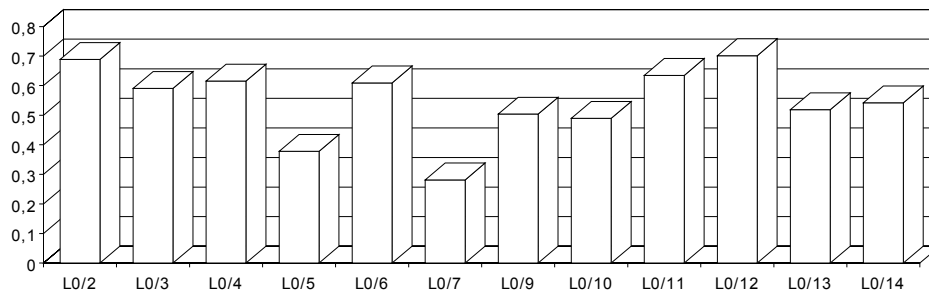


Abbildung 53: Flächenverhältnis von verkalktem zu unverkalktem Osteoid der Kontrollgruppe (Ordinate: Verhältnis als Dezimalbruch)

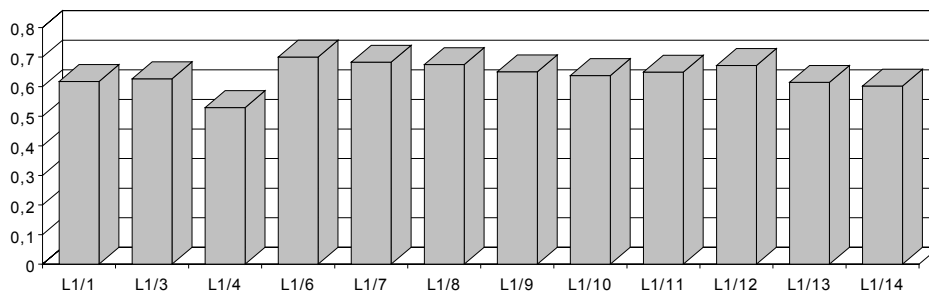


Abbildung 54: Flächenverhältnis von verkalktem zu unverkalktem Osteoid der Verumgruppe (Ordinate: Verhältnis als Dezimalbruch)

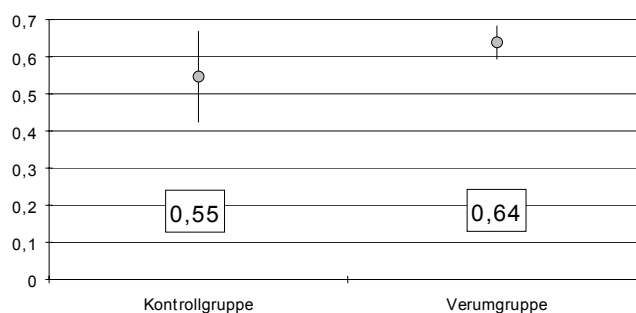


Abbildung 55: Vergleich der mittleren Flächenverhältnisse des verkalkten zum unverkalkten Osteoid der Kontroll- mit der Verumgruppe. Beachte die im Test nach Mann-Whitney signifikant bessere Mineralisation des vorhandenen Osteoids um 0,09, entsprechend 16,9 % ! (Ordinate: Flächenverhältnis als Dezimalbruch)

### 3.5. Osteblastenumfang

Der Versuch, die Deckzellen der Trabekel mit dem Bildanalysegerät automatisch zu quantifizieren, scheiterte daran, daß die Technik noch nicht ausgereift genug ist, Zellen in ihrer unterschiedlichen Form, Größe und Anfärbung zu differenzieren oder auch nur von dem umliegenden Gewebe abzugrenzen. So mußte halbautomatisch vorgegangen werden, d. h. die Zellen wurden im jeweiligen Meßrahmen vom Auswerter gezählt und deren Anzahl im Nachhinein den automatisch gewonnenen Daten, wie dem Trabekelumfang, Meßrahmen pro Meßrahmen hinzugefügt. So führte erstens die Tatsache der manuellen Auszählung und zweitens die Schwierigkeiten, Osteoblasten, deren Zellkern nicht angeschnitten war, zu identifizieren, zu einer geringeren Anzahl an ausgemessenen Rahmen (Gesichtsfeldern) und somit zu einer zu hohen Standardabweichung. Im folgenden die Ergebniswerte:

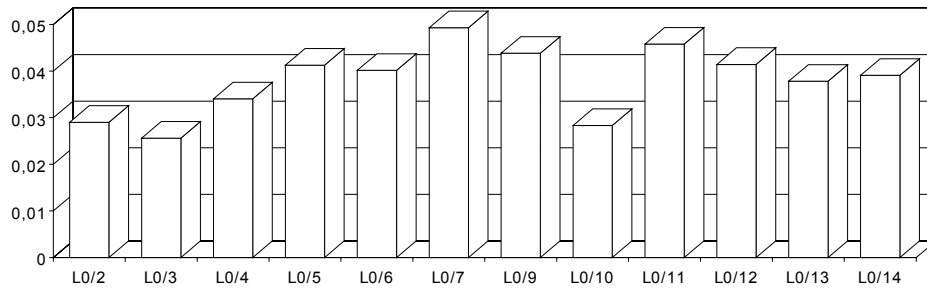


Abbildung 56: Osteoblastendichte, d. h. Osteoblastenzahl pro Trabekelumfang, der Kontrollgruppe (Ordinate: 1 Zelle/ $\mu\text{m}$ )

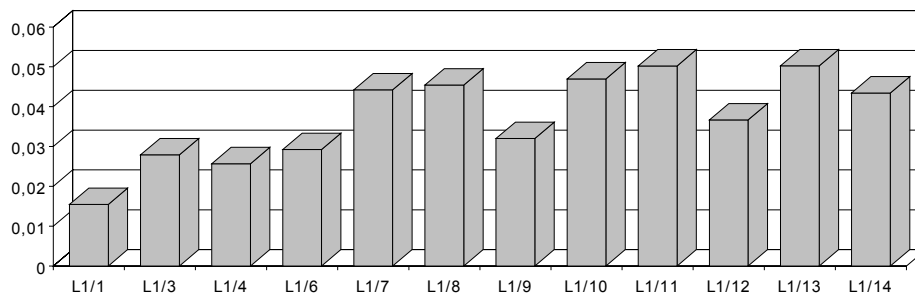


Abbildung 57: Osteoblastendichte, d. h. Osteoblastenzahl pro Trabekelumfang, der Verumgruppe (Ordinate: 1 Zelle/ $\mu\text{m}$ )

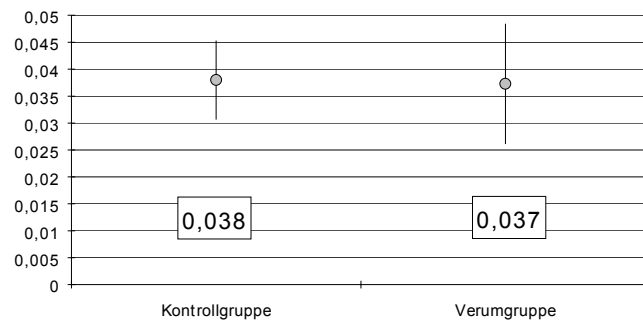


Abbildung 58: Osteoblastendichte, d. h. Osteoblastenzahl pro Trabekelumfang, im Vergleich der beiden Gruppen. Es ist ein nicht signifikanter Unterschied von 0,001, entsprechend 2,6 % Abnahme der Verumgruppe gegenüber der Kontrollgruppe festzustellen. (Ordinate: 1 Zelle/ $\mu\text{m}$ )

### 3.6. Umfangdichte der Trabekel

Eine Aussage über eine vermehrte Zerklüftung der Osteoidstruktur nach Faktor XIII-Gabe lassen die Werte der Umfangdichte ebenfalls nicht zu. Es besteht also nicht die Möglichkeit, daß mehr Grundstruktur und Kollagen synthetisierende Osteoblasten auf einer, auf das Trabekelvolumen bezogen, vergrößerten Oberfläche Platz haben und somit mehr Osteoid gebildet werden kann.

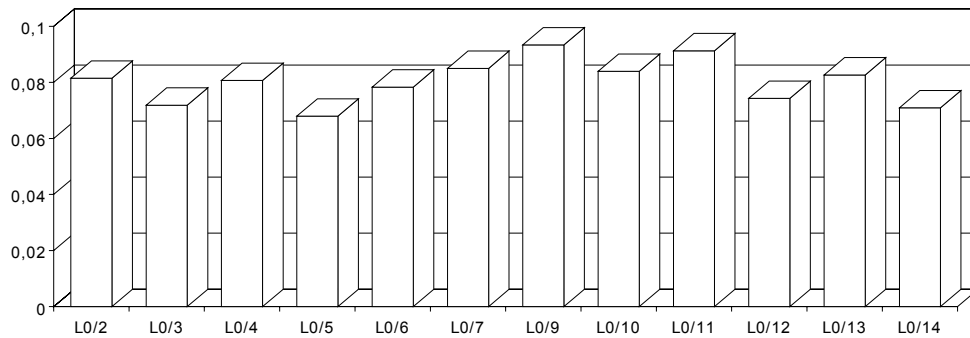


Abbildung 59: Umfangdichten, d. h. das Verhältnis von Trabekelumfang pro Trabekelfläche, der Kontrollgruppe. (Ordinate: Umfangdichte in  $1/\mu\text{m}$ )

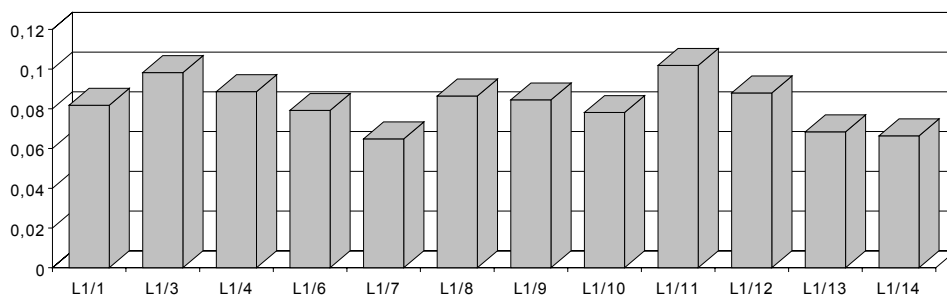


Abbildung 60: Umfangdichten, d. h. das Verhältnis von Trabekelumfang pro Trabekelfläche, der Verumgruppe (Ordinate: Umfangdichte in  $1/\mu\text{m}$ )

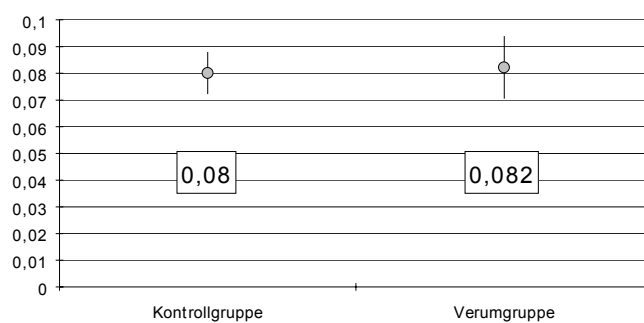


Abbildung 61: Umfangdichten, d. h. das Verhältnis von Trabekelumfang pro Trabekelfläche, im Vergleich der beiden Gruppen. Die Zunahme der Verumgruppe gegenüber der Kontrollgruppe ist nicht signifikant und beträgt  $0,002\ 1/\mu\text{m}$ , entsprechend 2,5 %. (Ordinate: Umfangdichte in  $1/\mu\text{m}$ )

### 3.7. Flächenanteil der Kollagenfasern

Die Flächen, auf denen Kollagenfasern zu erfassen waren, differierten im Vergleich der beiden Gruppen nicht signifikant (bei  $U=61$ ):

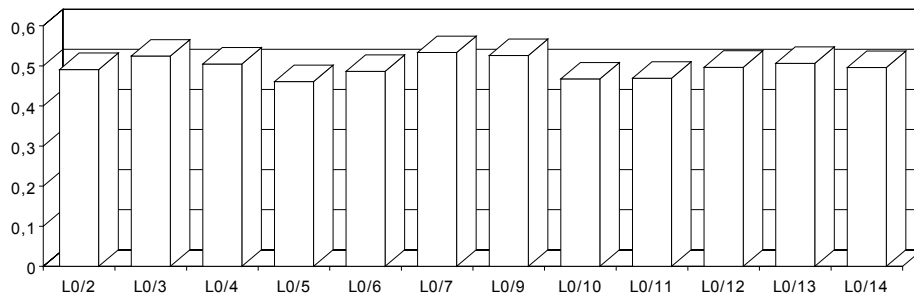


Abbildung 62: Flächenanteil an Kollagenfasern im mittleren Distractionssegment der Kontrollgruppe. (Ordinate: Dezimalbruch)

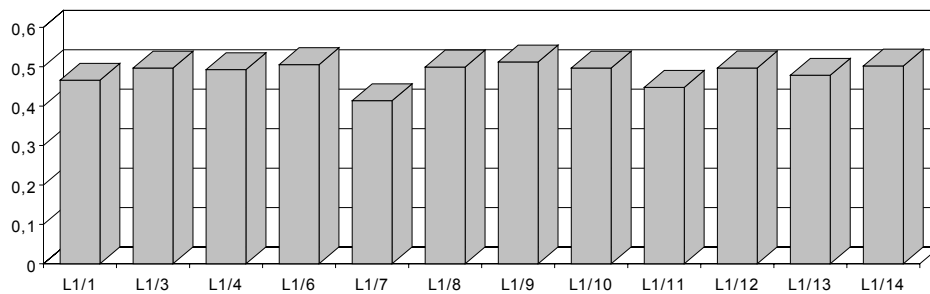


Abbildung 63: Flächenanteil an Kollagenfasern im mittleren Distractionssegment der Verumgruppe. (Ordinate: Dezimalbruch)

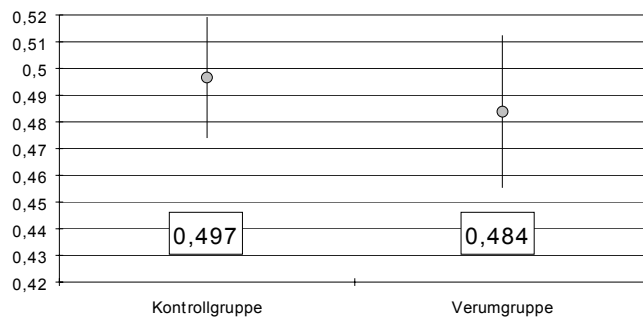


Abbildung 64: Flächenanteil an Kollagenfasern im mittleren Distractionssegment der Verumgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Abnahme der Verumgruppe gegenüber der Kontrollgruppe um 0,013, entsprechend 2,6 % ist nicht signifikant. (Ordinate: Dezimalbruch)



### 3.8. Ausrichtung der Osteoidstruktur (Anisotropie)

Die Bestimmung der Anisotropie ergab den zweiten signifikanten Unterschied betreffend der Längsausrichtung und Zahl der Trabekel im U-Test für unabhängige Stichproben (bei zweiseitiger Testung und  $\alpha=0,05$  ergibt sich  $U=33$ ). Da die Volumendichte des verkalkten Osteoids wie oben beschrieben (siehe Kap. 3.3.1.) gleich bleibt, spricht dies demnach für eine stärkere Längsausrichtung oder/und filigranere Struktur der Trabekel der Kontrollgruppe. Gegen letztere Annahme spricht natürlich das Ergebnis der Umfangdichtenmessung. Die zu schlußfolgernden Unterschiede in der Ausrichtung wären jedoch auch erstaunlich, da man dies doch eher mechanischen Faktoren der Distraction zuschreiben möchte, die für beide Gruppen gleich waren. PISTOR (1992)<sup>58</sup> beschreibt in seiner Dissertation eine filigranere Ausprägung der Trabekel ohne Faktor-XIII-Einfluß.

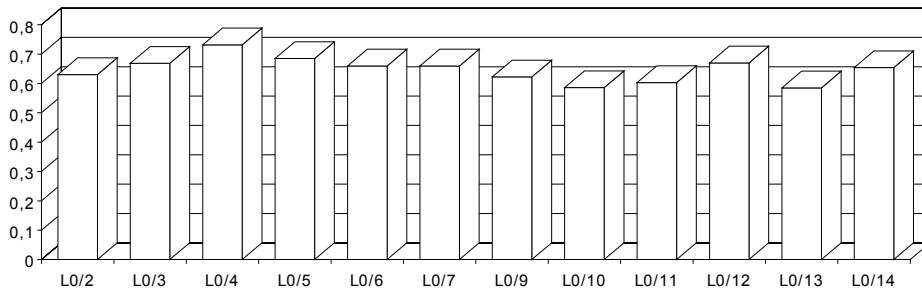


Abbildung 65: Anisotropie, also Ausrichtungstendenz der Trabekel der Kontrollgruppe. Je kleiner der Quotient ist, desto mehr Trabekel verlaufen in ihrer Tendenz parallel zur Zugrichtung. Bei einem Wert von 1 liegt keine Ausrichtung vor. (Ordinate: Anisotropie-Quotient als Dezimalbruch)

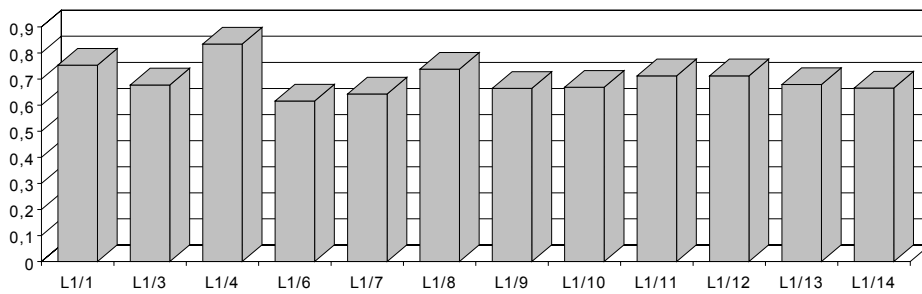


Abbildung 66: Anisotropie der Verumgruppe (Ordinate: Anisotropie-Quotient als Dezimalbruch)

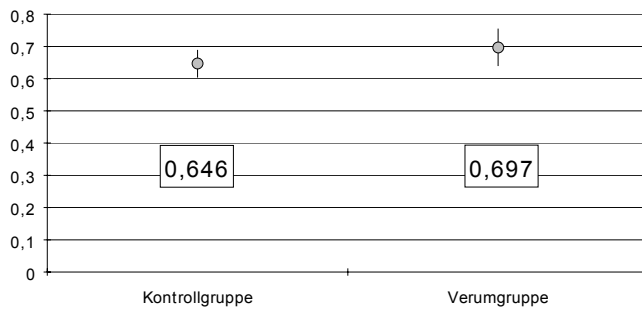


Abbildung 67: Anisotropie der beiden Gruppen im Vergleich. Man beachte den signifikanten Unterschied von 0,051 (7,9 %). Die Kontrollgruppe besitzt eine etwas größere Tendenz zur Längsausrichtung. (Ordinate: Anisotropie-Quotient als Dezimalbruch)

### 3.9. Faktor-XIII-Plasma-Spiegel

Die Faktor-XIII-Spiegel wurden im Plasma bestimmt, um den Umfang der systemischen Resorption des lokal applizierten Faktors zu kontrollieren. Wie an den folgenden Diagrammen zu verfolgen, erreicht der mittlere systemische Spiegel nach lokaler Faktor-XIII-Gabe zunächst höhere Werte als in der Kontrollgruppe. Bis Tag 4 steigt die Plasma-Aktivität auf 150 % der korrespondierenden Werte der Placebo-Gruppe an, um dann spätestens ab Tag 14 sehr geringe Werte anzunehmen. An Tag 14 beträgt der Plasmaspiegel nur noch 9% und an Tag 20 gerade 11% der Kontrollgruppenwerte (siehe auch Seite 109, Abbildung 70).

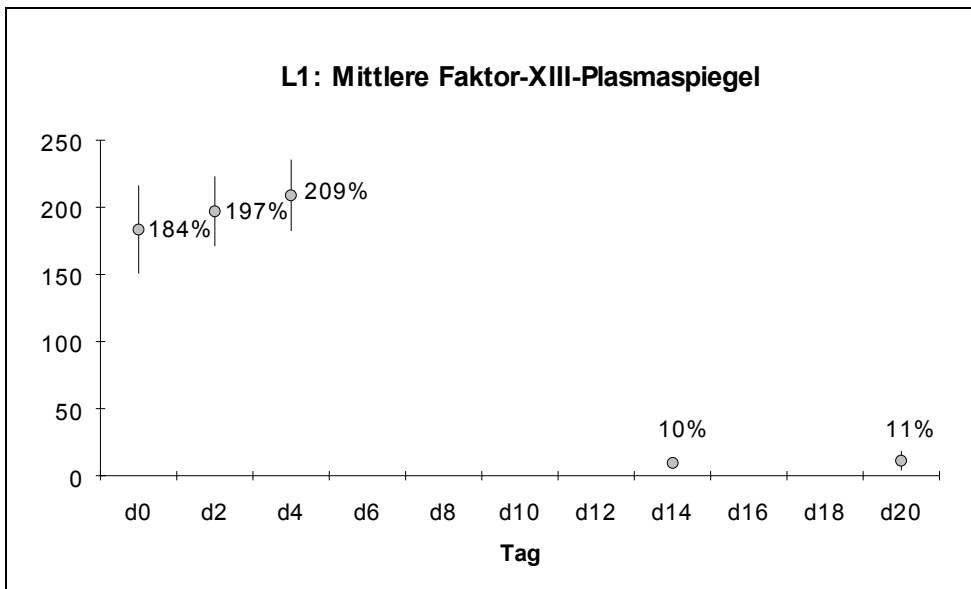


Abbildung 68: Mittlere Faktor-XIII-Plasmaspiegel der Verungruppung mit Standardabweichungen (Ordinate: Aktivität in % der Norm)

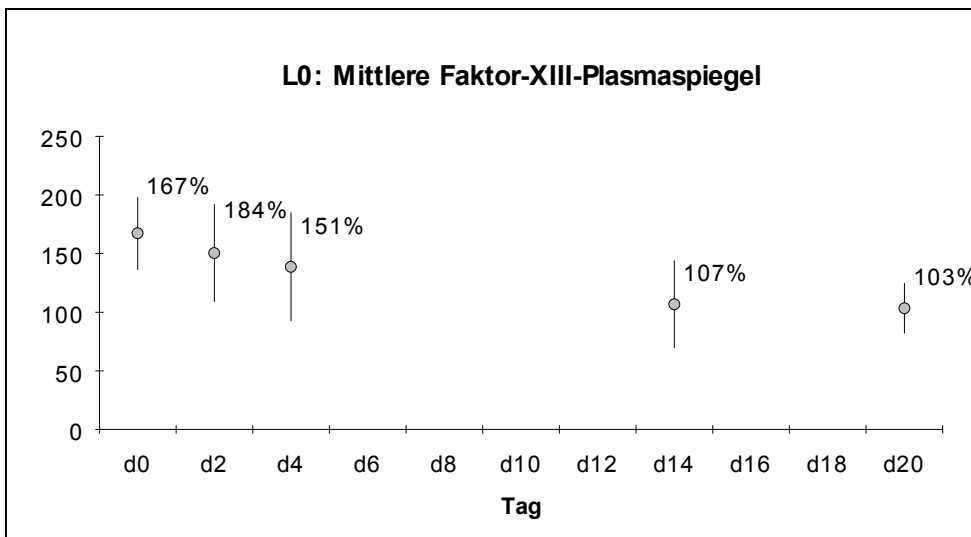


Abbildung 69: Mittlere Faktor-XIII-Plasmaspiegel der Kontrollgruppe mit Standardabweichungen (Ordinate: Aktivität in % der Norm)

Die Spiegel der Kontrollgruppe fallen dahingegen innerhalb der ersten fünf Tage, um sich an Tag 14 auf 107 % und an Tag 20 auf 103 % einzupendeln. Leider konnten wegen technischer und biologischer Probleme der Blutentnahme die Spiegel nicht in der Zeit zwischen Tag 4 und 14 bestimmt werden.

Die Ausgangswerte der Faktor-XIII-Spiegel am Tag 0 entsprechen nicht der Norm von 100%, da diese sich auf ein gepooltes, *humanes* Plasma bezieht. Die Normalspiegel von Kaninchen scheinen nach den vor der Operation erhobenen Mittelwerten dieser Studie um die 175% der menschlichen Norm-Aktivität zu liegen.

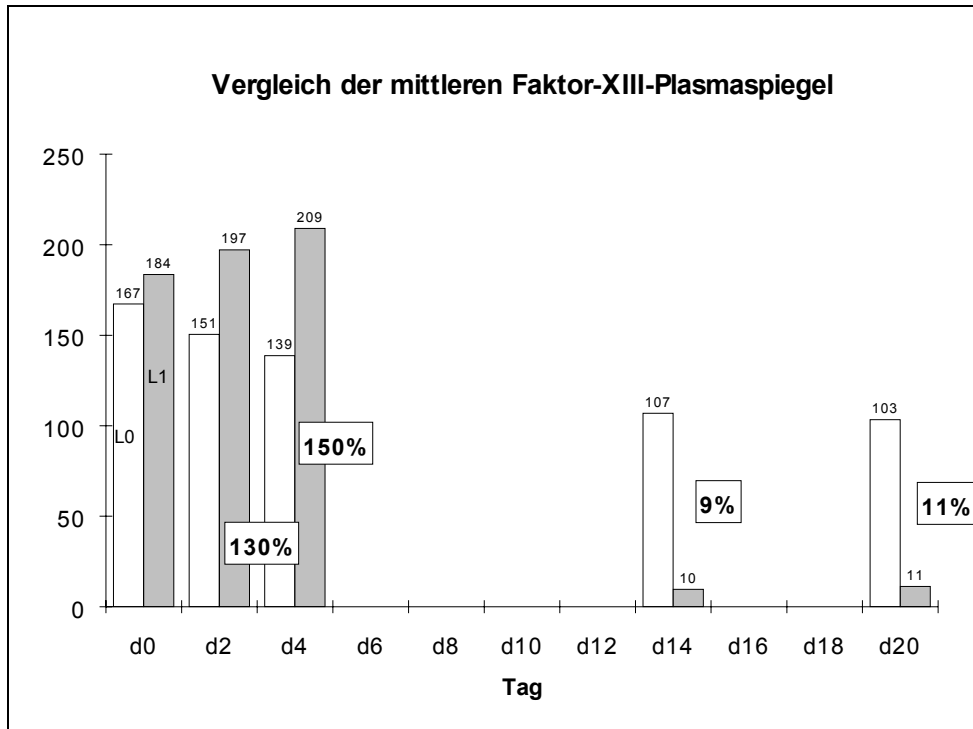


Abbildung 70: Vergleich der mittleren Faktor-XIII-Plasmaspiegel (Ordinate: Aktivität in % der Norm, fett eingetragene Prozentangaben bezeichnen den relativen Aktivitätsanteil der Verumgruppe bezogen auf die Placebogruppe)

### 3.9.1. Die Faktor-XIII-Plasmaspiegel der Parallelstudie zur systemischen Applikation

Die Plasmaspiegel der Verumgruppe der parallel gelaufenen Studie über die systemische Wirksamkeit von Faktor XIII<sup>59</sup>, der pro Tier die gleiche Menge Wirkstoff in gleichen Intervallen unter analogen Versuchsbedingungen gegeben wurde, zeigt an den Tagen d2, d4 und d14 hoch signifikant höhere Werte (U-Test nach MANN-WHITNEY bei zweiseitiger Testung und  $\alpha=0,01$ ), als die Verumgruppe der Lokal-Applikation und ansonsten qualitativ im Kurvenverlauf identisches Verhalten.

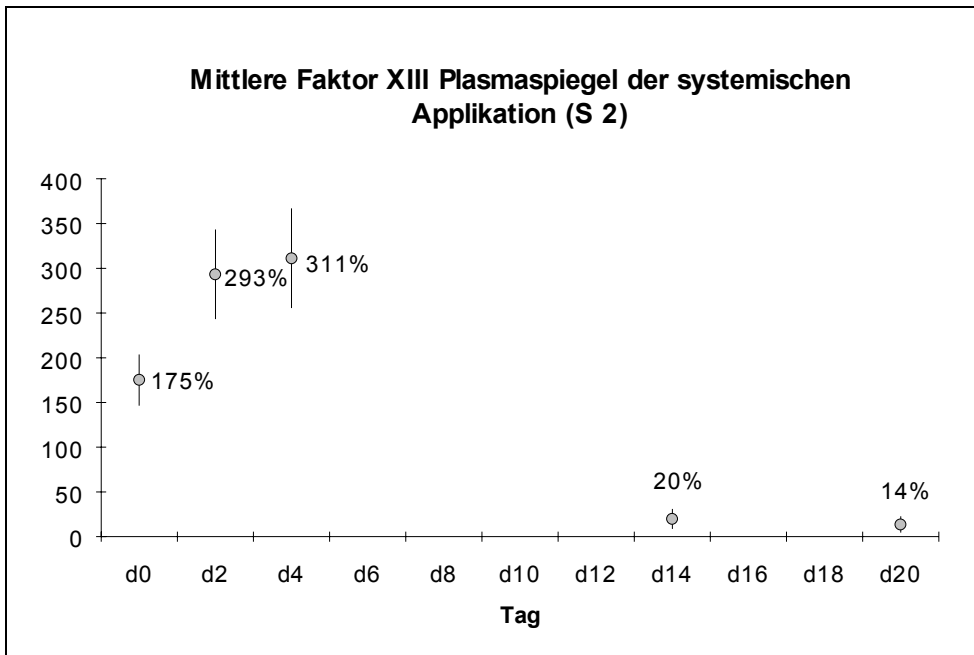


Abbildung 71: Plasmaspiegel der Verumgruppe der systemischen Applikation (Einheit der Ordinate: Aktivität in % der Norm)

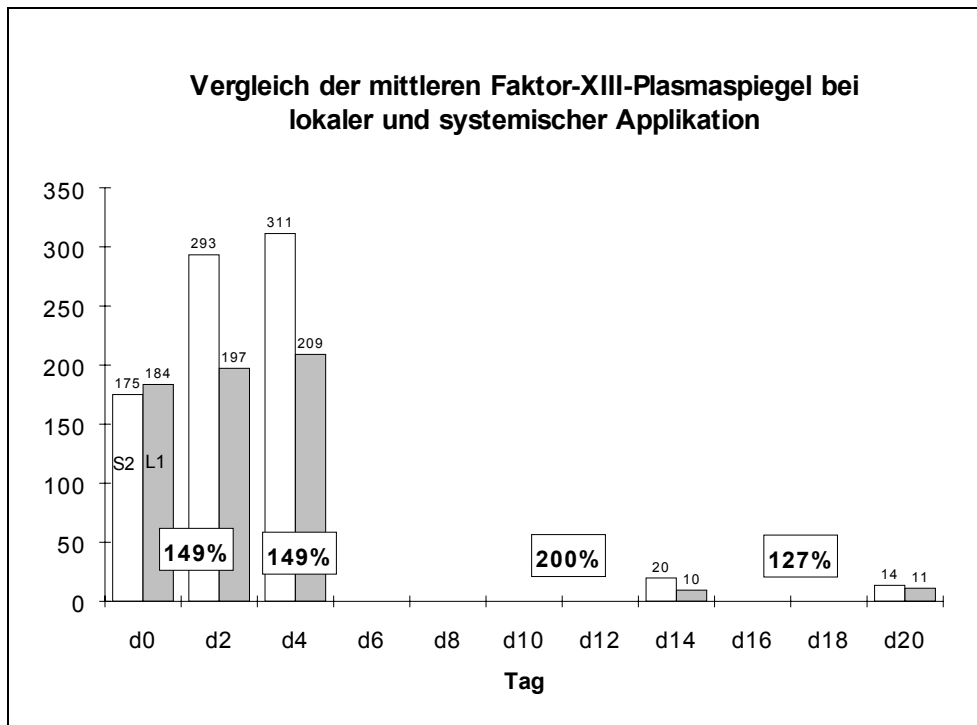


Abbildung 72: Vergleich der mittleren Faktor-XIII-Spiegel der Verumgruppen der lokalen (L 1) mit denen der systemischen Applikation (S 2)

(Einheit der Ordinate: Aktivität in % der Norm, fett eingetragene Prozentangaben bezeichnen den relativen Aktivitätsanteil der Verumgruppe systemischer Applikation bezogen auf die Verumgruppe lokaler Applikation)

### 3.10. Körpertemperaturkurve

Die Messung der Körpertemperatur der Tiere beider Gruppen erbrachte ein bemerkenswertes Ergebnis. Die mittlere Körpertemperatur unterschied sich um  $0,6^{\circ}\text{C}$  bei einer mittleren Standardabweichung der Placebogruppe von  $0,63^{\circ}\text{C}$  und der Verumgruppe von  $0,36^{\circ}\text{C}$ . Damit unterscheiden sich die beiden Gruppen voneinander. Da sich jedoch auch die mittleren Temperaturwerte an Tag 0, d. h. vor jedweder Manipulation ebenfalls um  $0,8^{\circ}\text{C}$  unterschieden (L0:  $38,9^{\circ}\text{C}$  ( $\sigma$ :  $0,94^{\circ}\text{C}$ ), L1:  $39,7^{\circ}\text{C}$  ( $\sigma$ :  $0,32^{\circ}\text{C}$ )), scheint dieser Unterschied nicht durch das Experiment, im Speziellen die Faktor-XIII-Gabe, bedingt.

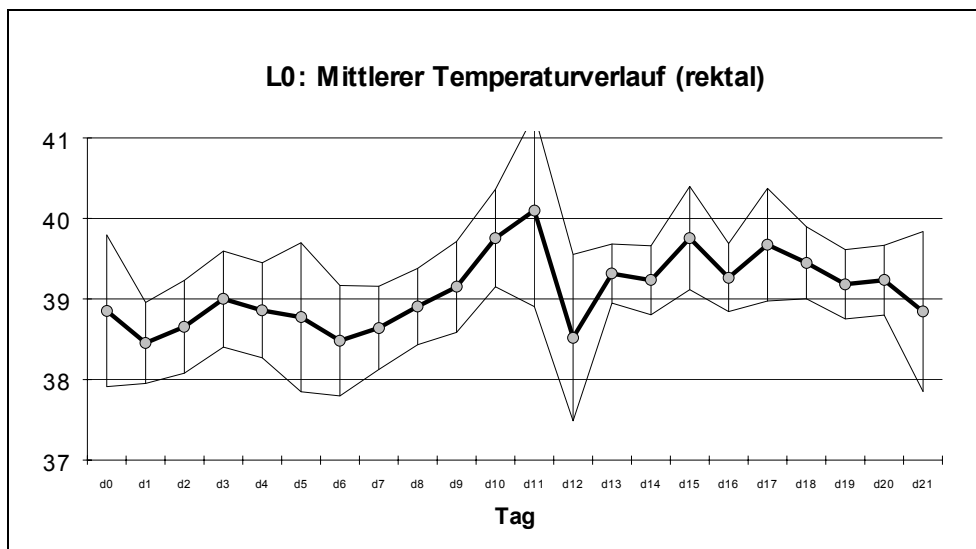


Abbildung 73: mittlere Körpertemperatur +/- 1 Standardabweichung in °C

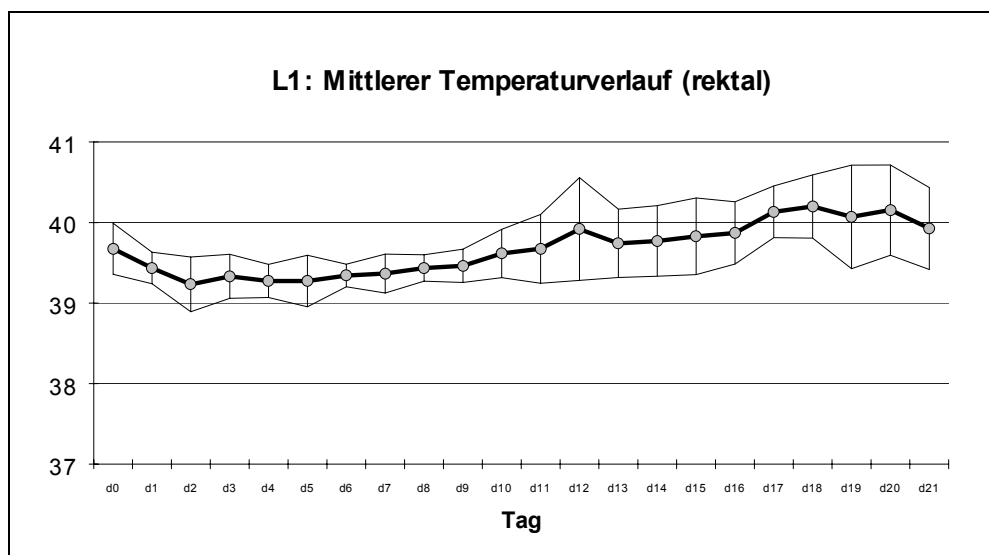


Abbildung 74: mittlere Körpertemperatur +/- 1 Standardabweichung in °C



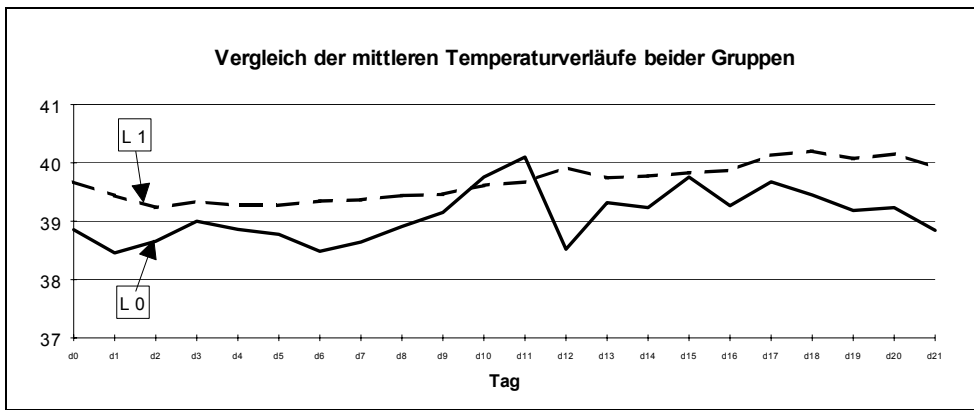


Abbildung 75: Mittlere Körpertemperaturen in °C

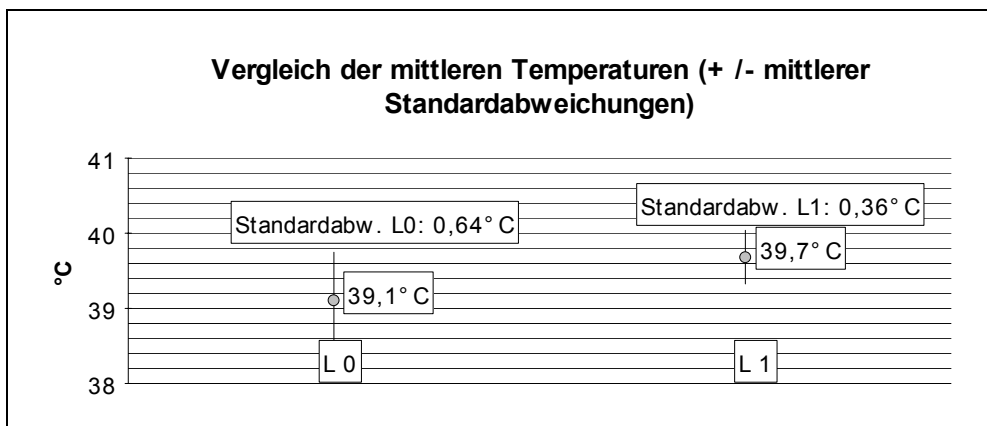


Abbildung 76: Vergleich der mittleren Tages-Körpertemperatur +/- mittlere Tages-Standardabweichung in °C

### 3.11. Gewichtsverlauf

Das mittlere Körpergewicht nahm von Tag 0 bis Tag 21 bei der Placebogruppe um 792g (18,9% des Ausgangsgewicht), bei der Verumgruppe um 835g (21,1% des Ausgangsgewicht) ab. Die mittlere Ausgangsgewichte jeweils mit Fixateur Externe an Tag 0 betrug bei L0 4169g und bei L1 3956g.

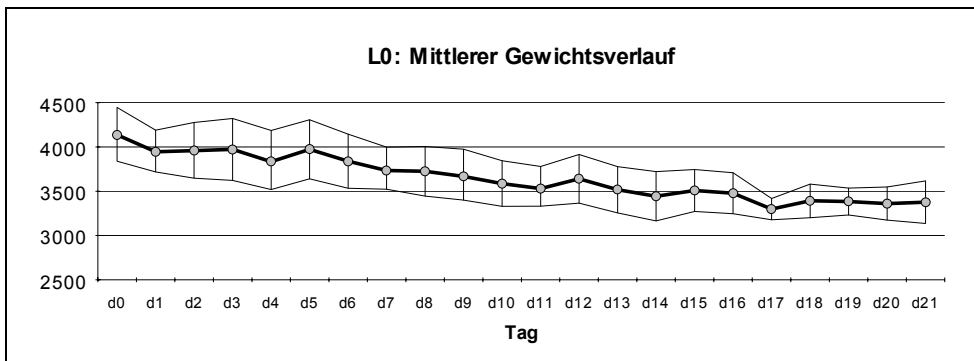


Abbildung 77: mittleres Körpergewicht +/- 1 Standardabweichung in Gramm

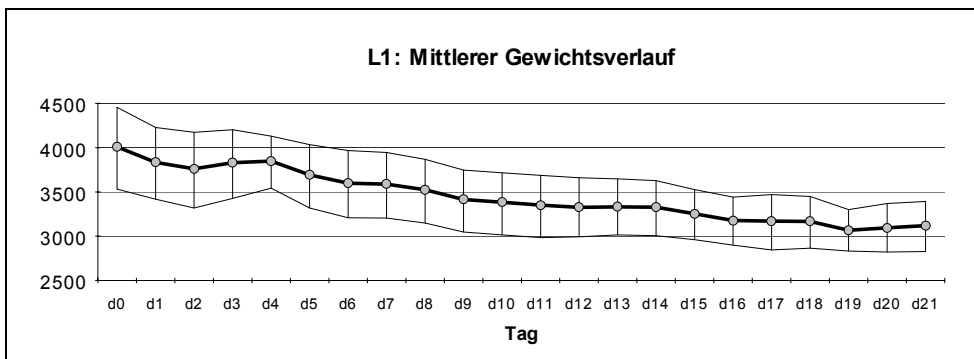


Abbildung 78: mittleres Körpergewicht +/- 1 Standardabweichung in Gramm

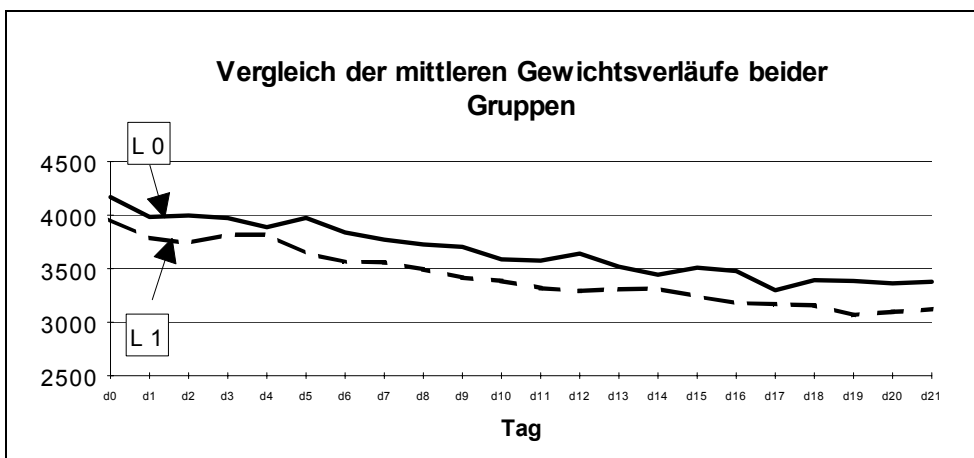


Abbildung 79: mittleres Körpergewicht in Gramm

## 4. DISKUSSION

### 4.1. Diskussion der histologischen Präparate

#### 4.1.1. Die Rolle des intermediären, osteochondroiden Gewebes im Callotaxis-Regenerat

Wie bei instabilen Osteosynthesen bilden sich auch bei der Verlängerungsosteosynthese in der Distractionszone Inseln von chondroidem Gewebe. Diese ähneln vom mikroskopischen Aspekt her sehr dem Aufbau des Säulenknorpels der Epiphysenfuge und legen einen funktionellen Vergleich nahe. Im folgenden soll versucht werden, die Rolle dieser knorpeligen Zwischenstufe des Distractionscallus auf dem Wege zum vollständigen Knochenregenerat zu erhellen.

Bei der intermediären Bildung des osteochondroiden Gewebes werden verschiedene Arten Kollagen und Grundsubstanz (bestehend aus Proteoglykanen wie Hyaluronsäure, Link-Protein, Core-Protein und Glykosaminoglykanen wie Keratan- und Chondroitinsulfat) gebildet, durch deren negative Ladungen und osmotische Wirkung ein hoher intrinsischer Druck aufgebaut wird, der zusammen mit der Retention des Bindegewebes eine weitergehende Stabilisierung bewirkt (siehe Abbildung 80).

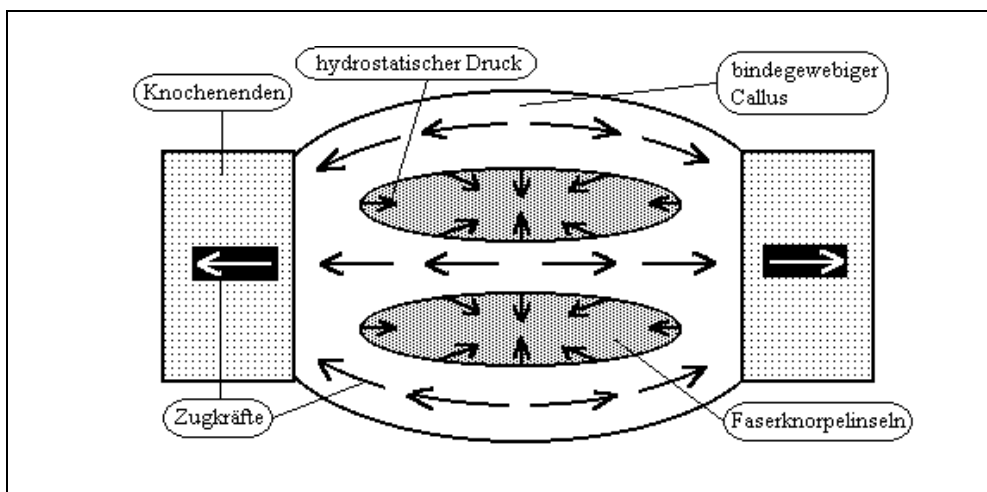
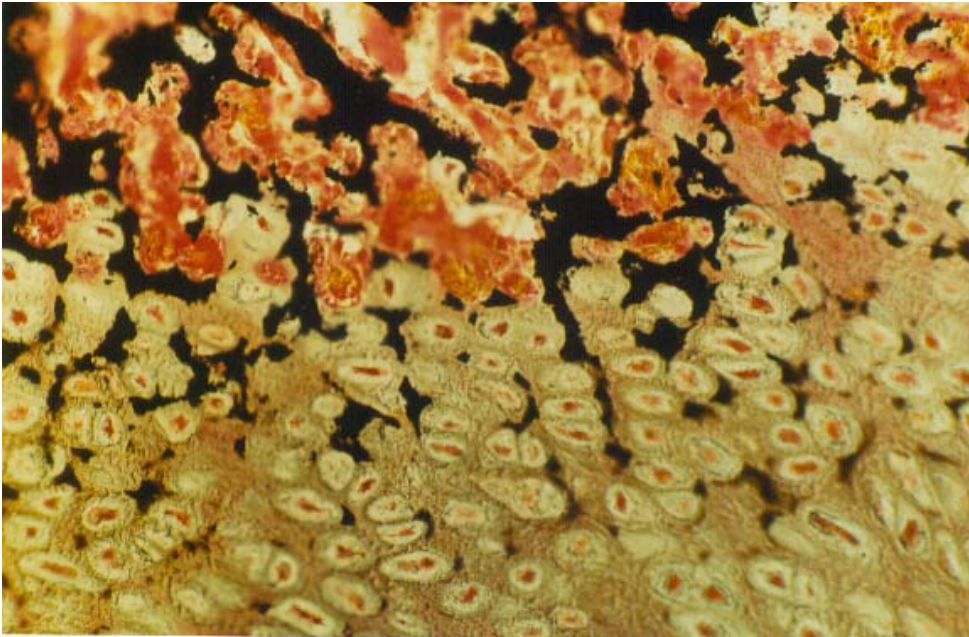


Abbildung 80: Darstellung der Zugkräfte über den bindegewebigen Callus und des dadurch verursachten hydrostatischen, intrinsischen Druckes in den Knorpelinseln, der mit dem retinierenden Bindegewebe die Stabilisierung des Callus gewährleistet. Die Größenverhältnisse sind nicht der Realität entsprechend.

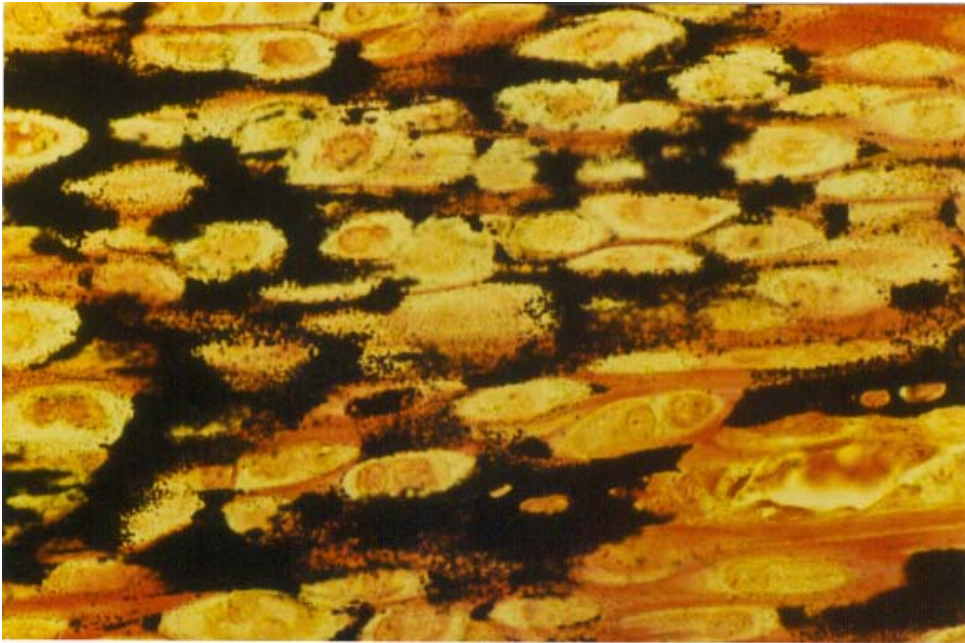
Wie SCHENK (1992)<sup>95</sup> an der Epiphysenfuge zeigen konnte, muß die Knorpelgrundsubstanz erst verkalken, bevor sie durch einwandernde Kapillaren und Osteoklasten partiell resorbiert werden kann und anschließend Osteoid durch Osteoblasten angelagert wird, das seinerseits verkalkt. Im Falle der Callotasis gehen ein Großteil der Osteochondroblasten nach erfolgtem Anschluß an das Markgefäßsystem kontinuierlich zur Differenzierung zu Osteoblasten über, womit ebenfalls die teils schon verkalkte Interzellular-Grundsubstanz kontinuierlich in verkalkendes Osteoid übergeht. Man kann hier nicht von einem totalen Ersatz der Knorpelzellen durch Osteoblasten wie bei der Epiphysenfuge während des Aufschlusses reden. Vielmehr kommt die fünfte Phase des Callotasis-Phasenmodells (Aufschluß durch Osteoklasten, partieller Zelluntergang und Metaplasie der Osteochondroblasten in Osteoblasten) einer Zwischenstufe auf der Zytogenese von der Osteoprogenitorzelle zum Osteoblasten gleich. Beweisend für die Tatsache, daß die hypoxische Degeneration des hydroptischen Säulenknorpels der Epiphysenfuge keinesfalls obligat für die Situation der Osteochondrozyten der fünften Phase des Distraktionsmodells sein muß, ist die Arbeit von NAKAMURA et al. (1993)<sup>96</sup>. In einem ähnlichen Callotasis-Versuch an Kaninchen konnte gezeigt werden, daß sich die Degeneration des osteochondrozytären Gewebes umgekehrt proportional zur Distraktionsfrequenz verhält. So riefte eine kontinuierliche Distraktion die geringste osteochondroblastäre Degeneration hervor.

Dies stünde in vermeintlichem Widerspruch zu Ergebnissen von BENTLEY UND GREER (1970)<sup>97</sup>, die an mit <sup>3</sup>H-Thymidin markierten und in Muskelgewebe implantierten Chondroblasten deren Metamorphose in Osteoblasten ausschlossen. Da diese Versuche jedoch in heterotopen Gewebe, und eben nicht an Osteoprogenitorzellen vorgenommen wurden, muß dies nicht zwingenderweise für die Osteogenese im Knochen gelten. Zudem fehlt im Muskel das 'potente Frakturxsudat', also die der Osteogenese eigenen, spezifischen, osteoinduktiven Zytokine. Andererseits handelt es sich bei den Osteochondroblasten nicht um 'echte' Chondroblasten, sondern eben um eine chondroide Zelldifferenzierung der Osteoprogenitorzelle. Auf jeden Fall ist der Schritt zur Mineralisation eine aktive Leistung sowohl der osteochondroblastären Zellen, wie auch der Osteoblasten<sup>98</sup>.



*Abbildung 81: Hier kommt die Aufschlußzone zwischen Osteochondroblastensäulen und der primären Spongiosa zur Darstellung. In der Kossa-Färbung werden mineralisierte Grundsubstanzbereiche schwarz dargestellt. Deutlich sieht man, wie die verkalkte Knorpelgrundsubstanz in die mineralisierten Primärtrabekel übergeht, an die sich nun Osteoblasten legen. Dieser Vorgang läßt sich mit der enchondralen Knochenbildung der Epiphysenfuge vergleichen. Oben links-mittig wandert ein Osteoklast aus dem Markbereich ein. (Kossa, 200 fache Vergrößerung, Präparat L0/3 re T)*

Im Callus<sup>99</sup> wie in der Epiphysenfuge<sup>100</sup> bilden Osteoblasten, wie auch die osteochondroblastären Zellen sogenannte Matrixvesikel, die die biologischen Kristallisationskeime für Appatitkristalle darstellen (siehe Abbildung 82).



*Abbildung 82: Darstellung der Mineralisation von Grundsubstanz des Distractionssegmentes in der von-Kossa-Färbung. Mineralisiertes Osteoid wird versilbert (schwarz). Man kann gut die Kristallisationskeime im noch unverkalkten Osteoid erkennen, die noch keine Verbindung zum verkalkten Osteoid aufweisen. Die Mineralisationskeime befinden sich z. T. in relativer Entfernung zu den Osteoblasten, obwohl die Mineralisation ein von ihnen bestimmter Vorgang ist. (Kossa, 400 fache Vergrößerung, Präparat L0/7 re T)*

Allerdings scheint auch eine direkte Mineralisation von kollagenösem Bindegewebe unter Umgehung der osteochondroblastären Phasen (Phase 4 und 5) möglich zu sein (siehe Abbildung 83), welche anschließend durch Faserknochen ersetzt wird. Diese Auffassung steht auch mit SCHENK (1992)<sup>95</sup> in Übereinstimmung, der durch Fibroblasten sezernierte Matrixvesikel für die hier im Gegensatz zum Faserknochen unregelmäßiger verteilten, nicht eng an Kollagenfasern gebundenen Mineralisationsherde verantwortlich macht. KOJIMOTO (1988)<sup>63</sup> beschreibt in einem diesem ähnlichen Versuch ebenfalls die Existenz zweier Ossifikationsoptionen während einer Callotaxis, der 'direkten' und der 'enchondralen'. Dies bedeutet, daß die Phasen vier und fünf nicht obligat auf dem Weg zum Faserknochen durchlaufen werden müssen. So mag ein Anschluß an die Blutversorgung des Markraumes auch ohne die knorpelige Metamorphose unter bestimmten Umständen möglich sein.

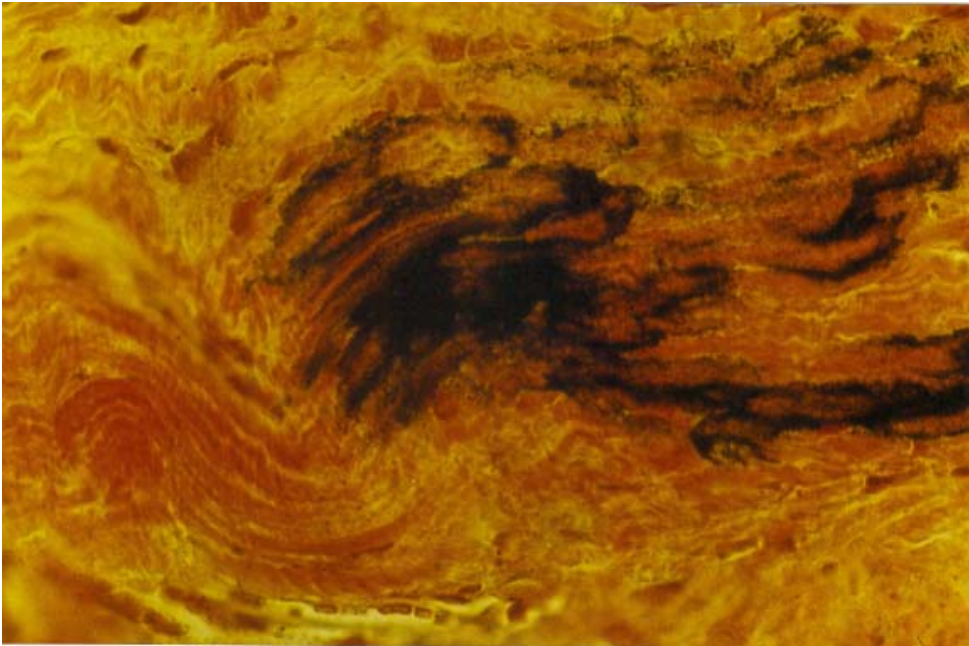


Abbildung 83: Demonstration der direkten desmalen Verknöcherung des Distractionssegment-Bindegewebes. (Kossa, 400 fache Vergrößerung, Präparat L0/2 re T)

Die Frage, welche Einflüsse die Stammzellen dazu bewegen, sich zu Osteoblasten, oder zunächst zu osteochondroblastären Zellen zu differenzieren, wird viel diskutiert. So mag Sauerstoffmangel zu Knorpelbildung führen<sup>101</sup>. PAUWELS (1960)<sup>102</sup> war der Ansicht, daß dort, wo Zugkräfte ausgeübt werden, fibröses Bindegewebe, dort wo hydrostatischer Druck herrscht, Knorpelgewebe ausgebildet wird. KROMPECHER (1937)<sup>103</sup> postulierte, daß an Stellen, an denen Zugkräfte auftreten, desmale Knochenbildung einsetzt. Teleologischer läßt sich das Erscheinen von Knorpel von einer anderen interessanten Warte aus sehen: Während der Anbau lamellären Knochens von der Osteoid-Appositionsrate abhängig ist und sehr langsam fortschreitet (ca. 1  $\mu\text{m}/\text{d}$ )<sup>104</sup>, läßt sich das Knochenwachstum durch Synthese von Faserknochen beschleunigen, da es nun nicht direkt nur von der Appositionsrate, sondern auch von der Proliferationsaktivität der Osteoblasten abhängig ist. Ähnlich verhält es sich beim osteochondroblastären Knorpel, der sekundär verkalkt und als Grundgerüst für die Primärtrabekel dient. Hier ist jedoch das Wachstum von der Proliferation *und* der umfangreichen Grundsubstanzsynthese der osteochondroblastären Knorpelzellen abhängig, was sich der Wachstumsknorpel der Epiphysenfuge 'zu eigen macht' und eine weitere Beschleunigung des Knochenwachstums mit sich bringen dürfte. Hinzu kommt noch die Zellhypertrophie der Knorpelzellen, welche in den Kolumnen des Wachstumsknorpels einen Höhenzuwachs um das Dreifache bewirkt<sup>105</sup>. Das Entstehen

dieses Wabensystems ist mit der Schäumung von Kunststoffen vergleichbar, bei dem mit wenig Material große Volumina an Baustoff erzeugt werden. Kurzum, Knorpel im Knochenwachstum kann als 'Trick' angesehen werden, schnell große Mengen an spongiösen Knochen (*spongia* (gr.): Schwamm) zu schaffen.

#### 4.1.2. Mineralisation und Konsolidierung

Klassischerweise postulierte man, daß für die Konsolidierung einer Fraktur relative Stabilität und eine ausreichende Blutversorgung gewährleistet sein muß. In den letzten Jahren konnte u. a. in der Forschung zum Thema Pseudarthrose gezeigt werden, daß der Zusammensetzung des Fraktur-exsudates eine wichtige Bedeutung hinsichtlich der Osteogenese zukommt. Dieses Exsudat besteht nicht nur aus dem Serum des Hämatoms, sondern ebenfalls aus der nichtkollagenösen Grundsubstanz, die bei einer Verletzung des Knochens in das Frakturgebiet diffundiert. Neben anderen Autoren isolierte URIST (1965)<sup>106</sup> z. B. ein Protein (Bone Morphogenetic Proteine, BMP), welches u. a. in der Lage war, heterotope Osteogenese in Muskelgewebe zu induzieren. Längere Zeit nekrotischer Knochen verlor mangels dieses Proteins seine Kapazität, Frakturen durch Osteoinduktion zur Konsolidierung zu bringen - eine mögliche Erklärung der Genese von Pseudarthrosen. Diese drei Voraussetzungen, ausreichende Stabilität, Blutversorgung und 'potentes' Fraktur-exsudat sind die Grundvoraussetzung für die Entwicklung von osteogenem Gewebe. Wie schon erwähnt, erfolgt während des Mineralisationsprozesses von Knorpel wie von Knochen eine Änderung der Zusammensetzung der extrazellulären Matrixsubstanz. Hierbei kommt es u. a. zu einem Shift in der Kollagensynthese der beteiligten Zellen von Kollagen II (Knorpel) über Kollagen X<sup>111</sup> (verkalkter Knorpel) zu Kollagen I (Knochen). Weiterhin ändert sich die Zusammensetzung der Grundsubstanz. Im hypertrophen Knorpel findet sich eine starke Expression von Aggrecan, Link-Protein und Osteonectin, welche im verkalkenden Knorpel nicht mehr vorhanden ist. Hier ist die Synthese von alkalischer Phosphatase, welche in den Matrixvesikeln exozytiert wird, hoch<sup>111</sup>. Die Konzentration von Phospholipiden steigt vor der Mineralisation<sup>107</sup>. Die Zusammensetzung der Glykosaminoglykane, die als saure, im Gegensatz zu den neutralen Mukopolysacchariden, die Mineralisation hemmen<sup>108</sup>, ändert sich ebenfalls. Während unverkalkter Knorpel reich an Chondroitin-4-Sulfat ist, weist die Knochengrundsubstanz zusätzlich Chondroitin-6-Sulfat und Keratansulfat auf. Im verkalkten Knorpel ist Apatit frei über die Grundsubstanz verteilt und das Kollagen noch gewellt, hingegen findet es sich im Knochen mittels Osteonectin<sup>112</sup> an das nunmehr gestreckte Kollagen gebunden. Die Auflistung könnte noch beinahe beliebig fortgeführt werden, würde jedoch den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Die Forschung



zu den Mineralisationsvorgängen ist noch im vollen Gange und folgende Abbildung 84 soll die Veränderungen während der Mineralisation und deren histologisches Korrelat der Metachromasie nur ansatzweise skizzieren.

| <b>Änderung der Anfärbarkeit der Grundsubstanz (Metachromasie)</b>   |  |  |
|--|--|--|
| <b>Unverkalkte Knorpelgrundsubstanz</b>  | <b>Verkalkte Knorpelgrundsubstanz (basophil)</b>   | <b>Verkalktes Osteoid des Faserknochens (azidophil)</b>  |
| Kollagen II (zu 66%) <sup>95</sup>   | Kollagen X <sup>109, 111</sup>   | Kollagen I (zu 95%) <sup>105, 111</sup>  |
| Kollagen gewellt   | Kollagen gewellt   | Kollagen gestreckt   |
| Chondroitin-4-Sulfat   |  | Chondroitin-4-Sulfat<br>Chondroitin-6-Sulfat<br>Keratansulfat  |
| saure Mukopolysaccharide inhibieren Calcifizierung! (neg. Ladungen) <sup>113</sup> , Hyaluronsäure unterhält Proliferation und Migration mesenchymaler und endothelialer Zellen <sup>110</sup> | neutrale Mukopolysaccharide fördern Mineralisation durch Anreicherung von Phosphat, kurz vor der Mineralisation steigt der Gehalt an Phosphorlipiden an <sup>113</sup> | Core-Protein der Glykosaminoglykane besitzt kein OH-Prolin, jedoch viel Thyrosin und Leucin  |
| Aggrecan<br>Osteonectin<br>Link-Protein <sup>111</sup>   | erloschene Expression der nebenstehenden Matrixproteinen, nun Expression der alkalischen Phosphatase <sup>111</sup>  |  |
| Osteonectin an Kollagen gebunden <sup>95</sup>   | Calcium nicht an Kollagen gebunden <sup>105</sup>  | Calcium mittels Osteonectin an Kollagen gebunden <sup>112</sup> , Grad der intermolekularen Quervernetzung des Kollagens korreliert positiv mit der Mineralisationsrate <sup>113</sup> |

Abbildung 84: Änderungen in der Zusammensetzung der zellulär synthetisierten Grundsubstanz-Matrix bedingen die mikroskopisch deutliche Metachromasie

Der oben skizzierten Änderung der Zusammensetzung der Interzellulärsubstanz entspricht die Metachromasie derselbigen im histologischen Präparat. Auch hier zeigt sich die Ähnlichkeit von Distraktionsvorgang und physiologischem Knochenwachstum: Sowohl in der Epiphysefuge, wie im Distraktionscallus scheint sich die umgebende Grundsubstanz zu verändern, wie auch die metachromatischen Effekte in den

Abbildungen 85 und 86 sowohl der Epiphysenfuge, wie auch der Distraktionszone zeigen.



Abbildung 85: Aufbau der Epiphysenfuge mit Säulenknorpel, Aufschlußzone und Mineralisation der metachromatischen Grundsubstanz. Kaninchen (Azan, 200 fache Vergrößerung, Präparat L1/14)

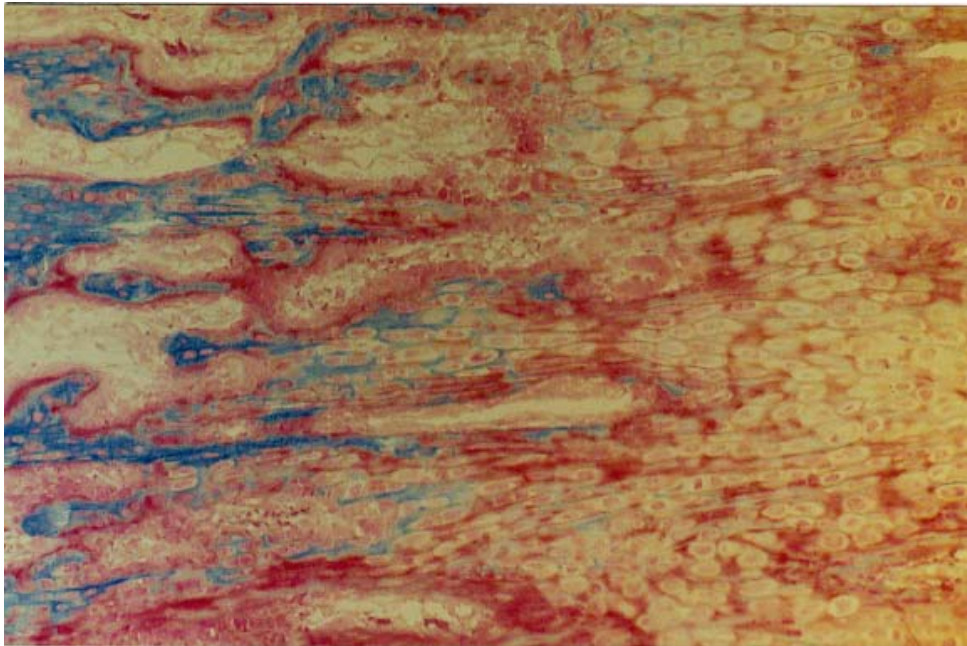


Abbildung 86: Säulenartig angeordnete osteochondroblastäres Zellgewebe, das kontinuierlich in verkalktes Knochengewebe übergeht. Man achte auf die metachromatischen Effekte während der Mineralisation sowohl des Knorpel- wie des Knochengewebes, die analog denen der Epiphysenfuge verlaufen. Distractionszone des Kaninchenfemurs (Azan, 200 fache Vergrößerung, Präparat L0/3 re T)

#### 4.1.3. Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten

In verschiedenen Experimenten wurde versucht, die Herkunft der Osteoblasten bei der Frakturheilung zu eruieren. Es konnte bewiesen werden, daß das Knochenmark Zellen enthält, die sich sowohl in Osteoblasten, wie auch in Osteoclasten<sup>114</sup> umwandeln können. OWEN (1985)<sup>115</sup> zeigte, daß Osteoprogenitorzellen u. a. speziellen Knochenmarksstromazellen entstammen, differenzierte jedoch schon einige Jahre vorher, daß Knochenstammzellen keinerlei Verbindung mit dem Parenchym des Knochenmarkes, sprich hämatopoetischen oder lymphopoetischen Zellen, aufweisen<sup>116</sup>. Bezüglich der Verlängerungsosteosynthese wiesen einige Autoren auf die Bedeutung des Endostes und die Erhaltung des Knochenmarkes hin<sup>117,118,119</sup>. Neuere Veröffentlichungen sehen das Periost als Hauptort der Osteoprogenitorzell-Proliferation<sup>61,63</sup>.

FRIEDENSTEIN (1973)<sup>120</sup> leitete aus Experimenten, in denen Knochenmark in Diffusionskammern ohne den Einfluß von osteoinduzierenden Substanzen in der Lage war, Knochen zu bilden, und aus Experimenten über heterotope Knochenbildung die Hypothese ab, daß es zweierlei Arten von Osteoprogenitorzellen gäbe. Die isotopen, zur Knochenbildung befähigten, 'determined osteoprogenitorcells' (DOPC) und die

heterotopen, 'inducible osteoprogenitorcells' (IOPC). Das berichtete Überwiegen der periostalen Rekrutierung von Stammzellen bei der Verlängerungsosteosynthese mag mit der Induktion von IOPC's durch Osteoinduktoren eventuell nicht nur aus der Kambiumschicht des Periosts, sondern auch aus peripherem Bindegewebe, in Zusammenhang stehen, um die Rekrutierung der DOPC's im Endost und Periost zu unterstützen.

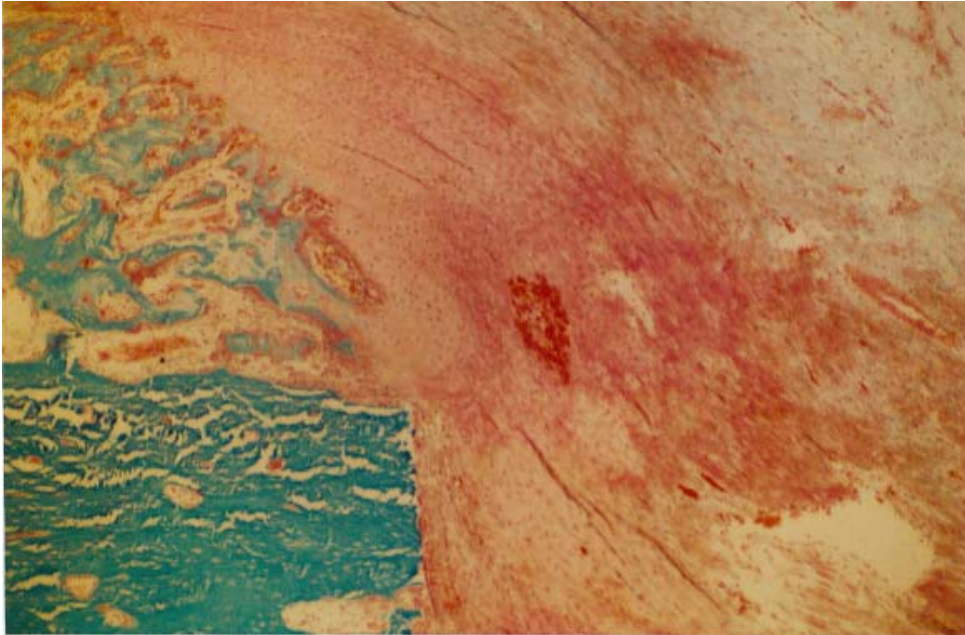


Abbildung 87: Übersicht über die fischzugartige Osteoprogenitorzell-Migration an derer osteotomierten Kortikalis vom Periost ins Distractionssegment. (Trichrom-Goldner, 40 fache Vergrößerung, PräparatL0/13 li T)

URIST (1983)<sup>18</sup> spricht in diesem Zusammenhang von nicht differenzierten perivaskulären Mesenchymzellen, die durch BMP zur Differenzierung zu Osteoprogenitorzellen induziert und wiederum von BDGF zur Proliferation angeregt werden. OWEN (1963)<sup>121</sup> berichtete aus <sup>3</sup>H-Thymidin-Markierungsversuchen, daß bei Knochenregenerationsvorgängen vor allem Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten, kaum jedoch Fibroblasten markiert werden.

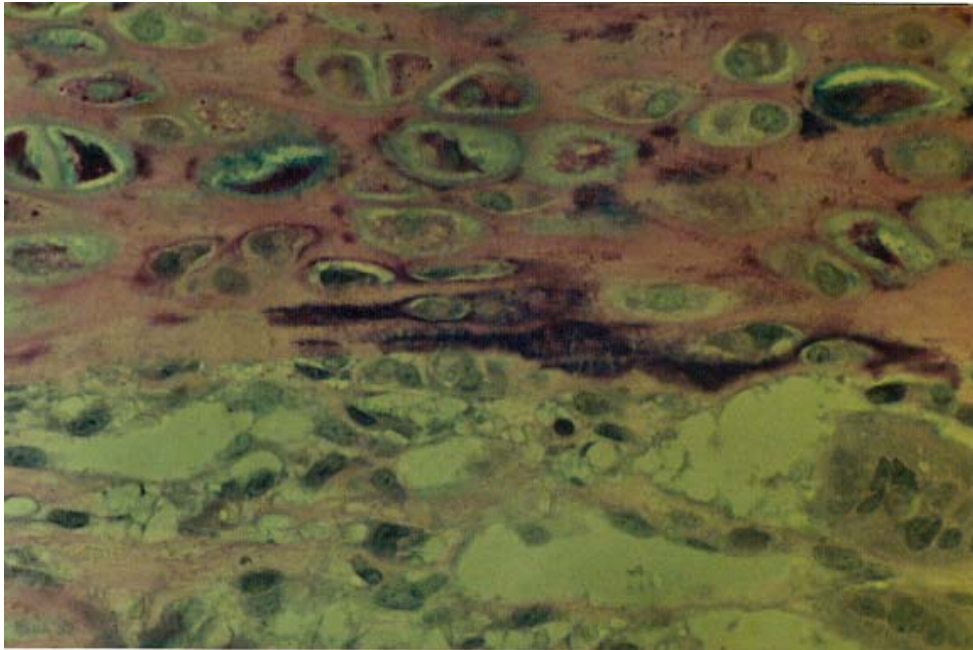


Abbildung 88: Unterschiedliche Aspekte von Osteoprogenitorzellen. Oben Osteochondroblasten in Zellteilung, Kernpyknose, Nukleoklasie, Cytolyse, und z. T. mit PAS-positivem Zytoplasma. In der unteren Bildhälfte sind noch relativ undifferenzierte Osteoprogenitorzellen, rechts unten zwei große, mehrkernige Osteoklasten zu sehen. (Alzianblau-PAS-Färbung, 400 fache Vergrößerung, Präparat L0/14 re T)

Histologisch handelt es sich bei den Osteoprogenitorzellen um ca. 10-12  $\mu\text{m}$  lange und 4-7  $\mu\text{m}$  breite Zellen mit ovoidem, meist nucleolushaltigem Zellkern und schwach anfärbarem Zytoplasma, welche nahe der Osteoidoberfläche oder der Blutgefäße im Bindegewebe gefunden werden<sup>91</sup>.

## 4.2. Lokale Osteoinduktion

### 4.2.1. Knocheneigene, osteogene Faktoren

Unter den lokal wirksamen, osteoinduktiven, knochenimmanenten Faktoren sind die aus der nativen Knochenmatrix isolierten Proteine wohl die meist zitiertesten. Zu nennen wäre hier an erster Stelle das von URIST (1983)<sup>18</sup> isolierte Bone Morphogenetic Protein (BMP), welches Teil der nichtkollagenösen Knochenmatrix (Interzellulärsubstanz) ist und dosisabhängig Knochenwachstum induziert. Aus der kollagenösen Knochenmatrix wurde von REDDI und HUGGINS (1972)<sup>122</sup> ein Osteoinduktor ('Extracellular Matrix Derived Factor') mit einem Molekulargewicht von 22.000 Dalton isoliert. Ein ähnlicher Faktor ('Intramembranous Osteogenetic Factor')

mit einem Molekulargewicht von 10.000 Dalton wurde von THIELEMANN (1982)<sup>123</sup> beschrieben. Osteokalzin und ein verwandtes Protein haben eine starke chemotaktische Wirkung auf Osteoblasten und werden unter dem Begriff 'Bone Chemotactic Factors' zusammengefaßt<sup>124</sup>. BENTZ et al. (1989)<sup>125</sup> isolierten aus mineralisierter Knochenmatrix den Osteoinductive Factor (OIF), dem MOHAN et al. (1991)<sup>31</sup> eine TGF- $\beta$ -abhängige Steigerung der osteoblastären Synthese an alkalischer Phosphatase, sowie eine Hemmung osteoklastärer Vorläuferzellen zuschreibt. BAYLINK (1982)<sup>126</sup> konnte zeigen, daß embryonaler Knochen nach PTH-Inkubation einen osteoinduktiven Faktor (Skeletal Growth Factor SGF) synthetisiert, den er später auch aus Knochen des erwachsenen Menschen isolierte. Die knochenabbauende Primärwirkung des Parathormons wird somit von der osteoinduktiven Wirkung des hSGF gefolgt, was den Annahmen der oben genannten 'Coupling-Hypothese' hinsichtlich der Gegenregulation des Knochenumbaus entspricht. Auch der Bone Derived Growth Factor (BDGF) (CANALIS, 1980)<sup>127</sup> läßt sich in die Reihe der Osteoinduktoren einreihen.

#### 4.2.2. Lokale Applikation mit dem Ziel der Osteoinduktion

Es sollen im Folgenden einige Versuche zur Osteoinduktion durch lokale Wirkstoff-Applikation vorgestellt werden.

1973 behandelten BENFER und STRUCK<sup>128</sup> eine an Ratten und Hunden vorgenommenen Osteotomie der Tibia mit einer Schweinehautkollagenlösung, die sie einmalig mittels einer Kanüle an den Osteotomiespalt spritzten. Durch Myographien wurde versucht, die Lösung am Wirkort zu halten. Hierbei wurde biomechanisch eine frühere Konsolidierung und histologisch eine frühere Kallusformation der mit Kollagen behandelten Gruppe festgestellt, was nicht nur für die Wirkung von Kollagen auf die Osteoinduktion, sondern auch für das lokale Diffusionsvermögen eines doch relativ großen Proteins in den Kallus spricht.

KIRKEBY und EKELAND<sup>48</sup> überprüften 1992 den Effekt von lokal appliziertem Somatomedin C auf die Knochenheilung. Hierbei wurde an eine Rattenfemurosteotomie mittels einer entlang der vorgenommenen Marknagelung geführten intramedullären Kanüle und einer subcutan am Rücken plazierten, osmotischen Pumpe kontinuierlich rekombinantes Somatomedin C infundiert. Man konnte jedoch weder in der biomechanischen Prüfung, noch radiologisch oder durch Kallusgewichts-, Durchblutungs- und Mineralisationsmessung Unterschiede zwischen der Verum- und Kontrollgruppe feststellen.

Erfolge konnte hingegen KELLER et al.<sup>49</sup> 1993 bei der Osteoinduktion durch Prostaglandin E<sub>2</sub> aufweisen. Die Arbeitsgruppe gab mittels eines an einen Katheter angeschlossenen, osmotischen Pumpsystems kontinuierlich PgE<sub>2</sub> an den Tibiaosteotomiespalt von Kaninchen. Sie konnte nachweisen, daß eine lokale Gabe während der 1. bis 3. Woche keinen Effekt, in der 4. bis 6. Woche jedoch eine signifikante Wirkung auf die Kallusstimulation aufwies.

SHARMA et al.<sup>129</sup> spritzten fünf Tage nach einer an Kaninchen vorgenommenen Osteotomie des Radius mit einer Kanüle perkutan autolog entnommenes Knochenmark in den Knochenspalt und wiesen einen positiven Effekt der Knochenmarktransplantation auf die Kallusformation nach.

YASKO, LANE et al.<sup>130</sup> füllten an Ratten Femurknochendefekte mit demineralisierter Rattenknochenmatrix, die als Träger für lyophilisiertes, rekombinantes, humanes BMP-2 diente. Das somit lokal eingebrachte BMP wirkte sich gegenüber der nur mit Knochenmatrix behandelten Kontrollgruppe in einer dosisabhängigen Beziehung positiv auf die radiographische, histologische und mechanische Qualität der Defektheilung aus.

Mit dem konträren Ziel der Inhibition von Knochenwachstum beschäftigte sich eine Studie an Rattenfemurfrakturen von ENGESÆTER et al.<sup>131</sup>. Hier wurde die Wirkung von oral administrierten Indomethazin mit der von lokal gespritztem, den gleichen Wirkstoff enthaltendem, biologisch abbaubarem Polyorthoester-Gel verglichen. Bei beiden Gruppen wurde eine die Knochenheilung deprimierende Wirkung gleichen Ausmaßes gefunden, wobei die Menge des lokal applizierten Wirkstoffes ein Viertel des oral gegebenen Indomethazins ausmachte. Im Serum wurde bei der lokal behandelten Gruppe kein Indomethazin gefunden.



### 4.3. Faktor XIII

#### 4.3.1. Physiologie und Biochemie

Blutgerinnungsfaktor XIII, von ROBBINS<sup>132</sup> 1944 als 'Serum-Faktor' erstmals beschrieben und 1948 von LAKI und LORAND<sup>133</sup> isoliert, auch Fibrinstabilisierender Faktor, Plasma-Transglutaminase, Collagen-Induzierender-Faktor oder Fibrinolygase genannt, ist ein Enzym, welches ein Fibringerinnsel gegen proteolytischen Abbau stabilisiert. Es ist als einziger Faktor des Gerinnungssystems keine Serin-Protease (im aktiven Zentrum befindet sich Cystein<sup>134</sup>) und scheint nebst dieser biochemischen Exposition auch funktionell herausstechend zu sein. Wie die vielfältige Namensgebung erahnen läßt, ist Faktor XIII nicht nur für die Gerinnung essentiell, sondern spielt auch eine bedeutende Rolle in der Wundheilung und Bindegewebeformation allgemein. Auch der Blick auf die Phylogenese des Proteins stellt die zentrale Bedeutung von Faktor XIII heraus. Primitive Gerinnungssysteme wie die des Hummers bestehen aus einem einzigen Koagulations-Substrat-Protein und einem Vernetzungsenzym, welches dem Faktor XIII analog ist<sup>135</sup>.

Der Mensch besitzt zwei Arten von Faktor-XIII-Proteinen. Im Plasma läßt sich ein extrazellulärer Faktor isolieren, welcher als Tetramer ( $\alpha_2\beta_2$ ) aus vier Peptidketten<sup>134</sup>, zwei  $\alpha$ -Ketten (à ca. 75.000 Dalton), dem eigentlich aktiven Peptid, und zwei  $\beta$ -Ketten (à ca. 80.000 Dalton) zusammengesetzt ist. Somit ergibt sich ein Gesamt-molekulargewicht von ca. 320.000 Dalton. Das u. a. in den Thrombozyten (und auch respektive Megakariozyten) befindliche intrazelluläre Faktor-XIII-Protein besteht lediglich aus zwei  $\alpha$ -Ketten und stellt somit ein Dimer ( $\alpha_2$ ) eines Molekulargewichts von insgesamt annähernd 160.000 Dalton dar<sup>136</sup>. In thrombozytenreichem Plasma ist ca. die Hälfte des Faktor XIII auf die Thrombozyten verteilt, deren Anteil an Faktor XIII zu 90% auf die lösliche Fraktion verteilt ist<sup>137</sup>. Interessanterweise wird Faktor XIII nicht in die Thrombozyten aufgenommen<sup>138</sup> und bei der viskösen Metamorphose nicht "ohne weiteres" freigesetzt<sup>139</sup>. Dahingegen berichtet KASAHARA (1988)<sup>140</sup>, daß Faktor XIII auf der Zelloberfläche von Rinder-Thrombozyten exprimiert wird und auch in die Kollagen-induzierte Plättchenaggregation, eventuell als Kollagen-Rezeptor involviert ist. Auch in Zellen des Mononucleären Phagozyten Systems (MPS) wurde diese Untereinheit von den Präkursoren des Knochenmarks an bis zu den enddifferenzierten Makrophagen und Histiozyten gefunden<sup>141</sup>. Hierbei sollte nicht unerwähnt bleiben, daß der intrazelluläre Faktor XIII dieser Zellen, welche im übrigen alle zur Thrombinbildung nötigen Faktoren aufweisen, ebenfalls in der extravaskulären Fibrinstabilisierung, involviert ist, sowie die phagozytäre Aktivität der Makrophagen und Monozyten zu beeinflussen scheint<sup>153</sup>.

#### 4.3.1.1. Pharmakodynamik und -kinetik

Der extrazelluläre Faktor XIII A (d. h. das Dimer  $\alpha_2$ ) wird teilweise, der intrazelluläre Faktor XIII A komplett von den Progenitorzellen der Monozyten und Thrombozyten synthetisiert<sup>142</sup>. Die für Faktor XIII kodierende Sequenz wurde auf Chromosom 6 des menschlichen Genoms lokalisiert, analoge Messenger-RNA in Placentazellen, Leberzellen und Monozyten nachgewiesen<sup>143,144</sup>. Die B-Untereinheit wird dahingegen lediglich in der Leber gebildet, wie Lebertransplantationsstudien zeigen konnten<sup>145</sup>. Immunoblotting-Untersuchungen wiesen die Biosynthese der A-, wie der B-Untereinheit durch humane Hepatomzellen nach<sup>146</sup>.

Der *extrazelluläre* Faktor XIII wird durch Proteolyse des an einer speziellen Stelle im Molekül bindenden Thrombin, unter Beteiligung die Stereometrie verändernder Calcium-Ionen und Fibrinogen<sup>147</sup> in einem schrittweisen Prozeß aktiviert, bei dem auch die ihn stabilisierende<sup>148,149</sup>  $\beta$ -Ketten vom Plasma-Tetramer getrennt werden<sup>150,151</sup>. Die Aktivierung und besonders die Sekretion des *intrazellulären* Faktor XIIIa wird noch diskutiert. In Frage kommt eine proteolytische Aktivierung durch intrazelluläres Calpain und Cathepsin G, eine Expression auf der Oberfläche auf bisher nicht bekannte, einzigartige Weise<sup>152</sup> und anschließende Aktivierung analog der des extrazellulären Faktors oder auch eine nicht-proteolytische Aktivierung<sup>153</sup>. Ergebnisse von YING (1991)<sup>154</sup> beschreiben den dosisabhängigen Effekt von humanem TNF- $\alpha$  auf die Sekretion der aktiven Untereinheit an Monocyten, bzw. Makrophagen.

Der aktive Faktor XIIIa katalysiert die Reaktion einer  $\gamma$ -Carbonyl-Gruppe eines Glutamyrestes mit einer  $\epsilon$ -Amidogruppe eines Lysylrestes, stellt also eine Endo- $\gamma$ -Glutamin: $\epsilon$ -Lysin-Transferase dar. Die Protein-Vernetzungs-Reaktion ist dabei hochspezifisch für räumlich bestimmt angeordnete Aminosäure-Konstellationen eines Proteins<sup>155</sup>.

Die Halbwertszeit wird beim Menschen von FEAR et al. (1983) auf 9 bis 10 Tage geschätzt<sup>156</sup>, MILOSZEWSKI et al. (1979)<sup>157</sup> geht von 4 bis 7 Tagen aus. Die Art des Abbaus von Faktor XIII wird noch diskutiert. Es ist wahrscheinlich, daß Faktor XIII durch  $\alpha$ -Thrombin nicht nur proteolytisch aktiviert, sondern auch, jedoch in einem langsameren Prozeß, inaktiviert wird<sup>158</sup>. Dies erklärt auch die fehlende Präsenz der isolierten A-Untereinheit im Plasma, da diese ohne die schützende B-Untereinheit direkt durch das Plasma-Thrombin abgebaut wird. Zudem wird von KLINGEMANN et al. (1982)<sup>159</sup> berichtet, daß Granulozyten-Proteasen Faktor XIII abbauen können. Somit mag also auch durch Granulozyten während einer Entzündung beispielsweise auch lokal ein Abbau möglich sein. FOLK (1975)<sup>160</sup> berichtet, daß Faktor XIII an Fibrin gebunden

wird, TRIANTAPHYLLOPOULOS (1973)<sup>161</sup> beschreibt eine Inaktivierung von Faktor XIII durch in der Polymerisation befindliche Fibrinmonomere, auch eine Absorption von Plasma-Faktor-XIII an verschiedenen nicht im Blut zirkulierenden Proteinen wäre denkbar.

#### 4.3.1.2. Antifibrinolytische Wirkung

Trotz der relativ hohen Spezifität von Faktor XIII sind bereits einige Proteine als mögliche Substrate beschrieben worden. Dabei beeinflussen z. T. einige Substrate die Reaktivität anderer, bzw. die Aktivität von Faktor XIII, sodaß Ergebnisse aus isolierten in-vitro-Versuchen nur mit Vorbehalt zu sehen sind und nur Anhaltspunkte für die schier unüberschaubare Vielfalt der komplexen Situation in vivo geben. Unter diesen Voraussetzungen sind Tierversuche im übrigen sehr hilfreich, um trotz der 'Black-Box-Situation' eines Organismus Aussagen über die Wirkung eines Pharmakons treffen zu können.

Substrate von Faktor XIII sind Glutamin und Lysinreste von u. a. *Fibrin*. In einer schnellen, sofortigen Reaktion der  $\gamma$ -Ketten des Fibrins zu Dimeren und in einer langsameren, verzögerten Reaktion der  $\alpha$ -Ketten zu Polymeren wird das Fibringerinsel vernetzt und stabilisiert. Ebenfalls Fibrinogen, was seinerseits als ein starker Inhibitor der Fibrinvernetzung angesehen werden darf<sup>162</sup>, kann vernetzt werden.

Auch  $\alpha_2$ -Plasmin-Inhibitor, interessanterweise auch ein von Osteoblasten synthetisiertes<sup>163</sup> Enzym, das die Fibrinolyse durch Plasmin hemmt, wird an Fibrin gebunden und hemmt somit den Abbau des Gerinnsels durch diese Protease<sup>164,165</sup>. Darüber hinaus wird die Proteolyse des stabilisierten Fibrins schon durch die  $\alpha$ -Kettenvernetzung erschwert<sup>166,167</sup>. Durch die Faktor-XIII-vermittelte Vernetzung besonders der  $\alpha$ -Ketten des Fibrins erhöht sich das Elastizitätsmodul des Fibringerinnsels, d. h. es wird nicht nur biochemisch, sondern auch mechanisch stabiler<sup>168</sup>.

*Actin*<sup>169</sup> und *Myosin*<sup>170</sup> als Filamente des Cytoskeletts der retraktilen Thrombozyten werden mit Fibrin vernetzt. Der Thrombozyten-Fibrin-Rezeptor stellt ebenso ein Substrat für Faktor XIII dar<sup>171</sup>. Dies suggeriert eine eventuelle Bedeutung von Faktor XIII in der Retraktionsphase des Fibringerinnsels, zusätzlich zur Wirkung des Thrombostenins. Makrophagen und Thrombozyten binden lösliches Fibrin an ihrer Zelloberfläche in einem Prozeß, der *Fibronektin als Cofaktor* benötigt und durch Faktor XIII beschleunigt wird<sup>172</sup>.

Was die Wirkung von zellulärem Faktor XIII auf Fibrin angeht, sind Ergebnisse von

ZEHER et al. (1994)<sup>173</sup> interessant, die in Speicheldrüsen von Sjögren-Syndrom-Patienten Fibrin-Akkumulationen nachwiesen zu denen Faktor-XIII-positive Makrophagen eng in Beziehung standen. Den Makrophagen wird hier eine regulative Rolle bezüglich der Demarkation von entzündlichem Gewebe zugesprochen.

#### 4.3.1.3. Wirkung auf Zellproliferation und -migration

Schon 1962 wiesen BECK und DUCKERT<sup>174</sup> nach, daß bei Fehlen von Faktor XIII Fibroblastenkulturen auf menschlichem Plasma Wachstumshemmungen zeigen. KNOCHE und SCHMITT<sup>175</sup> wiesen 1976 einen proliferativen Effekt auf Fibroblasten bei Wundsetzungen an Ratten nach. Spätere Untersuchungen zeigen, daß z. B. zelluläres wie plasmatisches Fibronectin, welches in einer durch Faktor XIII katalysierten Reaktion an die  $\alpha$ -Kette des Fibrins gebunden wird<sup>176</sup>, die Zellmigration und -proliferation in einem Fibringerinnsel erhöht. Dabei wirkt sich die Anwesenheit von Faktor XIII zusätzlich verstärkend auf die Zelladhäsion, der eigentlichen Grundlage für die Genese jeglicher Gewebestruktur, aus<sup>191</sup>. Hier wird weniger eine matrixgesteuerte, sondern vielmehr eine chemotaktisch gerichtete Fortbewegung für wahrscheinlich befunden<sup>177,178</sup>.

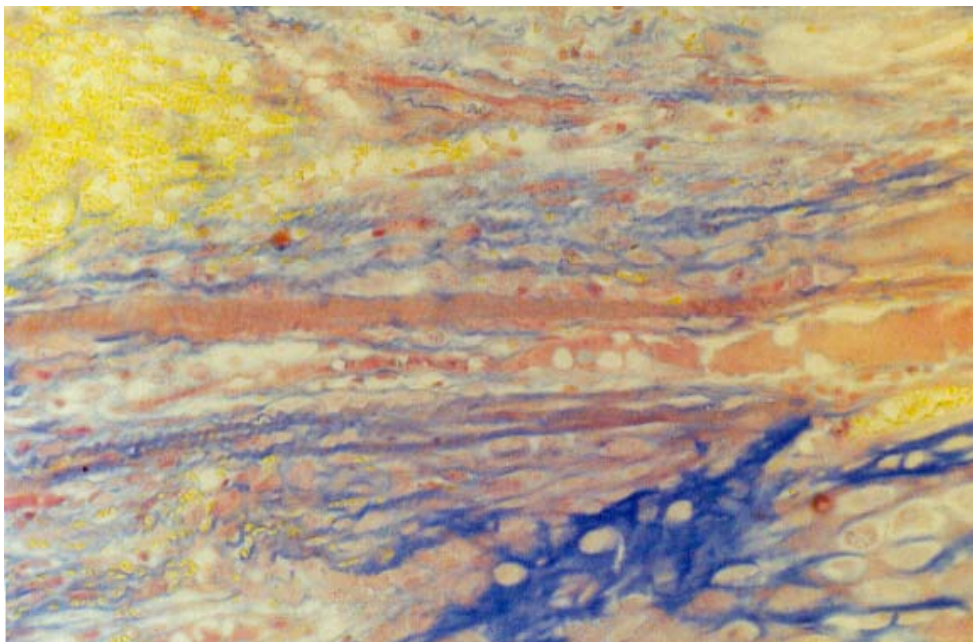


Abbildung 89: In einen Fibrinclot eines Hämatoms einwandernde Osteoprogenitorzellen. Die Erythrozyten stellen sich gelb, Fibrin rot, Osteoprogenitorzellen hellrosa, Kollagen blau und der unten rechts liegende Primärtrabekel dunkelblau dar. (Carstairs, 200 fache Vergrößerung, Präparat L0/9 li)

Aus den zahlreichen Versuchen zur dermalen Wundheilung geht hervor, daß Fibronectin die Ansammlung von Thrombozyten, sowie die Migration und Adhäsion von neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen im Wundgebiet fördert, als Opsonin zur Phagozytose von Zelldebris durch Makrophagen und Fibroblasten anregt und an der Organisation von Granulationsgewebe und Basalmembranen beteiligt ist. GRINNEL (1984)<sup>179</sup> legt nahe, daß bei Patienten mit Faktor-XIII-Defizienz die Wundheilung gestört ist, da Fibronectin nicht in Blutkoagel inkorporiert wird.

Zellgebundener Faktor XIII vermittelt den Aufbau einer Makrophagen und Fibroblasten umgebenden Fibronectin-Matrix<sup>180</sup>. Kollagen I, II; III und V werden spezifisch an Fibronectin gebunden, was bei der Organisation eines Fibringerinnsels eine bedeutende Rolle spielt<sup>181,182</sup>. In einer späteren Veröffentlichung beschreibt derselbe Autor einen in-vitro-Versuch, in dem Fibroblasten mit Collagen, Heparin und Fibronectin inkubiert wurden, welches unter dem Einfluß von Faktor XIII zu Aggregaten hohen molekularen Gewichts vernetzt wurde. Hierbei kam es zu einer Vernetzung der Fibronectin-Moleküle untereinander, die Bindung von Fibronectin an Kollagen blieb jedoch aus<sup>183</sup>.

BRUHN (1983)<sup>184</sup> unternahm umfangreiche in-vitro-Versuche mit unterschiedlichen Zellstämmen und untersuchte den Einfluß von Thrombin, Fibronectin und Faktor XIII auf deren Proliferationsverhalten. Dabei wirkte sich Faktor XIII 24 Stunden nach der Aussaat von Meerschweinchen-Fibroblasten in einer Konzentration von 0,1 bis 0,3 E/ml optimal auf die Proliferation aus. 72 Stunden nach Aussaat wurden bereits die zehnfache Konzentration, nämlich 3,0 E/ml für den gleichen Effekt benötigt. Hierbei wurde ein zweifacher Anstieg an intrazellulärem cGMP festgestellt, was den Vergleich von Faktor XIII mit einem Gewebehormon mit cGMP als Second Messenger nahelegt. Die Zugabe von 1 I.E. Thrombin zu den obigen Kulturen führte zu einem weiteren signifikanten Anstieg der Faktor-XIII-Wirkung auf die <sup>3</sup>H-Thymidin-Aufnahme, sprich die DNA-Synthese während der S-Phase des Zellteilungszyklus der Fibroblasten. In Gegenwart von Fibronectin hingegen wurde die Proliferation signifikant herabgesetzt. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit Endothelzellen des Göttinger Minischwein und glatten Muskelzellen aus der Rattenaorta erzielt. Die Verwandtschaft dieser Zellen läßt eine Wirkung auf die gesamte Zellfamilie der Bindegewebszellen, also eventuell auch auf Osteoblasten vermuten.

UEYAMA et al. (1978)<sup>185</sup> postulierten, daß eine durch Faktor XIII induzierte Fibrinvernetzung eine entscheidende Voraussetzung für die Faktor-XIII-Wirkung auf die Fibroblastenproliferation sei. BRUHN (1983)<sup>184</sup> hingegen verwendete fibrinfreies

Faktor-XIII-Konzentrat und bewies somit einen von Fibrin unabhängigen Einfluß von Faktor XIII auf die Proliferation.

Weitere Indizien für die Rolle von Faktor XIII in der zellulären Proliferations-Kontrolle bietet die Tumorforschung. So wurde gezeigt, daß Tumoren zum Wachstum vernetztes Fibrin, also indirekt Faktor XIII benötigen<sup>186</sup>. Im Plasma von Neoplasie-Patienten wurde ein Transformations-Inhibitor gefunden, der z. T. aus Faktor XIII besteht<sup>187</sup>. Neoblasten einer Akuten Lymphatischen Leukämie wurden durch Faktor XIII in vitro zur Proliferation angeregt<sup>188</sup>. In Leiomyomen des Uterus wurden vermehrt Faktor-XIII-tragende Histiozyten gefunden<sup>141</sup>. Faktor XIII wird von den Stromazellen des Riesenzelltumors des Knochens nebst fibrohistiozytärem Antigen exprimiert<sup>189</sup>.

#### 4.3.1.4. Regulation der Kollagensynthese durch Faktor XIII und Interaktion mit Kollagen

PAYÉ und LAPIÈRE (1987) studierten u. a. die biosynthetische Aktivität von auf Plastik-Untergrund in einem Nährmedium kultivierten Fibroblasten. Dabei stellten sie fest, daß Faktor XIII eine Verringerung der Synthese von ins Kulturmedium abgegebenem Prokollagen, jedoch eine verstärkte Vernetzung des perizellulären Kollagens bewirkt. Zudem modifiziert er die chemische Struktur des gebildeten Kollagen I und induziert die Synthese zweier bisher noch nicht identifizierter Kollagen-Polypeptide<sup>191</sup>.

Faktor XIII scheint die Synthese-Aktivität von Fibroblasten in Abhängigkeit von ihrer Umgebung zu regulieren. So werden in einer Fibrinmatrix befindliche Fibroblasten zur Kollagensynthese stimuliert<sup>190</sup>, während die gleichen Zellen in einer Kollagenmatrix hinsichtlich ihrer Kollagen-Synthese supprimiert werden<sup>191,192,193</sup>. Dies kann als regulierendes Prinzip auch in der Organisation eines Hämatoms hin zum bindegewebigen Callus (oder sonstiges Granulations- und Narbengewebe) verstanden werden: Besteht im Fibringerinnsel Bedarf an stabilisierendem Kollagen, wird produziert, ist der Callus 'abgesättigt', wird unnötige Kollagensynthese zu Gunsten der anschließenden Mineralisation eingestellt. In einer anderen Studie zeigt PAYÉ et al. (1987)<sup>194</sup>, daß transformierte Ratten-Lungenepithelzellen in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix unter kombiniertem Einfluß von Faktor XIII und Fibronektin ihre Fähigkeit wiedergewannen, das Gel zu retrahieren. Hierbei sank mit zunehmender Gelretraktion die biosynthetische Aktivität der Zellen. In einer Monolayer-Kultur war dieser Faktor-XIII-Fibronektin-Effekt nicht nachzuweisen. Auch hier wird die Rolle von Faktor XIII hinsichtlich der Interaktion von Fibroblasten mit Kollagen und auch die

Bedeutung der räumlichen Anordnung eines Gewebes in kausalem Bezug auf eine 'Kontaktaktivierung' deutlich.

In einem Tierversuch, in dem an Ratten Aneurysmen an intrazerebralen Arterien induziert wurden, zeigten KANG et al. (1990)<sup>195</sup>, daß mit Faktor XIII intravenös gespritzte Tiere im Gegensatz zu unbehandelten Tieren Intimaverdickungen an den Bifurkationsstellen und in den Aneurysmen aufwiesen. In einem anderen Versuch an Ratten konnten HERTER et al. (1989)<sup>196</sup> einen Fibrosierungen induzierenden Effekt durch Faktor XIII bei der Fibrinklebung von Nerven nachweisen.

TOIDA et al. (1989)<sup>197</sup> zeigte eine positive Korrelation zwischen dem Grad des Kollagengehalts und der Zahl Faktor-XIII-haltiger Zellen in entzündlichem und neoplastischem Gewebe von kieferchirurgisch operierten Patienten und diskutiert die Rolle von Faktor XIII im Fibrosierungsprozeß. Auch Stromazellen der Fibrome der Tuberosen Sklerose (BOURNEVILLE) weisen Faktor XIII auf<sup>198</sup>.

PAYÉ et al. (1991)<sup>199</sup> zeigten in vitro, daß Faktor XIII die Anfälligkeit von Kollagen-Präkursoren gegen proteolytischen Abbau herabsetzt und diskutieren hierbei die Rolle des Faktors in der strukturellen Organisation von Kollagen. Hierbei scheinen sogenannte Komplexe hohen molekularen Gewichts ('high molecular weight complexes'), die aus Kollagen I und III, sowie Fibronectin und Faktor XIII bestehen, von Bedeutung zu sein. In diesem Zusammenhang sind auch die Ergebnisse von KIKUCHI et al. (1986) interessant, die einem 260.000 Dalton schweren Plasmaprotein inhibitorische Eigenschaften bezüglich der Bindung von Faktor XIII an Kollagen zuschreiben<sup>200</sup>.

All diese Erkenntnisse sind Indizien für eine bedeutende Rolle von Faktor XIII, nicht nur betreffend der Organisation eines Hämatoms durch die nach 12 bis 24 Stunden einwandernden Fibroblasten, Kapillarendothelien und Entzündungszellen, sondern besonders in der Regulation der Bindegewebe-Genese im Allgemeinen und der Callus-Entstehung im Speziellen.

#### 4.3.2. Experimentelle Erkenntnisse hinsichtlich der Osteoinduktivität von Faktor XIII

Mehrfach wurde die Entstehung von Pseudoarthrosen mit Faktor-XIII-Mangel in Verbindung gebracht. THIES et al. (1981)<sup>201</sup> beschreibt eine signifikante Häufung von Faktor-XIII-Mangel in seinem Patientengut mit Frakturkonsolidierungsproblemen. So erschien es sinnvoll, näheres über die Rolle des Gewebefaktors auf die Knochenheilung

zu erfahren und die Wirksamkeit einer Substitutionstherapie in solchen Fällen zu untersuchen.

*In vitro* wurden in Kulturversuchen von Osteoprogenitorzellen bereits Ergebnisse erzielt, die für einen ähnlichen Einfluß von Faktor XIII auf die Osteoblastenvorläufer sprechen wie auf Fibroblasten<sup>202</sup>. PRINCE et al. (1991)<sup>203</sup> beschreiben, daß Osteopontin als Substrat sowohl einer Lebertransglutaminase wie auch von Faktor XIII dient und somit eine Rolle in der Knochen-Homöostase spielen könnte.

Bereits mehrere Forschergruppen setzten sich mit dem Einfluß von Faktor XIII auf die Osteogenese in *tierexperimentellen Studien* auseinander.

BENFER et al. (1977)<sup>204</sup> stellten am 7. Tag nach Tibiafraktur bei Faktor-XIII-behandelten Ratten eine fast doppelte Bruchfestigkeit fest. Die Differenz nahm bis zum 42. Tag kontinuierlich ab.

Ähnliche Ergebnisse erzielten CLAES et al. (1984)<sup>205</sup> bei Osteotomieversuchen mit Schafen, die prä-, direkt postoperativ und an den Tagen 3, 5, 7 und 9 mit 1250 I.E. Faktor XIII systemisch behandelt wurden. Hierbei wurden biomechanische Versuche an den Präparaten durchgeführt, die Mineraldichte radiographisch bestimmt, polychromsequenzmarkierte und nach Trichrom-Goldner gefärbte histologische Präparate histomorphologisch ausgewertet, sowie die Plasmaspiegel bestimmt. Dabei zeigten die Präparate der Faktor-XIII-behandelten Schafe eine höhere Reißfestigkeit, sowie einen höheren Elastizitätskoeffizienten. Auch die radiographisch bestimmte Mineralisationsdichte war signifikant höher. Dies korrespondierte histologisch mit einer erhöhten Zahl an Osteonen, welche in der ersten und vierten Woche gebildet wurden, die zwischenzeitlich gebildeten Osteone unterschieden sich nicht zahlenmäßig. Die Zahl der den Osteotomiespalt kreuzenden Osteone war, vergleichbar mit der vorliegenden Studie, bei der Faktor-XIII behandelten Gruppe ebenfalls erhöht und korrelierte mit den Ergebnissen der biomechanischen Ergebnisse. Die Kontrollgruppe wies keinen Faktor-XIII-Abfall im Gegensatz zur vorliegenden Studie auf, was auf den fehlenden Effekt der dauernden Distraction dieses Versuches zu erklären wäre.

GERNGROSS et al. (1981)<sup>206</sup> untersuchten in einem 24 Schafe umfassenden Tierversuch den Einfluß von Faktor XIII, Fibrinkleber und Calcitonin auf autologe Spongiosa-Transplantate in Kortikalis-Bohrlöchern. Hierbei wurden einmalig *lokal* 0,5 ml eines Faktor-XIII-Konzentrats (62,5 I.E./ml), also ca. 31 I.E. angewandt. Zusätzlich wurde ein Teil dieser Tiere systemisch in der ersten Woche täglich mit 1250 I.E. Faktor XIII behandelt (In dem vorliegenden Versuch wurden 10 mal 160 I.E. Faktor XIII lokal an jede Distraktionszone gegeben). Dabei wurde die Bildung verkalkten Osteoids



mittels polychromer Sequenzmarkierung in der 2., 4. und 9. Woche, sowie histomorphometrisch die gesamte Menge an verkalktem Osteoid ermittelt. Dabei erwies sich das reine Spongiosa-Transplantat der lokal mit Faktor XIII, Fibrinkleber und beidem behandelten Spongiosa in der Knochenbildung überlegen. Allerdings zeigte sich in dieser Gruppe ein signifikanter Effekt der systemischen Faktor-XIII-Behandlung auf die Osteogenese. Calcitonin führte, systemisch gegeben, zu einer Verschlechterung der Knochenheilung. Die Sequenzmarkierung brachte eine vermehrte Bildung von Osteoid in der lokal mit Fibrinkleber behandelten Gruppe schon in der 2. Woche zu Tage, während Faktor-XIII-lokal-behandelte und reine Spongiosa-Transplantate vergleichbare Bildungsraten erst in der 4. Woche aufwiesen. Dieser Versuch bestärkt also die systemische Wirkung von Faktor XIII auf die Osteogenese. Die einmalige lokale Gabe von Faktor XIII war in diesem Fall zudem sehr niedrig dosiert und mag in ihrer Aussagekraft in Frage gestellt werden.

An Bohrloch-Untersuchungen über die Knochenheilung von Rattenfemora konnte von CLAES et al. (1987)<sup>207</sup> gleichsam ein positiver Effekt von Faktor XIII auf die Osteoblastenzahl wie die Knochenbildung festgestellt werden.

KIENAPFEL et al. (1995)<sup>208</sup> verglich in einem Tierexperiment Knocheneinwuchsverhalten und Festigkeit von in Schafshumeri eingesetzten Titanimplantaten bei systemischer Gabe von rekombinantem und plazentarem Faktor XIII gegenüber einer Kontrollgruppe. Hierbei erwiesen sich Implantatstabilität und Volumen des eingewachsenen Knochens bei beiden Gruppen der Faktor-XIII-behandelten Tiere gegenüber der Kontrolle als höher.

HELLERER et al. (1980)<sup>209</sup>, die ähnliche Versuche mit Ratten wie BENFER et al. (1977)<sup>204</sup> durchführten, konnten keinen Effekt von Faktor XIII auf die Knochenheilung feststellen. Hierbei wurden jeweils 40 Tiere osteotomiert (sekundäre Knochenheilung), teilkortikotomiert (primäre Knochenheilung) und operiert ohne Knochenbeeinträchtigung. Der Hälfte jeder Gruppe wurden täglich systemisch 0,2 ml einer Faktor-XIII-Lösung nicht angegebener Konzentration, bzw. Aktivität injiziert. Die Knochenbildung wurde radiographisch und szintigraphisch am 20. Tag bestimmt, an dem vorangegangene Versuche ein Maximum an Umbaurate in der sekundären Knochenheilung gezeigt hatten. Die fehlende Wirksamkeit wird hier mit den schon optimal wirkenden physiologischen, endogenen Spiegeln erklärt, indem Hellerer postuliert, daß nur Faktor-XIII deprimierte Patienten einer Substitution bedürfen. Faktor-XIII-Plasmaspiegel wurden hingegen nicht bestimmt, wodurch bei der langdauernden und hochdosierten Gabe humanen Faktor-XIII eventuelle Abfälle oder Antikörperbildung nicht kontrolliert werden konnten. Zudem sind radio- und

szintigraphische Untersuchungen unpräziser als histomorphometrische Messungen. Somit muß die Aussage dieser Studie kritisch überdacht und ggf. revidiert werden.

#### 4.4. Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegende Studie sollte die lokale Anwendbarkeit von Blutgerinnungsfaktor XIII mit dem Ziel der Osteoinduktion am Modell der Verlängerungsosteosynthese des Kaninchenfemurs untersuchen. Zur Kontrolle der Faktor-XIII-Resorption in den Blutkreislauf wurden Plasmaaktivitätsbestimmungen vorgenommen. Die Wirkung auf das Distraktionsregenerat wurde mittels mehrerer Parameter evaluiert. Die Ergebnisse sollen im Folgenden der Übersicht wegen einzeln diskutiert werden.

##### 4.4.1. Der Abfall der Faktor-XIII-Plasma-Spiegel während der Distraction

Die Distraction während der Verlängerungsosteosynthese stellt in dem sich neu bildenden Callus eine ständige Mikrotraumatisierung dar. Kaum beginnt der Abbau und die bindegewebige Organisation des Fibringerinnsels, wird das Gefüge wieder durch die Dehnung der Callotaxis mikrotraumatisiert, ein neues zentrales, interzelluläres Hämatom induziert. Während der dauernden Vernetzung des Fibringerinnsels wird stetig Faktor XIII verbraucht. Geschieht dies exzessiv wie im vorliegenden Fall, müßte ein Abfall des zur Verfügung stehenden Faktor-XIII-Vorrates im Blut zu verzeichnen sein. Genau dies sieht man hervorragend an den Plasma-Spiegeln der Kontrollgruppe L 0. Die tägliche Distraction korreliert mit einem Faktor-XIII-Abfall von anfänglich 167 % d. N. auf 103 % d. N. (siehe Seite 108, Abbildung 69). Dies entspricht einer relativen Abnahme von 38 % der Ausgangswerte. Ein derart lang andauernder Abfall ist allein als Folge der Operation nicht zu erklären, der 'physiologische', postoperative Abfall wird von BURCHARDT et al. (1978)<sup>210</sup> und REDING et al. (1982)<sup>211</sup> beim Menschen auf 3-6 Tage veranschlagt. Die klinische Faktor-XIII-Studie von GERNGROSS (1987)<sup>42</sup> stimmt mit diesen Angaben überein. In dem Osteotomieversuch am Schaf durch CLAES et al. (1984)<sup>207</sup> kommt es in der Kontrollgruppe durch die stabile Plattenosteosynthese zu keinem Abfall des physiologischen Faktor-XIII-Spiegels. Dies läßt also die Schlußfolgerung zu, daß im Organismus während der Poly-Mikrotraumatisierung der Verlängerungsosteosynthese (in Widerspruch zu seiner Rolle als Enzym, einem biologischem *Katalysator*) ein Verbrauch von Faktor XIII zu erwarten ist. Zu den möglichen Abbau-Ursachen siehe Abschnitt 4.3. ('Faktor XIII').

##### 4.4.2. Verhalten der Faktor-XIII-Plasma-Spiegel unter der lokalen Applikation von Faktor XIII

Der vorliegende Versuch sollte die Praktikabilität und Wirkung einer lokalen Applikation von Faktor XIII studieren. Um die Anflutung im Blutkreislauf nach lokaler

Gabe und damit die systemische Wirkkomponente zu kontrollieren, wurden die Plasma-Spiegel an Faktor-XIII gemessen. Das Ergebnis war in doppelter Hinsicht überraschend. Anfänglich steigen die systemischen Faktor-XIII-Spiegel im Gegensatz zur Kontrollgruppe von 184 % d. N. (vor der Operation) auf 209 % d. N. an Tag d 4 an. Es liegt ein relativer Anstieg von 114 % des Ausgangswertes vor. Die Spätwerte ergeben jedoch einen jähen Abfall der Plasma-Aktivität. An Tag d 14 ist der Spiegel um 95 % des Ausgangswertes auf 10 % d. N., an Tag d 20 um 94 % auf 11 % d. N. gefallen (siehe Seite 108, Abbildung 68).

Der primäre Anstieg ist mit einer Aufnahme des Wirkstoffes in den Blutkreislauf zu erklären. Dies vermindert zwar die Trennschärfe der Ergebnisse gegenüber der Parallelstudie zur systemischen Gabe (BRÄUER 1995)<sup>59</sup>, doch ist damit zu rechnen, daß die lokale Wirkung überwiegen dürfte. In der erwähnten Parallelstudie wurde den Tieren einer Verumgruppe unter sonst exakt gleichen Versuchsbedingungen die gleiche Menge Faktor XIII, jedoch intravenös verabreicht. Die hoch signifikant ( $\alpha=0,01$ ) höheren Spiegel der systemischen Applikationsgruppe von 150 bis 200 % beweisen, daß nicht der gesamte Teil des lokal applizierten Faktors in den Kreislauf resorbiert wurde (siehe auch Seite 111, Abbildung 72). Betrachtet man die Pharmakokinetik an einem Mehrkompartimente-Modell, so ergibt sich das 'Lokalkompartiment' direkt im Verlängerungssegment, von wo aus der Wirkstoff in das umliegende Gewebe diffundiert und über einsprossende Kapillaren in den Blutkreislauf, dem zweiten Kompartiment aufgenommen wird. Das dritte Kompartiment mögen periphere Wirkorte und natürlich auch 'rückwirkend' das Callusgewebe sein. Über das Diffusionsverhalten von Faktor XIII in Wundgewebe oder Blutgerinnsel liegen keine Informationen vor. Von Fibronektin, einem 450.000 Dalton, also etwas größerem Protein-Dimer, wird jedoch ein erstaunliches Diffusionsvermögen, nahe dem in Wasser, berichtet<sup>178</sup>. Da das Verteilungsvolumen des ersten Kompartiments sehr viel kleiner als das des zweiten, dem Blutkreislauf, ist und alle zwei Tage appliziert wurde, ist davon auszugehen, daß die lokale Konzentration an Faktor XIII im Callusgewebe sehr viel höher ist, als in den übrigen Kompartimenten. Zudem wird sicher auch ein Teil des Wirkstoffes durch Gewebeeiweißbindung an Fibrin<sup>160</sup>, bzw. Fibrinogen<sup>212</sup> am Wirkort gehalten. Damit ist zu rechnen, daß auch der Hauptanteil der Faktor-XIII-Wirkung dem lokalen Effekt zuzuschreiben ist. Der Einwand, Faktor XIII sei ein Plasmaprotein und somit nur systemisch wirksam ist zu entgegnen, daß primär in der Mikrotraumatisierungszone des Distraktionssegmentes kein Blutkreislauf besteht, vielmehr Blut aus den verletzten Kapillaren exsudiert und somit, sei es über das Plasma direkt oder die sich im Koagel verteilenden Thrombozyten und Histiozyten, Faktor XIII im Interstitium wirksam wird. Es bliebe sich also gleich, ob der Wirkstoff aus verletzten Gefäßen oder einem direkt an die Wundzone angebrachten Katheter in das Wirkgebiet diffundiert. Die Arbeit von

CARMASSI (1991)<sup>213</sup>, welche die durch Faktor XIIIa katalysierte Stabilisierung eines subcutan bei Mäusen eingebrachten Fibringerinnsels untersucht, bestärkt die Ansicht, daß Faktor XIII auch extravaskulär, d. h. interstitiell wirksam ist.

Der sekundäre Abfall ist lediglich mit Hypothesen zu erklären. Da der Spiegel gegen Ende deutlich unter den korrespondierenden Werten der Kontrollgruppe zu liegen kommt, also 'subphysiologisch' wird, ist der Abfall nicht damit zu erklären, daß Faktor XIII nicht mehr in den Blutkreislauf gerät. Es liegt vielmehr ein massiver Verlust auch an Kaninchen-eigenem Faktor XIII vor. Die mir am wahrscheinlichst erscheinende Hypothese findet ihre Erklärung in der Bildung von Antikörpern gegen das *humane* Faktor-XIII-Konzentrat, welche kreuzreaktiv ebenfalls den tierischen Faktor XIII des Kaninchens inaktivierten. Dies müßte sich gleichermaßen auf die Konzentrationen im Blut, wie auch auf die Konzentrationen im von immunologisch kompetenten Zellen reichen Granulationsgewebe des Callus auswirken. Denkbar wäre eine (humorale) Immunreaktion des Types III nach Coombs und Gell in Form einer chronisch-subklinisch ablaufenden Arthus-Reaktion, bzw. Serumkrankheit durch systemisch resorbierten Faktor-XIII. Der lokal zugeführte, humane Faktor XIII stellt per se ein Antigen dar und könnte durch ihn phagozytierende Zellen des MPS zusätzlich an deren Oberfläche - antigen noch wirksamer - exprimiert und B-Lymphozyten dargeboten werden. Die nun einsetzende spezifische, aber auch kreuzreaktive, d. h. auch Kaninchen-Faktor-XIII-antigenspezifische IgM- und IgG-Antikörperbildung wäre nun in der Lage, sukzessiv zu einer Immunkomplexbildung mit systemisch vorhandenem Faktor XIII im Sinne einer Serum-Krankheit, bzw. mit lokal gegebenem Faktor XIII im Sinne einer Arthus-Reaktion zu führen. Dabei würden nach und nach der Wirkstoff abgefangen und unwirksam gemacht. Das Fehlen der Akutizität der klassischen Arthus-Reaktion, bzw. Serumkrankheit erklärt sich aus der Tatsache, daß keine vorherige Sensibilisierung gegen humanen Faktor XIII stattgefunden hatte, diese vielmehr beinahe parallel zur Immunkomplexbildung abläuft. Dieses Annahme konnte leider nicht bestätigt werden, da die Plasmaproben während eines Betriebsunfalles der Behringwerke AG verbrannten und nachträglich keine Antikörper gegen Faktor XIII nachgewiesen werden konnten.

Eine weitere Hypothese bildet die Vorstellung, daß der im Überschuß gegebene Faktor XIII die Expression des ihn kodierenden Gens blockierte und somit die Synthese des Kaninchen-Faktor XIII zum Erliegen kam. Dies setzt eine systemische, supraphysiologische Anflutung des Fremdwirkstoffes voraus, wie sie bis Tag d 4 gegeben war. Den Abfall um 95 %, also auf 5 % des Ausgangswertes erklärt diese Hypothese jedoch nicht. Der Anstieg bis Tag d 4 um 114 % des Ausgangswertes (additiv 14 %) ist ausschließlich auf die Gabe fremden Faktor XIII zu erklären. Unter

der bis zum Ende alle zwei Tage erfolgenden Applikation und bei gleichbleibender Kinetik wäre also auch bei Totalausfall der Faktor-XIII-Synthese des Kaninchens an Tag d 14 und 20 ein Faktor-XIII-Spiegel von mindestens diesen 14 %, und nicht nur 5, bzw. 6 %, des Ausgangswertes zu erwarten. Mit anderen Worten, der humane Faktor XIII muß ebenfalls in Mitleidenschaft gezogen worden sein.

CLAES et al. (1984)<sup>205</sup> bestimmten die Plasma-Spiegel an Faktor XIII während eines 28 tägigen Osteotomieversuchs an Schafstibien, in dem sie insgesamt 7 mal in den ersten neun Tagen jeweils 1250 I. E. humanen Faktor XIII (Fibrogammin®) i. v. gaben. Verglichen mit der vorliegenden Studie, in der 10 mal über 21 Tage jeweils 320 I. E. Faktor XIII lokal appliziert wurden, erscheint diese Dosierung sehr viel höher. Bis zum 9. Tag stiegen analog zur vorliegenden Studie die Faktor-XIII-Spiegel bis auf ca. 250 % der Normaktivität an. Hiernach fielen die Spiegel konstant ab, um ab Tag 21 einen leicht subphysiologischen Wert von 110 bis 117 % d. N. bei einem dem Schaf spezifischen Normbereich von 120 bis 150 % d. N. zu erreichen. Am 14. Tag o. p. lagen die Spiegel immer noch bei etwa 175 % d. N., obwohl seit 5 Tagen kein Faktor mehr gegeben wurde. Diese Ergebnisse weisen im Gegensatz zu der vorliegenden Studie nicht auf einen Wirkstoffverbrauch durch etwaige Antikörper trotz höherer, über einen etwas kürzeren Zeitraum applizierter Dosen hin. Sollte die lokale Gabe von humanen Plasmaproteinen sensibilisierender wirken, als deren systemische Gabe? Bei topisch angewandtem Penizillin z. B. ist die höhere Sensibilisierungsgefahr gegenüber der systemischen Gabe hinlänglich bekannt.

Berechnet man nun - nur der Anschauung wegen - die Mittelwerte der Plasmawerte der beiden Gruppen über die gesamte Zeit, erhält man für die Verumgruppe einen Wert von 122 % d. N, für die Kontrollgruppe einen *höheren* Wert von 142 % der Norm. Zieht man die verschiedenen Zeitabschnitte der Plasmaspiegel-Bestimmungen mit in die Betrachtung, so läßt sich feststellen, daß die Kontrollgruppe zwar in der letzten Woche deutlich höhere Werte aufweist als die Verumgruppe, letztere jedoch in den ersten Tagen des Versuches ansteigende und höhere Werte annimmt. Könnte man nachträglich den Einfluß des gesteigerten Faktor-XIII-Einflusses der ersten Tage evaluieren, wäre trotzdem eine differenziertere Auswertung möglich. An den histologischen Präparaten läßt sich nun eine Aufteilung in Zeitzonen postulieren. Die vom Knochenmark und dem Periost einsprossenden Gefäße und Zellen organisieren das Blutgerinnsel, während durch die tägliche Distraction an dem locus minoris resistentiae, nämlich dem noch nicht organisiertem Hämatom, das Distractionssegment immer wieder in der Mitte aufgebrochen wird. Somit kommt Tag d 8, dem ersten Tag, an dem eine Distraction erfolgte, direkt an den Kortikalisenden und Tag 21 in der Mitte des Präparates zu liegen (siehe Abb. 90). Die in der Abbildung dargestellten Linien geben natürlich nicht die

geometrisch exakten Verläufe der Zeitabschnitte wieder, sondern lediglich deren wahrscheinlichsten, ungefähren Verlauf. Dieser Sachverhalt wird durch Studien von HAUCH et al. (1992)<sup>214</sup> experimentell bestätigt, die an durch Callotasis verlängerten Schafstibien eine polychrome Fluoreszenzmarkierung vorgenommen hatten. Hierbei wird auf einer Mikrophotographie ein recht linearer Grenzverlauf der Zeitzonen ähnlich der unteren Abbildung 90 sichtbar.

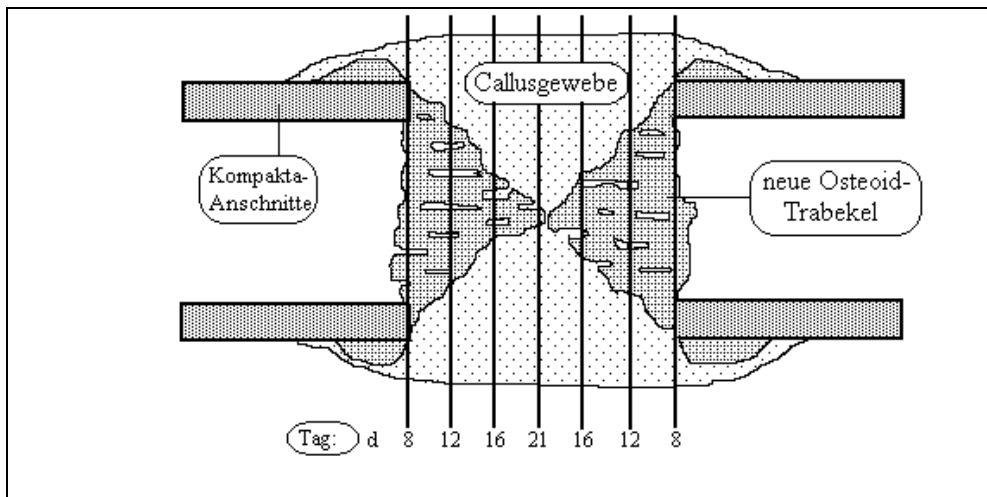


Abbildung 90: Zeitzonen des Distraktionssegmentes

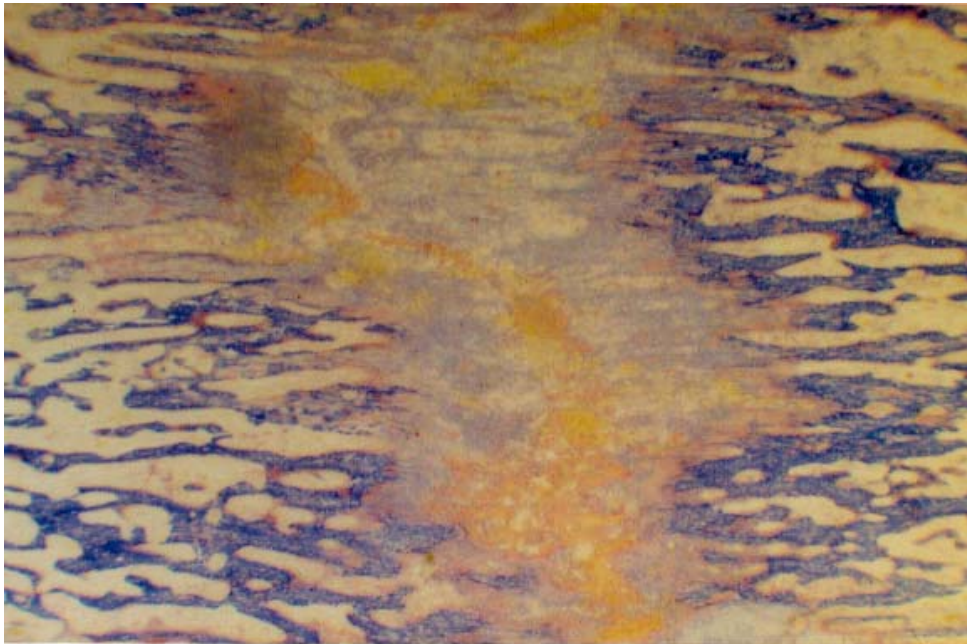


Abbildung 91: In Analogie zum obigen Zeitzonenmodell zeigt sich das Präparat in naturam. Deutlich und recht linear zeichnen sich die verschiedenen Zonen der Osteogenese ab. Mittig findet sich das Hämatom (gelb), der rötlich-orange Rand wird durch Fibrin gebildet. Ihm anliegend findet sich hellblau die Proliferationszone, gebildet aus blaues Kollagen bildenden Osteoprogenitorzellen, Osteochondroblastensäulen, ebenfalls hellblau, dann die Mineralisationszone, in der der rote Saum unmineralisierten Osteoids in mineralisierte, dunkelblaue Primärtrabekel umschlägt. (Carstairs, 20 fache Vergrößerung, Präparat L0/9 li)



Bei der Auszählung kamen verschiedene Vorgehensweisen zum Einsatz (vergleiche Kap. 2.13.). Das Verfahren, das die Meßrahmen entlang der Diagonalen (siehe Seite 84, Abb. 35) bestimmte, setzte in diesem Zusammenhang einen Querschnitt über die verschiedenen Zeitzonen des Präparates. Die beiden anderen Methoden hingegen, bei denen Orthogonalen mittig (siehe Seite 90, Abb. 42) und die Kortikalisenden berührend (siehe Seite 89, Abb. 41) zur Ausrichtung der Meßrahmen gewählt wurden, ergaben 'zeitspezifische' Werte. Erstere Messung ergab den Zustand, wie er, respektive der Breite der Meßrahmen ca. seit der letzten Distraction an Tag 20 vorlag. Diese Auszählung wurde nur bei der 'Kollagen-Flächen-Bestimmung' angewandt, welche keinen signifikanten Unterschied ergab. Die Methode der die Kortikalis berührenden Orthogonalen wurde bei der Osteoblastenzählung, die jedoch als Meßparameter aufgrund der hohen Standardabweichung sicherlich nicht sehr präzise ist, und bei der Bestimmung des Verhältnisses von verkalkter zu unverkalkter Osteoidstruktur angewandt. Hier wird das älteste Zeitsegment, die Tage d 8 bis 21 umfassend ausgewertet, welches noch unter dem Einfluß eventuell höherer Faktor-XIII-Spiegel stand.

#### 4.4.3. Der Unterschied der Flächenanteile des verkalkten zu denen des unverkalkten Osteoids

In diesem 'zeitspezifischen Meßparameter', der Oberflächenanteile der verkalkten zur unverkalkten Osteoidstruktur in Bezug setzt, zeigte sich in der Verumgruppe ein vermehrter Anteil von verkalktem Osteoid am gesamten Osteoid (siehe Seite 100, Abbildung 55). Da dies jedoch nur einen Verhältniswert darstellt und, im Gegensatz zum Parameter Volumendichte (Kapitel 3.3, Seite 98), keine Aussage über das Gesamtvolumen an verkalktem Osteoid zuläßt (es wurde nicht auf das gesamte Meßfeld bezogen!), bleibt die Interpretation offen, ob es sich um einen absolut vermehrten Anteil verkalkter Grundsubstanz der L1-Gruppe handelt, was die Ergebnisse der *zeitunspezifischen* Auszählung aus Kapitel 3.3. im übrigen nicht unbedingt in Frage stellt, oder ob einfach weniger unverkalktes Osteoid in der Verumgruppe vorhanden ist. Die letzte Hypothese wiederum wirft die Frage auf, ob die relativ 'dünnere', unverkalkte Osteoidschicht von einer schnelleren Mineralisation herrührt oder auf eine verminderte Grundsubstanz-Synthese zurückzuführen ist.

Ersteres erschiene unter der Annahme plausibel, daß trotz der nur unsignifikant höheren Werte der Verumgruppe in der zeitunspezifischen Messung der Volumendichte an verkalktem Osteoid (Kap. 3.3., Seite 98, Abbildung 49), unter der Lupe der zeitspezifischen Auszählung, welche die frühen Tage höherer Faktor-XIII-

Konzentrationen erfaßt, zunächst doch eine vermehrte Mineralisation der Verumgruppe festzustellen ist, die eventuell durch die höheren Faktor-XIII-Spiegel der Kontrollgruppe der späten Tage im zeitlichen Durchschnitt egalisiert wird. Die Annahme der verminderten Produktion unverkalkten Osteoids ist unwahrscheinlich, da eine verminderte Synthese an Knochengrundsubstanz ebenfalls eine insgesamt verminderte Volumendichte an verkalktem Osteoid nach sich ziehen müßte, was aufgrund Kapitel 3.3. nicht der Fall ist. Zusammenfassend ist somit eine vermehrte Kalzifizierung der Grundsubstanz in den frühen Tagen, welche noch unter unvermindertem Faktor-XIII-Einfluß standen, zu postulieren.

#### 4.4.4. Unterschiede in der Ausrichtung der verkalkten Osteoidtrabekel

Die während der Messung der Volumendichte an verkalktem Osteoid bestimmte Anisotropie der neugebildeten Trabekel (siehe Kap. 3.3.1., Seite 106, Abbildung 67) ergab einen signifikanten Unterschied im U-Test nach MANN-WHITNEY für unabhängige Stichproben (bei zweiseitiger Testung und  $\alpha=0,05$  ergibt sich  $U=33$ ), während die Volumendichte des verkalkten Osteoids wie oben beschrieben gleich bleibt (siehe Seite 98, Abbildung 49). Die Anisotropie ist, wie oben schon erwähnt von der Ausrichtung, der Zahl und der Grazilität der Trabekel abhängig. Bei gleicher Volumendichte an verkalktem Osteoid (über den Gesamtzeitraum gesehen) spricht dies demnach für eine stärkere Längsausrichtung oder/und grazilere Struktur der Trabekel. Gegen letztere Annahme spricht das Ergebnis der Umfangdichtenmessung, welche ebenfalls im gleichen Meßvorgang bestimmt wurde. Werte kleiner als 1 bedeuten also hier eine Tendenz zur Längsausrichtung, größer als 1 eher zur Querausrichtung. Eine stärkere Längsausrichtung der Trabekel ohne Faktor-XIII-Einfluß wäre jedoch auch erstaunlich, da man dies doch eher mechanischen Faktoren der Distraction zuschreiben möchte. PISTOR (1992)<sup>58</sup> beschreibt jedoch in seiner Dissertation eine grazilere Ausprägung der Trabekel ohne Faktor-XIII-Einfluß. CLAES (1984)<sup>207</sup> beschreibt eine Erhöhung der den Osteotomiespalt kreuzenden Osteone bei Osteotomieversuchen an Schafen unter systemischem Faktor-XIII-Einfluß und die damit korrelierende höhere Reißfestigkeit der Regeneratzone. Die Ausrichtung der Trabekel vollzieht sich wahrscheinlich in der Frühphase der Knochenbildung, wenn die Vorstufen des Callusgewebe, wie Fibringerinnsel und bindegewebiges Granulationsgewebe, noch ausreichend formbar und elastisch sind. Die Hauptzahl der schon verkalkten, alten Trabekel kommt in der frühen Zeitzone vom 8. Tag an zu liegen (siehe Seite 144, Abbildung 90), wodurch ein sonst durch den 'Antikörper-effekt' maskierter Effekt von Faktor XIII in diesem Fall eventuell doch zum Tragen kommt. Eine stärkere

Mineralisation in diesen Tagen unter erhöhtem Faktor-XIII-Einfluß, wie sie auch aus dem Ergebnissen in 4.3. (Diskussion der erhöhten Mineralisationsrate der Faktor-XIII-behandelten Gruppe) geschlossen wird, wirkt sich hier eventuell hemmend auf die mechanische Verformbarkeit der Trabekel aus, da diese schon früher mineralisiert sind. Hierdurch wäre eine verminderte Ausziehung der Trabekel unter der Distraction und somit die geringere Längsausrichtung zu erklären.



*Abbildung 92: Trabekelstruktur der Kontrollgruppe. Die Ausrichtung der langgestreckten Trabekel in Distractionsrichtung ist gut erkennbar. Viele, filigrane, in Distractionsrichtung verlaufende Trabekel ergeben eine kleinere, gegen 0 strebende Anisotropie. (Kossa, 10 fache Vergrößerung, Präparat L0/14 re)*



Abbildung 93: Trabekelstruktur der Verumgruppe. Die Trabekel erscheinen blasiger und weniger ausgerichtet, als in Abbildung 92. Weniger, nicht ausgerichtete, klobigere Trabekel streben in ihrer Anisotropie gegen 1. (Kossa, 10 fache Vergrößerung, Präparat L1/4 li)

#### 4.4.5. Betrachtungen über die Diffusion von Faktor-XIII im Callusgewebe

Da weder ein signifikanter Unterschied in der zeitunspecifischen Messung der Volumendichte zwischen Kontroll- und Verumgruppe der Zentralebene, noch der katheternahen Ebene, noch im Vergleich der beiden Ebenen einer Gruppe nachzuweisen war, läßt sich hier keine Aussage über die Diffusion oder einen Diffusionsgradienten von Faktor XIII treffen. Zwar lassen die vergleichbaren Werte der Verumgruppe in der zentralen und der katheternahen Ebene die Vermutung zu, der Wirkstoff habe sich homogen verteilt, die mangelnde Abgrenzbarkeit der Werte gegenüber der Kontrollgruppe führt diese Annahme jedoch ad absurdum.

#### 4.4.6. Zahl der Osteoblasten (Deckzellen) auf den Trabekeln (Osteblastenumfang)

Die Zahl der Osteoblasten auf den Trabekeln in der frühen Zeitzone ab Tag 8 unterscheidet sich in den beiden Gruppen nicht signifikant (siehe Seite 102, Abbildung 58). Dies spricht nicht für einen proliferativen oder migationsfördernden Effekt von Faktor XIII. Dem entgegengesetzt ist, daß die Trabekel beider Gruppen allein durch den Reiz der Distraction und fortdauernden Mikrotraumatisierung schon maximal mit

Osteoblasten besetzt sind und keine weitere Steigerung der Zelldichte zulassen (siehe Abbildung 94).

Nicht dagegen wird etwas über die Synthese-Aktivität der Osteoblasten ausgesagt, womit dieses Ergebnis nicht der angenommenen beschleunigenden Wirkung auf die Mineralisation widerspricht.



*Abbildung 94: Osteoblasten, welche als 'Deckzellen' die Trabekel besetzen, beachte den dichten Besatz! Am oberen Bildrand sind drei Osteoklasten zu sehen, noch nicht in Kontakt zur Trabekeloberfläche, erkennbar an der Mehrkernigkeit und der gegenüber den Osteoblasten intensiveren roten Färbung des Zytoplasmas. Im intertrabekulären Gewebe besteht eine reiche Kapillarisation. (Trichrom-Goldner, 200 fache Vergrößerung, Präparat L1/4 li)*

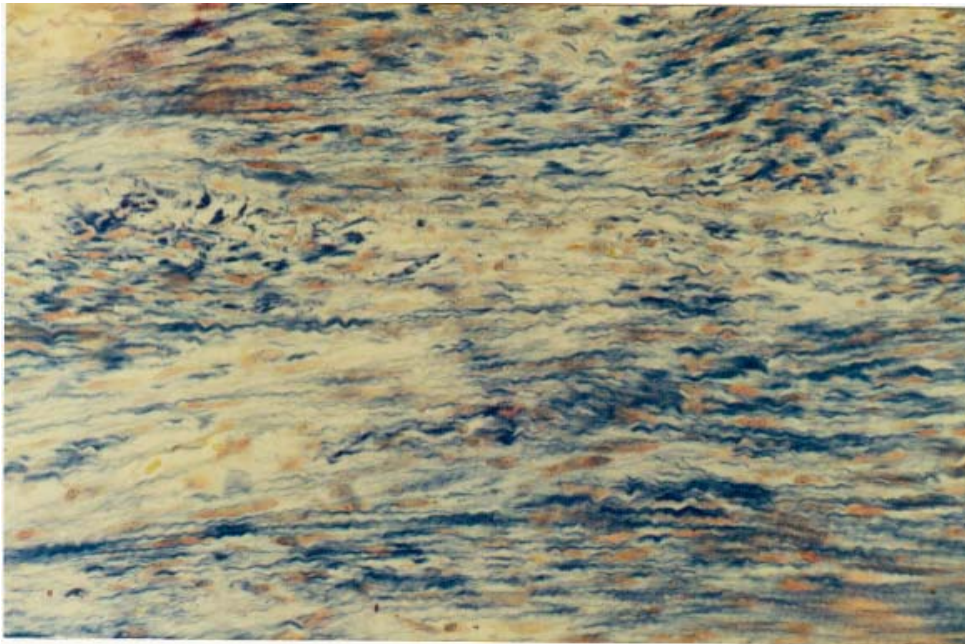
#### 4.4.7. Geometrische Komplexität (Umfangdichte) der Trabekel

Das Verhältnis von Umfang zu Flächeninhalt der Trabekelanschnitte unterschied sich im Mittel der beiden Gruppen nicht (siehe Seite 103, Abbildung 61). Auch hier wiederum ist anzumerken, daß die Auszählung 'zeitunspezifisch', in der gleichen Meßsituation wie die Volumendichte- und die Anisotropiebestimmung erfolgte, und eventuell durch eine Evaluation in der Frühphase des Experimentes unter wenigstens partiellen Ausschluß der Antikörperbildung andere Werte ergeben könnte. Wie schon erwähnt, ging PISTOR (1992)<sup>58</sup> von einer Wirkung von Faktor XIII auf die Verzweigkeit und Grazilität der Trabekel aus, insofern, als daß die Trabekel unter Faktor-XIII-Einfluß kräftiger erscheinen. Dies würde die Hypothese der Ausbildung

stärkerer Trabekel durch beschleunigte Mineralisation in der Frühphase dieses Experimentes unter erhöhtem Faktor-XIII-Einfluß bestärken.

## 4.4.8. Flächenanteil an Kollagenfasern

Die Auszählung der Flächen, in denen in der Carstairs-Färbung sehr gut die gewellten Kollagenfasern zu sehen waren, erstreckte sich entlang einer die Distraktionszone in zwei gleiche Hälften teilenden Orthogonalen zur Femurlängsachse. Somit erfaßte man ungefähr den Zeitbereich seit der letzten Distraction, also in dem Zeitbereich um den 20. und 21. Tag. Das Stadium des Fibrinabbaus und der Kollagensynthese zum Aufbau eines Granulationsgewebes ist spätestens nach einer Woche abgeschlossen, befindet sich also in diesem Zeitbereich in vollem Gange. Die Kollagenfasern färbten sich, von anderen Strukturen abgrenzbar, dunkelblau an.



*Abbildung 95: Die im paramedianen Distraktionszonenabschnitt gelegenen, gewellten, tiefblauen Kollagenfasern heben sich gut gegen die Grundsubstanz und die rot gefärbten, dazwischen liegenden Osteoprogenitorzellen ab. Sie lassen sich über die Berechnung der blauen Flächen in ihrer Dichte semiquantitativ bestimmen. (Carstairs, 200 fache Vergrößerung, Präparat L0/5 re)*

Diese Flächen wurden nun bestimmt und geben indirekt einen Hinweis auf das Volumen an synthetisierten Kollagenfasern. Die Messung ergab jedoch keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen (siehe Seite 104, Abbildung 64), was nicht unbedingt gegen einen Effekt von lokal appliziertem Faktor XIII auf die Kollagensynthese in der frühen Phase der Knochenbildung, nämlich dem Ersatz des

Blutkoagels durch Granulations- und Bindegewebe spricht. Am Tag 20 waren, wie oben besprochen, die Faktor-XIII-Werte der Kontrollgruppe beinahe 10fach höher gegenüber der Verumgruppe. Zudem ist ein Einfluß eventueller Antigen-Antikörper-Komplexe in dieser späten Phase des Experimentes auf die Heilungsvorgänge nicht auszuschließen, was die Diskussion dieser Ergebnisse schwierig macht.

#### 4.4.9. Die Körpertemperatur

Die Kurven der rektal gemessenen Körpertemperatur zeigen vom Aspekt einen leichten Anstieg über den gesamten Zeitraum des Experimentes (siehe Seite 112, Abbildungen 73 und 74). Durch Errechnung eines Korrelationskoeffizienten wurde dies allerdings nicht objektiviert, da es sich nur um eine minimale Änderung handelt. Interessanterweise liegt die Verumgruppe um 0,6 °C im zeitlichen Mittel höher als die Kontrollgruppe (siehe Seite 113, Abbildung 75). Dies möchte ich jedoch nicht Faktor XIII oder einer Antikörperbildung zuschreiben, da auch die mittleren Temperaturwerte vor jeder Manipulation um 0,8 °C differierten.

#### 4.4.10. Das Körpergewicht

Die im Schnitt 213 Gramm leichteren Kaninchen der Verumgruppe (mittleres Ausgangsgewicht 3956 g) nahmen während der Versuchszeit um 21,1 % im Mittel relativ mehr ab als die schwereren Kaninchen der Kontrollgruppe (mittleres Ausgangsgewicht 4169 g), welche um 18,9 % abnahmen (siehe Seite 114, Abbildung 77 und 78).



#### 4.5. Kritik des Versuchsdesigns und Ausblick

Nachdem die osteoinduktive Wirkung bei später Applikation in der Vorgängerstudie (PISTOR 1992)<sup>58</sup> bestätigt werden konnte und klinische Ergebnisse auch die positive Wirkung von früh appliziertem Faktor XIII auf die Knochenheilung zeigten (SCHLENZKA 1993)<sup>43</sup>, wurde im vorliegenden Versuch mit dem Ziel einer optimierten Osteoinduktion eine engmaschigere, kontinuierlichere und früher beginnende Faktor-XIII-Gabe gewählt.

Erstmals wurden bei einem Tierversuch zur Osteoinduktion durch lokal applizierten Blutgerinnungsfaktor XIII die Plasma-Spiegel der Versuchstiere bestimmt. Hier konnte ein bedeutender Abfall der Faktor-XIII-Plasma-Aktivität der Tiere der Verumgruppe ab der dritten Versuchswoche festgestellt werden. Offenbar hatten die Tiere Antikörper gegen das humane Plasmaprodukt gebildet, welche kreuzreaktiv auch die tiereigenen Spiegel senkten. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Studie von CLAES et al. (1984)<sup>205</sup>, der Faktor XIII jedoch i. v. applizierte und von keinerlei vergleichbaren Spiegelabfällen berichtet. Hier kann hypothetisch die lokale Applikation eines allogenetischen Proteins sensibilisierend gewirkt haben, als die systemische. Letztendlich wirft diese Untersuchung erstmalig in der Reihe der Faktor-XIII-Versuche zur Osteoinduktion den Verdacht auf, daß die Gabe von Fremdproteinen eine unerwünschte Immunreaktion der Versuchstiere verursacht.

Somit wird dieses methodisch saubere Ergebnis auch generell für Studien relevant, in denen humane Proteine im Tierversuch erprobt wurden und werden. Im Falle der pharmakologischen Osteoinduktion durch Faktor XIII wurde, bis auf die Arbeiten von CLAES et al. (1984)<sup>205</sup> und die vorliegende, nie die tatsächliche Wirkstoffpräsenz am Erfolgsort geprüft und damit ein gefundener Effekt auch direkt auf den Wirkstoff unter Ausschluß von Nebeneffekten (durch z. B. Antikörper-Antigen-Komplexe oder andere Immunreaktionen) zurückgeführt.

Die perturbierte Situation der Plasmaspiegel in der vorliegenden Studie lassen dadurch keine eindeutigen Aussagen über die lokale Wirksamkeit von Blutgerinnungsfaktor XIII hinsichtlich der Osteoinduktion zu. Nur die Messungen der frühen Zeitzone lassen auf eine bessere Mineralisation des Osteoids schließen. Diese ist in Zusammenhang mit den Ergebnissen der Anisotropie-Messung zu setzen, welche eine kompaktere Ausformung der 'Altrabekel' nahe der Osteotomiefläche der Femoraenden manifestiert.

Auf der anderen Seite ist die Nichtwirksamkeit jedoch ebensowenig durch diesen Versuch belegt. Somit wären zukünftige Untersuchungen mit der gleichen Fragestellung

durchaus wünschenswert, sollten jedoch die Problematik der Gabe eines humanen Proteins an Versuchstieren bedenken. Da die Produktion eines rekombinanten, homologen, speziesspezifischen Faktor-XIII-Proteins, hier des Kaninchens, zu kostspielig oder die Isolierung aus Kaninchenplasma ethisch nicht vertretbar wäre, bleibt nur die Reduktion der Gabe des humanen Faktor XIII, um die vermutete Antikörperbildung zu verhindern oder in Grenzen zu halten. Die Gabe von Immunsuppressiva sind im Hinblick auf Heilungsprozesse, speziell der Osteoinduktion, mit Vorsicht zu bewerten.

Aus Vorab-Ergebnissen der Parallelstudie zur Dosisoptimierung der systemischen Faktor-XIII-Applikation (BRÄUER 1996)<sup>59</sup>, die, ähnlich der vorliegenden, Abfälle der Faktor-XIII-Aktivitäten der Verumgruppen aufweist und somit hinsichtlich der Plasmaspiegelverläufe in direktem Widerspruch zur Studie von CLAES et al. (1984)<sup>205</sup> steht, läßt sich jedoch ein positiver Einfluß von Faktor XIII auf die Produktion verkalkten Osteoids gegenüber der Kontrollgruppe nachweisen, wenn auch die unterschiedlich hoch dosierten Verumgruppen ähnliche Ergebnisse untereinander zeigen. Somit geht diese Studie mit der von BENFER et al. (1977)<sup>204</sup>, CLAES et al. (1987)<sup>207</sup>, CLAES et al. (1984)<sup>205</sup> und PISTOR (1992)<sup>58</sup> konform, was die positive Wirkung des Gerinnungsfaktors auf die Osteoinduktion angeht. Eine tierexperimentelle Überprüfung der lokalen Applizierbarkeit bei geringerer Dosierung und längeren Applikationsintervallen bleibt somit weiterhin interessant. Vor allem die Bestimmung der Osteoidvolumendichte in der frühen Zeitzone ließe dank des vorliegenden Versuchsdesigns selbst bei Immunreaktionen, deren Wirkung etwas später eintritt, die Überprüfung der lokalen Wirksamkeit von Faktor XIII auf die Osteogenese zu. Weitergehende klinische Prüfungen könnten ohne das immunologische Problem über die lokale Anwendung von Faktor XIII entscheiden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die lange Heilungsdauer von Frakturen kann bei der konservativen, wie bei der operativen Frakturbehandlung, falls die Osteosynthese nicht belastungsstabil ist, zu einer erheblichen Atrophie der betroffenen Extremität führen. BENFER<sup>204</sup> ermittelte erstmals 1977, daß durch die Applikation von Blutgerinnungsfaktor XIII eine beschleunigte Osteoinduktion erreicht werden kann.

Physiologischerweise reichern die Thrombozyten primär Faktor XIII im Frakturhämatom an. Nach Resorption des Frakturhämatoms ist die Osteoinduktion limitiert durch die Höhe des Plasmaspiegels. Es wurde daher angestrebt, die lokale Wirksamkeit von Faktor XIII am Callotaxismodell des Kaninchenfemurs zu untersuchen. Vorteile bestehen in höherer lokaler Konzentration bei gleichzeitig niedrigerem systemischem Spiegel.

Bei 24 Chinchilla-Bastard-Kaninchen (Verum- und Kontrollgruppe je 12 Tiere) wurden beide Femora mittels unilateraler Verlängerungsapparate extern gefaßt, zentral osteotomiert und anschließend vom 8. - 20. postoperativen Tag um 0,7 mm/d distrahiert. Jeden 2. Tag wurde über ein subcutan liegendes Intraport-Katheter-System je 40 I. E. Faktor XIII unmittelbar an den Osteotomiespalt appliziert. Am 21. Tag p. o. wurden die Tiere getötet, die Femora entfernt und die Regeneratzone histologisch aufgearbeitet. Die Narkose erfolgte durch Gabe von 1 ml/kg Körpergewicht ROMPUN® i. m. und primär 0,6 ml NEMBUTAL® i. v., welches nach Bedarf nachinfundiert wurde. Die Schmerzbehandlung p. o. erfolgte einmalig durch je 1 ml Metamizol i. m. und i. v..

Die PMME-Kunststoff-eingebetteten, unentkalkten Präparate wurden histomorphometrisch evaluiert, Volumendichte des verkalkten Osteoids in zwei Schnittebenen, Mineralisationsrate, Osteoblastenbesatz, Ausrichtungstendenz und geometrische Komplexität der Trabekel, Flächenanteil des Kollagengewebes in unterschiedlichen Abschnitten der Regeneratzone mittels des automatischen Bildanalysegerätes Quantimet 500+ präzise vermessen. Weiterhin wurden die Faktor-XIII-Plasmaspiegel vor der OP und an Tag 2, 4, 14 und 20 p. o. photometrisch bestimmt (Berichrom®), um die systemische Resorption zu kontrollieren.

Die Plasmaspiegel der Kontrollgruppe an Faktor XIII sanken nach der Operation und während der Distraction durch die kontinuierliche Mikrotraumatisierung, während die der Verumgruppe anfänglich stark stiegen, dann jedoch zwischen Tag 4 und 14 p. o. auf Werte noch weit unter denen der Kontrollgruppe sanken. Dieser Effekt wurde vermutlich durch die Bildung kreuzreaktiver Antikörper gegen das humane Plasmaprotein hervorgerufen.

Somit finden die größtenteils nicht signifikant unterschiedlichen Ergebnisse ihre Erklärung in der Tatsache, daß im zeitlichen Schnitt beide Gruppen ähnlichen Faktor-XIII-Spiegeln ausgesetzt waren. Lediglich zwei Messungen ergaben signifikante Unterschiede: Sich der Korrelation bestimmter Abschnitte des Distraktionssegmentes mit bestimmten Zeitausschnitten der Distraktionsdauer bedienend, wurden die Mineralisationsraten der Osteoidtrabekel in den frühen Versuchstagen unter einer hohen Faktor-XIII-Aktivität bestimmt. Hier zeigte sich eine bessere Mineralisationsrate der Verumgruppe. Die Trabekel der Verumgruppe erscheinen überdies kompakter und weniger parallel zur Zugrichtung als die der Kontrollgruppe. Beide letzten im Test nach MANN-WHITNEY signifikanten Differenzen müssen jedoch im Gesamtkontext kritisch betrachtet werden und bedürfen der experimentellen Überprüfung.

## 6. TABELLEN

### 6.1. Verlaufsberichte

Die Tabellen geben einen stichwortartigen Überblick über die Operation, den Versuchsverlauf und Besonderheiten bei der Explantation. Sie stellt eine Zusammenfassung der täglichen Dokumentation der Operation, des Versuchsablaufes und der Explantation dar. Die Legende erklärt sich folgendermaßen:

|                            |   |
|----------------------------|---|
| OPdatum:                   | Tag d0 (Tag der Operation)  |
| Gewicht:                   | Körpergewicht am Operationstag (ohne Fixateur Externe)                                |
| Dauer:                     | Dauer der Operation   |
| Rompun:                    | Menge in Milliliter an appliziertem Rompun® als Prämedikation                         |
| Nembutal:                  | Menge an dem während der Operation appliziertem Narkotikum Nembutal® (Pentobarbital)  |
| Subst. Vol.:               | Menge an substituierter Kochsalzlösung  |
| Bemerkungen linker Femur:  | Operationsbesonderheiten am linken Femur  |
| Bemerkungen rechter Femur: | Operationsbesonderheiten am rechten Femur   |
| Bemerkungen allgemein:     | Allgemeine Bemerkungen zur Operation  |
| Lokale Gabe:               | Menge an lokal gegebenem Verum oder Placebo, eventuelle Spülungen                     |
| Fehlinjektion:             | Injektionen am falschen Tag oder der falschen Dosis                                   |
| Zus. Zina.:                | Gabe des Antibiotikums in ml. über die standardisierte perioperative Antibiose hinaus |
| Nov.:                      | zusätzliche Gabe des Analgetikums an den aufgeführten Tagen                           |
| Fieb.:                     | Tage, an denen die Körpertemperatur 40 °C überstieg                                   |
| Endgew.:                   | Gewicht an Tag d21 oder d20 in Gramm  |
| Absol. Abn.:               | Gewichtsabnahme während des Versuchs in Gramm   |
| Rel. Abn.:                 | Gewichtsabnahme in Prozent des Ausgangsgewichts an Tag d0 (mit Fixateur Externe)      |

---

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| Li. viel:                     | tropfenweiser Flüssigkeitsaustritt an den Schanzschen Schrauben oder der Hautnaht links an den aufgeführten Tagen.             |
| Li. wenig:                    | geringer Flüssigkeitsaustritt (Ausschwitzten) an den Schanzschen Schrauben oder der Hautnaht links an den aufgeführten Tagen.  |
| Re. viel:                     | tropfenweiser Flüssigkeitsaustritt an den Schanzschen Schrauben oder der Hautnaht rechts an den aufgeführten Tagen.            |
| Re. wenig:                    | geringer Flüssigkeitsaustritt (Ausschwitzten) an den Schanzschen Schrauben oder der Hautnaht rechts an den aufgeführten Tagen. |
| Verlaufs-Besonderheiten:      | ebensolche während des Distraktionsvorganges   |
| Blutabn.:                     | an den aufgeführten Tagen erfolgte Blutabnahme   |
| Eiter links:                  | Eiteransammlungen im Explantationsgebiet am linken Femur   |
| Eiter rechts:                 | Eiteransammlungen im Explantationsgebiet am rechten Femur  |
| Distr. links:                 | Distraktionsstrecke in mm, gemessen am histologischen Präparat der linken Regeneratzone  |
| Distr. rechts:                | Distraktionsstrecke in mm, gemessen am histologischen Präparat der rechten Regeneratzone                                       |
| Explantations-Besonderheiten: | Besonderheiten während der Explantation  |

| Tier  | Geschlecht | OP-datum | Gewicht | Dauer | Rompun | Nembutal | Subst Vol | Bemerkungen linker Femur  | Bemerkungen rechter Femur   |
|-------|------------|----------|---------|-------|--------|----------|-----------|---|---|
| L0/1  | männlich   | 17.05.93 | 3588    | 3,5   | 1      | 3        | 30        | Standardkatheter (2mm)  | Versuchskatheter (3mm)  |
| L0/2  | männlich   | 26.05.93 | 3577    | 3,75  | 1      | 3,5      | 40        | Längsfraktur Spalt-->2.Schraube, Cerclage, Katheter erstmals an 2. Schraube befestigt   | Katheter noch mittels um den gesamten Knochen geschlungenen 2/0 Faden befestigt (wie bei L0/1), Gefahr der Periost-Nekrose?!  |
| L0/3  | männlich   | 27.05.93 | 3737    | 4     | 1      | 5        | 55        | 2. Schraube dorsal des proximalen Femurs gelegen, nach Osteotomie wurde achsenkorrigiert und Schraube gesetzt. Dorsales Klaffen des Osteotomiespaltes | 3. Schraube dorsal des distalen Femurs gelegen, nach Osteotomie wurde achsenkorrigiert und Schraube gesetzt. Klaffen des Osteotomiespaltes wurde durch Aussägen eines keilförmigen Knochenstückes ausgeglichen. Haut-Entlastungsschnitte und -Naht an Schrauben 3,2,1 |
| L0/4  | männlich   | 28.05.93 | 3491    | 2,5   | 1      | 3        | 25        | -   | Wechsel auf Homann-Hebel zur Osteotomie   |
| L0/5  | männlich   | 01.06.93 | 3876    | 2,5   | 1      | 4        | 40        | -   | -   |
| L0/6  | männlich   | 09.06.93 | 4500    | 2     | 1      | 5        | 50        | 2.,3. Schraube sehr knapp dorsal gesetzt, verminderte Stabilität  | -   |
| L0/7  | männlich   | 14.06.93 | 3932    | 3,25  | 1      | 5        | 50        | -   | 2. Schraube brach nach dorsal aus, Knochensplitter mit Schraube an Knochen cercliert  |
| L0/8  | männlich   | 15.06.93 | 3647    | 3     | 1      | 4,5      | 55        | zu weit ventral zu liegen kommende 4. Schraube bricht aus und wurde cercliert   | an 4. Schraube bei Hautnaht leichte Spannung, kein Entlastungsschnitt   |
| L0/9  | männlich   | 21.06.93 | 4337    | 2,5   | 4,3    | 3        | 35        | -   | -   |
| L0/10 | weiblich   | 21.06.93 | 3465    | 2,3   | 3,4    | 2        | 30        | -   | -   |
| L0/11 | weiblich   | 22.06.93 | 3665    | 2,25  | 3,6    | 3,5      | 40        | -   | Während der Osteotomie rutschte die Säge aus und schnitt den Muskel an, Haut über 3-4 cm aufgeschnitten und exkoriiert, Muskel- und Hautnaht  |
| L0/12 | weiblich   | 23.06.93 | 3730    | 2     | 3,7    | 2,5      | 30        | -   | -   |
| L0/13 | weiblich   | 23.06.93 | 4078    | 2,75  | 4      | 3        | 40        | -   | -   |
| L0/14 | weiblich   | 24.06.93 | 3682    | 2,5   | 3,6    | 2,5      | 20        | mit Skalpell in den Muskel geschnitten als Tier unversehens zuckte, genäht  | -   |

Tabelle 1 (Fortsetzung folgende Seite)

|       |          |          |      |      |     |     |    |   |   |
|-------|----------|----------|------|------|-----|-----|----|---|---|
| L1/1  | weiblich | 23.08.93 | 3963 | 2,5  | 4   | 3   | 35 | Abstand zwischen der gegeneinander gekippten 2. und 3. Schraube besonders medial (4 mm) sehr gering, Osteotomie jedoch geglättet  | -   |
| L1/2  | weiblich | 25.08.93 | 3876 | 2    | 3,9 | 5   | 45 | Fixateur kopfüber eingesetzt, Fototermin  | -   |
| L1/3  | weiblich | 25.08.93 | 3910 | 2,75 | 3,9 | 3   | 45 | 'kleine Umstellungsosteotomie':<br>2. Schraube käme dorsal des Knochens zu liegen:<br>- Lockern der 1. Backe<br>- Setzen der Schrauben unter Spannung<br>- Osteotomie und Rotation um ca. 5° um Fixateur-Achse zur Adaptation<br>- Kompression<br>Muskelwunde geringer als rechts | 'große Umstellungsosteotomie':<br>Nach Setzen der 1. und 4. Schraube kämen 2. und 3. Schraube dorsal des Knochens zu liegen:<br>- Osteotomie<br>- Eindrehen der Knochenenden um 1. und 4. Schraube<br>- Setzen der 1. und 3. Schraube<br>- Aussägen des Knochenkeils zur Adaptation, Kompression<br>leichtes Muskeltrauma an Insertion. |
| L1/4  | weiblich | 26.08.93 | 4303 | 1,75 | 4,3 | 3,5 | 45 | -   | 'kleine Umstellungsosteotomie':<br>2. Schraube käme dorsal des Knochens zu liegen:<br>- Lockern der 1. Backe<br>- Setzen der Schrauben unter Spannung<br>- Osteotomie und Rotation um ca. 5° um Fixateur-Achse zur Adaptation<br>- Kompression<br>Muskelwunde geringer als rechts   |
| L1/5  | weiblich | 26.08.93 | 4132 | 2,25 | 4,1 | 3,5 | 40 | Katheter bei Fasziennaht durchstoßen, neuer Katheter, erneute Fasziennaht   | -   |
| L1/6  | weiblich | 27.08.93 | 4205 | 2,25 | 4,2 | 3   | 35 | -   | -   |
| L1/7  | weiblich | 30.08.93 | 3667 | 2    | 3,7 | 2   | 20 | 1. und 4. Schraube etwas locker   | -   |
| L1/8  | weiblich | 31.08.93 | 4160 | 1,75 | 4,2 | 2   | 30 | -   | -   |
| L1/9  | weiblich | 07.09.93 | 3238 | 2    | 3,2 | 2   | 25 | -   | knapp dorsaler Schraubensitz  |
| L1/10 | weiblich | 07.09.93 | 3104 | 1,75 | 3,1 | 2   | 30 | -   | -   |
| L1/11 | weiblich | 08.09.93 | 3162 | 2    | 3,2 | 2   | 25 | -   | -   |
| L1/12 | weiblich | 08.09.93 | 3278 | 2    | 3,3 | 2   | 25 | Arterie proximal des Knies angeschnitten  | -   |
| L1/13 | weiblich | 09.09.93 | 3272 | 2    | 3,3 | 2,5 | 25 | -   | -   |
| L1/14 | weiblich | 15.09.93 | 3353 | 1,75 | 3,4 | 2   | 30 | -   | -   |

Tabelle 2



| Tier  | Bemerkungen<br>allgemein  | Lokale<br>Gabe   | Fehlinjektion   | Zus.<br>Zina. | Zina-<br>tage | Nov.      | Fieb.      | End-<br>gew.    | Absol.<br>Abn. | Rel.<br>Abn. |
|-------|---|--|---|---------------|---------------|-----------|------------|-----------------|----------------|--------------|
| L0/1  | Herzpunktion zur Blutentnahme am Operationstag und Tag 4 notwendig  | 0,61 ml Placebo (Spülung täglich mit 2 ml 0,9%iger NaCl-Lösung)  |   | -             | -             | -         | -          | 2967            | 621            | 17,3         |
| L0/2  | schwierigere OP aufgrund der Probleme, den Katheter am Knochen zu fixieren  | 0,61 ml Placebo (Spülung täglich mit 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung)  |   | -             | -             | 1         | -          | 3030            | 547            | 15,3         |
| L0/3  | Langer Verlauf, schlechte Anaesthetie und Relaxation bei beginnender Atemdepression. Röcheln durch Halsexension beseitigt | 0,61 ml Placebo (Spülung täglich mit 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung)  |   | -             | -             | -         | -          | 2948            | 789            | 21,1         |
| L0/4  | OP kurz, Tier nach OP schnell wach  | 0,61 ml Placebo (Spülung täglich mit 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung)  |   | -             | -             | -         | -          | 2975            | 516            | 14,8         |
| L0/5  | OP kurz, keine Probleme   | 0,61 ml Placebo (Spülung täglich mit 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung)  |   | -             | -             | -         | -          | 3001            | 875            | 22,6         |
| L0/6  | kurze OP  | 0,61 ml Placebo (Spülung täglich mit 0,5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung)  | am 1. Tag wurde die Placebo-Gabe versäumt                         | -             | -             | -         | -          | 3350            | 1150           | 25,6         |
| L0/7  | Lange OP aufgrund der Cerclage, Tier schlecht zu narkotisieren  | 0,61 ml Placebo (Spülung täglich mit 0,5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung)  |   | -             | -             | -         | 0,11,18    | 3149            | 783            | 19,9         |
| L0/8  | -   | 0,61 ml Placebo (Spülung täglich mit 0,5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung)  |   | -             | -             | -         | -          | (3502 an Tag 2) | (145)          | (4,0)        |
| L0/9  | kurze OP, erhöhte Rompun®-Applikation (1ml/kg KG) gut vertragen   | 0,61 ml Placebo (Spülung täglich mit 0,5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung)  |   | -             | -             | -         | 11-15      | 3332            | 1005           | 23,2         |
| L0/10 | kurze OP, beide Fixateure haben in der Achsenschraube Spiel, ==> Instabilität der Osteosynthese                           | 0,61 ml Placebo (Spülung täglich mit 0,5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung)  |   | -             | -             | -         | 11,15      | 2748            | 717            | 20,7         |
| L0/11 | -   | 0,61 ml Placebo (Spülung täglich mit 0,5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung)  |   | -             | -             | -         | 10,17      | 2738            | 927            | 25,3         |
| L0/12 | sehr kurze OP   | 0,61 ml Placebo (Spülung täglich mit 0,5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung)  |   | -             | -             | -         | -          | 2963            | 767            | 20,6         |
| L0/13 | gute, kurze OP  | 0,61 ml Placebo (Spülung täglich mit 0,5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung)  |   | -             | -             | -         | -          | 3324            | 754            | 18,5         |
| L0/14 | kurz, gut   | 0,61 ml Placebo (Spülung täglich mit 0,5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung)  |   | -             | -             | -         | 12         | 3141            | 541            | 14,7         |
| L1/1  | -   | 0,61 ml = 160 I.E. Faktor XIII je Femur (Spülung nach jeder Applikation mit 0,4 ml 0,9%iger NaCl-Lösung) |   | -             | -             | -         | 17         | 3210            | 753            | 19,0         |
| L1/2  | aufgrund des Fotografierens länger  | 0,61 ml = 160 I.E. Faktor XIII je Femur (Spülung nach jeder Applikation mit 0,4 ml 0,9%iger NaCl-Lösung) |   | -             | -             | 6         | -          | (3341)          | (535)          | (13,8)       |
| L1/3  | sehr lange OP, aufgrund der starken S-förmigen Krümmung der Femora waren umfangreiche Umstellungsosteotomien notwendig    | 0,61 ml = 160 I.E. Faktor XIII je Femur (Spülung nach jeder Applikation mit 0,4 ml 0,9%iger NaCl-Lösung) | Tag 16: Fehlinjektion links von ca. 0,4 ml = 100 I.E. Faktor XIII | je 4 ml i.m.  | 15 bis 19     | 15 bis 19 | 0,12-19,21 | 2849            | 1061           | 27,1         |

Tabelle 3

| Tier  | Bemerkungen<br>allgemein | Lokale<br>Gabe   | Fehlinjektion  | Zus.<br>Zina. | Zina-<br>tage | Nov. | Fieb.   | End-<br>gew. | Absol.<br>Abn. | Rel.<br>Abn. |
|-------|--------------------------|--|--|---------------|---------------|------|---------|--------------|----------------|--------------|
| L1/4  | -                        | 0,61 ml = 160 I.E.<br>Faktor XIII je<br>Femur (Spülung<br>nach jeder<br>Applikation mit<br>0,4 ml 0,9%iger<br>NaCl-Lösung) |  | -             | -             | -    | -       | 3203         | 1100           | 25,6         |
| L1/5  | kurze OP                 | 0,61 ml = 160 I.E.<br>Faktor XIII je<br>Femur (Spülung<br>nach jeder<br>Applikation mit<br>0,4 ml 0,9%iger<br>NaCl-Lösung) |  | -             | -             | -    | 11-15   | (2993)       | (1139)         | (27,6)       |
| L1/6  | -                        | 0,61 ml = 160 I.E.<br>Faktor XIII je<br>Femur (Spülung<br>nach jeder<br>Applikation mit<br>0,4 ml 0,9%iger<br>NaCl-Lösung) |  | -             | -             | -    | 18-21   | 3109         | 1096           | 26,1         |
| L1/7  | kurze OP                 | 0,61 ml = 160 I.E.<br>Faktor XIII je<br>Femur (Spülung<br>nach jeder<br>Applikation mit<br>0,4 ml 0,9%iger<br>NaCl-Lösung) |  | -             | -             | -    | 11-18   | 2778         | 889            | 24,2         |
| L1/8  | kurze OP                 | 0,61 ml = 160 I.E.<br>Faktor XIII je<br>Femur (Spülung<br>nach jeder<br>Applikation mit<br>0,4 ml 0,9%iger<br>NaCl-Lösung) |  | -             | -             | -    | 14-17   | 2840         | 1320           | 31,7         |
| L1/9  | kurze OP                 | 0,61 ml = 160 I.E.<br>Faktor XIII je<br>Femur (Spülung<br>nach jeder<br>Applikation mit<br>0,4 ml 0,9%iger<br>NaCl-Lösung) |  | -             | -             | -    | 20      | 2466         | 772            | 23,8         |
| L1/10 | kurze OP                 | 0,61 ml = 160 I.E.<br>Faktor XIII je<br>Femur (Spülung<br>nach jeder<br>Applikation mit<br>0,4 ml 0,9%iger<br>NaCl-Lösung) | Tag 8: Fehlinjektion<br>von je 0,61 ml = 160<br>I.E. Faktor XIII | -             | -             | -    | 10      | 2482         | 622            | 20,0         |
| L1/11 | kurze OP                 | 0,61 ml = 160 I.E.<br>Faktor XIII je<br>Femur (Spülung<br>nach jeder<br>Applikation mit<br>0,4 ml 0,9%iger<br>NaCl-Lösung) |  | -             | -             | -    | 0,19-21 | 2509         | 653            | 20,7         |
| L1/12 | kurze OP                 | 0,61 ml = 160 I.E.<br>Faktor XIII je<br>Femur (Spülung<br>nach jeder<br>Applikation mit<br>0,4 ml 0,9%iger<br>NaCl-Lösung) |  | -             | -             | -    | 19-21   | 2668         | 610            | 18,6         |
| L1/13 | kurze OP                 | 0,61 ml = 160 I.E.<br>Faktor XIII je<br>Femur (Spülung<br>nach jeder<br>Applikation mit<br>0,4 ml 0,9%iger<br>NaCl-Lösung) |  | -             | -             | -    | 13,18   | 2874         | 398            | 12,2         |
| L1/14 | kurze OP                 | 0,61 ml = 160 I.E.<br>Faktor XIII je<br>Femur (Spülung<br>nach jeder<br>Applikation mit<br>0,4 ml 0,9%iger<br>NaCl-Lösung) |  | -             | -             | -    | 20      | 2821         | 532            | 15,9         |

Tabelle 3

| Tier  | Li Viel  | Li Wenig | Re Viel        | Re Wenig | Verlaufs Besonderheit  | Blut-abn.   | Eiter links  | Eiter rechts   | Distr. links | Distr. rechts | Explantations-Besonderheiten   |
|-------|----------|----------|----------------|----------|--|-------------|--|--|--------------|---------------|--|
| L0/1  | -        | -        | -              | 11       | Tag1: sprang drei Käfige weiter!<br>Tag2: re. Unterschenkel abduziert<br>Tag4: Herzpunktion<br>Tag9: li. Oberschenkel vernäht<br>Tag11: Abszeß entwickelt sich am re. Kniegelenk, Diarrhöe<br>Tag12: Tier verstirbt unter Narkose während Abszeßeröffnung                      | 0,2,4       | -  | dickflüssiger gelblicher Eiter ergießt sich aus dem Abszeß, Spiralbruch distal der Osteotomie und Ausriß der Schanzschen Schrauben | 1,8          | 1,8           | Beide Katheter reaktionslos  |
| L0/2  | -        | 15,19    | -              | -        | schwergängiger linker Fixateur   | 0,4,14,20   | -  | -  | 7,0          | 7,0           | besonders recht keinerlei Nekrosen, Faden gut im Periost verwachsen, kein Eiter, Knochen gut verheilt, selbst Cerclage   |
| L0/3  | -        | 15       | 15,17,18,19,21 | -        | an Tag 21 leichter Eiteraustritt an 4. Schraube  | 0,4,14,20   | -  | gelbliches Gewebe im Spalt, nicht flüssig  | 7,5          | 7,0           | sehr weiche Verbindung zwischen den Femurstücken, Katheter reaktionslos  |
| L0/4  | 20,21    | -        | 20,21          | -        | Tag12: Wunde re. Knie genäht<br>Tag19: re. an 4. Schraube Wunde 5mm offen, offene Wundheilung  | 0,2,14,20   | -  | an distaler Schraube leichte Eiterung  | 7,2          | 6,2           | gute Heilung, Katheter reaktionslos  |
| L0/5  | -        | -        | -              | -        | Tag 8: leichte Diarrhöe, li. Unterschenkel dorsal Tumor<br>Tag 10: li. am Knie genäht<br>Tag 17: li. an 4. Schraube Wunde über 1 cm geplatzt, offene Wundbehandlung  | 0,2,4,14,20 | -  | -  | 4,2          | 7,0           | Beide Katheter waren von dichtem Bindegewebe eingemauert. V.a. Mitreaktion des Callusgewebes   |
| L0/6  | -        | -        | 7,15,16,19     | 9        | Tag 12: Diarrhöe<br>Tag 16: Diarrhöe<br>Tag 20: Diarrhöe, re. Knie 2 cm großer, fester Tumor<br>Tag 21: Tumor unverändert  | 0,2,4,14,20 | -  | -  | 6,0          | 8,5           | Katheter reizlos, gut verheilt, Tumor leider nicht sezirt  |
| L0/7  | -        | -        | -              | -        | Tag 2: li. Unterschenkel geschwollen<br>Tag 4: Schwellung am li. Unterschenkel verschwunden, Blut am Thermometer<br>Tag 10: Diarrhöe, re. Katheterport liegt sehr tief (ventral), schlecht zu punktieren<br>Tag 15: Diarrhöe<br>Tag 21: Diarrhöe, Katheterport fest verwachsen | 0,20        | -  | -  | 6,5          | 8,0           | Li.: gut verheilt, fibrotische Reaktion um Katheter. Rechts makroskopisch Knochengewebsnekrose?, Sequester nicht gefunden, mikroskopisch liegt Sequester in der Distraktionszone |
| L0/8  | -        | -        | -              | -        | Tag 3: während des Röntgens Querbruch li. distal der 4. Schraube, Einschläfern des Tieres  | 0           | -  | -  | -            | -             | flächenhaft ausgedehntes Hämatom an Fraktur, Knochenspalt war gerade verklebt  |
| L0/9  | 17       | -        | 17,20          | -        | an Tag 14 wird eine Fehleichtung des Thermometers auf einen um 1,5°C zu niedrigen Wert festgestellt<br>Tag 8: 3 cm großer, fester Tumor am li. Knie, Diarrhöe<br>Tag 11: Eiter an 4. Schraube li., Blut am Thermometer<br>Tag 14: wie Tag 11, Diarrhöe                         | 0           | am Katheter entlang bis zur Distraktionszone rahmiger, hell-beiger, nicht foetider Eiter | am Katheter entlang bis zur Distraktionszone rahmiger, hell-beiger, nicht foetider Eiter   | 8,5 ?        | 6,0           | an linker Distraktionszone sehr wenig Gewebsbildung, beim Freipräparieren Zone mit Skalpell angeschnitten, beide Callus kippbeweglich  |
| L0/10 | 17,20    | -        | 15,17          | 9        | Tag 9: an 4. Schraube re. näßt Wunde blutig, Diarrhöe<br>Tag 10: Blut am Thermometer<br>Tag 11: Wunde klappt an 4. Schraube re. um 1 cm<br>Tag 14: Diarrhöe<br>Tag 21: Diarrhöe  | 0,2,4       | am Katheter entlang bis zur Distraktionszone rahmiger, hell-beiger, nicht foetider Eiter | am Katheter entlang bis zur Distraktionszone rahmiger, hell-beiger, nicht foetider Eiter   | 7,2 ?        | 7,8           | beide Distraktionszonen beweglich  |
| L0/11 | 17,19,20 | 1        | 19             | 1        | Tag 2: li. an 4. Schraube wunde über 1,5 cm offen, genäht<br>Tag 3: obige Wunde neu genäht, da Tier die Naht aufgeknaßte hatte<br>Tag 14: neu geeichtes Thermometer!<br>Tag 17: 4 cm großer, holzharter Tumor am re. Knie  | 0,2,4,14,20 | an 1. Schraube   | etwas mehr als li., entlang des Katheters  | 8,0          | 7,7           | Distraktionszone gut durchgewachsen, Knochen gegeneinander kippbeweglich, weniger Eiter als bei Tier L0/9 und L0/10  |

Kommentar [1]: Seite: 149

Tabelle 4

| Tier  | Li Viel       | Li Wenig | Re Viel | Re Wenig | Verlaufs Besonderheit   | Blut-abn.   | Eiter links  | Eiter rechts   | Distr. links | Distr. rechts | Explantations-Besonderheiten  |
|-------|---------------|----------|---------|----------|---|-------------|--|--|--------------|---------------|---|
| L0/12 | -             | -        | -       | -        | Tag 7: li. an 4. Schraube Wunde über 1 cm offen, genäht<br>Tag 13: neu geeichtes Thermometer<br>Tag 19-21: Diarrhöe   | 0,2,4,14,20 | Eiter entlang des Katheters und auch bis 5 mm aufsteigend im Katheterende            | Eiter entlang des Katheters und auch bis 5 mm aufsteigend im Katheterende            | 6,7          | 6,5           | beide Knochenenden gegeneinander kippbeweglich, Menge des Eiters wie bei L0/11  |
| L0/13 | -             | 21       | -       | -        | Tag 9: re. Wunde etwas blutig, li. Exkoration durch 4. Schraube<br>Tag 13: neu geeichtes Thermometer  | 0,2,4,14,20 | Eiter entlang des Katheters wie bei L0/11  | Eiter entlang des Katheters wie bei L0/11  | 7,5 ?        | 6,6           | beide Osteosynthesen kippbeweglich  |
| L0/14 | -             | 19,20,21 | -       | 19       | Tag 1: Diarrhöe<br>Tag 5: Blut am Thermometer<br>Tag 6: Diarrhöe<br>Tag 12: neu geeichtes Thermometer   | 0,2,14,20   | 'pseudomembranöser' Eiter wie auch bei den anderen Tieren, quantitativ wie bei L0/11 | 'pseudomembranöser' Eiter wie auch bei den anderen Tieren, quantitativ wie bei L0/11 | 6,5          | 7,5           | beide Osteosynthesezonen kippbeweglich  |
| L1/1  | 1,15,17       |          |         | 16,18    | Tag 2: re. 1 Kopfnahat geplatzt<br>Tag 7: li. an 1. Schraube angeknabberter Wundrand, 1 Kopfnahat<br>Tag 10: li. an 4. Schraube 1 Kopfnahat<br>Tag 11: wie Tag 10<br>Tag 14: wie Tag 10, doch nun offene Wundheilung  | 0,2,4,14,20 | -  | -  | 6,5 ?        | 7,8           | Distraction beidseitig gegliedert, li. jedoch ist Distaktionszone längs gebrochen, mikroskopisch schwer zu lokalisierende Distaktionszone |
| L1/2  | -             | -        | -       | -        | Tag 1: Diarrhöe<br>Tag 6: lethargisch, kein Muskeltonus mehr in den Hinterläufen, Wunde, Katheter, Palpation o.B., Analsphincter atonisch, Diarrhöe, Hypothermie (36,1°C).<br>1 Stunde nach Temperaturnahme verstirbt Tier, direkte Explantation  | 0,2         | -  | -  | (-1,7)       | (-0,8)        | Katheter reaktionslos, Knochenenden schon miteinander verklebt, Wirbelsäule o.B.  |
| L1/3  | 15            | 8        | 9,15    | 5        | Tag 1: Diarrhöe<br>Tag 12: Vulva blutig, Diarrhöe<br>Tag 13: Hautnekrose an 4. Schraube links, keine Diarrhöe<br>Tag 15: Knie links geschwellen, hart, hyperämisch, Tier badet Vorderpfoten im Wasser (um Fieber zu drücken?!), schlechter Allgemeinzustand<br>Tag 20: Tumor am li. Knie etwas rückgebildet, Tier apathisch | 0,2,4,14,20 | Eiter den Katheter entlang bis zur 4. Schraube                                       | Eiter den Katheter entlang bis zur 4. Schraube                                       | 5,8          | 5,9           | li. Hautnaht zu locker (bes. 3.,4. Schraube), teilweise nicht richtig verheilt  |
| L1/4  | 9,11,13,17,19 | -        | -       | -        | Tag 8: leichte Hautnekrose an 4. Schraube links<br>Tag 15: Wunde an 4. Schraube li. 2 cm offen, Naht<br>Tag 19: 1 Kopfnahat an 4. Schraube li.  | 0,2,4,14,20 | epifaszial an den Schrauben leichte Eiterungen                                       | epifaszial an den Schrauben leichte Eiterungen                                       | 5,1          | 5,8           | Katheter reaktionslos, kein Eiter, in lockeres Bindegewebe eingewachsen, Distaktionszone relativ fest                                     |
| L1/5  |               | 11,13    |         | 12       | Tag 14: li. Knie leicht geschwellen, fest<br>Tag 15: li. an 4. Schraube offen, rahmiger Eiter<br>Tag 19: schlechter Allgemeinzustand, Tier auf Nachfrage des Tierschutzbeauftragten getötet. Explantation   | 0,2,4,14    | epifaszial an Schrauben Eiter  | epifaszial an Schrauben Eiter  | 5,5          | 5,5           | Katheter reaktionslos, Distaktionszone wie gehabt normal verheilt   |
| L1/6  |               | (5)      |         | (5)      | Tag 4: re. Intraport sehr weit nach kaudal gerutscht<br>Tag 19: re. Intraport schwer zu finden  | 0,2,4,14,20 | der gesamte epifaszial liegende Katheter vereitert, Distaktionszone eiterfrei        | der gesamte Katheter bis an die Distaktionszone vereitert                            | 6,5          | 6,2           | Distaktionszone leicht kippbeweglich, längst nicht konsolidiert   |

Tabelle 4

| Tier  | Li Viel | Li Wenig | Re Viel | Re Wenig | Verlaufs Besonderheit   | Blut-abn.       | Eiter links   | Eiter rechts  | Distr. links | Distr. rechts | Explantations-Besonderheiten  |
|-------|---------|----------|---------|----------|---|-----------------|---|---|--------------|---------------|---|
| L1/7  | -       | -        | -       | -        | Tag 1: re. 5 cm großer, prallelastischer, beweglicher Tumor am ventralen Hals(Kehle)<br>Tag 4: Tumor hat sich nicht merklich vergrößert, verschieblich<br>Tag 8: Tumor unverändert<br>Tag 10: Fixateur hat sich um 270° zurückgedreht, Distraction mit Drehung um 360°+270° nach links ausgeglichen<br>Tag 15: li. Knie geschwollen<br>Tag 16: li. Knie und Halstumor unverändert<br>Tag 17: Eiteraustritt an 4. Schraube li.<br>Tag 18: Tumor li. Knie fest, Halstumor unverändert | 0,2,4,14,2<br>0 | -   | -   | 6,3          | 4,5           | leichte fibrotische Reaktion an Intraport.<br>Sektion des Halstumors: hypertrophierte Schilddrüse, 3-4 Epithelkörperchen ebenfalls auf Fingerkuppengröße vergrößert, Kapselmeres gelatinös bis flüssig, innere Kapselwand mottenfraßähnlich strukturiert. |
| L1/8  | -       | 15       | -       | -        | Tag 1: Diarrhöe<br>Tag 3: li. Oberschenkel Knistern bei Palpation, leicht geschwollen<br>Tag 6: Knistern nicht mehr spürbar<br>Tag 16: an li. 4. Schraube leichter Eiteraustritt<br>Tag 21: li. Knie etwas dicker, Eiter an 4. Schraube   | 0,2,4,14,2<br>0 | von der 4. Schraube her leichte epifasziale Eiterung        | -   | 6,5          | 4,8           | Distractionszone wie gehabt kippbeweglich, leichte Fibrosierung der Intraportlager  |
| L1/9  | -       | -        | -       | -        | Tag 15: Wunde an 4. Schraube li. leicht offen, kaum Eiter   | 0,2,4,14,2<br>0 | Katheter epifaszial und Wunde vereitert                     | Katheter epifaszial und Wunde vereitert   | 6,9          | 6,6           | Distractionszone normal durchbaut, normal beweglich   |
| L1/10 | -       | -        | -       | -        | Tag 3: weicher Tumor am re. Unterschenkel<br>Tag 8: re. Unterschenkel dorsal weich geschwollen<br>Tag 15: li. an 4. Schraube 2 Tropfen Eiter ausgedrückt<br>Tag 20: li. an 4. Schraube Eiteraustritt<br>Tag 21: re. Unterschenkel um ca. 30° innenrotiert   | 0,2,4,14,2<br>0 | epifasziale leichte Eiterung                                | epifasziale leichte Eiterung, Katheter ebenfalls vereitert  | 7,0          | 7,0           | Linker Katheter reizlos, gut eingewachsen, Distractionszone normal  |
| L1/11 | 15      | 7        | -       | 7        | Tag 14: li. Knie an 4. Schraube leichte Schwellung und Rötung<br>Tag 15: li. 4. Schraube leichter Eiteraustritt<br>Tag 19: beidseits an 4. Schraube leichter Eiteraustritt<br>Tag 20: Diarrhöe<br>Tag 21: keine Diarrhöe  | 0,2,4,14,2<br>0 | Eiter am und im Schlauch, sub- wie epifaszial               | Eiter am und im Schlauch, sub- wie epifaszial   | 6,9          | 6,7           | Distractionszone normal   |
| L1/12 | 19      | -        | -       | -        | Tag 6: li. Knie hyperämisch<br>Tag 19: li. 4. Schraube Eiteraustritt<br>Tag 20: li. 4. Schraube erbsengroße Schwellung<br>Tag 21: li. 4. Schraube Eiteraustritt   | 0,2,4,14,2<br>0 | Eiter subfaszial am Schlauch, nicht darin, sowie epifaszial | Eiter subfaszial am Schlauch, nicht darin, sowie epifaszial   | 6,2          | 6,4           | Distractionszone normal   |
| L1/13 | -       | -        | 13,17   | 7,19     | Tag 12: Fell am Rücken sehr schnell nachgewachsen<br>Tag 18: re. an 4. Schraube dünnflüssiger Eiteraustritt, li. Osteotomie V. a. Dislokation<br>Tag 19,20: re. an 4. Schraube Eiteraustritt<br>Tag 21: beidseits an 4. Schraube Eiteraustritt  | 0,2,4,14,2<br>0 | -   | dicker Eiterabszess von 2. bis 4. Schraube, im Katheter bis 1 cm aufsteigend, sonst Katheterlager eiterfrei | 10,4 ?       | 7,0           | Li.: Längsbruch an 2. Schraube, Splitter steht lateral ab und entspricht der 'Dislokation', Splitterheilung und Regeneratzone noch weich, Mikroskopisch liegt Splitter in der Distractionszone<br>Re.: Steifigkeit der Regeneratzone wie links.           |
| L1/14 | 7,19    | 20,21    | -       | -        | Tag 16: li. an 4. Schraube Eiteraustritt<br>Tag 19: li. an 3. und 4. Schraube Eiteraustritt   | 0,2,4,14,2<br>0 | wenig epifaszialer Eiter an Katheter und Wunde              | in Spuren epifaszialer Eiter an Katheter und Wunde  | 5,5          | 6,7           | kein Eiter im Katheter, Distractionszone normal   |

Tabelle 4

## 6.2. Volumendichte des mineralisierten Osteoids (in Kossa, 63-fache Vergrößerung)

### 6.2.1. Zentrale Ebene

Kontrollgruppe

| Tier                | rechts | links | Mittel             |
|---------------------|--------|-------|--------------------|
| L0/2                | 0,2    | 0,304 | 0,252              |
| L0/3                | 0,222  | 0,35  | 0,286              |
| L0/4                | 0,257  | 0,299 | 0,278              |
| L0/5                | 0,336  | 0,256 | 0,296              |
| L0/6                | 0,24   | 0,15  | 0,195              |
| L0/7                |        | 0,213 | 0,213              |
| L0/9                | 0,204  | 0,243 | 0,2235             |
| L0/10               |        | 0,24  | 0,24               |
| L0/11               | 0,2    | 0,204 | 0,202              |
| L0/12               | 0,27   | 0,322 | 0,296              |
| L0/13               | 0,1965 |       | 0,1965             |
| L0/14               | 0,267  | 0,22  | 0,2435             |
| <b>Mittel</b>       |        |       | <b>0,243458333</b> |
| <b>Standardabw.</b> |        |       | 0,038384691        |

Tabelle 5

Verumgruppe

| Tier                | rechts | links | Mittel             |
|---------------------|--------|-------|--------------------|
| L1/1                | 0,279  |       | 0,279              |
| L1/3                | 0,208  | 0,226 | 0,217              |
| L1/4                |        | 0,26  | 0,26               |
| L1/6                |        | 0,238 | 0,238              |
| L1/7                | 0,204  | 0,291 | 0,2475             |
| L1/8                | 0,192  | 0,233 | 0,2125             |
| L1/9                | 0,277  | 0,221 | 0,249              |
| L1/10               | 0,282  | 0,261 | 0,2715             |
| L1/11               | 0,226  | 0,216 | 0,221              |
| L1/12               | 0,273  | 0,298 | 0,2855             |
| L1/13               | 0,342  |       | 0,342              |
| L1/14               | 0,35   | 0,249 | 0,2995             |
| <b>Mittel</b>       |        |       | <b>0,260208333</b> |
| <b>Standardabw,</b> |        |       | 0,03791705         |

Tabelle 6

## 6.2.2. Katheternahe (kortikalisnahe) Ebene

## Kontrollgruppe

| Tier                | rechts | links | Mittel             |
|---------------------|--------|-------|--------------------|
| L0/2                | 0,276  | 0,217 | 0,2465             |
| L0/3                | 0,347  | 0,36  | 0,3535             |
| L0/4                | 0,193  | 0,343 | 0,268              |
| L0/5                | 0,297  | 0,286 | 0,2915             |
| L0/6                | 0,295  | 0,242 | 0,2685             |
| L0/7                |        | 0,233 | 0,233              |
| L0/9                | 0,318  | 0,276 | 0,297              |
| L0/10               |        | 0,206 | 0,206              |
| L0/11               | 0,264  | 0,208 | 0,236              |
| L0/12               | 0,36   | 0,28  | 0,32               |
| L0/13               | 0,353  | 0,233 | 0,293              |
| L0/14               | 0,283  | 0,244 | 0,2635             |
| <b>Mittel</b>       |        |       | <b>0,273041667</b> |
| <b>Standardabw.</b> |        |       | <b>0,040791297</b> |

Tabelle 7

## Verumgruppe

| Tier                | rechts | links | Mittel             |
|---------------------|--------|-------|--------------------|
| L1/1                | 0,266  |       | 0,266              |
| L1/3                | 0,194  | 0,278 | 0,236              |
| L1/4                |        | 0,281 | 0,281              |
| L1/6                |        | 0,278 | 0,278              |
| L1/7                | 0,174  | 0,211 | 0,1925             |
| L1/8                | 0,221  | 0,249 | 0,235              |
| L1/9                | 0,281  | 0,279 | 0,28               |
| L1/10               | 0,281  | 0,264 | 0,2725             |
| L1/11               | 0,207  | 0,237 | 0,222              |
| L1/12               | 0,336  | 0,29  | 0,313              |
| L1/13               | 0,313  |       | 0,313              |
| L1/14               | 0,343  | 0,335 | 0,339              |
| <b>Mittel</b>       |        |       | <b>0,269</b>       |
| <b>Standardabw,</b> |        |       | <b>0,042044889</b> |

Tabelle 8

### 6.3. Verhältnis von verkalkter zu unverkalkter Osteoidstruktur (in Carstairs, 63-fache Vergrößerung)

Kontrollgruppe

| Tier                | rechts      | links       | Mittel      | Verkalktes/unverkalktes Osteoid |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|---------------------------------|
| L0/2                | 0,295873478 | 0,327000212 | 0,311436845 | 0,688563155                     |
| L0/3                | 0,497180216 | 0,321663988 | 0,409422102 | 0,590577898                     |
| L0/4                | 0,384594301 | 0,384594301 | 0,384594301 | 0,615405699                     |
| L0/5                | 0,421655844 | 0,82213786  | 0,621896852 | 0,378103148                     |
| L0/6                | 0,376487325 | 0,405193867 | 0,390840596 | 0,609159404                     |
| L0/7                |             | 0,718613312 | 0,718613312 | 0,281386688                     |
| L0/9                | 0,441113733 | 0,551509544 | 0,496311639 | 0,503688362                     |
| L0/10               |             | 0,510407841 | 0,510407841 | 0,489592159                     |
| L0/11               | 0,40919107  | 0,321046201 | 0,365118636 | 0,634881365                     |
| L0/12               | 0,367682498 | 0,229614217 | 0,298648358 | 0,701351643                     |
| L0/13               | 0,481498301 |             | 0,481498301 | 0,518501699                     |
| L0/14               | 0,532869831 | 0,38308374  | 0,457976786 | 0,542023215                     |
| <i>Mittel</i>       |             |             | 0,453897131 | <b>0,546102869</b>              |
| <i>Standardabw.</i> |             |             | 0,123253344 | 0,123253344                     |

Tabelle 9

Verumgruppe

| Tier                | rechts      | links       | Mittel      | Verkalktes/unverkalktes Osteoid |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|---------------------------------|
| L1/1                | 0,382290009 |             | 0,382290009 | 0,617709991                     |
| L1/3                | 0,496233584 | 0,250270563 | 0,373252074 | 0,626747927                     |
| L1/4                |             | 0,470330014 | 0,470330014 | 0,529669986                     |
| L1/6                |             | 0,29985339  | 0,29985339  | 0,70014661                      |
| L1/7                | 0,286196151 | 0,348039766 | 0,317117959 | 0,682882042                     |
| L1/8                | 0,404827798 | 0,24589727  | 0,325362534 | 0,674637466                     |
| L1/9                | 0,356427934 | 0,342746835 | 0,349587385 | 0,650412616                     |
| L1/10               | 0,379978509 | 0,345005624 | 0,362492067 | 0,637507934                     |
| L1/11               | 0,334308971 | 0,366748764 | 0,350528868 | 0,649471133                     |
| L1/12               | 0,358173344 | 0,298282104 | 0,328227724 | 0,671772276                     |
| L1/13               | 0,385368097 |             | 0,385368097 | 0,614631903                     |
| L1/14               | 0,544290923 | 0,250850764 | 0,397570844 | 0,602429157                     |
| <i>Mittel</i>       |             |             | 0,361831747 | <b>0,638168253</b>              |
| <i>Standardabw.</i> |             |             | 0,045457343 | 0,045457343                     |

Tabelle 10



## 6.4. Osteblastenumfang (in Trichrom-Goldner, 250-fache Vergrößerung)

## Kontrollgruppe

| Tier           | Feldnr. | Fläche     | Umfang     | Flächenant. | Fläche % | Mefrahmen  | Deckzellen | Zellen/Umfang   |
|----------------|---------|------------|------------|-------------|----------|------------|------------|-----------------|
| L0/2 li        | 1       | 20416,79   | 3082,04    | 0,39        | 39,25    | 52020,76   | 96         | 0,0311482       |
|                | 2       | 18500,4    | 2585,92    | 0,36        | 35,56    | 52020,76   | 85         | 0,03287031      |
|                | 3       | 22022,18   | 2461,69    | 0,42        | 42,33    | 52020,76   | 67         | 0,02721707      |
| L0/2 re        | 4       | 20581,37   | 3051,55    | 0,4         | 39,56    | 52020,76   | 76         | 0,02490538      |
|                | 5       | 18657,64   | 2283,41    | 0,36        | 35,87    | 52020,76   | 54         | 0,02364884      |
| L0/3 li        | 6       | 22399,59   | 3666,64    | 0,43        | 43,06    | 52020,76   | 67         | 0,01827286      |
|                | 7       | 22846,26   | 1747,89    | 0,44        | 43,92    | 52020,76   | 59         | 0,03375499      |
| L0/3 re        | 8       | 17661,25   | 1784,58    | 0,34        | 33,95    | 52020,76   | 59         | 0,033061        |
|                | 9       | 21211,95   | 4200,53    | 0,41        | 40,78    | 52020,76   | 73         | 0,01737876      |
| L0/4 li        | 10      | 20038,57   | 2068,22    | 0,39        | 38,52    | 52020,76   | 96         | 0,04641673      |
|                | 11      | 19376,01   | 4198,86    | 0,37        | 37,25    | 52020,76   | 97         | 0,02310151      |
| L0/4 re        | 12      | 20909,69   | 2932,99    | 0,4         | 40,19    | 52020,76   | 102        | 0,0347768       |
|                | 13      | 16111,88   | 2349,18    | 0,31        | 30,97    | 52020,76   | 75         | 0,03192603      |
| L0/5 li        | 14      | 15298,8    | 2686,49    | 0,29        | 29,41    | 52020,76   | 109        | 0,04057339      |
|                | 15      | 21193,62   | 3168,53    | 0,41        | 40,74    | 52020,76   | 86         | 0,02714192      |
| L0/5 re        | 16      | 18858,46   | 2373,89    | 0,36        | 36,25    | 52020,76   | 75         | 0,03159371      |
|                | 17      | 9699,1     | 1155,03    | 0,19        | 18,64    | 52020,76   | 76         | 0,06579916      |
| L0/6 li        | 18      | 20227,38   | 1760,48    | 0,39        | 38,88    | 52020,76   | 84         | 0,04771426      |
|                | 19      | 18779,03   | 2653,02    | 0,36        | 36,1     | 52020,76   | 71         | 0,02676195      |
| L0/6 re        | 20      | 14909,57   | 2409,93    | 0,29        | 28,66    | 52020,76   | 72         | 0,02987639      |
|                | 21      | 9350,2     | 1100,74    | 0,18        | 17,97    | 52020,76   | 62         | 0,05632574      |
| L0/7 li        | 22      | 19708,81   | 3208,76    | 0,38        | 37,89    | 52020,76   | 132        | 0,04113739      |
|                | 23      | 18357,82   | 2867,89    | 0,35        | 35,29    | 52020,76   | 112        | 0,0390531       |
| L0/9 li        | 27      | 9860,82    | 1717,22    | 0,19        | 18,96    | 52020,76   | 107        | 0,06231001      |
|                | 28      | 8775,83    | 1551,77    | 0,17        | 16,87    | 52020,76   | 85         | 0,05477616      |
| L0/9 re        | 29      | 15275,99   | 2686,74    | 0,29        | 29,37    | 52020,76   | 95         | 0,03535884      |
|                | 30      | 25797,33   | 4099,91    | 0,5         | 49,59    | 52020,76   | 94         | 0,02292733      |
| L0/10 li       | 31      | 17871,65   | 1636,26    | 0,34        | 34,35    | 52020,76   | 44         | 0,02689059      |
|                | 32      | 21239,24   | 4138,21    | 0,41        | 40,83    | 52020,76   | 113        | 0,02730649      |
| L0/11 li       | 35      | 21047,79   | 4479,08    | 0,4         | 40,46    | 52020,76   | 80         | 0,01786081      |
|                | 36      | 21629,69   | 1963,63    | 0,42        | 41,58    | 52020,76   | 81         | 0,04125013      |
| L0/11 re       | 37      | 10069,18   | 1551,07    | 0,19        | 19,36    | 52020,76   | 76         | 0,04899843      |
|                | 38      | 13797,29   | 1185,85    | 0,27        | 26,52    | 52020,76   | 89         | 0,07505165      |
| L0/12 li       | 39      | 14746,83   | 2436,76    | 0,28        | 28,35    | 52020,76   | 96         | 0,03939658      |
|                | 40      | 15458,48   | 1993,13    | 0,3         | 29,72    | 52020,76   | 67         | 0,03361547      |
| L0/12 re       | 41      | 10789,79   | 2153,56    | 0,21        | 20,74    | 52020,76   | 94         | 0,04364866      |
|                | 42      | 18152,11   | 2098,32    | 0,35        | 34,89    | 52020,76   | 103        | 0,04908689      |
| L0/13 re       | 43      | 9233,7     | 1547,57    | 0,18        | 17,75    | 52020,76   | 69         | 0,04458603      |
|                | 44      | 24912,76   | 2670,96    | 0,48        | 47,89    | 52020,76   | 68         | 0,02545901      |
| L0/14 li       | 45      | 25196,89   | 2718,8     | 0,48        | 48,44    | 52020,76   | 86         | 0,0316316       |
|                | 46      | 12207,59   | 1310,34    | 0,23        | 23,47    | 52020,76   | 65         | 0,04960545      |
| L0/14 re       | 47      | 25614,84   | 2960,97    | 0,49        | 49,24    | 52020,76   | 113        | 0,03816317      |
|                | 48      | 29742,15   | 2540,22    | 0,57        | 57,17    | 52020,76   | 94         | 0,03700467      |
| <b>Gesamt</b>  |         | 843474,908 | 116937,127 | 16,214      | 1621,42  | 2496996,38 | 3981       | 1,75930179      |
| <b>Mittel</b>  |         | 17572,394  | 2436,19    | 0,338       | 33,78    | 52020,758  | 84,7021277 | <b>0,037432</b> |
| <b>Std Abw</b> |         | 5474,379   | 921,921    | 0,105       | 10,523   | 0          | 18,6663087 | 0,0131182       |

Tabelle 11 (Einheit: Osteblasten/Umfang [ $1/\mu\text{m}$ ], übriges einheitslos oder in  $\mu\text{m}$ , bzw.  $\mu\text{m}^2$ )

## Verumgruppe

| Tier           | Feldnr. | Fläche     | Umfang     | Flächenant. | Fläche %   | Meßrahmen  | Deckzellen | Zellen/Umfang     |
|----------------|---------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-------------------|
| L1/1 re        | 1       | 16985,1345 | 5418,77977 | 0,33        | 32,58      | 52136,0826 | 62         | 0,01144169        |
|                | 2       | 17506,0698 | 4658,61665 | 0,34        | 33,58      | 52136,0826 | 77         | 0,01652851        |
|                | 3       | 16851,2247 | 4832,26763 | 0,32        | 32,32      | 52136,0826 | 89         | 0,01841785        |
| L1/3 li        | 4       | 12924,4031 | 2462,7261  | 0,25        | 24,79      | 52136,0826 | 69         | 0,02801773        |
|                | 5       | 25440,1411 | 3244,12543 | 0,49        | 48,8       | 52136,0826 | 86         | 0,02650946        |
|                | 6       | 22745,6443 | 2933,71164 | 0,44        | 43,63      | 52136,0826 | 68         | 0,02317883        |
| L1/3 re        | 7       | 20479,4071 | 4175,25147 | 0,39        | 39,28      | 52136,0826 | 95         | 0,02275312        |
|                | 8       | 20914,6101 | 3178,36564 | 0,4         | 40,12      | 52136,0826 | 100        | 0,03146271        |
|                | 9       | 18941,9102 | 2898,87713 | 0,36        | 36,33      | 52136,0826 | 103        | 0,035531          |
| L1/4 li        | 10      | 20256,2948 | 3895,22384 | 0,39        | 38,85      | 52136,0826 | 101        | 0,02592919        |
|                | 11      | 23151,8593 | 3377,3401  | 0,44        | 44,41      | 52136,0826 | 96         | 0,02842474        |
|                | 12      | 17211,512  | 4488,48874 | 0,33        | 33,01      | 52136,0826 | 102        | 0,0227248         |
| L1/6 li        | 22      | 23862,6351 | 1840,45418 | 0,46        | 45,77      | 52136,0826 | 78         | 0,04238084        |
|                | 23      | 25537,1026 | 3860,29906 | 0,49        | 48,98      | 52136,0826 | 111        | 0,02875425        |
|                | 24      | 22178,5732 | 5363,97786 | 0,43        | 42,54      | 52136,0826 | 89         | 0,01659216        |
| L1/7 li        | 28      | 20603,7219 | 1922,61568 | 0,4         | 39,52      | 52136,0826 | 108        | 0,05617347        |
|                | 29      | 26556,3163 | 2320,67994 | 0,51        | 50,94      | 52136,0826 | 99         | 0,04265991        |
|                | 30      | 26353,0045 | 2086,32684 | 0,51        | 50,55      | 52136,0826 | 103        | 0,04936906        |
| L1/7 re        | 31      | 23445,5997 | 5084,46677 | 0,45        | 44,97      | 52136,0826 | 146        | 0,02871491        |
|                | 32      | 24268,8519 | 3156,56524 | 0,47        | 46,55      | 52136,0826 | 139        | 0,04403521        |
|                | 33      | 27152,9847 | 2413,30032 | 0,52        | 52,08      | 52136,0826 | 107        | 0,04433762        |
| L1/8 li        | 34      | 18963,3436 | 1290,65218 | 0,36        | 36,37      | 52136,0826 | 64         | 0,04958733        |
|                | 35      | 20477,5698 | 5606,16696 | 0,39        | 39,28      | 52136,0826 | 106        | 0,01890775        |
|                | 36      | 26487,7298 | 2452,35749 | 0,51        | 50,8       | 52136,0826 | 135        | 0,05504907        |
| L1/8 re        | 37      | 19048,058  | 2372,41014 | 0,37        | 36,54      | 52136,0826 | 119        | 0,05015996        |
|                | 38      | 21993,6333 | 2458,34546 | 0,42        | 42,19      | 52136,0826 | 117        | 0,04759299        |
|                | 39      | 23488,2634 | 2224,66939 | 0,45        | 45,05      | 52136,0826 | 114        | 0,05124357        |
| L1/9 li        | 40      | 21070,5638 | 2995,33903 | 0,4         | 40,41      | 52136,0826 | 100        | 0,0333852         |
|                | 41      | 28699,258  | 2783,48594 | 0,55        | 55,05      | 52136,0826 | 57         | 0,02047792        |
|                | 42      | 15630,5365 | 2529,61679 | 0,3         | 29,98      | 52136,0826 | 101        | 0,039927          |
| L1/9 re        | 43      | 21425,7486 | 2491,71056 | 0,41        | 41,1       | 52136,0826 | 77         | 0,03090247        |
|                | 44      | 17545,6702 | 3136,07627 | 0,34        | 33,65      | 52136,0826 | 94         | 0,02997376        |
|                | 45      | 16220,672  | 2464,57916 | 0,31        | 31,11      | 52136,0826 | 92         | 0,03732889        |
| L1/10 li       | 46      | 12362,845  | 1754,61164 | 0,24        | 23,71      | 52136,0826 | 112        | 0,06383179        |
|                | 47      | 18733,4959 | 3814,30357 | 0,36        | 35,93      | 52136,0826 | 140        | 0,03670395        |
|                | 48      | 20201,997  | 3684,23083 | 0,39        | 38,75      | 52136,0826 | 122        | 0,0331141         |
| L1/10 re       | 49      | 26852,0977 | 2966,1289  | 0,52        | 51,5       | 52136,0826 | 126        | 0,04247961        |
|                | 50      | 17331,1311 | 1424,90496 | 0,33        | 33,24      | 52136,0826 | 101        | 0,07088192        |
|                | 51      | 31030,4079 | 2579,88008 | 0,6         | 59,52      | 52136,0826 | 90         | 0,03488534        |
| L1/11 li       | 52      | 19484,892  | 1751,74303 | 0,37        | 37,37      | 52136,0826 | 75         | 0,0428145         |
|                | 53      | 15311,075  | 2230,47681 | 0,29        | 29,37      | 52136,0826 | 92         | 0,04124679        |
|                | 54      | 4607,38702 | 1222,20432 | 0,09        | 8,84       | 52136,0826 | 61         | 0,04990982        |
| L1/11 re       | 55      | 9272,54201 | 1264,71687 | 0,18        | 17,79      | 52136,0826 | 68         | 0,05376697        |
|                | 56      | 19757,2009 | 1791,43461 | 0,38        | 37,9       | 52136,0826 | 89         | 0,04968085        |
|                | 57      | 12685,9816 | 1377,26202 | 0,24        | 24,33      | 52136,0826 | 88         | 0,06389489        |
| L1/12 li       | 58      | 17229,6796 | 1888,43563 | 0,33        | 33,05      | 52136,0826 | 77         | 0,04077449        |
|                | 59      | 35882,3419 | 2578,09473 | 0,69        | 68,82      | 52136,0826 | 71         | 0,02753972        |
|                | 60      | 28061,3562 | 3945,89336 | 0,54        | 53,82      | 52136,0826 | 109        | 0,02762366        |
| L1/12 re       | 61      | 16850,8179 | 2373,6313  | 0,32        | 32,32      | 52136,0826 | 82         | 0,03454622        |
|                | 62      | 20643,9353 | 1691,87843 | 0,4         | 39,6       | 52136,0826 | 50         | 0,02955295        |
|                | 63      | 10847,8027 | 1401,50225 | 0,21        | 20,81      | 52136,0826 | 84         | 0,05993569        |
| L1/13 re       | 67      | 24274,7705 | 2213,19497 | 0,47        | 46,56      | 52136,0826 | 96         | 0,04337621        |
|                | 68      | 19662,4854 | 2091,11621 | 0,38        | 37,71      | 52136,0826 | 103        | 0,04925599        |
|                | 69      | 18757,5834 | 1858,05198 | 0,36        | 35,98      | 52136,0826 | 108        | 0,05812539        |
| L1/14 li       | 70      | 16639,9533 | 1795,49931 | 0,32        | 31,92      | 52136,0826 | 74         | 0,04121416        |
|                | 71      | 20971,9693 | 2456,08618 | 0,4         | 40,23      | 52136,0826 | 79         | 0,032165          |
|                | 72      | 20724,9739 | 2168,28523 | 0,4         | 39,75      | 52136,0826 | 87         | 0,04012387        |
| L1/14 re       | 73      | 7538,87798 | 1269,43853 | 0,14        | 14,46      | 52136,0826 | 64         | 0,05041599        |
|                | 74      | 19617,78   | 2230,63479 | 0,38        | 37,63      | 52136,0826 | 79         | 0,03541593        |
|                | 75      | 16981,2556 | 1158,36279 | 0,33        | 32,57      | 52136,0826 | 71         | 0,06129341        |
| <b>Gesamt</b>  |         | 1206734,68 | 163399,873 | 23,19       | 2314,61    | 3128164,96 | 5602       | 2,32304218        |
| <b>Mittel</b>  |         | 20112,2447 | 2723,33121 | 0,3865      | 38,5768333 | 52136,0826 | 93,3666667 | <b>0,03871737</b> |
| <b>Std Abw</b> |         | 5531,70459 | 1136,22112 | 0,10675213  | 10,6098033 | 0,00160818 | 21,4104098 | 0,01347848        |

Tabelle 12 (Einheit: Osteoblasten/Umfang [ $1/\mu\text{m}$ ], übriges einheitslos oder in  $\mu\text{m}$ , bzw.  $\mu\text{m}^2$ )

### 6.5. Umfangdichte der Trabekel (in Kossa, 63-fache Vergrößerung)

#### Kontrollgruppe

| Tier         | Umfang rechts | Fläche rechts | Umfang links | Fläche links | Mittel Umfang | Mittel Fläche | Quotient Umfang/Fläche |
|--------------|---------------|---------------|--------------|--------------|---------------|---------------|------------------------|
| L0/2         | 16990         | 124310        | 12952        | 243164       | 14971         | 183737        | 0,081480593            |
| L0/3         | 12781         | 177511        | 20125        | 280211       | 16453         | 228861        | 0,071890798            |
| L0/4         | 18426         | 205264        | 17423        | 238953       | 17924,5       | 222108,5      | 0,080701549            |
| L0/5         | 15352         | 268715        | 16832        | 204911       | 16092         | 236813        | 0,067952351            |
| L0/6         | 12712         | 191636        | 11677        | 139767       | 12194,5       | 155701,5      | 0,078319734            |
| L0/7         |               | 14506         | 17070        | 14506        |               | 17070         | 0,084978998            |
| L0/9         | 15572         | 161824        | 17674        | 194238       | 16623         | 178031        | 0,092371379            |
| L0/10        | 6734          | 75064         | 15710        | 192320       | 11222         | 133692        | 0,083939204            |
| L0/11        | 11466         | 160340        | 18055        | 163101       | 14760,5       | 161720,5      | 0,091271669            |
| L0/12        | 17473         | 216311        | 17738        | 257554       | 17605,5       | 236932,5      | 0,074305973            |
| L0/13        | 12325         | 149100        |              |              | 12325         | 149100        | 0,082626643            |
| L0/14        | 14743         | 213511        | 12891        | 176023       | 13817         | 194767        | 0,070941176            |
| Mittel       | 14052,18182   | 176689,6364   | 15962,09091  | 203722,0909  | 14874,5       | 187680,4167   | 0,080151339            |
| Standardabw. | 3325,34106    | 51725,98725   | 2640,522011  | 47247,0532   | 2176,143273   | 36014,97154   | 0,007884759            |

Tabelle 13 (Einheit: Umfang/Fläche [ $\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ ], sonstige in  $\mu\text{m}$ , bzw.  $\mu\text{m}^2$ )

#### Verumgruppe

| Tier         | Umfang rechts | Fläche rechts | Umfang links | Fläche links | Mittel Umfang | Mittel Fläche | Quotient Umfang/Fläche |
|--------------|---------------|---------------|--------------|--------------|---------------|---------------|------------------------|
| L1/1         | 18226         | 222869        |              |              | 18226         | 222869        | 0,081778982            |
| L1/2         | 15876         | 166750        | 18274        | 180967       | 17075         | 173858,5      | 0,098212052            |
| L1/4         | 7864          | 91713         | 18682        | 207812       | 13273         | 149762,5      | 0,088626993            |
| L1/6         | 10590         | 92607         | 11844        | 190747       | 11217         | 141677        | 0,079173049            |
| L1/7         | 10206         | 163158        | 15494        | 233075       | 12850         | 198116,5      | 0,064860827            |
| L1/8         | 17133         | 153780        | 12281        | 186419       | 14707         | 170099,5      | 0,086461159            |
| L1/9         | 19402         | 221795        | 14263        | 176336       | 16832,5       | 199215,5      | 0,084493927            |
| L1/10        | 17004         | 225814        | 16971        | 209035       | 16987,5       | 217424,5      | 0,078130569            |
| L1/11        | 18466         | 180550        | 17517        | 172854       | 17991,5       | 176702        | 0,101818316            |
| L1/12        | 13659         | 218327        | 17738        | 138458       | 15698,5       | 178392,5      | 0,087999776            |
| L1/13        | 18709         | 273508        |              |              | 18709         | 273508        | 0,068403849            |
| L1/14        | 17554         | 279622        | 14249        | 199404       | 15901,5       | 239513        | 0,066390968            |
| Mittel       | 15390,75      | 190874,4167   | 15731,3      | 189540,7     | 15789,04167   | 195094,875    | 0,082195872            |
| Standardabw. | 3869,808549   | 61037,13146   | 2479,907707  | 25485,32493  | 2346,335581   | 38161,40972   | 0,011702499            |

Tabelle 14 (Einheit: Umfang/Fläche [ $\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ ], sonstige in  $\mu\text{m}$ , bzw.  $\mu\text{m}^2$ )

### 6.6. Flächenanteil der Kollagenfasern (in Azan, 63-fache Vergrößerung)

Kontrollgruppe

| Tier                | rechts  | links   | Mittel            |
|---------------------|---------|---------|-------------------|
| L0/2                | 0,52659 | 0,45503 | 0,49081           |
| L0/3                | 0,54133 | 0,50714 | 0,524235          |
| L0/4                | 0,52482 | 0,48413 | 0,504475          |
| L0/5                | 0,49274 | 0,42854 | 0,46064           |
| L0/6                | 0,47896 | 0,49324 | 0,4861            |
| L0/7                |         | 0,53309 | 0,53309           |
| L0/9                | 0,54052 | 0,51123 | 0,525875          |
| L0/10               |         | 0,46723 | 0,46723           |
| L0/11               | 0,55594 | 0,38193 | 0,468935          |
| L0/12               | 0,53403 | 0,45848 | 0,496255          |
| L0/13               | 0,50601 |         | 0,50601           |
| L0/14               | 0,53266 | 0,4587  | 0,49568           |
| <b>Mittelwert</b>   |         |         | <b>0,49661125</b> |
| <b>Standardabw.</b> |         |         | 0,022672692       |

Tabelle 15

Verumgruppe

| Tier                | rechts | links  | Mittel         |
|---------------------|--------|--------|----------------|
| L1/1                | 46.573 |        | 0,46573        |
| L1/3                | 50.580 | 48.765 | 0,49673        |
| L1/4                |        | 50.380 | 0,49256        |
| L1/6                |        | 50.967 | 0,50530        |
| L1/7                | 46.917 | 35.843 | 0,41380        |
| L1/8                | 48.919 | 50.905 | 0,49912        |
| L1/9                | 52.820 | 49.560 | 0,51190        |
| L1/10               | 52.279 | 47.057 | 0,49668        |
| L1/11               | 44.108 | 45.400 | 0,44754        |
| L1/12               | 49.922 | 49.452 | 0,49687        |
| L1/13               | 47.835 |        | 0,47835        |
| L1/14               | 52.445 | 47.923 | 0,50184        |
| <b>Mittelwert</b>   |        |        | <b>0,48387</b> |
| <b>Standardabw.</b> |        |        | 0,028545983    |

Tabelle 16

## 6.7. Anisotropie der Trabekel (in Kossa, 63-fache Vergrößerung)

Kontrollgruppe

| Tier                | rechts | links | Mittel             |
|---------------------|--------|-------|--------------------|
| L0/2                | 0,587  | 0,673 | 0,63               |
| L0/3                | 0,674  | 0,663 | 0,6685             |
| L0/4                | 0,731  | 0,732 | 0,7315             |
| L0/5                | 0,666  | 0,704 | 0,685              |
| L0/6                | 0,59   | 0,729 | 0,6595             |
| L0/7                |        | 0,732 | 0,6595             |
| L0/9                | 0,658  | 0,587 | 0,6225             |
| L0/10               |        | 0,586 | 0,586              |
| L0/11               | 0,577  | 0,629 | 0,603              |
| L0/12               | 0,654  | 0,686 | 0,67               |
| L0/13               |        | 0,585 | 0,585              |
| L0/14               | 0,652  | 0,656 | 0,654              |
| <b>Mittel</b>       |        |       | <b>0,646208333</b> |
| <b>Standardabw.</b> |        |       | 0,042979624        |

Tabelle 17

Verumgruppe

| Tier                | rechts | links | Mittel             |
|---------------------|--------|-------|--------------------|
| L1/1                | 0,753  |       | 0,753              |
| L1/3                | 0,682  | 0,673 | 0,6775             |
| L1/4                |        | 0,834 | 0,834              |
| L1/6                |        | 0,616 | 0,616              |
| L1/7                | 0,621  | 0,665 | 0,643              |
| L1/8                | 0,78   | 0,696 | 0,738              |
| L1/9                | 0,68   | 0,649 | 0,6645             |
| L1/10               | 0,655  | 0,683 | 0,669              |
| L1/11               | 0,735  | 0,69  | 0,7125             |
| L1/12               | 0,726  | 0,699 | 0,7125             |
| L1/13               | 0,679  |       | 0,679              |
| L1/14               | 0,7    | 0,631 | 0,6655             |
| <b>Mittel</b>       |        |       | <b>0,697041667</b> |
| <b>Standardabw.</b> |        |       | 0,05805971         |

Tabelle 18

### 6.8. Faktor-XIII-Plasmaspiegel

#### Kontrollgruppe

| Tier                      | d0            | d2           | d4            | d14                | d20          |
|---------------------------|---------------|--------------|---------------|--------------------|--------------|
| L0/2                      | 174           |              | 134           | 155                | 125          |
| L0/3                      | 169           |              | 91            | 88                 | 83           |
| L0/4                      | 160           | 124          |               | 129                | 89           |
| L0/5                      | 204           | 158          | 177           | 105                | 99           |
| L0/6                      | 153           | 123          | 126           | 60                 | 86           |
| L0/7                      | 166           |              |               |                    | 103          |
| L0/9                      | 134           |              |               |                    |              |
| L0/10                     | 170           | 125          | 139           |                    |              |
| L0/11                     | 160           | 160          | 104           | 87                 | 95           |
| L0/12                     | 244           | 247          | 233           | 163                | 150          |
| L0/13                     | 139           | 136          | 106           | 115                | 118          |
| L0/14                     | 134           | 131          |               | 60                 | 86           |
| <b>Standardabweichung</b> | 31,06627812   | 41,67561809  | 46,4319779    | 37,36791553        | 21,52621141  |
| <b>Mittelwert</b>         | <b>167,25</b> | <b>150,5</b> | <b>138,75</b> | <b>106,8888889</b> | <b>103,4</b> |

Tabelle 19 (Einheit: Aktivität in Prozent der Norm)

#### Verumgruppe

| Tier                      | d0                 | d2           | d4          | d14         | d20         |
|---------------------------|--------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| L1/2                      | 210,1              | 251,9        |             |             |             |
| L1/3                      | 189,2              | 181,5        | 198         | 12,1        | 15,4        |
| L1/4                      | 194,7              | 187          | 205,7       | 6,6         | 12,1        |
| L1/6                      | 200,2              | 185,9        | 220         | 9,9         | 11          |
| L1/7                      | 145,2              | 179,3        | 239,8       | 13,2        | 28,6        |
| L1/8                      | 207,9              | 216,7        | 267,3       | 14,3        | 7,7         |
| L1/9                      | 162,8              | 189,2        | 200,2       | 5,5         | 6,6         |
| L1/10                     | 220                | 170,5        | 195,8       | 8,8         | 5,5         |
| L1/11                     | 216,7              | 216,7        | 195,8       | 9,9         | 1,1         |
| L1/12                     | 133,1              |              | 177,1       | 9,9         | 12,1        |
| L1/13                     | 127,6              | 168,3        |             | 7,7         | 15,4        |
| L1/14                     | 194,7              | 222,2        | 190,3       | 7,7         | 7,7         |
| <b>Standardabweichung</b> | 32,83570211        | 26,05440462  | 26,65341337 | 2,742991068 | 7,21013176  |
| <b>Mittelwert</b>         | <b>183,5166667</b> | <b>197,2</b> | <b>209</b>  | <b>9,6</b>  | <b>11,2</b> |

Tabelle 20 (Einheit: Aktivität in Prozent der Norm)

#### Verumgruppe der Parallelstudie zur systemischen Applikation

| Tier                | d0                 | d2                 | d4                 | d14         | d20         |
|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------|-------------|
| S2/2                | 155,1              | 243,1              | 268,4              | 11          | 7,7         |
| S2/3                | 238,7              | 313,5              | 354,2              | 8,8         | 5,5         |
| S2/4                | 152,9              | 290,4              | 308                | 8,8         |             |
| S2/5                | 167,2              | 235,4              | 270,6              | 17,6        | 22          |
| S2/6                | 132                | 317,9              | 416,9              | 24,2        | 8,8         |
| S2/7                | 176                | 336,6              | 293,7              | 14,3        | 8,8         |
| S2/8                | 218,9              | 368,5              | 399,3              | 28,6        | 7,7         |
| S2/9                | 159,5              | 297                | 309,1              | 37,4        | 37,4        |
| S2/10               | 178,2              | 333,3              | 338,8              | 9,9         | 12,1        |
| S2/11               |                    | 276,1              | 270,6              | 40,7        | 13,2        |
| S2/12               | 170,5              | 321,2              | 330                | 12,1        | 15,4        |
| S2/14               | 178,2              | 179,3              | 225,5              | 24,2        | 12,1        |
| S2/15               | 173,8              | 300,3              | 260,7              |             |             |
| <b>Mittelwert</b>   | <b>175,0833333</b> | <b>293,2769231</b> | <b>311,2153846</b> | <b>19,8</b> | <b>13,7</b> |
| <b>Standardabw.</b> | 28,70301959        | 50,13059867        | 55,70943735        | 11,17855089 | 9,089004346 |

Tabelle 21 (Einheit: Aktivität in Prozent der Norm)

## 6.9. Körpertemperatur

## Kontrollgruppe

| Tier               | d0          | d1          | d2          | d3          | d4          | d5          | d6          | d7          |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| L0/2               | 39,4        | 38,3        | 38,9        |             |             |             | 39,2        |             |
| L0/3               | 39,4        | 39          |             |             |             | 39,2        |             | 39,2        |
| L0/4               | 39,5        |             |             |             | 39,3        |             | 39,2        |             |
| L0/5               | 39,8        |             | 38,9        | 39,2        | 38,7        | 39,4        |             |             |
| L0/6               | 38,5        |             | 39,7        |             |             | 39,1        | 38,5        | 38,8        |
| L0/7               | 40,2        | 38,7        | 39,1        | 39,1        | 37,9        |             |             | 37,6        |
| L0/9               | 37,4        | 38,5        | 38          | 38,7        | 39,1        |             |             |             |
| L0/10              | 39          | 38,8        | 38          | 38,2        | 39,3        |             |             |             |
| L0/11              | 38,2        | 37,3        | 38,1        | 39,8        |             |             |             | 38,8        |
| L0/12              | 38,7        | 38,8        | 38,8        |             |             |             | 38,1        | 38,5        |
| L0/13              | 37,3        | 38,2        | 38,4        |             |             |             | 37,4        | 38,6        |
| L0/14              |             | 38,5        |             |             |             | 37,4        | 38,5        | 39          |
| Standardabweichung | 0,940599422 | 0,502770104 | 0,576868943 | 0,595818764 | 0,589915248 | 0,925112606 | 0,685322309 | 0,515936504 |
| Mittelwert         | 38,85454545 | 38,45555556 | 38,65555556 | 39          | 38,86       | 38,775      | 38,48333333 | 38,64285714 |

| Tier               | d8          | d9          | d10         | d11         | d12         | d13         | d14         |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| L0/2               | 38,8        | 39,2        | 39,3        | 39,3        |             |             | 38,9        |
| L0/3               | 39,7        | 39,3        | 39,7        |             |             | 39          |             |
| L0/4               | 39,4        | 39,4        |             |             | 39          |             | 39,3        |
| L0/5               | 39,2        |             | 39,8        |             |             | 39,6        | 39,8        |
| L0/6               | 38,6        | 37,8        |             |             | 38,1        | 39,1        | 39,3        |
| L0/7               | 38,8        | 38,8        | 39,1        | 40,7        |             |             |             |
| L0/9               | 38,6        | 39,9        | 39,7        | 41,1        |             |             |             |
| L0/10              | 37,9        | 38,9        | 39,7        | 41          |             |             | 38,6        |
| L0/11              | 39,1        | 39,4        | 41          |             |             | 38,9        | 39,5        |
| L0/12              | 38,6        | 39,5        |             |             | 37,6        | 39,5        |             |
| L0/13              | 38,9        | 39,3        |             |             | 37,8        | 39,8        |             |
| L0/14              | 39,3        |             |             | 38,4        | 40,1        |             |             |
| Standardabweichung | 0,473782331 | 0,564210363 | 0,605136742 | 1,193733639 | 1,032956921 | 0,365604522 | 0,427395211 |
| Mittelwert         | 38,90833333 | 39,15       | 39,75714286 | 40,1        | 38,52       | 39,31666667 | 39,23333333 |

| Tier               | d15         | d16         | d17         | d18        | d19         | d20         | d21         |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| L0/2               |             | 38,7        |             |            | 38,7        | 38,7        |             |
| L0/3               | 39,2        |             |             | 39,4       | 38,9        | 38,8        | 38,2        |
| L0/4               |             |             | 39          | 38,7       | 38,8        | 39          |             |
| L0/5               | 39,6        | 39,3        | 39,3        |            |             | 38,8        |             |
| L0/6               | 39,6        | 39,6        |             |            |             | 39,9        | 38,7        |
| L0/7               | 39,1        | 38,8        | 39,8        | 40         |             |             | 36,6        |
| L0/9               | 40,1        |             |             | 39,4       |             |             | 38,6        |
| L0/10              | 41          |             |             | 39,8       |             |             | 39,9        |
| L0/11              |             |             | 40,6        |            |             | 39,6        | 39,4        |
| L0/12              |             | 39,7        |             |            | 39,5        | 39,6        | 39,3        |
| L0/13              |             | 39,5        |             |            | 39,5        | 39,5        | 39,4        |
| L0/14              | 39,7        |             |             | 39,4       | 39,7        | 39,2        | 39,5        |
| Standardabweichung | 0,639940473 | 0,4226898   | 0,699404509 | 0,44609416 | 0,430890551 | 0,433012702 | 0,993870101 |
| Mittelwert         | 39,75714286 | 39,26666667 | 39,675      | 39,45      | 39,18333333 | 39,23333333 | 38,84444444 |

Tabelle 22 (Einheit: °C)

## Verumgruppe

| Tier                      | d0            | d1                 | d2                 | d3                 | d4            | d5            | d6                 | d7                 |
|---------------------------|---------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------|---------------|--------------------|--------------------|
| L1/1                      | 39,7          | 39,3               | 39,2               | 39                 | 39,1          |               |                    | 38,8               |
| L1/3                      | 40,4          | 39,4               | 39,5               |                    |               | 39,5          | 39,5               | 39,5               |
| L1/4                      | 39,3          | 39,7               |                    |                    | 39,4          | 39,4          | 39,4               | 39,7               |
| L1/6                      | 39,3          |                    |                    | 39,7               | 39,5          | 39,4          | 39,3               | 39,4               |
| L1/7                      | 39,4          | 39,3               | 38,9               | 39,1               | 39,1          |               |                    | 39,3               |
| L1/8                      | 39,6          | 39,8               | 39,3               | 39,5               |               |               | 39,3               | 39,6               |
| L1/9                      | 39,6          | 39,6               | 39,6               | 39,5               |               |               |                    | 39,6               |
| L1/10                     | 39,7          | 39,4               | 39,3               | 39,2               |               |               |                    | 39,2               |
| L1/11                     | 40,1          | 39,4               | 38,5               |                    |               |               | 39,5               | 39,5               |
| L1/12                     | 39,8          | 39,5               | 39,4               |                    |               |               |                    | 39,3               |
| L1/13                     | 39,6          | 39,2               |                    |                    |               | 38,8          |                    | 39,3               |
| L1/14                     | 39,6          | 39,2               | 39,4               |                    |               |               | 39,1               | 39,3               |
| <b>Standardabweichung</b> | 0,316586912   | 0,196329963        | 0,339116499        | 0,27325202         | 0,206155281   | 0,320156212   | 0,139727626        | 0,242462118        |
| <b>Mittelwert</b>         | <b>39,675</b> | <b>39,43636364</b> | <b>39,23333333</b> | <b>39,33333333</b> | <b>39,275</b> | <b>39,275</b> | <b>39,34285714</b> | <b>39,36666667</b> |

| Tier                      | d8                 | d9             | d10                | d11           | d12          | d13                | d14                |
|---------------------------|--------------------|----------------|--------------------|---------------|--------------|--------------------|--------------------|
| L1/1                      | 39,4               | 39,4           | 39,2               | 39,4          |              |                    | 39,1               |
| L1/3                      | 39,3               | 39,6           |                    |               | 41           | 40,5               | 40,8               |
| L1/4                      | 39,8               |                |                    | 39,6          | 39,8         | 39,7               | 39,5               |
| L1/6                      |                    |                | 39,5               | 39,4          | 39,5         | 39,5               | 39,6               |
| L1/7                      | 39,5               | 39             | 39,4               | 40,3          |              |                    |                    |
| L1/8                      | 39,5               | 39,4           | 39,8               |               |              |                    | 40,2               |
| L1/9                      | 39,6               | 39,5           | 39,8               |               |              |                    | 39,9               |
| L1/10                     | 39,3               | 39,6           | 40                 |               |              |                    | 39,8               |
| L1/11                     | 39,5               | 39,6           |                    |               |              | 39,7               | 39,7               |
| L1/12                     | 39,3               | 39,6           |                    |               |              |                    | 39,4               |
| L1/13                     | 39,3               |                |                    |               | 39,4         | 40,1               | 39,8               |
| L1/14                     | 39,3               |                |                    |               | 39,9         | 39,3               | 39,6               |
| <b>Standardabweichung</b> | 0,162927759        | 0,206587927    | 0,299443929        | 0,427200187   | 0,637965516  | 0,423702501        | 0,438385468        |
| <b>Mittelwert</b>         | <b>39,43636364</b> | <b>39,4625</b> | <b>39,61666667</b> | <b>39,675</b> | <b>39,92</b> | <b>39,74285714</b> | <b>39,77272727</b> |

| Tier                      | d15          | d16                | d17                | d18         | d19                | d20                | d21                |
|---------------------------|--------------|--------------------|--------------------|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| L1/1                      | 39,5         | 39,6               | 40                 | 39,8        |                    |                    |                    |
| L1/3                      | 40,5         | 40,2               |                    |             | 40,9               | 39,5               | 40,2               |
| L1/4                      | 39,6         |                    |                    |             | 39,4               | 39,5               | 39,5               |
| L1/6                      |              |                    |                    | 40,3        | 40,1               | 40,7               | 40,7               |
| L1/7                      | 40,4         | 40,2               | 39,9               | 40,7        |                    |                    | 39,8               |
| L1/8                      | 40,4         | 40,4               | 40,5               |             |                    |                    | 39,8               |
| L1/9                      | 39,9         | 39,4               |                    |             |                    | 40                 | 39,7               |
| L1/10                     | 39,7         | 39,6               |                    |             |                    | 39,9               | 39,4               |
| L1/11                     | 39,7         |                    |                    |             | 40,6               | 40,8               | 40,6               |
| L1/12                     | 39           |                    |                    |             | 40,6               | 41                 | 40,6               |
| L1/13                     |              |                    |                    | 40          | 39,4               | 39,8               | 39,4               |
| L1/14                     | 39,6         | 39,7               |                    |             | 39,5               | 40,2               | 39,5               |
| <b>Standardabweichung</b> | 0,476211904  | 0,386066858        | 0,321455025        | 0,391578004 | 0,642168944        | 0,559265391        | 0,50811595         |
| <b>Mittelwert</b>         | <b>39,83</b> | <b>39,87142857</b> | <b>40,13333333</b> | <b>40,2</b> | <b>40,07142857</b> | <b>40,15555556</b> | <b>39,92727273</b> |

Tabelle 23 (Einheit: °C)



## 6.10. Körpergewicht

## Kontrollgruppe

| Tier                      | d0                 | d1                 | d2          | d3          | d4            | d5             | d6          | d7            |
|---------------------------|--------------------|--------------------|-------------|-------------|---------------|----------------|-------------|---------------|
| L0/2                      | 3907               | 3680               | 3650        |             |               |                | 3559        | 3513          |
| L0/3                      | 4067               | 3855               |             |             |               | 3739           |             | 3689          |
| L0/4                      | 3821               |                    |             |             | 3568          |                | 3587        | 3523          |
| L0/5                      | 4206               |                    | 3905        | 3941        | 3857          | 3778           |             | 3771          |
| L0/6                      | 4830               |                    | 4600        |             |               | 4462           | 4397        | 4394          |
| L0/7                      | 4262               | 4156               | 4062        | 4025        | 3981          |                |             | 3781          |
| L0/9                      | 4667               | 4524               | 4475        | 4527        | 4458          |                |             |               |
| L0/10                     | 3795               | 3729               | 3603        | 3596        | 3572          |                |             |               |
| L0/11                     | 3995               | 3878               | 3783        | 3776        |               |                |             | 3656          |
| L0/12                     | 4060               | 3935               | 3884        |             |               |                | 3739        | 3692          |
| L0/13                     | 4408               | 4122               | 4011        |             |               |                | 3864        | 3875          |
| L0/14                     | 4012               | 3965               |             |             |               | 3918           | 3888        | 3815          |
| <b>Standardabweichung</b> | 324,5833226        | 256,9756798        | 342,6346451 | 350,5645447 | 366,3204881   | 334,1260999    | 305,3830382 | 248,3811811   |
| <b>Mittelwert</b>         | <b>4169,166667</b> | <b>3982,666667</b> | <b>3997</b> | <b>3973</b> | <b>3887,2</b> | <b>3974,25</b> | <b>3839</b> | <b>3770,9</b> |

| Tier                      | d8          | d9                 | d10           | d11                | d12         | d13                | d14                |
|---------------------------|-------------|--------------------|---------------|--------------------|-------------|--------------------|--------------------|
| L0/2                      | 3460        |                    |               | 3422               |             | 3427               | 3312               |
| L0/3                      | 3638        | 3603               | 3576          |                    | 3510        | 3415               |                    |
| L0/4                      | 3484        | 3435               |               | 3461               | 3387        |                    | 3295               |
| L0/5                      | 3660        |                    | 3505          |                    |             | 3393               | 3342               |
| L0/6                      | 4302        | 4248               |               |                    | 4055        | 3957               | 3880               |
| L0/7                      | 3738        | 3761               | 3661          | 3576               |             |                    |                    |
| L0/9                      | 4196        | 4108               | 4054          | 3969               |             |                    | 3811               |
| L0/10                     | 3389        | 3368               | 3348          | 3294               |             |                    | 3240               |
| L0/11                     | 3589        | 3489               | 3381          |                    |             | 3307               | 3229               |
| L0/12                     | 3611        | 3541               |               |                    | 3378        | 3305               |                    |
| L0/13                     | 3879        | 3782               |               |                    | 3872        | 3818               |                    |
| L0/14                     | 3766        |                    |               | 3727               | 3644        |                    |                    |
| <b>Standardabweichung</b> | 280,391285  | 303,4668204        | 256,8912221   | 242,366183         | 274,0846585 | 260,4879122        | 277,6853306        |
| <b>Mittelwert</b>         | <b>3726</b> | <b>3703,888889</b> | <b>3587,5</b> | <b>3574,833333</b> | <b>3641</b> | <b>3517,428571</b> | <b>3444,142857</b> |

| Tier                      | d15         | d16                | d17           | d18                | d19           | d20                | d21         |
|---------------------------|-------------|--------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------|-------------|
| L0/2                      |             | 3287               |               |                    | 3300          | 3330               |             |
| L0/3                      | 3359        |                    |               | 3356               | 3298          | 3330               | 3248        |
| L0/4                      |             |                    | 3301          | 3269               | 3336          | 3275               |             |
| L0/5                      | 3344        | 3338               | 3333          |                    |               | 3301               |             |
| L0/6                      | 3838        | 3794               |               |                    |               | 3659               | 3650        |
| L0/7                      | 3464        | 3451               | 3425          | 3415               |               |                    | 3449        |
| L0/9                      | 3773        |                    |               | 3681               |               |                    | 3632        |
| L0/10                     | 3195        |                    |               | 3133               |               |                    | 3048        |
| L0/11                     |             |                    | 3135          |                    |               | 3054               | 3038        |
| L0/12                     |             | 3263               |               |                    | 3254          | 3256               | 3263        |
| L0/13                     |             | 3733               |               |                    | 3658          | 3624               | 3624        |
| L0/14                     | 3590        |                    |               | 3499               | 3461          | 3425               | 3441        |
| <b>Standardabweichung</b> | 236,2357579 | 231,4801647        | 121,0110188   | 189,2114338        | 151,4328234   | 187,1691154        | 240,4792091 |
| <b>Mittelwert</b>         | <b>3509</b> | <b>3477,666667</b> | <b>3298,5</b> | <b>3392,166667</b> | <b>3384,5</b> | <b>3361,555556</b> | <b>3377</b> |

Tabelle 24 (Einheit: Gramm)

## Verumgruppe

| Tier                      | d0             | d1            | d2                 | d3                 | d4                 | d5          | d6                 | d7                 |
|---------------------------|----------------|---------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------|--------------------|--------------------|
| L1/1                      | 4293           | 3933          | 3921               | 3929               | 3885               | 3820        | 3689               | 3779               |
| L1/3                      | 4240           | 4247          | 4106               | 4147               | 4038               | 3994        | 3938               | 3842               |
| L1/4                      | 4633           | 4338          | 4306               | 4237               | 4128               | 4052        | 4004               | 3970               |
| L1/6                      | 4535           | 4280          | 4230               | 4132               | 4118               | 4033        | 4023               | 3983               |
| L1/7                      | 3997           | 3892          | 3774               | 3767               | 3756               |             |                    | 3706               |
| L1/8                      | 4490           | 4255          | 4174               | 4145               |                    |             | 4063               | 4047               |
| L1/9                      | 3568           | 3491          | 3335               | 3315               |                    |             | 3175               | 3163               |
| L1/10                     | 3434           | 3319          | 3217               | 3314               |                    |             | 3145               | 3140               |
| L1/11                     | 3492           | 3385          | 3287               |                    |                    | 3207        | 3127               | 3131               |
| L1/12                     | 3608           | 3447          | 3391               |                    |                    | 3338        | 3317               | 3283               |
| L1/13                     | 3602           | 3438          |                    |                    | 3378               | 3369        | 3384               | 3366               |
| L1/14                     | 3583           | 3437          | 3396               | 3359               | 3420               |             | 3330               | 3336               |
| <b>Standardabweichung</b> | 457,1158845    | 408,7378578   | 424,2150612        | 390,8201135        | 314,8639162        | 362,4700973 | 384,0301598        | 358,7267467        |
| <b>Mittelwert</b>         | <b>3956,25</b> | <b>3788,5</b> | <b>3739,727273</b> | <b>3816,111111</b> | <b>3817,571429</b> | <b>3645</b> | <b>3563,181818</b> | <b>3562,166667</b> |

| Tier                      | d8                 | d9            | d10           | d11           | d12                | d13           | d14         |
|---------------------------|--------------------|---------------|---------------|---------------|--------------------|---------------|-------------|
| L1/1                      | 3760               | 3726          | 3698          | 3656          |                    |               | 3652        |
| L1/3                      | 3806               | 3786          |               |               | 3671               | 3613          | 3586        |
| L1/4                      | 3934               |               |               | 3777          | 3709               | 3659          | 3595        |
| L1/6                      |                    |               | 3791          | 3754          | 3730               | 3707          | 3721        |
| L1/7                      | 3669               | 3632          | 3621          | 3492          |                    |               | 3358        |
| L1/8                      | 3976               | 3965          | 3880          |               |                    | 3673          | 3571        |
| L1/9                      | 3127               | 3091          | 3042          | 2961          | 2930               | 2939          | 2880        |
| L1/10                     | 3105               | 3044          | 3047          | 2892          | 2900               | 2943          | 2891        |
| L1/11                     | 3112               | 3102          | 3014          | 3025          | 3045               | 3008          | 2988        |
| L1/12                     | 3216               | 3234          | 3160          | 3071          | 3156               | 3118          | 3117        |
| L1/13                     | 3365               | 3320          | 3270          | 3274          | 3281               | 3218          | 3214        |
| L1/14                     | 3351               | 3249          | 3318          | 3290          | 3202               | 3195          | 3183        |
| <b>Standardabweichung</b> | 342,1902448        | 332,311584    | 333,5650694   | 333,9636707   | 332,0026774        | 320,5900983   | 307,532999  |
| <b>Mittelwert</b>         | <b>3492,818182</b> | <b>3414,9</b> | <b>3384,1</b> | <b>3319,2</b> | <b>3291,555556</b> | <b>3307,3</b> | <b>3313</b> |

| Tier                      | d15                | d16           | d17           | d18                | d19                | d20           | d21         |
|---------------------------|--------------------|---------------|---------------|--------------------|--------------------|---------------|-------------|
| L1/1                      | 3641               | 3612          | 3602          | 3523               |                    |               | 3510        |
| L1/3                      | 3479               | 3405          |               |                    | 3209               |               | 3149        |
| L1/4                      | 3562               |               |               | 3569               | 3110               | 3564          | 3503        |
| L1/6                      |                    |               | 3633          | 3542               | 3501               | 3435          | 3409        |
| L1/7                      | 3325               | 3226          | 3198          | 3166               | 2953               | 3078          |             |
| L1/8                      | 3523               | 3491          | 3430          | 3180               | 3313               | 3267          | 3140        |
| L1/9                      | 2850               | 2836          | 2821          | 2800               | 2800               | 2784          | 2766        |
| L1/10                     | 2867               | 2830          | 2780          | 2752               | 2691               | 2717          | 2782        |
| L1/11                     | 2986               | 2960          | 2927          | 2902               | 2874               | 2859          | 2809        |
| L1/12                     | 3155               | 3135          | 3071          | 2948               | 3008               | 3008          | 2968        |
| L1/13                     | 3159               | 3152          | 3112          | 3125               | 3124               | 3119          | 3174        |
| L1/14                     | 3097               | 3135          | 3135          | 3223               | 3160               | 3127          | 3121        |
| <b>Standardabweichung</b> | 282,6479339        | 264,6010834   | 301,2398269   | 292,9324464        | 234,3439198        | 272,8242413   | 273,1010802 |
| <b>Mittelwert</b>         | <b>3240,363636</b> | <b>3178,2</b> | <b>3170,9</b> | <b>3157,272727</b> | <b>3067,545455</b> | <b>3095,8</b> | <b>3121</b> |

Tabelle 25 (Einheit: Gramm)

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

## 7.1. nach Folge der Erwähnung (nach numerischer Reihenfolge)

- <sup>1</sup> CODIVILLA, A.: On the means of lengthening in the lower limbs, the muscles and tissues which are shortened through deformity. *Am J Orthop Surg* 11: 353, **1905**
- <sup>2</sup> CODIVILLA, A.: Come si possa rendere efficace e tollerata una fort trazione applicata all'arto inferiore. *Mem Chir Publ* 2: 3, **1903**
- <sup>3</sup> BIER, A.: Über Knochenregeneration und über Pseudarthrosen. *Arch Klin Chir* 127: 1, **1923**
- <sup>4</sup> BLOCK, W.: Ein neuer Distraktionsapparat und Spannbügel für die Drahtextension. *Zentralbl Chir* 46/47, **1923**
- <sup>5</sup> KLAPP, R.; BLOCK, W.: Die Knochenbruchbehandlung mit Drahtzügen. *Urban und Schwarzenberg, Berlin*, **1930**
- <sup>6</sup> WITTMOSER, R.: Zur Druckosteosynthese. *Langenbecks Arch Klin Chir* 276: 229, **1953**
- <sup>7</sup> ILIZAROV, G. A.: The Tension-Stress Effect on the Genesis and Growth of Tissues. *Clin Orthop Rel Res* 238: 249-281, **1989**
- <sup>8</sup> PLENK, H.: Knochengewebe und Zähne. In *Romeis: Mikroskopische Technik, 17. neubearbeitete Auflage*; Hrsg. P. Böck, Urban & Schwarzenberg; München, Wien, Baltimore: 553, **1989**
- <sup>9</sup> FROST, H. M.: Bone Dynamics in metabolic bone disease. *J Bone Joint Surg* 48A: 1192-1203, **1966**
- <sup>10</sup> HAM, A. W.: Some Histophysiological problems peculiar to calcified tissues. *J Bone Joint Surg* 34A: 701, **1952**
- <sup>11</sup> HOLTROP, M. E.: The ultrastructure of bone. *Ann Clin Lab Sci* 5: 264, **1975**
- <sup>12</sup> KERN, H. F.: Allegorie zitiert aus einer Kursstunde "Histologie für Zahnmediziner", gehalten an der Philipps-Universität Marburg im Wintersemester **1988/89**.
- <sup>13</sup> SCHENK, R.; WILLENEGGER, H.: Zur Histologie der primären Knochenheilung. Modifikationen und Grenzen der Spaltheilung in Abhängigkeit von der Defektgröße. *Unfallheilkunde* 80: 155, **1977**
- <sup>14</sup> BIRKENHAUER, B.: Die zelluläre Interaktion während der Osteogenese - Ein morphologisch und funktionell gegliedertes Modell. *Inaugural-Dissertation an der Philipps-Universität Marburg, Klinik für Unfallchirurgie*, **1995**.
- <sup>15</sup> BIER, A.: Die Bedeutung des Blutergusses für die Heilung des Knochenbruches. Heilung von Pseudarthrosen und von verspäterter Callusbildung durch Bluteinspritzung. *Med Klin* 1: 6, **1905**
- <sup>16</sup> TASHIBANA, T.; MATSUBARA, T., et al.: Enhancement of new bone formation by hematoma at fracture site. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi*, 65(5): 349-358, **1991**
- <sup>17</sup> GAZIT, D.; KARMISH, M. et al.: Regenerating marrow induces systemic increase in osteo- and chondrogenesis. *Endocrinology*, 126 (5): 2607-2613, **1990**
- <sup>18</sup> URIST, M.R.; DELANGE, R.J.; FINERMAN, G.A.: Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 220: 680-686, **1983**
- <sup>19</sup> CANALIS, E.; MCCARTHY, T.; CENTRELLA, M.: Identity of bone derived growth factor with  $\beta$ 2-Mikroglobulin. *J Bone Mineral Res* 2 (Suppl. 1): 532, **1987**
- <sup>20</sup> TRIFFITT, J. T.: Initiation and enhancement of bone formation. *Acta Orthop Scand* 58: 673-684, **1987**
- <sup>21</sup> JAWORSKI, Z. F. G.: Coupling of bone formation to bone resorption: A broader view. *Calcif Tissue Int* 36: 531, **1984**
- <sup>22</sup> SCHULZ, A.: Knochenstruktur: physiologische und pathologische Knochenumbauvorgänge. *Sandorama* 5: 25-31, **1988**
- <sup>23</sup> TAYLOR, H. G.; WEISS, J. B.; MCLAUGHLIN, B.; DAWES, P. T.: Raised endothelial cell stimulating angiogenesis factor in ankylosing spondylitis. *Clin Experim Rheumatol* 11 (5): 537-539, **1993**
- <sup>24</sup> RAISZ, L. G.; KREAM, B. E.: Regulation of bone formation (first of two parts). *The New England Journal of Medicine* 309 (1): 29-35, **1983**
- <sup>25</sup> ROSEN, E. M.; GRANT, D. S.: Scatter factor (hepatocyte growth factor) is a potent angiogenesis factor in vivo. *Clin Exp Rheumatol* 47: 227-234, **1993**
- <sup>26</sup> THOMPSON, W. D.; HARVEY, J. A., et al.: Fibrinolysis and angiogenesis in wound healing. *J Pathol.*, 165 (4): 311-318, **1991**
- <sup>27</sup> LILIENFELD-TOAL, H. VON: Wachstumsfaktoren und Knochenremodellierung. In: *Aktuelle Aspekte der Osteologie*; Ittel, T. H., Sieberth, H. G., Matthiaß, H. H. (Hrsg.); Berlin, Heidelberg: Springer **1992**.
- <sup>28</sup> KOCH, A. E.; POLVERINI, P. J.: Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*, 258 (5089): 1798-1801, **1992**

- <sup>29</sup> SCHULTZ, G. S.; GRANT, M. B.: Neovascular growth factors. *Eye*, 5 (Pt 2): 170-180, **1991**
- <sup>30</sup> ZHENG, M. H.; WOOD, D. J., et al.: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances expression of IL-6 and TGF  $\beta_1$  genes in normal human osteoblast-like cells. *J Cell Physiol* 159 (1): 76-82, **1994**
- <sup>31</sup> MOHAN, S.; BAYLINK, D. J.: Bone growth factors. *Clin Orthop.*, 263: 30-48, **1991**
- <sup>32</sup> RODAN, G. A.: Introduction of Bone Biology. *Bone*, 13 Suppl 1: 3-6, **1992**
- <sup>33</sup> HOCK, J. M.; CANALIS, E.: Platelet-Derived-Growth-Factor enhances bone cell replication, but not differentiates function of osteoblast. *Endocrinology*, 134 (3): 1423-1428, **1994**
- <sup>34</sup> TAKESHITA, A.; HANAZAWA, S.; AMANO, S.; MATUMOTO, T., KITANO, S.: IL-1 induces expression of monocyte chemoattractant JE in clonal mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1. *Journal of Immunology*, 150 (4): 1554-1562, **1993**
- <sup>35</sup> FULLER, K.; GALLAGHER, A. C. et al.: Osteoclast resorption stimulating activity is associated with the osteoblast cell surface and/or the extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun*, 181 (1): 67-73, **1991**
- <sup>36</sup> PECK, W. A.; RIFAS, L. et al.: Macrophages release a peptide stimulator of osteoblasts growth. *Ann Biol Clin Paris*, 43 (5): 751-754, **1985**
- <sup>37</sup> SEITZ, R.; KEHNEN, G.; KÜSTERS, G., EGBRING, R.: Pathogenetic causes of acquired factor XIII deficiency. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg: S. E1, 1991*
- <sup>38</sup> SILBERZAHN, J.: Factor XIII and wound-healing impairments in ENT. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg: S. F7, 1991*
- <sup>39</sup> LANG, D.: Einsatz von Faktor XIII bei verzögerter Knochenneubildung. *Die Gelben Hefte* 18: 91-92, **1978**
- <sup>40</sup> SALZMANN, G.: Einsatz von Faktor XIII bei verzögerter Knochenneubildung. *Die Gelben Hefte* 16: 129-130, **1976**
- <sup>41</sup> GERNGROSS, H.; CLAES, L.: Successful treatment of pseudarthrosis with human placenta factor XIII concentrate. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg: S. F8, 1991*
- <sup>42</sup> GERNGROSS, H.; STEINMANN, R.; GRAF, K.: Faktor XIII und Knochenheilung. *Med Welt* 38: 1533-1538, **1987**
- <sup>43</sup> SCHLENZKA, R.; v. GARREL, T.; PISTOR, C.: Does Fibrogammin significantly accelerate bone healing? *J Bone Joint Surg*, 75 [B] Supp 2: 100, **1993**
- <sup>44</sup> STÜCKER, R.; BRINKMANN, C.; HÄRLE, A; Orthopädische Klinik, Universität Freiburg: Ergebnisse der Behandlung der hämatogenen Osteomyelitis mit Septopalketten. *Orthopädische Mitteilungen* 3 164, **1992**
- <sup>45</sup> WEI, G.; KOTOURA, Y; OKA, M. et. al.; Kyoto University, Japan: Bioabsorbable Delivery System for Antibiotic Treatment of Osteomyelitis. *Journal of Bone and Joint Surgery [Br]* 73-B: 246-52, **1991**
- <sup>46</sup> SOLHEIM, E.; PINHOLT, E. M. et. al.: Inhibition of Heterotopic Osteogenesis in Rats by a New Bioerodible System for Local Delivery of Indomethacin. *American Journal of Bone and Joint Surgery* 74-A: 705-711, **1992**
- <sup>47</sup> PRITCHETT, J. W.; Dept. of Orthopaedics, University of Washington and Pacific Medical Center, Seattle: Human Growth Hormone in polymethyl methacrylate. *Acta Orthop. Scand.* 63 (5): 520-522, **1992**
- <sup>48</sup> KIRKEBY, O. J.; EKELAND, A.: No effects of local Somatomedin C on bone repair - Continuous infusion in rats. *Acta Orthop. Scand* 63 (4): 447-450, **1992**
- <sup>49</sup> KELLER, J.; SCHUMACHER, B.; LIND M.: Effect of local Prostaglandin E<sub>2</sub> on periosteum and muscle in rabbits. *Acta Orthop. Scand.* 63 (6): 623-627, **1992**
- <sup>50</sup> GROSSE-SIESTRUP, CH.; BÜCHERL, E. S.: Katheter- und Kabel- Dauerhautdurchleitungen. *Z. Versuchstierkunde* 19: 320, **1977**
- <sup>51</sup> STRESEMANN, E., AST, D.; TUSL, M: Erfahrungen mit der Implantation von arteriellen Verweilkathetern bei der Ratte. *Z. für Versuchstierkunde* 13: 51-58, **1971**
- <sup>52</sup> PFRIMMER, W. et al.: Methodische und technische Probleme der langfristigen Infusionstherapie mit dem Cava-Katheter. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaften* 2: 254-271, **1972**
- <sup>53</sup> BURRI, C.; GASSNER, D.: Der Vena-cava-Katheter. *Anaesthesiology und Wiederbelebung* 54, Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag **1971**
- <sup>54</sup> LEONHARDT, F.J.: Ein neues System zum Katheterismus der V. cava bei Ratten für Langzeitinfusionen (Implantofix®). *Z. für Versuchstierkunde* 32, VEB Gustaf Fischer Verlag, Jena: 171-178, **1989**

- 55 BODZIONY, J.; SCHWILLE, P. O.: Subcutaneous cannula in the jugular and femoral vein - a tool for frequent blood sampling and infusions in the rat. *Z. Versuchstierkunde* 27: 29-32, **1985**
- 56 RASCHE, H.: Blutgerinnungsfaktor XIII und Fibrinstabilisierung. *Klin Wschr* 53: 1137-1145, **1975**
- 57 DASCHNER, F.: Antibiotikatherapie am Krankenbett, 5. Auflage, *Springer-Verlag* **1990**, Ss. 35, 50.
- 58 PISTOR, C.: Die Distractionsosteosynthese langer Röhrenknochen als standardisiertes Verfahren zur histomorphometrischen Beurteilung der Wirkung des Blutgerinnungsfaktors XIII auf die Knochenheilung; *Inaugural-Dissertation an der Philipps-Universität Marburg, Klinik für Unfallchirurgie*, **1992**.
- 59 BRÄUER, T.: Pharmakologische Osteoinduktion durch systemische Gabe von Blutgerinnungsfaktor XIII - Eine Dosisfindungsstudie. *Inaugural-Dissertation an der Philipps-Universität Marburg, Klinik für Unfallchirurgie*, **1995**.
- 60 PREVOT, J.; PONCELET, T.; LASCOMBES, P. et al.: L'ostéogénèse en distraction chez l'animal soumis à une chimiothérapie anti-cancéreuse. Etude expérimentale chez le lapin. *Revue de chirurgie orthopédique et réparatrice de l'appareil moteur Paris*. 74 Supplément 2: 98-100, **1988**
- 61 KORKALA, O.; KARAHARJU E. et al.: Experimental Lengthening of Tibial Diaphysis: Gap Healing With or Without Gradual Distraction. *Arch. Orthop. Trauma. Surg.* 107: 172-175, **1988**
- 62 RICHTER, M.; SOSNA, A.; I. Orthopädische Klinik, Praha: Die Vaskularisierung des Knochenregenerates nach Verlängerungsoperation im distalen Tibiadrittel. *Orthop. Mitteilungen* 3: 50, **1992**
- 63 KOJIMOTO, H.; YASUI, N. et al.: Bone lengthening in rabbits by callus distraction. The role of periosteum and endosteum. *J. Bone Joint Surg. [Br]* 70-B: 543-9, **1988**
- 64 WHITE, S. H.; KENWRIGHT, J.; Nuffield Orthopaedic Centre, Oxford: The Timing of Distraction of an Osteotomy. *J. Bone Joint Surg. [Br]* 72-B: 356-61, **1990**
- 65 DE BASTIANI, G.; ALDEGHERI, R. et al.: Limb lengthening by callus distraction (callotaxis). *J. Pediatr. Orthop.* 7: 129-34, **1987**
- 66 FICKENSCHER, K.; AAB, A.; STÜBER, W.: A Photometric Assay for Blood Coagulation Factor XIII. *Thromb. Haemostas.* 65: 535-540, **1991**
- 67 SOLLEDER, E.; DEMUTH, D. et al.: Klinische Prüfung eines neuen Photometrischen Tests zur Bestimmung der Faktor-XIII-Aktivität im Plasma. *Lab. Med.* 16: 48-53, **1992**
- 68 SKRZYŃIA, C.; REISNER, H.M.; MCDONAGH, J.: Characterization of the catalytic subunit of factor XIII by radioimmunoassay. *Blood* 60: 1089, **1982**
- 69 PUCKET, W. O.: The methacrylate plastics as mounting media for biological materials. *Anat. Rev.* 80: 453, **1941**
- 70 ROOFE, P. G.; HOECKER, F. E.; VORHEES, C. D.: A rapid bone sectioning technic. *Proc. Soc. exp. Biol.* 72: 619, **1949**
- 71 KROPP, B. M.: Grinding thin sections of plastic-embedded bone. *Stain Technol.* 29: 77, **1954**
- 72 BOELLAARD, J. W.; VON HIRSCH, TH.: Die Herstellung histologischer Schnitte von nicht entkalkten Knochen mittels Einbettung in Methacrylatsäureester. *Mikroskopie* 13: 386, **1959**
- 73 SCHENK, R.: Zur histologischen Verarbeitung von unentkalkten Knochen. *Acta anat.* 60: 3, **1965**
- 74 BURKHARDT, R.: Präparative Voraussetzungen zur klinischen Histologie des menschlichen Knochenmarks. *Blut* 13: 337, **1966**
- 75 KATTHAGEN, B. D.; BECHTEL, U.: Technik der unentkalkten Knochenhistologie und -histomorphometrie. *mta-journal* 7 4: 164-172, **1985**
- 76 ROMEIS: Mikroskopische Technik. 17. neubearbeitete Auflage, Hrsg. P. Böck. Urban & Schwarzenberg; München, Wien, Baltimore **1989**.
- 77 PLENK, H.: Knochengewebe und Zähne; Romeis: Mikroskopische Technik, 17. neubearbeitete Auflage; Hrsg. P. Böck, Urban & Schwarzenberg; München, Wien, Baltimore **1989**
- 78 KATTHAGEN, B. D.: Knochenregeneration mit Knochensatzmaterialien - eine tierexperimentelle Studie. *H. Unfallheilk.* 178: 64, **1986**
- 79 REVELL, P. A.: Histomorphometry of bone. *J. Clin. Pathol.* 36: 1323-1331, **1983**
- 80 SCHIEBLER, T. H.: Histologie: Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen; unter Berücksichtigung der Histophysiologie; nach d. amerikan. Ausg. von L. C. Junqueira u. J. Carneiro/übers., überarb. u. erg. von T.H. Schiebler, U. Peiper u. Fr. Schneider. - 2., korrigierte Aufl.-Berlin; Heidelberg; New York; Paris; Tokyo: Springer **1986**.
- 81 PARFITT, A. M. et al.: Bone Histomorphometry: Standardization of Nomenclature, Symbols, and Units - Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *Journal of Bone and Mineral Research* 6 (1987) 2: 595-610.
- 82 GUNDERSEN, G.; ØSTERBY, R.: Estimation of True Lamina Thickness From Apparent Width. *Metab. Bone Dis. et Rel. Res.* 2: 281-289, **1980**

- <sup>83</sup> WEIBEL, E. R.: Stereological Methods, Practical Methods for Biological Morphometry. *Academic Press* 1, **1979**
- <sup>84</sup> KIMMEL, D. B.; JEE, W. S. S.: Measurements of area, perimeter, and distance: Details of data collection in bone histomorphometry. *Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation*, Robert R. Recker, MD. (Hrsg.) CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida U. S. A. **1983**.
- <sup>85</sup> VAN DIEST, P. J.; BAAK, J. P. A.: Morphometry. *Comprehensive Cytopathology*; Marluce Bibbo, MD. (Hrsg.), Saunders **1971**.
- <sup>86</sup> BEYER, W. F.; BÖHRINGER, M. E. ; BAIL, H. ; KURTZ, T.: Inter- und intraindividuelle Meßgenauigkeit beim Einsatz eines Bildanalyse-Systems in der Knochenhistomorphometrie. *Aktuelle Aspekte der Osteologie*; Ittel, T. H., Sieberth, H. G., Matthiaß, H. H. (Hrsg.); Berlin, Heidelberg: Springer **1992**.
- <sup>87</sup> ROMPPANEN, T.: Postembryonic development of the chicken bursa of Fabricius: A light microscopic histoquantitative study. *Poult Sci* 61: 2261-2270, **1982**
- <sup>88</sup> DELESSE, M. A.: Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. *Annales des Mines* 13: 379-88, **1848**
- <sup>89</sup> ROSIWAL, A.: Über geometrische Gesteinsanalysen. *Verh. k. k. Geol. Reichsanstalt, Wien*: 143, **1898**
- <sup>90</sup> AHERNE, W. A.; DUNNILL, M. S.: Morphometry, Edward Arnold, London, **1982**
- <sup>91</sup> KIMMEL, D. B.: A Light Microscopic Description of Osteoprogenitor Cells of Remodeling Bone in the Adult. *Bone Histomorphometry - Third International Workshop, Sun Valley May 28/June 2 1980*; W.S.S. Jee, A. M. Parfitt (Hrsg.); Société Nouvelle de Publication Médicales et Dentaires, 75009 Paris, France, **1980**.
- <sup>92</sup> RÜSCHOFF, J.: Methoden der lichtmikroskopischen Morphometrie. *Romeis: Mikroskopische Technik*, 17. neubearbeitete Auflage; Hrsg. P. Böck, Urban & Schwarzenberg; München, Wien, Baltimore **1989**, 327-38.
- <sup>93</sup> OLAH, A. J.: Influence of microscopic resolution on the estimation of structural parameters in cancellous bone. *Meunier, P. J. (Hrsg.), Bone Histomorphometry, 2nd International Workshop. Société de la Nouvelle Imprimerie Fournié: Toulouse, France, 1976*: 55-61.
- <sup>94</sup> BORTZ, J.: Statistik für Sozialwissenschaftler/Jürgen Bortz.-3., neubearb. Aufl.- Berlin; Heidelberg; New York; Tokyo: Springer **1989**, Ss. 178ff,850
- <sup>95</sup> SCHENK, R.: Biology of fracture repair. In: 'Skeletal Trauma', Browner, Jupiter, Levine, Trafton (Hrsg.), W. B. Saunders Company, Philadelphia: Kapitel 2, 31-75, **1992**
- <sup>96</sup> NAKAMURA, E., MIZUTA, H. et al.: Knee articular cartilage injury in leg lengthening. Histological studies in rabbits. *Acta Orthop Scand*, 64 (4): 437-440, **1993**
- <sup>97</sup> BENTLEY, G.; GREER, R. B.: The fate of chondrocytes in endochondral ossification in the rabbit. *J Bone Joint Surg* 52 [B]: 571-577, **1970**
- <sup>98</sup> BOSKEY, A. L.: Current concepts of the physiology and biochemistry of calcification. *Clin Orthop* 157: 225-257, **1981**
- <sup>99</sup> LOWE, J.; STEIN, H.; SELA, J.: Primary calcification in remodeling haversian systems following tibial fracture in rats. *Clin Orthop* 176: 291, **1983**
- <sup>100</sup> BONUCCI, E.: Fine structure of early cartilage calcification. *J Ultrastruct Res* 20: 33, **1976**
- <sup>101</sup> BASSETT, C. A. L.; HERRMANN, I.: Influence of oxygen concentrations and mechanical factors on differentiation of connective tissues in vitro. *Nature* 190: 460, **1961**
- <sup>102</sup> PAUWELS, F.: Eine neue Theorie über den Einfluß mechanischer Reize auf die Differenzierung der Stützgewebe. *Z Anat Entwickl-Gesch* 121: 478-515, **1960**
- <sup>103</sup> KROMPECHER, S.: Die Knochenbildung. *Gustav Fischer Verlag, Jena*, **1937**
- <sup>104</sup> FROST, H. M.: Bone Remodeling Dynamics. *Springfield, IL, Charles C. Thomas*, **1963**
- <sup>105</sup> SCHENK, R.: Histomorphologische und physiologische Grundlagen des Skelettwachstums. In: B. G. Weber, Brunner, Freuler: *Die Frakturbehandlung bei Kindern und Jugendlichen*, Springer: 3-20, **1978**
- <sup>106</sup> URIST, M. R.: Bone: formation by autoinduction. *Science* 150 (698): 893-899, **1965**
- <sup>107</sup> KATTHAGEN, B. D.: Knochenregeneration mit Knochenersatzmaterialien - eine tierexperimentelle Studie. *H. Unfallheilk.* 178: 13, **1986**
- <sup>108</sup> EGER, W.: Kalziumnachweis und Mineralisation des Knochengewebes. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*, 47. Tagung, Fischer, Stuttgart: 54, **1963**
- <sup>109</sup> NERLICH, A.; KIRSCH, T.; WIEST, I.; VON DER MARK, K.: Verteilungsmuster von Kollagen X bei der fetalen und juvenilen Knorpel-Knochen-Entwicklung. In: T. H. Ittel, H. G. Sieberth, H. H. Matthiaß (Hrsg.): *Aktuelle Aspekte der Osteologie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg **1992**
- <sup>110</sup> HALL, B. K.: Earliest evidence of cartilage and bone development in embryonic life. *Clin Orthop* 225: 255, **1987**

- <sup>111</sup> MUNDLOS, S.; WINTERPACHT, A.; ZABEL, B.: Expression von Matrixgenen während der Skelettentwicklung. *Osteologie, Suppl. 1, Bd. 1*: 56, **1992**
- <sup>112</sup> TERMINE, J.; KLEINMAN, H.; WHITSON, W. et al.: Osteonectin, a bone specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26: 99, **1981**
- <sup>113</sup> KATTHAGEN, B. D.: Knochenregeneration mit Knochenersatzmaterialien - eine tierexperimentelle Studie. *H. Unfallheilk. 178*: 11-13, **1986**
- <sup>114</sup> HANCOX, N. H.: Biology of bone. *Cambridge University Press, Cambridge*, **1972**
- <sup>115</sup> OWEN, M.: Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. In: *Peck, W. A. (Hrsg.): Bone and Mineral Research. Elsevier 3*: 1-25, **1985**
- <sup>116</sup> OWEN, M.: Histogenesis of bone cells. *Calcif Tissue Res* 25 (3): 205-207, **1978**
- <sup>117</sup> DAL MONTE, A.; DONZELLI, O.: Tibial lengthening according to Ilizarov in congenital hypoplasia of the leg. *J Pediatr Orthop* 7: 135-138, **1987**
- <sup>118</sup> DE BASTIANI, G.; ALDEGHERI, R.; RENZI BRIVIO, L.; TRIVELLA, G.: Limb lengthening by distraction of the epiphyseal plate: a comparison of two techniques in the rabbit. *J Bone Joint Surg [Br]* 68B: 545-549, **1987**
- <sup>119</sup> KAWAMURA, B.; HOSONO, S.; TAKAHASHI, T. et al.: Limb lengthening by means of subcutaneous osteotomy: experimental and clinical studies. *J Bone Joint Surg [Am]* 50A: 851-871, **1968**
- <sup>120</sup> FRIEDENSTEIN, A. J.: Determined and inducible osteogenic precursor cells. In: *Hard tissue growth repair and remineralization. Ciba Foundation Symposium Elsevier. Excerpta-Medica, Amsterdam*: 169-185, **1973**
- <sup>121</sup> OWEN, M.: Cell population kinetics of an osteogenic tissue. *J Cell Biol* 19: 19, **1963**
- <sup>122</sup> REDDI, A. H.; HUGGINS, C.: Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 1601-1605, **1972**
- <sup>123</sup> THIELEMANN, F. W.; ALEXA, M.; SCHMIDT, G.: Matrix-induced intramembranous osteogenesis. In: *Silbermann, M.; Slavkin, D. C.F.: Current Advances in Skeletogenesis: Development, Biomaterialization, Mediators and Metabolic Bone Disease. jExcerpta Medica, Amsterdam*: 66-73, **1982**
- <sup>124</sup> SCHWEIBERER, L.; HALLFELD, K.; MANDELKOW, J.: Pathophysiologie der Knochen transplantation: Grundlagen und klinische Anwendung. *Hefte zur Unfallheilkunde 179: Defektüberbrückung an Knochen und Weichteilen, Springer, Berlin, Heidelberg*: 160-170, **1987**
- <sup>125</sup> BENTZ, H.; NATHAN, R. M. et al.: Purification and characterization of a unique osteoinductive factor from bovine bone. *J Biol Chem*, 264 (34): 20805-20810, **1989**
- <sup>126</sup> BAYLINK, D. J.; FARLAY, J.; HOWARD, G.; DRIVDAHL, R.; PUZAS, E. et al.: Coupling Factor. In: *Massry, S. G.; Letteri, L. M.; Ritz, E.: Regulation of phosphate and mineral metabolism. Plenum, New York*: 409-420, **1982**
- <sup>127</sup> CANALIS, E.; PECK, W.; RAISZ, L. G.: Stimulation of DNA and collagen synthesis by autologous growth factor in cultured fetal rat calvaria. *Science* 210: 1021-1023, **1980**
- <sup>128</sup> BENFER, J.; STRUCK, H.: Experimental Studies on fracture healing. III. Accelerated fracture healing through soluble heterologous collagen. *Arch Surg* 106: 838-842, **1973**
- <sup>129</sup> SHARMA, S.; GARG, N. K.; VELIATH, A. J.; SUBRAMANIAN, S.; SRIVASTAVA, K. K.: Percutaneous bone-marrow grafting in Osteotomies and bony defects in rabbits. *Acta Orthop Scand* 63 (2): 166-169, **1992**
- <sup>130</sup> YASKO, A. W.; LANE, J. M.; FELLINGER, E. J.; ROSEN, V.; WOZNEY, J. M.; WANG, E. A.: The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg [Am]* 74-A (5): 659-670, **1992**
- <sup>131</sup> ENGSÆTER, L. B.; SUDMANN, B.; SUDMANN, E.: Fracture healing in rats by locally administered indomethacin. *Acta Orthop Scand* 63 (3): 330-333, **1992**
- <sup>132</sup> ROBBINS, K.C.: A study of the conversion of fibrinogen to fibrin. *Amer J Physiol* 142: 581-588, **1944**
- <sup>133</sup> LAKI, K.; LORAND, L.: On the solubility of fibrin clots. *Science* 108: 280, **1948**
- <sup>134</sup> HOLBROOK, J.J.; COOKE, R.D.; KINGSTON, I.B.: The amino acid sequence around the reactive cysteine residue in human plasma factor XIII. *Biochem J* 135: 901, **1973**
- <sup>135</sup> MCDONAGH, J.: Structure and Function of Factor XIII. In: *Menostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Hrsg.: R. W. Colman, J. Hirsch, V. J. Marden, E. W. Salzman. Philadelphia, J. B. Lippincott Company: Chapter 18, Ss. 289-300*, **1987**
- <sup>136</sup> SCHWARTZ, M.L.; PIZZO, S.V.; HILL, R.L.; MCKEE, P.A.: Human factor XIII from plasma and platelets: Molecular weights, subunit structure, proteolytic activation and cross-linking of fibrinogen and fibrin. *J Biol Chem* 248: 1395, **1973**
- <sup>137</sup> LOPACIUK, S.; LOVETTE, K.M.; MCDONAGH, J et al.: Subcellular distribution of fibrinogen and factor XIII in human plasma and platelets. *Thromb Res* 8: 453, **1976**

- 138 McDONAGH, J.; McDONAGH, R.P.; DELAGE, J.M.; WAGNER, R.H.: Factor XIII in human plasma and platelets. *J Clin Invest* 48: 940, **1969**
- 139 JOIST J.H.; NIEWIAROWSKI, S.: Retention of platelet fibrin-stabilizing-factor during the platelet release reaction and clot retraction. *Thromb Diath Haemorrh* 29: 679, **1973**
- 140 KASAHARA, K.; TAKAGI, J.; SEKIYA, F.; INADA, Y.; SAITO, Y.: "A" subunit of factor XIII is present on bovine platelet membrane and mediates collagen-induced platelet aggregation. *Thromb Res* 50 (2): 253-263, **1988**
- 141 ADÁNY, R.; FODOR, F.; MOLNÁR, P. et al.: Increased density of histiocytes containing factor XIIIa in uterine leiomyomas. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg: S. A10, 1991*
- 142 POON, M.C.; RUSSELL, J.A.; LOW, S. et al.: Hemopoietic origin of factor XIII A subunits in platelets, monocytes, and plasma. Evidence from bone marrow transplantation studies. *J Clin Invest* 84 (3): 787-792, **1989**
- 143 WEISBERG, L.J.; SHIU, D.T.; GREENBERG, C.S.; KAN, Y.W.; SHUMAN, M.A.: Localization of the gene for coagulation factor XIII a-chain to chromosome 6 and identification of sites of synthesis. *J Clin Invest* 79 (2): 649-652, **1987**
- 144 WEISBERG, L.J.; SHIU, D.T.; CONKLING, P.R.; SHUMAN, M.A.: Identification of normal human peripheral blood monocytes and liver as sites of synthesis of coagulation factor XIII a-chain. *Blood* 70 (2): 579-582, **1987**
- 145 WOLPL, A.; LATTKE, H.; BOARD, P.G.; ARNOLD, R. et al.: Coagulation factor XIII A and B subunits in bone marrow and liver transplantation. *Transplantation* 43 (1): 151-153, **1987**
- 146 NAGY, J.A.; HENRIKSSON, P.; McDONAGH, J.: Biosynthesis of factor XIII B subunit by human hepatoma cell lines. *Blood* 68 (6): 1272-1279, **1986**
- 147 JANUS, T.J.; LEWIS, S.D.; LORAND, L.; SHAFER, J.A.: Promotion of thrombin-catalyzed activation of factor XIII by fibrinogen. *Biochemistry* 22: 6269, **1983**
- 148 MATSUDA, T.; SAITO, M.; ASAKURA, H.; YOSHIDA, T. et al.: A familial factor XIII subunit B deficiency. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg: S. D5, 1991*
- 149 GREENBERG, C.S.; ACHYUTHAN, FENTON, J.W.: Factor XIIIa formation promoted by complexing of  $\alpha$ -thrombin, fibrin and plasma factor XIII. *Blood* 69: 867-871, **1987**
- 150 CURTIS, C.G.; BROWN, K.L.; CREDO, R.B. et al.: Calcium-dependent unmasking of active-center-cysteine during activation of fibrin-stabilizing-factor. *Biochemistry* 13: 3774, **1974**
- 151 LORAND, L.; GRAY, A.J.; BROWN, K.; CREDO, R.B. et al.: Dissociation of the subunit structure of fibrin stabilizing factor during activation of the zymogen. *Biochem Biophys Res Commun* 56: 914-922, **1974**
- 152 KETSU, H.; FOSTER, D.C.; DAVIE, E.W.; ICHINOSE, A.: Biosynthesis and secretion of the a and b subunits for human coagulation factor XIII in mammalian cell systems. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg: S. B4, 1991*
- 153 MUSZBEK, L.; POLGÁR, J. KARGES, H.; ADÁNY, R.: Activation of cellular factor XIII. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg: S. A11, 1991*
- 154 YING LIU, Y.; McDONAGH, J.: Recombinant human tumor necrosis factor- $\alpha$  regulates coagulation F XIIIa expression at the post-transcription level. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg: S. B5, 1991*
- 155 SCHRODE, J.; FOLK, J.E.: Stereochemical aspects of amine substrate attachment to acyl intermediates of transglutaminase: Human blood plasma (activated coagulation factor XIII) and the guinea pig liver-enzyme. *J Biol Chem* 254: 653, **1979**
- 156 FEAR, J.D.; MILOSZEWSKI, K.J.; LOSOWSDY, M.S.: The half life of factor XIII in the management of inherited deficiency. *Thromb Haemost* 49: 102, **1983**
- 157 MILOSZEWSKI, K.; LOSOWSKI, M.S.: The half-life of factor XIII in vivo. *Brit J Haemat* 19: 686, **1970**
- 158 KARGES, H.E.: Inactivation of F XIII by  $\alpha$ -Thrombin and during coagulation. *Egbring, R.; Klingemann, H.G. (Hrsg.): Factor XIII and Fibronectin. Med. Verlagsgesellschaft Marburg: 133-140, 1983*
- 159 KLINGEMANN, H.G.; EGBRING, R.; HOLST, F.; GRAMSE, M.; HAVEMANN, K.: Degradation of human plasma fibrin stabilizing factor XIII subunits by human granulocytic proteinases. *Thromb Res* 28: 793, **1982**
- 160 FOLK, J.E.; CHUNG, S.I.: Blood coagulation factor XIII: Relationship of some biological properties to subunit structure. *Reich, E., Rifkin, D.B., Shaw, E.: Proteases and Biological Control. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory: S. 157, 1975*



- 161 TRIANTAPHYLLOPOULOS, D.C.: The inactivation of factor XIII during blood coagulation. *Thromb Res* 3: 241, **1973**
- 162 KANAIDE, H.; SHAINOFF, J.R.: Cross-linking of fibrinogen and fibrin by fibrin-stabilizing-factor (factor XIIIa). *J Lab Clin Med* 85: 574, **1975**
- 163 ABENDROTH, K.: Der Osteoblast: Funktion und hormonelle Regulation. In: *Aktuelle Aspekte der Osteologie*; Ittel, T. H., Sieberth, H. G., Matthiaß, H. H. (Hrsg.); Berlin, Heidelberg: Springer **1992**.
- 164 SADATA, Y.; AIKI, N.: Significance of cross-linking of  $\alpha_2$ -Plasmin-Inhibitor to fibrin in inhibition of fibrinolysis and in hemostasis. *J Clin Invest* 69: 536, **1982**
- 165 AOKI, N., TAMAKI, T.; SAKATA, Y.; ICHINOSE, A.: Crosslinking of  $\alpha_2$ -plasmin-inhibitor to fibrin. Its comparison with fibronectin cross-linking and its physiological significance. *Egbring, Klingemann (Hrsg.): Factor XIII and Fibronectin. Med. Verlagsgesellschaft Marburg*: 205-211, **1983**
- 166 GAFFNEY, P.J.; WHITAKER, A.N.: Fibrin cross-links and lysis rates. *Thromb Res* 14: 85, **1979**
- 167 JANSEN, J.W.C.M.; MINKEMA, J.; HAVERKATE, F.; KLUF, C. et al.: Coupling of  $\alpha_2$ -antiplasmin to fibrin by F XIIIa and effect of F XIII-inhibitors, species differences. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg*: S. A12, **1991**
- 168 SHEN, L.L.; GERMANS, J.; MCDONAGH, J. et al.: Effect of calcium ion and covalent cross-linking on formation and elasticity of fibrin gels. *Thromb Res* 6: 255, **1975**
- 169 MUI, P.T.K.; GANGULY, P.: Cross-linking of actin and fibrin by fibrin-stabilizing factor. *Am J Physiol* 233: H346, **1977**
- 170 COHEN, I.; YOUNG-BANDALA, L.; BLANKENBERG, T.A. et al.: Fibrinolytic-catalyzed cross-linking of myosin from platelet and skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 192: 100, **1979**
- 171 COHEN, I.; GLASER, T.; VEIS, A.; BRUNER-LORAND, J.:  $Ca^{2+}$  dependent cross-linking processes in human platelets. *Biochim Biophys Acta* 628: 365, **1981**
- 172 HÖRMANN, H.; JELINIC, V.; RICHTER, H.: N-terminal fibronectin fragments mediate binding of soluble fibrin to cell-attached factor XIIIa (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried/München, supported by Sonderforschungsbereich 207, Project G7). *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg*: S. F5, **1991**
- 173 ZEHER, M.; SZEGEDI, G.; CSIKI, Z.; CSEH, A.; ADANY, R.: Fibrinolysis-resistant deposits in minor labial salivary glands of patients with Sjogren's syndrom. *Clin Immunol Immunopathol* 71 (2): 149-155, **1994**
- 174 BECK, E.; DUCKERT, F.; VOGEL, A.; ERNST, M.: Der Einfluß des fibrinstabilisierenden Faktors (FSF) auf Funktion und Morphologie von Fibroblasten in vitro. *Zeitschr. Zellf.* 57: 327-346, **1962**
- 175 KNOCH, H.; SCHMITT, G.: Autoradiographische Untersuchungen über den Einfluß des Faktor XIII auf die Wundheilung im Tierexperiment. *Arzneim Forsch* 26: 547-551, **1976**
- 176 IWANAGA, S.; SUZAKI, K.; HASHIMOTO, S.: Bovine Plasma cold-insoluble globulin: Cross structure and function. *Ann NY Acad Sci* 312: 74, **1978**
- 177 GRINNEL, F.; FELD, M.; MINTER, D.L.: Fibroblast adhesion to fibrinogen and fibrin substrata: Requirement for cold-insoluble globulin (plasma fibronectin). *Cell* 19:517, **1980**
- 178 KNOX, P.; CROOKS, S.; RIMMER, C.S.: Role of fibronectin in the migration of fibroblasts into plasma clots. *J Cell Biol* 102: 2318-2323, **1986**
- 179 GRINNEL, F.: Fibronectin and wound healing. *J Cell Biochem* 26 (2): 107-116, **1984**
- 180 HÖRMANN, H.; JELINIC, V.; RICHTER, H.: Involvement of factor XIIIa in the formation of a pericellular fibronectin matrix (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried/München, supported by Sonderforschungsbereich 207, Project G7). *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg*: S. F2, **1991**
- 181 MOSHER, D.F.; SCHAD, P.E.; KLEINMAN, H.K.: Cross-linking of fibronectin to collagen by blood coagulation factor XIIIa. *J Clin Invest* 64: 781, **1979**
- 182 MOSHER, D.F.: Cross-linking of fibronectin to collagenous proteins. *Mol Cell Biochem* 58: 63, **1984**
- 183 BARRY, E.L.; MOSHER, D.F.: Factor XIIIa-mediated cross-linking of fibronectin in fibroblast cell layers. Cross linking of cellular and plasma fibronectin and of amino-terminal fibronectin fragments. *J Biol Chem* 264 (7): 4179-4185, **1989**
- 184 BRUHN, H.D.: Faktor XIII, Thrombin und Fibronectin als Regulatoren der Fibroblastenproliferation bei der Wundheilung. *Hämostasieologie* 1: 41-48, **1983**
- 185 UEYAMA, M.; URAYAMA, T.: The role of factor XIII in fibroblast proliferation. *Japan J Exp Med* 48: 135-142, **1978**
- 186 YANCEY, S.T.; LAKE, K.: Transglutaminase and tumor growth. *Ann NY Acad Sci* 202: 344, **1972**

- 187 BARLATI, S.; MIGNATTI, P.; GREGA, A. et al.: Utilization of Rous sarcoma virus for the detection of transformation enhancing and inhibiting factors in human plasma. *Barlati, S.; die Guili-Morghen, C. (Hrsg.): Avian RNA Tumor Virusus, Padna, Italien, Piccin Medical Books: S. 331, 1978*
- 188 BRUHN, H. D.; ZURBORN, K.H.: Influence of clotting factors (thrombin, factor XIII) and of fibronectin on the growth of tumor cells and leukemic cells in vitro. *Blut 46: 85, 1983*
- 189 HASEGAWA, T.; HIROSE, T.; SEKI, K.; SANO, T.; HIZAWA, K.: Transforming growth factor alpha and CD68 immunoreactivity in giant cell tumours of bone: a study on the nature of stromal and giant cells, and their interrelations. *J Pathol 170 (3): 305-310, 1993*
- 190 KARGES, H.E.; CLEMENS, R.: Faktor XIII: Enzymatische und klinische Aspekte. *Behring Inst. Mitt. 82: 43-58, 1988*
- 191 PAYÉ, M.; LAPIÈRE, M.: Wundheilung: Der Beitrag des Gerinnungsfaktors XIII. *Die Gelben Hefte 26: 128-135, 1986*
- 192 NUSGENS, B et al.: Collagen biosynthesis by cells in a tissue equivalent matrix in vitro. *Coll Rel Res 4: 351, 1984*
- 193 PAYÉ, M.; NUSGENS, B.V.; LAPIÈRE, C.M.: Factor XIII of blood coagulation modulates collagen biosynthesis by fibroblasts in vitro. *Haemostasis 19 (5): 274-283, 1989*
- 194 PAYÉ, M.; NUSGENS, B.V.; LAPIÈRE, C.M.: Modulation of cellular biosynthetic activity in the retracting collagen lattice. *Eur J Cell Biol 45 (1): 44-50, 1987*
- 195 KANG, Y.; HASHIMOTO, N.; KIKUCHI, H., et al.: Effects of blood coagulation factor XIII on the development of experimental cerebral aneurysms in rats. *J Neurosurg 73 (2): 242-247, 1990*
- 196 HERTER, T.; ANAGUOSTOPOULOS-SCHEEP, J.; WINDMANN, D.: The influence of factor XIII on the fibrosing of a nerve anastomosis in the rat. *Res Exp Med Berl. 189 (1): 25-32, 1989*
- 197 TOIDA, M.; WATANABE, F.; TSAI, C.S.; et al.: Factor XIIIa-containing cells and fibrosis in oral and maxillofacial lesions: an immunohistochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol 63 (8): 293-299, 1989*
- 198 PENNEYS, N.S.; SMITH, K.J.; NEMETH, A.J.: Factor XIIIa in the hamartomas of tuberous sclerosis. *J Dermatol Sci 2 (1): 50-54, 1991*
- 199 PAYÉ, M.; NUSGENS, B.; LAPIÈRE, C.M.: Factor XIII of blood coagulation decreases the susceptibility of collagen precursors to proteolysis. *Biochem Biophys Acta 1073 (3): 437-441, 1991*
- 200 KIKUSHI, T.; TAGAKI, J.; KASAHARA, K.; INADA, Y.; SAITO, Y.: Interaction between plasma factor XIII and collagen. *Thromb Res 43 (2): 213-218, 1986*
- 201 THIES, H.A.; RICHTER, U.: Erworbener Faktor-XIII-Mangel und klinische Chirurgie. *MedWelt 32: 250-255, 1981*
- 202 KUGLMEIER, K.: Experimentelle, proliferationskinetische Untersuchungen über die Wirkung des Plasmafaktor XIII auf das Knochenwachstum in vivo und in vitro. *Inaugural-Dissertation, Universität Ulm, 1985*
- 203 PRINCE, C.W.; DICKIE, D.; KRUMDIECK, C.L.: Osteopontin, a substrate for transglutaminase and factor XIII activity. *Biochem Biophys Res Commun 177 (3): 1205-1210, 1991*
- 204 BENFER, J.; STRUCK, H.: Factor XIII and fracture healing. *Europ Surg Res 9: 217-223, 1977*
- 205 CLAES, L.; BURRI, C.; GERNGROSS, H.; MUTSCHLER, W.: Die Beschleunigung der Frakturheilung durch F XIII. *Helv Acta 51: 209-212, 1984*
- 206 GERNGROSS, H.; CLAES, L.; BURRI, C.: Tierexperimentelle Untersuchungen zur autologen Fibrin-spongiosaplastik unter Calcitonin- und Faktor-XIII-Behandlung. *Chirurgisches Forum '81, Springer Verlag, Berlin: 109-112, 1981*
- 207 CLAES, L.; KUGLMEIER, K.; GERNGROSS, H.: Experimentelle Untersuchungen zur mitogenen Wirkung von F XIII auf Osteoblasten. *Hefte zur Unfallheilkunde, Heft 189: 153-156, 1987*
- 208 KIENAPFEL, H.; WILKE, A.; DORNER, P.; JÜRGENSEN, R.; PRINZ, H.; HETTEL, A.; SWAIN, R.; GRISS, P.: Implantatverankerungsfestigkeit sowie Knocheneinwachsverhalten nach systemischer Gabe von rekombinantem Faktor XIII und Faktor-XIII-Konzentrat. Eine tierexperimentelle Untersuchung mit Bestimmung von Implantatverankerungsfestigkeit sowie Knocheneinwachsverhalten bei porösen Oberflächenimplantaten. *Z Orthop Ihre Grenzgeb 133 (5): 394-400, 1995*
- 209 HELLERER, O.; BRÜCKNER, W.L.; FREY, K.W.; WESTERBURG, K.W.; KLESSINGER, U.: Fracture healing under factor XIII mediation. *Arch Orthop Traumat Surg 97: 157-159, 1980*
- 210 BURCHARDT, P.; TILSNER, V.; HUPE, W.: Faktor-XIII-Mangel als Ursache postoperativer Blutungen. *Aktuell Urologie 9: 29-33, 1978*
- 211 REDING, R.; RIEMER, H.: Wundheilung und Wundheilungsstörungen - Morphologie, Biochemie, Pathophysiologie und klinische Aspekte. *Z ärztl Fortbildung 76: 822-824, 1982*
- 212 GREENBERG, C.S.; SHUMAN, M.A.: The zymogen forms of blood coagulation factor XIII bind specifically to fibrinogen. *J Biol Chem 257: 6096-6101, 1982*

- <sup>213</sup> CARMASSI, F.; UCHINO, R.; CARDINALI, M. et al.: Influence of Factor XIII-Mediated Crosslinking on Extravascular Fibrinolysis. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg: S. A2, 1991*
- <sup>214</sup> HAUCH, S.; SIMON, M.; FRANKE, J.: Zur Histologie der Knochenneubildung bei der Beinverlängerung nach der Ilizarov-Methode. *In: Aktuelle Aspekte der Osteologie. Hrsg.: T. H. Ittel, H. G. Siebert, H. H. Matthias, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg: 318-323, 1992*

## 7.2. nach alphabetischer Folge

## Nr. Seite Quelle

- 163 131 **ABENDROTH, K.**: Der Osteoblast: Funktion und hormonelle Regulation. In: Aktuelle Aspekte der Osteologie; Ittel, T. H., Sieberth, H. G., Matthiaß, H. H. (Hrsg.); Berlin, Heidelberg: Springer 1992.
- 141 129 **ADÁNY, R.; FODOR, F.; MOLNÁR, P.** et al.: Increased density of histiocytes containing factor XIIIa in uterine leiomyomas. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg: S. A10, 1991*
- 90 81 **AHERNE, W. A.; DUNNILL, M. S.**: Morphometry, *Edward Arnold, London, 1982*
- 165 131 **AOKI, N.; TAMAKI, T.; SAKATA, Y.; ICHINOSE, A.**: Crosslinking of  $\alpha_2$ -plasmin-inhibitor to fibrin. Its comparison with Fibronectin cross-linking and its physiological significance. *Egbring, Klingemann (Hrsg.): Factor XIII and Fibronectin. Med. Verlagsgesellschaft Marburg: 205-211, 1983*
- 187 134 **BARLATI, S.; MIGNATTI, P.; GREGA, A.** et al.: Utilization of Rous sarcoma virus for the detection of transformation enhancing and inhibiting factors in human plasma. *Barlati, S.; die Guili-Morghen, C. (Hrsg.): Avian RNA Tumor Virus, Padna, Italien, Piccin Medical Books: S. 331, 1978*
- 183 133 **BARRY, E.L.; MOSHER, D.F.**: Factor XIIIa-mediated cross-linking of Fibronectin in fibroblast cell layers. Cross linking of cellular and plasma Fibronectin and of amino-terminal Fibronectin fragments. *J Biol Chem 264 (7): 4179-4185, 1989*
- 101 119 **BASSETT, C. A. L.; HERRMANN, I.**: Influence of oxygene concentrations and mechanical factors on differentiation of connective tissues in vitro. *Nature 190: 460, 1961*
- 126 127 **BAYLINK, D. J.; FARLAY, J.; HOWARD, G.; DRIVDAHL, R.; PUZAS, E.** et al.: Coupling Factor. In: *Massry, S. G.; Letteri, L. M.; Ritz, E.: Regulation of phosphate and mineral metabolism. Plenum, New York: 409-420, 1982*
- 174 132 **BECK, E.; DUCKERT, F.; VOGEL, A.; ERNST, M.**: Der Einfluß des fibrinstabilisierenden Faktors (FSF) auf Funktion und Morphologie von Fibroblasten in vitro. *Zeitschr. Zellf. 57: 327-346, 1962*
- 128 127 **BENFER, J.; STRUCK, H.**: Experimental Studies on fracture healing. III. Accelerated fracture healing through soluble heterologous collagen. *Arch Surg 106: 838-842, 1973*
- 204 136 **BENFER, J.; STRUCK, H.**: Factor XIII and fracture healing. *Europ Surg Res 9: 217-223, 1977*
- 97 116 **BENTLEY, G.; GREER, R. B.**: The fate of chondrocytes in endochondral ossification in the rabbit. *J Bone Joint Surg 52 [B]: 571-577, 1970*
- 125 127 **BENTZ, H.; NATHAN, R. M.** et al.: Purification and characterization of a unique osteoinductive factor from bovine bone. *J Biol Chem, 264 (34): 20805-20810, 1989*
- 86 80 **BEYER, W. F.; BÖHRINGER, M. E.; BAIL, H.; KURTZ, T.**: Inter- und intraindividuelle Meßgenauigkeit beim Einsatz eines Bildanalyse-systems in der Knochenhistomorphometrie. *Aktuelle Aspekte der Osteologie; Ittel, T. H. Sieberth, H. G., Matthiaß, H. H. (Hrsg.); Berlin, Heidelberg: Springer 1992.*
- 15 20 **BIER, A.**: Die Bedeutung des Blutergusses für die Heilung des Knochenbruches. Heilung von Pseudarthrosen und von verspäterter Callusbildung durch Bluteinspritzung. *Med Klin 1: 6, 1905*
- 3 9 **BIER, A.**: Über Knochenregeneration und über Pseudarthrosen. *Arch Klin Chir 127: 1, 1923*
- 14 20 **BIRKENHAUER, B.**: Die zelluläre Interaktion während der Osteogenese - Ein morphologisch und funktionell gegliedertes Modell. *Inaugural-Dissertation an der Philipps-Universität Marburg, Klinik für Unfallchirurgie, 1995.*
- 4 9 **BLOCK, W.**: Ein neuer Distraktionsapparat und Spannbügel für die Drahtextension. *Zentralbl Chir 46/47, 1923*
- 55 40 **BODZIONY, J.; SCHWILLE, P. O.**: Subcutaneous cannula in the jugular and femoral vein - a tool for frequent blood sampling and infusions in the rat. *Z. Versuchstierkunde 27: 29-32, 1985*
- 72 60 **BOELLAARD, J. W.; VON HIRSCH, TH.**: Die Herstellung histologischer Schnitte von nicht entkalkten Knochen mittels Einbettung in Methacrylatsäureester. *Mikroskopie 13: 386, 1959*
- 100 117 **BONUCCI, E.**: Fine structure of early cartilage calcification. *J Ultrastruct Res 20: 33, 1976*
- 94 96 **BORTZ, J.**: Statistik für Sozialwissenschaftler/Jürgen Bortz.-3., neubearb. Aufl.-Berlin; Heidelberg; New York; Tokyo: Springer 1989, Ss. 178ff,850
- 98 116 **BOSKEY, A. L.**: Current concepts of the physiology and biochemistry of calcification. *Clin Orthop 157: 225-257, 1981*

- 59 49 **BRÄUER, T.:** Pharmakologische Osteoinduktion durch systemische Gabe von Blutgerinnungsfaktor XIII - Eine Dosisfindungsstudie. *Inaugural-Dissertation an der Philipps-Universität Marburg, Klinik für Unfallchirurgie, 1995.*
- 188 134 **BRUHN, H. D.; ZURBORN, K.H.:** Influence of clotting factors (thrombin, factor XIII) and of Fibronectin on the growth of tumor cells and leukemic cells in vitro. *Blut* 46: 85, **1983**
- 184 133 **BRUHN, H.D.:** Faktor XIII, Thrombin und Fibronectin als Regulatoren der Fibroblastenproliferation bei der Wundheilung. *Hämostaseologie* 1: 41-48, **1983**
- 210 139 **BURCHARDT, P.; TILSNER, V.; HUPE, W.:** Faktor-XIII-Mangel als Ursache postoperativer Blutungen. *Aktuell Urologie* 9: 29-33, **1978**
- 74 60 **BURKHARDT, R.:** Präparative Voraussetzungen zur klinischen Histologie des menschlichen Knochenmarks. *Blut* 13: 337, **1966**
- 53 40 **BURRI, C.; GASSNER, D.:** Der Vena-cava-Katheter. *Anaesthesiology und Wiederbelebung* 54, Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag **1971**
- 19 22 **CANALIS, E., PECK, W, RAISZ, L. G.:** Stimulation of DNA and collagen synthesis by autologous growth factor in cultured fetal rat calvaria. *Science* 210: 1021-1023, **1980**
- 127 127 **CANALIS, E.; MCCARTHY, T.; CENTRELLA, M.:** Identity of bone derived growth factor with  $\beta_2$ -Mikroglobulin. *J Bone Mineral Res* 2 (Suppl. 1): 532, **1987**
- 213 141 **CARMASSI, F.; UCHINO, R.; CARDINALI, M. et al.:** Influence of Factor XIII-Mediated Crosslinking on Extravascular Fibrinolysis. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg: S. A2, 1991*
- 207 137 **CLAES, L.; BURRI, C.; GERNGROSS, H.; MUTSCHLER, W.:** Die Beschleunigung der Frakturheilung durch F XIII. *Helv Acta* 51: 209-212, **1984**
- 205 136 **CLAES, L.; KUGLMEIER, K.; GERNGROSS, H.:** Experimentelle Untersuchungen zur mitogenen Wirkung von F XIII auf Osteoblasten. *Hefte zur Unfallheilkunde, Heft 189:* 153-156, **1987**
- 1 9 **CODIVILLA, A.:** Come si possa rendere efficace e tollerata una fort trazione applicata all'arto inferiore. *Mem Chir Publ* 2: 3, **1903**
- 2 9 **CODIVILLA, A.:** On the means of lengthening in the lower limbs, the muscles and tissues which are shortened through deformity. *Am J Orthop Surg* 11: 353, **1905**
- 170 131 **COHEN, I.; YOUNG-BANDALA, L.; BLANKENBERG, T.A. et al.:** Fibrinolytic-catalyzed cross-linking of myosin from platelet and skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 192: 100, **1979**
- 171 131 **COHEN, I.; GLASER, T.; VEIS, A.; BRUNER-LORAND, J.:**  $Ca^{2+}$  dependent cross-linking processes in human platelets. *Biochim Biophys Acta* 628: 365, **1981**
- 150 130 **CURTIS, C.G.; BROWN, K.L.; CREDO, R.B. et al.:** Calcium-dependent unmasking of active-center-cysteine during activation of fibrin-stabilizing-factor. *Biochemistry* 13: 3774, **1974**
- 117 124 **DAL MONTE, A.; DONZELLI, O.:** Tibial lengthening according to Ilizarov in congenital hypoplasia of the leg. *J Pediatr Orthop* 7: 135-138, **1987**
- 57 42 **DASCHNER, F.:** Antibiotikatherapie am Krankenbett, 5. Auflage, *Springer-Verlag 1990*, Ss. 35, 50.
- 65 51 **DE BASTIANI, G.; ALDEGHERI, R. et al.:** Limb lengthening by callus distraction (callotaxis). *J. Pediatr. Orthop.* 7: 129-34, **1987**
- 118 124 **DE BASTIANI, G.; ALDEGHERI, R.; RENZI BRIVIO, L.; TRIVELLA, G.:** Limb lengthening by distraction of the epiphyseal plate: a comparison of two techniques in the rabbit. *J Bone Joint Surg [Br]* 68B: 545-549, **1987**
- 88 81 **DELESSE, M. A.:** Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. *Annales des Mines* 13: 379-88, **1848**
- 108 120 **EGER, W.:** Kalziumnachweis und Mineralisation des Knochengewebes. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 47. Tagung, Fischer, Stuttgart:* 54, **1963**
- 131 128 **ENGÆTER, L. B.; SUDMANN, B.; SUDMANN, E.:** Fracture healing in rats by locally administered indomethacin. *Acta Orthop Scand* 63 (3): 330-333, **1992**
- 156 130 **FEAR, J.D.; MILOSZEWSKI, K.J.; LOSOWSDY, M.S.:** The half life of factor XIII in the management of inherited deficiency. *Thromb Haemost* 49: 102, **1983**
- 66 57 **FICKENSCHER, K.; AAB, A.; STÜBER, W.:** A Photometric Assay for Blood Coagulation Factor XIII. *Thromb. Haemostas.* 65: 535-540, **1991**
- 160 130 **FOLK, J.E.; CHUNG, S.I.:** Blood coagulation factor XIII: Relationship of some biological properties to subunit structure. *Reich, E., Rifkin, D.B., Shaw, E.: Proteases and Biological Control. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory: S. 157, 1975*
- 120 124 **FRIEDENSTEIN, A. J.:** Determined and inducible osteogenic precursor cells. *In: Hard tissue growth repair and remineralization. Ciba Foundation Symposium Elsevier. Excerpta-Medica, Amsterdam:* 169-185, **1973**

- 9 12 **FROST, H. M.:** Bone Dynamics in metabolic bone disease. *J Bone Joint Surg 48A*: 1192-1203, **1966**
- 104 119 **FROST, H. M.:** Bone Remodeling Dynamics. *Springfield, IL, Charles C. Thomas, 1963*
- 35 27 **FULLER, K.; GALLAGHER, A. C. et al.:** Osteoclast resorption stimulating activity is associated with the osteoblast cell surface and/or the extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun, 181 (1)*: 67-73, **1991**
- 166 131 **GAFFNEY, P.J.; WHITAKER, A.N.:** Fibrin cross-links and lysis rates. *Thromb Res 14*: 85, **1979**
- 17 21 **GAZIT, D.; KARMISH, M. et al.:** Regenerating marrow induces systemic increase in osteo- and chondrogenesis. *Endocrinology, 126 (5)*: 2607-2613, **1990**
- 41 31 **GERNGROSS, H.; CLAES, L.:** Successful treatment of pseudarthrosis with human placenta factor XIII concentrate. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg*: S. F8, **1991**
- 206 136 **GERNGROSS, H.; CLAES, L.; BURRI, C.:** Tierexperimentelle Untersuchungen zur autologen Fibrin-spongiosaplastik unter Calcitonin- und Faktor-XIII-Behandlung. *Chirurgisches Forum '81, Springer Verlag, Berlin*: 109-112, **1981**
- 42 31 **GERNGROSS, H.; STEINMANN, R.; GRAF, K.:** Faktor XIII und Knochenheilung. *Med Welt 38*: 1533-1538, **1987**
- 149 130 **GREENBERG, C.S.; ACHYUTHAN, FENTON, J.W.:** Factor XIIIa formation promoted by complexing of  $\alpha$ -thrombin, fibrin and plasma factor XIII. *Blood 69*: 867-871, **1987**
- 212 140 **GREENBERG, C.S.; SHUMAN, M.A.:** The zymogen forms of blood coagulation factor XIII bind specifically to fibrinogen. *J Biol Chem 257*: 6096-6101, **1982**
- 179 133 **GRINNEL, F.:** Fibronectin and wound healing. *J Cell Biochem 26 (2)*: 107-116, **1984**
- 177 132 **GRINNEL, F.; FELD, M.; MINTER, D.L.:** Fibroblast adhesion to fibrinogen and fibrin substrata: Requirement for cold-insoluble globulin (plasma Fibronectin). *Cell 19*: 517, **1980**
- 50 40 **GROSSE-SIESTRUP, CH.; BÜCHERL, E. S.:** Katheter- und Kabel-Dauerhautdurchleitungen. *Z. Versuchstierkunde 19*: 320, **1977**
- 82 79 **GUNDERSEN, G.; ØSTERBY, R.:** Estimation of True Lamina Thickness From Apparent Width. *Metab. Bone Dis. et Rel. Res. 2*: 281-289, **1980**
- 110 121 **HALL, B. K.:** Earliest evidence of cartilage and bone development in embryonic life. *Clin Orthop 225*: 255, **1987**
- 10 13 **HAM, A. W.:** Some Histophysiological problems peculiar to calcified tissues. *J Bone Joint Surg 34A*: 701, **1952**
- 114 124 **HANCOX, N. H.:** Biology of bone. *Cambridge University Press, Cambridge, 1972*
- 189 134 **HASEGAWA, T.; HIROSE, T.; SEKI, K.; SANO, T.; HIZAWA, K.:** Transforming growth factor alpha and CD68 immunoreactivity in giant cell tumours of bone: a study on the nature of stromal and giant cells, and their interrelations. *J Pathol 170 (3)*: 305-310, **1993**
- 214 143 **HAUCH, S.; SIMON, M.; FRANKE, J.:** Zur Histologie der Knochenneubildung bei der Beinverlängerung nach der Ilizarov-Methode. In: *Aktuelle Aspekte der Osteologie. Hrsg.: T. H. Ittel, H. G. Siebert, H. H. Matthias, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg*: 318-323, **1992**
- 209 137 **HELLERER, O.; BRÜCKNER, W.L.; FREY, K.W.; WESTERBURG, K.W., KLESSINGER, U.:** Fracture healing under factor XIII mediation. *Arch Orhtop Traumat Surg 97*: 157-159, **1980**
- 196 135 **HERTER, T.; ANAGUOSTOPOULOS-SCHEEP, J.; WINDMANN, D.:** The influence of factor XIII on the fibrosing of a nerve anastomosis in the rat. *Res Exp Med Berl. 189 (1)*: 25-32, **1989**
- 33 27 **HOCK, J. M.; CANALIS, E.:** Platelet-Derived-Growth-Factor enhances bone cell replication, but not differentiates function of osteoblast. *Endocrinology, 134 (3)*: 1423-1428, **1994**
- 134 129 **HOLBROOK, J.J.; COOKE, R.D.; KINGSTON, I.B.:** The amino acid sequence around the reactive cysteine residue in human plasma factor XIII. *Biochem J 135*: 901, **1973**
- 11 13 **HOLTROP, M. E.:** The ultrastructure of bone. *Ann Clin Lab Sci 5*: 264, **1975**
- 172 131 **HÖRMANN, H.; JELINIC, V.; RICHTER, H.:** Involvement of factor XIIIa in the formation of a pericellular Fibronectin matrix (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried/München, supported by Sonderforschungsbereich 207, Project G7). *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg*: S. F2, **1991**
- 180 133 **HÖRMANN, H.; JELINIC, V.; RICHTER, H.:** N-terminal Fibronectin fragments mediate binding of soluble fibrin to cell-attached factor XIIIa (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried/München, supported by Sonderforschungsbereich 207, Project G7). *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg*: S. F5, **1991**

- 7 9 **ILIZAROV, G. A.:** The Tension-Stress Effect on the Genesis and Growth of Tissues. *Clin Orthop Rel Res* 238: 249-281, **1989**
- 176 132 **IWANAGA, S.; SUZAKI, K.; HASHIMOTO, S.:** Bovine Plasma cold-insoluble globulin: Cross structure and function. *Ann NY Acad Sci* 312: 74, **1978**
- 167 131 **JANSEN, J.W.C.M.; MINKEMA, J.; HAVERKATE, F.; KLUFT, C. et al.:** Coupling of  $\alpha_2$ -antiplasmin to fibrin by F XIIIa and effect of F XIII-inhibitors, species differences. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg: S. A12, 1991*
- 147 130 **JANUS, T.J.; LEWIS, S.D., LORAND, L.; SHAFER, J.A.:** Promotion of thrombin-catalyzed activation of factor XIII by fibrinogen. *Biochemistry* 22: 6269, **1983**
- 21 23 **JAWORSKI, Z. F. G.:** Coupling of bone formation to bone resorption: A broader view. *Calcif Tissue Int* 36: 531, **1984**
- 139 129 **JOIST J.H.; NIEWIAROWSKI, S.:** Retention of platelet fibrin-stabilizing-factor during the platelet release reaction and clot retraction. *Thromb Diath Haemorrh* 29: 679, **1973**
- 162 131 **KANAIDE, H.; SHAINOFF, J.R.:** Cross-linking of fibrinogen and fibrin by fibrin-stabilizing-factor (factor XIIIa). *J Lab Clin Med* 85: 574, **1975**
- 195 131 **KANG, Y.; HASHIMOTO, N.; KIKUCHI, H. et al.:** Effects of blood coagulation factor XIII on the development of experimental cerebral aneurysms in rats. *J Neurosurg* 73 (2): 242-247, **1990**
- 158 130 **KARGES, H.E.:** Inactivation of F XIII by  $\alpha$ -Thrombin and during coagulation. *Egbring, R.; Klingemann, H.G. (Hrsg.): Factor XIII and Fibronektin. Med. Verlagsgesellschaft Marburg: 133-140, 1983*
- 190 134 **KARGES, H.E.; CLEMENS, R.:** Faktor XIII: Enzymatische und klinische Aspekte. *Behring Inst. Mitt.* 82: 43-58, **1988**
- 140 129 **KASAHARA, K.; TAKAGI, J.; SEKIYA, F.; INADA, Y.; SAITO, Y.:** "A" subunit of factor XIII is present on bovine platelet membrane and mediates collagen-induced platelet aggregation. *Thromb Res* 50 (2): 253-263, **1988**
- 107 120 **KATTHAGEN, B. D.:** Knochenregeneration mit Knochenersatzmaterialien - eine tierexperimentelle Studie. *H. Unfallheilk.* 178: 13, **1986**
- 113 121 **KATTHAGEN, B. D.:** Knochenregeneration mit Knochenersatzmaterialien - eine tierexperimentelle Studie. *H. Unfallheilk.* 178: 11-13, **1986**
- 78 64 **KATTHAGEN, B. D.:** Knochenregeneration mit Knochenersatzmaterialien - eine tierexperimentelle Studie. *H. Unfallheilk.* 178: 64, **1986**
- 75 61 **KATTHAGEN, B. D.; BECHTEL, U.:** Technik der unentkalkten Knochenhistologie und -histomorphometrie. *mta-journal* 7 4: 164-172, **1985**
- 119 124 **KAWAMURA, B.; HOSONO, S.; TAKAHASHI, T. et al.:** Limb lengthening by means of subcutaneous osteotomy: experimental and clinical studies. *J Bone Joint Surg [Am]* 50A: 851-871, **1968**
- 49 39 **KELLER, J.; SCHUMACHER, B.; LIND M.:** Effect of local Prostaglandin E<sub>2</sub> on periosteum and muscle in rabbits. *Acta Orthop. Scand.* 63 (6): 623-627, **1992**
- 12 13 **KERN, H. F.:** Allegorie zitiert aus einer Kursstunde "Histologie für Zahnmediziner", gehalten an der Philipps-Universität Marburg im Wintersemester **1988/89**.
- 152 130 **KETSU, H.; FOSTER, D.C., DAVIE, E.W.; ICHINOSE, A.:** Biosynthesis and secretion of the a and b subunits for human coagulation factor XIII in mammalian cell systems. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg: S. B4, 1991*
- 208 137 **KIENAPFEL, H.; WILKE, A.; DORNER, P.; JÜRGENSEN, R.; PRINZ, H.; HETTEL, A.; SWAIN, R.; GRISS, P.:** Implantatverankerungsfestigkeit sowie Knocheneinwachsverhalten nach systemischer Gabe von rekombinantem Faktor XIII und Faktor-XIII-Konzentrat. Eine tierexperimentelle Untersuchung mit Bestimmung von Implantatverankerungsfestigkeit sowie Knocheneinwachsverhalten bei porösen Oberflächenimplantaten. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 133 (5): 394-400, **1995**
- 200 135 **KIKUSHI, T.; TAGAKI, J., KASAHARA, K.; INADA, Y., SAITO, Y.:** Interaction between plasma factor XIII and collagen. *Thromb Res* 43 (2): 213-218, **1986**
- 84 79 **KIMMEL, D. B.; JEE, W. S. S.:** Measurements of area, perimeter, and distance: Details of data collection in bone histomorphometry. *Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation, Robert R. Recker, MD. (Hrsg.) CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida U. S. A. 1983.*
- 91 83 **KIMMEL, D. B.:** A Light Microscopic Description of Osteoprogenitor Cells of Remodeling Bone in the Adult. *Bone Histomorphometry - Third International Workshop, Sun Valley May 28/June 2 1980; W.S.S. Jee, A. M. Parfitt (Hrsg.): Société Nouvelle de Publication Médicales et Dentaires, 75009 Paris, France, 1980.*

- 48 39 **KIRKEBY, O. J.; EKELAND, A.:** No effects of local Somatomedin C on bone repair - Continuous infusion in rats. *Acta Orthop. Scand* 63 (4): 447-450, **1992**
- 5 9 **KLAPP, R.; BLOCK, W.:** Die Knochenbruchbehandlung mit Drahtzügen. *Urban und Schwarzenberg, Berlin, 1930*
- 159 130 **KLINGEMANN, H.G.; EGBRING, R.; HOLST, F.; GRAMSE, M.; HAVEMANN, K.:** Degradation of human plasma fibrin stabilizing factor XIII subunits by human granulocytic proteinases. *Thromb Res* 28: 793, **1982**
- 175 132 **KNOCHE, H.; SCHMITT, G.:** Autoradiographische Untersuchungen über den Einfluß des Faktor XIII auf die Wundheilung im Tierexperiment. *Arzneim Forsch* 26: 547-551, **1976**
- 178 132 **KNOX, P.; CROOKS, S.; RIMMER, C.S.:** Role of Fibronectin in the migration of fibroblasts into plasma clots. *J Cell Biol* 102: 2318-2323, **1986**
- 28 26 **KOCH, A. E.; POLVERINI, P. J.:** Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*, 258 (5089): 1798-1801, **1992**
- 63 51 **KOJIMOTO, H.; YASUI, N. et al.:** Bone lengthening in rabbits by callus distraction. The role of periosteum and endosteum. *J. Bone Joint Surg. [Br]* 70-B: 543-9, **1988**
- 61 51 **KORKALA, O.; KARAHARJU E. et al.:** Experimental Lengthening of Tibial Diaphysis: Gap Healing With or Without Gradual Distraction. *Arch. Orthop. Trauma. Surg.* 107: 172-175, **1988**
- 103 119 **KROMPECHER, S.:** Die Knochenbildung. *Gustav Fischer Verlag, Jena, 1937*
- 71 60 **KROPP, B. M.:** Grinding thin sections of plastic-embedded bone. *Stain Technol.* 29: 77, **1954**
- 202 136 **KUGLMEIER, K.:** Experimentelle, proliferationskinetische Untersuchungen über die Wirkung des Plasmafaktor XIII auf das Knochenwachstum in vivo und in vitro. *Inaugural-Dissertation, Universität Ulm, 1985*
- 133 129 **LAKI, K.; LORAND, L.:** On the solubility of fibrin clots. *Science* 108: 280, **1948**
- 39 30 **LANG, D.:** Einsatz von Faktor XIII bei verzögerter Knochenneubildung. *Die Gelben Hefte* 18: 91-92, **1978**
- 54 40 **LEONHARDT, F.J.:** Ein neues System zum Katheterismus der V. cava bei Ratten für Langzeitinfusionen (Implantofix®). *Z. für Versuchstierkunde* 32, *VEB Gustav Fischer Verlag, Jena:* 171-178, **1989**
- 27 26 **LILIENFELD-TOAL, H. VON:** Wachstumsfaktoren und Knochenremodellierung. In: *Aktuelle Aspekte der Osteologie; Titel, T. H., Sieberth, H. G., Matthiaß, H. H. (Hrsg.); Berlin, Heidelberg: Springer 1992.*
- 137 129 **LOPACIUK, S.; LOVETTE, K.M.; MCDONAGH, J. et al.:** Subcellular distribution of fibrinogen and factor XIII in human plasma and platelets. *Thromb Res* 8: 453, **1976**
- 151 130 **LORAND, L.; GRAY, A.J.; BROWN, K.; CREDO, R.B. et al.:** Dissociation of the subunit structure of fibrin stabilizing factor during activation of the zymogen. *Biochem Biophys Res Commun* 56: 914-922, **1974**
- 99 117 **LOWE, J.; STEIN, H.; SELA, J.:** Primary calcification in remodeling haversian systems following tibial fracture in rats. *Clin Orthop* 176: 291, **1983**
- 148 130 **MATSUDA, T.; SAITO, M.; ASAKURA, H.; YOSHIDA, T. et al.:** A familial factor XIII subunit B deficiency. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg: S. D5, 1991*
- 135 129 **MCDONAGH, J.:** Structure and Function of Factor XIII. In: *Menostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Hrsg.: R. W. Colman, J. Hirsch, V. J. Marden, E. W. Salzman. Philadelphia, J. B. Lippincott Company: Chapter 18, Ss. 289-300, 1987*
- 138 129 **MCDONAGH, J.; MCDONAGH, R.P.; DELAGE, J.M.; WAGNER, R.H.:** Factor XIII in human plasma and platelets. *J Clin Invest* 48: 940, **1969**
- 157 130 **MILOSZEWSKI, K.; LOSOWSKI, M.S.:** The half-life of factor XIII in vivo. *Brit J Haemat* 19: 686, **1970**
- 31 27 **MOHAN, S.; BAYLINK, D. J.:** Bone growth factors. *Clin Orthop.*, 263: 30-48, **1991**
- 182 133 **MOSHER, D.F.:** Cross-linking of Fibronectin to collagenous proteins. *Mol Cell Biochem* 58: 63, **1984**
- 181 133 **MOSHER, D.F.; SCHAD, P.E.; KLEINMAN, H.K.:** Cross-linking of Fibronectin to collagen by blood coagulation factor XIIIa. *J Clin Invest* 64: 781, **1979**
- 169 131 **MUI, P.T.K.; GANGULY, P.:** Cross-linking of actin and fibrin by fibrin-stabilizing factor. *Am J Physiol* 233: H346, **1977**
- 111 121 **MUNDLOS, S.; WINTERPACHT, A.; ZABEL, B.:** Expression von Matrixgenen während der Skelettentwicklung. *Osteologie, Suppl. 1, Bd. 1:* 56, **1992**



- 153 130 **MUSZBEK, L.; POLGÁR, J. KARGES, H.; ADÁNY, R.:** Activation of cellular factor XIII. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg: S. A11, 1991*
- 146 130 **NAGY, J.A.; HENRIKSSON, P.; MCDONAGH, J.:** Biosynthesis of factor XIII B subunit by human hepatoma cell lines. *Blood 68 (6): 1272-1279, 1986*
- 96 116 **NAKAMURA, E., MIZUTA, H. et al.:** Knee articular cartilage injury in leg lengthening. Histological studies in rabbits. *Acta Orthop Scand, 64 (4): 437-440, 1993*
- 109 121 **NERLICH, A.; KIRSCH, T.; WIEST, I.; VON DER MARK, K.:** Verteilungsmuster von Kollagen X bei der fetalen und juvenilen Knorpel-Knochen-Entwicklung. In: *T. H. Ittel, H. G. Sieberth, H. H. Matthiaß (Hrsg.): Aktuelle Aspekte der Osteologie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1992*
- 192 134 **NUSGENS, B. et al.:** Collagen biosynthesis by cells in a tissue equivalent matrix in vitro. *Coll Rel Res 4: 351, 1984*
- 93 83 **OLAH, A. J.:** Influence of microscopic resolution on the estimation of structural parameters in cancellous bone. *Meunier, P. J. (Hrsg.), Bone Histomorphometry, 2nd International Workshop. Société de la Nouvelle Imprimerie Fournié: Toulouse, France, 1976: 55-61.*
- 121 125 **OWEN, M.:** Cell population kinetics of an osteogenic tissue. *J Cell Biol 19: 19, 1963*
- 116 124 **OWEN, M.:** Histogenesis of bone cells. *Calcif Tissue Res 25 (3): 205-207, 1978*
- 115 124 **OWEN, M.:** Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. In: *Peck, W. A. (Hrsg.): Bone and Mineral Research. Elsevier 3: 1-25, 1985*
- 81 79 **PARFITT, A. M. et al.:** Bone Histomorphometry: Standardization of Nomenclature, Symbols, and Units - Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committée. *Journal of Bone and Mineral Research 6 (1987) 2: 595-610.*
- 102 119 **PAUWELS, F.:** Eine neue Theorie über den Einfluß mechanischer Reize auf die Differenzierung der Stützgewebe. *Z Anat Entwickl-Gesch 121: 478-515, 1960*
- 191 120 **PAYÉ, M.; LAPIÈRE, M.:** Wundheilung: Der Beitrag des Gerinnungsfaktors XIII. *Die Gelben Hefte 26: 128-135, 1986*
- 199 135 **PAYÉ, M.; NUSGENS, B.; LAPIÈRE, C.M.:** Factor XIII of blood coagulation decreases the susceptibility of collagen precursors to proteolysis. *Biochem Biophys Acta 1073 (3): 437-441, 1991*
- 194 134 **PAYÉ, M.; NUSGENS, B.V., LAPIÈRE, C.M.:** Modulation of cellular biosynthetic activity in the retracting collagen lattice. *Eur J Cell Biol 45 (1): 44-50, 1987*
- 193 134 **PAYÉ, M.; NUSGENS, B.V.; LAPIÈRE, C.M.:** Factor XIII of blood coagulation modulates collagen biosynthesis by fibroblasts in vitro. *Haemostasis 19 (5): 274-283, 1989*
- 36 27 **PECK, W. A.; RIFAS, L. et al.:** Macrophages release a peptide stimulator of osteoblasts growth. *Ann Biol Clin Paris, 43 (5): 751-754, 1985*
- 198 135 **PENNEYS, N.S.; SMITH, K.J.; NEMETH, A.J.:** Factor XIIIa in the hamartomas of tuberous sclerosis. *J Dermatol Sci 2 (1): 50-54, 1991*
- 52 40 **PFRIMMER, W. et al.:** Methodische und technische Probleme der langfristigen Infusionstherapie mit dem Cava-Katheter. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaften 2: 254-271, 1972*
- 58 49 **PISTOR, C.:** Die Distractionsosteosynthese langer Röhrenknochen als standardisiertes Verfahren zur histomorphometrischen Beurteilung der Wirkung des Blutgerinnungsfaktors XIII auf die Knochenheilung; *Inaugural-Dissertation an der Philipps-Universität Marburg, Klinik für Unfallchirurgie, 1992.*
- 8 10 **PLENK, H.:** Knochengewebe und Zähne. In *Romeis: Mikroskopische Technik, 17. neubearbeitete Auflage; Hrsg. P. Böck, Urban & Schwarzenberg; München, Wien, Baltimore: 553, 1989*
- 77 61 **PLENK, H.:** Knochengewebe und Zähne; *Romeis: Mikroskopische Technik, 17. neubearbeitete Auflage; Hrsg. P. Böck, Urban & Schwarzenberg; München, Wien, Baltimore 1989*
- 142 130 **POON, M.C.; RUSSELL, J.A.; LOW, S. et al.:** Hemopoietic origin of factor XIII A subunits in platelets, monocytes, and plasma. Evidence from bone marrow transplantation studies. *J Clin Invest 84 (3): 787-792, 1989*
- 60 51 **PREVOT, J., PONCELET, T; LASCOMBES, P. et al.:** L'ostéogenèse en distraction chez l'animal soumis à une chimiothérapie anti-cancéreuse. Etude expérimentale chez le lapin. *Revue de chirurgie orthopédique et réparatrice de l'appareil moteur Paris. 74 Supplément 2: 98-100, 1988*
- 203 136 **PRINCE, C.W.; DICKIE, D.; KRUMDIECK, C.L.:** Osteopontin, a substrate for transglutaminase and factor XIII activity. *Biochem Biophys Res Commun 177 (3): 1205-1210, 1991*
- 47 39 **PRITCHETT, J. W.:** Dept. of Orthopaedics, University of Washington and Pacific Medical Center, Seattle: Human Growth Hormone in polymethyl methacrylate. *Acta Orthop. Scand. 63 (5): 520-522, 1992*

- 69 60 **PUCKET, W. O.:** The methacrylate plastics as mounting media for biological materials. *Anat. Rev.* 80: 453, **1941**
- 24 26 **RAISZ, L. G.; KREAM, B. E.:** Regulation of bone formation (first of two parts). *The New England Journal of Medicine* 309 (1): 29-35, **1983**
- 56 41 **RASCHE, H.:** Blutgerinnungsfaktor XIII und Fibrinstabilisierung. *Klin Wschr* 53: 1137-1145, **1975**
- 122 126 **REDDI, A. H.; HUGGINS, C.:** Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 1601-1605, **1972**
- 211 139 **REDING, R.; RIEMER, H.:** Wundheilung und Wundheilungsstörungen - Morphologie, Biochemie, Pathophysiologie und klinische Aspekte. *Z ärztl Fortbildung* 76: 822-824, **1982**
- 79 70 **REVELL, P. A.:** Histomorphometry of bone. *J. Clin. Pathol.* 36: 1323-1331, **1983**
- 62 51 **RICHTER, M.; SOSNA, A; I.:** Orthopädische Klinik, Praha: Die Vaskularisierung des Knochenregenerates nach Verlängerungsoperation im distalen Tibiadrittel. *Orthop. Mitteilungen* 3: 50, **1992**
- 132 129 **ROBBINS, K.C.:** A study of the conversion of fibrinogen to fibrin. *Amer J Physiol* 142: 581-588, **1944**
- 32 27 **RODAN, G. A.:** Introduction of Bone Biology. *Bone, 13 Suppl 1:* 3-6, **1992**
- 76 61 **ROMEIS:** Mikroskopische Technik. 17. neubearbeitete Auflage, Hrsg. P. Böck. Urban & Schwarzenberg; München, Wien, Baltimore **1989**.
- 87 80 **ROMPPANEN, T.:** Postembryonic development of the chicken bursa of Fabricius: A light microscopic histoquantitative study. *Poult Sci* 61: 2261-2270, **1982**
- 70 60 **ROOFE, P. G.; HOECKER, F. E.; VORHEES, C. D.:** A rapid bone sectioning technic. *Proc. Soc. exp. Biol.* 72: 619, **1949**
- 25 26 **ROSEN, E. M.; GRANT, D. S.:** Scatter factor (hepatocyte growth factor) is a potent angiogenesis factor in vivo. *Clin Exp Rheumatol* 47: 227-234, **1993**
- 89 81 **ROSIWAL, A.:** Über geometrische Gesteinsanalysen. *Verh. k. k. Geol. Reichsanstalt, Wien:* 143, **1898**
- 92 83 **RÜSCHOFF, J.:** Methoden der lichtmikroskopischen Morphometrie. *Romeis: Mikroskopische Technik, 17. neubearbeitete Auflage; Hrsg. P. Böck, Urban & Schwarzenberg; München, Wien, Baltimore 1989,* 327-38.
- 164 131 **SADATA, Y.; AIKI, N.:** Significance of cross-linking of  $\alpha_2$ -Plasmin-Inhibitor to fibrin in inhibition of fibrinolysis and in hemostasis. *J Clin Invest* 69: 536, **1982**
- 40 30 **SALZMANN, G.:** Einsatz von Faktor XIII bei verzögerter Knochenneubildung. *Die Gelben Hefte* 16: 129-130, **1976**
- 95 116 **SCHENK, R.:** Biology of fracture repair. In: 'Skeletal Trauma', Browner, Jupiter, Levine, Trafton (Hrsg.), W. B. Saunders Company, Philadelphia: Kapitel 2, 31-75, **1992**
- 105 119 **SCHENK, R.:** Histomorphologische und physiologische Grundlagen des Skeletwachstums. In: B. G. Weber, Brunner, Freuler: *Die Frakturbehandlung bei Kindern und Jugendlichen*, Springer: 3-20, **1978**
- 73 60 **SCHENK, R.:** Zur histologischen Verarbeitung von unentkalkten Knochen. *Acta anat.* 60: 3, **1965**
- 13 14 **SCHENK, R.; WILLENEGGER, H.:** Zur Histologie der primären Knochenheilung. Modifikationen und Grenzen der Spalthheilung in Abhängigkeit von der Defektgröße. *Unfallheilkunde* 80: 155, **1977**
- 80 74 **SCHIEBLER, T. H.:** Histologie: Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen; unter Berücksichtigung der Histophysiologie; nach d. amerikan. Ausg. von L. C. Junqueira u. J. Carneiro/übers., überarb. und hrsg. von T.H. Schiebler, U. Peiper u. Fr. Schneider. - 2., korrigierte Aufl.-Berlin; Heidelberg; New York; Paris; Tokyo: Springer **1986**.
- 43 31 **SCHLENZKA, R.; v. GARREL, T.; PISTOR, C.:** Does Fibrogammin significantly accelerate bone healing? *J Bone Joint Surg, 75 [B] Supp 2:* 100, **1993**
- 155 130 **SCHRODE, J.; FOLK, J.E.:** Stereochemical aspects of amine substrate attachment to acyl intermediates of transglutaminase: Human blood plasma (activated coagulation factor XIII) and the guinea pig liver-enzyme. *J Biol Chem* 254: 653, **1979**
- 29 26 **SCHULTZ, G. S.; GRANT, M. B.:** Neovascular growth factors. *Eye, 5 (Pt 2):* 170-180, **1991**
- 22 23 **SCHULZ, A.:** Knochenstruktur: physiologische und pathologische Knochenumbauvorgänge. *Sandorama* 5: 25-31, **1988**
- 136 129 **SCHWARTZ, M.L.; PIZZO, S.V.; HILL, R.L.; MCKEE, P.A.:** Human factor XIII from plasma and platelets: Molecular weights, subunit structure, proteolytic activation and cross-linking of fibrinogen and fibrin. *J Biol Chem* 248: 1395, **1973**

- 124 127 **SCHWEIBERER, L.; HALLFELD, K.; MANDELKOW, J.:** Pathophysiologie der Knochentransplantation: Grundlagen und klinische Anwendung. *Hefte zur Unfallheilkunde 179: Defektüberbrückung an Knochen und Weichteilen*, Springer, Berlin, Heidelberg: 160-170, **1987**
- 37 30 **SEITZ, R.; KEHNEN, G.; KÜSTERS, G., EGBRING, R.:** Pathogenetic causes of acquired factor XIII deficiency. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg*: S. E1, **1991**
- 129 128 **SHARMA, S.; GARG, N. K.; VELIATH, A. J.; SUBRAMANIAN, S.; SRIVASTAVA, K. K.:** Percutaneous bone-marrow grafting in Osteotomies and bony defects in rabbits. *Acta Orthop Scand 63 (2)*: 166-169, **1992**
- 168 131 **SHEN, L.L.; GERMANS, J.; MCDONAGH, J. et al.:** Effect of calcium jon and covalent cross-linking on formation and elasticity of fibrin gels. *Thromb Res 6*: 255, **1975**
- 38 30 **SILBERZAHN, J.:** Factor XIII and wound-healing impairments in ENT. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg*: S. F7, **1991**
- 68 57 **SKRZY尼亚, C.; REISNER, H.M.; MCDONAGH, J.:** Characterization of the catalytic subunit of factor XIII by radioimmunoassay. *Blood 60*: 1089, **1982**
- 46 39 **SOLHEIM, E.; PINHOLT, E. M. et al.:** Inhibition of Heterotopic Osteogenesis in Rats by a New Bioerodible System for Local Delivery of Indomethacin. *American Journal of Bone and Joint Surgery 74-A*: 705-711, **1992**
- 67 57 **SOLLEDER, E.; DEMUTH, D. et al.:** Klinische Prüfung eines neuen Photometrischen Tests zur Bestimmung der Faktor-XIII-Aktivität im Plasma. *Lab. Med. 16*: 48-53, **1992**
- 51 40 **STRESEMANN, E., AST, D.; TUSL, M.:** Erfahrungen mit der Implantation von arteriellen Verweilkathetern bei der Ratte. *Z. für Versuchstierkunde 13*: 51-58, **1971**
- 44 39 **STÜCKER, R.; BRINKMANN, C.; HÄRLE, A.:** Orthopädische Klinik, Universität Freiburg: Ergebnisse der Behandlung der hämatogenen Osteomyelitis mit Septopalketten. *Orthopädische Mitteilungen 3* 164, **1992**
- 34 27 **TAKESHITA, A.; HANAZAWA, S.; AMANO, S.; MATUMOTO, T., KITANO, S.:** IL-1 induces expression of monocyte chemoattractant JE in clonal mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1. *Journal of Immunology, 150 (4)*: 1554-1562, **1993**
- 16 20 **TASHIBANA, T.; MATSUBARA, T., et al.:** Enhancement of new bone formation by hematoma at fracture site. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi., 65(5)*: 349-358, **1991**
- 23 24 **TAYLOR, H. G.; WEISS, J. B.; MCLAUGHLIN, B., DAWES, P. T.:** Raised endothelial cell stimulating angiogenesis factor in ankylosing spondylitis. *Clin Experim Rheumatol 11 (5)*: 537-539, **1993**
- 112 121 **TERMINE, J.; KLEINMAN, H.; WHITSON, W. et al.:** Osteonectin, a bone specific protein linking mineral to collagen. *Cell 26*: 99, **1981**
- 123 127 **THIELEMANN, F. W.; ALEXA, M.; SCHMIDT, G.:** Matrix-induced intramembranous osteogenesis. In: *Silbermann, M.; Slavkin, D. C.F: Current Advances in Skeletogenesis: Development, Biomaterialization, Mediators and Metabolic Bone Disease. jExcerpta Medica, Amsterdam*: 66-73, **1982**
- 201 135 **THIES, H.A.; RICHTER, U.:** Erworbener Faktor-XIII-Mangel und klinische Chirurgie. *MedWelt 32*: 250-255, **1981**
- 26 26 **THOMPSON, W. D.; HARVEY, J. A., et al.:** Fibrinolysis and angiogenesis in wound healing. *J Pathol., 165 (4)*: 311-318, **1991**
- 197 135 **TOIDA, M.; WATANABE, F.; TSAI, C.S.; et al.:** Factor XIIIa-containing cells and fibrosis in oral and maxillofacial lesions: an immunohistochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol 63 (8)*: 293-299, **1989**
- 161 131 **TRIANAPHYLLOPOULOS, D.C.:** The inactivation of factor XIII during blood coagulation. *Thromb Res 3*: 241, **1973**
- 20 22 **TRIFFITT, J. T.:** Initiation and enhancement of bone formation. *Acta Orthop Scand 58*: 673-684, **1987**
- 185 133 **UEYAMA, M.; URAYAMA, T.:** The role of factor XIII in fibroblast proliferation. *Japan J Exp Med 48*: 135-142, **1978**
- 106 120 **URIST, M. R.:** Bone: formation by autoinduction. *Science 150 (698)*: 893-899, **1965**
- 18 21 **URIST, M.R.; DELANGE, R.J.; FINERMAN, G.A.:** Bone cell differentiation and growth factors. *Science 220*: 680-686, **1983**
- 85 79 **VAN DIEST, P. J.; BAAK, J. P. A.:** Morphometry. *Comprehensive Cytopathology; Marluce Bibbo, MD. (Hrsg.), Saunders 1971.*

- 45 39 **WEI, G.; KOTOURA, Y; OKA, M.** et. al.: Kyoto University, Japan: Bioabsorbable Delivery System for Antibiotic Treatment of Osteomyelitis. *Journal of Bone and Joint Surgery [Br]* 73-B: 246-52, **1991**
- 83 79 **WEIBEL, E. R.:** Stereological Methods, Practical Methods for Biological Morphometry. *Academic Press* 1, **1979**
- 144 130 **WEISBERG, L.J.; SHIU, D.T.; CONKLING, P.R.; SHUMAN, M.A.:** Identification of normal human peripheral blood monocytes and liver as sites of synthesis of coagulation factor XIII a-chain. *Blood* 70 (2): 579-582, **1987**
- 143 130 **WEISBERG, L.J.; SHIU, D.T.; GREENBERG, C.S.; KAN, Y.W.; SHUMAN, M.A.:** Localization of the gene for coagulation factor XIII a-chain to chromosome 6 and identification of sites of synthesis. *J Clin Invest* 79 (2): 649-652, **1987**
- 64 51 **WHITE, S. H.; KENWRIGHT, J.:** Nuffield Orthopaedic Centre, Oxford: The Timing of Distraction of an Osteotomy. *J. Bone Joint Surg. [Br]* 72-B: 356-61, **1990**
- 6 9 **WITTMOSER, R.:** Zur Druckosteosynthese. *Langenbecks Arch Klin Chir* 276: 229, **1953**
- 145 130 **WOLPL, A.; LATTKE, H.; BOARD, P.G.; ARNOLD, R.** et al.: Coagulation factor XIII A and B subunits in bone marrow and liver transplantation. *Transplantation* 43 (1): 151-153, **1987**
- 186 134 **YANCEY, S.T.; LAKI, K.:** Transglutaminase and tumor growth. *Ann NY Acad Sci* 202: 344, **1972**
- 130 128 **YASKO, A. W.; LANE, J. M.; FELLINGER, E. J.; ROSEN, V.; WOZNEY, J. M.; WANG, E. A.:** The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg [Am]* 74-A (5): 659-670, **1992**
- 154 130 **YING LIU, Y.; McDONAGH, J.:** Recombinant human tumor necrosis factor- $\alpha$  regulates coagulation F XIIIa expression at the post-transcription level. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg:* S. B5, **1991**
- 173 132 **ZEHER, M.; SZEGEDI, G.; CSIKI, Z.; CSEH, A.; ADANY, R.:** Fibrinolysis-resistant deposits in minor labial salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* 71 (2): 149-155, **1994**
- 30 27 **ZHENG, M. H.; WOOD, D. J.,** et al.: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances expression of IL-6 and TGF  $\beta_1$  genes in normal human osteoblast-like cells. *J Cell Physiol* 159 (1): 76-82, **1994**

## 8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| Abb. | Legende<br><i>(Mikrophotographien der Histologie kursiv)</i>  | Seite |
|------|---|-------|
| 1    | <i>Eine Bone metabolizing Unit (BMU) am Werke: Ein Osteoklasten-Bohrkopf bahnt sich seinen Weg durch die alte Kompakta, Kapillarendothel und Osteoblasten folgen ihm in einem definierten Abstand und bilden konzentrisch neues Osteoid. Ein neues Haversches System ist 'geboren'. (Trichrom Goldner, 200 fache Vergrößerung, Präparat L0/6 re T)</i>                                    | 13    |
| 2    | Verformungstoleranz interfragmentärer Gewebe (aus SCHENK (1992) <sup>FEHLER!</sup><br><b>TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b> )   | 14    |
| 3    | <i>Ein einwandernder Osteoklast überdeckt die Osteotomie-Schnittfläche der Kortikalis und 'frischt' die Oberfläche an. (Trichrom Goldner, 400 fache Vergrößerung, Präparat L1/8 li)</i>   | 15    |
| 4    | <i>Die von Osteoklasten vorbereiteten Oberflächen der Osteotomie werden von eingewanderten Osteoblasten besiedelt. Man beachte die in die Kortikalis eindringenden Osteoklasten, die hierdurch die Retention des neu entstehenden Callusgewebes mit der Kortikalis erhöhen. (Trichrom Goldner, 100 fache Vergrößerung, Präparat L0/13 li T)</i>   | 16    |
| 5    | <i>Die Phasen 1 bis 6 in einem Übersichtsbild. Man erkennt mittig die gelben Erythrozyten, das gelb-rötlich angefärbte Fibrin, blaues Kollagen, Osteochondroblastensäulen und dunkelblaue Primärtrabekel. (Carstairs, 40 fache Vergrößerung, Präparat L0/9 li)</i>  | 16    |
| 6    | <i>Osteochondroblastäre Zellen mit gut sichtbarem, türkisblauen Cytoplasma (Granula), das als histologisches Korrelat der intrazellulären Proteinsynthese und -Glukuronidierung anzusehen ist. (Alzianblau-PAS, 100 fache Vergrößerung, Präparat L0/5 li T)</i>   | 18    |
| 7    | <i>Die Epiphysenfuge als Pendant der obigen Abbildung 6. Auch hier sind deutlich PAS-positive Granula im Zellplasma der hypertrophen Chondroblasten der Säulenknorpelzone zu erkennen. (Alzianblau-PAS, 200 fache Vergrößerung, Präparat L1/14)</i>   | 19    |
| 8    | Einige Faktoren, die das Knochenwachstum beeinflussen (ergänzt nach Triffitt (1987) <sup>20</sup> )   | 22    |
| 9    | Aufführung einiger Mediatoren und Hormone, die Osteoblasten und -klastenaktivität steuern. Die am 'Coupling' beteiligten, auto, bzw. parakrinen Mediatoren und PTH sind fett gedruckt. (nach A. Schulz <sup>22</sup> )  | 23    |
| 10   | Darstellung der vielfältigen Interaktion der an der Osteogenese beteiligten Zellgruppen mittels lokaler Mediatoren. Obwohl die Abbildung keinen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt und zeitliche Zusammenhänge nicht berücksichtigt, gibt sie einen groben Überblick über mögliche Vorgänge sowohl des Remodelings wie der Neosteogenese während der Frakturheilung oder der Callotasis. | 24    |
| 11   | Übersicht über die während der verschiedenen Frakturheilungsphasen freigesetzten Mediatoren und ihre Wirkung  | 27    |
| 12   | Operierte Kaninchen mit Fixateur Externe auf der grünen Wiese   | 36    |

|    |   |    |
|----|---|----|
| 13 | Demonstration der Mobilität der operierten Tiere  | 37 |
| 14 | Modell des die Osteotomie stabilisierenden Miniatur-Fixateur-Externe mit am Knochen angebrachten Intraport-Kathetersystem.  | 38 |
| 15 | Sicht auf das Operationsfeld nach Durchtrennung von Haut und Fascia lata. Der Femur (die Pinzette zeigt auf ihn) stellt sich dar. Rechts läßt sich der Trochanter major vermuten, links läuft über den Knochen eine kleine Arterie, auf die beim Setzen der Schanzschen Schrauben peinlichst zu achten war. | 44 |
| 16 | Bohrung für die erste Schanzsche Schraube ventral an dem hier gut sichtbaren Trochanter major vorbei in den Trochanter tertius. Die Bohrhülse verhindert ein Abrutschen des Bohrers.  | 45 |
| 17 | Festlegung des Sitzes des Fixateur Externe durch die distale Bohrung. Die mittleren Schanzschen Schrauben mußten nun auf dem gekrümmten Femur Platz finden.   | 46 |
| 18 | Osteotomie mittels einer Trennscheibe aus dem Dentalbedarf. Zum Schutz des umliegenden Gewebes sind Homann-Hebel eingesetzt. Um Hitzeekrosen des Knochens zu vermeiden wird kontinuierlich mit steriler, isotonischer Kochsalzlösung gekühlt und ohne Druck osteotomiert.                                   | 47 |
| 19 | Intraoperativer Sitz des Katheters, welcher zum am Rücken epifaszial liegenden Intraport führt. Der Femur ist zur besseren Darstellung der Osteotomie einen halben Zentimeter distrahiert. Vor Faziennaht wird die Osteotomie leicht komprimiert.   | 48 |
| 20 | Punktieren und Füllen des Intraport-Systems, dessen Konturen sich unter der Haut abzeichnen.  | 50 |
| 21 | Täglicher Distraktionsvorgang. Die Schraube wird eine Umdrehung gedreht, was einer Distraction von 0,7 mm entspricht.   | 51 |
| 22 | Zeitübersicht über den Versuchsablauf   | 53 |
| 23 | Röntgenaufnahme eines Kaninchens in maximaler Streckstellung. Über den Distraktionszonen sind leichte, streifenförmige Verschattungen zu erkennen, die beginnender Mineralisation entsprechen. (Tier L1/6)  | 59 |
| 24 | Röntgenaufnahme eines Kaninchen in Hockstellung (Tier L1/14)  | 59 |
| 25 | Schnittführung der Histologie in katheternahe Ebene   | 64 |
| 26 | Schnittführung der Histologie in zentraler, marknaher Ebene   | 64 |
| 27 | <i>Ein histologisches Übersichtspräparat in der Trichrom-Goldner-Färbung (10 fache Vergrößerung, Präparat L0/5 re)</i>  | 66 |
| 28 | <i>Ein histologisches Übersichtspräparat in der Toluidin-Färbung (10 fache Vergrößerung, Präparat L0/3 li)</i>  | 70 |
| 29 | <i>Ein histologisches Übersichts-Präparat in der Azan-Färbung (10 fache Vergrößerung, Präparat L0/5 re)</i>   | 71 |
| 30 | <i>Ein histologisches Übersichtspräparat in der Alzianblau-PAS-Färbung (10 fache Vergrößerung, Präparat L0/5 re)</i>  | 74 |

|    |  |    |
|----|--|----|
| 31 | <i>Ein histologisches Übersichtspräparat in der Carstairs-Färbung (10 fache Vergrößerung, Präparat L0/5 re)</i>  | 77 |
| 32 | Die Kollegen Birkenhauer und Bräuer während der Auswertung an dem Quantimet 500+® Die im Mikroskop eingestellten Bildausschnitte werden mit einer hochauflösenden CCD-Kamera aufgenommen und im Rechner digital verarbeitet.   | 80 |
| 33 | Abhängigkeit der Maße von der Ausrichtung der Strukturen   | 82 |
| 34 | Darstellung des Holmes-Effektes  | 83 |
| 35 | Auszählung entlang der Diagonalen  | 84 |
| 36 | <i>Ein Diagonalen-Zählkreuz ist in einem Präparat eingezeichnet. Das mineralisierte Osteoid der Primärtrabekel läßt sich gut von der Grundfärbung differenzieren. (Kossa, 10 fache Vergrößerung, Präparat L0/5 re)</i>   | 85 |
| 37 | <i>Gut zu differenzierender Übergang von unverkalktem (rot) zu verkalktem (grün) Osteoid der Marktrabekel in der Trichrom-Goldner-Färbung (100 fache Vergrößerung, Präparat L0/13 re)</i>  | 86 |
| 38 | <i>Gut zu differenzierender Übergang von unverkalktem (rot) zu verkalktem (blau) Osteoid der Marktrabekel in der Carstairs-Färbung (100 fache Vergrößerung, Präparat L0/13 re)</i>   | 86 |
| 39 | <i>Farblich gut zu differenzierende verkalkte (blau) und unverkalkte (rot) Knochengrundsubstanz der Distractionszone in der Carstairs-Färbung. Links unten bereits vollkommen mineralisierte, 'statisch' anmutende Primärtrabekel, die mittig in rotes, unverkalktes, eher dynamisch, sich in der Zugrichtung ausrichtendes Osteoid der Distractionszone übergehen. Rechts Osteochondroblastensäulen in Distractionsrichtung, oben gewellte, ebenfalls blaue Kollagenfasern. (100 fache Vergrößerung, Präparat L0/13 re)</i> | 87 |
| 40 | <i>Fleckig angeordnete Mineralisationsstörungen der jungen Kaninchenkompakta färben sich in der Carstairs-Färbung rot an. Im Laufe des Heranwachsens werden diese Areale durch das 'Remodeling' durchbaut und mineralisiert. (Carstairs, 100 fache Vergrößerung, Präparat L0/14 li)</i>  | 88 |
| 41 | Plazierung der Meßrahmen entlang der Orthogonalen  | 89 |
| 42 | mittige Anordnung der Meßfelder bei der Kollagenmessung  | 90 |
| 43 | <i>Distractionszone an Tag 3. Kompakta-Trümmer werden von einem Fibringerinnsel umgeben, Erythrozyten befinden sich noch im Osteotomiespalt, dessen Osteotomieränder nicht vollständig adaptiert sind. Erste Zellen wandern an der Schnittfläche entlang. (Trichrom-Goldner, 100 fache Vergrößerung, Präparat L0/8 re)</i>   | 92 |
| 44 | <i>Distractionszone an Tag 6. Recht deutlich läßt sich die Einwanderung von Osteoprogenitorzellen aus dem Periost über den Knochensplitter in die Distractionszone verfolgen. Im Spalt hat sich inzwischen ein lockeres, zellreiches Gewebe etabliert. Einzelne Erythrozyten sind vermutlich von dem pericallösen Hämatom im Callusgewebe übrig geblieben. (Trichrom-Goldner, 100 fache Vergrößerung, Präparat L1/2 li)</i>  | 93 |

|    |  |     |
|----|--|-----|
| 45 | <i>Distrazionszone an Tag 12. Die ersten Primärtrabekel haben sich auf der Kompaktaschnittfläche im Callusgewebe gebildet. Die Oberflächen der Trabekel sind bereits von ausdifferenzierten Osteoblasten besetzt, während das übrige Callusgewebe noch aus unreiferen Osteoprogenitoren besteht. In der Nähe der Kompaktaoberfläche befindet sich auch ein Osteoklast. Leider ist die dichtere Kompakta vom weicheren Callusgewebe während des Schneidens abgerissen. (Trichrom-Goldner, 100 fache Vergrößerung, Präparat L0/1 re)</i> | 94  |
| 46 | <i>Distrazionszone an Tag 19. Die Kompakta hat sich innig mit den neugebildeten Primärtrabekeln verbunden. Rechts findet sich noch Osteochondroblastäres Gewebe, welches an wenigen Stellen bereits fleckhaft verkalkt ist (Mineralisierte Grundsubstanz: grün, nichtmineralisierte Grundsubstanz: rot, Trichrom-Goldner, 100 fache Vergrößerung, Präparat L1/5 li)</i>  | 95  |
| 47 | Volumendichten des verkalkten Osteoids der einzelnen Tiere der Kontrollgruppe in zentraler Schnittebene (Ordinate: Volumendichte als Dezimalbruch)   | 98  |
| 48 | Volumendichten des verkalkten Osteoids der einzelnen Tiere der Verumgruppe in zentraler Schnittebene (Ordinate: Volumendichte als Dezimalbruch)  | 98  |
| 49 | Vergleich der mittleren Volumendichten des verkalkten Osteoids (+/- Standardabweichung) der Verum- mit der Kontrollgruppe für die zentrale Ebene. Die Verumgruppe weist eine nicht signifikante Zunahme der Volumendichte um 0,017, entsprechend 6,9 % gegenüber der Kontrollgruppe auf. (Ordinate: Volumendichte als Dezimalbruch)  | 98  |
| 50 | Volumendichten des verkalkten Osteoids der einzelnen Tiere der Kontrollgruppe in katheternaher Schnittebene (Ordinate: Volumendichte als Dezimalbruch)   | 99  |
| 51 | Volumendichten des verkalkten Osteoids der einzelnen Tiere der Verumgruppe in katheternaher Schnittebene (Ordinate: Volumendichte als Dezimalbruch)  | 99  |
| 52 | Vergleich der mittleren Volumendichten des verkalkten Osteoids (+/- Standardabweichung) der Verum- mit der Kontrollgruppe für die katheternahe Ebene. Die Verumgruppe weist eine nicht signifikante Abnahme der Volumendichte um 0,004, entsprechend 1,5 % gegenüber der Kontrollgruppe auf. (Ordinate: Volumendichte als Dezimalbruch)  | 99  |
| 53 | Flächenverhältnis von verkalktem zu unverkalktem Osteoid der Kontrollgruppe (Ordinate: Verhältnis als Dezimalbruch)  | 100 |
| 54 | Flächenverhältnis von verkalktem zu unverkalktem Osteoid der Verumgruppe (Ordinate: Verhältnis als Dezimalbruch)   | 100 |
| 55 | Vergleich der mittleren Flächenverhältnisse des verkalkten zum unverkalkten Osteoid der Kontroll- mit der Verumgruppe. Beachte die im Test nach Mann-Whitney signifikant bessere Mineralisation des vorhandenen Osteoids um 0,09, entsprechend 16,9 % ! (Ordinate: Flächenverhältnis als Dezimalbruch)   | 100 |
| 56 | Osteoblastendichte, d. h. Osteoblastenzahl pro Trabekelumfang, der Kontrollgruppe (Ordinate: 1 Zelle/ $\mu\text{m}$ )  | 102 |
| 57 | Osteoblastendichte, d. h. Osteoblastenzahl pro Trabekelumfang, der Verumgruppe (Ordinate: 1 Zelle/ $\mu\text{m}$ )   | 102 |



|    |   |     |
|----|---|-----|
| 58 | Osteoblastendichte, d. h. Osteoblastenzahl pro Trabekelumfang, im Vergleich der beiden Gruppen. Es ist kein signifikanter Unterschied von 0,001, entsprechend 2,6 % Abnahme der Verumgruppe gegenüber der Kontrollgruppe festzustellen. (Ordinate: 1 Zelle/ $\mu\text{m}$ )                     | 102 |
| 59 | Umfangdichten, d. h. das Verhältnis von Trabekelumfang pro Trabekelfläche, der Kontrollgruppe. (Ordinate: Umfangdichte in $1/\mu\text{m}$ )   | 103 |
| 60 | Umfangdichten, d. h. das Verhältnis von Trabekelumfang pro Trabekelfläche, der Verumgruppe (Ordinate: Umfangdichte in $1/\mu\text{m}$ )   | 103 |
| 61 | Umfangdichten, d. h. das Verhältnis von Trabekelumfang pro Trabekelfläche, im Vergleich der beiden Gruppen. Die Zunahme der Verumgruppe gegenüber der Kontrollgruppe ist nicht signifikant und beträgt 0,002 $1/\mu\text{m}$ , entsprechend 2,5 %. (Ordinate: Umfangdichte in $1/\mu\text{m}$ ) | 103 |
| 62 | Flächenanteil an Kollagenfasern im mittleren Distractionssegment der Kontrollgruppe. (Ordinate: Dezimalbruch)   | 104 |
| 63 | Flächenanteil an Kollagenfasern im mittleren Distractionssegment der Verumgruppe (Ordinate: Dezimalbruch)   | 104 |
| 64 | Flächenanteil an Kollagenfasern im mittleren Distractionssegment der Verumgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Abnahme der Verumgruppe gegenüber der Kontrollgruppe um 0,013, entsprechend 2,6 % ist nicht signifikant. (Ordinate: Dezimalbruch)   | 104 |
| 65 | Anisotropie, also Ausrichtungstendenz der Trabekel der Kontrollgruppe. Je höher der Quotient ist, desto mehr Trabekel verlaufen in ihrer Tendenz parallel zur Zugrichtung. (Ordinate: Anisotropie-Quotient als Dezimalbruch)  | 106 |
| 66 | Anisotropie der Verumgruppe (Ordinate: Anisotropie-Quotient als Dezimalbruch)   | 106 |
| 67 | Anisotropie der beiden Gruppen im Vergleich. Man beachte den signifikanten Zuwachs von 0,051 (7,9 %). (Ordinate: Anisotropie-Quotient als Dezimalbruch)   | 106 |
| 68 | Faktor-XIII-Plasmaspiegel der Verumgruppe   | 108 |
| 69 | Faktor-XIII-Plasmaspiegel der Kontrollgruppe  | 108 |
| 70 | Vergleich der mittleren Faktor-XIII-Spiegel der Verum- mit denen der Kontrollgruppe der lokalen Applikation   | 109 |
| 71 | Faktor-XIII-Plasmaspiegel der Verumgruppe der systemischen Applikation, die der lokalen Verumgruppe in der Dosis entspricht   | 110 |
| 72 | Vergleich der mittleren Faktor-XIII-Spiegel der Verumgruppen der lokalen (L 1) mit denen der systemischen Applikation (S 2)   | 111 |
| 73 | Temperaturverlauf der Kontrollgruppe  | 112 |
| 74 | Temperaturverlauf der Verumgruppe   | 112 |
| 75 | Vergleich der beiden Temperaturverläufe   | 113 |

|    |   |     |
|----|---|-----|
| 76 | Vergleich der mittleren Temperaturen beider Gruppen   | 113 |
| 77 | Gewicht der Kontrollgruppe  | 114 |
| 78 | Gewicht der Verumgruppe   | 114 |
| 79 | Vergleich der Gewichtsverläufe von Kontroll- und Verumgruppe  | 114 |
| 80 | Darstellung der Zugkräfte über den bindegewebigen Callus und des dadurch verursachten hydrostatischen, intrinsischen Druckes im Callus, insbesondere in den Knorpelinseln, die Größenverhältnisse sind nicht der Realität entsprechend  | 115 |
| 81 | <i>Hier kommt die Aufschlußzone zwischen Osteochondroblastensäulen und der primären Spongiosa zur Darstellung. In der Kossa-Färbung werden mineralisierte Grundsubstanzbereiche dargestellt. Deutlich sieht man, wie die verkalkte Knorpelgrundsubstanz in die mineralisierten Primärtrabekel übergeht, an die sich nun Osteoblasten legen. Dieser Vorgang läßt sich mit der enchondralen Knochenbildung der Epiphysenfuge vergleichen. Oben links-mittig wandert ein Osteoklast aus dem Markbereich ein. (Kossa, 200 fache Vergrößerung, Präparat L0/3 re T)</i> | 117 |
| 82 | <i>Darstellung der Mineralisation von Grundsubstanz des Distractionssegmentes in der von-Kossa-Färbung. Mineralisiertes Osteoid wird versilbert (schwarz). Man kann gut die Kristallisationskeime im noch unverkalkten Osteoid erkennen, die noch keine Verbindung zum verkalkten Osteoid aufweisen. Die Mineralisationskeime befinden sich z. T. in relativer Entfernung zu den Osteoblasten, obwohl die Mineralisation ein von ihnen bestimmter Vorgang ist. (Kossa, 400 fache Vergrößerung, Präparat L0/7 re T)</i>  | 118 |
| 83 | <i>Demonstration der direkten desmalen Verknöcherung des Distractionssegment-Bindegewebes. (Kossa, 400 fache Vergrößerung, Präparat L0/2 re T)</i>  | 119 |
| 84 | Änderungen in der Zusammensetzung der zellulär synthetisierten Grundsubstanz-Matrix bedingen die mikroskopisch deutliche Metachromasie  | 121 |
| 85 | <i>Aufbau der Epiphysenfuge mit Säulenknorpel, Aufschlußzone und Mineralisation der metachromatischen Grundsubstanz. Kaninchen (Azan, 200 fache Vergrößerung, Präparat L1/14)</i>   | 123 |
| 86 | <i>Säulenartig angeordnete osteochondroblastäres Zellgewebe, das kontinuierlich in verkalktes Knochengewebe übergeht. Man achte auf die metachromatischen Effekte während der Mineralisation sowohl des Knorpel- wie des Knochengewebes, die analog denen der Epiphysenfuge verlaufen. Distractionszone des Kaninchenfemurs (Azan, 200 fache Vergrößerung, Präparat L0/3 re T)</i>  | 124 |
| 87 | <i>Übersicht über die fischzugartige Osteoprogenitorzell-Migration an derer osteotomierten Kortikalis vom Periost ins Distractionssegment. (Trichrom-Goldner, 40 fache Vergrößerung, Präparat L0/13 li T)</i>   | 125 |
| 88 | <i>Unterschiedliche Aspekte von Osteoprogenitorzellen. Oben Osteochondroblasten in Zellteilung, Kernpyknose, Nukleoklasie, Cytolyse, und z. T. mit PAS-positivem Zytoplasma. In der unteren Bildhälfte sind noch relativ undifferenzierte Osteoprogenitorzellen, rechts unten zwei große, mehrkernige Osteoklasten zu sehen. (Alzianblau-PAS-Färbung, 400 fache Vergrößerung, Präparat L0/14 re T)</i>  | 126 |

|    |   |     |
|----|---|-----|
| 89 | <i>In einen Fibrinclot eines Hämatoms einwandernde Osteoprogenitorzellen. Die Erythrozyten stellen sich gelb, Fibrin rot, Osteoprogenitorzellen hellrosa, Kollagen blau und der unten rechts liegende Primärtrabekel dunkelblau dar. (Carstairs, 200 fache Vergrößerung, Präparat L0/9 li)</i>  | 132 |
| 90 | Zeitzone des Distraktionssegmentes  | 144 |
| 91 | <i>In Analogie zum obigen Zeitzonemodell zeigt sich das Präparat in naturam. Deutlich und recht linear zeichnen sich die verschiedenen Zonen der Osteogenese ab. Mittig findet sich das Hämatom (gelb), der rötlich-orange Rand wird durch Fibrin gebildet. Ihm anliegend findet sich hellblau die Proliferationszone, gebildet aus blaues Kollagen bildenden Osteoprogenitorzellen, Osteochondroblastensäulen, ebenfalls hellblau, dann die Mineralisationszone, in der der rote Saum unmineralisierten Osteoids in mineralisierte, dunkelblaue Primärtrabekel umschlägt. (Carstairs, 20 fache Vergrößerung, Präparat L0/9 li)</i> | 144 |
| 92 | <i>Trabekelstruktur der Kontrollgruppe. Die Ausrichtung der langgestreckten Trabekel in Distraktionsrichtung ist gut erkennbar. Viele, filigrane, in Distraktionsrichtung verlaufende Trabekel ergeben eine kleinere, gegen 0 strebende Anisotropie. (Kossa, 10 fache Vergrößerung, Präparat L0/14 re)</i>  | 147 |
| 93 | <i>Trabekelstruktur der Verumgruppe. Die Trabekel erscheinen blasiger und weniger ausgerichtet, als in Abbildung 92. Weniger, nicht ausgerichtete, klobigere Trabekel streben in ihrer Anisotropie gegen 1. (Kossa, 10 fache Vergrößerung, Präparat L1/4 li)</i>  | 148 |
| 94 | <i>Osteoblasten, welche als 'Deckzellen' die Trabekel besetzen, beachte den dichten Besatz! Am oberen Bildrand sind drei Osteoklasten zu sehen, noch nicht in Kontakt zur Trabekeloberfläche, erkennbar an der Mehrkernigkeit und der gegenüber den Osteoblasten intensiveren roten Färbung des Zytoplasmas. Im intertrabekulären Gewebe besteht eine reiche Kapillarisation. (Trichrom-Goldner, 200 fache Vergrößerung, Präparat L1/4 li)</i>  | 149 |
| 95 | <i>Die im paramedianen Distraktionszonenabschnitt gelegenen, gewellten, tiefblauen Kollagenfasern heben sich gut gegen die Grundsubstanz und die rot gefärbten, dazwischen liegenden Osteoprogenitorzellen ab. Sie lassen sich über die Berechnung der blauen Flächen in ihrer Dichte semiquantitativ bestimmen. (Carstairs, 200 fache Vergrößerung, Präparat L0/5 re)</i>  | 151 |

## 9. TABELLARISCHER LEBENS LAUF

|                           |                   |  |
|---------------------------|-------------------|--|
| <b>Persönliche Daten:</b> | Name:             | Axel Suhrborg  |
|                           | geboren am:       | 10. März 1967 in Trier   |
|                           | Familienstand:    | ledig  |
|                           | Eltern:           | Dieter Suhrborg, Versicherungskaufmann<br>Elke Suhrborg, geb. Bartels, Hausfrau  |
| <b>Schulbildung:</b>      | 1973 - 1977       | Matthias-Grundschule Trier   |
|                           | 1977 - 1986       | Staatliches Friedrich-Wilhelm-Gymnasium Trier;<br>Abschluß: Allgemeine Hochschulreife  |
| <b>Ersatzdienst:</b>      | 09/1986 - 04/1988 | Zivildienstschule Trier<br>Nichtseßhaftenhilfe der Caritas Trier   |
| <b>Studium:</b>           | 04/1988 - 03/1989 | Zahnmedizin an der Philipps-Universität Marburg;<br>Naturwissenschaftliche Vorprüfung  |
|                           | 04/1989 - 09/1990 | Humanmedizin (Vorklinik) an der Philipps-Universität Marburg; Ärztliche Vorprüfung   |
|                           | 10/1990 - 09/1991 | Humanmedizin (Klinik) an der Philipps-Universität Marburg; Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung   |
|                           | 10/1991 - 09/1992 | Humanmedizin an der Université de Poitiers;<br>Universitätsexamina in den Fächern:<br>Dermatologie (Prof. Marc Larrègue)<br>Orthopédie-Traumatologie (Prof. Jean-Pierre Clarac)<br>Gynécologie (Prof. H. de Touris)<br>Spécialités chirurgicales:<br>ORL (HNO): Prof. Jean-Pierre Fontanel;<br>Ophtalmologie: Prof. Jean-François Risse;<br>Stomatologie: Prof. Jean-Marie Descrozailles |
|                           | 10/1992 - 09/1994 | Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg;<br>Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  |
|                           | 10/1994 - 03/1995 | Niederschrift der Promotionsarbeit   |

|  |                   |  |
|--|-------------------|--|
| <b>Studium:</b>                        | 04/1995 - 03/1996 | Praktisches Jahr am Universitätsklinikum der Philipps-Universität Marburg:<br>Chirurgie: Allgemeinchirurgie (Prof. Dr. M. Rothmund)<br>Dermatologie (Prof. Dr. R. Happle)<br>Innere Medizin (Prof. Dr. P von Wichert)  |
|  | 28.05.1996        | Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung sehr gut (Ärztliche Prüfung insgesamt 1,83)   |
| <b>Famulaturen und Praktika:</b>       | 08/1989 - 09/1989 | Krankenpflegepraktikum am Centre Hospitalier Général d'Arles in der HNO  |
|  | 02/1991 - 03/1991 | Famulatur in der Chirurgie am Lehrkrankenhaus der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Mutterhaus der Borromäerinnen, Trier (Prof. Dr. Straaten)  |
|  | 08/1992           | Famulatur in der Inneren Medizin (Maladies infectieuses et tropicales) am Centre Hospitalier Universitaire der Université de Poitiers (Prof. B. Becq-Giraudon)   |
|  | 03/1993 - 04/1993 | Famulatur im Medizinischen Zentrum für Pathologie des Klinikums der Philipps-Universität Marburg (Prof. Dr. Thomas)  |
|  | 02/1994 - 03/1994 | Famulatur in der Gemeinschaftspraxis Dr. Tat/ Dr. Breithaupt, Ärzte für Chirurgie und Unfallchirurgie, Laubach   |
| <b>Studienbegleitende Tätigkeiten:</b> | 10/1990 - 06/1991 | Englisch-Kurs am Institut für Anglistik der Philipps-Universität Marburg mit dem Abschluß des First Certificate in English der University of Cambridge (Certificate Grade C)   |
|  | 04/1991 - 07/1991 | Französisch-Kurs am Institut für Romanische Philologie   |
|  | 04/1993 - 04/1996 | Studentische Hilfskraft im Schlafmedizinischen Labor des Zentrums für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg, zuletzt auch als Supervisor und zu wissenschaftlichen Messungen bei der Entwicklung eines Personalcomputer gestützten Polysomnographie-Geräts (Sidas GS) eingesetzt |

|  |                   |  |
|--|-------------------|--|
| <b>Studienbegleitende<br/>Tätigkeiten:</b> | 04/1993 - 05/1993 | EDV-Kurse im Fachbereich Medizinische Informatik der Philipps-Universität Marburg (SAS, DOS)   |
|  | 10/1993 - 03/1996 | Inskription im Fachbereich Neuere Deutsche Literatur und Kunstwissenschaften mit Nebenfach Graphik und Malerei an der Philipps-Universität Marburg |
|  | 07/1994           | Sprachtest für den DFA am Institut für Romanische Philologie bescheinigt sehr gute Französisch-Kenntnisse  |
|  | 10/1994 - 08/1996 | studentische Hilfskraft im Altenwohnheim der Stiftung St. Jakob, Marburg   |
| <b>Weitere<br/>Qualifikationen:</b>        | EDV-Kenntnisse    | DOS, Word für Windows, Excel, Access   |
| <b>Interessen:</b>                         | Sport<br>Hobby    | Tennis, Fahrradfahren, Segeln<br>Farb- und Schwarz-Weiß-Fotographie und eigene Entwicklung, Kochen, Jazz, Gitarre, Saxophon                        |

## 10. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt insbesondere meinem Doktorvater, Privatdozent Dr. Reinhard Schlenzka, der den Anstoß zu dieser Arbeit lieferte und in seiner humorvollen und unkonventionellen Art den Fortgang des Unternehmens unterstützte.

Weiterhin möchte ich der Behringwerke AG Marburg danken, ohne deren finanzielle und organisatorische Unterstützung die Dissertation nicht zustande gekommen wäre. Hier bin ich besonders den Mitarbeitern Herrn Dr. Wrabetz, Herrn Dr. Ronneberger, Herrn Dr. Diehl und Herrn Dr. Hein für Ihren akademischen Ratschlag und die organisatorische Hilfe verbunden. Herr Spehrer wird mir in seiner väterlichen Art und besonderen Hilfsbereitschaft bei den alltäglichen Problemen während des Operierens in Erinnerung bleiben. Herrn Seitner, Herrn Michels, Herrn Schick und Herrn Bellmann möchte ich für ihr persönliches Engagement und ihre Freundschaft beim täglichen Zusammenarbeiten danken. Den Mitarbeitern des hämatologischen Labors sei Dank für ihre Zuverlässigkeit. Die gute Arbeitsatmosphäre in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie der Behringwerke schätzte ich sehr.

Den Damen aus der Sterilisation der Universitätsklinik sei mein Dank ausgesprochen für ihr unermüdliches Bemühen, uns immer rechtzeitig Operationsbesteck und -Kleidung steril zur Verfügung zu stellen.

Ohne die Mitarbeit der Pathologischen Abteilung der Universitätsklinik, besonders Herrn Privatdozenten Dr. Neumann, wären Röntgenverlaufskontrollen nicht möglich gewesen.

Den Mitarbeitern des Forschungslabors des Zentrums für Hautkrankheiten der Philipps-Universität Marburg gebührt mein Dank für die Bereitstellung eines Mikroskops zur Erstellung von histologischen Fotographien.

Frau Prof. Flores de Jacoby der Abteilung für Parodontologie der Mund-,Gesichts- und Kieferklinik der Philipps-Universität möchte ich danken für ihren Rat zu Theorie und Praxis der unentkalkten Knochenhistologie.

Den Mitarbeitern des Pathologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen, Herrn Dr. Dreyer, Herrn Dr. Hinrichs, Herrn Dr. Heinrich und Herrn Dechert danke ich für ihr herzliches Entgegenkommen gegenüber Angehörigen einer anderen Universität und ihrem kompetenten Ratschlag zur automatischen Bildanalyse und Methoden der Histomorphometrie von Knochengewebe.

Herrn Cassel des Zeitreihenlabors für Polysomnographie des Medizinischen Zentrums für Innere Medizin sei Dank für seine Beratung hinsichtlich Fragen zur statistischen Auswertung.

Herrn Dr. Lehnhard der Firma Braun Melsungen bin ich für seinen Rat zu Fragen der Katheterproblematik verbunden.

Der Firma Hoechst sei Dank für die großzügige Bereitstellung des Antibiotikums Zinacef®.

Last but not least natürlich möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit mit meinen Kommilitonen und Freunden Torsten Bräuer und Björn Birkenhauer herzlich bedanken, die mich in allen Höhen und Tiefen der Arbeit begleiteten und unterstützten, mit denen ich Team-Arbeit schätzen lernte.



## EPILOG

Ich bin des trockenen Tons nun satt,  
Muß wieder recht den Teufel spielen.  
Der Geist der Medizin ist leicht zu fassen!  
Ihr durchstudiert die groß- und kleine Welt,  
Um es am Ende gehn zu lassen,  
Wies Gott gefällt.  
Vergebens, daß Ihr ringsum wissenschaftlich schweift,  
Ein jeder lernt nur, was er lernen kann;  
Doch der den Augenblick ergreift,  
Der ist der rechte Mann.  
Ihr seid noch ziemlich wohlgebaut,  
An Kühnheit würd's Euch auch nicht fehlen,  
Und wenn Ihr Euch nur selbst vertraut,  
Vertrauen Euch die andern Seelen.  
Besonders lernt die Weiber führen!  
Es ist ihr ewig Weh und Ach,  
So tausendfach,  
Aus Einem Punkt zu kurieren  
Und wenn Ihr halbwegs ehrbar tut,  
Dann habt Ihr sie all unterm Hut.  
Ein Titel muß sie erst vertraulich machen,  
Daß Eure Kunst viel Künste übersteigt;  
Zum Willkomm tappt Ihr dann nach allen Siebensachen,  
Um die ein andrer viele Jahre streicht,  
Versteht das Pülslein wohl zu drücken  
Und fasset sie, mit feurig-schlauen Blicken,  
Wohl um die schlanke Hüfte frei,  
Zu sehn, wie fest geschnürt sie sei. ...

...Grau, teurer Freund, ist alle Theorie,  
Und grün des Lebens goldner Baum.

*Mephistopheles im Studienzimmer  
des Doktor Faustus zu einem Schüler*

*(J. W. von Goethe: Faust, der Tragödie erster Teil)*

## **11. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

### **Osteoinduktion durch lokale Applikation von Blutgerinnungsfaktor XIII**

#### **Eine tierexperimentelle Studie am Modell der Distraktionsosteosynthese des Kaninchenfemurs**

im Medizinischen Zentrum für Operative Medizin I, Abteilung für Unfallchirurgie, unter Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. R. Schlenzka ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 10. Dezember 2007

- <sup>1</sup> CODIVILLA, A.: On the means of lengthening in the lower limbs, the muscles and tissues which are shortened through deformity. *Am J Orthop Surg* 11: 353, **1905**
- <sup>2</sup> CODIVILLA, A.: Come si possa rendere efficace e tollerata una fort trazione applicata all'arto inferiore. *Mem Chir Publ* 2: 3, **1903**
- <sup>3</sup> BIER, A.: Über Knochenregeneration und über Pseudarthrosen. *Arch Klin Chir* 127: 1, **1923**
- <sup>4</sup> BLOCK, W.: Ein neuer Distraktionsapparat und Spannbügel für die Drahtextension. *Zentralbl Chir* 46/47, **1923**
- <sup>5</sup> KLAPP, R.; BLOCK, W.: Die Knochenbruchbehandlung mit Drahtzügen. *Urban und Schwarzenberg, Berlin*, **1930**
- <sup>6</sup> WITTMOSER, R.: Zur Druckosteosynthese. *Langenbecks Arch Klin Chir* 276: 229, **1953**
- <sup>7</sup> ILIZAROV, G. A.: The Tension-Stress Effect on the Genesis and Growth of Tissues. *Clin Orthop Rel Res* 238: 249-281, **1989**
- <sup>8</sup> PLENK, H.: Knochengewebe und Zähne. In *Romeis: Mikroskopische Technik, 17. neubearbeitete Auflage; Hrsg. P. Böck, Urban & Schwarzenberg; München, Wien, Baltimore: 553, 1989*
- <sup>9</sup> FROST, H. M.: Bone Dynamics in metabolic bone disease. *J Bone Joint Surg* 48A: 1192-1203, **1966**
- <sup>10</sup> HAM, A. W.: Some Histophysiological problems peculiar to calcified tissues. *J Bone Joint Surg* 34A: 701, **1952**
- <sup>11</sup> HOLTROP, M. E.: The ultrastructure of bone. *Ann Clin Lab Sci* 5: 264, **1975**
- <sup>12</sup> KERN, H. F.: Allegorie zitiert aus einer Kursstunde "Histologie für Zahnmediziner", gehalten an der Philipps-Universität Marburg im Wintersemester **1988/89**.
- <sup>13</sup> SCHENK, R.; WILLENEGGER, H.: Zur Histologie der primären Knochenheilung. Modifikationen und Grenzen der Spalthheilung in Abhängigkeit von der Defektgröße. *Unfallheilkunde* 80: 155, **1977**
- <sup>14</sup> BIRKENHAUER, B.: Die zelluläre Interaktion während der Osteogenese - Ein morphologisch und funktionell gegliedertes Modell. *Inaugural-Dissertation an der Philipps-Universität Marburg, Klinik für Unfallchirurgie, 1995*.
- <sup>15</sup> BIER, A.: Die Bedeutung des Blutergusses für die Heilung des Knochenbruches. Heilung von Pseudarthrosen und von verspäterter Callusbildung durch Bluteinspritzung. *Med Klin* 1: 6, **1905**
- <sup>16</sup> TASHIBANA, T.; MATSUBARA, T., et al.: Enhancement of new bone formation by hematoma at fracture site. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi*, 65(5): 349-358, **1991**
- <sup>17</sup> GAZIT, D.; KARMISH, M. et al.: Regenerating marrow induces systemic increase in osteo- and chondrogenesis. *Endocrinology*, 126 (5): 2607-2613, **1990**
- <sup>18</sup> URIST, M.R.; DELANGE, R.J.; FINERMAN, G.A.: Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 220: 680-686, **1983**
- <sup>19</sup> CANALIS, E.; MCCARTHY, T.; CENTRELLA, M.: Identity of bone derived growth factor with  $\beta$ 2-Mikroglobulin. *J Bone Mineral Res* 2 (Suppl. 1): 532, **1987**
- <sup>20</sup> TRIFFITT, J. T.: Initiation and enhancement of bone formation. *Acta Orthop Scand* 58: 673-684, **1987**
- <sup>21</sup> JAWORSKI, Z. F. G.: Coupling of bone formation to bone resorption: A broader view. *Calcif Tissue Int* 36: 531, **1984**
- <sup>22</sup> SCHULZ, A.: Knochenstruktur: physiologische und pathologische Knochenumbauvorgänge. *Sandorama* 5: 25-31, **1988**
- <sup>23</sup> TAYLOR, H. G.; WEISS, J. B.; MCLAUGHLIN, B.; DAWES, P. T.: Raised endothelial cell stimulating angiogenesis factor in ankylosing spondylitis. *Clin Experim Rheumatol* 11 (5): 537-539, **1993**
- <sup>24</sup> RAISZ, L. G.; KREAM, B. E.: Regulation of bone formation (first of two parts). *The New England Journal of Medicine* 309 (1): 29-35, **1983**
- <sup>25</sup> ROSEN, E. M.; GRANT, D. S.: Scatter factor (hepatocyte growth factor) is a potent angiogenesis factor in vivo. *Clin Exp Rheumatol* 47: 227-234, **1993**
- <sup>26</sup> THOMPSON, W. D.; HARVEY, J. A., et al.: Fibrinolysis and angiogenesis in wound healing. *J Pathol.*, 165 (4): 311-318, **1991**
- <sup>27</sup> LILIENTHAL-TOAL, H. VON: Wachstumsfaktoren und Knochenremodellierung. In: *Aktuelle Aspekte der Osteologie; Ittel, T. H., Sieberth, H. G., Matthiaß, H. H. (Hrsg.); Berlin, Heidelberg: Springer 1992*.
- <sup>28</sup> KOCH, A. E.; POLVERINI, P. J.: Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*, 258 (5089): 1798-1801, **1992**
- <sup>29</sup> SCHULTZ, G. S.; GRANT, M. B.: Neovascular growth factors. *Eye*, 5 (Pt 2): 170-180, **1991**
- <sup>30</sup> ZHENG, M. H.; WOOD, D. J., et al.: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances expression of IL-6 and TGF  $\beta$ 1 genes in normal human osteoblast-like cells. *J Cell Physiol* 159 (1): 76-82, **1994**

- 31 MOHAN, S.; BAYLINK, D. J.: Bone growth factors. *Clin Orthop.*, 263: 30-48, **1991**
- 32 RODAN, G. A.: Introduction of Bone Biology. *Bone*, 13 Suppl 1: 3-6, **1992**
- 33 HOCK, J. M.; CANALIS, E.: Platelet-Derived-Growth-Factor enhances bone cell replication, but not differentiates function of osteoblast. *Endocrinology*, 134 (3): 1423-1428, **1994**
- 34 TAKESHITA, A.; HANAZAWA, S.; AMANO, S.; MATUMOTO, T.; KITANO, S.: IL-1 induces expression of monocyte chemoattractant JE in clonal mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1. *Journal of Immunology*, 150 (4): 1554-1562, **1993**
- 35 FULLER, K.; GALLAGHER, A. C. et al.: Osteoclast resorption stimulating activity is associated with the osteoblast cell surface and/or the extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun*, 181 (1): 67-73, **1991**
- 36 PECK, W. A.; RIFAS, L. et al.: Macrophages release a peptide stimulator of osteoblasts growth. *Ann Biol Clin Paris*, 43 (5): 751-754, **1985**
- 37 SEITZ, R.; KEHNEN, G.; KÜSTERS, G., EGBRING, R.: Pathogenetic causes of acquired factor XIII deficiency. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg*: S. E1, **1991**
- 38 SILBERZAHN, J.: Factor XIII and wound-healing impairments in ENT. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg*: S. F7, **1991**
- 39 LANG, D.: Einsatz von Faktor XIII bei verzögerter Knochenneubildung. *Die Gelben Hefte* 18: 91-92, **1978**
- 40 SALZMANN, G.: Einsatz von Faktor XIII bei verzögerter Knochenneubildung. *Die Gelben Hefte* 16: 129-130, **1976**
- 41 GERNGROSS, H.; CLAES, L.: Successful treatment of pseudarthrosis with human placenta factor XIII concentrate. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg*: S. F8, **1991**
- 42 GERNGROSS, H.; STEINMANN, R.; GRAF, K.: Faktor XIII und Knochenheilung. *Med Welt* 38: 1533-1538, **1987**
- 43 SCHLENZKA, R.; v. GARREL, T.; PISTOR, C.: Does Fibrogammin significantly accelerate bone healing? *J Bone Joint Surg*, 75 [B] Supp 2: 100, **1993**
- 44 STÜCKER, R.; BRINKMANN, C.; HÄRLE, A.: Orthopädische Klinik, Universität Freiburg: Ergebnisse der Behandlung der hämatogenen Osteomyelitis mit Septopalketten. *Orthopädische Mitteilungen* 3 164, **1992**
- 45 WEI, G.; KOTOURA, Y.; OKA, M. et al.: Kyoto University, Japan: Bioabsorbable Delivery System for Antibiotic Treatment of Osteomyelitis. *Journal of Bone and Joint Surgery [Br]* 73-B: 246-52, **1991**
- 46 SOLHEIM, E.; PINHOLT, E. M. et al.: Inhibition of Heterotopic Osteogenesis in Rats by a New Bioerodible System for Local Delivery of Indomethacin. *American Journal of Bone and Joint Surgery* 74-A: 705-711, **1992**
- 47 PRITCHETT, J. W.; Dept. of Orthopaedics, University of Washington and Pacific Medical Center, Seattle: Human Growth Hormone in polymethyl methacrylate. *Acta Orthop. Scand.* 63 (5): 520-522, **1992**
- 48 KIRKEBY, O. J.; EKELAND, A.: No effects of local Somatomedin C on bone repair - Continuous infusion in rats. *Acta Orthop. Scand* 63 (4): 447-450, **1992**
- 49 KELLER, J.; SCHUMACHER, B.; LIND M.: Effect of local Prostaglandin E<sub>2</sub> on periosteum and muscle in rabbits. *Acta Orthop. Scand.* 63 (6): 623-627, **1992**
- 50 GROSSE-SIESTRUP, CH.; BÜCHERL, E. S.: Katheter- und Kabel-Dauerhautdurchleitungen. *Z. Versuchstierkunde* 19: 320, **1977**
- 51 STRESEMANN, E., AST, D.; TUSL, M: Erfahrungen mit der Implantation von arteriellen Verweilkathetern bei der Ratte. *Z. für Versuchstierkunde* 13: 51-58, **1971**
- 52 PFRIMMER, W. et al.: Methodische und technische Probleme der langfristigen Infusionstherapie mit dem Cava-Katheter. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaften* 2: 254-271, **1972**
- 53 BURRI, C.; GASSNER, D.: Der Vena-cava-Katheter. *Anaesthesiology und Wiederbelebung* 54, Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag **1971**
- 54 LEONHARDT, F.J.: Ein neues System zum Katheterismus der V. cava bei Ratten für Langzeitinfusionen (Implantofix®). *Z. für Versuchstierkunde* 32, VEB Gustaf Fischer Verlag, Jena: 171-178, **1989**
- 55 BODZIONY, J.; SCHWILLE, P. O.: Subcutaneous cannula in the jugular and femoral vein - a tool for frequent blood sampling and infusions in the rat. *Z. Versuchstierkunde* 27: 29-32, **1985**
- 56 RASCHE, H.: Blutgerinnungsfaktor XIII und Fibrinstabilisierung. *Klin Wschr* 53: 1137-1145, **1975**
- 57 DASCHNER, F.: Antibiotikatherapie am Krankenbett, 5. Auflage, Springer-Verlag **1990**, Ss. 35, 50.

- 58 PISTOR, C.: Die Distractionsosteosynthese langer Röhrenknochen als standardisiertes Verfahren zur histomorphometrischen Beurteilung der Wirkung des Blutgerinnungsfaktors XIII auf die Knochenheilung; *Inaugural-Dissertation an der Philipps-Universität Marburg, Klinik für Unfallchirurgie*, 1992.
- 59 BRÄUER, T.: Pharmakologische Osteoinduktion durch systemische Gabe von Blutgerinnungsfaktor XIII - Eine Dosisfindungsstudie. *Inaugural-Dissertation an der Philipps-Universität Marburg, Klinik für Unfallchirurgie*, 1995.
- 60 PREVOT, J.; PONCELET, T.; LASCOMBES, P. et al.: L'ostéogénèse en distraction chez l'animal soumis à une chimiothérapie anti-cancéreuse. Etude expérimentale chez le lapin. *Revue de chirurgie orthopédique et réparatrice de l'appareil moteur Paris. 74 Supplément 2*: 98-100, 1988
- 61 KORKALA, O.; KARAHARJU E. et al.: Experimental Lengthening of Tibial Diaphysis: Gap Healing With or Without Gradual Distraction. *Arch. Orthop. Trauma. Surg. 107*: 172-175, 1988
- 62 RICHTER, M.; SOSNA, A.; I. Orthopädische Klinik, Praha: Die Vaskularisierung des Knochenregenerates nach Verlängerungsoperation im distalen Tibiadrittel. *Orthop. Mitteilungen 3*: 50, 1992
- 63 KOJIMOTO, H.; YASUI, N. et al.: Bone lengthening in rabbits by callus distraction. The role of periosteum and endosteum. *J. Bone Joint Surg. [Br] 70-B*: 543-9, 1988
- 64 WHITE, S. H.; KENWRIGHT, J.; Nuffield Orthopaedic Centre, Oxford: The Timing of Distraction of an Osteotomy. *J. Bone Joint Surg. [Br] 72-B*: 356-61, 1990
- 65 DE BASTIANI, G.; ALDEGHERI, R. et al.: Limb lengthening by callus distraction (callotaxis). *J. Pediatr. Orthop. 7*: 129-34, 1987
- 66 FICKENSCHER, K.; AAB, A.; STÜBER, W.: A Photometric Assay for Blood Coagulation Factor XIII. *Thromb. Haemostas. 65*: 535-540, 1991
- 67 SOLLEDER, E.; DEMUTH, D. et al.: Klinische Prüfung eines neuen Photometrischen Tests zur Bestimmung der Faktor-XIII-Aktivität im Plasma. *Lab. Med. 16*: 48-53, 1992
- 68 SKRZYŃIA, C.; REISNER, H.M.; MCDONAGH, J.: Characterization of the catalytic subunit of factor XIII by radioimmunoassay. *Blood 60*: 1089, 1982
- 69 PUCKET, W. O.: The methacrylate plastics as mounting media for biological materials. *Anat. Rev. 80*: 453, 1941
- 70 ROOFE, P. G.; HOECKER, F. E.; VORHEES, C. D.: A rapid bone sectioning technic. *Proc. Soc. exp. Biol. 72*: 619, 1949
- 71 KROPP, B. M.: Grinding thin sections of plastic-embedded bone. *Stain Technol. 29*: 77, 1954
- 72 BOELLAARD, J. W.; VON HIRSCH, TH.: Die Herstellung histologischer Schnitte von nicht entkalkten Knochen mittels Einbettung in Methacrylatsäureester. *Mikroskopie 13*: 386, 1959
- 73 SCHENK, R.: Zur histologischen Verarbeitung von unentkalkten Knochen. *Acta anat. 60*: 3, 1965
- 74 BURKHARDT, R.: Präparative Voraussetzungen zur klinischen Histologie des menschlichen Knochenmarks. *Blut 13*: 337, 1966
- 75 KATTHAGEN, B. D.; BECHTEL, U.: Technik der unentkalkten Knochenhistologie und -histomorphometrie. *mta-journal 7 4*: 164-172, 1985
- 76 ROMEIS: Mikroskopische Technik. 17. neubearbeitete Auflage, Hrsg. P. Böck. Urban & Schwarzenberg; München, Wien, Baltimore 1989.
- 77 PLENK, H.: Knochengewebe und Zähne; Romeis: Mikroskopische Technik, 17. neubearbeitete Auflage; Hrsg. P. Böck, Urban & Schwarzenberg; München, Wien, Baltimore 1989
- 78 KATTHAGEN, B. D.: Knochenregeneration mit Knochenersatzmaterialien - eine tieresperimentelle Studie. *H. Unfallheilk. 178*: 64, 1986
- 79 REVELL, P. A.: Histomorphometry of bone. *J. Clin. Pathol. 36*: 1323-1331, 1983
- 80 SCHIEBLER, T. H.: Histologie: Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen; unter Berücksichtigung der Histophysiologie; nach d. amerikan. Ausg. von L. C. Junqueira u. J. Carneiro/übers., überarb. u. erg. von T.H. Schiebeler, U. Peiper u. Fr. Schneider. - 2., korrigierte Aufl.-Berlin; Heidelberg; New York; Paris; Tokyo: Springer 1986.
- 81 PARFITT, A. M. et al.: Bone Histomorphometry: Standardization of Nomenclature, Symbols, and Units - Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *Journal of Bone and Mineral Research 6* (1987) 2: 595-610.
- 82 GUNDERSEN, G.; ØSTERBY, R.: Estimation of True Lamina Thickness From Apparent Width. *Metab. Bone Dis. et Rel. Res. 2*: 281-289, 1980
- 83 WEIBEL, E. R.: Stereological Methods, Practical Methods for Biological Morphometry. Academic Press 1, 1979

- 84 KIMMEL, D. B.; JEE, W. S. S.: Measurements of area, perimeter, and distance: Details of data collection in bone histomorphometry. *Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation*, Robert R. Recker, MD. (Hrsg.) CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida U. S. A. **1983**.
- 85 VAN DIEST, P. J.; BAAK, J. P. A.: Morphometry. *Comprehensive Cytopathology*; Marluce Bibbo, MD. (Hrsg.), Saunders **1971**.
- 86 BEYER, W. F.; BÖHRINGER, M. E.; BAIL, H.; KURTZ, T.: Inter- und intraindividuelle Meßgenauigkeit beim Einsatz eines Bildanalyseystems in der Knochenhistomorphometrie. *Aktuelle Aspekte der Osteologie*; Ittel, T. H., Sieberth, H. G., Matthiaß, H. H. (Hrsg.); Berlin, Heidelberg: Springer **1992**.
- 87 ROMPPANEN, T.: Postembryonic development of the chicken bursa of Fabricius: A light microscopic histoquantitative study. *Poult Sci* 61: 2261-2270, **1982**
- 88 DELESSE, M. A.: Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. *Annales des Mines* 13: 379-88, **1848**
- 89 ROSIWAL, A.: Über geometrische Gesteinsanalysen. *Verh. k. k. Geol. Reichsanstalt, Wien*: 143, **1898**
- 90 AHERNE, W. A.; DUNNILL, M. S.: Morphometry, Edward Arnold, London, **1982**
- 91 KIMMEL, D. B.: A Light Microscopic Description of Osteoprogenitor Cells of Remodeling Bone in the Adult. *Bone Histomorphometry - Third International Workshop, Sun Valley May 28/June 2 1980*; W.S.S. Jee, A. M. Parfitt (Hrsg.); Société Nouvelle de Publication Médicales et Dentaires, 75009 Paris, France, **1980**.
- 92 RÜSCHOFF, J.: Methoden der lichtmikroskopischen Morphometrie. *Romeis: Mikroskopische Technik*, 17. neubearbeitete Auflage; Hrsg. P. Böck, Urban & Schwarzenberg; München, Wien, Baltimore **1989**, 327-38.
- 93 OLAH, A. J.: Influence of microscopic resolution on the estimation of structural parameters in cancellous bone. *Meunier, P. J. (Hrsg.), Bone Histomorphometry, 2nd International Workshop. Société de la Nouvelle Imprimerie Fournié: Toulouse, France, 1976*: 55-61.
- 94 BORTZ, J.: Statistik für Sozialwissenschaftler/Jürgen Bortz.-3., neubearb. Aufl.- Berlin; Heidelberg; New York; Tokyo: Springer **1989**, Ss. 178ff,850
- 95 SCHENK, R.: Biology of fracture repair. In: 'Skeletal Trauma', Browner, Jupiter, Levine, Trafton (Hrsg.), W. B. Saunders Company, Philadelphia: Kapitel 2, 31-75, **1992**
- 96 NAKAMURA, E., MIZUTA, H. et al.: Knee articular cartilage injury in leg lengthening. Histological studies in rabbits. *Acta Orthop Scand*, 64 (4): 437-440, **1993**
- 97 BENTLEY, G.; GREER, R. B.: The fate of chondrocytes in endochondral ossification in the rabbit. *J Bone Joint Surg* 52 [B]: 571-577, **1970**
- 98 BOSKEY, A. L.: Current concepts of the physiology and biochemistry of calcification. *Clin Orthop* 157: 225-257, **1981**
- 99 LOWE, J.; STEIN, H.; SELA, J.: Primary calcification in remodeling haversian systems following tibial fracture in rats. *Clin Orthop* 176: 291, **1983**
- 100 BONUCCI, E.: Fine structure of early cartilage calcification. *J Ultrastruct Res* 20: 33, **1976**
- 101 BASSETT, C. A. L.; HERRMANN, I.: Influence of oxygen concentrations and mechanical factors on differentiation of connective tissues in vitro. *Nature* 190: 460, **1961**
- 102 PAUWELS, F.: Eine neue Theorie über den Einfluß mechanischer Reize auf die Differenzierung der Stützgewebe. *Z Anat Entwickl-Gesch* 121: 478-515, **1960**
- 103 KROMPECHER, S.: Die Knochenbildung. *Gustav Fischer Verlag, Jena, 1937*
- 104 FROST, H. M.: Bone Remodeling Dynamics. *Springfield, IL, Charles C. Thomas, 1963*
- 105 SCHENK, R.: Histomorphologische und physiologische Grundlagen des Skelettwachstums. In: B. G. Weber, Brunner, Freuler: *Die Frakturbehandlung bei Kindern und Jugendlichen*, Springer: 3-20, **1978**
- 106 URIST, M. R.: Bone: formation by autoinduction. *Science* 150 (698): 893-899, **1965**
- 107 KATTHAGEN, B. D.: Knochenregeneration mit Knochensatzmaterialien - eine tierexperimentelle Studie. *H. Unfallheilk.* 178: 13, **1986**
- 108 EGER, W.: Kalziumnachweis und Mineralisation des Knochengewebes. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*, 47. Tagung, Fischer, Stuttgart: 54, **1963**
- 109 NERLICH, A.; KIRSCH, T.; WIEST, I.; VON DER MARK, K.: Verteilungsmuster von Kollagen X bei der fetalen und juvenilen Knorpel-Knochen-Entwicklung. In: T. H. Ittel, H. G. Sieberth, H. H. Matthiaß (Hrsg.): *Aktuelle Aspekte der Osteologie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg **1992**
- 110 HALL, B. K.: Earliest evidence of cartilage and bone development in embryonic life. *Clin Orthop* 225: 255, **1987**

- 111 MUNDLOS, S.; WINTERPACHT, A.; ZABEL, B.: Expression von Matrixgenen während der Skelettentwicklung. *Osteologie, Suppl. 1, Bd. 1*: 56, **1992**
- 112 TERMINE, J.; KLEINMAN, H.; WHITSON, W. et al.: Osteonectin, a bone specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26: 99, **1981**
- 113 KATTHAGEN, B. D.: Knochenregeneration mit Knochensatzmaterialien - eine tieresperimentelle Studie. *H. Unfallheilk. 178*: 11-13, **1986**
- 114 HANCOX, N. H.: Biology of bone. *Cambridge University Press, Cambridge*, **1972**
- 115 OWEN, M.: Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. In: *Peck, W. A. (Hrsg.): Bone and Mineral Research. Elsevier* 3: 1-25, **1985**
- 116 OWEN, M.: Histogenesis of bone cells. *Calcif Tissue Res* 25 (3): 205-207, **1978**
- 117 DAL MONTE, A.; DONZELLI, O.: Tibial lengthening according to Ilizarov in congenital hypoplasia of the leg. *J Pediatr Orthop* 7: 135-138, **1987**
- 118 DE BASTIANI, G.; ALDEGHERI, R.; RENZI BRIVIO, L.; TRIVELLA, G.: Limb lengthening by distraction of the epiphyseal plate: a comparison of two techniques in the rabbit. *J Bone Joint Surg [Br]* 68B: 545-549, **1987**
- 119 KAWAMURA, B.; HOSONO, S.; TAKAHASHI, T. et al.: Limb lengthening by means of subcutaneous osteotomy: experimental and clinical studies. *J Bone Joint Surg [Am]* 50A: 851-871, **1968**
- 120 FRIEDENSTEIN, A. J.: Determined and inducible osteogenic precursor cells. In: *Hard tissue growth repair and remineralization. Ciba Foundation Symposium Elsevier. Excerpta-Medica, Amsterdam*: 169-185, **1973**
- 121 OWEN, M.: Cell population kinetics of an osteogenic tissue. *J Cell Biol* 19: 19, **1963**
- 122 REDDI, A. H.; HUGGINS, C.: Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 1601-1605, **1972**
- 123 THIELEMANN, F. W.; ALEXA, M.; SCHMIDT, G.: Matrix-induced intramembranous osteogenesis. In: *Silbermann, M.; Slavkin, D. C.F. Current Advances in Skeletogenesis: Development, Biomineralization, Mediators and Metabolic Bone Disease. jExcerpta Medica, Amsterdam*: 66-73, **1982**
- 124 SCHWEIBERER, L.; HALLFELD, K.; MANDELKOW, J.: Pathophysiologie der Knochentransplantation: Grundlagen und klinische Anwendung. *Hefte zur Unfallheilkunde 179: Defektüberbrückung an Knochen und Weichteilen, Springer, Berlin, Heidelberg*: 160-170, **1987**
- 125 BENTZ, H.; NATHAN, R. M. et al.: Purification and characterization of a unique osteoinductive factor from bovine bone. *J Biol Chem*, 264 (34): 20805-20810, **1989**
- 126 BAYLINK, D. J.; FARLAY, J.; HOWARD, G.; DRIVDAHL, R.; PUZAS, E. et al.: Coupling Factor. In: *Massry, S. G.; Letteri, L. M.; Ritz, E.: Regulation of phosphate and mineral metabolism. Plenum, New York*: 409-420, **1982**
- 127 CANALIS, E., PECK, W, RAISZ, L. G.: Stimulation of DNA and collagen synthesis by autologous growth factor in cultured fetal rat calvaria. *Science* 210: 1021-1023, **1980**
- 128 BENFER, J.; STRUCK, H.: Experimental Studies on fracture healing. III. Accelerated fracture healing through soluble heterologous collagen. *Arch Surg* 106: 838-842, **1973**
- 129 SHARMA, S.; GARG, N. K.; VELIATH, A. J.; SUBRAMANIAN, S.; SRIVASTAVA, K. K.: Percutaneous bone-marrow grafting in Osteotomies and bony defects in rabbits. *Acta Orthop Scand* 63 (2): 166-169, **1992**
- 130 YASKO, A. W.; LANE, J. M.; FELLINGER, E. J.; ROSEN, V.; WOZNEY, J. M.; WANG, E. A.: The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg [Am]* 74-A (5): 659-670, **1992**
- 131 ENGSÆTER, L. B.; SUDMANN, B.; SUDMANN, E.: Fracture healing in rats by locally administered indomethacin. *Acta Orthop Scand* 63 (3): 330-333, **1992**
- 132 ROBBINS, K.C.: A study of the conversion of fibrinogen to fibrin. *Amer J Physiol* 142: 581-588, **1944**
- 133 LAKI, K.; LORAND, L.: On the solubility of fibrin clots. *Science* 108: 280, **1948**
- 134 HOLBROOK, J.J.; COOKE, R.D.; KINGSTON, I.B.: The amino acid sequence around the reactive cysteine residue in human plasma factor XIII. *Biochem J* 135: 901, **1973**
- 135 McDONAGH, J.: Structure and Function of Factor XIII. In: *Menostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Hrsg.: R. W. Colman, J. Hirsch, V. J. Marden, E. W. Salzman. Philadelphia, J. B. Lippincott Company: Chapter 18, Ss. 289-300*, **1987**
- 136 SCHWARTZ, M.L.; PIZZO, S.V.; HILL, R.L.; MCKEE, P.A.: Human factor XIII from plasma and platelets: Molecular weights, subunit structure, proteolytic activation and cross-linking of fibrinogen and fibrin. *J Biol Chem* 248: 1395, **1973**

- 137 LOPACIUK, S.; LOVETTE, K.M.; MCDONAGH, J et al.: Subcellular distribution of fibrinogen  
and factor XIII in human plasma and platelets. *Thromb Res* 8: 453, **1976**
- 138 MCDONAGH, J; MCDONAGH, R.P; DELAGE, J.M.; WAGNER, R.H.: Factor XIII in human plasma  
and platelets. *J Clin Invest* 48: 940, **1969**
- 139 JOIST J.H.; NIEWIAROWSKI, S.: Retention of platelet fibrin-stabilizing-factor during the platelet  
release reaction and clot retraction. *Thromb Diath Haemorrh* 29: 679, **1973**
- 140 KASAHARA, K.; TAKAGI, J.; SEKIYA, F.; INADA, Y.; SAITO, Y.: "A" subunit of factor XIII is present  
on bovine platelet membrane and mediates collagen-induced platelet aggregation. *Thromb Res* 50  
(2): 253-263, **1988**
- 141 ADÁNY, R.; FODOR, F.; MOLNÁR, P. et al.: Increased density of histiocytes containing factor XIIIa  
in uterine leiomyomas. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International  
Conference on Factor XIII, Marburg: S. A10, 1991*
- 142 POON, M.C.; RUSSELL, J.A.; LOW, S. et al.: Hemopoietic origin of factor XIII A subunits in platelets,  
monocytes, and plasma. Evidence from bone marrow transplantation studies. *J Clin Invest* 84 (3):  
787-792, **1989**
- 143 WEISBERG, L.J.; SHIU, D.T.; GREENBERG, C.S.; KAN, Y.W.; SHUMAN, M.A.: Localization of the  
gene for coagulation factor XIII a-chain to chromosome 6 and identification of sites of synthesis. *J  
Clin Invest* 79 (2): 649-652, **1987**
- 144 WEISBERG, L.J.; SHIU, D.T.; CONKLING, P.R.; SHUMAN, M.A.: Identification of normal human  
peripheral blood monocytes and liver as sites of synthesis of coagulation factor XIII a-chain. *Blood*  
70 (2): 579-582, **1987**
- 145 WOLPL, A.; LATTKE, H.; BOARD, P.G.; ARNOLD, R. et al.: Coagulation factor XIII A and B subunits  
in bone marrow and liver transplantation. *Transplantation* 43 (1): 151-153, **1987**
- 146 NÁGY, J.A.; HENRIKSSON, P.; MCDONAGH, J.: Biosynthesis of factor XIII B subunit by human  
hepatoma cell lines. *Blood* 68 (6): 1272-1279, **1986**
- 147 JANUS, T.J.; LEWIS, S.D.; LORAND, L.; SHAFER, J.A.: Promotion of thrombin- catalyzed activation  
of factor XIII by fibrinogen. *Biochemistry* 22: 6269, **1983**
- 148 MATSUDA, T.; SAITO, M.; ASAKURA, H.; YOSHIDA, T. et al.: A familial factor XIII subunit B  
deficiency. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on  
Factor XIII, Marburg: S. D5, 1991*
- 149 GREENBERG, C.S.; ACHYUTHAN, FENTON, J.W.: Factor XIIIa formation promoted by complexing of  
 $\alpha$ -thrombin, fibrin and plasma factor XIII. *Blood* 69: 867-871, **1987**
- 150 CURTIS, C.G.; BROWN, K.L.; CREDO, R.B. et al.: Calcium-dependent unmasking of active-center-  
cysteine during activation of fibrin-stabilizing-factor. *Biochemistry* 13: 3774, **1974**
- 151 LORAND, L.; GRAY, A.J.; BROWN, K.; CREDO, R.B. et al.: Dissociation of the subunit structure of  
fibrin stabilizing factor during activation of the zymogen. *Biochem Biophys Res Commun* 56: 914-  
922, **1974**
- 152 KETSU, H.; FOSTER, D.C.; DAVIE, E.W.; ICHINOSE, A.: Biosynthesis and secretion of the a and b  
subunits for human coagulation factor XIII in mammalian cell systems. *McDonagh, J.; Seitz, R.;  
Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg: S. B4, 1991*
- 153 MUSZBEK, L.; POLGÁR, J. KARGES, H.; ADÁNY, R.: Activation of cellular factor XIII. *McDonagh, J.;  
Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg: S. A11,  
1991*
- 154 YING LIU, Y.; MCDONAGH, J.: Recombinant human tumor necrosis factor- $\alpha$  regulates coagulation F  
XIIIa expression at the post-transcription level. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.):  
Second International Conference on Factor XIII, Marburg: S. B5, 1991*
- 155 SCHRODE, J.; FOLK, J.E.: Stereochemical aspects of amine substrate attachment to acyl  
intermediates of transglutaminase: Human blood plasma (activated coagulation factor XIII) and  
the guinea pig liver-enzyme. *J Biol Chem* 254: 653, **1979**
- 156 FEAR, J.D.; MILOSZEWSKI, K.J.; LOSOWSDY, M.S.: The half life of factor XIII in the management  
of inherited deficiency. *Thromb Haemost* 49: 102, **1983**
- 157 MILOSZEWSKI, K.; LOSOWSKI, M.S.: The half-life of factor XIII in vivo. *Brit J Haemat* 19: 686,  
**1970**
- 158 KARGES, H.E.: Inactivation of F XIII by  $\alpha$ -Thrombin and during coagulation. *Egbring, R.;  
Klingemann, H.G. (Hrsg.): Factor XIII and Fibronectin. Med. Verlagsgesellschaft Marburg: 133-  
140, 1983*



- 159 KLINGEMANN, H.G.; EGBRING, R.; HOLST, F.; GRAMSE, M.; HAVEMANN, K.: Degradation of human plasma fibrin stabilizing factor XIII subunits by human granulocytic proteinases. *Thromb Res* 28: 793, **1982**
- 160 FOLK, J.E.; CHUNG, S.I: Blood coagulation factor XIII: Relationship of some biological properties to subunit structure. Reich, E., Rifkin, D.B., Shaw, E.: *Proteases and Biological Control*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory: S. 157, **1975**
- 161 TRIANTAPHYLLOPOULOS, D.C.: The inactivation of factor XIII during blood coagulation. *Thromb Res* 3: 241, **1973**
- 162 KANAIDE, H.; SHAINOFF, J.R.: Cross-linking of fibrinogen and fibrin by fibrin-stabilizing-factor (factor XIIIa). *J Lab Clin Med* 85: 574, **1975**
- 163 ABENDROTH, K.: Der Osteoblast: Funktion und hormonelle Regulation. In: *Aktuelle Aspekte der Osteologie*; Ittel, T. H., Sieberth, H. G., Matthiaß, H. H. (Hrsg.); Berlin, Heidelberg: Springer **1992**.
- 164 SADATA, Y.; AIKI, N.: Significance of cross-linking of  $\alpha_2$ -Plasmin-Inhibitor to fibrin in inhibition of fibrinolysis and in hemostasis. *J Clin Invest* 69: 536, **1982**
- 165 AOKI, N., TAMAKI, T.; SAKATA, Y.; ICHINOSE, A.: Crosslinking of  $\alpha_2$ -plasmin-inhibitor to fibrin. Its comparison with fibronectin cross-linking and its physiological significance. *Egbring, Klingemann (Hrsg.): Factor XIII and Fibronectin. Med. Verlagsgesellschaft Marburg: 205-211, 1983*
- 166 GAFFNEY, P.J.; WHITAKER, A.N.: Fibrin cross-links and lysis rates. *Thromb Res* 14: 85, **1979**
- 167 JANSEN, J.W.C.M.; MINKEMA, J.; HAVERKATE, F.; KLUFT, C. et al.: Coupling of  $\alpha_2$ -antiplasmin to fibrin by F XIIIa and effect of F XIII-inhibitors, species differences. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg: S. A12, 1991*
- 168 SHEN, L.L.; GERMANS, J.; MCDONAGH, J. et al.: Effect of calcium ion and covalent cross-linking on formation and elasticity of fibrin gels. *Thromb Res* 6: 255, **1975**
- 169 MUI, P.T.K.; GANGULY, P.: Cross-linking of actin and fibrin by fibrin-stabilizing factor. *Am J Physiol* 233: H346, **1977**
- 170 COHEN, I.; YOUNG-BANDALA, L.; BLANKENBERG, T.A. et al.: Fibrinolytic-catalyzed cross-linking of myosin from platelet and skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 192: 100, **1979**
- 171 COHEN, I.; GLASER, T.; VEIS, A.; BRUNER-LORAND, J.:  $Ca^{2+}$  dependent cross-linking processes in human platelets. *Biochim Biophys Acta* 628: 365, **1981**
- 172 HÖRMANN, H.; JELINIC, V.; RICHTER, H.: N-terminal fibronectin fragments mediate binding of soluble fibrin to cell-attached factor XIIIa (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried/München, supported by Sonderforschungsbereich 207, Project G7). *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg: S. F5, 1991*
- 173 ZEHER, M.; SZEGEDI, G.; CSIKI, Z.; CSEH, A.; ADANY, R.: Fibrinolysis-resistant deposits in minor labial salivary glands of patients with Sjogren's syndrom. *Clin Immunol Immunopathol* 71 (2): 149-155, **1994**
- 174 BECK, E.; DUCKERT, F.; VOGEL, A.; ERNST, M.: Der Einfluß des fibrinstabilisierenden Faktors (FSF) auf Funktion und Morphologie von Fibroblasten in vitro. *Zeitschr. Zellf.* 57: 327-346, **1962**
- 175 KNOCH, H., SCHMITT, G.: Autoradiographische Untersuchungen über den Einfluß des Faktor XIII auf die Wundheilung im Tierexperiment. *Arzneim Forsch* 26: 547-551, **1976**
- 176 IWANAGA, S.; SUZAKI, K.; HASHIMOTO, S.: Bovine Plasma cold-insoluble globulin: Cross structure and function. *Ann NY Acad Sci* 312: 74, **1978**
- 177 GRINNEL, F.; FELD, M., MINTER, D.L.: Fibroblast adhesion to fibrinogen and fibrin substrata: Requirement for cold-insoluble globulin (plasma fibronectin). *Cell* 19:517, **1980**
- 178 KNOX, P.; CROOKS, S.; RIMMER, C.S.: Role of fibronectin in the migration of fibroblasts into plasma clots. *J Cell Biol* 102: 2318-2323, **1986**
- 179 GRINNEL, F.: Fibronectin and wound healing. *J Cell Biochem* 26 (2): 107-116, **1984**
- 180 HÖRMANN, H.; JELINIC, V.; RICHTER, H.: Involvement of factor XIIIa in the formation of a pericellular fibronectin matrix (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried/München, supported by Sonderforschungsbereich 207, Project G7). *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg: S. F2, 1991*
- 181 MOSHER, D.F.; SCHAD, P.E., KLEINMAN, H.K.: Cross-linking of fibronectin to collagen by blood coagulation factor XIIIa. *J Clin Invest* 64: 781, **1979**
- 182 MOSHER, D.F.: Cross-linking of fibronectin to collagenous proteins. *Mol Cell Biochem* 58: 63, **1984**

- 183 BARRY, E.L.; MOSHER, D.F.: Factor XIIIa-mediated cross-linking of fibronectin in fibroblast cell  
layers. Cross linking of cellular and plasma fibronectin and of amino-terminal fibronectin  
fragments. *J Biol Chem* 264 (7): 4179-4185, **1989**
- 184 BRUHN, H.D.: Faktor XIII, Thrombin und Fibronectin als Regulatoren der Fibroblastenproliferation  
bei der Wundheilung. *Hämostaseologie* 1: 41-48, **1983**
- 185 UHEYAMA, M.; URAYAMA, T.: The role of factor XIII in fibroblast proliferation. *Japan J Exp Med* 48:  
135-142, **1978**
- 186 YANCEY, S.T.; LAKI, K.: Transglutaminase and tumor growth. *Ann NY Acad Sci* 202: 344, **1972**
- 187 BARLATI, S.; MIGNATTI, P.; GREGA, A. et al.: Utilization of Rous sarcoma virus for the detection of  
transformation enhancing and inhibiting factors in human plasma. *Barlati, S.; die Guli-Morghen, C.*  
(Hrsg.): *Avian RNA Tumor Virus, Padna, Italien, Piccin Medical Books*: S. 331, **1978**
- 188 BRUHN, H. D.; ZURBORN, K.H.: Influence of clotting factors (thrombin, factor XIII) and of  
fibronectin on the growth of tumor cells and leukemic cells in vitro. *Blut* 46: 85, **1983**
- 189 HASEGAWA, T.; HIROSE, T.; SEKI, K.; SANO, T.; HIZAWA, K.: Transforming growth factor alpha and  
CD68 immunoreactivity in giant cell tumours of bone: a study on the nature of stromal and giant  
cells, and their interrelations. *J Pathol* 170 (3): 305-310, **1993**
- 190 KARGES, H.E.; CLEMENS, R.: Faktor XIII: Enzymatische und klinische Aspekte. *Behring Inst. Mitt.*  
82: 43-58, **1988**
- 191 PAYÉ, M.; LAPIÈRE, M.: Wundheilung: Der Beitrag des Gerinnungsfaktors XIII. *Die Gelben Hefte*  
26: 128-135, **1986**
- 192 NUSGENS, B et al.: Collagen biosynthesis by cells in a tissue equivalent matrix in vitro. *Coll Rel Res*  
4: 351, **1984**
- 193 PAYÉ, M.; NUSGENS, B.V.; LAPIÈRE, C.M.: Factor XIII of blood coagulation modulates collagen  
biosynthesis by fibroblasts in vitro. *Haemostasis* 19 (5): 274-283, **1989**
- 194 PAYÉ, M.; NUSGENS, B.V.; LAPIÈRE, C.M.: Modulation of cellular biosynthetic activity in the  
retracting collagen lattice. *Eur J Cell Biol* 45 (1): 44-50, **1987**
- 195 KANG, Y.; HASHIMOTO, N.; KIKUCHI, H., et al.: Effects of blood coagulation factor XIII on the  
development of experimental cerebral aneurysms in rats. *J Neurosurg* 73 (2): 242-247, **1990**
- 196 HERTER, T.; ANAGUOSTOPOULOS-SCHEEP, J.; WINDMANN, D.: The influence of factor XIII on the  
fibrosing of a nerve anastomosis in the rat. *Res Exp Med Berl.* 189 (1): 25-32, **1989**
- 197 TOIDA, M.; WATANABE, F.; TSAI, C.S.; et al.: Factor XIIIa-containing cells and fibrosis in oral and  
maxillofacial lesions: an immunohistochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 63 (8): 293-  
299, **1989**
- 198 PENNEYS, N.S.; SMITH, K.J.; NEMETH, A.J.: Factor XIIIa in the hamartomas of tuberous sclerosis. *J*  
*Dermatol Sci* 2 (1): 50-54, **1991**
- 199 PAYÉ, M.; NUSGENS, B.; LAPIÈRE, C.M.: Factor XIII of blood coagulation decreases the  
susceptibility of collagen precursors to proteolysis. *Biochem Biophys Acta* 1073 (3): 437-441, **1991**
- 200 KIKUSHI, T.; TAGAKI, J.; KASAHARA, K.; INADA, Y.; SAITO, Y.: Interaction between plasma factor  
XIII and collagen. *Thromb Res* 43 (2): 213-218, **1986**
- 201 THIES, H.A.; RICHTER, U.: Erworbener Faktor-XIII-Mangel und klinische Chirurgie. *MedWelt* 32:  
250-255, **1981**
- 202 KUGLMEIER, K.: Experimentelle, proliferationskinetische Untersuchungen über die Wirkung des  
Plasmafaktor XIII auf das Knochenwachstum in vivo und in vitro. *Inaugural-Dissertation,*  
*Universität Ulm*, **1985**
- 203 PRINCE, C.W.; DICKIE, D.; KRUMDIECK, C.L.: Osteopontin, a substrate for transglutaminase and  
factor XIII activity. *Biochem Biophys Res Commun* 177 (3): 1205-1210, **1991**
- 204 BENFER, J.; STRUCK, H.: Faktor XIII and fracture healing. *Europ Surg Res* 9: 217-223, **1977**
- 205 CLAES, L.; BURRI, C.; GERNGROSS, H.; MUTSCHLER, W.: Die Beschleunigung der Frakturheilung  
durch F XIII. *Helv Acta* 51: 209-212, **1984**
- 206 GERNGROSS, H.; CLAES, L.; BURRI, C.: Tierexperimentelle Untersuchungen zur autologen  
Fibrinspongiosaplastik unter Calcitonin- und Faktor-XIII-Behandlung. *Chirurgisches Forum '81,*  
*Springer Verlag, Berlin*: 109-112, **1981**
- 207 CLAES, L.; KUGLMEIER, K.; GERNGROSS, H.: Experimentelle Untersuchungen zur mitogenen  
Wirkung von F XIII auf Osteoblasten. *Hefte zur Unfallheilkunde, Heft 189*: 153-156, **1987**
- 208 KIENAPFEL, H.; WILKE, A.; DORNER, P.; JÜRGENSEN, R.; PRINZ, H.; HETTEL, A.; SWAIN, R.; GRISS, P.:  
Implantatverankerungsfestigkeit sowie Knocheneinwachsverhalten nach systemischer Gabe von  
rekombinantem Faktor XIII und Faktor-XIII-Konzentrat. Eine tierexperimentelle Untersuchung mit

- 
- Bestimmung von Implantatverankerungsfestigkeit sowie Knocheneinwachsverhalten bei porösen Oberflächenimplantaten. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 133 (5): 394-400, **1995**
- <sup>209</sup> HELLERER, O.; BRÜCKNER, W.L.; FREY, K.W.; WESTERBURG, K.W., KLESSINGER, U.: Fracture healing under factor XIII mediation. *Arch Orthop Traumat Surg* 97: 157-159, **1980**
- <sup>210</sup> BURCHARDT, P.; TILSNER, V.; HUPE, W.: Faktor-XIII-Mangel als Ursache postoperativer Blutungen. *Aktuell Urologie* 9: 29-33, **1978**
- <sup>211</sup> REDING, R.; RIEMER, H.: Wundheilung und Wundheilungsstörungen - Morphologie, Biochemie, Pathophysiologie und klinische Aspekte. *Z ärztl Fortbildung* 76: 822-824, **1982**
- <sup>212</sup> GREENBERG, C.S.; SHUMAN, M.A.: The zymogen forms of blood coagulation factor XIII bind specifically to fibrinogen. *J Biol Chem* 257: 6096-6101, **1982**
- <sup>213</sup> CARMASSI, F.; UCHINO, R.; CARDINALI, M. et al.: Influence of Factor XIII-Mediated Crosslinking on Extravascular Fibrinolysis. *McDonagh, J.; Seitz, R.; Egbring, R. (Hrsg.): Second International Conference on Factor XIII, Marburg: S. A2, 1991*
- <sup>214</sup> HAUCH, S.; SIMON, M.; FRANKE, J.: Zur Histologie der Knochenneubildung bei der Beinverlängerung nach der Ilizarov-Methode. In: *Aktuelle Aspekte der Osteologie. Hrsg.: T. H. Ittel, H. G. Siebert, H. H. Matthias, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg: 318-323, 1992*