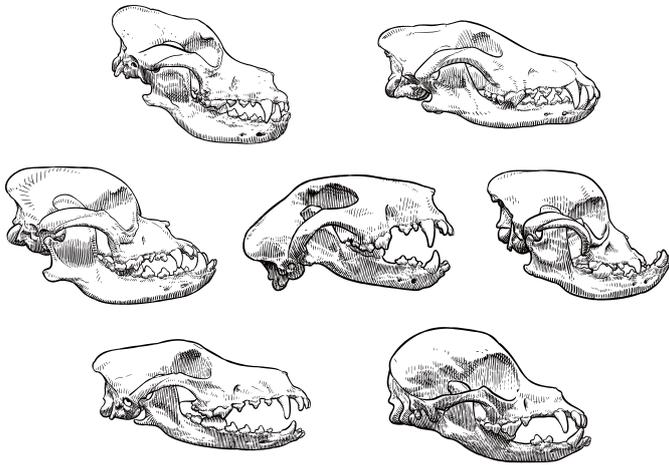


LARA JOHN

Histomorphologische Untersuchungen an Schädelwachstumsfugen des Hundes



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2022

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publisher.

1st Edition 2022

© 2022 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus der Klinik für Kleintiere, Chirurgie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Martin Schmidt

und

dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Carsten Staszyc

Histomorphologische Untersuchungen an Schädelwachstumsfugen des Hundes

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Lara John

Tierärztin aus Bad Honnef

Gießen 2022

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Martin Schmidt

Prof. Dr. Carsten Staszuk

Prof. Dr. Monika Kressin

Tag der Disputation: 04.10.2022

Meiner Familie

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus- Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Lara John

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Anatomische und embryologische Grundlagen	3
2.1.1 Anatomie des Hundeschädels	3
2.1.2 Ossifikation	5
2.1.3 Embryologie des Schädels	6
2.2 Suturen des Schädels	10
2.2.1 Definition von Suturen und Synchondrosen	10
2.2.2 Funktion der Suturen	10
2.2.3 Histologie der Suturen	11
2.2.4 Morphologische Subtypen von Suturen	12
2.2.5 Suturen als Wachstumszentren des Schädels	15
2.2.6 Regulation der Suturen auf molekularer Ebene	16
2.2.7 Zeitpunkt der Ossifikation von Suturen	21
2.2.8 Kraniosynostosen beim Menschen	24
2.2.9 Proliferation in Suturen	28
2.2.10 Apoptose in Suturen	32
2.2.11 Osteoklasten in Suturen	37
2.2.12 Blutgefäße in Suturen	39
2.2.13 Kollagenfasern und ihre Orientierung in der Suture	41
2.2.14 Einfluss der Dura mater auf die Suture	43
2.3 Brachycephalie	46
2.3.1 Kranimetrie – Einteilung der Schädeltypen	48
2.3.2 Ursachen der Brachycephalie	51
2.3.3 Genetik der Brachycephalie	53
2.3.4 Gesundheitliche Probleme im Zusammenhang mit Brachycephalie	56
2.4 Ziel der Studie	58

3	Material und Methoden	59
3.1	Histologische Schnittpräparate	59
3.1.1	Zur Verfügung stehendes Probenmaterial	59
3.1.2	Anfertigung von histologischen Paraffin-Schnitten	62
3.1.3	Histologische Färbungen	63
3.1.4	Enzymhistochemische Färbung	64
3.1.5	Immunhistochemische Färbung	65
3.2	Datenerhebung	71
3.2.1	Morphometrische Analyse	71
3.2.2	Deskription der Kollagenfasern	73
3.2.3	Detektion von osteoklastischen Zellen	74
3.2.4	Detektion von Blutgefäßen	75
3.2.5	Detektion von Apoptose	75
3.3	Bildbearbeitung und Auswertung	76
4	Ergebnisse	77
4.1	Altersverteilung	77
4.2	Morphometrische Analyse	77
4.2.1	Kategorisierung der Suturen	77
4.2.2	Vermessung der Suturen	81
4.3	Deskription der Kollagenfasern	84
4.4	Detektion von osteoklastischen Zellen	85
4.5	Detektion von Blutgefäßen	89
4.6	Detektion von Apoptose	90
	Diskussion	95
4.7	Indikation zur Untersuchung der Schädelwachstumsfugen beim Hund	95
4.8	Erläuterung zur Studiengruppe und zum Studiendesign	97
4.9	Erläuterung zur Wahl der Färbemethoden	99
4.10	Morphometrische Analyse	102
4.11	Beurteilung der Kollagenfasern in Suturen	105
4.12	Beurteilung der osteoklastischen Zellen in Suturen	107
4.13	Beurteilung der Blutgefäße in Suturen	111
4.14	Beurteilung von Apoptose in Suturen	113
4.15	Schlussfolgerung und Ausblick	117
5	Zusammenfassung	119
6	Summary	121

Literaturverzeichnis VII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Knochen des Schädels und des Unterkiefers beim Hund (modifiziert nach König, 2012).	4
Abbildung 2: Embryonaler Ursprung der Schädelknochen (Mishina et al. 2014).....	7
Abbildung 3: Ossifikation der einzelnen Knochen des Hundeschädels (Evans 1993).	9
Abbildung 4: Schema einer kranialen Suture (Beederman, 2014).	11
Abbildung 5: Schema einer verzahnten Suture (Koskinen 1976).	14
Abbildung 6: Anwesenheit von Wachstums- und Transkriptionsfaktoren und ihren Rezeptoren in unterschiedlichen Phasen der Suturmorphogenese (modifiziert nach Opperman, 2000).	18
Abbildung 7: Abnormale Schädelformen aufgrund von Kraniosynostose je nach betroffener Suture (Müller 1997).	26
Abbildung 8: Bedeutung von Wachstumsfaktoren für zelluläre Ereignisse wie Apoptose und Proliferation bei der Entwicklung der Sutura coronalis (modifiziert nach Opperman 2000).	35
Abbildung 9: Einfluss der Dura mater auf verschiedene Stadien der Morphogenese von Suturen (A-C) und ihrer Fusion (D) (modifiziert nach Opperman 2000).	45
Abbildung 10: Schädel eines mesozephalen und brachyzephalen Hundes (Nöller et al. 2008).	47
Abbildung 11: Kraniometrische Messpunkte am Hundeschädel (modifiziert nach Evans, 1993).	50
Abbildung 12: Schema der ABC-Methode zur Immundetektion.....	67
Abbildung 13: Verlauf der Suturen.	72
Abbildung 14: Höhe und Breite der Suturen.	73
Abbildung 15: Regionen der Sutteränder für die räumliche Anordnung innerhalb der Suture	75
Abbildung 16: Säulendiagramm zur Darstellung der Altersverteilung der Studienteilnehmer.....	77
Abbildung 17: Säulendiagramm zur Darstellung der Häufigkeit einer überlappenden Suture und einer End-zu-End Suture bei den einzelnen Suturen.....	78
Abbildung 18: Säulendiagramm zur Darstellung der Häufigkeit einer verzahnten Suture und einer gerade gestreckten Suture bei den einzelnen Suturen.....	79
Abbildung 19: Histologische Schnittpräparate, Masson Goldner Trichrom Färbung, 1,25x.....	80
Abbildung 20: Histologisches Schnittpräparat, Masson Goldner Trichrom Färbung, 1,25x.....	81

Abbildung 21: Säulengramm zur Darstellung der durchschnittlichen Länge der einzelnen Suturen.	82
Abbildung 22: Säulengramm zur Darstellung der durchschnittlichen Breite der einzelnen Suturen.	82
Abbildung 23: Säulendiagramm zur Darstellung des Verhältnisses von Länge zu Breite der Suture bei den einzelnen Suturen.	83
Abbildung 24: Säulendiagramm zur Darstellung des Verhältnisses zwischen der Länge der Suture und der Dicke der knöchernen Calvaria bei den einzelnen Suturen.	84
Abbildung 25: Histologische Schnittpräparate, Pikro-Siriusrot-Färbung, 40x.	85
Abbildung 26: Histologisches Schnittpräparat, Färbung nach TRAP-Methode, 10x.	86
Abbildung 27: Histologische Schnittpräparate, Färbung nach TRAP-Methode, 10x.	88
Abbildung 28: Histologische Schnittpräparate, von-Willebrand-Faktor-Färbung, 10x.	89
Abbildung 29: Histologische Schnittpräparate, von-Willebrand-Faktor-Färbung, 10x.	90
Abbildung 31: Säulendiagramm zur Darstellung des durchschnittlichen prozentualen Anteils an apoptotischen Zellen innerhalb der Suturen bei den einzelnen untersuchten Hunden.	91
Abbildung 31: Histologische Schnittpräparate, TUNEL-Färbung, 20x.	92
Abbildung 32: Säulendiagramm zur Darstellung der prozentualen Häufigkeit einer vermehrten Anhäufung von TUNEL-positiven Zellen an den Enden der Suture bei den einzelnen Suturen.	93
Abbildung 33: Histologische Schnittpräparate, TUNEL-Färbung, 20x.	94

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswahl von Suturen und Synchondrosen des Schädels und ihre zugehörigen Knochen.....	5
Tabelle 2: Kranio-metrische Messpunkte am Schädel (modifiziert nach Evans, 1993).....	49
Tabelle 3: Daten der Hunde, deren Suturen untersucht wurden.....	60
Tabelle 4: Untersuchte Suturen und ihre zugehörigen Knochen.	61
Tabelle 5: Probenhunde nach vorhandenen zu untersuchenden Suturen.	62
Tabelle 6: Anzahl der Osteoklasten pro μm^2 Suturefläche (OK/ μm^2).	86

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
BMP	bone morphogenetic protein
BSP	Bone-Sialoprotein
BSP-1	Osteopontin
CBFA1	Core-binding factor subunit alpha-1 = RUNX2
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EFNB-1	Ephrin B1
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
ID	Inhibitors of differentiation
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MRT	Magnetresonanztomographie
MSX	Msh homeobox
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PTC	segment polarity gene patched
RAB-23	Ras-related protein
RANKL	Receptor activator of necrosis factor- κ B ligand
RUNX2	Runt-related transcription factor 2 = CBFA1
SCor	Sutura coronalis
SHH	Sonic hedgehog
SInt	Sutura interfrontalis

SLam	Sutura lambdoidea
SMOC2	secreted modular calcium-binding protein 2
SSag	Sutura sagittalis
SSqu	Sutura squamosa
TCOF1	Treacle Ribosome Biogenesis Factor 1
TdT	terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TGF- β	Tumor-Growth-Factor β
TRAP	tartratesistente saure Phosphatase
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase- mediated dUTP nick end labeling-Methode
TWIST	Twist-related protein 1
vWF	von-Willebrand-Faktor

1 Einleitung

Nach der Beendigung der fetalen Schädelentwicklung bleiben an den Berührungsstellen der Belegknochen, die durch desmale Ossifikation entstehen, die Suturen übrig (Schnorr & Kressin, 2011). Die Suturen fungieren als Wachstumszentren des Schädels und ermöglichen auch nach der Geburt ein fortwährendes Wachstum der Schädelknochen und eine gleichzeitige Expansion des Gehirns (Moss & Young, 1960; Cohen, 1993). Dafür müssen sie bis zu einem bestimmten Zeitpunkt in einem unverknöcherten, offenen Zustand bleiben (Morriss-Kay & Wilkie, 2005; Jin *et al.*, 2016). Schon aus der Humanmedizin ist bekannt, dass zeitliche Abweichungen im Schluss der Schädeluturen zu Deformationen der normalen Schädelform führen. Vor allem ein verfrühter Fugenschluss in Form von Kraniosynostosen ist beim Menschen recht weit erforscht. Einige Mutationen bestimmter Gene konnten für syndromale Kraniosynostosen verantwortlich gemacht werden (Müller *et al.*, 1997; Senarath-Yapa *et al.*, 2012).

Auch bei Hunden und Katzen scheinen frühzeitige Verknöcherungen verschiedener Schädelwachstumszonen zu abnormalen Schädelformen zu führen, die unter dem Begriff der Brachycephalie zusammengefasst und bisher nicht als krankhafter Prozess angesehen wurden.

In einer Studie von Schmidt *et al.* (2013) wurde der Schluss der Synchronosen der Schädelbasis zwischen mesocephalen Hunden, brachycephalen Hunden und Cavalier King Charles Spaniern verglichen. Dort konnte mithilfe der Magnetresonanztomographie gezeigt werden, dass bei brachycephalen Hunden ein frühzeitiger Schluss dieser Suturen, insbesondere der Synchronosis sphenoccipitalis, stattfindet (Schmidt *et al.*, 2013). Daraufhin wurden die Suturen und Synchronosen meso- und brachycephaler Rassen genauer untersucht und verglichen. Eine histologische Untersuchung der Suturen durch Lichtmikroskopie ermöglicht eine bessere Aussage über den Fugenschluss als konventionelle Bildgebungsverfahren wie MRT und CT. Es konnte für drei Wachstumsfugen ein verfrühter Verschluss bei brachycephalen Rassen nachgewiesen werden (Farke, 2017).

Um zu verstehen, warum sich die Suturen früher schließen, muss man sich mit den Mechanismen des normalen Fugenschlusses auseinandersetzen. Proliferation, Apoptose und auch osteoklastische Zellen haben Einfluss auf die Aufrechterhaltung und den Schluss der Suture. Das Knochenwachstum in Suturen beruht auf Proliferation von Osteoprogenitorzellen und der Differenzierung von Osteoblasten (Sun *et al.*, 2007). Ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung ist wichtig für die Erhaltung des Wachstums an den osteogenen Fronten der Suture und für die Verhinderung der Fusion (Winograd *et al.*, 1997; Opperman, 2000). Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren haben ebenfalls einen nachgewiesenen Einfluss auf den Sutureschluss oder wirken bei der Entstehung von Kraniosynostosen mit. Es konnte gezeigt werden, dass sie eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zell-Proliferation und auch Apoptose in Suturen spielen (Liu *et al.*, 1999; Mansukhani *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2000; Opperman *et al.*, 2000a). Außerdem ist ein Gleichgewicht zwischen Knochenbildung durch Osteoblasten und Knochenresorption durch Osteoklasten vonnöten, sodass anzunehmen ist, dass die Aktivität von Osteoklasten für die Aufrechterhaltung der Suture unerlässlich ist (Lee *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2018; Byron, 2006).

Bislang liegen kaum morphologisch-histologische Studien von Suturen am Hundeschädel vor. Ebenso wurde auch die Zellaktivität in Suturen noch nicht am Hundemodell beschrieben. Wie oben erwähnt spielt auch die zelluläre Aktivität in Form von Apoptose und die Anwesenheit von Osteoklasten innerhalb der Suture eine große Rolle bei der physiologischen und auch der pathologischen Fusion von Suturen. Die Hypothese, dass sich die Suturen des Schädels bei brachycephalen Hunden früher schließen und dadurch eine Deformation des Schädels verursacht wird, die den brachycephalen Schädeltyp entstehen lässt, wurde durch die Studien von Schmidt *et al.* (2013) und Farke *et al.* (2017) untermauert. Aus diesem Grund ist eine weitergehende Untersuchung der Suturen am Hundeschädel sinnvoll um ihre Morphologie und Entwicklung zu beschreiben. In dieser Studie sollen Suturen am Hundeschädel histomorphologisch beschrieben werden und die Zellaktivität unter Zuhilfenahme der Enzym- und Immunhistochemie näher untersucht werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Anatomische und embryologische Grundlagen

2.1.1 Anatomie des Hundeschädels

Hirnschädel (Neurokranium, Cranium) und Gesichtsschädel (Viscerokranium, Facies) bilden zusammen den Gesamtschädel. Der Unterkiefer (Mandibula) und der Zungenbeinapparat (Apparatus hyoideus) sind dem Schädel beweglich angelagert. Das Neurokranium umgibt und schützt das Gehirn und das Viszerokranium formt das Gesicht.

Der Schädel wird aus einer Vielzahl von Knochen zusammengesetzt. Dabei unterscheidet man zwischen Knochen des Neurokraniums und des Viszerokraniums. Das Gehirn, seine Hüllen und die zur Versorgung notwendigen Gefäße werden von den Knochen des Neurocraniums in der Schädelhöhle (Cavum cranii) umfasst. Zu diesen Knochen gehören das paarige Stirnbein (Os frontale), das paarige Scheitelbein (Os parietale) und das unpaarige Zwischenscheitelbein (Os interparietale), welche zusammen das Dach der Schädelhöhle bilden. Die Seitenwände bestehen aus dem paarigen Schläfenbein (Os temporale). Das unpaarige Hinterhauptsbein (Os occipitale) mit seinem basalen Teil (Pars basilaris) und die unpaarigen Keilbeine (Os basisphenoidale und Os praesphenoidale) formen die Bodenwand der Schädelhöhle. Die Genickwand besteht ebenfalls aus dem unpaarigen Hinterhauptsbein mit seiner Schuppe (Squama occipitalis) und seinen Seitenanteilen (Partes laterales). Nach kranial wird die Schädelhöhle von dem unpaarigen Siebbein (Os ethmoidale) durch die Lamina cribrosa von der Nasenhöhle abgegrenzt (König, 2012).

Die Knochen des Viscerokraniums formen die Nasenhöhle. Das Nasendach besteht aus dem Stirnbein (Os frontale) und dem Nasenbein (Os nasale). Die Seitenwände werden aus dem jeweils paarigem Tränenbein (Os lacrimale), Jochbein (Os zygomaticum), Oberkieferbein (Maxilla) und Zwischenkieferbein (Os incisivum) gebildet. Die Bodenwand der Nasenhöhle stellt gleichzeitig das Dach der Mundhöhle

dar und ist aus dem Gaumenbein (Os palatinum), Oberkieferbein, Zwischenkieferbein und dem unpaarigen Pflugscharbein (Vomer) zusammengesetzt. Die Schlundkopfhöhle (Cavum pharyngis) setzt sich aus Flügelbein (Os pterygoideum), Gaumenbein, Keilbein (Os sphenoidale) und Teiles des Pflugscharbeins zusammen (König, 2012).

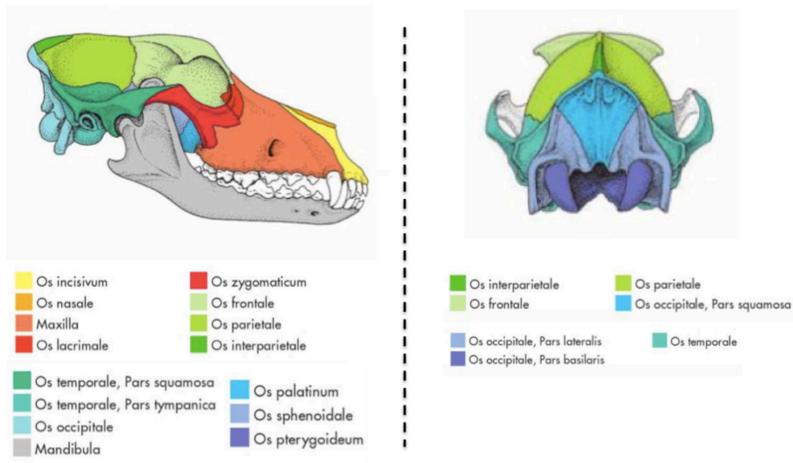


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Knochen des Schädels und des Unterkiefers beim Hund (modifiziert nach König, 2012).

Links = rechte laterale Ansicht, rechts = Nackenwand

Die Einzelknochen des Schädels sind durch bindegewebige Knochennähte (Suturæ) oder Verbindungen durch hyalinen Knorpel (Synchondrosen) miteinander verbunden (Tabelle 1). Suturen und Synchondrosen gehören zu den spaltfreien Knochenverbindungen, den sogenannten Synarthrosen. Die einzelnen Suturen und Synchondrosen sind nach den Knochen benannt, welche sie verbinden (Nickel *et al.*, 2004; König, 2012).

Tabelle 1: Auswahl von Suturen und Synchondrosen des Schädels und ihre zugehörigen Knochen.

Sutur/Synchondrose	Beteiligte Schädelknochen
Sutura interfrontalis	Ossa frontalia
Sutura coronalis sinister/dexter	Os frontale und Os parietale
Sutura sagittalis	Ossa parietalia
Sutura sphenofrontalis sinister/dexter	Os frontale und Os sphenoidale
Sutura squamosa sinister/dexter	Os temporale und Os parietale
Sutura parietointerparietalis	Os interparietale und Os parietale
Sutura lambdoidea sinister/dexter	Os occipitale und Os parietale
Sutura palatina mediana	Ossa palatina
Synchondrosis sphenoccipitalis	Os sphenoidale und Os occipitale
Synchondrosis intersphenoidalis	Os basisphenoidale und Os praesphenoidale
Synchondrosis sphenothmoidalis	Os ethmoidale und Os sphenoidale

2.1.2 Ossifikation

Die Bildung von Knochengewebe wird als Ossifikation bezeichnet. Hierbei unterscheidet man zwei Formen: eine direkte (desmale, bindegewebige) Ossifikation und eine indirekte (chondrale) Ossifikation.

Bei der desmalen Ossifikation werden mesodermale Bindegewebszellen direkt in Zellen des Knochens umgewandelt. Dies geschieht über eine Entwicklung von undifferenzierten Mesenchymzellen zu Präosteoblasten, welche die Vorläuferzellen der knochenbildenden Osteoblasten darstellen. Die Osteoblasten produzieren Osteoid, eine organische unverkalkte Knochenmatrix, und bauen sich schließlich selber in dieses ein. Osteoid enthält neben anderen Bestandteilen wie Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen und diversen Knochenproteinen hauptsächlich Kollagen Typ 1 (95%). In das Osteoid werden anorganische Knochenbestandteile (Kalziumphosphat, Kalziumkarbonat, Magnesiumphosphat und Kalziumfluorid) über das Blutgefäßsystem eingelagert. Durch diese Mineralisierung wird das Osteoid in verkalktes Ossein (Knochengrundsubstanz) umgewandelt. Die vom Ossein umgebenen Osteoblasten wandeln sich in Osteozyten um (König,

2012). Den Knochen, der bei der desmalen Ossifikation entsteht, bezeichnet man als Bindegewebsknochen, Deck- oder Belegknochen. Die meisten Schädelknochen entstehen durch desmale Ossifikation.

Bei der chondralen Ossifikation wird Knochen über hyalinen Knorpel als Vorstufe gebildet. Der hyaline Knorpel dient als Platzhalter und Ausgangsmaterial für das Längenwachstum des Knochens. Im Rahmen der Ossifikation wird er schrittweise abgebaut und durch permanentes Knochengewebe ersetzt, weshalb man auch von Ersatzknochen spricht. Zudem unterteilt man die chondrale Ossifikation in die perichondrale und enchondrale Ossifikation. Am Schädel entsteht die Schädelbasis durch enchondrale Ossifikation. Dabei kommt es zu strukturellen Umbauvorgängen, die mit einem typischen histologischen Erscheinungsbild einhergehen und sich in verschiedene Zonen einteilen lassen. Die Reservezone besteht aus diffus ungeordneten Chondrozyten. An diese schließt sich die breite Zone der Proliferation an, in der sich die Chondrozyten durch verstärkte Teilung vermehren. Es folgt eine säulenförmige Anordnung (Zone des Säulenknorpels) und letztlich eine Degeneration der Knorpelzellen, welche durch Wasseraufnahme blasig werden (Zone des Blasenknorpels). Hier beginnt auch die Interzellulärsubstanz zu verkalken und in der anschließenden Verknöcherungszone kommt es zur Verkalkung der Knorpelmatrix. Chondroklasten bauen den Knorpel in der Eröffnungszone ab. Osteoblasten gelangen durch eindringende Gefäße in die Eröffnungszone und bilden dann wie bei der desmalen Ossifikation Osteoid (Samuelson, 2007; König, 2012)

2.1.3 Embryologie des Schädels

In der Embryologie unterscheidet man drei Keimblätter: Mesoderm, Endoderm und Ektoderm. Bei der Ontogenese des Hundeschädels sind allerdings nur das Ektoderm (äußeres Keimblatt) und das Mesoderm (mittleres Keimblatt) beteiligt (Schnorr & Kressin, 2011). Das Anlagematerial für die Entwicklung des vertebralen Schädels stammt von drei Komponenten ab. Das sind das Mesektoderm, das paraaxiale Mesoderm und die ersten fünf Somiten (Urwirbel) (Rüsse & Sinowatz, 1998). Das Mesektoderm geht aus Anteilen der Neuralleiste hervor, welche sich wiederum aus dem Ektoderm differenziert hat. Das paraaxiale Mesoderm und die ersten fünf Somiten sind mesodermalen Ursprungs (Rüsse & Sinowatz, 1998). Anhand eines Vogelembryos gelang Couly *et al.* (1993) die genaue Zuordnung der

schädelbildenden Knochen zu ihrem embryonalem Ursprung (Couly *et al.*, 1993). Das Os frontale, das Os interparietale, die Dura mater und die Knochen des Viszerokraniums entstehen aus Zellen der Neuralleiste und sind somit ektodermalen Ursprungs. Mesodermalen Ursprungs sind das Os parietale, Os supraoccipitale, Os exoccipitale, Os basioccipitale und Os basisphenoidale (Abbildung 2) (Couly *et al.*, 1993; Senarath-Yapa *et al.*, 2013; Snider & Mishina, 2014; Jiang *et al.*, 2002).

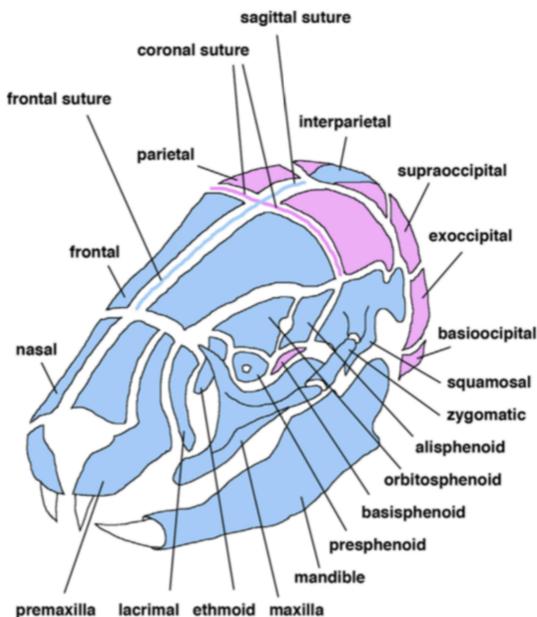


Abbildung 2: Embryonaler Ursprung der Schädelknochen (Mishina *et al.* 2014).

Blau = Ursprung aus der Neuralleiste (ektodermal), rosa = mesodermaler Ursprung. Es sind nicht alle Knochen der Schädelbasis abgebildet.

Bei der embryonalen Entwicklung des Schädels formen sich zuerst Vorläufer für den endgültigen knöchernen Schädel in Form von Chondrokranium und Desmokranium. Das Chondrokranium, auch Primordialkranium genannt, formiert sich ventral des Gehirns und bildet ein knorpeliges Grundgerüst des Schädels, welches Gehirn und Sinnesorgane schützt. Am Neurokranium betrifft die Verknorpelung hauptsächlich die Schädelbasis. Mehrere Knorpelanlagen schließen sich für die Bildung des Chondrokraniums zusammen. Zu Beginn verwachsen die Cartilagine parachordalia zur einheitlichen Basalplatte. Diese vereinigt sich mit dem aus den okzipitalen

Sklerotomen hervorgegangenen Cartilago occipitalis und auf beiden Seiten entstehen die Ala orbitalis und Ala temporalis. Die Cartilagine hypophyseales, Vorläufer des Keilbeinkörpers, entstehen rostral des Kopffortsatzendes und sie verbinden sich vor und hinter der Hypophysengrube. Ebenfalls rostral der Basalplatte bilden sich die Cartilagine trabeculares, welche später zum Siebbein werden. Bei der Fusion dieser Knorpelkerne bleiben Öffnungen für den Durchtritt der Gehirnnerven bestehen (Schnorr & Kressin, 2011; Rüsse & Sinowatz, 1998). Dorsal des Gehirns verbindet sich das Chondrokranium mit dem Desmokranium, der bindegewebig vorgeformte Anteil des fetalen Schädels, welcher ohne ein knorpeliges Grundgerüst direkt aus dem Mesenchym hervorgeht (Evans & DeLahunta, 2012)

Die embryonale Entwicklung zum Osteokranium erfolgt entweder über das Primordialkranium als Ersatzknochen (enchondrale Ossifikation) oder durch desmale Ossifikation als Beleg- oder Deckknochen (Kapitel 2.1.2). Teilweise formen sich auch Mischknochen durch beide Verknöcherungsarten (Schnorr & Kressin, 2011). Keilbein (Os sphenoidale) und Siebbein (Os ethmoidale) des Hirnschädels sowie Zungenbein (Os hyoideum), Amboss, Steigbügel und Muschelbeine (Ossa conchae) des Gesichtsschädels entstehen durch enchondrale Ossifikation. Zwischenscheitelbein (Os interparietale), Scheitelbein (Os parietale) und Stirnbein (Os frontale) des Hirnschädels sowie Nasenbein (Os nasale), Tränenbein (Os lacrimale), Jochbein (Os zygomaticum), Oberkieferbein (Os maxillare), Zwischenkieferbein (Os incisivum), Gaumenbein (Os palatinum), Pflugscharbein (Vomer), Flügelbein (Os pterygoideum) und Unterkiefer (Os mandibulare) des Gesichtsschädels entstehen durch desmale Ossifikation. Hinterhauptsbein (Os occipitale) und Schläfenbein (Os temporale) des Hirschädels sowie der Hammer (Malleus) des Gesichtsschädels werden aus Mischknochen geformt (Abbildung 3) (Schnorr & Kressin, 2011).

Bindegewebig vorgeformte Knochen (Deckknochen) verknöchern früher als solche, die aus Knorpel entstehen (Ersatzknochen) (Evans & DeLahunta, 2012; Schnorr & Kressin, 2011).

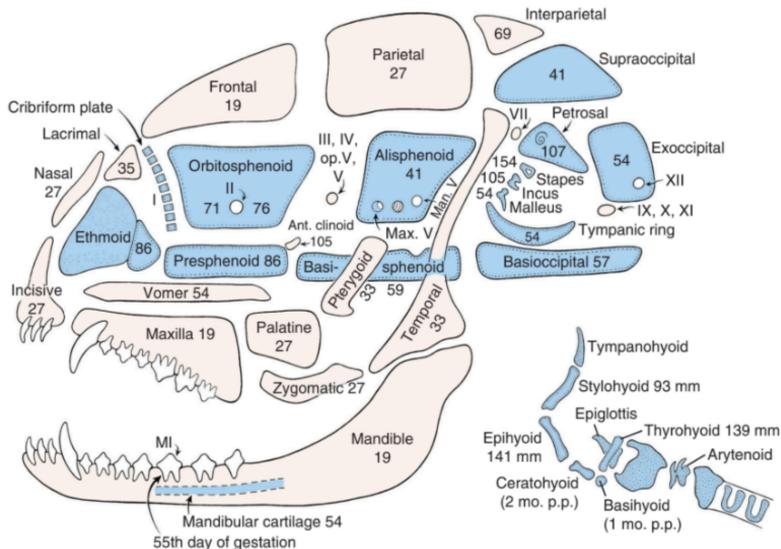


Abbildung 3: Ossifikation der einzelnen Knochen des Hundeschädels (Evans 1993). Laterale Ansicht des primordialen Hundeschädels. Blau = enchondrale Ossifikation, beige = desmale Ossifikation. Die Zahlenwerte geben die fetale Größe in Millimeter an, ab der die Ossifikation der einzelnen Knochen beginnt.

Nach Beendigung der Schädelentwicklung bleibt an den Berührungsstellen der Knochen bei den enchondral gebildeten Ersatzknochen sogenannter Nahtknorpel (Synchondrosen) und bei Belegknochen ein bindegewebiges Nahtband (Suturen) übrig. An den Stellen, an denen mehrere Deckknochen zusammenstoßen, bleiben durch Bindegewebsmembranen bedeckte Lücken frei, welche als Fontanellen bezeichnet werden. Diese schließen sich bei Tieren im Gegensatz zum Menschen meistens vor der Geburt. Allerdings kommen beim Hund auch Dauerfontanellen vor. Vor allem bei brachycephalen Hunden können Stirn- und Hinterhauptsfontanellen lebenslang persistieren (Nickel *et al.*, 2004; Schnorr & Kressin, 2011). Die Zellen in den Suturen stammen von embryonalem Mesenchym ab. Diese mesenchymalen Zellen proliferieren und differenzieren sich zu Osteoblasten, welche Kollagenfasern und Mineral für das Knochenwachstum produzieren. Somit stellen Suturen die Wachstumsfugen der Schädelknochen dar. Die Sutura nasalis und die Sutura frontalis entstehen aus Zellen der Neuralleiste. Die Suturae coronales sind mesodermalen Ursprungs. Sie liegen zwischen dem aus der Neuralleiste

entstehendem Os frontale und dem Os parietale, das ebenfalls mesodermalen Ursprungs ist. Die Sutura sagittalis entwickelt sich aus der Neuralleiste, während die Suturen umgebenden paarigen Ossa parietales aus Zellen des Mesoderms entstehen (Abbildung 2) (Jiang *et al.*, 2002; Snider & Mishina, 2014).

2.2 Suturen des Schädels

2.2.1 Definition von Suturen und Synchondrosen

Wie bereits beschrieben, bleiben nach der Beendigung der embryonalen Schädelentwicklung an den Berührungstellen der Belegknochen, welche durch desmale Ossifikation entstehen, die Suturen übrig. Sie stellen somit bindegewebige Nahtstellen zwischen den Schädelknochen dar und zählen zu den Syndesmosen. Zwischen den enchondral gebildeten Ersatzknochen verbleiben die knorpeligen Synchondrosen (Schnorr & Kressin, 2011).

Suturen und Synchondrosen gehören zu den sogenannten unechten Gelenken. Nach der Verknöcherung von Syndesmosen und Synchondrosen spricht man von Synostosen (König, 2012).

2.2.2 Funktion der Suturen

Die Suturen stellen komplexe anatomische Strukturen dar, die wichtige Funktionen im Bereich des Schädels übernehmen.

Bei einer Geburt lasten während des Durchtritts durch den Geburtskanal enorme Kräfte auf den Schädel. Die Suturen erlauben ein Überlappen der einzelnen Schädelknochen und somit eine Verformung des Schädels. Außerdem sind Suturen die Wachstumszentren des Schädels und ermöglichen ein fortwährendes Wachstum der Knochen und eine gleichzeitige Expansion des Gehirns. Auf der anderen Seite verhindern die Schädelnähte auch eine Separation der Knochen bei Krafteinwirkungen von außen. Trotzdem erlauben sie zugleich geringfügige Beweglichkeit, um kleinste mechanische Belastungen auszugleichen (Moss, 1960; Cohen, 1993).

2.2.3 Histologie der Suturen

Das Wort *Sutura* lässt sich aus dem lateinischen ableiten und bedeutet „Naht“. Suturen lassen sich nur am Schädel in Form von Schädelnähten finden.

Pritchard et al. (1956) beschrieb als einer der Ersten den fundamentalen histologischen Aufbau einer Suture. Demnach besteht eine Suture aus fünf eindeutigen Schichten: Zwei Kambium-Schichten und zwei kapsuläre Schichten des Periosts der beiden jeweils aneinandergrenzenden Knochen und die mittlere Schicht, welche diese voneinander separiert. Dazu kommen noch zwei verbindende Schichten, welche die innere und äußere Begrenzung der Suture bilden. Sie bestehen aus bindegewebigen Schichten des Periosts (Pritchard *et al.*, 1956). Je nach Autor differiert die Anzahl der Schichten einer Suture (Cohen, 1993).

Grundsätzlich besteht eine Suture aus vier Hauptkomponenten: Die osteogenen Fronten der sich annähernden Knochenplatten, das dazwischenliegende Mesenchym, die darüber liegende Knochenhaut und die darunterliegende Dura mater (Abbildung 4) (Lenton *et al.*, 2005; Slater *et al.*, 2008; Beederman *et al.*, 2014).

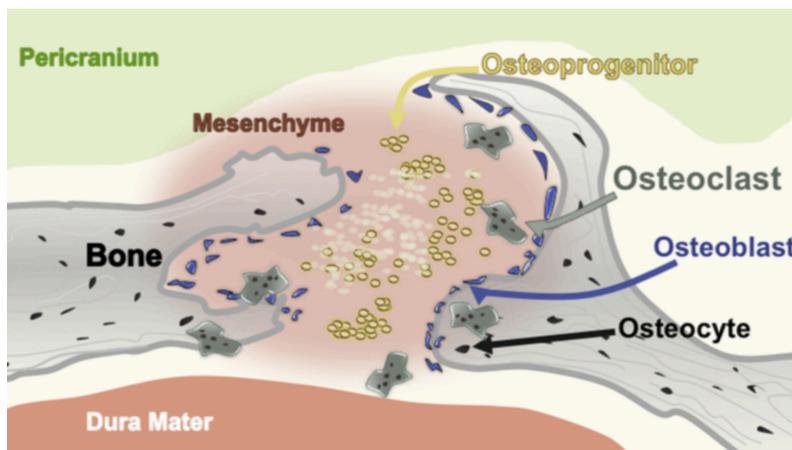


Abbildung 4: Schema einer kranialen Suture (Beederman, 2014).

Eine Suture enthält mesenchymale Stammzellen, Osteoblasten, Osteoklasten, Fibroblasten, Fibrozyten, Blutgefäße und ihre zugehörigen Nerven. Osteoblasten und Osteoklasten befinden sich knochenah an den Rändern der Suture (Cate *et al.*,

1977). Histologisch unterscheidet man innerhalb einer Suture verschiedene Zonen. Dazu gehört eine zelluläre osteoblastische Schicht, die dem Knochen direkt anliegt, außerdem eine fibröse Schicht aus kollagenem Bindegewebe (hauptsächlich Kollagen Typ 3) und eine zentrale Zone, welche Blutgefäße und Nerven, wie beispielsweise Nozizeptoren, beinhaltet (Proff *et al.*, 2006).

Während der fortlaufenden Entwicklung der Suture verändert sich die Anzahl und Form der verschiedenen Zellen, aber auch die Orientierung und Struktur des Kollagens (Kapitel 2.2.13). In offenen Suturen lagern sich die gleichmäßig kubisch geformten Osteoblasten in hoher Zahl an den Rändern der Knochenkanten an. Wenn die Suturen sich schließen, verringert sich die Anzahl der Osteoblasten und auch ihre Form wird flacher. Dies ist ein Zeichen für eine Ruhephase mit wenig knochenformender Aktivität (Regelsberger *et al.*, 2012).

In einer Studie an Ratten im Jahr 2006 wurde die Histologie kranialer Suturen in Bezug auf das Alter näher untersucht (Proff *et al.*, 2006). Die Autoren beschreiben einen dreiphasigen Wachstumsprozess der Suturen. Die erste Phase ist gekennzeichnet durch diffus verteilte Osteoblasten und nur wenig Gefäße mit kleinen Lumina. Gegen Ende der ersten Phase kommt es zu einer steigenden Zellproliferation, einer Anordnung der Osteoblasten entlang einer longitudinalen Achse und einer wachsenden Anzahl an Blutgefäßen. In der zweiten Phase kann man die Suture schon deutlich vom umgebenden Knochen abgrenzen. Im Verlauf lagern sich die Osteoblasten dem Knochen an und bilden dort eine Art Randbegrenzung. Die Dichte der Blutgefäße erreicht zu diesem Zeitpunkt ihren Höhepunkt. Die dritte und letzte Phase zeichnet sich durch eine zunehmende Verknöcherung aus. Die Anzahl der Blutgefäße nimmt ab und haben größere Lumina (Proff *et al.*, 2006).

2.2.4 Morphologische Subtypen von Suturen

Der Verlauf der Suturen durch die Calvaria von ekto- nach endokraniel wird unter anderem durch die beiden osteogenen Fronten, welche die Suture bilden und begrenzen, determiniert. Es existieren zwei wesentliche Typen der Suture-Morphologie: die End-zu-End Suture und die überlappende Suture. Die Unterscheidung beruht auf der Art der Annäherung der osteogenen Fronten zueinander während der Suturebildung, die auf zwei verschiedene Weisen erfolgen kann. Entweder sie

überlappen sich bei zunehmender Annäherung und man spricht von einer *überlappenden Sutura* oder sie grenzen auf derselben Ebene aneinander, was einer *End-zu-End Sutura* entspricht. Zwischen den osteogenen Fronten liegt jeweils das mesenchymale Bindegewebe, welches sich zu einem kollagenfaserigen Bindegewebe differenziert und damit die mechanisch belastbare Komponente der Sutura darstellt (Moss, 1957; Cohen, 1993). In der Fachliteratur werden die Sutura interfrontalis und die Sutura sagittalis als End-zu-End Suturen beschrieben. Die Sutura coronalis, Sutura lambdoidea und Sutura squamosa sind überlappende Suturen (Rice *et al.*, 1997; Furtwängler *et al.*, 1985; Cohen, 1993; Opperman, 2000; Slater *et al.*, 2008).

Beide Suturentypen, End-zu-End und überlappend, sind anfangs gerade gestreckt und können sich während des Schädelwachstums zusätzlich durch eine Verzahnung verändern. Diese Verzahnung kann unterschiedliches Ausmaß annehmen und von leichten Wellen bis hin zu einem stark mäanderförmigen Verlauf variieren (Moss, 1957). Je länger eine Sutura vor ihrer Verknöcherung offen bleibt, umso komplexer wird ihre Verzahnung (Cohen, 1993; Byron, 2006). Histologisch zeigt sich eine typische ungleichmäßige Verteilung der Osteoblasten entlang der osteogenen Fronten. Sie gruppieren sich an den Spitzen der Knochenpicula (konvexer Kurvenbereich der Sutura), an denen die Knochenwachstumsprozesse stattfinden. Durch die Anhäufung der Osteoblasten wird ein schnelles Wachstum der Knochenpicula ermöglicht (Abbildung 5) (Koskinen *et al.*, 1976).

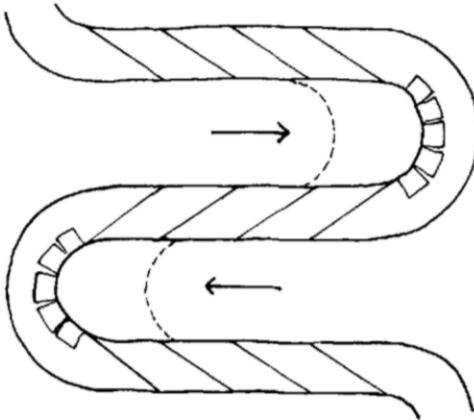


Abbildung 5: Schema einer verzahnten Suture (Koskinen 1976).

Anhäufung von Osteoblasten (rechteckig) im konvexen Bereich der Suture an den Spitzen der Knochenpicula. Die Pfeile deuten die Knochenwachstumsrichtung an. Zusätzlich ist der Kollagenfaserverlauf innerhalb der Suture dargestellt.

Insbesondere während der rapiden Wachstumsphase des Schädels erlauben die Suturen eine relative Beweglichkeit der Schädelknochen zueinander (Moss & Young, 1960). Es ist mittlerweile bekannt, dass die Morphologie von kranialen Suturen nicht durch sie selber bestimmt wird, sondern zu einem großen Anteil durch extrinsische Einflüsse geprägt wird. Die Morphologie der Suture entspricht der Art der Kräfte, die auf die Wachstumsfuge wirkt und erklärt somit auch ihre Vielfalt (Moss, 1957).

Die Suture-Morphologie ist nicht vorher festgelegt. Eine gerade gestreckte End-zu-End Suture ist wahrscheinlich die Grundlage, aus der sich dann Überlappung und Verzahnung als Modifizierung aufgrund von biomechanischer Belastung und funktionellen Anforderungen entwickeln (Moss, 1957). Solche Anforderungen sind vor allem die Beanspruchung der Suturen durch den Kauvorgang, bei dem durch die Kaumuskulatur Kräfte auf die Suturen wirken. Insbesondere bei Spezies mit großer Beißkraft und solchen, die oft harte Nahrung zu sich nehmen, findet man eine erhöhte Komplexität der Suturen. Dazu gehören zum Beispiel die Nagetiere (Monteiro & Lessa, 2000; Kopher & Mao, 2003; Byron *et al.*, 2004; Buezas *et al.*, 2017).

Weiterhin wurde festgestellt, dass die Morphologie einer Suture durch die Gegensätzlichkeit von Kräften beeinflusst wird, nicht aber durch das Ausmaß der

Kräfte. Daher liegt es nahe, dass bei End-zu-End Suturen die Kräfte auf beiden Seiten gleich wirken und bei überlappenden Suturen unterschiedlich stark wirkende Kräfte von beiden Seiten einwirken (Cohen, 1993). Zudem ist die Art der Krafteinwirkung entscheidend. Eine Verzahnung wird mit Kompression assoziiert, wohingegen End-zu-End Suturen und nicht-verzahnnte Suturen mit Zugkräften assoziiert werden. Zugkräfte sind demnach nicht für die Komplexität verantwortlich (Rafferty & Herring, 1999; Sun *et al.*, 2004; Herring & Ochareon, 2005). Histologisch lässt sich vermuten, dass durch die gebogene Schädelform auf der ektokraniellen Oberfläche Zugkräfte lasten und auf die endokranielle Oberfläche Kompressionskräfte wirken (Herring & Teng, 2000).

Eine stärkere Verzahnung bietet eine größere Fläche für die Befestigung von Kollagenfaserzügen. Infolgedessen nimmt man an, dass komplexere Suturen eher in der Lage sind, große Belastungen abzufangen (Buezas *et al.*, 2017). Eine überlappende Sutura erlaubt mehr Spielraum als eine gerade gestreckte Sutura und verzahnnte Suturen können mehr Beweglichkeit zulassen und die Belastung auf die Sutura reduzieren (Cohen, 1993). Dahingegen zeigte eine Studie an Hirschen im Jahr 2006, dass männliche Tiere mit Geweihen, deren Suturen immer starken mechanischen Belastungen bei Kämpfen und durch das zusätzliche Gewicht ausgesetzt sind, keine verstärkte Sutura-Komplexität aufweisen. Allerdings wurde die Beurteilung der Komplexität auch nur durch eine ektokranielle Ansicht vorgenommen (Nicolay & Vaders, 2006).

2.2.5 Suturen als Wachstumszentren des Schädels

Eine anhaltende Funktion der Suturen als Wachstumszentren ist Voraussetzung solange eine Ausdehnung des Schädeldachs um das wachsende Gehirn herum erforderlich ist. Um auch postnatal als Wachstumszentren des Schädels zu fungieren, müssen Suturen offen bleiben. In diesem unverknöcherten, offenen Zustand wird an den Rändern der osteogenen Fronten durch desmale Ossifikation neuer Knochen gebildet (Morriss-Kay & Wilkie, 2005; Jin *et al.*, 2016).

Die Entwicklung einer Sutura und das Knochenwachstum ist ein gut koordinierter Prozess von zellulären Abläufen, an dem die Rekrutierung von mesenchymalen Zellen zu osteogenen Zelllinien, Proliferation, die Differenzierung zu reifen Osteoblasten, Mineralisation der Matrix an den osteogenen Fronten und auch

Apoptose beteiligt sind (Chen *et al.*, 2003; Mao & Nah, 2004). Das unmineralisierte Mesenchym in einer Suture ist dabei unerlässlich für das fortlaufende Wachstum der angrenzenden Knochen. Die mesenchymalen Stammzellen in den Suturen fungieren als eine Art Tank, aus dem immer wieder neue Zellen bezogen werden, damit das Gleichgewicht des Gewebes aufrecht erhalten bleibt. Sie sind in der Lage zu fibrogenen, chondrogenen oder osteogenen Zelllinien zu differenzieren (Mao & Nah, 2004; Guo *et al.*, 2018). Dabei bleiben die Zellen in der Mitte des Mesenchyms undifferenziert. Je näher die Zellen an den osteogenen Knochenfronten liegen, desto mehr kommt es zur Differenzierung über Osteoprogenitorzellen, zu Osteoblasten und letztlich zur Bildung von Knochen durch desmale Ossifikation (Beederman, Farina & Reid, 2014).

Ein Gleichgewicht zwischen Proliferation der mesenchymalen Zellen und Differenzierung zu knochenformenden Osteoblasten ermöglicht die Aufrechterhaltung des Wachstums an den osteogenen Fronten. Dazu ist eine zeitgleiche und ausgewogene Synthese von extrazellulärer Matrix sowohl von fibrogenen als auch von osteogenen Zellen vonnöten, sodass die Suture in einem unverknöcherten Status bleibt. Das Wachstum von fibrogener Matrix verhindert den Schluss der Suture und die osteogenen Zellen und Matrix ermöglichen das Knochenwachstum. Ein streng reguliertes Gleichgewicht zwischen fibrogenen und osteogenen Zellen ist für eine normale Entwicklung der Suture von großer Bedeutung. Für den zeitgerechten Fugenschluss ist es notwendig, dass die Osteoblasten zu einem gegebenen Zeitpunkt überwiegen und den fibrogenen Anteil ersetzen (De Pollack *et al.*, 1996; Opperman, 2000; Mao & Nah, 2004). Zusätzlich spielen auch noch andere Faktoren wie Apoptose und Osteoklasten eine Rolle bei der Aufrechterhaltung und dem physiologischen Schluss einer Suture (Kapitel 2.2.10 und 2.2.11).

Die genaue Regulation des Fugenschlusses ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Es wurden jedoch bereits einige daran beteiligte Signalwege und die dabei mitwirkenden Faktoren identifiziert (Kapitel 2.2.6).

2.2.6 Regulation der Suturen auf molekularer Ebene

Wie bereits beschrieben, wird sowohl der räumliche als auch der zeitliche Ablauf der Ossifikation in den Schädelfugen genau reguliert. Das Knochenwachstum in einer

Sutur muss so reguliert werden, dass ein schnelles Wachstum des Schädels ermöglicht wird, jedoch ohne eine übermäßige Knochenbildung, die letztlich in einem knöchernen Verschluss der Sutur enden würde (Morriss-Kay & Wilkie, 2005).

Um dies zu gewährleisten bedarf es verschiedener Faktoren, die alle einen Einfluss auf diesen präzisen Vorgang nehmen. Eine verfrühte oder verspätete Verknöcherung der Schädelfugen führt zu Malformationen des Schädels mit teils erheblichen klinischen Auswirkungen (Kapitel 2.2.8).

Die Regulation der Suturen findet auf molekularer Ebene durch Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren und ihren Rezeptoren statt. Sie haben einen maßgeblichen Einfluss auf die Entwicklung von Suturen, indem sie verschiedene Zellfunktionen regulieren. Zum Beispiel haben sie Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung oder auch die Apoptose innerhalb einer Sutur (Kapitel 2.2.9 und 2.2.10). Auch die Interaktion dieser Faktoren miteinander ist notwendig für die Aufrechterhaltung einer offenen Sutur (Opperman, 2000).

Während der Entwicklung von Suturen und den verschiedenen Status (in Bildung, offen, sich schließend und geschlossen) unterscheiden sich die Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren in ihrem Auftreten und ihrer Lokalisation innerhalb der Sutur. Dabei sind Faktoren nicht nur innerhalb der Sutur lokalisiert, sondern auch im perisuralem Gewebe zu finden (Abbildung 6).

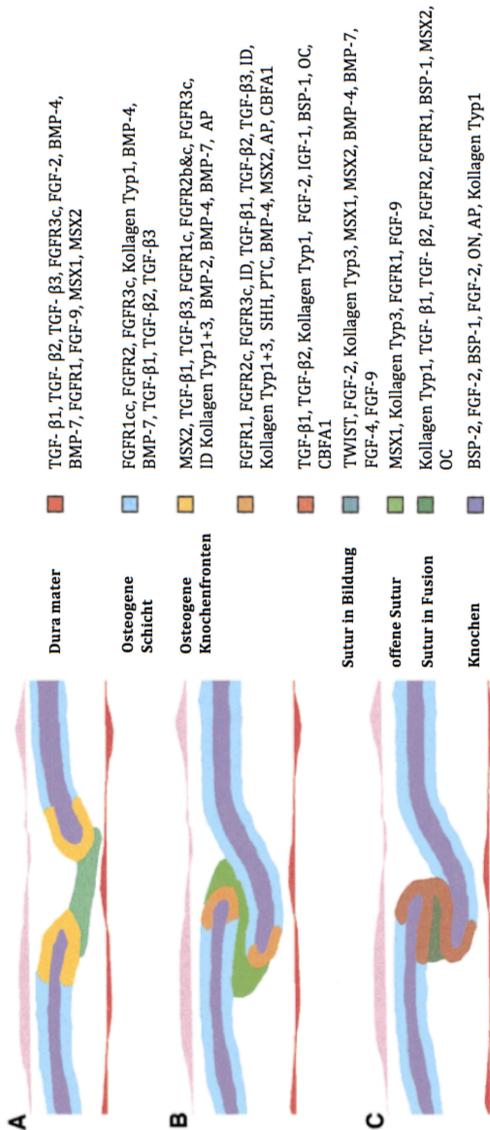


Abbildung 6: Anwesenheit von Wachstums- und Transkriptionsfaktoren und ihren Rezeptoren in unterschiedlichen Phasen der Suturmorphogenese (modifiziert nach Opperman, 2000). A = sich bildende Sutur, B = offene Sutur, C = sich schließende Sutur

Schon vor der eigentlichen Bildung der Suture regulieren bestimmte Faktoren über verschiedene Signalwege wichtige Zellfunktionen. Dazu gehören BMP4, BMP7, FGF9, MSX1, MSX2, FGFR 1, 2 und 3, TGF- β 1, 2 und 3 und TWIST. Sie befinden sich in der angrenzenden Dura mater, den sich annähernden Knochenfronten und der mutmaßlichen späteren Lokalisation der Suture selber. FGFR2 findet sich allerdings nur in den Knochenfronten und TGF- β 1,2 und 3 fehlen im suturalen Mesenchym (Abbildung 6) (Rice *et al.*, 1999; Rice *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999; Iseki *et al.*, 1997; Iseki *et al.*, 1999; Opperman, Nolen & Ogle, 1997; Rice *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2000).

Während sich die Knochenfronten annähern und je nach Suturetyp auch überlappen, sind unter anderem folgende Faktoren an diesem Prozess beteiligt: SHH, PTC und ID (Kim *et al.*, 1998; Rice *et al.*, 2000). Außerdem sind Bestandteile der extrazellulären Matrix unterschiedlich verteilt. Im Knochen lässt sich CBFA1, BSP-1, BSP-2, Kollagen Typ 1, Osteonectin und die alkalische Phosphatase finden (Zhou *et al.*, 2000; Iseki *et al.*, 1997; Iseki, Wilkie & Morriss-Kay, 1999; Rice *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 1999). In den Knochenfronten sind Kollagen Typ 1 und Typ 3, sowie FGFR 1,2 und 3 und TGF- β 1,2 und 3 lokalisiert. In der suturalen Matrix wird hauptsächlich Kollagen Typ 3 exprimiert, außerdem auch FGF-9, MSX1 und FGFR1 (Abbildung 6) (Marks *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1998; Opperman *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 2000; Rice *et al.*, 2000; Iseki, Wilkie & Morriss-Kay, 1999; Liu *et al.*, 1999).

Bei der fusionierenden Suture ist die Verteilung der Faktoren wieder anders. In der suturalen Matrix sind vor allem Faktoren beteiligt, die bei der Knochenbildung mitwirken. Dazu gehören Kollagen Typ 1, TGF- β 1 und 2, FGFR 1 und 2 und BSP-1. CBFA1, FGF-2 und IGF-1 sind in den Knochenfronten lokalisiert. Außerdem werden während der Fusion die Faktoren MSX1, ID, SHH, PTC und FGF-9 runter reguliert und haben somit kaum oder gar keinen Einfluss auf diesen Vorgang (Abbildung 6) (Lemonnier *et al.*, 2001; Opperman *et al.*, 1997; Rice *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000; Most *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 1996).

Um genauer zu verstehen, welche regulatorischen Mechanismen an der Entwicklung einer Suture beteiligt sind, kann man einen Blick auf Modelle werfen, in denen diese Mechanismen nicht funktionieren oder gestört sind. Bei der Entstehung von

Kraniosynostosen des Menschen sind beispielsweise zahlreiche Mutationen von Wachstums- und Transkriptionsfaktoren beteiligt (Kapitel 2.2.8).

Im Folgenden wird näher auf einzelne Faktoren, welche die Zellfunktionen in den Schädelfugen regulieren, eingegangen.

Die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF)-Familie umfasst bislang 23 identifizierte FGFs, von denen 18 sezerniert werden und mit vier Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren (FGFR) interagieren. FGFs sind in nahezu allen Geweben zu finden (Ornitz & Itoh, 2015). Sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus regulieren FGFs die Zellproliferation, -differenzierung und -migration. Sie übernehmen Funktionen bei der Gewebeerhaltung, der Gewebereparatur, der Wundheilung und Regeneration und wirken sogar bei der Angiogenese von Tumoren mit (Eswarakumar *et al.*, 2005; Ornitz & Itoh, 2015). FGFs führen zelluläre Antworten herbei, indem sie an FGFRs binden und diese aktivieren. Eine Vielzahl von skelettalen Fehlbildungen beim Menschen, darunter auch die häufigsten syndromalen Kraniosynostosen, stehen im Zusammenhang mit bestimmten Punktmutationen im FGFR1, FGFR2 und FGFR3. Zu den durch FGFR-Mutationen ausgelösten Kraniosynostosen gehören beispielsweise das Pfeiffer-, Crouzon-, Jackson-Weiss-, Apert- oder Muenke-Syndrom (Eswarakumar *et al.*, 2005; Senarath-Yapa *et al.*, 2012). Mutationen von FGFR sind üblicherweise Gain-of-Function-Mutationen, die eine Verstärkung der Genaktivität bewirken (Opperman, 2000).

Das Msh-Homeobox-2 Gen (MSX2-Gen) codiert für einen Transkriptionsfaktor, der an der kraniofaszialen Morphogenese beteiligt ist (Liu *et al.*, 1999). Mutationen im MSX2-Gen sind ebenfalls meist Gain-of-Function-Mutationen (Opperman, 2000). Eine Mutation in diesem Gen führt zur autosomal dominant vererbten Kraniosynostose Typ Boston (Senarath-Yapa *et al.*, 2012). Durch einige Studien konnte bestätigt werden, dass MSX2 in Schädelsuturen eine zentrale Rolle spielt, da eine veränderte Expression zu einer fehlerhafter Ossifikation des Schädels oder zu einem veränderten Schädelwachstum führt (Liu *et al.*, 1999; Wilkie *et al.*, 2000).

Core-binding transcription factor α subunit type 1 (CBFA1) ist ein Protein, das für die Aktivierung der Osteoblasten-Differenzierung benötigt wird (Ducy *et al.*, 1999; Opperman, 2000). Des Weiteren ist CBFA1 ein nachgeschalteter Faktor im

Signalweg vom FGFR1, dessen Mutation das Pfeiffer Syndrom beim Menschen auslöst und somit auch die CBFA1 Expression beeinflusst, welches wiederum die desmale Ossifikation reguliert (Zhou *et al.*, 2000).

Der Transforming Growth Factor beta (TGF- β) ist ein Zytokin, welches bei der Embryogenese und im adulten Organismus beispielsweise Zellproliferation und -differenzierung oder auch Apoptose reguliert. Obwohl sich die Expression von den Mitgliedern der TGF- β -Familie bei normalem als auch bei abnormalem Suturenschluss unterscheidet, ist bislang keine Mutation bekannt, bei der TGF- β oder seine Rezeptoren involviert sind (Lin *et al.*, 2017; Opperman *et al.*, 1997; Opperman *et al.*, 2000a).

Bone morphogenetic proteins (BMP's) gehören ebenfalls zu der Transforming Growth Factor- β -Superfamilie und sind wichtige Signalmoleküle, die bei einer Reihe von Wachstums- und Entwicklungsprozessen mitwirken. Erstmals entdeckt wurden sie durch ihre Fähigkeit Knochenbildung zu veranlassen. Zudem haben sie einen wichtigen Einfluss auf die Entwicklung einiger Organe wie Herz, Lunge, Nieren, Augen und auch Knochen (Wozney *et al.*, 1988; Wozney, 1992; Zhao, 2003).

Es existieren noch eine Reihe weiterer Signalwege, die alle einen Beitrag zu der Entstehung einer Suture bis hin zur Signalmodulation für den Suturenschluss leisten.

Studien zu Wachstums- und Transkriptionsfaktoren und ihren Rezeptoren in den Schädelfugen beim Hund gibt es bislang nicht. Doch ihre wichtige Rolle bei der Schädelentwicklung insbesondere im Hinblick auf die Suturen führt unweigerlich zu einem weiteren Forschungsbedarf – auch beim Hund.

2.2.7 Zeitpunkt der Ossifikation von Suturen

Die Suturen und Synchondrosen am Schädel haben einen mehr oder weniger festgelegten Zeitpunkt wann sie sich verschließen und kein Wachstum des Schädels mehr zulassen. Dieser Zeitpunkt unterscheidet sich je nach Spezies und auch von Suture zu Suture. Nicht alle Suturen verknöchern gleichzeitig.

Wichtig für die Feststellung des Ossifikationszeitpunktes der Suturen ist die Methodik der Darstellung der Suturen. Hierbei existieren verschiedene Möglichkeiten den Verknöcherungszustand zu beurteilen.

Einerseits ist eine makroskopische Beurteilung an Schädelpräparaten möglich. Die offene Sutura zeigt sich als eine Unterbrechung der Kontinuität des Knochens in Form eines visuell wahrnehmbaren Spaltes zwischen den einzelnen Schädelknochen. Eine fusionierende Sutura zeigt eine beginnende Verknöcherung dieses Spaltes durch Auffüllung mit Knochenmaterial. Es besteht makroskopisch aber immer noch eine Diskontinuität. Bei einer vollständig verknöcherten Sutura ist der Spalt komplett mit Knochen ausgefüllt, sodass die beiden Schädelknochen weitestgehend kontinuierlich ineinander übergehen (Shirley & Jantz, 2011).

Am lebenden Individuum kann man sich verschiedene bildgebende Verfahren zu Nutze machen um die Suturen und Synchondrosen des Schädels darzustellen. Dazu gehören Röntgenaufnahmen, die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT). Röntgenaufnahmen wurden hauptsächlich in älteren Arbeiten genutzt (Julian *et al.*, 1957; Powell & Brodie, 1963). Eine Röntgenaufnahme ermöglicht nur eine zweidimensionale Darstellung, weshalb die Gefahr einer falschen Auswertung aufgrund von Überlagerungen von Strukturen, die auf derselben Ebene liegen, besteht.

Heutzutage ist vor allem die Schnittbilddiagnostik ein beliebtes Bildgebungsverfahren. Sowohl die CT als auch die MRT bieten eine gute Beurteilung des Ossifikationsstatus der Sutura (Okamoto *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1999; Yoshimi Furuya *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2013; Nikolova *et al.*, 2019). Trotzdem konnte gezeigt werden, dass die Qualität der Beurteilung der Suturen und Synchondrosen durch konventionelle Bildgebungsverfahren vom Erfahrungsmaß des Untersuchers abhängt. In einem Vergleich mit MRT-Bildern war die Histologie bezüglich einer Aussage über den Status der Sutura eindeutig im Vorteil. Mit der Histologie kann eine eindeutige Einstufung der Sutura als „offen“ oder „geschlossen“ getroffen werden (Farke, 2017).

Beim Menschen verknöchert die Sutura frontalis im Kindesalter meist bis zum dritten Lebensjahr. Das Verknöcherungsalter für die Sutura sagittalis liegt zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr, für die Sutura coronalis zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr und für die Sutura lambdoidea zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr (Cohen & Kreiborg, 1996; Schünke *et al.*, 2009). Bei den Synchondrosen der Schädelbasis ist vor allem die Synchondrosis sphenoccipitalis von besonderem Interesse, da sie als letzte verknöchert und eine größere Rolle für das kraniale

Wachstum spielt als die anderen Synchondrosen (Cendekiawan *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2016). Die Synchondrosis intersphenoidalis ossifiziert beim Menschen gemäß den Angaben verschiedener Autoren entweder kurz vor der Geburt oder zwischen dem zweiten und dritten Lebensjahr und die Synchondrosis sphenothmoidalis zwischen dem 9. und dem 15. Lebensjahr. Für die Synchondrosis sphenoccipitalis ist eine Geschlechtsabhängigkeit bekannt und auch hier existieren je nach Studie unterschiedliche, teils kontroverse Angaben. Bei Frauen liegt der Ossifikationszeitpunkt ungefähr zwischen 11 und 14 Jahren und bei Männern etwas später im Alter von 13 bis 16 Jahren (Powell & Brodie, 1963; Cendekiawan *et al.*, 2010; Shirley & Jantz, 2011).

Im Gegensatz zum Menschen ist bei den Spezies Maus und Ratte die Sutura frontalis unterteilt in einen anterioren und posterioren Anteil. Hier ist bekannt, dass die Sutura frontalis posterior in den ersten 45 Lebenstagen fusioniert, während alle anderen Schädeluturen ein Leben lang offen bleiben (Warren *et al.*, 2001; Mishina & Snider, 2014). In einer Studie zu brachycephalen Hereford und Aberdeen Angus Rindern mit Dwarfismus (Kleinwuchs) konnte gezeigt werden, dass ein verfrühter Schluss der Synchondrosis sphenoccipitalis zu der Kurzköpfigkeit führt. In der Kontrollgruppe schloss sich die Synchondrose in einem Alter zwischen 24 und 36 Monaten. Bei allen betroffenen Rindern hingegen, die 5,5 Monate oder älter waren, war die Synchondrose bereits vollständig fusioniert (Julian *et al.*, 1957).

Bisher existieren keine Angaben zum genauen Ossifikationszeitpunkt der Schädeluturen und -synchondrosen beim Hund. Dahingegen gibt es fundierte Angaben zum Zeitpunkt des Schlusses von Epi- und Apophysensfugen der Vorder- und Hintergliedmaßen bei Hunden (Hecht, 2012). Die Synchondrosen der Schädelbasis sollen sich bei Hunden in einem Alter von etwa 12 Monaten schließen. Allerdings wurden keine rasseabhängigen Unterschiede berücksichtigt (Stockard, 1941; Ussow 1901).

Anhand einer MRT-Studie von Schmidt *et al.* (2013) konnte der Zeitpunkt der Fusion der Synchondrosis sphenoccipitalis bei mesocephalen Hunden mit ca. 13,5 Monaten, bei brachycephalen Hunden mit ca. 9,5 Monaten und für den Cavalier King Charles Spaniel schon mit etwa 5 Monaten bestimmt werden. Außerdem wurde festgestellt, dass sich sowohl die Synchondrosis sphenothmoidalis als auch die Synchondrosis interphenoidalis bei dem vorhanden Patientengut im Alter von 0 bis

18 Monaten noch nicht verschlossen hat. Diese Abweichung im Vergleich zu vorangegangenen Studien könnte sich aber mit der besseren MRT-Technik erklären lassen, welche offene Fugen sensitiver detektieren kann (Schmidt *et al.*, 2013). Um einen genauen Ossifikationszeitpunkt der Suturen und Synchondrosen beim Hund benennen zu können ist eine Längsschnittstudie mit ausreichendem Patientengut erforderlich. Bisherige Studien konnten noch keine ausreichende statistische Signifikanz liefern.

2.2.8 Kraniosynostosen beim Menschen

Einen vorzeitigen Verschluss in Form einer Verknöcherung von einer oder mehrerer Schädelsuturen bezeichnet man als Kraniosynostose. Die Inzidenz von Kraniosynostosen beim Menschen liegt bei etwa 1:2500 Lebendgeburten, womit sie die zweithäufigste kraniofaziale Anomalie nach den Spaltbildungen der Lippe und/oder des Gaumens sind (Levi *et al.*, 2012; Kutkowska-Kaźmierczak, Gos & Obersztyn, 2018). Beim Menschen gehören die Sutura sagittalis, Sutura coronalis, Sutura lambdoidea und die Sutura frontalis zu den Hauptsuturen des Schädels. Eine Kraniosynostose der Sutura sagittalis ist mit 40 – 55 % am häufigsten. Danach folgen die Suturae coronales (20 – 25 %), die Sutura frontalis (5 – 15 %), multiple Synostosen von Suturen (5 – 15 %) und die Sutura lambdoidea (0 – 5 %) (Senarath-Yapa *et al.*, 2012; Rice, 2008). Risikofaktoren, die eine Kraniosynostose begünstigen, sind ein Geburtsgewicht über 4000 Gramm, männliches Geschlecht, fortgeschrittenes väterliches Alter, aber auch eine Mutter im Alter von über 35 Jahren, Exposition der Mutter mit dem Medikament Valproat, Frühgeburten und Wachstumseinschränkungen im Uterus (Kutkowska-Kaźmierczak *et al.*, 2018).

Da eine Sutura nicht nur eine einfache Verbindung zwischen zwei Knochen darstellt, sondern auch als Ort der Knochenbildung für den Schädel fungiert, hat eine frühzeitige Verknöcherung erhebliche Folgen für das normale Schädelwachstum. Aufgrund dieser nicht zeitgerechten Verknöcherung kann die Sutura nicht mehr ihre Funktion als Wachstumsfuge erfüllen und das Wachstum des Schädels ist an dieser Stelle nicht mehr möglich. Um das weiterhin schnelle und expansive Wachstum des Gehirns zu gewährleisten, kommt es zu einer morphologischen Deformation des Schädels aufgrund eines kompensatorischen Wachstums an den nicht betroffenen Suturen. Diese Kompensation findet planparallel zur fusionierten Sutura statt und

gleichzeitig kommt es zu einem verminderten perpendikulärem Wachstum (Virchow 1851).

Angesichts dieser Tatsache bilden sich typische Schädelformen, abhängig davon, welche Sutura von der Kraniosynostose betroffen ist (Abbildung 7). Eine Kraniosynostose der Sutura sagittalis führt durch kompensatorisches Wachstum der Schädelkalotte phänotypisch zu einem sogenannten Skaphozephalus (Kahnschädel). Eine frühzeitige Synostose der Sutura coronalis kann unilateral oder bilateral sein. Eine bilaterale coronale Synostose führt zu einem brachyzephalen Schädeltyp (Kurzschädel) aufgrund einer anteroposterioren Verkürzung. Wächst der Schädel kompensatorisch in die Höhe bezeichnet man diese Schädelform als Turrizephalus (Turmschädel). Wenn nur eine Seite betroffen ist, kommt es zu einer asymmetrischen Verkürzung des Schädels und man spricht von einem Plagiozephalus (Schiefschädel). Ein Trigonozephalus (Keilschädel) ist Resultat einer Kraniosynostose der Sutura frontalis. Die selten vorkommende prämatüre Synostose der Sutura lambdoidea führt zu einer Abflachung des Hinterkopfes, die zu Anomalien im Bereich des Gehirns führen kann. Auch hier ist die Schädelform abhängig davon, ob die Kraniosynostose uni- oder bilateral ausgeprägt ist. Bei einer Fusion von allen Suturen des Schädels spricht man von einer Pansynostosis und es entsteht ein sogenannter Mikrozephalus (Müller *et al.*, 1997).

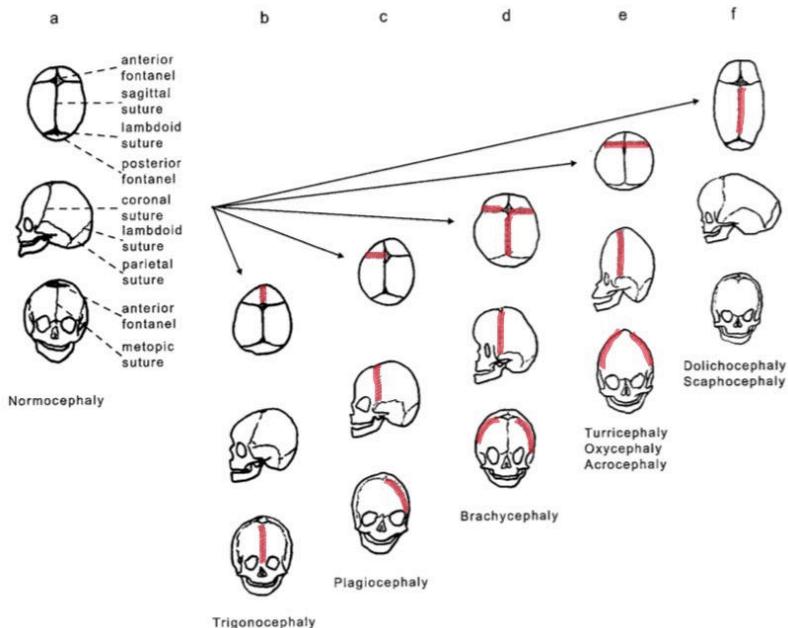


Abbildung 7: Abnormale Schädelformen aufgrund von Kraniosynostose je nach betroffener Suture (Müller 1997).
 Prämatür fusionierte Suturen sind rot dargestellt. a = normaler Schädel, b = Trionocephalus (prämatüre Fusion der Sutura frontalis), c = Plagiocephalus (einseitige prämatüre Fusion der Sutura coronalis), d = Brachycephalus (prämatüre Fusion mehrerer Suturen einschließlich Suturae coronales, Sutura sagittales und Suturen der Schädelbasis), e = Turri- Oxy- oder Akrozephalus (prämatüre Fusion beider Sutura coronales), f = Skaphozephalus (prämatüre Fusion der Sutura sagittalis).

Das allometrische Wachstum des Schädels basiert auf einem Zusammenspiel zwischen Gehirn, Dura mater, Suturen-Mesenchym und den osteogenen Fronten der Knochenplatten. Schon kleinste Störungen der sich entwickelnden Gewebe kann potentiell zu einer verfrühten Fusion der Suture führen (Levi *et al.*, 2012).

Man unterscheidet primäre von sekundären Kraniosynostosen. Primäre Formen sind entweder idiopathisch bedingt oder genetisch angelegte Funktionsstörungen der Suture. Sekundäre Formen entstehen durch eine reaktive Verknöcherung und gehen mit verschiedenen hämatologischen und metabolischen Störungen einher oder können aus Umwelteinflüssen wie intrauterine Infektionen, Medikamente und Drogen oder Traumata resultieren (Müller, Steinberger & Kunze, 1997). Hämatologische Erkrankungen können zum Beispiel eine Thalassämie, Polyzythämie vera oder die

Sichelzellkrankheit sein. Zu den metabolischen Störungen gehören die Hyperthyreose und Mukolipidosen. Die Medikamente Valproat, Retinoide und Methotrexat stehen ebenfalls im Zusammenhang mit einem häufigeren Vorkommen von Kraniosynostosen (Cohen, 1979; Jentink *et al.*, 2010; James *et al.*, 2010). Auch Tabakrauch kann Fehlbildungen des Schädels verursachen. Rauchen während der Schwangerschaft verursacht ein um 33 % höheres Auftreten von Kraniosynostosen (Hackshaw *et al.*, 2011). Außerdem kann eine zu geringe Volumenzunahme des Gehirns, wie bei einer Mikroenzephalie, dazu führen, dass der mechanische Impuls vermindert ist und somit einen prämaturnen Suturenverschluss fördern (Cohen, 1993).

Neben der Klassifikation in primäre und sekundäre Kraniosynostosen kann man auch eine Einteilung in syndromale und nicht-syndromale Kraniosynostosen vornehmen. Während nicht syndromale Kraniosynostosen eine isolierte Schädelformveränderung aufweisen und meist nur eine Sutur betroffen ist, sind syndromale Kraniosynostosen Teil einer komplexeren Erkrankung, bei der auch andere Organsysteme einbezogen sind. Nicht-syndromale Kraniosynostosen kommen mit 80 – 90 % wesentlich häufiger vor. In nur 10 – 20 % der Fälle handelt es sich um eine syndromale Kraniosynostose, die meist einen autosomal dominanten Erbgang zugrunde liegen hat (Azoury *et al.*, 2017).

Obwohl nicht-syndromale Kraniosynostosen wesentlich häufiger auftreten, ist ihre genetische Ätiologie weitgehend unerforscht. Im Gegensatz dazu existiert ein fundiertes Wissen über die Genetik von syndromalen Kraniosynostosen. Es sind über 180 Syndrome beim Menschen bekannt, die mit Kraniosynostosen einhergehen (Kutkowska-Kaźmierczak, Gos & Obersztyn, 2018). Autosomal dominante syndromale Kraniosynostosen sind beispielsweise das Crouzon-, Pfeiffer-, Jackson-Weiss-, Apert-, oder Saethre-Chotzen Syndrom (Müller *et al.*, 1997).

Aufgrund von familiären Häufungen und molekularen Analysen auf chromosomaler Ebene konnten mehrere Gene identifiziert werden, deren Mutation die Ursache für eine Kraniosynostose ist. Die Gene codieren für zahlreiche Wachstumsfaktorrezeptoren und Transkriptionsfaktoren, die an osteogener Proliferation, Differenzierung und Homöostase beteiligt sind, sodass ihre Mutationen mit syndromalen Kraniosynostosen assoziiert sind. Dazu gehören unter anderem

FGFR1, FGFR2, FGFR3, TWIST-1, EFNB-1, MSX-2 und RAB-23 (Senarath-Yapa *et al.*, 2012).

Bei der Mehrzahl der Fälle der syndromalen Kraniosynostosen sind Mutationen der FGFR-Familie ursächlich (Rice, 2008). Über verschiedene Signalwege kontrollieren die FGF's, eine Familie von Wachstumsfaktoren, physiologische Prozesse wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung oder auch Apoptose (Eswarakumar, Lax & Schlessinger, 2005). Mutationen von FGFR 1, 2 und 3 sind ausnahmslos immer Gain-of-Function-Mutationen und verursachen eine Verstärkung der Genaktivität zum Beispiel durch gesteigerte Liganden-Affinität, bessere Liganden-Rezeptor-Bindung oder Liganden-unabhängige Aktivierung. Gut erforschte Mutationen sind beispielsweise eine Punktmutation durch Substitution im FGFR2, die das Crouzon Syndrom (Cys342Tyr) und das Apert Syndrom (Ser252Trp) verursacht. Beim Pfeiffer Syndrom (Pro252Arg) ist der FGFR1 betroffen und eine Mutation im FGFR-3 ruft das Muenke Syndrom hervor (Senarath-Yapa *et al.*, 2012).

Eine Mutation im TWIST-1 Gen löst das Saethre-Chotzen Syndrom aus, bei dem es durch Synostosen der Sutur coronales zur Brachycephalie kommt. Des Weiteren sind eine maxilläre Hypoplasie, fasziale Asymmetrie, flache Augenhöhlen, Hypertelorismus, Hautanomalien, Ptosis und Syndaktylie der Finger typische klinische Erscheinungen dieses Syndroms. Eine Punktmutation im MSX2-Gen auf Chromosom 5 führt zur Kraniosynostose Typ 2, auch Boston Typ genannt. Das MSX2-Gen wird bei der Maus vor allem in den Suturen der Calvaria, aber auch in Herz, Gliedmaßen, Ohr- und Augenanlagen exprimiert. Bei allen Syndromen sind neurologische und ophthalmologische Symptome möglich (Müller *et al.*, 1997).

2.2.9 Proliferation in Suturen

Wie bereits beschrieben sind Suturen die Wachstumszentren des Schädels. Damit es zu einem Wachstum kommen kann müssen Zellen proliferieren. Das Knochenwachstum in den Suturen beruht auf der Proliferation von Osteoprogenitorzellen und der Differenzierung von Osteoblasten (Sun *et al.*, 2007). Die Zellen des undifferenzierten Mesenchyms innerhalb einer offenen Suture haben zwei Aufgaben. Zum einen die Proliferation, um den normalen Zellgehalt und den Aufbau der Suture aufrechtzuerhalten. Und zum anderen die Bereitstellung einer gewissen Anzahl an Osteoblasten entlang der Knochenfronten, welche

differenzieren und letztlich Knochen bilden können. Beides muss gleichzeitig ablaufen und während der Aufrechterhaltung der Sutur im Gleichgewicht zueinander stehen (Winograd *et al.*, 1997). Dieses Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung von knochenformenden Zellen ist essentiell für die Erhaltung des Wachstums an den osteogenen Fronten und zur Verhinderung der Fusion (Opperman, 2000).

Aus diesem Grund ist es auch nicht verwunderlich, dass ein Zusammenhang zwischen Proliferation in Suturen und ihrer Fusion besteht.

An einem Schweinemodell wurden Proliferation und Differenzierung in Suturen beschrieben und untersucht, wie sich diese mit steigendem Alter der Tiere verändern. Dabei konnte beobachtet werden, dass an den Knochenfronten mehr Proliferation und Differenzierung als in der Mitte der Sutur stattfindet. Außerdem nehmen mit dem Alter sowohl Proliferation als auch Differenzierung in der Sutur ab (Sun *et al.*, 2007).

In vielen Studien wurde die Rolle von Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren, die nachgewiesenen Einfluss auf den Suturenschluss haben oder bei der Entstehung von Kraniosynostosen mitwirken, bei der Regulation von Zell-Proliferation und Zell-Differenzierung in Suturen untersucht.

Wie bereits erwähnt haben FGF's eine wichtige Funktion bei der Entwicklung und dem Wachstum von Knochen (Kapitel 2.2.6). Bei der desmalen Ossifikation der Schädeluturen kann eine unkontrollierte Signalübertragung von FGF's zu prämaturom Suturenschluss oder Kraniosynostosen führen (Kim *et al.*, 1998; Greenwald *et al.*, 2001). Viele syndromale Kraniosynostosen stehen mit aktivierenden Mutationen des FGFR2 oder FGFR3 in Verbindung (Eswarakumar *et al.*, 2005). Daraufhin wurde auch der Einfluss auf die Proliferation in der Sutur untersucht.

Unreife Osteoblasten reagieren auf FGF2 mit einer Proliferation und bei mehr differenzierten Osteoblasten konnte eine erhöhte Rate an Apoptose festgestellt werden. Die Proliferation der unreifen Osteoblasten könnte dem Zweck dienen das Reservoir an Osteoblasten-Vorläufern aufzustocken (Mansukhani *et al.*, 2000).

Auch eine künstlich induzierte Mutation des FGFR2 wie beim Apert Syndrom bei Mäusen verursachte eine abnormale Proliferation der Osteoblasten in der Sutura

sagittalis und interfrontalis. Verglichen mit den Kontrolltieren konnte in den Suturen der Mutanten ein erheblicher Anstieg an Ki-67-positiven Zellen, also ein Anstieg der Proliferation, festgestellt werden. Ki-67 ist ein in der Immunhistochemie häufig genutzter Proliferationsmarker. Die Zellen zeigten eine abnorme Verteilung. Statt sich an den osteogenen Fronten anzureichern dehnten sie sich fast bis in die Mitte der Sutura aus. Ein Zusammenhang zwischen Kraniosynostosen und gesteigerter Proliferation scheint sehr wahrscheinlich (Wang *et al.*, 2005).

Eine Zugabe von FGF4 auf Suturen führt sowohl an den osteogenen Fronten als auch im Mesenchym der Sutura zu einer erhöhten Zellproliferation. Allerdings wurde nur bei der Platzierung von FGF4 auf die osteogenen Fronten die Geschwindigkeit des Sutureschlusses erhöht. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte ein unterschiedliches Ansprechen von unterschiedlichen Lokalisationen in der Sutura auf FGF4 sein. Im suturalen Mesenchym stimuliert FGF4 die Proliferation von undifferenzierten mesenchymalen Zellen, während an den osteogenen Fronten differenzierende Osteoblasten mit einer Proliferation auf FGF4 reagieren. Das könnte eine gesteigerte Anzahl an Osteoblasten und somit die Produktion von Knochen zur Folge haben, welche letztlich zum Schluss der Sutura führt (Kim *et al.*, 1998).

Zhou und seine Mitarbeiter (2000) beobachteten ebenfalls, dass eine P250R Mutation im FGFR1 den Phänotyp des Pfeiffer-Syndroms in Mäusen verursacht und diese zu einer vorübergehenden Erhöhung der Zellproliferation vor der sichtbaren Fusion der Sutura führt (Zhou *et al.*, 2000).

Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass sich viele der FGFR-Mutationen nicht auf die Zellproliferation auswirken, sondern vielmehr die Zelldifferenzierung beeinflussen (Lomri *et al.*, 1998; Fragale *et al.*, 1999; Iseki *et al.*, 1999; Lemonnier *et al.*, 2001). Eine vermehrte Zellproliferation führt zu mehr Zellen der Osteoblastenzelllinie. Das wiederum zieht eine beschleunigte Osteoblastendifferenzierung nach sich. Somit kann eine Hochregulierung sowohl von Proliferation als auch von Differenzierung eine prämatüre Verknöcherung der Suturen auslösen.

Auch Kraniosynostosen, die durch Mutationen von weiteren Wachstums- und Transkriptionsfaktoren ausgelöst werden, bestätigten die Vermutung, dass Zellproliferation in Verbindung mit einem prämaturem Sutureschluss steht. Die

MSX2-assoziierte Kraniosynostose (Typ Boston) wird durch eine Mutation im MSX2-Gen ausgelöst. Anhand von transgenen Mäusen konnte bei einer Überexpression von MSX2 ein vermehrtes Wachstum der Schädelknochen beobachtet werden, welches mit einer signifikanten Zunahme von proliferierenden osteoblastischen Zellen an den osteogenen Fronten der Suture einherging (Liu *et al.*, 1999). Umgekehrt bewirkt eine MSX2-Haploinsuffizienz eine reduzierte Zell-Proliferation. Somit sind weniger Zellen verfügbar, die zu Osteoblasten werden können, was zur Folge hat, dass sich die Suturen nicht schließen (Satokata *et al.*, 2000).

TGF- β 2 und TGF- β 3 haben unterschiedliche Auswirkungen auf den Erhalt einer Schädelnaht. In diesem Kontext wurden auch Untersuchungen an Suturen von Ratten bezüglich der Proliferationsraten durchgeführt. Sowohl TGF- β 2 als auch TGF- β 3 regulieren den Status der Suturen durch eine Regulation der Proliferations- und Apoptoserate. Eine Verhinderung der Obliteration durch TGF- β 3 geht mit einer verminderten Proliferationsrate einher, während eine durch TGF- β 2 induzierte Fusion durch eine wesentlich gesteigerte Proliferationsrate gekennzeichnet ist. Umgekehrt führte eine Obliteration aufgrund einer Entfernung von TGF- β 3 durch neutralisierende Antikörper auch zu signifikant gesteigerter Proliferation (Opperman *et al.*, 2000b).

Welche Rolle die Dura mater für den Erhalt einer Suture spielt, wird in Kapitel 2.2.14 genauer beschrieben. Opperman (1999) benutzte dieses Wissen, um die Zellproliferation einer offenen und sich schließenden Suture vergleichend zu untersuchen. Die Versuche erfolgten an der Sutura coronalis von Ratten. Offene Suturen, die in Anwesenheit der Dura mater kultiviert wurden, behielten ihr Level an Proliferation bei. In Suturen, die durch die Abwesenheit der Dura mater veranlasst wurden sich zu schließen, konnte vor der Fusion ein erheblicher Anstieg der Zellproliferation beobachtet werden. Bei Fortschreiten der Fusion sank die Anzahl proliferierender Zellen wieder auf das Kontrollniveau. Die Dura mater hat einen wichtigen regulatorischen Einfluss auf die offene, nicht verknöcherte Suture, indem sie verschiedene Faktoren sezerniert, die sich auch auf die Zellproliferation auswirken (Opperman *et al.*, 1999; Opperman *et al.*, 1996).

Diese Studien verdeutlichen, dass ein prämaturer Suturenschluss oft mit einer abnormal erhöhten Zellanzahl einhergeht und eine erhöhte Zellproliferationsrate wahrscheinlich eine wichtige regulatorische Größe für den vorzeitigen Schluss einer

Sutur ist. Leider liegen bisher keine Daten zum Proliferationsgeschehen in caninen Schädelsturen vor.

2.2.10 Apoptose in Sturen

Bei der Entstehung einer Sutur, der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts von fibrogenen und osteogenen Zellen sowie von Knochenbildung und Knochenabbau innerhalb der Sutur und beim physiologischen Sturenschluss muss unter anderem auch ein kontrolliertes Absterben von Zellen beteiligt sein, wie es in allen Geweben des Körpers der Fall ist. Im Folgenden wird die Bedeutung der Apoptose für eine Sutur erläutert.

Der Begriff Apoptose beschreibt eine Form des intravitale Zelltds, bei der eine programmierte Abfolge von Teilschritten auf molekularer Ebene stattfindet. Aus diesem Grund wird die Apoptose auch „programmierter Zelltd“ genannt. Sie findet nicht nur bei pathologischen Zuständen als Folge einer Zellschädigung statt, sondern kommt auch unter physiologischen Bedingungen vor, wie zum Beispiel bei der normalen Embryonalentwicklung oder im Rahmen des physiologischen Zellumsatzes. So kann als überlebenswichtiger Prozess ein Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung und Zellelimination ermöglicht werden, das der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase dient. Eine akute Entzündungsreaktion wird bei der Apoptose nicht hervorgerufen, da betroffene Zellen kontrolliert phagozytiert werden, sodass es nicht zu einer Zellyse kommt. Mikroskopisch lassen sich bei apoptotischen Zellen charakteristische Kennzeichen feststellen, die nacheinander ablaufen: Zuerst kommt es zur Lösung von Interzellularverbindungen und Kondensation des Chromatins. Es folgt die Fragmentierung und Pyknose des Zellkerns mit anschließender entzündungsfreier Elimination der apoptotischen Zellteile durch Phagozytose. Aufgrund dieser signifikanten Merkmale lässt sich eine Abgrenzung zur Nekrose, einer anderen Form des Zelltdes, ziehen. Nekrosen kommen nur unter krankhaften Bedingungen vor und bedingen lokale Entzündungsreaktionen. Die Apoptose von Zellen wird entweder durch eine rezeptorvermittelte Signalverarbeitung oder durch primär intrazelluläre Mechanismen ausgelöst, die aber beide in einer gemeinsamen Endstrecke enden (Roessner, 2008; Böcker *et al.*, 2012; Schmitz & Desel, 2018).

Da die Apoptose viele verschiedene Aufgaben auch noch im adulten Organismus übernimmt ist ein geordneter Ablauf unerlässlich. Eine Fehlregulation sowohl in Form eines übersteigerten Maßes an Apoptose als auch durch eine Inhibition von Apoptose, kann schwerwiegende Folgen haben. Die Entstehung von Krebs kann zum Beispiel die Folge einer Inhibition der Apoptose mit resultierender Dysregulation der Zellproliferation sein (Schmitz & Desel, 2018).

Abgesehen von dem charakteristischen morphologischen Erscheinungsbild von apoptotischen Zellen in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung kann man Apoptosen auch durch andere Methoden nachweisen. Dazu gehören zum Beispiel der Nachweis der charakteristischen DNA-Fragmente (Nukleosomen-Pattern), der Nachweis von aktivierten Caspasen oder auch die TUNEL-Reaktion (Terminal deoxynucleotidyl transferase- mediated dUTP nick end labeling-Methode), welche die durch Caspasen gespaltene DNA mittels Einbau von markierten Nukleotiden nachweist (Böcker *et al.*, 2012).

Schon früh bestand die Annahme, dass Apoptose möglicherweise in Zusammenhang mit der normalen Entwicklung einer Sutur steht und eine frühzeitige Synostose verhindert. Cate *et al.* (1977) dokumentierten als eine der Ersten das Auftreten von Apoptose in Suturen. In der zentralen Zone der Sutura sagittales von Ratten konnten apoptotische Zellen nachgewiesen werden. Sie begründeten ihren Fund darin, dass es ohne Apoptose zur Fusion der Sutur kommen würde. Denn sie sei ein notwendiger Mechanismus, damit ein Kontakt der aneinandergrenzenden mineralisierten Knochenzonen verhindert wird. Somit wurde bereits im Jahr 1977 die Möglichkeit erörtert, dass eine Fehlfunktion der normalen Apoptose in Suturen zur Ausbildung von Kraniosynostosen beitragen kann (Cate *et al.*, 1977).

Anhand einer Studie an der Sutura coronalis von Mäusen wurde die Vermutung bestätigt, dass Apoptose schon bei der Entstehung einer Sutur mitwirkt. Denn Apoptose war bereits pränatal vor der eigentlichen Formation der Sutur zu detektieren. Das bedeutet, dass sie nicht nur zur Aufrechterhaltung der Sutur, sondern auch zur eigentlichen Bildung der Sutur beiträgt (Bourez *et al.*, 1997).

Furtwängler (1985) stellte fest, dass apoptotische Zellen an den Rändern der Knochenfronten lokalisiert sind, welche sich zu sehr angenähert haben. Er

vermutete, dass durch die Apoptose das Verschließen der Suture verhindert werden soll (Furtwängler *et al.*, 1985).

Rice (1999) untersuchte Suturen der Calvaria von Mäusen und beobachtete mithilfe der TUNEL-Methode Apoptose in mesenchymalen Zellen, Präosteoblasten, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. Die Verteilung der positiven Zellen war nicht zufällig und deutete auf eine kontrollierte und ordnungsgemäße Entwicklung hin. Apoptotische Zellen sind vor allem an den osteogenen Fronten - ein Bereich von starker osteogener Aktivität - und am vorderen Rand des sich überlappenden Knochens zu finden. Hier leistet der programmierte Zelltod einen wichtigen Beitrag, um die Balance zwischen Knochenbildung und Knochenabbau aufrecht zu erhalten. Apoptotische Zellen waren vor allem dann aufzufinden, wenn sich der Bereich zwischen den Knochen durch Annäherung der Knochenfronten verschmälerte. Außerdem waren mehr apoptotische Zellen in mesenchymalen Gewebe von Suturen zu finden, in denen sich die Knochenfronten überlappen (Sutura coronalis und lambdoidea) als in Suturen, die eine End-zu-End-Annäherung der Knochenfronten aufweisen (Sutura sagittalis) (Rice *et al.*, 1999).

Diese Ergebnisse stützen die Behauptung, dass Apoptose einen wichtigen Beitrag zur normalen Entwicklung und Aufrechterhaltung einer Suture leistet.

TGF- β 2 und TGF- β 3 regulieren den Status der Suturen durch die Regulation sowohl der Proliferations- als auch der Apoptoserate. Durch TGF- β 3 wird die Obliteration einer Suture verhindert. Dabei konnte eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen beobachtet werden, welche sich zwischen den sich überlappenden Knochenfronten befanden. Im Gegensatz dazu sind bei einer durch TGF- β 2 induzierten Fusion fast keine apoptotischen Zellen zu finden (Opperman *et al.*, 2000b). Diese Studie bestätigt ebenfalls, dass die normale Aufrechterhaltung einer Suture und auch das Verhindern der Fusion von einer gesteigerten Apoptose begleitet wird.

Die Tatsache, dass sich eine große Menge an apoptotischen Zellen entlang der Knochenfronten von offenen Suturen befinden, ist aber trotzdem nicht Beweis genug, dass diese einer Fusion entgegenwirken. Denn auch entlang der Knochenfronten von fusionierenden Suturen waren apoptotische Zellen angeordnet. Aus diesem Grund entstand die Annahme, dass eine entscheidende Anzahl von Zellen innerhalb der suturalen Matrix apoptotisch werden muss. Wenn dies nicht

geschieht, dann übersteigt die Zellanzahl die kritische Dichte und es kommt zur Auslösung von Zelldifferenzierung und infolgedessen durch Knochenbildung zum Schluss der Suture (Opperman, 2000).

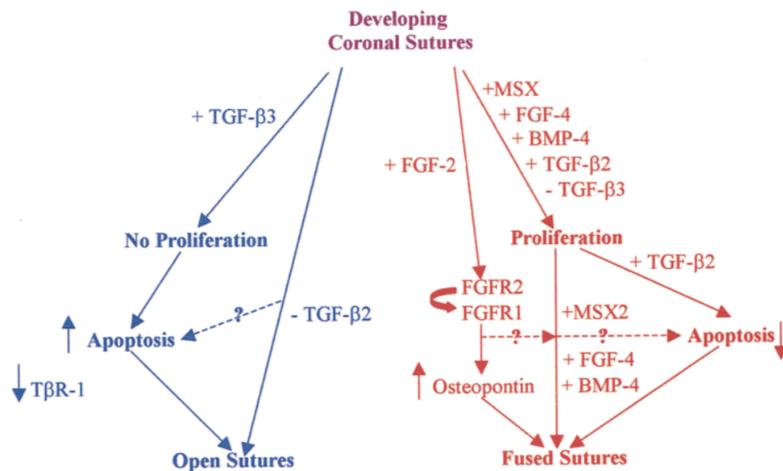


Abbildung 8: Bedeutung von Wachstumsfaktoren für zelluläre Ereignisse wie Apoptose und Proliferation bei der Entwicklung der Sutura coronalis (modifiziert nach Opperman 2000). Nach oben gerichtete Pfeile stellen vermehrte Aktivität dar. Nach unten gerichtete Pfeile stellen verminderte Aktivität dar. Der linke blaue Pfad zeigt Zusammenhänge bei einer offenen Suture, der rechte rote Pfad bei einer sich schließenden Suture.

Bei der Maus konnte bei der einzigen sich schließenden Suture weniger Apoptose festgestellt werden, wohingegen solche, die offen bleiben, einen ausgeprägten Bereich von apoptotischer Aktivität zeigten (Agresti & Gosain, 2005). Bei syndromalen Kraniosynostosen wurde ebenfalls eine verminderte Apoptose der Osteoblasten beobachtet (Dry *et al.*, 2001). Aufgrund der oben aufgeführten Studien besteht die Vermutung, dass apoptotische Aktivität wichtig für die Aufrechterhaltung einer Suture ist und eine gesteigerte Apoptose mit einem verzögerten Suturenverschluss assoziiert sein könnte. Eine verminderte Apoptose könnte im Zusammenhang mit einem vorzeitigen Schluss der Suturen stehen.

Im Gegensatz zu dieser Hypothese existieren allerdings auch einige Studien, die zu einem anderen Ergebnis kommen. Sie demonstrieren einen Zusammenhang zwischen gesteigerter Apoptose und Fugenschluss. Die im Folgenden dargestellten Studien zu Gain-of-function-Mutationen von FGFR zeigten jeweils eine erhöhte

apoptotische Aktivität während eines prämaternen Suturenschlusses. Eine Studie aus dem Jahr 2000 beschäftigte sich mit FGFR2 Mutationen, welche das Apert und Crouzon Syndrom beim Menschen verursachen. Dabei konnte eine drastisch erhöhte Apoptoserate der differenzierenden Osteoblasten in Zellkulturen aus der sich entwickelnden Calvaria verzeichnet werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Apoptose den Ablauf an den Knochenfronten unterstützt indem Zellen, die sterben müssen, beseitigt werden und somit die Mineralisation stattfinden kann. FGF-induzierte Apoptose könnte also ein homöostatischer Mechanismus zur Steuerung von Osteoblasten-Differenzierung und -Osteogenese sein (Mansukhani *et al.*, 2000). In einer anderen Studie wurde der Effekt einer gain-of-function-Mutation an der Sutura coronalis der Maus durch die Zugabe von FGF2 und FGF4 initiiert. Auch hier war die apoptotische Aktivität erhöht (Mathijssen *et al.*, 2001). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Chen *et al.* (2003). Hier löste eine aktivierende Mutation von Ser250Trp im FGFR2, welche das Apert Syndrom im Menschen hervorruft, eine verstärkte Apoptose von osteogenen Zellen in der Sutura coronalis von Mäusen aus. Die erzeugte Kraniosynostose ging mit einer verminderten Knochenbildung vermutlich aufgrund der erhöhten Apoptoserate einher. Eine mögliche Erklärung wie es daraufhin zu einem verfrühten Fugenschluss kam, sei die resultierende verminderte Zellzahl und der verringerte Abstand zwischen den angrenzenden Knochen. Es wird angenommen, dass der verringerte Abstand einen Kontakt der gegenüberliegenden Knochen ermöglicht und es daraufhin zur Fusion der Sutura kommt (Chen *et al.*, 2003). Auch anhand von Apert-Syndrom-Zellkulturen war ein deutlicher Anstieg an Apoptose in reifen Osteoblasten zu verzeichnen (Lemonnier *et al.*, 2001).

Aufgrund dieser Studien liegt die Vermutung nahe, dass Apoptose auch bei der Entstehung von Kraniosynostosen eine Rolle spielt.

Wieder andere Studien konnten keinen Unterschied bezüglich der Apoptose zwischen Suturen mit künstlich erzeugter S252W Mutation im FGFR2 (wie sie bei zwei Drittel der beim Apert Syndrom erkrankten Individuen vorkommt) und der Kontrollgruppe feststellen (Wang *et al.*, 2005).

Insgesamt scheint Apoptose eine wichtige Stellschraube zu sein, sowohl für die Aufrechterhaltung als auch für den Schluss einer Sutura, indem sie das Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung und Zellelimination innerhalb der Sutura reguliert. Dennoch

bedarf es weiterer Forschung, um eindeutigere Aussagen zu treffen. Insbesondere für den caninen Schädel fehlen bisher grundlegende Daten zum Apoptosegeschehen in den Suturen.

2.2.11 Osteoklasten in Suturen

Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die unter geeigneten Bedingungen durch die Fusion von einzelligen Monozyten entstehen. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Knochenresorption und im Knochenumbau. Dabei liegen die aktiven Osteoklasten der mineralisierten Knochenmatrix direkt an. Die Knochenresorption resultiert aus der Sekretion von verschiedenen Substanzen, wie Säuren, die den pH-Wert senken, was die Auflösung des Minerals erleichtert und lysosomalen Enzymen, welche die extrazelluläre Matrix abbauen (Samuelson, 2007; Lüllmann-Rauch, 2009). Die Entstehung und Aktivität von Osteoklasten wird vor allem im Zuge von osteolytischen Prozessen stark angekurbelt. Die wichtigsten Zytokine der Osteoklasten sind der Receptor activator of necrosis factor- κ B ligand (RANKL) und der macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). Sie fördern die Entstehung, die Reifung und die Aktivität von Osteoklasten (Teitelbaum, 2000; Bar-Shavit, 2007; Lüllmann-Rauch, 2009). Außerdem spielt das endokrine System, durch die Sekretion von Calcitonin in der Schilddrüse und Parathormon in der Nebenschilddrüse, eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Knochenresorption und Bildung von Osteoklasten (Samuelson, 2007).

Die zwei hauptverantwortlichen Zelltypen des Knochenmetabolismus sind Osteoblasten und Osteoklasten. In Suturen sind unter anderem mesenchymale Stammzellen, Osteoblasten und auch Osteoklasten enthalten. Ihr Zusammenspiel ermöglicht die Homöostase innerhalb der Suture. Für die Aufrechterhaltung der Suture ist ein Gleichgewicht zwischen Knochenbildung durch Osteoblasten und Knochenresorption durch Osteoklasten vonnöten (Lee *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2018; Maxhimer *et al.*, 2015).

Die Rolle von Osteoklasten in Suturen wurde in mehreren Studien näher untersucht und wird nachfolgend weiter erläutert.

Nachgewiesene zelluläre Veränderungen, die zeitlich mit der Fusion einer Suture einhergehen, umfassen sowohl einen Anstieg von osteosynthetischen als auch von

osteolytischen Prozessen. Das bedeutet, dass während der Fusion Osteoblasten- und Osteoklastenvorläufer im undifferenzierten Mesenchym der Sutura aktiviert werden, sodass der Knochenmetabolismus während der Fusion deutlich gesteigert ist (Winograd *et al.*, 1997).

Rice (1997) untersuchte die Bedeutung von Osteoklasten bei der desmalen Ossifikation an der Calvaria von Mäusen. Er vermutete, dass Osteoklasten die Geschwindigkeit des Knochenwachstums in Suturen beeinflussen und somit auch die Aufrechterhaltung der Sutura regulieren können. In der Studie wurde die Verteilung der Osteoklasten in den Suturen beschrieben, um eine mögliche Verbindung zur Knochenentwicklung in der Calvaria herzustellen. Die Osteoklasten ordneten sich unmittelbar gegenüber bzw. entlang der osteogenen Fronten an. Aufgrund der Lokalisation der Osteoklasten wurde angenommen, dass die Knochenresorption durch Osteoklasten einen wichtigen Anteil an der Entwicklung des Knochens in der Sutura hat und somit auch Einfluss auf den Schluss der Sutura nimmt (Rice *et al.*, 1997).

Auch in weiteren Studien konnte bestätigt werden, dass die Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten an den osteogenen Fronten unerlässlich für die Aufrechterhaltung der offenen Sutura sind (Byron, 2006; Guo *et al.*, 2018). Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Osteoklasten in verzahnten Suturen und ihrer wellenförmigen Gestalt. Die größte Aktivität der Osteoklasten konnte an den konkaven Regionen der Sutura verzeichnet werden und lässt darauf schließen, dass Osteoklasten maßgeblich zur Entstehung der morphologischen Komplexität einer Sutura beitragen (Byron 2006).

Im Vergleich zu offenen Suturen konnte bei verfrühtem Schluss der Suturen eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten verzeichnet werden. Da Osteoklasten Indikatoren für Knochenbildung und -resorption sind, ist dies ein Hinweis auf eine fortgeschrittene Knochenentwicklung in Form von Umbau und Bildung von endgültigem Knochen. Die erhöhte Osteoklastendichte weist also auf einen deutlich gesteigerten Knochenmetabolismus bei fusionierenden Suturen hin (Winograd *et al.*, 1997; 2001; Regelsberger *et al.*, 2012). Ebenso wurden bei der histologischen Untersuchung von unilateralen Kraniosynostosen der Sutura coronalis deutlich mehr Osteoklasten gefunden als in normalen Suturen. Dies untermauert die Hypothese,

dass Kraniosynostosen aus einer abnormal hohen Aktivität des Knochenumbaus resultieren (Vastardis *et al.*, 2004).

Wie bereits erwähnt, werden Osteoklasten durch das RANKL-System reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von RANK sich je nach Status der Sutur unterscheidet. Immunhistochemisch konnte bei Mäusen eine deutliche Reduktion des Signals für RANK-positive-Zellen in fusionierenden Suturen im Vergleich zu offenen Suturen festgestellt werden. Außerdem führt eine Herunterregulierung von RANK zu einer gesteigerten Knochenbildung in der Sutur und fördert so die Fusion, sodass ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Expression von RANK und der Durchgängigkeit einer Sutur besteht (Lee *et al.*, 2011). Ebenso bewirkt ein Mangel an Osteoprotegerin, welches die Differenzierung von Osteoklasten durch die Inhibierung von RANKL hemmt, dass bei der Maus die Sutura frontalis posterior, welche normalerweise fusioniert, offen bleibt (Beederman *et al.*, 2015). Diese Korrelationen deuten auf die Relevanz von Osteoklasten in der Aufrechterhaltung einer offenen Sutur hin.

Es lässt sich festhalten, dass Osteoklasten sowohl bei der Entwicklung von normalen als auch von prämaturn fusionierenden Schädelsuturen von Bedeutung sind und vermutlich einen wichtigen Beitrag zur Erhaltung der Durchgängigkeit und dem Schluss einer Sutur leisten. Untersuchungen der osteoklastischen Aktivität in den caninen Schädelsuturen liegen bisher nicht vor.

2.2.12 Blutgefäße in Suturen

Knochen ist ein stark vaskularisiertes Gewebe und die Blutgefäße innerhalb der Knochenmatrix sind unabdingbar für eine physiologische Knochenbildung, sowohl bei der enchondralen als auch bei der desmalen Ossifikation. Die Blutgefäße versorgen den Knochen unter anderem mit Sauerstoff, Nährstoffen, Hormonen, Wachstumsfaktoren und Neurotransmittern, sodass die Vitalität und die Aktivität der Knochenzellen gewährleistet ist (Filipowska *et al.*, 2017; Brandi & Collin-Osdoby, 2006).

Die Vaskularisation in Suturen verändert sich während der Entwicklung der Schädelfugen. Zu Beginn lassen sich nur wenige Blutgefäße mit kleinen Lumina in den Suturen finden. Mit der Zeit nimmt die Anzahl der Blutgefäße zu. Vor allem bei

starkem Schädelwachstum sind vermehrt Blutgefäße zu verzeichnen. Mit zunehmender Verknöcherung der Sutura nimmt die Dichte der Vaskularisation wieder ab, aber die Durchmesser der Blutgefäße sind kurz vor vollendeter Synostose am größten (Cate *et al.*, 1977; Proff *et al.*, 2006).

Zimmermann *et al.* (1998) beschrieben die Morphologie der Sutura sagittalis an Mäusen vom Embryonalstadium bis zum erwachsenen Tier. Es konnte gezeigt werden, dass einer desmalen Ossifikation in der Schädelfuge immer eine Vaskularisation vorausgeht. Bereits am 18. Tag post coitum werden die sich annähernden Knochenfronten eng von kleinen Blutgefäßen begleitet. Im Bereich zwischen den Knochenfronten erscheinen Kapillare. Am fünften Tag post partum sind große zentrale Blutgefäße zu verzeichnen, welche die Knochen voneinander in Abstand halten. Vier Tage später spalten die einzelnen Knochenfronten sich jeweils in zwei Schichten mit dazwischen liegenden Blutgefäßen. Zwischen dem 20. und 28. Tag nähern sich die Knochenfronten immer weiter an und in diesem Stadium lassen sich ebenfalls viele zentral liegende Blutgefäßen mit dünnem Endothel finden. Auch die letztlich synostotisch verschlossene Sutura wird von großen Blutgefäßen kanalisiert. Zusammenfassend stellt der Autor fest, dass eine Vaskularisation immer der Knochenbildung voraus geht. Außerdem scheint die Anordnung der Blutgefäße eine wichtige Voraussetzung für das ineinandergreifende Wachstum des Knochens zu sein, indem die Blutgefäße eine knochenfreie Umgebung schaffen, in welche das Knochengewebe einwächst (Zimmermann *et al.*, 1998).

Ebenfalls an der Sutura sagittalis der neugeborenen Maus ließen sich zahlreiche Kapillare eng benachbart mit den osteogenen Fronten antreffen. Die Endothelzellen dieser Kapillare zeigen eine starke proliferative Aktivität. Der Grund dafür sind vermutlich entwicklungsbedingte und chemotaktische Prozesse (Decker & Hall, 1985).

Eine Abweichung der Größe und Form der Blutgefäße innerhalb des Schädelknochens konnte bei Patienten mit Crouzon-Syndrom festgestellt werden. Bei Menschen, die vom Crouzon-Syndrom betroffen sind, ist der Schädelknochen oft dünner und fragiler als der eines gesunden Menschen. Bei einer vergleichenden histologischen Untersuchung des Schädelknochens wurden sowohl die Form und der Durchmesser der Osteone als auch die der Blutgefäße vermessen. Zwar konnte keine Abweichung bei den Osteonen verzeichnet werden, wohl aber konnte ein

signifikanter Unterschied bei der Form und dem Durchmesser der Blutgefäße innerhalb des Osteons festgestellt werden. Die Blutgefäße des Knochens von Crouzon-Patienten sind größer und unregelmäßig geformt. FGF's tragen einen wichtigen Anteil zur Vaskulogenese bei. Eine Mutation des FGFR wie beim Crouzon-Syndrom beeinflusst somit auch die normale Entwicklung der Blutgefäße und bedingt mutmaßlich somit ihren vergrößerten Durchmesser. Es liegt der Verdacht nahe, dass der brüchige Schädelknochen beim Crouzon-Syndrom durch eine abnorme Knochenformation zustande kommt. Da sich Osteone erst nach den Gefäßen entwickeln, welche sie anschließend umgeben, bleibt durch die ausgedehnten Blutgefäße vermutlich weniger Platz für die Knochenbildung. Daraus resultiert ein Verlust an Knochenmasse, was letztendlich zu brüchigem Knochen führt. Die Blutgefäße innerhalb der Schädelfugen wurden in dieser Studie nicht mit einbezogen (Tholpady *et al.*, 2004).

Ebenfalls mit Kraniosynostosen assoziiert, allerdings nicht die Suturen betreffend, sind endokraniale vaskuläre Veränderungen der Arteria meningea media und der Sinus durae matris. Hier wurden Abweichungen der Dimensionen dieser Blutgefäße bei Kraniosynostosen der Sutura coronalis entdeckt. Da diese Abweichungen von der physiologischen Vaskularisation sowohl bei familiärer als auch bei künstlich induzierter coronaler Kraniosynostose zu finden sind, geht man davon aus, dass es sich nur um eine sekundäre Reaktion bedingt durch die Kraniosynostose handelt und diese Abweichungen nicht der Grund für die Entstehung der Kraniosynostosen sind. Es wird vermutet, dass ein erhöhter intrakranieller Druck ursächlich für die Veränderungen an den Gefäßen ist (O'Loughlin, 1996; Burrows *et al.*, 2001).

2.2.13 Kollagenfasern und ihre Orientierung in der Suture

Eine Suture beinhaltet hinsichtlich ihrer funktionellen Aktivität zwei Zellpopulationen: die osteozytären Zellen, wozu Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten gehören und die fibrozytären Zellen, zu denen Fibroblasten und Fibrozyten zählen (Cate *et al.*, 1977). Die fibrozytären Zellen liegen zwischen den Fasern der Extrazellulärmatrix, bauen diese auf und stabilisieren sie. Eines der Hauptprodukte der Fibroblasten ist Kollagen. Einige histomorphologische Studien haben sich genauer mit der Kollagenfaserausrichtung innerhalb der Suture beschäftigt und auch den Einfluss von Krafteinwirkung näher untersucht. Kollagenfasern überbrücken den

Spalt zwischen den beiden an der Suture beteiligten Schädelknochen. Dabei konnte festgestellt werden, dass ihre Orientierung zwischen verschiedenen Suturen und teilweise auch innerhalb ein und derselben Suture stark variiert (Koskinen *et al.*, 1976; Cohen, 1993). An Schädelfugen der Ratte wurden die Kollagenfasern im Laufe der ihrer Entwicklung untersucht. Im frühen Stadium der Entwicklung einer Suture sind die Kollagenfasern wahllos angeordnet. Im weiteren Verlauf bei starkem Wachstum des Schädels zeigte sich eine große Anzahl an Kollagenfaserbündeln, die aber weiterhin keine definitive Orientierung haben. Bei älteren Tieren, bei denen kaum noch Schädelwachstum zu verzeichnen ist, dominieren große Kollagenfaserbündel die Suture. Der Autor bezeichnet diese als Sharpey-Fasern, welche von der einen zur anderen Seite verlaufen und in den Knochen einstrahlen (Cate *et al.*, 1977).

Auch in anderen Studien an verschiedenen Tieren bestätigte sich, dass sich die Kollagenfaserausrichtung im Laufe der Zeit verändert. In einer offenen, noch wachsenden Suture sind quantitativ mehr Kollagenfasern zu finden. Diese sind entweder wahllos entlang der Achse der Suture angeordnet oder im 45° Winkel zu den mineralisierten Knochenfronten orientiert. Mineralisierte Knochenbälkchen zeigen die gleiche Orientierung wie die der Kollagenfasern (Cohen, 1993; Ogle *et al.*, 2004; Regelsberger *et al.*, 2012). Koskinen (1976) stellte fest, dass die Faserausrichtung in einer verzahnten Suture den Wachstumsrichtungen der beiden Knochenfronten entspricht, welche aufeinander zuwachsen (Abbildung 5) (Koskinen *et al.*, 1976). In einer Phase von sehr schnellem Wachstum der Suture wird vor allem Kollagen Typ 3 neu synthetisiert (Yen *et al.*, 1989).

In der späteren Wachstumsphase und bei älteren Suturen laufen die Faserbündel von einer zur anderen Seite vorwiegend im rechten Winkel zum Knochen. Zudem enthalten reifere Suturen mehr Sharpey-Fasern (Pritchard *et al.*, 1956; Zimmermann *et al.*, 1998). Die Anzahl der Fibroblasten, ebenso wie die der Kollagenfasern innerhalb der Suture, nimmt ab (Cohen, 1993). Diese Beobachtungen decken sich auch mit denen am Hundeschädel. Es werden zwei Typen von offenen Suturen beschrieben, abhängig von der Art des Bindegewebes und der zellulären Komponenten, die den Suturespalt dominieren. In offenen Schädelfugen des jungen Hundes findet sich histologisch bei einer Färbung nach Masson-Goldner-Trichrom lockeres Bindegewebe und die Kollagenfasern sind überwiegend parallel entlang des Sutureverlaufes ausgerichtet. Bei älteren Suturen (Hunde über sieben Monate),

die funktionell geschlossen sind, überwiegt straffes Bindegewebe und die Kollagenfasern ordnen sich schräg bis senkrecht zum Suturenverlauf an. Osteoblasten und Fibroblasten waren im Vergleich zu jungen Hunden deutlich weniger anzutreffen (Farke, 2017).

Wie bereits erwähnt ist eine Funktion der Schädelfugen Kräfte, zum Beispiel in Form von mechanischen Belastungen, abzufangen. Suturen sind in der Lage Energie zu absorbieren. Das Ausmaß ist unter anderem abhängig von der Faserausrichtung innerhalb der Suturen. Studien zeigen, dass sowohl die Morphologie einer Suturen als auch ihre Faserausrichtung zu der Art der Belastung, der die Suturen ausgesetzt war, passen (Jaslow, 1990; Rafferty & Herring, 1999; Herring & Ochareon, 2005). Eine verzahnte Suturen kann aufgrund der erhöhten Oberfläche, welche für eine Befestigung der Kollagenfasern sorgt, mehr Energie absorbieren als eine gerade Suturen. Diese Kollagenfasern sind an den Knochenrändern so orientiert, dass sie Kräfte möglichst entgegen wirken. Zentral findet man ein kompaktes und dichtes Netz aus Faserbündeln (Jaslow, 1990; Rafferty & Herring, 1999; Herring & Ochareon, 2005).

Die Anordnung der Kollagenfasern hat somit einen wichtigen Einfluss auf die Mechanik des Suturen-Knochen-Gefüges. Abhängig von der vorherrschenden Art der Belastung auf eine Suturen können sich ungeordnete Kollagenfasern in der Suturen so orientieren, dass sie dieser Krafteinwirkung bestmöglich standhalten (Rafferty & Herring, 1999; Jasinowski *et al.*, 2010). Bei Zugkräften verlaufen die Fasern gerade oder überkreuzt, während eine Kompression zu einem schrägen Verlauf führt (Herring & Ochareon, 2005). Koskinen *et al.* (1976) beschreiben die Orientierung der Kollagenfasern als abhängig von lokalen Wachstumsprozessen innerhalb der Suturen, sodass die Anordnung dynamischen Veränderungen unterliegt und damit sehr variiert. Dementsprechend kann die Kollagenfaserausrichtung innerhalb einer Suturen uneinheitlich sein (Koskinen *et al.*, 1976).

2.2.14 Einfluss der Dura mater auf die Suturen

Die Dura mater ist die äußerste der drei bindegewebigen Hüllen, die das Gehirn und das Rückenmark umgeben. Sie verschmilzt peripher mit dem Periost des Schädelknochens (König, 2012). Die Dura mater entsteht embryologisch aus Zellen der Neuralleiste. Diese Zellen sind in der Lage über verschiedene Mechanismen die

Osteogenese des umliegenden Gewebes zu stimulieren. Bei der Entwicklung und dem Wachstum des Neurokraniums wirkt die Dura mater sowohl auf das Gehirn als auch auf den Schädel ein. Dies passiert unter anderem über FGF und TGF- β Signalwege (Ogle *et al.*, 2004; Gagan *et al.*, 2007).

Es wurden einige Untersuchungen zum Einfluss der Dura mater auf den Status der Suturen durchgeführt. Dabei wurden vor allem die Aufrechterhaltung und der Schluss einer Sutur sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit der Dura mater erforscht, denn es bestand die Annahme, dass biomechanische Faktoren ausgehend von der Dura mater sich auf die Regulation der Sutur auswirken (Kokich *et al.* 1986).

In Studien an Ratten wurde gezeigt, dass die Dura mater für die initiale Überlappung der Knochenfronten nicht von Nöten ist, aber in Abwesenheit der Dura mater eine gerade frisch entstandene Sutur nicht in der Lage war sich aufrechtzuerhalten und in Folge dessen verknöcherte (Opperman *et al.*, 1993; 1995). Die Dura mater sezerniert lösliche Heparin-bindende Wachstumsfaktoren, welche für die Aufrechterhaltung der Sutur benötigt werden, indem sie osteo-inhibitorische Signale aussenden (Opperman *et al.*, 1996). Levine *et al.* (1998) zeigten, dass die Dura mater Regionen mit unterschiedlichem Einfluss bezüglich der Aufrechterhaltung einer Sutur hat. Bei Mäusen und Ratten ist die Sutura interfrontalis in einen anterioren und einen posterioren Anteil aufgeteilt. Der anteriore Anteil der Sutur bleibt normalerweise ein Leben lang offen, während der posteriore Anteil innerhalb der ersten 45 Lebenstage fusioniert. Eine Rotation der Dura mater, sodass die unterliegenden Anteile getauscht wurden, führte auch zu einem entgegengesetztem Verhalten der Suturen. Der anteriore Anteil der Sutura interfrontalis schloss sich, während der posteriore Anteil nicht fusionierte. Man erklärte sich dies durch eine Prägung der Dura mater, welche sie daran hindert osteogene Signale auszusenden (Levine *et al.*, 1998).

Eine Transplantation von Dura mater, die normalerweise unter offenen Suturen lokalisiert ist, führte bei Kaninchen mit Kraniosynostose zu einer Verhinderung der Obliteration der betroffenen Suturen. Dies stellte einen weiteren Beweis für die regional unterschiedliche Wirkung der Dura mater auf die Suturen dar (Mooney *et al.*, 2018).

Während der verschiedenen Stadien der Bildung bis hin zur Fusion einer Sutur übernimmt die Dura mater verschiedene Aufgaben und wirkt somit auf die Sutur ein. Die erste Annäherung der Knochenfronten einer Sutur findet ohne den Einfluss der Dura mater statt. Nachdem die Überlappung der Knochenfronten stattgefunden hat sind bestimmte Signale, die von der Dura mater ausgehen, unerlässlich für die initiale Stabilisierung der Sutur. Zusätzlich sendet sie osteogene Signale, die das Knochenwachstum ankurbeln. Sobald die Sutur stabilisiert ist, hindert diese die Dura mater daran weitere osteogene Signale zu senden. Fehlen diese osteoinhibitorischen Signale durch die Sutur allerdings, dann kommt es durch die osteogenen Signale der Dura mater schließlich zur knöchernen Durchbauung der Sutur (Abbildung 9) (Kim *et al.*, 1998; Opperman *et al.*, 1993; Opperman *et al.*, 1995; Opperman, 2000).

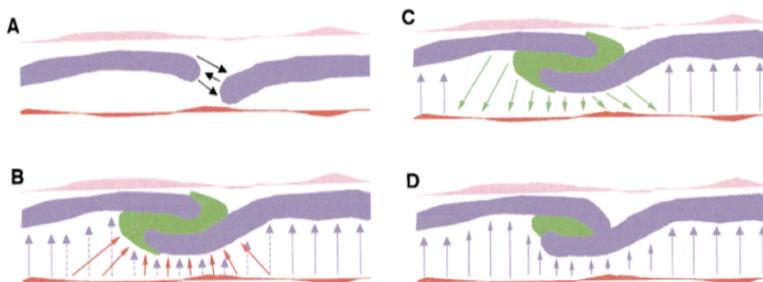


Abbildung 9: Einfluss der Dura mater auf verschiedene Stadien der Morphogenese von Suturen (A-C) und ihrer Fusion (D) (modifiziert nach Opperman 2000).

Rosa = Periost, rot = Dura mater, schwarze Pfeile = induzierende Signale ausgehend von den Knochenfronten, rote Pfeile = stabilisierende Signale der Dura mater, lila = Knochenfronten, lila Pfeile = osteogene Signale von der Dura mater ausgehend, grün = Sutur, grüne Pfeile = osteoinhibitorische Signale von der Sutur an die Dura mater

Bei einer physiologisch fusionierenden Sutur konnte wiederum gezeigt werden, dass ein Blockieren des Kontaktes zwischen Sutur und Dura mater zu einem verzögerten Schluss dieser Sutur führt (Roth *et al.*, 1996).

Die Hypothesen über die Rolle der Dura mater auf die Entwicklung einer Sutur kommen allerdings ins Wanken, wenn man bedenkt, dass die Suturen des Viscerocraniums gar keinen Kontakt zur Dura mater haben und sich trotzdem in Morphologie und Funktion genauso verhalten wie die Suturen des Neurokraniums. Dies lässt sich nur damit erklären, dass sie umgebenen Gewebe die gleichen Regulationsmechanismen haben müssen wie die Dura mater. Bisher wurden solche

Gewebe allerdings noch nicht identifiziert (Opperman, 2000). Ergänzend zeigte eine Studie aus dem Jahr 1994, dass das Periost, das der Sutura ektokranial anliegt, für eine Aufrechterhaltung der Sutura nicht notwendig ist (Opperman *et al.*, 1994). Bis heute bleibt unklar, welche Gewebe und Faktoren bei der Entwicklung einer Sutura mitwirken. Die Dura mater scheint aber einen nicht zu vernachlässigenden Anteil daran zu haben und muss bei zukünftigen Studien weiter mit einbezogen werden.

2.3 Brachyzephalie

Das Wort Brachyzephalie leitet sich von den beiden griechischen Wörtern *brachys* (kurz) und *kephalé* (Kopf) ab und kann somit mit dem Begriff „Kurzköpfigkeit“ übersetzt werden. In der evolutionären Entwicklung vom ursprünglichen Vorfahren dem Wolf (*Canis lupus*) hin zum jetzigen Hund als Haustier entwickelten sich, unter anderem durch die gezielte Selektion durch den Menschen, teils massive phänotypische Unterschiede zwischen den verschiedenen Hunderassen. Insbesondere beim Schädel findet man große Abweichungen in Bezug auf Form und Größe (Evans & DeLahunta, 2012). Während der Schädel eines Wolfes ungefähr 30 cm lang ist, variiert die Länge bei unseren heutigen Hunderassen zwischen 7 und 28 cm (McGreevy, Grassi & Harman, 2004). Ellenberger und Baum gliederten Hunderassen erstmalig in langköpfig (*dolichocephal*) oder kurzköpfig (*brachycephal*) ein und erwähnten auch eine Zwischenform, welche im Laufe der Zeit als *mesocephal* bezeichnet wurde. Der Hirnschädel von brachycephalen Hunden ist demnach kugelig und der von dolichocephalen Hunden wird als schmal beschrieben (Ellenberger & Baum, 2013). Es entwickelten sich weitere Messverfahren zur Einteilung in die drei Gruppen der Schädelformen auf die in Kapitel 2.3.1 näher eingegangen wird.

Wie der Begriff „Kurzköpfigkeit“ schon vermuten lässt, sind Schädel von brachycephalen Hunderassen durch eine starke Verkürzung der Schnauze und der darunterliegenden knöchernen Anteile gekennzeichnet. Der Schädel ist verkürzt, aber gleichzeitig verbreitert (Stockard, 1941; Evans & DeLahunta, 2012). Außerdem fällt anatomisch auf, dass der Hirnschädel gegenüber dem Gesichtsschädel vergrößert ist, die Augenhöhlen liegen weit auseinander, die Form des Gesamtschädels ist kugelig und gedrungen und die Crista sagittalis externa fehlt oder ist stark reduziert. Zudem findet man bei brachycephalen Hunden oft ein

Hechtgebiss (*Prognathia inferior*), das heißt der Unterkiefer ist länger als der Oberkiefer (König, 2012).



Abbildung 10: Schädel eines mesozephalen und brachyzephalen Hundes (Nöller et al. 2008). Links: Schädel eines Deutschen Schäferhundes (mesozephal); rechts: Schädel eines Pekinesen (brachyzephal).

Neben den Veränderungen am knöchernen Hundeschädel hat die Brachyzephalie auch Auswirkungen auf die Morphologie des Gehirns, welches vom Neurokranium umgeben wird. Das Gehirn brachycephaler Hunde ist am rostralen und kaudalen Pol abgerundet. Die Position des Riechkolbens ist deutlich nach ventral verlagert (Seiferle, 1966). Anhand von MRT Bildern konnte gezeigt werden, dass eine Verkürzung der Schädelänge in Relation zur Schädelbreite, also eine brachyzephal Schädelform, mit einem Abkippen der longitudinalen Gehirnnachse (gemessen als längste Strecke zwischen dem rostralen Punkt des Lobus frontalis und dem kaudalen Punkt des Lobus occipitalis) nach rostral und einer ventralen Verlagerung des Riechkolbens (*Bulbus olfactorius*) korreliert (Roberts *et al.*, 2010). Zudem wurde in einer Studie von Pilegaard et al. (2017) anhand von MRT Ausmessungen eine negative Korrelation zwischen dem kranialen Index (Quotient aus maximaler Breite zu maximaler Länge des Neurokraniums) und dem Verhältnis von kortikalem zu ventrikulärem Hirnvolumen festgestellt. Brachyzephal Rassen bei denen der kraniale Index hoch ist, also der Schädel im Verhältnis breiter als lang ist, haben ein geringeres Kortextvolumen, wenn man dieses im Verhältnis zum ventrikulärem Volumen setzt (Pilegaard *et al.*, 2017).

Die Selektion auf Brachyzephalie beim Hund erfolgte ursprünglich um züchterisch eine hohe Beißkraft zu erzielen (Ellis *et al.*, 2009). Durch die runde Schädelform und die großen, herausstehenden Augen entsteht ein kindliches Aussehen, welches mit ein Grund für die hohe und immer weiter ansteigende Beliebtheit von

brachyzephalen Rassen ist (Nöller *et al.*, 2008). Die Beibehaltung von juvenilen Merkmalen beim adulten Tier bezeichnet man als Paedomorphose und entstand durch Domestikation und Selektion (Goodwin *et al.*, 1997).

Als brachyzephal werden unter anderem folgende Hunderassen eingestuft: Boston Terrier, Boxer, Brussels Griffon, Bull Terrier, Mops, Shih Tzu, Bulldogge, Französische Bulldogge, Japan Chin, Pekinese, Chihuahua und Malteser. Der Cavalier King Charles Spaniel wurde anhand von zephalometrischen Messungen, die anhand von computertomographischen Bildern erstellt wurden, erst später der Gruppe der brachyzephalen Hunde zugeordnet (Schmidt *et al.*, 2011).

Brachyzephalie existiert nicht nur beim Hund. Auch bei einigen Katzenrassen, wie zum Beispiel der Perserkatze, wurde gezielt auf Kurzköpfigkeit gezüchtet (Wastlhuber *et al.* 1991). Beim Menschen wird die Brachyzephalie immer als pathologischer Zustand angesehen, der durch einen verfrühten Schluss von bestimmten Schädelfugen entsteht. Vor allem eine bilaterale Kraniosynostose der Suturae coronales führt phänotypisch zur Brachyzephalie. Einige syndromale Kraniosynostosen wie das Apert-, Pfeiffer- oder Saethre-Chatzen-Syndrom gehen mit Kraniosynostosen der coronalen Suturen und damit auch mit einer Brachyzephalie einher (Rice, 2008).

Im Gegensatz zum Menschen wurde beim Hund der brachyzephal Schädeltyp bisher nicht als pathologische Entwicklung des Schädels betrachtet. Man ist der Meinung, dass es sich dabei um eine physiologische Variationsbreite im Rahmen von züchterischen Idealvorstellungen handelt. Vor allem aufgrund der gesundheitlichen Probleme, die mit der Brachyzephalie einhergehen, hat sich diese Wahrnehmung allerdings im Laufe der letzten Jahre verändert (Kapitel 2.3.4).

2.3.1 Kranimetrie – Einteilung der Schädeltypen

Wie schon erwähnt stammt die erste Einteilung in langköpfige (dolichocephale), intermediäre (mesozephal) und kurzköpfige (brachyzephal) Hunde von Ellenberger und Baum aus dem Jahr 1891. Diese Einteilung bezog sich auf das Verhältnis von Hirnschädel zu Gesichtsschädel und schloss des Weiteren die Ausbildung der Crista sagittalis externa als Merkmal mit ein (Brehm *et al.*, 1985).

Im Verlauf schlossen sich einige morphometrische und allometrische Studien an und es wurden weitere daraus abgeleitete Indizes (Messzahlen) entwickelt, die als Grundlage für die Einteilung in die drei Gruppen der Schädelformen des Hundes dienten. Für eine einheitliche Messung bei allen Hunderassen wurden definierte anatomische Messpunkte am knöchernen Schädel festgelegt. Diese dienten als Grundlage für Längen- und Breitenmessungen (Tabelle 2 und Abbildung 11) (Evans & DeLahunta, 2012).

Tabelle 2: Kranio-metrische Messpunkte am Schädel (modifiziert nach Evans, 1993).

Messpunkt	Erklärung
Inion	Höchster Punkt der Protuberantia occipitalis externa
Bregma	Kreuzungspunkt der Sutura sagittalis und Sutura coronalis
Nasion	Punkt, an dem die beiden Suturae nasofrontales zusammenlaufen
Prosthion	rostrales Ende der Sutura interincisiva
Basion	mittig des ventralen Randes des Foramen magnum
Zygion	der äußerste Punkt des Gesichtsschädels
Euryon	der lateralste Punkt der Schädelkapsel

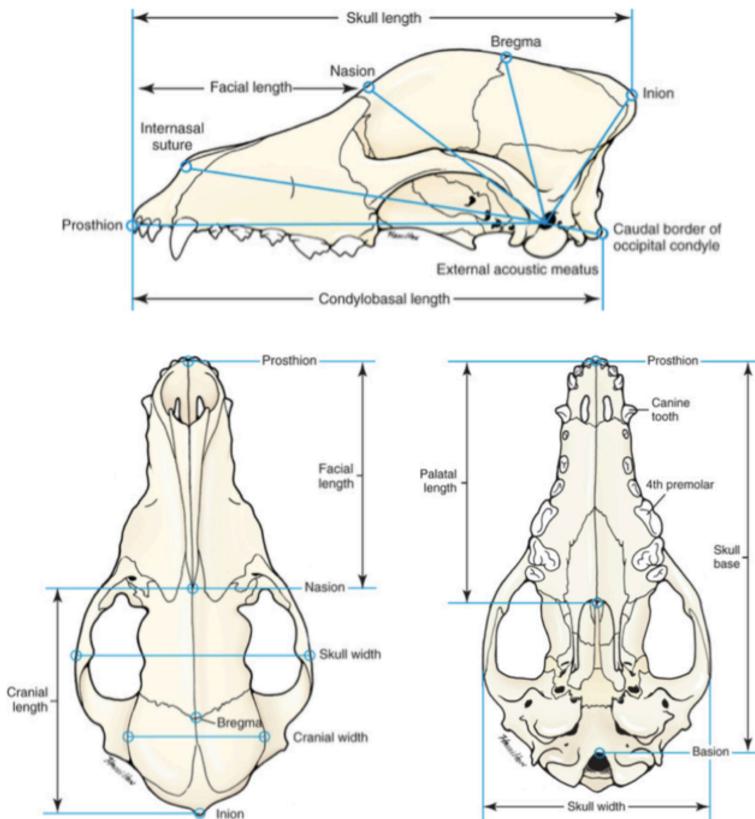


Abbildung 11: Kraniometrische Messpunkte am Hundeschädel (modifiziert nach Evans, 1993). Oben: laterale Ansicht, unten links: dorsale Ansicht, unten rechts: ventrale Ansicht

Brehm (1985) führte Messungen an präparierten Hundeschädeln durch und bildete daraus Indizes zur Charakterisierung der Schädelform. Ein Verhältnis von Hirnkapsellänge zur Gesichtsschädelänge (sogenannter Längen-Längen-Index 2) von über 1,60 wurde für brachycephale Rassen ermittelt (Brehm *et al.*, 1985).

Evans (1993) definierte den Schädel-Index (skull-index) als die maximale Breite des Schädels (größter Abstand zwischen den beiden Arcus zygomaticus) multipliziert mit 100 in Relation zu seiner maximalen Länge (Abstand zwischen Prosthion und Inion). Des Weiteren wurden der kraniale und der faziale Index etabliert. Dabei kann man einen hohen kranialen Index (Quotient aus maximaler Breite zu maximaler Länge

des Neurokraniums) mit einem hohen Grad an Brachyzehalie in Zusammenhang bringen (Evans & DeLahunta, 2012).

Regodón (1993) führte erstmalig eine Klassifikation anhand von Röntgenbildern durch und anhand dieser wurde der Kraniofaziale Winkel definiert. Dieser wird anhand einer Linie entlang der Schädelbasis (basilare Achse) und einer anderen Linie entlang des harten Gaumens (faziale Achse) bestimmt. Dabei gilt, dass der Kraniofaziale Winkel bei einer Verkürzung des Schädels, also bei brachycephalen Hunden, klein ist ($9 - 14^\circ$) und mit der Länge der Schädels größer wird, sodass meso- und dolichocephale einen Kraniofazialen Winkel größer als 19° haben (Regodón *et al.*, 1993).

Die unterschiedlichen Arten der Ausmessung des Schädels (anatomisch, fotografisch, radiografisch) führen allerdings dazu, dass die Zuordnung der Hunderassen zu der jeweiligen Schädelform teilweise voneinander abweicht. So gibt es zum Beispiel beim deutschen Schäferhund immer noch keine einheitliche Auffassung bezüglich der Einteilung zu dem entsprechenden Schädeltyp (Brehm *et al.*, 1985; Onar, 1999).

Eine Studie führte anatomische und röntgenologische Messungen an Schädeln toter Welpen im Alter von 0 bis 7 Tagen durch. Dabei wurden bereits etablierte Messmethoden aus der Literatur verwendet. Es konnte ein eindeutiger Unterschied zwischen brachycephalen und nicht-brachycephalen Rassen festgestellt werden: Lineare Messungen und anatomische Indizes wichen erheblich voneinander ab. Darüber hinaus konnte die Aussage getroffen werden, dass die kranio-metrischen Unterschiede zwischen den drei Schädeltypen (dolichocephal, mesozephal und brachycephal) größtenteils schon bereits bei neugeborenen Welpen existieren. Vor allem lineare Messungen können schon bei neugeborenen Welpen eine klare Einteilung in brachycephale und nicht-brachycephale Schädelformen gewährleisten. Radiografische Indizes waren hier den anatomischen Indizes überlegen (Andreis *et al.*, 2018).

2.3.2 Ursachen der Brachyzehalie

Bei anderen Spezies wie dem Rind, der Maus und dem Menschen besteht ein Zusammenhang zwischen einem frühzeitigem Verschluss der

Schädelbasissynchondrosen und einer faszialen Hypoplasie wie auch der Brachycephalie (Julian *et al.*, 1957; Chen *et al.*, 1999; Fitch, 1961; Cohen *et al.*, 1985).

Eine Brachycephalie bei Menschen wird vor allem durch einen bilateralen frühzeitigen Schluss der Suturæ coronales oder durch eine fehlerhafte enchondrale Ossifikation der Synchondrosen an der Schädelbasis ausgelöst (Cendekiawan *et al.*, 2010). Auch bei der Perser-Katze besteht der Verdacht einer Kraniosynostose der Sutura coronalis als Auslöser für die extreme Brachycephalie. Mithilfe von Mikro-CT-Aufnahmen konnte bei 4 bis 5 Wochen alten Kitten der Perser Katze die Sutura coronalis nicht mehr dargestellt werden, während sie bei mesozephalen Katzen im Vergleich noch bis zu einem Alter von 6 Monaten nachweisbar war (Schmidt *et al.*, 2017).

Auch beim Hund spielt die Schädelbasis eine große Rolle bei der Entstehung der Brachycephalie. Sowohl radiographische Studien als auch MRT-Studien an brachycephalen Hunden ließen vermuten, dass eine frühzeitige Ossifikation der Synchondrosen der Schädelbasis zu einem verminderten Längenwachstum und einer daraus resultierenden kompensatorischen Verbreiterung des Schädels führt (Carrera *et al.*, 2009; Rusbridge *et al.*, 2009). Das Längenwachstum der Schädelbasis wird maßgeblich durch die Synchondrosis sphenoccipitalis beeinflusst (Mao & Nah, 2004).

In einer MRT-Studie an 176 Hunden unterschiedlicher Rassen und Kopfformen konnte gezeigt werden, dass sich die Synchondrosis sphenoccipitalis bei brachycephalen Hunderassen früher schließt, als bei mesozephalen (Schmidt *et al.*, 2013).

Brachycephale Rassen haben einen signifikant höheren Anteil sich schließender Suturen und Synchondrosen ("closure score") im Vergleich zu anderen Rassen sowie dem Wolf. Außerdem konnte auch ein positiver Zusammenhang zwischen dem Maß an Airorhynchie (sein Winkel $> 180^\circ$ zwischen dem harten Gaumen und der Schädelbasis, was einer Rotation des Rostrums nach dorsal entspricht) und dem Verschluss der Synchondrosis intersphenoidalis und Suturen der Nase und des Gaumens bewiesen werden. Airorhynchie ist typisch für eine brachycephale Schädelform. Die Ergebnisse wurden anhand von makroskopischen Befunden an

knöchernen Schädeln erstellt. Insgesamt weisen die Ergebnisse der Studie auf eine bedeutsame Korrelation zwischen dem Verschluss von Suturen und Synchondrosen und der Schädelform hin (Geiger & Haussman, 2016).

Für drei Wachstumsfugen des Schädels konnte eine höhere Wahrscheinlichkeit für einen frühzeitigen Verschluss bei brachycephalen Hunderassen bewiesen werden (Farke, 2017). Dazu gehören die Sutura sphenofrontalis sinister, Sutura lamboidea dexter und die Synchondrosis interphenoidalis. Allerdings wird in dieser Studie auch darauf verwiesen, dass größere Fallzahlen und eine breitere Altersverteilung von Nöten sind und auch andere Schädelfugen gegebenenfalls mit Brachyzehalie in Verbindung stehen könnten (Farke, 2017).

Hinsichtlich der Ursache für die verfrühte Ossifikation der Schädelbasis existieren verschiedene Hypothesen. Bei den Rassen Chihuahua und Yorkshire Terrier soll der ateliotische Zwergenwuchs ursächlich sein, bedingt durch einen kongenitalen Mangel an Wachstumshormonen (Stockard, 1941). Bei anderen Rassen steht die Achondroplasie als Auslöser für die Brachyzehalie in der Diskussion. Allerdings findet sich hier eine gestörte enchondrale Ossifikation und somit auch eine fehlerhafte Knorpelbildung, vor allem an den langen Röhrenknochen und nicht nur an der Schädelbasis. Deshalb wird über eine lokale Form der Achondroplasie im Bereich der Wachstumsfugen der Schädelbasis diskutiert (Montavon et al. 2000). Weitere Krankheiten, die im Zusammenhang stehen könnten, sind die canine GM1-Gangliosidose und andere Speicherkrankheiten, wie die Mucopolysaccharidose Typ VII (Alroy et al., 1992; Haskins, 1991).

Zusätzlich wird auch eine Ursache auf molekularer und genetischer Ebene in Form einer Mutation für die kanine Brachyzehalie vermutet (s. Kapitel 2.3.3).

Insgesamt ist die Brachyzehalie bis jetzt nur ein Phänotyp, dessen ursprünglicher Auslöser bis heute nicht gefunden wurde. Zudem sind auch verschiedene Grundursachen möglich, sodass der Ursprung der Brachyzehalie bei einer Hunderasse nicht gleich für alle anderen Rassen zutreffen muss.

2.3.3 Genetik der Brachyzehalie

Während die große Bandbreite der Form des Hundeschädels bereits ausgiebig untersucht und beschrieben wurde, ist eine Identifikation der verursachenden

zugrundeliegenden Genvarianten erst vor einiger Zeit möglich geworden. Beim Hund wurde das Augenmerk vor allem auf den genetischen Hintergrund der Brachyzehalie gerichtet (Schoenebeck & Ostrander, 2013).

Um Kandidatengene für die Brachyzehalie beim Hund zu identifizieren, nutzte man bereits bekannte Gene der Maus und des Menschen, die einen ähnlichen brachyzehaligen Phänotyp hervorbrachten, also vergleichbare Merkmale mit der caninen Brachyzehalie aufwiesen. Dazu zählen zum Beispiel die Gene TCOF1, FRFR2c, MSX1 und MSX2. Beim Menschen stehen diese Gene in Verbindung mit angeborenen kranialen Malformationen. Einige Studien nutzten den phänotypischen Vergleich zwischen transgenen Mäusen mit gezielter Manipulation dieser Gene und unterschiedlichen brachyzehaligen Hunderassen. Anhand dieser Krankheitsmodelle konnten qualitative Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Schädelform verglichen werden (Bannasch *et al.*, 2010; Rizk, 2012).

Haworth (2001) untersuchte die codierende Sequenz von TCOF1 und konnte eine Korrelation zwischen einer Variante des TCOF1 Gens und einer brachyzehaligen Schädelform herstellen. Diese Entdeckung wurde aber bald darauf widerlegt, als mehr Hunderassen in die Untersuchungen einbezogen wurden (Haworth *et al.*, 2001b; Hünemeier *et al.*, 2009). Außerdem zeigten genetische Analysen, dass die Sequenz von MSX2 in verschiedenen Hunderassen stark konserviert ist und dass Variationen in dem Gen nicht zur Diversität der unterschiedlichen Schädelformen bei Hunderassen beitragen (Haworth *et al.*, 2001a).

Eine Studie zu Varianten des FGFR3 Gens bei Hunden, welches in Verbindung mit kaniner Chondrodysplasie steht, zeigte keine Abweichungen beim Vergleich von mesozehaligen Hunderassen und dem Boxer als Vertreter einer brachyzehaligen Rasse. Das FGFR3 Gen scheint demnach trotz des Druckes durch Domestikation und Selektion bei den verschiedenen Rassen erhalten geblieben zu sein (Smith *et al.*, 2008). Da allerdings nur ein Vergleich mit einer einzigen brachyzehaligen Rasse, dem Boxer, gezogen wurde, ist eine endgültige Aussage, die sich auf alle brachyzehaligen Rassen bezieht, nicht zu treffen. Denn es ist bislang nicht geklärt, ob unterschiedliche Formen der Brachyzehalie bei den verschiedenen Rassen existieren und somit auch ein unterschiedlicher genetischer Hintergrund als Ursache der Kurzköpfigkeit besteht (Rizk, 2012).

Durch genomweite Assoziationsstudien konnte das kanine Chromosom 1 (CFA1) mit Brachycephalie in Zusammenhang gebracht werden (Bannasch *et al.*, 2010). Genomweite Assoziationsstudien werden in der Genetik genutzt um einen bestimmten Phänotyp oder eine Krankheit mit bestimmten Allelen in Verbindung zu bringen. Dabei wird sich nicht auf spezifische Loci beschränkt. Eine statistische Testung soll eine Assoziation von einem Phänotyp und Allelen herstellen. Da die identifizierten Abschnitte auf der DNA somit nur das Ergebnis von Zahlenverhältnissen darstellen, ist ihre Rolle bei der Ausprägung des Merkmals oder Krankheitsentstehung fragwürdig. Sie müssen durch weitere Forschung auf ihre Relevanz geprüft werden (Power *et al.*, 2017).

Die Schädelform des Hundes wird laut Schoenebeck (2012) durch mindestens fünf Quantitative Trait Loci reguliert. Ein „Quantitative Trait Locus“ ist eine genomische Region, welche mit der Ausprägung eines quantitativen phänotypischen Merkmals in Zusammenhang steht. Diese seien für die skelettalen Unterschiede der Schädelform von brachycephal bis dolichocephal verantwortlich. Die Ergebnisse basieren ebenfalls auf genomweiten Assoziationsstudien. BMP3 ist auch eines der Gene, das durch eine genomweite Assoziationsstudie mit der kaninen Brachycephalie assoziiert wird. Durch DNA-Sequenzierung konnte außerdem eine „missense mutation“ im BMP3-Gen aufgedeckt werden, sodass eine signifikante Relation zwischen dieser Mutation im BMP3-Gen und brachycephalen Rassen besteht. Es konnte gezeigt werden, dass diese Mutation nahezu konstant bei extrem brachycephalen Rassen vorkommt (Schoenebeck *et al.*, 2012).

Des Weiteren wurde kürzlich das Gen SMOC2 auf dem kaninen Chromosom 1 in Zusammenhang mit Brachycephalie beim Hund gebracht. Dabei führt eine Dysfunktion von SMOC2 zu einer deutlich verminderten Genexpression bei brachycephalen Hunden. Auch dieses Gen steht somit auf der Liste potenzieller Gene, die für Brachycephalie verantwortlich sind und sollte bei weiteren Forschungsarbeiten als Ursache in Betracht gezogen werden (Marchant *et al.*, 2017).

In Zukunft wird bei der Suche nach der Ursache der Brachycephalie der genetische Hintergrund wohl weiter eine große Rolle spielen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte noch kein einzelnes Gen identifiziert werden, welches mit Gewissheit für die Brachycephalie beim Hund codiert.

2.3.4 Gesundheitliche Probleme im Zusammenhang mit Brachycephalie

Zuchtverbände von Hunderassen machen Vorgaben zu äußerlichen Merkmalen der Rasse, die in den jeweiligen Rassestandards festgehalten werden. Bei vielen Zuchtverbänden wie beispielsweise dem „Kennel Club“ oder dem „American Kennel Club“ stehen in den Rassestandards von brachycephalen Rassen auch Angaben zur Länge der Schnauze. Bei Rassen wie dem Mops, der französischen Bulldogge, der Bulldogge oder dem Pekinesen werden die Schnauzen stets als „kurz“ beschrieben (Packer *et al.*, 2015). Auch in Deutschland schreibt der Rassestandard des FCI (Fédération Cynologique Internationale) Nr. 253 für den Mops einen „*ziemlich kurzen* Fang“ vor (FCI Standard Nr. 253, Mops).

Leider hat die Brachycephalie für betroffene Hunderassen oft auch gesundheitliche Konsequenzen. Dazu gehört vor allem das sogenannte brachycephale Atemnotsyndrom. Dieses konnte schon bei über zehn brachycephalen Rassen festgestellt werden (Packer *et al.*, 2012). Klinisch zeigen betroffene Hunde Stridor, Schnarchen, Husten, Leistungsschwäche, Hitzeintoleranz, Hyperthermie, Apnoe im Schlaf und angestrengte Atmung bis hin zum Kollaps. Ursächlich sind die anatomischen Veränderungen, die mit der Kurzköpfigkeit einhergehen und zu Atemnot führen. Zu den Missbildungen gehören stenotische Nasenlöcher, ein zu langer weicher Gaumen, eine relative Conchenhypertrophie und Makroglossie. Durch den daraus resultierenden erhöhten Luftwiderstand entstehen sekundäre Probleme wie Ödeme, Schwellungen, Eversion der Tonsillen bis hin zum Larynxkollaps (Meola, 2013; Packer *et al.*, 2015; Mackensen *et al.*, 2017; Roedler *et al.*, 2013). Das pharyngale Weichteilgewebe, wie der weiche Gaumen, Zunge und Tonsillen, haben sich nicht proportional mit dem Schädel verkleinert. So können die Atemwege durch überschüssiges Weichteilgewebe verlegt werden (Köhler *et al.*, 2016; Packer *et al.*, 2015). In einer Studie wurde die Gaumensegeldicke von mesozephalen und brachycephalen Hunden anhand von sagittalen CT-Bildern verglichen und es wurde festgestellt, dass das Gaumensegel brachycephaler Hunde im Durchschnitt mehr als doppelt so dick ist (Köhler *et al.*, 2016). Auch intranasale Missbildungen in Form von einer abnormen Konfiguration der Nasenmuscheln (Conchae nasales) wurde mittels CT dargestellt (Oechtering *et al.*, 2018). Zusätzlich ist auch die Thermoregulation bei brachycephalen Hunden durch die kurze Nase deutlich eingeschränkt (Davis *et al.*, 2017; Mackensen *et al.*, 2017).

Eine weitere gesundheitliche Folge, die mit der extremen Schädelform einhergeht, sind Ulzera der Cornea. Grund dafür sind unter anderem die flachen Augenhöhlen und die dadurch hervorstehenden Augen mit exponierter Cornea, ein ungenügender Lidschluss durch große Augenlideröffnungen und Trichiasis bedingt durch Nasenfalten (Mackensen *et al.*, 2017). Es besteht ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Brachyzephalie und dem Risiko für ein Hornhautulkus. Hiervon sind brachyzephaler Hunde mit einem kraniofasziales Verhältnis von $< 0,5$ im Vergleich zu mesozephalen Hunden zwanzigmal so häufig betroffen (Packer *et al.*, 2015).

Des Weiteren besteht ein Zusammenhang zwischen Brachyzephalie und gastrointestinales Störungen wie zum Beispiel Erbrechen, Regurgitation und Hypersalivation. Endoskopisch waren distale Ösophagitis und diffuse Entzündung von Magen und Duodenum die häufigsten Befunde (Meola, 2013). Durch eine chirurgische Therapie des Brachyzephalen Atemnotsyndroms konnte auch eine Verbesserung der gastrointestinales Beschwerden erreicht werden (Poncet *et al.*, 2006).

Ein Hydrozephalus internus scheint im Zusammenhang mit einer Brachyzephalie zu stehen und kommt insbesondere bei kleinen brachyzephalen Rassen vor (Biel *et al.*, 2013; Selby *et al.*, 1979; de Stefani *et al.*, 2011; Shihab *et al.*, 2011).

Verglichen mit mesozephalen und dolichocephalen Rassen ist die durchschnittliche Lebenserwartung bei brachyzephalen Rassen in etwa drei Jahre kürzer (Liu *et al.*, 2017).

In Deutschland sind diese gesundheitlichen Probleme, die im Zusammenhang mit der Brachyzephalie stehen, auf dem 27. Deutschen Tierärztertäg thematisiert worden. Es wurde die Arbeitsgruppe „Qualzuchten“ der Bundestierärztekammer gegründet, an der fünf tierärztliche Verbände beteiligt sind. Daraufhin ist eine „Broschüre zur Aufklärung über das brachycephale Syndrom“ entstanden. Diese enthält unter anderem eine Checkliste, mit deren Hilfe man erkennt, ob es sich um ein Tier handelt, das durch die Brachyzephalie leidet. Als gesetzliche Grundlage dient der Paragraph 11b des Tierschutzgesetzes. Außerdem wurde eine „Entscheidungshilfe für Amtstierärzte“ zur „Beurteilung der Qualzuchtausprägungen beim Brachycephalen Hund“ erstellt (Mackensen *et al.*, 2017).

2.4 Ziel der Studie

Ziel der hier durchgeführten Studie ist eine morphologisch-histologische Beschreibung der Schädelwachstumsfugen des Hundes im Alter von 1 bis 4 Monaten. Insbesondere die Darstellung der Osteoklasten, Kollagenfasern, Blutgefäße und apoptotischen Zellen soll eine Deskription auf zellulärer Ebene ermöglichen.

Wie bereits erwähnt stellen beispielsweise das Maß an Apoptose oder auch Osteoklasten wichtige Stellschrauben für den Schluss einer Sutura dar und stehen somit im Zusammenhang mit der Verknöcherung. Ihre Darstellung ist wichtig, um die physiologische Morphologie und Entwicklung der Schädelwachstumsfugen bei Hunden unterschiedlicher Schädeltypen zu beschreiben und zu definieren.

Nach ausführlicher Literaturrecherche ist diese Studie die erste, die Schädelwachstumsfugen des Hundes so umfangreich histologisch, enzym- und immunhistochemisch untersucht. Aus diesem Grund soll diese Arbeit einen Grundstein für die weitere Forschung im Bereich der Schädelwachstumsfugen des Hundes legen.

Anhand der gewonnenen Erkenntnisse und Daten werden in Zukunft auch Vergleiche zwischen Hunden verschiedener Rassen oder unterschiedlichen Alters möglich sein. Brachycephale Rassen und Rassen, die häufig an einem Hydrozephalus erkranken, sind hier von besonderem Interesse. Bei diesen Tieren ist die Forschung an Schädelwachstumsfugen möglicherweise auch eine wichtige Grundlage für den Tierschutz.

3 Material und Methoden

3.1 Histologische Schnittpräparate

3.1.1 Zur Verfügung stehendes Probenmaterial

Die bereits in Paraffinblöcken eingebetteten Schädelwachstumsfugen stammen von meso- und brachyzephalen Hunden unterschiedlicher Rassen und beider Geschlechter im Alter von 1 bis 4 Monaten (28 bis 126 Tage) (Tabelle 3). Von den 14 untersuchten Hunden handelt es sich bei vier Tieren um brachyzephalie Rassen. Dazu zählen der Zwergspitz, der Mops und der Chihuahua. Die restlichen 10 Tiere haben eine mesozephalie oder dolichocephale Kopfform. Bei zwei der untersuchten Hunde war eine Vorerkrankung in Form eines Hydrozephalus bekannt.

Die Schädelwachstumsfugen wurden aus Schädeln von Hunden entnommen, welche aus medizinischen Gründen euthanasiert wurden oder verstorben sind. Danach wurden sie in 8% Formaldehyd-Lösung (Formalin) eingelegt und fixiert. Für die Studie wurden fünf Suturen ausgewählt. Diese sind die Sutura interfrontalis (SInt), Sutura sagittalis (SSag), Sutura coronalis (SCor), Sutura squamosa (SSqu) und die Sutura lambdoidea (SLam) (Tabelle 4). Die drei letztgenannten Suturen sind am Schädel paarig angelegt, sodass jeweils eine Sutura auf der linken und auf der rechten Schädelhälfte existiert. In dieser Studie wurde wahlweise die linke oder die rechte der beiden Suturen ausgewählt. Teilweise konnte bei der Entnahme der Suturen aus dem Schädelknochen nur eine Seite so entnommen werden, dass eine Auswertung möglich war. In diesen Fällen bestand keine Wahlmöglichkeit mehr. Waren beide Suturen vorhanden und auswertbar, wurde eine beliebige Wahl getroffen.

Tabelle 3: Daten der Hunde, deren Suturen untersucht wurden.
Aufgeführt sind die Patientennummer, die Hunderasse, das Alter in Tagen, das Geschlecht, bekannte Vorerkrankungen und die Kopfform. M = Männlich, W = Weiblich, nb = nicht bekannt.

Patienten Nr.	Rasse	Alter (Tage)	Geschlecht	Vorerkrankung	Kopfform
1	Dackel	35	nb	nb	mesozephal
2	Collie	84	W	nb	dolichozecephal
3	Jack Russel Terrier (JRT)	84	nb	nb	mesozephal
4	West Highland White Terrier (WHWT)	35	W	nb	mesozephal
5	Beagle	98	W	nb	mesozephal
6	Mischling mesozephal (Mmeso)	112	W	nb	mesozephal
7	Deutscher Schäferhund (DSH)	112	M	nb	mesozephal
8	Deutscher Schäferhund (DSH)	126	nb	nb	mesozephal
9	Mischling mesozephal (Mmeso)	112	nb	nb	mesozephal
10	Golden Retriever (GR)	28	W	Hydrozephalus	mesozephal
11	Mops	84	nb	nb	brachyzecephal
12	Mops	56	M	Hydrozephalus	brachyzecephal
13	Chihuahua	84	nb	nb	brachyzecephal
14	Zwergspitz	70	nb	nb	brachyzecephal

Tabelle 4: Untersuchte Suturen und ihre zugehörigen Knochen.

Abkürzung	Sutur	Beteiligte Schädelknochen
SInt	Sutura interfrontalis	Ossa frontalis
SCor	Sutura coronalis sinister/dexter	Os frontale und Os parietale
SSag	Sutura sagittalis	Ossa parietales
SSqu	Sutura squamosa sinister/dexter	Os temporale und Os parietale
SLam	Sutura lambdoidea sinister/dexter	Os occipitale und Os parietale

Von den insgesamt 14 Hunden konnten teilweise nicht alle fünf der untersuchten Suturen ausgewertet werden, da in den histologischen Proben keine Sutur innerhalb der entnommenen Schädelprobe nachzuweisen war. Insgesamt konnten 58 Suturen mit den verschiedenen Färbungen und Methoden untersucht werden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Probenhunde nach vorhandenen zu untersuchenden Suturen.**V = Suture zur Auswertung vorhanden, X = keine Suture zur Auswertung vorhanden**

Patienten Nr.	Rasse	SInt	SCor	SSag	SSqu	SLam
1	Dackel	X	V	V	V	X
2	Collie	V	V	V	V	V
3	Jack Russel Terrier	V	V	V	V	V
4	West Highland White Terrier	V	V	V	V	V
5	Golden Retriever	V	V	V	V	V
6	Beagle	V	V	V	V	V
7	Mischling mesozephal	V	V	V	V	V
8	Deutscher Schäferhund	V	V	V	V	V
9	Deutscher Schäferhund	V	X	V	V	V
10	Mischling mesozephal	V	V	V	V	X
11	Mops	V	X	V	V	V
12	Mops	V	V	V	X	X
13	Chihuahua	V	X	V	V	V
14	Zwergspitz	X	X	X	V	X

3.1.2 Anfertigung von histologischen Paraffin-Schnitten

Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (Leica RM2255) wurden von jedem Paraffinblock der eingebetteten Schädelwachstumsfugen Gewebeschnitte in Serie angefertigt. Die Schnittstärke betrug 6 bis 7µm. Die Schnitte wurden in einem warmen Wasserbad entfaltet und anschließend auf Objektträger aufgezogen. Jeder Objektträger enthielt 2 bis 3 Einzelschnitte. Es wurden besonders gut haftende Objektträger (Thermo Scientific™ SuperFrost Ultra Plus™ Adhäsionsobjektträger) benutzt, um ein Abschwimmen der Schnittpräparate bei weiteren Bearbeitungsschritten zu verhindern. Die Schnitte wurden zum Trocknen über Nacht in einen Brutschrank von 37°C gelegt.

3.1.2.1 Entparaffinierung und Rehydrierung

Um die Schnitte für histologische und enzym- oder immunhistochemische Färbungen nutzen zu können, musste das Paraffin entfernt werden. Xylol löste das Paraffin und die absteigende Alkoholreihe sorgte für eine Rehydrierung des Gewebes. Dies geschah in 6 Schritten in der jeweils angegebenen Zeitdauer.

1. Xylol 8 Minuten
2. Xylol 8 Minuten
3. Ethanol 100% 3 Minuten
4. Ethanol 96% 3 Minuten
5. Ethanol 70% 3 Minuten
6. Aqua destillata (dest.) 1 Minute

3.1.3 Histologische Färbungen

3.1.3.1 Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Die Schnitte wurden nach Standardmethode mit Masson-Goldner-Trichrom gefärbt. Diese Färbemethode eignet sich besonders gut zur selektiven Darstellung von kollagenen Fasern und Bindegewebe. Kerne färben sich braunschwarz, Zytoplasma, Fibrin und Muskulatur rot, Erythrozyten rot-orange und Kollagen grün bzw. blau. Mineralisierte Hartgewebematrix wie Knochen stellt sich ebenfalls leuchtend grün dar, während Osteoid eine rote Färbung annimmt (Lang, 2006).

3.1.3.2 Piko-Siriusrot-Färbung

Die Piko-Siriusrot-Färbung wird zur Färbung von Kollagen angewendet. Lichtmikroskopisch stellen sich Kollagenfasern rot, Muskelgewebe, Zytoplasma und der Hintergrund gelblich dar. Sirius Rot ist ein starker anionischer Farbstoff, dessen Sulfonsäuren mit basischen Gruppen der Kollagenmoleküle reagieren. Da auch andere basische Gruppen mit dem Farbstoff reagieren, ist er nicht spezifisch für Kollagen. Die Spezifität wird erst durch die Kombination mit der Polarisationsmikroskopie erreicht, dabei entsteht die für die Färbung typische Doppelbrechung. Eine Kombination der Piko-Siriusrot-Färbung und der Polarisationsmikroskopie gilt als die sensitivste Methode um Kollagenfasern zu

detektieren und ist anderen gängigen Färbemethoden mit Trichromen überlegen (Constantine & Mowry, 1968; Junqueira *et al.*, 1979). Früher sprach man der Picro-Siriusrot-Färbung eine Unterscheidbarkeit von verschiedenen Kollagentypen abhängig von ihrer Farbe unter polarisiertem Licht zu. Eine gelb-rote Doppelbrechung wurde Kollagen Typ 1 und eine grünlichen Farbe Kollagen Typ 3 zugeordnet (Junqueira *et al.*, 1979; Montes *et al.*, 1991). In anderen Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass die Färbung unter polarisiertem Licht lediglich von der Faserdicke und -anordnung abhängig ist (Lattouf *et al.*, 2014; Rich & Whittaker, 2005). Unstrittig ist, dass die Färbung eine einfache, sensitive und spezifische Methode ist, um die Anordnung, Organisation und unterschiedliche Orientierung der Kollagenfasern deutlich zu machen. Zusätzlich kann die Menge des Kollagengehalts von normalen oder pathologischen Geweben ermittelt werden (Lattouf *et al.*, 2014).

3.1.3.3 Picro-Siriusrot-Färbeprotokoll

1. Entparaffinieren und absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest. (Kapitel 3.1.2.1)
2. Picro-Sirius Red (von Clin-Tech) für 60 Minuten
3. 1%ige Essigsäure für 10 Sekunden
4. Spülen mit Aqua dest. für 1 Minute
5. Aufsteigende Alkoholreihe
 - Ethanol 70% für 2 Minuten
 - Ethanol 96% für 2 Minuten
 - Ethanol 100% für 2 Minuten
 - 2x Xylol für 5 Minuten
6. Eindecken mit Eukitt®

3.1.4 Enzymhistochemische Färbung

Bei der Enzymhistochemie (EHC) werden Enzymaktivitäten lokalisiert und elektiv Gewebestrukturen dargestellt (Lang, 2006). Die darzustellenden Enzyme reagieren mit der Färbelösung zu unlöslichen Farbstoffen. Da spezielle Enzyme meist von bestimmten Zelltypen synthetisiert werden, kann die Anzahl und Lokalisation dieser Zelltypen ermittelt werden (Böcker *et al.*, 2012).

3.1.4.1 TRAP-Methode

Osteoklastische Zellen werden mithilfe eines Markerenzym, der tartratresistenten sauren Phosphatase (Tartrate resitant acid phosphatase = TRAP), angefärbt. Osteoklasten produzieren TRAP, um kollagene Knochenmatrix abzubauen. Durch diese Resorption entstehen die typischen, in der Histologie sichtbaren Howship-Lakunen (Reinholt *et al.*, 1990).

3.1.4.1.1 TRAP-Färbelösung

- 35 mg Naphthol AS-TR-Phosphat Disodium Salt in 125µl N-N-Dimethylformamid (DMF) lösen
- 57,5 mg Natriumtartrat
- 35 mg Echtrotsalz (Fast Red TR Salt)
- 25 ml 0,1M Natriumacetatpuffer

Die Komponenten wurden gut gemischt und bei 4°C für 12 Stunden stehen gelassen. Die Farbe der Lösung wechselt dabei von gelblich zu rötlich. Die Färbelösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.1.4.1.2 TRAP-Färbeprotokoll

Zum Nachweis von Osteoklasten in den Schädelfugen des Hundes wurden diese mit der TRAP-Methode sichtbar gemacht.

1. Entparaffinieren und absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest. (Kapitel 3.1.2.1)
2. Na-Acetatpuffer 10 Minuten (oder länger)
3. Trocknen der Objektträger mit Softtuch
4. Umranden der Proben mit PAP-Pen
5. TRAP Lösung filtrieren (2µm Filter)
6. TRAP Lösung auf die Proben bringen bis zu 60 Minuten bei 37°C in feuchter Dunkelkammer
7. Aqua dest. 3x mal kurz spülen
8. Eindecken mit Roti®-Mount Aqua

3.1.5 Immunhistochemische Färbung

Bei der Immunhistochemie sollen geknüpfte Antigen-Antikörper-Komplexe durch eine Immundetektion sichtbar gemacht werden. Dabei werden bestimmte Strukturen,

wie beispielsweise Proteine oder Nukleinsäuren, unter Einsatz von markierten Antikörpern nachgewiesen und lokalisiert. Die Affinität und Bindung des Antikörpers an ein Epitop innerhalb eines bestimmten Proteins ist dabei entscheidend. Um die Affinität zu erhöhen, müssen Gewebeschnitte einer Vorbehandlung unterzogen werden (3.1.5.1).

Die Immunlokalisation erfolgt durch die Kopplung des Antikörpers mit einem Detektionssystem. Hierbei unterscheidet man zwischen einer direkten und indirekten Immunmarkierung. Bei der direkten Immunmarkierung ist der an das nachzuweisende Protein bindende Antikörper mit einem Detektionssystem gekoppelt und man kann diesen direkt im Gewebe nachweisen. Wenn an den primären Antikörper erst ein zweiter (Sekundärantikörper) binden muss, welcher detektiert wird, dann handelt es sich um eine indirekte Immunmarkierung. Die Bindung des Sekundärantikörpers an den antigenspezifischen Primärantikörper erfolgt an seinem F_c-Fragment. Durch die Bindung von mehreren sekundären Antikörpern kann das Signal verstärkt werden und somit eine Sensitivitätssteigerung erzielt werden. Allerdings steigt mit der Anzahl der verwendeten Antikörper auch die Gefahr der unspezifischen Bindungen, welche zu einer potentiellen unspezifischen Hintergrundfärbung führen kann (Schmitz & Desel, 2018; Luttmann *et al.*, 2014).

Auch bei den Detektionssystemen zum visuellen Nachweis der Lokalisation der Antigen-Antikörper-Komplexe gibt es unterschiedliche Methoden. Man unterscheidet die Detektion eines Fluorophors oder eines farbigen präzipitierenden Reaktionsprodukts. Bei beiden entstehen durch die Aktivität der Markerenzyme, welche an die Antikörper gebundenen sind, unlösliche Produkte.

Das konjugierte Markerenzym Meerrettich-Peroxidase (horseradisch peroxidase, HRP) benutzt Wasserstoffperoxid (H₂O₂) als Substrat. Nach der Umsetzung von H₂O₂ und der Oxidation von Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) entsteht ein dunkelbraunes unlösliches Präzipitat, das die Lokalisation des Antigens sichtbar macht (Schmitz & Desel, 2018).

Ein weiteres Detektionssystem zum Nachweis von Antigenen ist die ABC (Avidin-Biotin-Complex)-Methode. Avidin aus Hühnereiweiß hat eine hohe Affinität zu dem Vitamin Biotin. Eine Alternative zu Avidin stellt Streptavidin aus *Streptomyces avidinii* dar, welches etwas sensitiver ist. Bei der ABC-Methode wird nach dem

Primärantikörper und einem folgenden biotinylierten Sekundärantikörper schließlich ein tertiärer Enzym-tragender Komplex auf die Probe aufgetragen. Letzterer ist ein mit Avidin oder Streptavidin verbundenes Markerenzym, welches dann mit dem biotinylierten Sekundärantikörper einen (Strept)Avidin-Biotin-Enzym-Komplex bildet. Die Visualisierung erfolgt über ein farbloses chromogenes Substrat, welches von dem Enzym umgesetzt wird und somit ein farbiger Niederschlag in direkter Nähe zum Antigen entsteht (Abbildung 12). Das Substrat AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) bildet ein rotes Endprodukt (Schmitz & Desel, 2018; Luttmann *et al.*, 2014).

Einfluss auf die Qualität der Färbungen nehmen unter anderem die Verdünnung, Inkubationszeit und Temperatur. Das Austesten der verschiedenen Einflussgrößen wie beispielsweise der Antikörperkonzentration ist dabei unerlässlich.

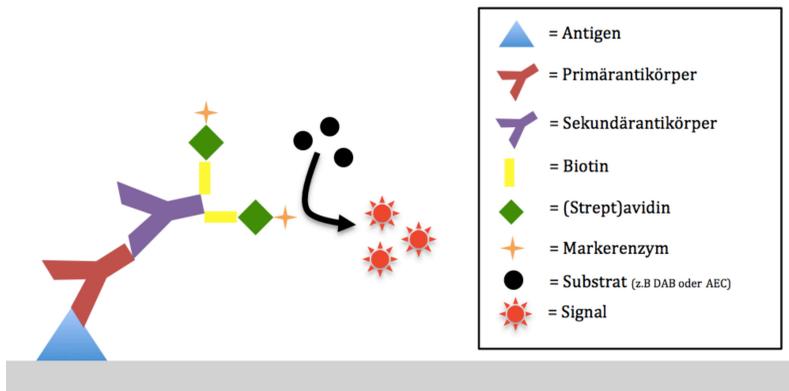


Abbildung 12: Schema der ABC-Methode zur Immundetektion.

Der (Strept)avidin-Biotin-Enzym-Komplex bindet an biotinylierten Sekundärantikörper. Das zugegebene Substrat wird von dem Markerenzym umgesetzt und es entsteht ein farbiges Signal.

3.1.5.1 Vorbehandlung

3.1.5.1.1 Epitop-Demaskierung

Um eine erfolgreiche Immundetektion bei den formalinfixierten Schnitten zu gewährleisten bedarf es einer Epitop-Demaskierung, auch Antigen-Retrieval genannt. Die Formalinfixierung führt zu einer Quervernetzung von Proteinen, welche als Maskierung bezeichnet wird. Diese Quervernetzungen müssen aufgebrochen werden, da es andernfalls zu einer unzureichenden Antigenität der Proteine kommen

kann. Eine Epitop-Demaskierung kann man durch Hitzeeinwirkung zum Beispiel in Wasserbädern oder Mikrowellen erreichen oder durch proteolytische Enzyme. Das Ziel ist die Anzahl an immunreaktiven Epitopen zu erhöhen (Luttmann *et al.*, 2014).

3.1.5.1.2 Blockierung endogener Enzyme

Im Präparat vorhandene endogene Enzyme können unspezifische Signale und somit falsch positive Ergebnisse erzeugen. Aus diesem Grund wurde vor der Immunlokalisation die endogene Enzymaktivität der Peroxidase durch H₂O₂ blockiert (Luttmann *et al.*, 2014).

3.1.5.2 Kontrollen

Bei den immunhistochemischen Färbungen ist es wichtig Kontrollen durchzuführen, um die Spezifität der immunhistologischen Färbung zu prüfen. Falsche Konzentrationen oder pH-Werte und auch fehlende oder falsche Waschschrte können zu unspezifischen Signalen führen, die unabhängig von den Antigen-Antikörper-Bindungen auftreten (Schmitz & Desel, 2018).

Es wurde für jede Probe eine Negativkontrolle mitgeführt, um unspezifische und unerwartete Färbungen beurteilen zu können und zusätzlich eine bessere Interpretation der spezifischen Färbung an der Antigenstelle zu ermöglichen. Für die Negativkontrollen wurde das gesamte Protokoll ohne die Zugabe des Primärantikörpers durchgeführt. Stattdessen wurde Pufferlösung auf die Proben gegeben.

3.1.5.3 Von-Willebrand-Faktor-Färbung

Der von-Willebrand-Faktor (vWF) ist ein Glykoprotein, welches eine entscheidende Rolle bei der Hämostase spielt. Die Expression des von-Willebrand-Faktors ist gewebespezifisch. Er wird ausschließlich in Endothelzellen, Megakaryozyten und Thrombozyten gebildet und durch Sekretion in die Zirkulation abgegeben. Der vWF vermittelt die Adhäsion der Thrombozyten an die Gefäßwand, die Thrombozytenaggregation und fungiert als Trägerprotein für den Faktor VIII (Ruggeri, 2003; Vischer, 2006). Aufgrund der Gewebespezifität und der Expression in der subendothelialen Matrix von Blutgefäßen ist der vWF ein geeigneter Marker um immunhistochemisch Blutgefäße darzustellen.

3.1.5.3.1 Von-Willebrand-Färbeprotokoll

Zum Nachweis von Blutgefäßen in der Schädelnaht von Hunden wurden diese immunhistochemisch mithilfe eines Antikörpers, der gegen den vWF reagiert, angefärbt.

1. Entparaffinieren und absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest. (Kapitel 3.1.2.1)
2. Enzymatische Vorbehandlung mit Proteinase K 5 µg/ml (60 µl in 50 ml PBS-Puffer (Phosphat-gepufferte Salzlösung)) für 30 Minuten bei 37°C
3. Blockieren der endogenen Peroxidase: 5ml 30%iges H₂O₂ in 50ml PBS-Puffer für 10 Minuten
4. 3 x 3 Minuten Waschen mit PBS-Puffer
5. Permeabilisierung in Blockpuffer: 1 g Bovines Serumalbumin (BSA) + 70ml PBS für 30 Minuten
6. Trocknen der Objektträger mit Softtuch
7. Umranden der Proben mit PAP-Pen
8. Aufbringen des Primärantikörpers (PAK) in einer Verdünnung von 1:250 und 1 Stunde bei 37°C inkubieren
 - PAK: Polyclonal Rabbit, Anti-Human, Von Willebrand Factor, Code A0082 von Dako
9. 3 x 3 Minuten Waschen mit PBS-Puffer
10. Aufbringen des Sekundärantikörpers (SAK) in einer Verdünnung von 1:200 und 30 bis 45 Minuten bei 37°C inkubieren
 - SAK: Polyclonal Goat Anti-Rabbit biotinyliert, Code E0432 von Dako
11. 3 x 3 Minuten Waschen mit PBS-Puffer
12. Inkubation mit ABC Kit von Vectastain® für 30 Minuten
13. 3 x 3 Minuten Waschen mit PBS-Puffer
14. Entwickeln mit Peroxidase Substratkit AEC für 10 bis 15 Minuten
15. Spülen mit Aqua dest. 3 x für 5 Minuten
16. Eindecken mit Roti®-Mount Aqua

3.1.5.4 TUNEL-Methode

Die TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase- mediated dUTP nick end labeling)-Methode ermöglicht die immunhistochemische Darstellung von apoptotischen Zellen, indem sie DNA-Strangbrüche detektiert und sichtbar macht.

Bei der TUNEL-Methode handelt es sich um eine Immunoperoxidase Färbung. Der typische Ablauf einer kontrollierten Apoptose (Kapitel 2.2.10) geht mit einer Fragmentierung des Zellkerns (Karyorrhesis), bei der die DNA durch Endonukleasen abgebaut wird, einher. Durch die DNA-Fragmentierung entstehen DNA-Bruchstücke, welche die Basis der TUNEL-Methode darstellen. Durch die Strangbrüche entstehen freie Hydroxygruppen (3'-OH Endungen), die enzymatisch mit markierten Nucleotiden gekennzeichnet werden. Das Enzym terminale Desoxyribonucleotidyltransferase (TdT) fügt dabei Nucleotide an das freie 3'-OH Ende von doppel- oder einzelsträngiger DNA. Diese Nucleotide sind ihrerseits mit Digoxigenin markiert und können somit von anti-Digoxigenin-Antikörpern gebunden werden, welche wiederum mit einem Peroxidase-Detektions-Molekül konjugiert sind. Durch die Zugabe von chromogenen Substraten wie DAB (Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) entsteht durch die gebundenen Antikörper-Peroxidase-Konjugate eine sichtbare Färbung, die eine lichtmikroskopische Detektion der apoptotischen Zellen ermöglicht.

Die Methode erkennt apoptotische Zellen schon in der Frühphase, in der eine Kondensation des Chromatins bereits stattgefunden hat und nur eine geringe Anzahl an Strangbrüchen festzustellen ist. Dabei müssen lichtmikroskopisch noch keine morphologischen Veränderungen des Zellkerns stattgefunden haben.

Normale oder proliferierende Zellen, bei denen nur eine geringfügige Anzahl an freien 3'-OH-Endungen festzustellen ist, werden mit dieser Methode normalerweise nicht angefärbt (Gavrieli *et al.*, 1992; Migheli *et al.*, 1995).

3.1.5.4.1 TUNEL-Färbeprotokoll

Zum Nachweis von apoptotischen Zellen in der Schädelfuge von Hunden wurde das ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit der Firma Merck Millipore verwendet. Dieses basiert auf der oben beschriebenen TUNEL-Methode.

Als Positivkontrolle diente Lymphknotengewebe eines Hundes. Dabei wurde bei der mikroskopischen Auswertung darauf geachtet, dass positiv gefärbte Zellen auch typische mikroskopische Anzeichen der Apoptose aufwiesen.

Für die Negativkontrollen wurde anstatt des Tdt Enzyms nur Pufferlösung auf die Proben gegeben.

1. Entparaffinieren und absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest. (Kapitel 3.1.2.1)
2. Enzymatische Vorbehandlung mit Proteinase K 5µg/ml (60µl in 50ml PBS-Puffer (Phosphat-gepufferte Salzlösung)) für 30 Minuten bei 37°C
3. Blockieren der endogenen Peroxidase: 5ml 30%iges H₂O₂ in 50ml PBS-Puffer für 10 Minuten
4. 3 x 3 Minuten Waschen mit PBS-Puffer
5. Trocknen der Objektträger mit Softtuch
6. Umranden der Proben mit PAP-Pen
7. Inkubation mit unverdünntem Equilibrations Buffer für 5 Minuten
8. Inkubation mit Tdt Enzym für 1 Stunde bei 37°C
 - Verdünnung Tdt Enzym 1:20 mit Reaction Buffer
9. Waschen in 1,5ml Stop/Wasch Buffer + 50ml Aqua dest. für 10 Minuten
10. 3 x 3 Minuten Waschen mit PBS-Puffer
11. Inkubation mit unverdünntem Anti-digoxigenin-Conjugate für 30 Minuten
12. 3 x 3 Minuten Waschen mit PBS-Puffer
13. Entwickeln mit DAB für 5 Minuten
14. Spülen mit Aqua dest. 3 x für 5 Minuten
15. Eindecken mit Roti®-Mount Aqua

3.2 Datenerhebung

3.2.1 Morphometrische Analyse

3.2.1.1 Kategorisierung der Suturen

Die mit Masson-Goldner-Trichrom gefärbten Schnitte der Suturen wurden dazu verwendet den Verlauf der Suture durch den Knochen von ekto- nach endokraniel zu beschreiben. Hierbei wird zwischen einer End-zu-End Suture und einer

überlappenden Suturen unterschieden. Von einer End-zu-End Suture wird gesprochen, wenn das ekto- und endokraniale Ende der Suture jeweils auf einer Höhe liegen und somit eine gedachte Linie, welche beide Enden verbindet, rechtwinklig zu den ekto- und endokranielen Knochenoberflächen liegt. Liegen die beiden Enden der Suture nicht auf einer Höhe, dann wird diese als überlappende Suture definiert (Abbildung 13).

Zum Anderen wurde unterschieden, ob die Suture von ekto- nach endokraniel geradlinig oder gekrümmt verläuft. Entspricht der Verlauf der Suture einer geraden Linie vom einen zum anderen Ende, wird von einer „gerade gestreckten“ Suture gesprochen. Ist dies nicht der Fall und die Suture hat einen regelmäßigen oder unregelmäßigen gekrümmten Verlauf vom einem zum anderen Ende, dann wird von einer verzahnten Suture gesprochen (Abbildung 13).

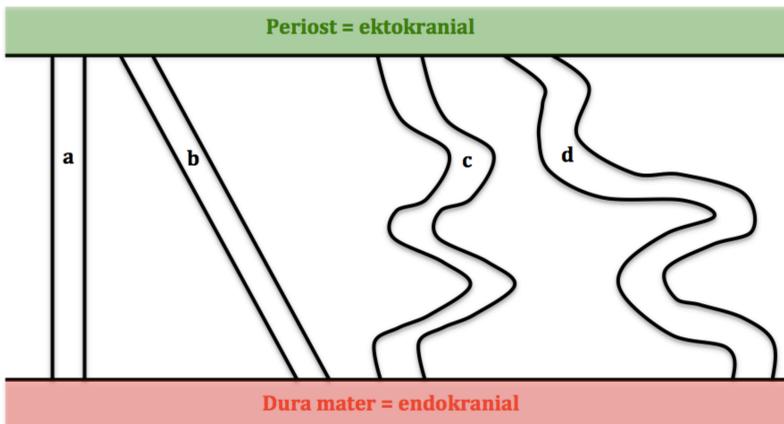


Abbildung 13: Verlauf der Suturen.

a = End-zu-End, gerade gestreckt; b = überlappend, gerade gestreckt; c = End-zu-End, verzahnt; d = überlappend, verzahnt

3.2.1.2 Vermessung der Suturen

Die Suturen wurden in ihrer Länge und Breite vermessen (Abbildung 14) und anschließend wurde rechnerisch die Fläche ermittelt.

Die Länge einer Suture wird über die Länge einer Linie definiert, die der zentralen Struktur von ekto- zu endokraniel folgt. Die Länge der Suture wurde zudem ins Verhältnis zur Höhe der Schädelkalotte gesetzt, welche das innen liegende Gehirn

und seine es umgebenden Hirnhäute (endokraniel) von der außen liegenden Kopfhaut (ektokraniel) abgrenzt. Die Breite einer Suture wird als Abstand zwischen den zwei aneinandergrenzenden Schädelknochen, die die Suture bilden, definiert. Da die Breite innerhalb einer Suture mehr oder weniger stark divergierte, wurden Messungen alle 100µm entlang der Länge der Suture vorgenommen, sodass die Anzahl der Messungen von der Länge der Suture abhing. Anschließend wurde ein Mittelwert berechnet und eine durchschnittliche Breite angegeben.

Aus der gemessenen Länge und der durchschnittlichen Breite der Suture ließ sich die durchschnittliche Fläche der Suture berechnen.

Die Länge und Breite der Suture konnte nur bestimmt werden, wenn die entnommenen Schädelstücke beide an der Suture beteiligten Schädelknochen beinhalteten, welches nur bei richtiger Schnitfführung durch die Paraffinblöcke gegeben war.

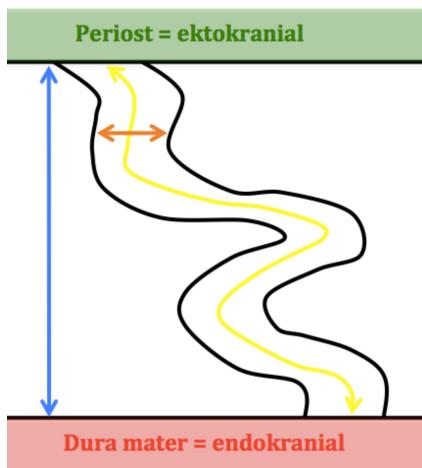


Abbildung 14: Höhe und Breite der Suturen.
Orangener Pfeil = Breite der Suture; gelber Pfeil = Länge der Suture; blauer Pfeil = Höhe der knöchernen Schädelkalotte

3.2.2 Deskription der Kollagenfasern

Durch die Kombination der Piko-Siriusrot-Färbung mit der Polarisationsmikroskopie kann die Orientierung der Kollagenfasern in den Schädelfugen der untersuchten Hunde veranschaulicht werden. Diese Tatsache ermöglicht eine Deskription des

Kollagens in den untersuchten Suturen. Es wurde jeweils die gesamte Suture angeschaut, um einen Gesamteindruck des Faserverlaufes zu bekommen. Es wurden die Anordnung, Organisation und die unterschiedliche Orientierung der Kollagenfasern innerhalb der Suturen beschrieben.

3.2.3 Detektion von osteoklastischen Zellen

Bei den mit der TRAP-Methode gefärbten Suturen wurden die Osteoklasten innerhalb der Suture ausgezählt und die Anzahl der Osteoklasten pro Suture ins Verhältnis zur Fläche der Suture gesetzt. Außerdem wurde die räumliche Anordnung der Osteoklasten innerhalb der Suture beschrieben. Es erfolgte auch eine regionale Einteilung der Suturenränder. Dabei wurde unterschieden, ob die Osteoklasten in geraden, konkaven oder konvexen Anteilen der Suture zu finden waren (Abbildung 15).

Zusätzlich wurden Osteoklasten, die sich außerhalb der Suture im angrenzenden Schädelknochen befinden mit einbezogen. Es wurden drei beliebige, sich nicht überlappende Gesichtsfelder innerhalb des Knochens, zu den zwei Seiten der Suture betrachtet. Anhand der Anzahl der gezählten Osteoklasten pro Gesichtsfeld wurde semiquantitativ ein Score erstellt.

Die Beurteilung der Osteoklastenmenge im angrenzenden Knochen erfolgte bei 100facher Gesamtvergrößerung nach folgendem Score:

0 = keine Osteoklasten

1 = 1 – 5 Osteoklasten

2 = 6 – 12 Osteoklasten

3 = 13 oder mehr Osteoklasten

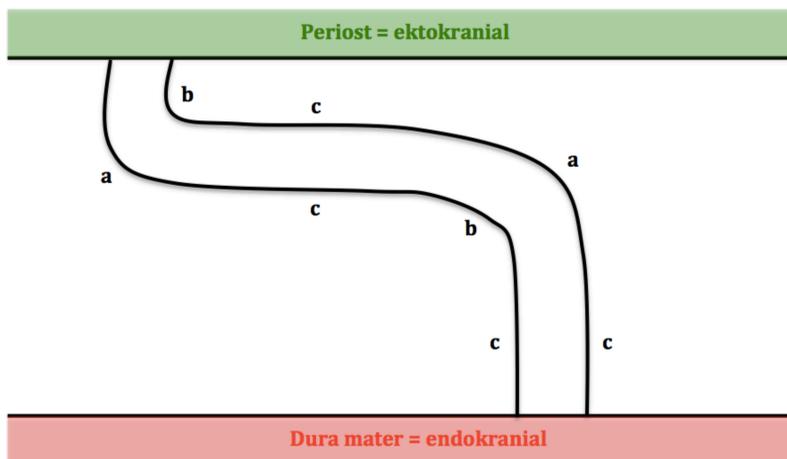


Abbildung 15: Regionen der Suturränder für die räumliche Anordnung innerhalb der Suturen.
a = konkav, b = konvex, c = gerade

3.2.4 Detektion von Blutgefäßen

Bei den Schnitten der immunhistologischen vWF-Färbung wurden die Anschnitte der Blutgefäße innerhalb der Suturen ausgezählt und die Anzahl ins Verhältnis zur Fläche der Suturen gesetzt. Zudem wurde die räumliche Anordnung der Blutgefäße innerhalb der Suturen beschrieben.

Eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Typen an Blutgefäßen (Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venolen, Venen) erfolgte nicht. Der Grund ist die teils starke Farbreaktion, welche eine präzise Unterscheidung nicht mehr ermöglicht.

3.2.5 Detektion von Apoptose

Die mit der TUNEL-Methode gefärbten Schnitte der Suturen wurden hinsichtlich ihrer apoptotischen Zellen ausgewertet. Zuerst wurde die Gesamtzellzahl innerhalb der Suturen bestimmt. Anschließend wurden die apoptotischen Zellen ausgezählt und ihr Anteil an der Gesamtzellzahl in Prozent angegeben. Zusätzlich erfolgte eine Deskription der räumlichen Verteilung der Apoptose innerhalb der Suturen.

3.3 Bildbearbeitung und Auswertung

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit dem optischen Mikroskop *Leica DM2500 LED*. Die mikroskopischen Bilder wurden über die Mikroskop Kamera *Leica DMC 4500* auf einen Computer übertragen und visualisiert. Für die qualitative Auswertung und fotografische Dokumentation wurde die Mikroskopsoftware *Leica LAS X*, eine Imaging und Analyse Software für Weitfeldmikroskope, benutzt. Die Bilder wurden in ihrem Kontrast, der Helligkeit und der Farbsättigung bearbeitet, sodass der Eindruck, welcher sich beim Mikroskopieren ergeben hat, auf dem Bildschirm angepasst wurde. Dabei wurden keine Bildinformationen hinzugefügt oder entfernt.

Die semiquantitative Auswertung erfolgte teilweise mit der Mikroskopsoftware *Leica LAS X*. Mit dieser erfolgte sowohl die fotografische Dokumentation als auch einige Messungen, wie zum Beispiel die Länge und Breite der Sutur.

Für Zellzählungen wurde die Open Source Image Processing Software *FIJI*, Version 2.0.0, verwendet (Schindelin *et al.*, 2012). Dazu wurde mit Hilfe der Software ein Schwellenwert (threshold) definiert, ab dem ein Bildpunkt als belichtet gezählt wird. Durch dieses Schwellenwertverfahren entsteht ein Binärbild, auf dem nur noch definierte Bildpunkte, die über dem Threshold-Wert liegen, dargestellt werden. Der Schwellenwert wurde sowohl für die Gesamtzellzahl als auch für die TUNEL-positiven Zellen innerhalb der Sutur bestimmt. Mit Hilfe einer Analysefunktion der gleichen Software wurden die gesuchten Bildpunkte automatisch gezählt.

4 Ergebnisse

4.1 Altersverteilung

Das Alter der Studienteilnehmer, bei denen eine Untersuchung der Suturen vorgenommen wurde, liegt zwischen 28 und 126 Tagen.

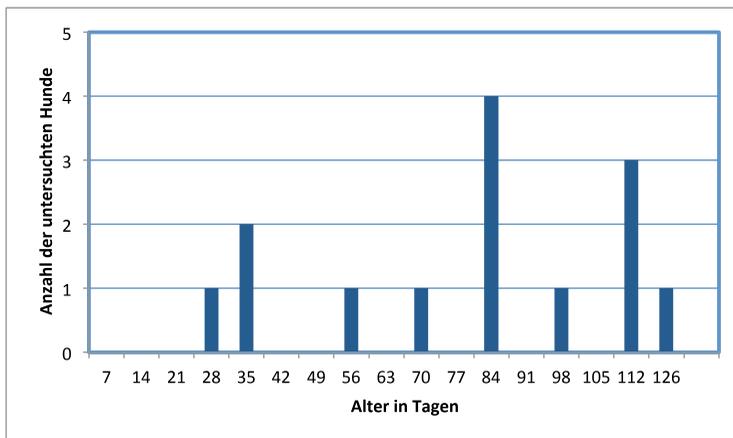


Abbildung 16: Säulendiagramm zur Darstellung der Altersverteilung der Studienteilnehmer.

4.2 Morphometrische Analyse

4.2.1 Kategorisierung der Suturen

Von den 58 Suturen konnten 46 hinsichtlich ihrer Morphologie untersucht werden. Der Verlauf der restlichen 12 Suturen konnte nicht in die Ergebnisse einfließen, da die Suturen nicht vollständig auf den Schnitten vorhanden waren und somit auch ihr Verlauf nicht dargestellt werden konnte.

Es konnten 11 Schnitte der Sutura interfrontalis, 8 Schnitte der Sutura coronalis, 12 Schnitte der Sutura sagittalis, 6 Schnitte der Sutura squamosa und 8 Schnitte der Sutura lambdoidea ausgewertet werden. Die Sutura interfrontalis, Sutura sagittalis und Sutura lambdoidea sind überwiegend End-zu-End Suturen (81,8%, 75%,

87,5%). Bei der Sutura squamosa handelt es sich immer um eine überlappende Sutura (100%) und die Sutura coronalis zeigt auch eine Tendenz zur Überlappung (Abbildung 17). Die Sutura interfrontalis ist immer verzahnt (100%), während die Sutura lambdoidea ausschließlich gerade gestreckt verläuft (100%). Bei den Sutura coronalis, Sutura sagittalis und Sutura squamosa konnte nur wenig Tendenz für einen bestimmten Sutura-Verlauf festgestellt werden. In geringem Maße überwiegen die verzahnten Suturen (Abbildung 18).

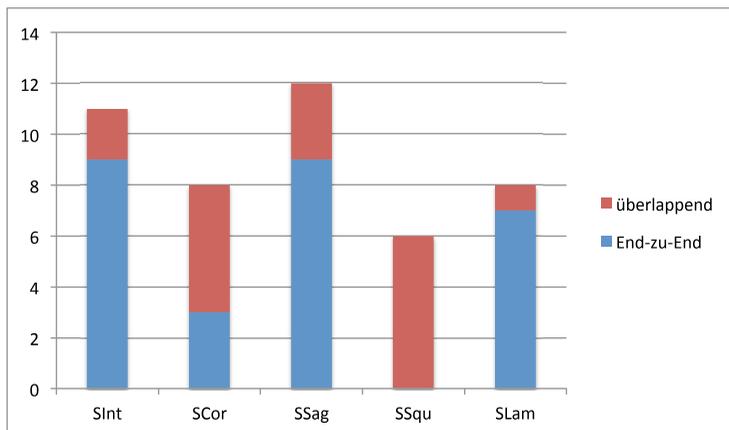


Abbildung 17: Säulendiagramm zur Darstellung der Häufigkeit einer überlappenden Sutura und einer End-zu-End Sutura bei den einzelnen Suturen.

Sint = Sutura interfrontalis, SCor = Sutura coronalis, SSag = Sutura Sagittalis, SSqu = Sutura squamosa und SLam = Sutura Lambdoidea.

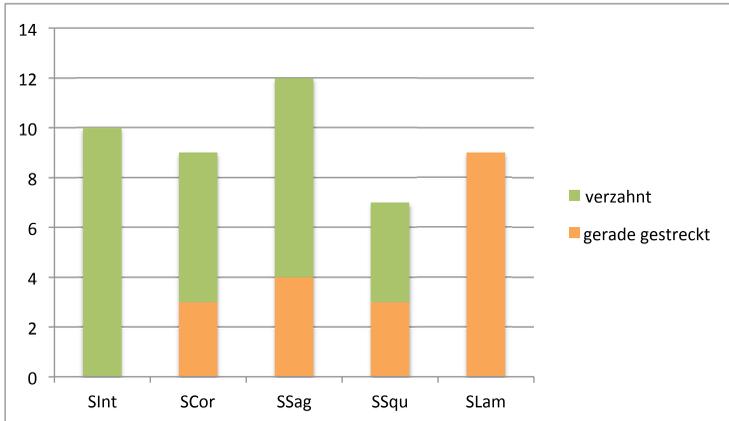


Abbildung 18: Säulendiagramm zur Darstellung der Häufigkeit einer verzahnten Sutura und einer gerade gestreckten Sutura bei den einzelnen Suturen. SInt = Sutura interfrontalis, SCor = Sutura coronalis, SSag = Sutura Sagittalis, SSqu = Sutura squamosa und SLam = Sutura Lambdoidea.

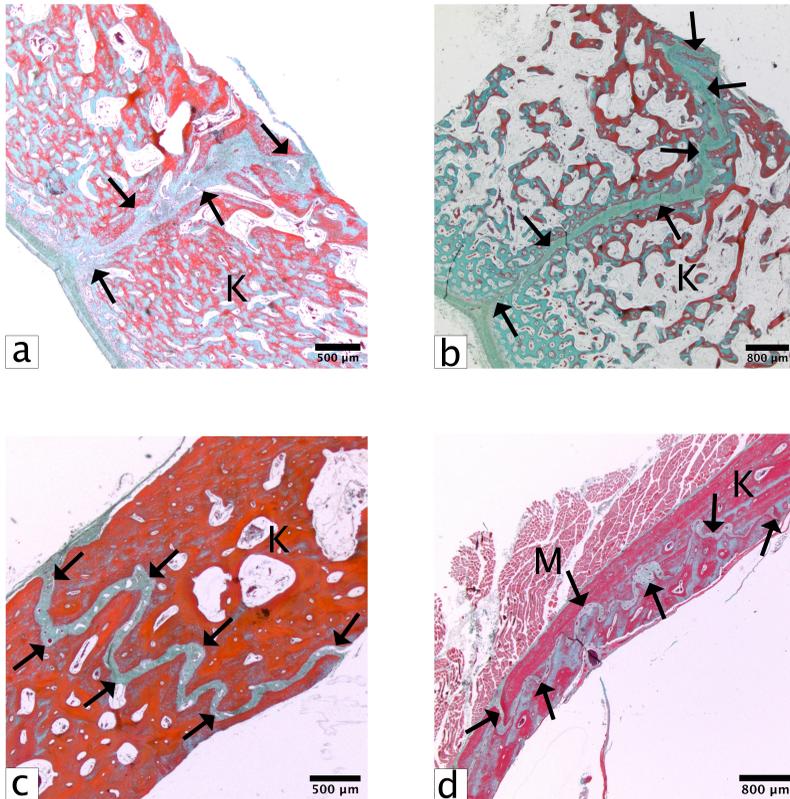


Abbildung 19: Histologische Schnittpräparate, Masson Goldner Trichrom Färbung, 1,25x.
 a) Hund 5, Beagle, 14 Wochen, Sutura sagittalis, End-zu-End Suture, gerade gestreckt. b) Hund 7, Deutscher Schäferhund, 4 Monate, Sutura interfrontalis, End-zu-End Suture, verzahnt. c) Hund 6, Mischling mesozephal, 16 Wochen, Sutura sagittalis, überlappende Suture, verzahnt. d) Hund 6, Mischling mesozephal, 16 Wochen, Sutura squamosa, überlappende Suture, verzahnt. Pfeile = Sutureverlauf K = Knochensubstanz, M = Muskulatur

Bei den zwei mit Hydrozephalus vorerkrankten Hunden ist eine besonders starke Verzahnung der Suturen aufgefallen. Dies zeigt sich vor allem durch lange, fingerartige, ineinandergreifende Knochenausläufer. Es lässt sich keine einheitlich verlaufende Knochenkante, die normalerweise durch die osteogenen Fronten gebildet wird, erkennen.

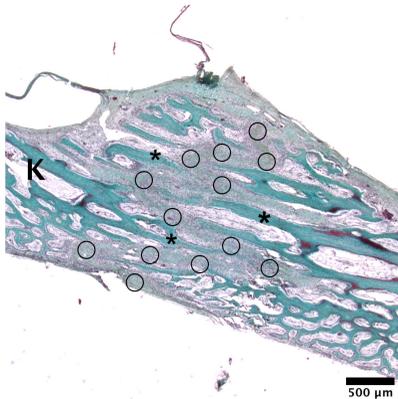


Abbildung 20: Histologisches Schnittpräparat, Masson Goldner Trichrom Färbung, 1,25x.
a) Hund 10, Golden Retriever mit Hydrozephalus, 4 Wochen, Sutura sagittalis, ausgeprägte Verzahnung der Suture. K = Knochen, Kreise = markieren den Suturverlauf, Sternchen (*) = Knochenausläufer.

4.2.2 Vermessung der Suturen

Die Länge der Suture konnte bei 44 Suturen ausgewertet werden. Auf den restlichen Schnitten waren die Suturen nicht vollständig, da nicht beide Enden der jeweiligen Suture enthalten waren. Die Längen der Suturen umfassen Werte von 506µm bis 12436µm. Die durchschnittliche Länge aller auswertbaren Suturen beträgt 4373,29µm. Die durchschnittlichen Längen ergaben für die Sutura interfrontalis 3873,21µm, die Sutura coronalis 4181,2µm, die Sutura sagittalis 4205,34µm, die Sutura squamosa 6238,2µm und die Sutura lambdoidea 4000,1µm (Abbildung 21).

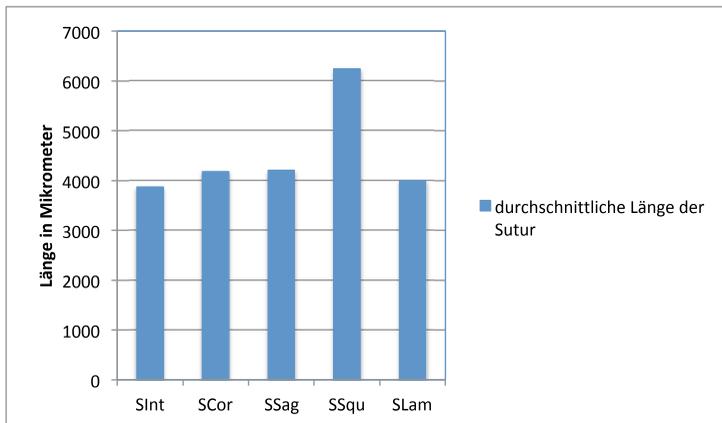


Abbildung 21: Säulengramm zur Darstellung der durchschnittlichen Länge der einzelnen Suturen.

SInt = Sutura interfrontalis, SCor = Sutura coronalis, SSag = Sutura Sagittalis, SSqu = Sutura squamosa und SLam = Sutura Lambdoidea.

Die durchschnittliche Breite der Suture konnte bei allen 58 Suturen vermessen werden und beträgt für alle Suturen im Schnitt 151,72 µm. Die Werte für die Breite der Suturen reichen von 54,8 µm bis 318,7 µm. Für die einzelnen Suturen konnten folgende Werte für die durchschnittliche Breite ermittelt werden: Sutura interfrontalis = 146,19 µm, Sutura coronalis = 173,59 µm, Sutura sagittalis = 148,12 µm, Sutura squamosa = 118,18 µm und Sutura lambdoidea = 188,46 µm.

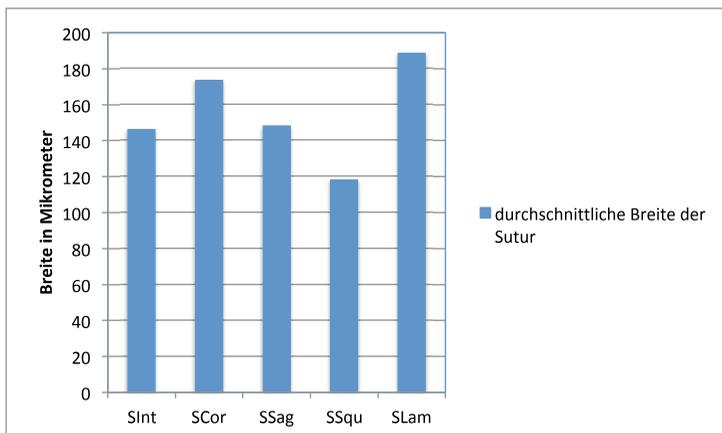


Abbildung 22: Säulengramm zur Darstellung der durchschnittlichen Breite der einzelnen Suturen.

Slnt = Sutura interfrontalis, SCor = Sutura coronalis, SSag = Sutura Sagittalis, SSqu = Sutura squamosa und SLam = Sutura Lambdoidea.

Die durchschnittliche Breite der Suturen aller brachycephalen Rassen (118,26 μm) war im Vergleich geringer als die der mesozephalen Rassen (164,18 μm).

Das Verhältnis von Länge zu Breite einer Sutura wurde bei 44 Suturen berechnet. Bei Betrachtung aller ausgewerteten Suturen ist eine Sutura im Durchschnitt 33,5 mal so lang wie sie breit ist. Für die einzelnen Suturen ergaben sich folgende Länge-zu-Breite-Verhältnisse: Slnt = 27,31, SCor = 25,26, SSag = 31,29, SSqu = 64,84 und SLam = 18,7.

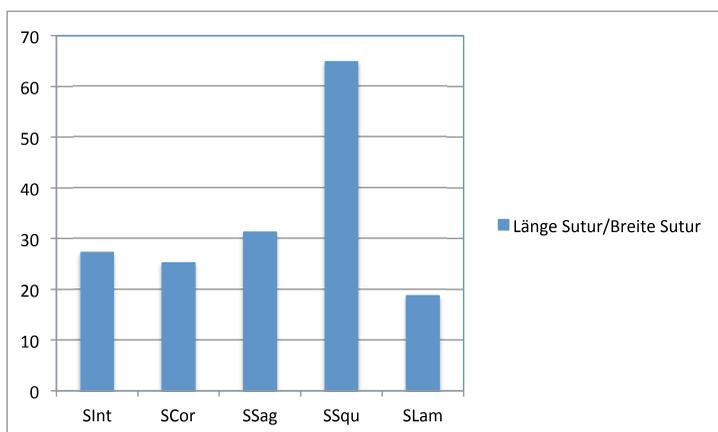


Abbildung 23: Säulendiagramm zur Darstellung des Verhältnisses von Länge zu Breite der Sutura bei den einzelnen Suturen.

Slnt = Sutura interfrontalis, SCor = Sutura coronalis, SSag = Sutura Sagittalis, SSqu = Sutura squamosa und SLam = Sutura Lambdoidea.

Die Dicke des Schädelknochens von ekto- nach endokranial auf Höhe der Sutura konnte bei allen Schnitten vermessen werden. Die durchschnittliche Dicke des Schädelknochens beträgt für alle 58 Suturen im Schnitt 2275,3 μm . Die Calvaria von kleineren Rassen hat eine geringere Dicke als die von größeren Rassen. So beträgt die durchschnittliche Dicke der Calvaria bei den beiden Schäferhunden jeweils knapp 4000 und knapp 5000 μm und die des Dackels und des Jack Russel Terriers dagegen 1080 μm und 1844 μm . Besonders gering ist die durchschnittliche Dicke der Calvarien beim untersuchten Chihuahua mit 560 μm .

Für alle Suturen, bei denen die Länge gemessen werden konnte (44 Suturen), wurde diese ins Verhältnis zur Länge der knöchernen Calvarien gesetzt. Das Verhältnis ergab für die SInt einen Wert von 1,67, für die SCor 2,64, für die SSag 1,94, für die SSqu 5,83 und für die SLam 1,18 (Abbildung 24).

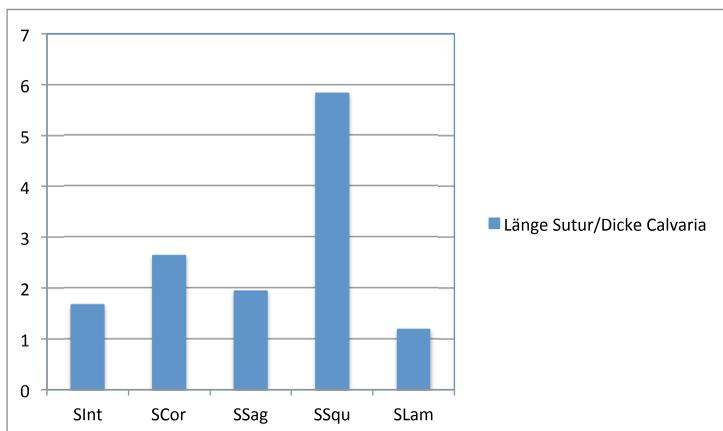


Abbildung 24: Säulendiagramm zur Darstellung des Verhältnisses zwischen der Länge der Suture und der Dicke der knöchernen Calvaria bei den einzelnen Suturen.

SInt = Sutura interfrontalis, SCor = Sutura coronalis, SSag = Sutura Sagittalis, SSqu = Sutura squamosa und SLam = Sutura Lambdaidea.

4.3 Deskription der Kollagenfasern

Bei der Betrachtung der Suturen, die mit Pikro-Siriusrot gefärbt wurden, wurde mithilfe der Polarisationsmikroskopie die Anordnung, Organisation und unterschiedliche Orientierung der Kollagenfasern deutlich. Es zeigt sich, dass innerhalb ein und derselben Suture je nach Region unterschiedliche Kollagenfaserausrichtungen existieren. Ist in einer Region ein überwiegend paralleler Faserverlauf zu den osteogenen Fronten zu erkennen, kann die gleiche Suture auch Areale mit ungeordnetem Faserverlauf haben.

Unverzahnte, gerade gestreckte Suturen haben vor allem parallel zu den osteogenen Fronten verlaufende Kollagenfasern. Dagegen zeigen verzahnte Suturen vermehrt eine unterschiedliche Orientierung der Kollagenfasern, welche aber an die Zugrichtungen der Kräfte angepasst zu sein scheint. Je stärker die Verzahnung, umso schräger sind die Fasern zu den Knochenfronten angeordnet.

Außerdem war immer wieder eine Verwebung der Kollagenfasern in alle drei Raumrichtungen zu vermerken. Diese ist in der Färbung nach Masson-Goldner-Trichrom nicht ersichtlich.

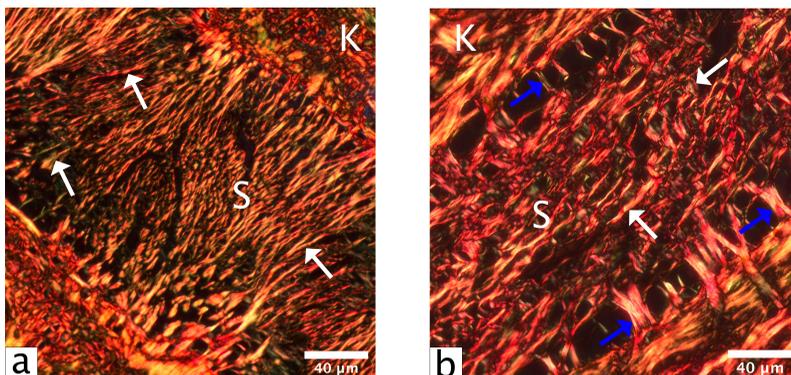


Abbildung 25: Histologische Schnittpräparate, Piko-Siriusrot-Färbung, 40x.

a) Hund 3, Jack Russel Terrier, 12 Wochen, Sutura coronalis, Verwebung der Kollagenfasern überwiegend im 90° Winkel zum Sutureverlauf. b) Hund 2, Collie, 12 Wochen, Sutura coronalis, Entesen strahlen im 90° Winkel in die Knochenfronten ein (blaue Pfeile). S = Sutura, K = Knochen, weiße Pfeile = Kollagenfasergeflecht

In unregelmäßigem Abstand strahlen ganze Kollagenfaserbündel in die angrenzenden Knochenfronten ein. Diese Bündel (Entesen) sind stets im 45° bis 90° Winkel zu den osteogenen Fronten ausgerichtet, wobei teilweise sogar ein überkreuzendes Einstrahlen beobachtet werden konnte (Abbildung 25).

4.4 Detektion von osteoklastischen Zellen

53 von den 58 untersuchten Suturen konnten mit der TRAP-Methode untersucht werden. Fünf Suturen zeigten eine so geringe Anfärbung, dass eine Auswertung nicht möglich war. Sechs weitere Schnitte wurden nur unter Vorbehalt ausgewertet, da auch hier nur eine schwache Anfärbbarkeit gegeben war.

In 10 der untersuchten Schnitte war innerhalb der Sutura kein einziger Osteoklast zu verzeichnen. Dies war bei 5 der 14 untersuchten Hunde der Fall, wobei alle 5 Hunde jeweils zwei Suturen ohne Osteoklasten aufwiesen. Es handelte sich zu fast gleichen Teilen um die SInt, SCor und SSag. In der SSqu und SLam waren immer Osteoklasten innerhalb der Sutura zu finden.

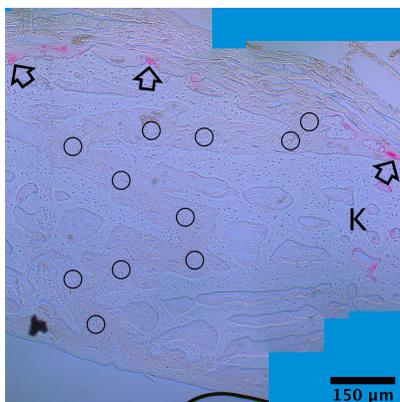


Abbildung 26: Histologisches Schnittpräparat, Färbung nach TRAP-Methode, 10x.

a) Hund 4, West Highland White Terrier, 5 Wochen, Sutura sagittalis ohne osteoklastische Aktivität. Kreise (O) markieren den Verlauf der Sutura, rötlich gefärbte Osteoklasten (↑) befinden sich lediglich am Rand der Lamina interna der Calvaria. K = Knochen. Hinweis zur Bilderstellung: Histologische Bildmontage aus mehreren Einzelbildern durch die Software Leica Application Suite (LAS), Live Image Builder.

Die Anzahl der Osteoklasten pro Quadratmikrometer Fläche einer Sutura unterschied sich teilweise bei ein und demselben Hund je nach Sutura erheblich. Auch die gleiche Sutura von unterschiedlichen Hunden zeigte sehr uneinheitliche Ergebnisse (Tabelle 6).

Tabelle 6: Anzahl der Osteoklasten pro μm^2 Suturafläche ($\text{OK}/\mu\text{m}^2$).

SInt = Sutura interfrontalis, SCor = Sutura coronalis, SSag = Sutura Sagittalis, SSqu = Sutura squamosa und SLam = Sutura Lambdoidea; n.a = nicht auswertbar

Patienten-Nr.	Rasse	SInt $\text{OK}/\mu\text{m}^2$	SCor $\text{OK}/\mu\text{m}^2$	SSag $\text{OK}/\mu\text{m}^2$	SSqu $\text{OK}/\mu\text{m}^2$	SLam $\text{OK}/\mu\text{m}^2$
1	Dackel		0	0	14,189	
2	Collie	0	1,598	17,033	1,395	22,596
3	Jack Russel Terrier	5,416	13,867	15,536	12,659	2,305
4	West Highland White Terrier	0	0	1,844	10,373	15,219
5	Beagle	39,515	7,235	38,919	n.a	9,435

6	Mischling mesozephal	9,269	0	0	20,121	5,640
7	Deutscher Schäferhund	4,768	n.a	4,010	n.a	n.a
8	Deutscher Schäferhund	67,017		51,500	n.a	15,045
9	Mischling mesozephal	6,833	3,583	0	7,936	
10	Golden Retriever	2,444	2,406	12,325	20,759	48,103
11	Zwergspitz				3,958	
12	Mops	69,829		44,691	16,091	17,503
13	Mops	0	0	4,925		
14	Chihuahua	0		0	9,731	6,203

Aus der Auswertung der Osteoklastenmenge außerhalb der Suture kann kein Schluss bezüglich der Menge der Osteoklasten innerhalb der Suture gezogen werden. Durch den definierten Score zur Beurteilung der Osteoklastenmenge außerhalb der Suture ließ sich feststellen, dass etwa bei der Hälfte aller untersuchten Suturen eine Übereinstimmung zwischen der Osteoklastenmenge innerhalb und außerhalb der Suture gegeben war. Für die andere Hälfte war allerdings das Gegenteil der Fall. Bei Suturen, die keine Osteoklasten enthielten, waren dennoch einige Osteoklasten in der angrenzenden Diploe zu finden.

Die räumliche Anordnung der Osteoklasten in der Suture ist durch die Physiologie der Osteoklasten bestimmt. Bedingt durch ihre Funktion, ist der überwiegende Anteil der Osteoklasten direkt am Knochen lokalisiert. In der Suture sind die Osteoklasten also vor allem an den osteogenen Fronten zu finden. Bei verzahnten Suturen mit mäanderförmigem Verlauf waren einige TRAP-positive Zellen auch in geraden Anteilen zu sehen. In Kurvenbereichen lässt sich der Großteil der Osteoklasten im konkaven Bereich finden. Außerdem lassen sich Ausbuchtungen, die oft mit einem Blutgefäß assoziiert sind, vermehrt Osteoklasten vermerken.

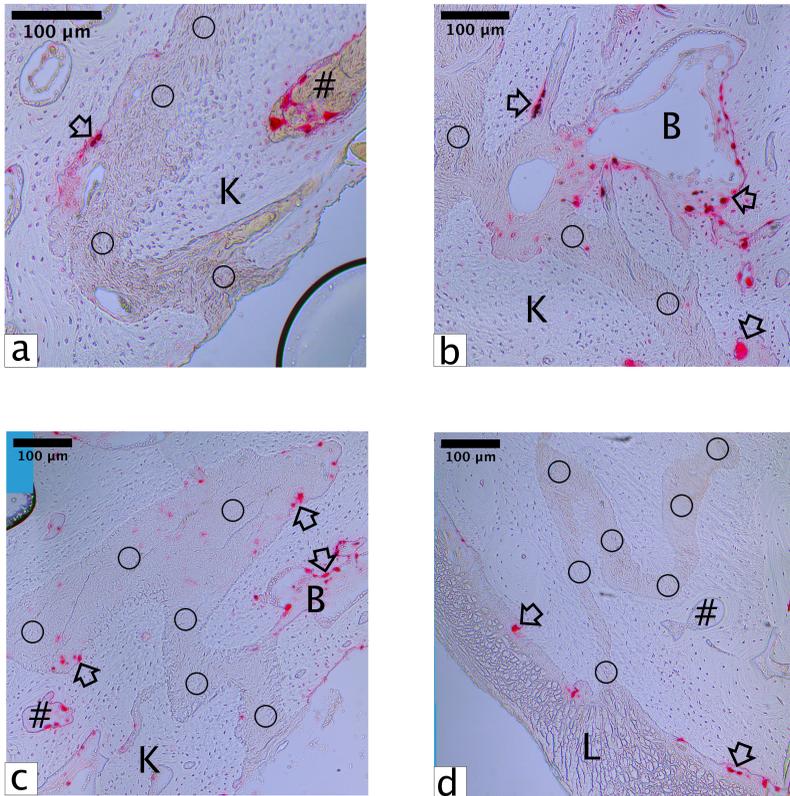


Abbildung 27: Histologische Schnittpräparate, Färbung nach TRAP-Methode, 10x.

a) Hund 2, Collie, 12 Wochen, Sutura interfrontalis. b) Hund 5, Beagle, 14 Wochen, Sutura interfrontalis. c) Hund 8, Deutscher Schäferhund, 4,5 Monate, Sutura squamosa. d) Hund 9, Mischling mesozephal, 16 Wochen, Sutura squamosa. Kreise (O) markieren den Verlauf der Sutur, rötlich gefärbte Osteoklasten (↑), K = Knochen. B = Blutgefäß, # = Blutgefäßkanal im Knochen, L = Lamina interna der Calvaria. Hinweis zur Bilderstellung: Histologische Bildmontage aus mehreren Einzelbildern durch die Software Leica Application Suite (LAS), Live Image Builder.

Darüber hinaus konnte bei 40 der 58 untersuchten Suturen ein erhöhtes Aufkommen von Osteoklasten am Rand der Lamina interna der Calvaria beobachtet werden. Die Osteoklasten reihten sich teils dicht an dicht dural entlang der äußeren Knochenkante. Auch hier zeigt sich keine Korrelation zur Osteoklastenmenge im Rest des Schnittes.

4.5 Detektion von Blutgefäßen

Es konnten 55 von den 58 untersuchten Suturen bezüglich ihrer Blutgefäße in der vWBF-Färbung ausgewertet werden. Die durchschnittliche Anzahl an Blutgefäßen pro Quadratmillimeter Fläche einer Sutur für alle Suturen beträgt 73,02. Für die einzelnen Suturen ergaben sich im Durchschnitt folgende Werte: Sutura interfrontalis 67,8, Sutura coronalis 69,22, Sutura sagittalis 78,11, Sutura squamosa 75,43 und Sutura lambdoidea 66,26.

Die Durchschnittswerte der einzelnen untersuchten Hunde weichen allerdings teilweise erheblich voneinander ab. Der geringste Durchschnittswert beträgt 42,47 Blutgefäße pro Quadratmillimeter Fläche einer Sutur, wohingegen der höchste bei 110,93 liegt und damit mehr als doppelt so hoch ist.

Eine Vermessung der Größe des Lumens der Blutgefäße erfolgte nicht. Anhand des subjektiven Eindrucks erscheint die Gesamtheit der Gefäße relativ homogen in ihrer Größe.

Die Blutgefäße liegen in der Sutur hauptsächlich zentral und sind überwiegend kleinlumig. Bei verzahnten Suturen sind die Blutgefäße in Kurven jedoch vermehrt randständig und im konkaven Kurvenbereich angeordnet.

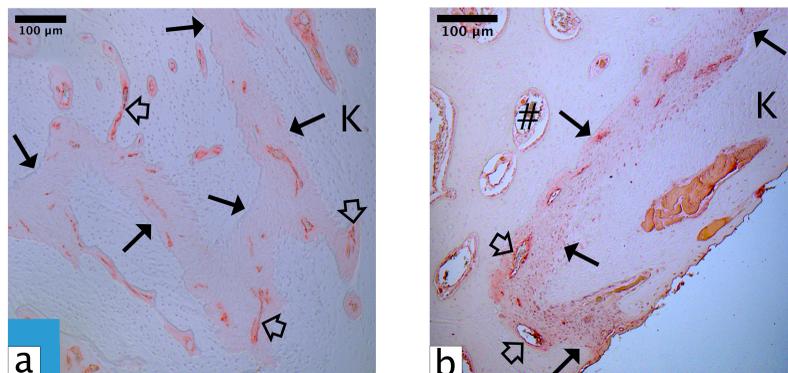


Abbildung 28: Histologische Schnittpräparate, von-Willebrand-Faktor-Färbung, 10x.
 a) Hund 7, Deutscher Schäferhund, 4 Monate, Sutura interfrontalis. b) Hund 2, Collie, 12 Wochen, Sutura sagittalis. → = Verlauf der Sutur, ↑ = leuchtendrote Blutgefäße in den Suturen, K = Knochen, # = Blutgefäßkanal im Knochen. Hinweis zur Bilderstellung: Histologische Bildmontage aus mehreren Einzelbildern durch die Software Leica Application Suite (LAS), Live Image Builder.

Die Suture bildet immer wieder Ausbuchtungen, die in die knöchernen Fronten reinragen. Diese Ausbuchtungen sind stets mit einem oder mehreren Blutgefäßen assoziiert. Das Lumen dieser Blutgefäße ist oft größer als das der mittig in der Suture lokalisierten Gefäße.

Die Suturen der brachycephalen Rassen weisen im Schnitt weniger Blutgefäße pro Quadratmillimeter Fläche einer Suture auf (65,41) als die der mesozephalen Rassen (76,1). Auffallend ist in dem Zusammenhang aber die Größe des Lumens der Blutgefäße. Die Blutgefäße bei den brachycephalen Rassen scheinen großlumiger zu sein, weisen im Gegenzug aber eine geringere Anzahl an Anschnitten pro Fläche auf. Teilweise reichte das Lumen der Blutgefäße fast über die ganze Breite der Suture (Abbildung 29).

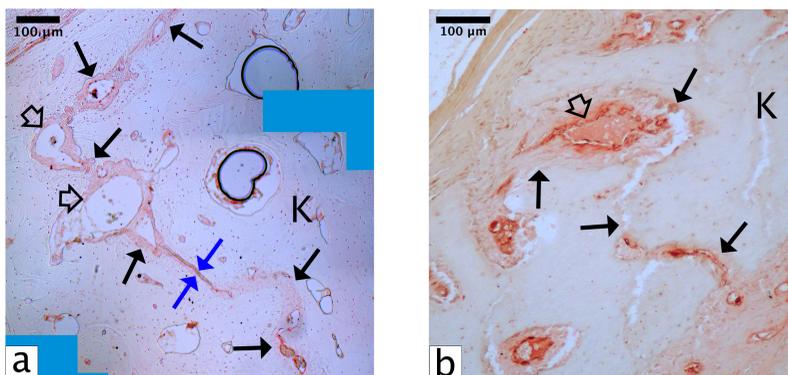


Abbildung 29: Histologische Schnittpräparate, von-Willebrand-Faktor-Färbung, 10x. a) Hund 11, Mops, 12 Wochen, Sutura interfrontalis. b) Hund 12, Mops 8 Wochen, Sutura interfrontalis. → = Verlauf der Suture, ↑ = Blutgefäß in der Suture, K = Knochen, blaue Pfeile = beinahe fusionierte Sutura. Hinweis zur Bilderstellung: Histologische Bildmontage aus mehreren Einzelbildern durch die Software Leica Application Suite (LAS), Live Image Builder.

Die beiden Hunde bei denen ein Hydrozephalus bekannt war zeigen mehr großlumige, kavernenartige Blutgefäße in Ausbuchtungen, die in den angrenzenden Schädelknochen ziehen und von langen Knochenausläufern eingerahmt werden.

4.6 Detektion von Apoptose

Von den 58 Suturen konnten 53 Suturen auf apoptotische Zellen untersucht werden. Nach der Bestimmung der Gesamtzellzahl innerhalb der Suture wurden TUNEL-positive Zellen ausgezählt und ihr Anteil an der Gesamtzellzahl in Prozent

angegeben. Die Werte des prozentualen Anteils an apoptotischen Zellen reichen von weniger als 1 % bis hin zu fast 50 %. Für jeden Hund wurde ein Durchschnittswert berechnet. Diese sind in Abbildung 30 dargestellt. Der Durchschnittswert für alle 14 Hunde beträgt 10,1 %. Der Durchschnittswert nur für die mesozephalen Hunde beträgt 7,6 % und nur für die brachycephalen Hunde beträgt 16,2 %. Betrachtet man die einzelnen Suturen ergeben sich folgende Durchschnittswerte: SInt 9,4 %, SCor 8,4 %, SSag 14,1 %, SSqu 6,9 % und SLam 4,9 %.

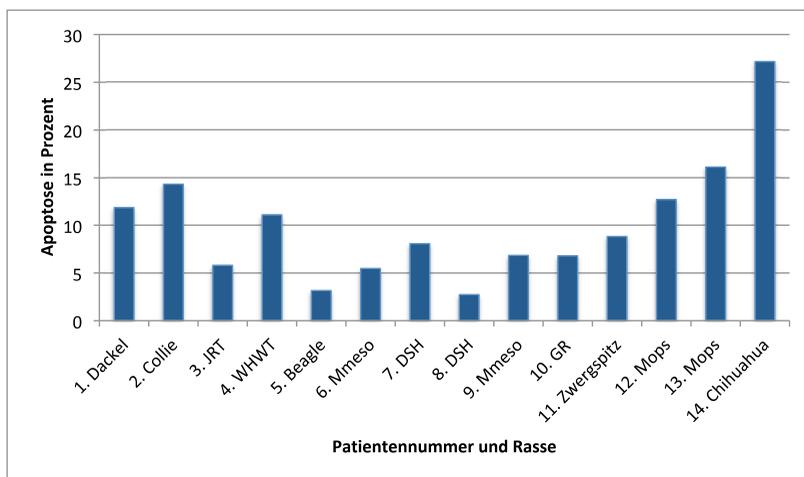


Abbildung 30: Säulendiagramm zur Darstellung des durchschnittlichen prozentualen Anteils an apoptotischen Zellen innerhalb der Suturen bei den einzelnen untersuchten Hunden. JRT = Jack Russel Terrier, WHWT = West Highland White Terrier, Mmeso = Mischling mesozephal, GR = Golden Retriever.

Bei der Verteilung der apoptotischen Zellen innerhalb der Suturen fiel auf, dass bei 30 von 51 auswertbaren Suturen eine vermehrte Anhäufung der TUNEL-positiven Zellen an den Enden der Suture zu verzeichnen ist (Abbildung 31). Dies zeigt sich bei 13 dieser 30 Suturen sowohl beim ekto- als auch beim endokranielen Ende. Bei weiteren 13 dieser 30 Suturen zeigt nur eines der beiden Enden der Suture auffallend mehr apoptotische Zellen. Abbildung 32 verdeutlicht die Häufigkeit je nach Suture. Da bei manchen Suturen nicht beide Enden auf dem Schnitt waren, konnte hier nur ein Ende ausgewertet werden. In diesen Fällen konnte nur die Aussage getroffen werden, ob mindestens ein Ende mehr Apoptose zu verzeichnen hat. Dies war bei 4

der 30 Suturen, die Anhäufung der TUNEL-positiven Zellen an den Enden der Sutur zeigten, der Fall.

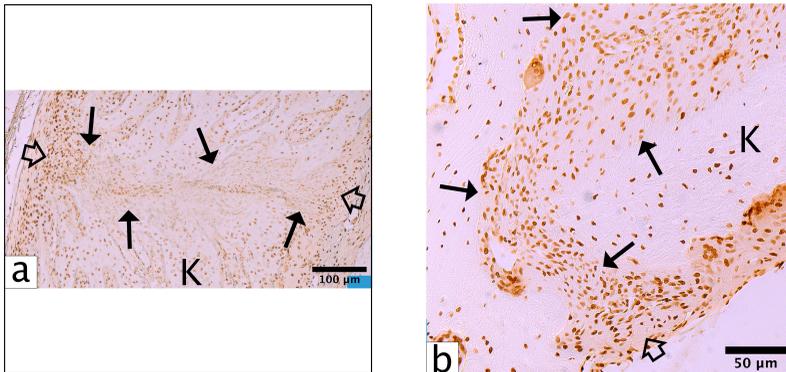


Abbildung 31: Histologische Schnittpräparate, TUNEL-Färbung, 20x.

a) Hund 1, Dackel, 5 Wochen, Sutura sagittalis. b) Hund 5, Beagle, 14 Wochen, Sutura sagittalis. → = Verlauf der Sutur, ↑ = Ende der Sutur mit Anhäufung von apoptotischen Zellen, K = Knochen. Hinweis zur Bilderstellung: Histologische Bildmontage aus mehreren Einzelbildern durch die Software Leica Application Suite (LAS), Live Image Builder.

In den meisten Fällen konnte nicht bestimmt werden, welches das ektokraniale und welches das endokraniale Ende der Sutur ist. Aus diesem Grund konnte für den Fall, dass nur ein Ende verstärkt TUNEL-positive Zellen aufweist, keine Aussage darüber getroffen werden, ob das ekto- oder das endokraniale Ende einer Sutur mehr apoptotische Zellen aufweist.

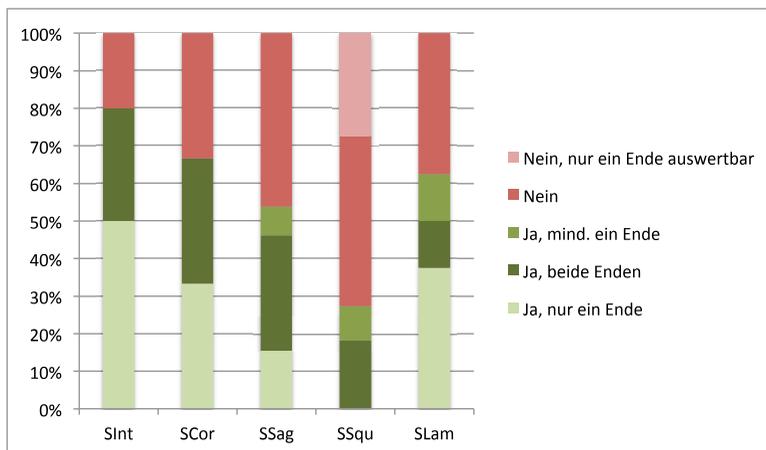


Abbildung 32: Säulendiagramm zur Darstellung der prozentualen Häufigkeit einer vermehrten Anhäufung von TUNEL-positiven Zellen an den Enden der Sutura bei den einzelnen Suturen. SInt = Sutura interfrontalis, SCor = Sutura coronalis, SSag = Sutura Sagittalis, SSqu = Sutura squamosa und SLam = Sutura Lambdoidea.

Bei der Betrachtung der räumlichen Verteilung der TUNEL-positiven Zellen innerhalb der Sutura zeigt sich ein zoniertes Auftreten. Beim Großteil der Suturen färbten sich vor allem die randständigen Zellen an den osteogenen Fronten TUNEL-positiv. Hierbei handelt es sich nach mikroskopischer Betrachtung mit einer 400 fachen Vergrößerung um Osteoblasten. Zentral der Suturen ließ sich ein geringerer Anteil apoptotischer Zellen verzeichnen. Dennoch lassen sich auch immer wieder mittig im suturalen Bindegewebe einige TUNEL-positive Zellen finden. Dabei handelt es sich vor allem um Fibrozyten und Fibroblasten, die eingebettet zwischen Fasern der extrazellulären Matrix an ihrer spindelförmigen Gestalt und ihren Fortsätzen zu erkennen sind.

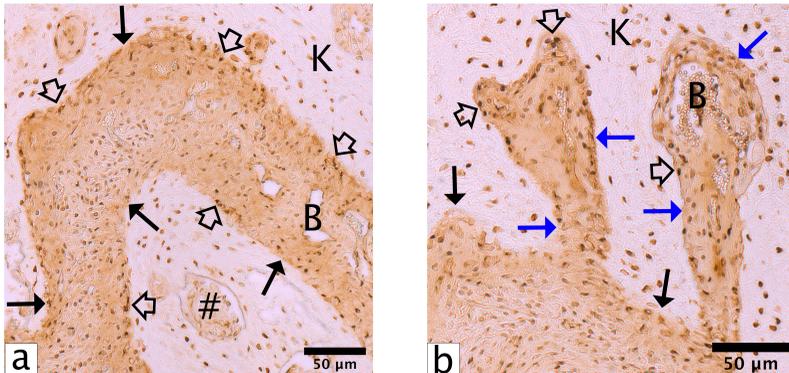


Abbildung 33: Histologische Schnittpräparate, TUNEL-Färbung, 20x.
 Dargestellt sind randständige apoptotische Zellen an den osteogenen Fronten. a und b) Hund 2, Collie, 12 Wochen, Sutura sagittalis. → = Verlauf der Suture, blaue Pfeile = Ausbuchtungen der Suture, ⬆ = randständige dunkelbraun gefärbte apoptotische Zellen an den osteogenen Fronten, K = Knochen, # = Blutgefäßkanal im Knochen, B = Blutgefäß in der Suture.

Die Suturen sind oftmals mit Ausbuchtungen in den Knochen hinein versetzt. Diese sind immer mit einem Blutgefäß assoziiert. In den Ausbuchtungen sind stets vermehrt TUNEL-positive Zellen zu finden, welche sich ebenfalls hauptsächlich randständig anordnen. Außerdem sind bei verzahnten Suturen vor allem in den konkaven Kurvenbereichen (Abbildung 15) gehäuft apoptotische Zellen zu finden.

Diskussion

4.7 Indikation zur Untersuchung der Schädelwachstumsfugen beim Hund

Die Suturen sind die Wachstumszentren des Schädels. Schon aus der Humanmedizin ist bekannt, dass zeitliche Abweichungen im Schluss der Schädeluturen zu Deformationen der normalen Schädelform führen. Vor allem ein verfrühter Fugenschluss in Form von Kraniosynostosen ist beim Menschen weitreichend erforscht. In diesem Zusammenhang existieren viele Studien, welche am Mäusemodell eine Erklärung für die prämatüre Verknöcherung gesucht haben (Kim *et al.*, 1998; Iseki *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005). Für syndromale Kraniosynostosen konnten einige Mutationen als Ursache benannt werden (Senarath-Yapa *et al.*, 2012). Aber nicht nur die genetische Ebene ist hier von Bedeutung. Auch die zellulären Veränderungen wurden näher untersucht. Viele Studien legten besonderes Augenmerk auf Parameter der Zellaktivität. Insbesondere die Proliferation, Differenzierung und Apoptose stellen hier wichtige Stellschrauben der Schädelwachstumsfugen dar (Opperman, 2000). Auch die Anzahl der Osteoklasten als maßgeblicher Indikator für Knochenumbau, erwies sich bei der Fusion von Suturen als bedeutender Faktor und erweckte entsprechendes Forschungsinteresse (Rice *et al.*, 1997; Beederman *et al.*, 2014).

Der überwiegende Anteil an Studien zu Suturen und ihrer Fusion fand bisher an Mäusen statt. Zum jetzigen Zeitpunkt existieren nur wenige Studien zu Wachstumsfugen des Hundes (Montavon *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2013; Geiger & Haussman, 2016; Farke, 2017). In den letzten Jahren rückte der brachycephale Schädeltyp des Hundes aber immer mehr in den Fokus der Forschung. Hier stellt man sich die Frage, ob die Brachycephalie des Hundes vergleichbar ist mit humanen pathologischen Schädeldeformationen, die zu einem brachycephalen Schädeltyp führen. Beim Menschen löst insbesondere ein verfrühter Schluss der Sutura coronalis, teilweise auch in Kombination mit den Synchronosen der Schädelbasis,

eine Brachyzephalie aus (Müller *et al.*, 1997; Cendekiawan *et al.*, 2010). Auch bei der Perserkatze steht eine Kraniosynostose der Sutura coronalis im Verdacht Auslöser der Brachyzephalie zu sein (Schmidt *et al.*, 2017).

Auch bei Hunden vermutet man einen prämaturen Verschluss von Schädelwachstumsfugen als Ursache für die Brachyzephalie. In einer Studie von Schmidt *et al.* wurde der Schluss der Synchronosen der Schädelbasis zwischen mesocephalen Hunden, brachycephalen Hunden und Cavalier King Charles Spaniel verglichen. Dort konnte mithilfe der Magnetresonanztomographie gezeigt werden, dass bei brachycephalen Hunden ein frühzeitiger Schluss dieser Schädelwachstumsfugen, speziell der Synchronosis sphenooccipitalis, stattfindet. Bei dieser Synchronose konnte eine Fusion bei mesozephalen Hunden mit ca. 13,5 Monaten, bei brachyzephalen Hunden mit ca. 9,5 Monaten und beim Cavalier King Charles Spaniel schon mit 5 Monaten gezeigt werden (Schmidt *et al.*, 2013). Daraufhin wurden die Suturen und Synchronosen meso- und brachyzephaler Rassen genauer untersucht und verglichen. Hierbei wurde festgestellt, dass mit konventionellen Bildgebungsverfahren wie MRT und CT nur bedingt eine Aussage darüber getroffen werden kann, ob Suturen und Synchronosen noch offen oder schon geschlossen sind. Die Histologie als Goldstandard bietet uns dagegen eine klare Aussage. Eine abschließende Aussage über den Zeitpunkt des Fugenschlusses konnte allerdings nicht getroffen werden, da die Patientenzahl und Altersverteilung dafür nicht ausreichend war. Zudem konnte nur für drei Wachstumsfugen der Einfluss der Brachyzephalie mit statistischer Signifikanz bewiesen werden. Dabei handelt es sich um die Sutura sphenofrontalis sinister, die Sutura lambdaidea dexter und die Synchronosis intersphenoidalis, welche mit höherer Wahrscheinlichkeit früher bei brachyzephalen Rassen schließen. Auch hier ist eine endgültige Aussage durch zu geringe Fallzahlen nicht möglich (Farke, 2017).

Bislang liegen keine morphologisch-histologischen Studien von Suturen am Hundeschädel vor. Ebenso wurde auch die Zellaktivität in Suturen noch nicht am Hundemodell beschrieben. Die zelluläre Aktivität in Form von Proliferation, Apoptose und die Anwesenheit von Osteoklasten und Blutgefäßen innerhalb der Sutura zeigte sich aber bereits in Studien an anderen Tierspezies und auch beim Menschen als äußerst wichtige Stellschraube sowohl bei der physiologischen als auch der

pathologischen Fusion von Suturen (Kapitel 2.2.9, 2.2.10, 2.2.11 und 2.2.12). Aufgrund dessen ist es sinnvoll die physiologische Morphologie und Morphogenese der Schädelwachstumsfugen bei Hunden unterschiedlicher Schädeltypen zu beschreiben und zu definieren. Nur so lassen sich Abweichungen von der Norm erkennen. Folglich ist auch eine vergleichende Betrachtung der Fugenhistologie bei bestimmten Krankheitsbildern, die mit einer prämaturnen Verknöcherung der Schädelnugen einhergehen, möglich.

4.8 Erläuterung zur Studiengruppe und zum Studiendesign

Für die Studiengruppe wurden 14 Hunde im Alter von 28 bis 126 Tagen ausgewählt. Die Wahl der Altersspanne erfolgte aufgrund der Tatsache, dass in vorangegangenen Studien festgestellt wurde, dass Suturen am Hundeschädel bis zu einem Alter von vier Monaten noch nicht geschlossen waren (Schmidt *et al.*, 2013; Farke, 2017). Somit kann davon ausgegangen werden, dass offene Schädelnugen bei Hunden bis zu einem Alter von vier Monaten ein Wachstum des Schädels zulassen und demzufolge funktionell sind. Auf eine Untersuchung von älteren Hunden wurde in dieser Studie verzichtet. Das Ziel der Studie war es, offene Suturen am Hundeschädel zu beschreiben um eine allgemein gültige Beschreibung dieses Status der Suturen zu ermöglichen. Bisher konnte kein genauer Ossifikationszeitpunkt für die Suturen und Synchondrosen des Hundes bestimmt werden. Außerdem unterscheidet sich dieser vermutlich sogar zwischen mesozephalen und brachycephalen Rassen. Aufgrund dieser Tatsache ist eine Beschränkung auf einen verlässlichen Zeitraum, indem die Suturen definitiv noch offen sind, sinnvoll.

Um eine möglichst große Heterogenität des Probenmaterials zu erreichen, wurden Hunde unterschiedlicher Rassen und Geschlechter gewählt. Das Geschlecht wurde bei der Auswertung der Ergebnisse nicht berücksichtigt, da es nicht bei allen vierzehn Hunden bekannt war. Trotzdem ist eine Berücksichtigung des Geschlechts prinzipiell als sinnvoll zu erachten. Eine Geschlechtsabhängigkeit für den Zeitpunkt der Ossifikation bei Suturen ist zwar nicht bekannt, dafür aber für eine Synchondrose der Schädelbasis. Der Ossifikationszeitpunkt der Synchondrosis sphenoccipitalis beim Menschen ist geschlechtsabhängig. Hier kommt es bei männlichen Individuen

zu einer späteren Verknöcherung (Powell & Brodie, 1963; Cendekiawan *et al.*, 2010; Shirley & Jantz, 2011).

Weiterhin wurden Hunde unterschiedlicher Schädeltypen in die Studie miteingeschlossen. Da die Rassen der Studienteilnehmer bekannt sind, konnten vier Hunde anhand ihrer Rasse als brachyzephal eingeordnet werden. Der Collie gehört als einziger zu einer dolichozephalen Rasse. Eine Fallzahl von insgesamt vierzehn Hunden, von denen vier eine Brachyzephalie aufweisen, ist nicht ausreichend um einen Vergleich zwischen brachyzephalen und nicht-brachyzephalen Rassen mit statistischer Relevanz zu ziehen. Dennoch wurde bei der Auswertung der verschiedenen Untersuchungsmethoden teilweise auch eine separate Betrachtung der brachyzephalen und nicht-brachyzephalen Hunde vorgenommen.

Bei zwei der Studienteilnehmer ist eine Vorerkrankung in Form eines Hydrozephalus verzeichnet. Es ist bekannt, dass ein Hydrozephalus meist mit einem erhöhten intrakraniellen Druck einhergeht (Zettl *et al.*, 2005). Besteht ein Hydrozephalus bevor die Schädelfugen verknöchern, kommt es aufgrund der Ausdehnung des Gehirns durch die Ansammlung von zerebrospinaler Flüssigkeit (Liquor) zu einer Expansion des Neurokraniums, während das Viszerokranium davon unberührt bleibt (Schünke *et al.*, 2009). Ebenso kann ein verminderter mechanischer Impuls bei einer Mikroenzephalie den prämaternen Suturenverschluss fördern (Cohen, 1993). Grundsätzlich ist anzunehmen, dass veränderte intrakranielle Druckverhältnisse allgemein einen Einfluss auf den Schluss der Schädelfugen haben können. Infolgedessen sind die beiden untersuchten Hunde mit Hydrozephalus bei Abweichungen von den anderen Tieren gesondert zu betrachten. Möglicherweise war die brachyzephale Schädelform des in der Studie untersuchten Mopses auch Auslöser des Hydrozephalus. Ein Zusammenhang zwischen Brachyzephalie und der Ausbildung eines Hydrozephalus ist beim Menschen bereits beschrieben und wird auch bei der Perser Katze und kleinen brachyzephalen Hunderassen vermutet (Cinalli *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 2019; Schmidt *et al.*, 2017).

Für die Studie wurden fünf Suturen untersucht: die Sutura interfrontalis, die Sutura sagittalis, die Sutura coronalis, die Sutura squamosa und die Sutura lambdoidea. Diese Suturen gehören zu den wichtigsten Suturen des Neurokraniums. Zudem sind die meisten Kraniosynostosen des Menschen an diesen Suturen beschrieben. Die Sutura sagittalis ist mit 40 – 55 % am häufigsten betroffen, danach folgen die

Suturæ coronales (20 – 25 %), die Sutura frontalis (5 – 15 %), multiple Synostosen von Suturen (5 – 15 %) und die Sutura lambdoidea (0 – 5 %) (Senarath-Yapa *et al.*, 2012). Wenn man der Hypothese eines prämaturen Fugenschlusses bei brachycephalen Rassen nachgehen will, ist es folglich sinnvoll solche Suturen zu untersuchen, bei denen man vom Menschen weiß, dass sie häufig von Kraniosynostosen betroffen sind.

Drei der ausgewählten Suturen sind paarig angelegt (Sutura coronales, Sutura squamosa und Sutura lambdoidea). Leider konnte oft nur die Sutura einer Schädelseite in die Auswertung einbezogen werden. Der Anteil an Suturen, bei denen sowohl die rechte als auch die linke Seite zur Auswertung vorhanden war, ist zu gering, um einen Vergleich zwischen den beiden Seiten der jeweiligen Sutura ziehen zu können.

Insgesamt waren bei den vierzehn untersuchten Hunden nicht immer alle fünf Suturen vorhanden (Tabelle 5). Vor allem bei der Sutura lambdoidea konnte oft keine Sutura in den histologischen Schnitten identifiziert werden. Da eine vollständige Ossifikation der Sutura in der ausgewählten Altersspanne bis vier Monate als unwahrscheinlich angesehen wird, ist eine mangelhafte Probenentnahme als Ursache denkbar. Durch eine falsche Schnittführung beim Herausschneiden der Suturen aus den Schädeln können die Suturen nicht im Schnitt enthalten sein. Auch für das Vorhandensein von nur einem Ende einer Sutura auf dem Schnitt wird diese Erklärung herangezogen. Die oft betroffene Sutura lambdoidea zeigte sich in einer vorangegangenen Studie im CT und MRT als auch in der Histologie allgemein als schwer identifizierbar (Farke, 2017).

4.9 Erläuterung zur Wahl der Färbemethoden

Die morphologische Auswertung der Suturen erfolgte an histologischen Schnitten, die nach Standardmethode mit Masson-Goldner-Trichrom gefärbt wurden. Da sich durch die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung kollagene Fasern und Bindegewebe selektiv gut darstellen lassen, eignete sich diese Färbemethode insbesondere für eine Übersichtsdarstellung der Suturen. Die Suturen bestehen im frühen Stadium, welches in dieser Studie untersucht wurde, zu einem Großteil aus Kollagenfasern. Kollagen färbt sich in der Masson-Goldner-Trichrom-Färbung grün bzw. blau, sodass

sich die Suture optimal von rot gefärbtem Osteoid, aber auch leicht von leuchtend grün gefärbtem Knochen abhebt (Lang, 2006). Dadurch lassen sich morphologische Aspekte der Suturen wie ihr Verlauf auf den ersten Blick erfassen und die Auswertung wird erleichtert. Andere Übersichtsfärbungen wie beispielsweise die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ermöglichen oft keine Anfärbung von Geweben im Speziellen, sodass eine Differenzierung und damit die Auswertung erschwert wird.

Eine Beurteilung der Kollagenfasern und ihrer Ausrichtung wurde durch die Färbung mit Pikro-Siriusrot und gleichzeitiger Polarisationsmikroskopie deutlich erleichtert. Bei korrespondierenden Schnitten, die mit Masson-Goldner-Trichrom gefärbt wurden, lässt sich die Orientierung der Faserbündel nur undeutlich erkennen. Zudem ist es nicht möglich im bläulich gefärbten Kollagen einzelne Faserbündel gut voneinander abzugrenzen. Die Struktur und Orientierung der Kollagenfasern ließ sich durch die Polarisationsmikroskopie hingegen sehr eindrucksvoll darstellen. Auch dünnere Fasern ließen sich erfassen, wie es Junqueira et al. (1979) bereits zeigte. Insbesondere eine Verwebung der Kollagenfasern in alle drei Raumrichtungen war nur durch die Polarisationsmikroskopie ersichtlich.

In dieser Studie sollten Osteoklasten in den Suturen von Hunden genauer untersucht werden. TRAP gilt als Markerenzym für Osteoklasten und die TRAP-Färbung wird speziell für das Sichtbarmachen von Osteoklasten benutzt. Bei den Schnitten der untersuchten Suturen ließ sich mit der TRAP-Färbung eine gute Darstellung und Auswertung der Osteoklasten erzielen. Dennoch zeigten elf der mit der TRAP-Methode gefärbten Schnitte bei der Auswertung eine schwache Anfärbbarkeit. Fünf davon waren so gering angefärbt, dass eine Auswertung nicht möglich war. Die restlichen sechs Schnitte wurden dennoch ausgewertet, da eine Nachbearbeitung an dem Computer durch eine Verstärkung der Farbsättigung eine Auswertung einwandfrei ermöglichte.

Die betroffenen Schnitte durchliefen die Färbung gleichzeitig mit Schnitten, die eine gute Anfärbbarkeit zeigten, sodass ein fehlerhafter Färbeprozess als auch eine mangelhafte Färbelösung ausgeschlossen werden kann. Ein möglicher Grund für eine schwache Anfärbung könnte eine mangelnde Qualität der unbehandelten, in Paraffin eingebetteten Schädelnagen sein. Hier ist beispielsweise eine unzureichende Entkalkung denkbar. Auf der anderen Seite zeigten die Schnitte vom selben Paraffinblock, die mit der TUNEL-Methode gefärbt wurden, in den meisten

Fällen eine gute Anfärbarkeit. Eine weitere Erklärung könnte eine schwache Enzymaktivität der tartratresistenten sauren Phosphatase sein. Osteoklasten, die kein oder wenig TRAP produzieren und somit nicht oder nur wenig angefärbt werden, sind wahrscheinlich auch nicht aktiv und tragen somit nicht zur Knochenresorption bei. In einer Studie an der Calvaria der Maus wurden Osteoklasten gleichzeitig mit TRAP und TUNEL gefärbt. Dabei stellte man fest, dass viele TUNEL-positive Osteoklasten TRAP-negativ waren. Der Autor ging davon aus, dass apoptotische Osteoklasten ihre Funktion verlieren und deshalb die Enzymproduktion stoppen (Rice *et al.*, 1999).

Die Vaskularisation in den Suturen der untersuchten Hunde ließ sich durch die gewählte Methode der immunhistochemischen vWBF-Färbung gut visualisieren. Die Immunhistologie ermöglicht eine spezifische Anfärbung der Blutgefäße innerhalb der Suture. Bei der Übersichtsfärbung mit Masson-Goldner-Trichrom konnten Blutgefäße ebenfalls gut dargestellt werden. Allerdings waren hier vor allem größere, mit Erythrozyten gefüllte Blutgefäße leicht zu erkennen. Kleinere Blutgefäße ließen sich schwieriger detektieren. Dies machte sich vor allem in einer vergleichenden Zählung der Blutgefäße in einem nach Masson-Goldner-Trichrom gefärbten Schnitt der identischen Suture bemerkbar. Bei der immunhistochemischen von Willebrand-Faktor-Färbung lassen sich stets mehr Blutgefäße zählen als bei der Masson-Goldner-Trichrom-Färbung. Insbesondere sehr kleinlumige Gefäße wären ohne die immunhistochemische Markierung übersehen worden.

Die Untersuchung der Suturen auf apoptotische Zellen erfolgte mit der TUNEL-Methode. Wie auch die von Willebrand-Faktor-Färbung handelt es sich hierbei um eine immunhistochemische Färbemethode. Dadurch konnte eine spezifische Darstellung von apoptotischen Zellen gewährleistet werden, indem DNA-Strangbrüche detektiert und sichtbar gemacht werden. Eine lichtmikroskopische Darstellung von Apoptose ist zwar möglich, aber bei der Vielzahl von Zellen innerhalb einer Suture unmöglich auszuwerten. Die gezielte Anfärbung von apoptotischen Zellen durch die TUNEL-Methode ermöglicht eine Differenzierung auf den ersten Blick ohne nach mikroskopisch charakteristischen Kennzeichen für Apoptose suchen zu müssen. Viele Studien an Mäusen, Ratten und auch am Menschen konnten mit der TUNEL-Methode gute Resultate bei der Untersuchung an

Suturen erzielen (Rice *et al.*, 1999; Agresti & Gosain, 2005; Chen *et al.*, 2003; Holmes *et al.*, 2009; Lemonnier *et al.*, 2001).

4.10 Morphometrische Analyse

Studien zur morphologisch-histologischen Beschreibung von Suturen am Hundeschädel existieren nach jetzigem Stand noch nicht. Eine Beschreibung der Suturen bei der Spezies Hund ermöglicht eine bessere Vergleichbarkeit für zukünftige Studien am Hundemodell. Zusätzlich waren die Messungen an den Suturen auch für die Berechnungen der anderen untersuchten Parameter notwendig wie zum Beispiel der Menge an Blutgefäßen innerhalb der Sutura.

In der Literatur existieren Beschreibungen der Schädelstuturen vor allem für Maus, Ratte und Mensch. Am Schädel variiert die Morphologie der Suturen. Der Grad der Verzahnung und Komplexität unterscheidet sich von Sutura zu Sutura (Kapitel 2.2.4).

In der Literatur werden die Sutura interfrontalis und die Sutura sagittalis als End-zu-End Suturen beschrieben. Die Sutura coronalis, Sutura lambdoidea und Sutura squamosa sind überlappende Suturen (Rice *et al.*, 1997; Furtwängler *et al.*, 1985; Cohen, 1993; Opperman, 2000; Slater *et al.*, 2008). Dies deckt sich weitestgehend mit den Beobachtungen in dieser Studie beim Hund. Lediglich die Sutura lambdoidea ist bei den meisten der hier untersuchten Hunde eine End-zu-End Sutura, obwohl sie in der Literatur als überlappend beschrieben wird. Möglicherweise gestaltet sich die Krafteinwirkung auf die Sutura lambdoidea beim Hund weniger ungleichmäßig, sodass sich keine Überlappung entwickelt. Zudem ist eine spätere Entwicklung der Überlappung im fortgeschrittenen Alter (nach 4 Monaten) nicht auszuschließen.

In dieser Studie verläuft die Sutura interfrontalis beim Hund immer mäanderförmig und ist demnach verzahnt. Es ist anzunehmen, dass die Sutura interfrontalis aufgrund ihrer vorhandenen Verzahnung funktionellen Anforderungen durch Krafteinwirkung ausgesetzt ist. Der Grad der Verzahnung variiert von Hund zu Hund, aber eine gewisse Verzahnung ist immer vorhanden, sodass man von einer stets vorhandenen Krafteinwirkung von unterschiedlichem Ausmaß auf die Sutura interfrontalis beim Hund ausgehen kann.

Die Sutura lambdoidea zeigt sich dagegen ausschließlich ohne Verzahnung gerade gestreckt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Beanspruchung dieser Suturen sehr gering ist. Eine sich noch entwickelnde Verzahnung, die erst bei älteren Hunden von statten geht, kann aber nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Bei den anderen drei Suturen (SCor, SSag und SSqu) zeigt sich nur wenig oder kaum eine Tendenz bezüglich der Komplexität, sodass die Verzahnung unterschiedlich stark ausfällt. Da in geringem Maße die verzahnten Suturen überwiegen (66,6%, 66,6% und 57,1%) könnten das Alter der Hunde oder die Krafteinwirkung auf die Suturen mögliche Faktoren sein, die zu unterschiedlichen Ausprägungen der Morphologie führen. Da es sich in dieser Studie um Hunde von 1 bis 4 Monaten handelt, ist die Modifizierung in Form einer Verzahnung, die durch Belastungen entsteht, womöglich noch im vollen Gange. Suturen, die bis zum Zeitpunkt der Untersuchung noch unverzahnt waren, hätten sich bei einer längeren Lebensdauer des Hundes gegebenenfalls noch verändert, da die Entwicklung der Sutura in diesem Alter noch nicht abgeschlossen ist. Eine Zunahme der Komplexität bis zur Verknöcherung der Schädelfuge ist in der Literatur beschrieben (Cohen, 1993; Byron, 2006). Eine Studie von Sun et al. an Schweinen belegt allerdings eine Abnahme der Komplexität mit zunehmendem Alter. Bei älteren Schweinen reduziert sich die Verzahnung der Sutura am ektokraniellen Anteil, bei welchem die Fusion der Sutura beginnt. Der endokranielle Anteil der Sutura bleibt verzahnt (Sun et al., 2004). Um eine Aussage über eine Zu- oder Abnahme der Komplexität einer Sutura mit zunehmendem Alter beim Hund zu treffen, ist eine longitudinale Studie mit einer größeren Altersverteilung nötig.

Ein starker Grad der Verzahnung konnte in dieser Studie bei den beiden Hunden mit Hydrozephalus festgestellt werden. Das ist nicht verwunderlich, denn eine markante Verzahnung ist ein typisches Merkmal von Schädeluturen bei Hydrozephalus (Herring, 1972). Durch den erhöhten intrakraniellen Druck wirkt mehr Kraft auf die Suturen ein. Die funktionelle Anforderung führt zur Entstehung einer erhöhten Komplexität, um diesen Kräften entgegenzuwirken. Die langen fingerartigen Knochenausläufer, die in dieser Studie beobachtet wurden, bieten mehr Ansatzfläche für kollagene Fasern, welche Belastungen abfangen können.

Die gemessenen Längen der Suturen variieren bei den vierzehn untersuchten Hunden recht stark. Ein Grund ist wohl die unterschiedliche Dicke der Calvaria der einzelnen Hunde, die natürlich maßgeblich die Suture-Länge beeinflusst. Zudem ist der Grad an Verzahnung oder Überlappung auch ein wichtiger Einflussfaktor. Die gemessenen Längen der einzelnen Suturen korrelieren mit ihrer Morphologie.

Bei Schweinen und Ratten nimmt die Länge einer Suture linear mit dem Alter zu (Proff *et al.*, 2006; Sun, Lee & Herring, 2007). Ob dies auch bei der Spezies Hund der Fall ist, muss in weiteren Studien mit einer größeren Altersverteilung untersucht werden. Da die Calvaria aber während des Wachstums eines Hundes sehr wahrscheinlich auch an Dicke zunimmt, ist eine gleichzeitige Zunahme der Suture-Länge auch annehmbar.

Die gemessenen durchschnittlichen Breiten der Suturen geben einen Hinweis auf grundsätzlich gültige Angaben beim Hund im Alter von 1 bis 4 Monaten. Messungen der Breite von Suturen fanden bisher an Ratten, Mäusen und Schweinen statt (Vij & Mao, 2006; Sun *et al.*, 2004; Howie *et al.*, 2016). Wichtig bei der Beurteilung der Suturebreite ist die Tatsache, dass sich die Breite während der Entwicklung einer Suture verändert. Bei Schwein und Mensch nimmt die Breite der Suture mit zunehmendem Alter ab (Sun *et al.*, 2007; Mitchell *et al.*, 2011; Fricke-Zech *et al.*, 2011). Bei der Ratte hingegen bleibt die Breite der Suture mit 200 bis 300 μm mit steigendem Alter konstant. Allerdings bleiben die meisten Suturen bei der Ratte in einem offenen Status, sodass es nie zu einer Fusion kommt (Proff *et al.*, 2006). Um eine Aussage über die Entwicklung der Suture-Breite mit steigendem Alter beim Hund geben zu können, bedarf es ebenfalls einer höheren Fallzahl mit einer größeren Altersverteilung. Anhand der Daten aus dieser Studie lässt sich keine Aussage dazu treffen.

Bei den eigenen Untersuchungen am Hund fiel auf, dass die durchschnittliche Breite der Suturen aller untersuchten brachycephalen Hunde im Vergleich geringer war als die der mesozephalen Hunde. Bei dem 84 Tage alten untersuchten Mops waren die Suturen besonders schmal und sogar stellenweise synostotisch. Vorausgesetzt die Breite der Suture nimmt mit zunehmendem Alter beim Hund ab und die osteogenen Fronten nähern sich vor der Fusion einer Suture immer weiter an, bis es schließlich zu Verknöcherung kommt, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die Suturen der brachycephalen Hunde sich früher schließen als die der mesozephalen Hunde. Ein

verfrühter Schluss von Suturen und Synchondrosen bei brachycephalen Hunden wurde bereits in einer Studie anhand von ausgewerteten histologischen Schnitten sowie CT- und MRT-Bildern vermutet. Hier schlossen sich bei brachycephalen Rassen die Sutura sphenofrontalis sinister, die Sutura lambdaidea dexter und die Synchondrosis intersphenoidalis mit höherer Wahrscheinlichkeit früher (Farke, 2017).

Grundsätzlich ist eine Vermessung der Breite von Suturen anhand eines histologischen Schnittes bei Hunden in zukünftigen Studien sinnvoll und als geeignete Untersuchungsmethode zu betrachten, um den Ossifikationszeitpunkt beim Hund näher zu definieren und den Einfluss der Brachycephalie auf den Suturenschluss zu erforschen. Hier ist eine weiterführende Forschung wünschenswert.

Sowohl das Verhältnis von Länge zu Breite einer Sutura als auch das Verhältnis der Suturlänge zur Länge der Schädelknochen von ekto- nach endokraniel entsprechen der Morphologie der Suturen. Eine Verzahnung und Überlappung vergrößert die Suturlänge und beeinflusst so die Relation. Das Verhältnis von Länge zu Breite der Sutura lambdaidea ist am geringsten, da sie morphologisch eine gerade gestreckte Sutura ist. Die Sutura squamosa zeigt eine starke Überlappung, sodass hier das Verhältnis am höchsten ist.

Auch die gemessenen Längen der Schädelknochen von ekto- nach endokraniel (Dicke der Calvaria) sind plausibel. Sie sind je nach Rasse unterschiedlich lang. Dabei scheint die Größe der Rasse mit der Dicke der Calvaria zu korrelieren. Ein Schäferhund besitzt eine dickere Calvaria als ein Dackel oder Jack Russel Terrier. Besonders geringe Werte wurden beim Chihuahua, der Kleinsten in der Studie inkludierten Rasse, gemessen. Hierzu existieren noch keinerlei vergleichbare Studien am Hund.

4.11 Beurteilung der Kollagenfasern in Suturen

Die Kollagenfaserausrichtung in Suturen beim Hund scheint sehr variabel zu sein. Es waren sowohl unorganisierte Areale zu finden als auch Areale, die eine zweckdienliche Anordnung vermuten lassen. Die Orientierung der Kollagenfasern unterscheidet sich teilweise innerhalb einer Sutura je nach Region und auch die

Morphologie einer Suture scheint eine Rolle zu spielen. Dies beschrieb Koskinen et al. (1976) bereits an den Schädelfugen der Ratte. Die Vermutung, dass lokale Wachstumsprozesse die Ausrichtung der Kollagenfasern beeinflussen, wird auch bei den Beobachtungen in dieser Studie bestärkt. Gerade gestreckte Suturen, aber auch gerade verlaufende Anteile von verzahnten Suturen besitzen überwiegend parallel zu den osteogenen Fronten angeordnete Fasern. Bei verzahnten Suturen wurde dagegen eine sich verändernde Orientierung beobachtet, die aber an die Zugrichtung der Kräfte angepasst zu sein scheint. Je stärker die Suture verzahnt ist, umso schräger sind die Faserbündel angeordnet. Diese Anordnung entspricht einer physikalischen Entgegenwirkung von Kräften auf die Suture, welche in der Arbeit von Jasinowski et al. (2010) dargestellt wurde.

Es existieren einige Studien, die eine Verzahnung von Suturen und die mit ihr einhergehenden Anordnung der Kollagenfasern als Mechanismus zur Widerstandsfähigkeit gegenüber Krafteinwirkungen erklären (Jaslow, 1990; Rafferty & Herring, 1999; Herring & Ochareon, 2005; Jasinowski *et al.*, 2010). Es liegt daher nahe, dass auch beim Hund eine Anpassung der Kollagenfaserausrichtung durch auf die Suture einwirkende Kräfte stattfindet.

Die in unregelmäßigen Abständen in den Knochen einstrahlenden Faserbündel dienen als Verankerung am Knochen wie bei einer Entthese. Diese Befestigungsstellen dienen vermutlich der Entgegenwirkung von mechanischen Belastungen, da durch die Verankerung eine Kräfteübertragung gewährleistet wird. Zudem wird durch die Befestigung ein Auseinanderweichen der beiden Schädelknochen verhindert. Die Kollagenfaserbündel strahlen bei den untersuchten Suturen beim Hund im 45° bis 90° Winkel in die Knochenfronten ein. Teilweise ist auch ein überkreuzendes Einstrahlen in den Knochen zu vermerken, welches vermutlich eine noch größere Belastung auf die Suture zulässt. Einige Studien beschreiben die Verankerung der Fasern in den Knochen in ähnlicher Weise und bezeichnen diese kollagenen Fasern als Sharpey-Fasern (Pritchard *et al.*, 1956; Cate *et al.*, 1977; Sun *et al.*, 2004).

Eine Veränderung der Kollagenfaserausrichtung während der Entwicklung einer Suture wurde in zahlreichen Studien beschrieben (Koskinen *et al.*, 1976; Cate *et al.*, 1977; Cohen, 1993; Regelsberger *et al.*, 2012). Diese konnte in der hier untersuchten Altersspanne zwischen 1 und 4 Monaten nicht beurteilt werden. Eine

Studie zur Orientierung der Kollagenfasern im Verlauf der Zeit beim Hund erscheint allerdings nur in geringem Maße von Nutzen zu sein. Bisher gibt es keinen Anhaltspunkt, dass die Kollagenfaserausrichtung sich zum Zeitpunkt des Suturenschlusses oder bei Pathologien der Schädeluturen beim Hund verändert.

4.12 Beurteilung der osteoklastischen Zellen in Suturen

Wie in Kapitel 4.9 bereits erläutert, zeigten einige Schnitte eine schlechte bis gar keine Anfärbbarkeit mit der TRAP-Methode. Neben einer mangelnden Qualität der untersuchten Paraffinschnitte wurde eine schwache Enzymaktivität der tartratresistenten sauren Phosphatase als Erklärung diskutiert.

Die Anwesenheit von Osteoklasten ist ein Marker für Knochenumbau und Knochenresorption (Teitelbaum, 2000; Bar-Shavit, 2007). Eine grundsätzlich geringe Aktivität der Osteoklasten in der untersuchten Altersklasse ist kritisch zu hinterfragen. Die Suturen werden von der Diploe der beteiligten Schädelknochen benachbart. Bei den untersuchten Tieren im Alter von 1 bis 4 Monaten wird ein aktiver Knochenumbau in der Diploe der Calvaria erwartet, weil in diesem Alter das Wachstum des Schädels und des Gehirns noch nicht abgeschlossen ist. Da nicht nur innerhalb der Suturen, sondern im gesamten Schnitt eine schlechte Anfärbbarkeit zu verzeichnen ist, scheint eine mangelnde Anfärbbarkeit der Paraffinschnitte aufgrund von qualitativen Mängeln am wahrscheinlichsten.

Eine Abwesenheit von Osteoklasten in mindestens 10 Suturen ließ sich nur bei der Sutura interfrontalis, Sutura coronalis und Sutura sagittalis beobachten. In den Sutura squamosa und Sutura lambdoidea waren immer Osteoklasten zu finden. Die betroffenen Suturen zeigten im restlichen Schnitt eine gute Anfärbung und teilweise eine hohe Osteoklastendichte außerhalb der Sutura in der angrenzenden Diploe, sodass das alleinige Fehlen von Osteoklasten in der Sutura plausibel scheint und nicht mit einer schlechten Anfärbbarkeit des Schnittes an sich erklärt werden kann.

Keine Osteoklasten zu finden deutet vermutlich darauf hin, dass in der untersuchten Sutura kaum Knochenumbauprozesse stattfinden. Zeitgleich waren aber immer Osteoblasten an den osteogenen Fronten angelagert. Man geht davon aus, dass ein Gleichgewicht zwischen Knochenbildung durch Osteoblasten und Knochenabbau durch Osteoklasten bei der Aufrechterhaltung der Sutura wichtig ist (Lee *et al.*, 2011;

Guo *et al.*, 2018). Da bei einem verfrühten Schluss der Suturen eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten festgestellt wurde, die auf einen deutlich gesteigerten Knochenmetabolismus bei fusionierenden Suturen hinweist, kann man bei den Suturen, in denen keine Osteoklasten zu finden sind davon ausgehen, dass diese nicht im Begriff sind sich zu schließen (Winograd *et al.*, 1997; Winograd *et al.*, 2001; Vastardis *et al.*, 2004; Regelsberger *et al.*, 2012). Hier könnte auch eine Dominanz der Osteoblasten ohne die Anwesenheit von Osteoklasten ein Indikator für intensives Schädelwachstum sein.

Auf der anderen Seite konnte bei einer physiologischen Fusion einer Suture eine verminderte Expression von RANK verzeichnet werden, welcher ein wichtiger Mediator für die Bildung und Aktivierung von Osteoklasten ist. Gleichermäßen resultiert aus einer Herunterregulierung von RANK eine gesteigerte Knochenbildung in der Suture, welche letztlich die Fusion fördert (Lee *et al.*, 2011). Ein Mangel an Osteoprotegerin, einem Antagonist von RANKL, verhinderte die Fusion einer Suture, welche normalerweise nicht offen bleibt (Beederman *et al.*, 2015). Die Korrelation zwischen der Expression von RANK und der Durchgängigkeit einer Suture deutet auf die Wichtigkeit von Osteoklasten bei der Aufrechterhaltung einer offenen Suture hin. Diese Beobachtung wird auch bei einer Studie an Mäusen mit Osteopetrose bestätigt, bei denen eine Unterfunktion der Osteoklasten eine verfrühte Fusion von kranialen Suturen bewirkt (Kawata *et al.*, 1998). Aus diesem Grund kann die Abwesenheit von Osteoklasten ebenso gut ein Hinweis auf eine beginnende Fusion sein.

In der untersuchten Altersgruppe scheint das Alter der Hunde dabei keine Rolle zu spielen, ob Osteoklasten anwesend waren oder nicht. Trotzdem waren nur fünf von vierzehn Hunden betroffen, bei denen jeweils gleich zwei der fünf untersuchten Suturen keine Osteoklasten beinhalteten. Daher ist anzunehmen, dass bei diesen Hunden zur gegebenen Zeit ein verminderter Knochenmetabolismus besteht. Dies spiegelt sich auch bei der durchschnittlichen Osteoklastenzahl pro Fläche einer Suture wider: die fünf Hunde, bei denen Suturen ohne Osteoklasten zu finden waren, wiesen auch bei den restlichen Suturen eine eher geringe Osteoklastenzahl auf. Da in den Sutura squamosa und Sutura lambdaidea immer Osteoklasten zu finden waren, scheint in diesen Suturen in der untersuchten Altersspanne stets ein gewisser Knochenumbau stattzufinden.

Die Anzahl an Osteoklasten pro Fläche einer Suture weist teilweise je nach Suture erhebliche Unterschiede bei ein und demselben Hund auf. Deshalb kann man davon ausgehen, dass die verschiedenen Suturen am Hundeschädel sich nicht alle gleichzeitig im selben Entwicklungsstadium befinden. Die Suturen, die mehr Osteoklasten aufweisen, zeigen zum selben Zeitpunkt mehr Knochenumbau und dadurch möglicherweise auch eine fortgeschrittene Knochenentwicklung.

Zwei der vierzehn Hunde dieser Studie besitzen eine auffallend hohe Osteoklastendichte bei Betrachtung des Durchschnittswertes aller fünf Suturen. Dabei ist die Dichte an Osteoklasten bei beiden Tieren, insbesondere bei der Sutura interfrontalis und der Sutura sagittalis, am höchsten. Es handelt sich hierbei um den ältesten untersuchten Hund mit 126 Tagen und den 84 Tage alten Mops. Eine Erklärung für die hohe Osteoklastendichte ist eine starke Aktivität des Knochenumbaus. Da ein gesteigerter Knochenmetabolismus mit der Fusion einer Suture in Zusammenhang gebracht wurde, könnten die Suturen, welche wesentlich mehr Osteoklasten aufweisen, im Begriff sein sich zukunftsnahe zu schließen (Winograd *et al.*, 1997; Winograd *et al.*, 2001; Regelsberger *et al.*, 2012). Da bei dem 84 Tage alten Mops teilweise schon fast synostotische Suturen zu finden waren und der älteste Hund der Studie prinzipiell zeitlich näher an dem Sutureschluss dran ist als die weniger alten Tiere, scheint diese Hypothese durchaus naheliegend. Um diese Vermutung weiter zu untermauern müssten allerdings weitaus mehr Suturen von Hunden über 4 Monaten untersucht werden.

Insgesamt ist die Anwesenheit von Osteoklasten in Suturen erst einmal ein Zeichen von Knochenmetabolismus. Die hier untersuchten offenen Suturen, die ein Wachstum des Schädels zulassen, können bei Hunden zwischen ein und vier Monaten sehr unterschiedlich viele Osteoklasten enthalten. Auch das Fehlen von Osteoklasten ist offenbar keine Seltenheit. Ob eine hohe Dichte an Osteoklasten in einer Suture ein Zeichen für die baldige Fusion ist, oder vielmehr an der Aufrechterhaltung ihrer Durchgängigkeit und gleichzeitigem Schädelwachstum mitwirkt, muss in weiteren Studien geklärt werden.

Anhand der Beobachtungen in dieser Studie ist kein Rückschluss von der Osteoklastenmenge außerhalb der Suture (angrenzende Diploe) auf die Menge innerhalb der Suture möglich. Auch Suturen ohne Osteoklasten wiesen im angrenzenden Schädelknochen teilweise eine hohe Anzahl an Osteoklasten auf.

Dies deutet darauf hin, dass die lokalen Wachstumsprozesse der Suture unabhängig von Knochenumbauprozessen im angrenzenden Knochen geschehen.

Die Lokalisation der Osteoklasten an den Knochenrändern der Suturen entspricht ihrer Physiologie und ist daher nicht ungewöhnlich. In verzahnten Suturen konnte man jedoch im Kurvenbereich den Großteil der Osteoklasten im konkaven Bereich antreffen. Dies deckt sich mit Beobachtungen aus einer Studie, die eine starke Aktivität der Osteoklasten an den konkaven Regionen der Suture für die Ausbildung der wellenförmigen Gestalt einer verzahnten Suture verantwortlich macht (Byron, 2006).

Des Weiteren konnte ein erhöhtes Aufkommen von Osteoklasten endokraniel an der Lamina interna der Calvaria beobachtet werden. Die Lamina externa dagegen zeigte keine Anhäufung von Osteoklasten. Diese Beobachtung konnte auch schon bei der Calvaria der Maus in der Nähe der Sutura coronalis gemacht werden. Der Autor brachte die Anreicherung der Osteoklasten an der endokranielen Oberfläche der Calvaria mit einer lokalen Reduzierung der Dickenzunahme des Knochens in Verbindung (Rice *et al.*, 1997). Die Erhaltung der Knochenstärke erfolgt durch eine Balance zwischen osteoklastischer Aktivität auf der endokranielen Oberfläche und osteoblastischer Aktivität auf der ektokranielen Oberfläche. Die größte Resorption der Osteoklasten findet dementsprechend auf der endokranielen Oberfläche der Schädelknochen statt (Weinreb *et al.*, 1990; Huang & Thesleff, 2013). Darüberhinaus wird eine Funktion der Osteoklasten bei der Aufrechterhaltung der Suture vermutet. Die besonders hohe Dichte von aneinandergereihten Osteoklasten auf der endokranielen Oberfläche, die sich in direkter Nähe zu dem endokranielen Ende der Suture befinden, könnte den Schluss des endokranielen Anteils der Suture verhindern (Rice *et al.*, 1997).

Grundsätzlich sind weitere Untersuchungen von Osteoklasten innerhalb von Suturen wünschenswert. Osteoklasten stellen eine gute quantitative Messgröße für die Knochenresorption dar. Nun sind weitere Studien erforderlich, um die Zusammenhänge zwischen der Anwesenheit und Lokalisation von Osteoklasten innerhalb von Suturen und sowohl dem physiologischen als auch dem verfrühten pathologischen Zeitpunkt der Verknöcherung einer Suture zu erforschen.

4.13 Beurteilung der Blutgefäße in Suturen

Die Zählung der Blutgefäße innerhalb der Suture und der Bezug zur Fläche geben eine Aussage über die Dichte der Blutgefäße. Die Anzahl der Blutgefäße pro Fläche einer Suture ist bei allen fünf untersuchten Suturen des gleichen Hundes relativ ähnlich. Insgesamt waren alle ausgewerteten Suturen reich an Blutgefäßen. Da die Suturen während des Wachstums von Schädel und Gehirn als Wachstumszentren des Schädels fungieren, ist eine ausreichende Vaskularisation für die physiologische Knochenbildung unabdingbar. Betrachtet man die einzelnen untersuchten Hunde, dann lassen sich jedoch signifikante Unterschiede feststellen. Dabei zeigen einige Hunden im Schnitt mehr als doppelt so viele Blutgefäße pro Fläche im Vergleich zu anderen Hunden. Solche erheblichen Abweichungen könnten sich durch unterschiedliche Alters- und folglich auch Entwicklungsstadien der Tiere erklären lassen. Es ist bekannt, dass sich die Gefäßversorgung innerhalb der Suture im Laufe der Zeit verändert. Die Anzahl der Blutgefäße nimmt zu und insbesondere bei starkem Schädelwachstum sind viele Blutgefäße vorhanden (Cate *et al.*, 1977; Proff *et al.*, 2006). Die Tiere, die mehr Blutgefäße pro Fläche aufweisen als andere, könnten also gerade in einer Phase von stärkerem Schädelwachstum sein. Da die Dichte der Blutgefäße anfangs erst gering ist, dann zunimmt und mit zunehmender Verknöcherung wieder abnimmt, spielt das Alter der Tiere und die individuelle Entwicklung der Suturen vermutlich auch eine große Rolle. Nicht alle Suturen eines Hundes werden zu einem gegebenen Zeitpunkt auf dem selben Stand sein und gleichaltrige Tiere sind auch nicht zwangsläufig gleich weit in ihrer Entwicklung. Hier sind sicherlich auch Rasseunterschiede von Bedeutung.

Eine Abnahme der Anzahl an Blutgefäßen mit zunehmender Verknöcherung kann in dieser Studie aufgrund der ausgewählten Altersspanne von 1 bis 4 Monaten nicht geprüft werden. Trotzdem zeigte der ungefähr 3 Monate alte Mops, dessen Suturen histologisch schon teilweise synostotisch waren, im Schnitt die wenigstens Blutgefäße. Die vorhandenen Gefäße besaßen allerdings ein auffallend großes Lumen und erstreckten sich teilweise von der einen zur anderen osteogenen Front durch die Suture. Insgesamt zeigten die untersuchten brachycephalen Hunde im Schnitt weniger Blutgefäße als die mesozephalen Vertreter. Diese Beobachtungen sollten in zukünftigen Studien an einer größeren Anzahl brachycephaler Hunde weiter untersucht werden. Die Menge der Blutgefäße und möglicherweise auch ihr

Durchmesser könnten in engem Zusammenhang mit der Fusion einer Suture stehen. So könnte sich dieser Parameter daher als Vergleichsgröße zwischen brachycephalen und mesozephalen Hunden anbieten.

Da die Blutgefäße nicht vermessen wurden, kann bei der Beurteilung ihrer Größe nur ein subjektiver Eindruck angegeben werden. Weiterhin ist das Lumen eines Gefäßes, das sich in einem histologischen Schnitt mit einer Dicke von ca. 7 µm darstellt, nur ein kleiner Abschnitt des gesamten Gefäßes. Da ein Gefäß sich immer in einem dreidimensionalen Raum erstreckt, hat auch die Schnittebene Einfluss auf die Größe des Lumens. Nichtsdestotrotz erscheint die Gesamtheit der Gefäße relativ homogen. Die zentralen Gefäße sind überwiegend kleinlumig, während solche in Ausbuchtungen der osteogenen Fronten größer sind. Bei anderen Spezies wurde eine Größenzunahme der Gefäße im Laufe der Zeit beschrieben (Cate *et al.*, 1977; Proff *et al.*, 2006).

Ausbuchtungen an den osteogenen Fronten, die stets mit einem Blutgefäß assoziiert sind, könnten Areale mit verstärkter Knochenbildung sein, denn einer desmalen Ossifikation in der Schädelfuge geht immer eine Vaskularisation voraus (Zimmermann *et al.*, 1998).

Bei den beiden Hunden, die an einem Hydrozephalus erkrankt waren, fielen großlumige, kavernenartige Blutgefäße auf, die von fingerartig verzahnten Knochenausläufern umgeben waren. Die fingerartige Verzahnung wurde bereits in Kapitel 4.10 als Folge von Krafteinwirkungen auf die Suture diskutiert. Eine Studie von Zimmermann *et al.* erklärt die Anordnung der Blutgefäße innerhalb einer Suture als eine wichtige Voraussetzung für das ineinandergreifende Wachstum des Knochens. Die von den Knochenausläufern eingerahmten Blutgefäße ermöglichen eine knochenfreie Umgebung, in welche das Knochengewebe einwachsen kann (Zimmermann *et al.*, 1998). Insbesondere bei Suturen von Tieren mit Hydrozephalus scheint eine starke Verzahnung aufzutreten und mit der Vaskularisation zu korrelieren.

Die Dichte und die Größe von Blutgefäßen in Suturen des Hundeschädels waren bis jetzt noch nicht Gegenstand der aktuellen Forschung. Weitere Studien diesbezüglich erscheinen jedoch sinnvoll, um eine bessere Aussage über die Bedeutung der Blutgefäße in den Suturen des Hundes treffen zu können.

4.14 Beurteilung von Apoptose in Suturen

Die Suturen fungieren als Wachstumszentren des Schädels und sind somit der Ort, an dem in physiologischem Rahmen Knochenbildung und Knochenumbau stattfinden. Apoptose ist ein wesentlicher Bestandteil von normalen Knochenumbauprozessen sowie der Reparatur und Regeneration von Knochen (Hock *et al.*, 2001). Aus diesem Grund ist die Untersuchung der Suturen auf Apoptose auch beim Hund unerlässlich.

Der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen in den untersuchten Suturen wies eine sehr große Spanne auf. Diese reichte von Suturen mit weniger als 1 % Apoptose bis hin zu Suturen, in denen fast die Hälfte aller Zellen apoptotisch waren. Die Durchschnittswerte der einzelnen Hunde differierten ebenfalls, wenn auch nicht in dem Ausmaß. Die meisten mesozephalen Hunde bewegten sich unter 10 % Apoptose oder nur knapp darüber. Die stete Anwesenheit von Apoptose in einem Gewebe und damit auch in einer Sutur, ist nicht ungewöhnlich. Ein gewisser Anteil an Zellen wird auch unter physiologischen Bedingungen apoptotisch, denn ein Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung und Zellelimination ermöglicht die Gewebehomöostase, deren Aufrechterhaltung essentiell ist (Schmitz & Desel, 2018). Gleichmaßen ist die Anwesenheit von apoptotischen Zellen in Suturen, die zu ihrer normalen Entwicklung beitragen, bereits beschrieben worden (Cate *et al.*, 1977; Bourez *et al.*, 1997; Rice *et al.*, 1999).

Inwiefern das Ausmaß an Apoptose in den untersuchten Suturen als allgemeingültig für Hunde in dieser Altersgruppe erachtet werden kann, sollte durch eine größere Zahl an Studienteilnehmern überprüft werden. Es existieren keine Studien in denen numerische Angaben über physiologische Apoptoseraten in Suturen gemacht werden. Die meisten Studien vermerken lediglich ein vermehrtes oder vermindertes Ausmaß an Apoptose ohne exakte Zahlen zu nennen. Da die Apoptoserate in dieser Studie teils stark variiert, ist der Durchschnittswert aller Hunde von 10,1% kein verlässlicher Wert. Er dient höchstens als Anhaltspunkt, an welchem man stark abweichende Werte in Frage stellen könnte.

Die Unterschiede in der Apoptose betreffen nicht nur die Hunde untereinander, sondern auch verschiedene Suturen eines einzelnen Hundes. Die Tatsache, dass die Suturen eines gleichen Tieres nicht alle auf dem selben Entwicklungsstand sind,

erklärt sich allein dadurch, dass die Suturen nicht alle gleichzeitig verknöchern und sich verschließen (Kapitel 2.2.7). Aus diesem Grund kann auch der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen variieren. Des Weiteren ist Apoptose in Geweben ein dynamischer Parameter, sodass vermutlich auch innerhalb ein und derselben Suture an verschiedenen Stellen nicht einheitliche Werte gefunden werden. Nichtsdestotrotz erscheinen die Werte für das Ausmaß der Apoptose in der Suture zumindest bei den mesozephalen Hunden weitestgehend beständig.

Der Durchschnittswert der brachycephalen Hunde ist allerdings wesentlich höher als der von den mesozephalen Hunden. Dabei stellt sich die Frage, ob ein erhöhtes Maß an Apoptose zu einer Verhinderung oder einer Begünstigung des Fugenschlusses beiträgt. Die Literatur gibt nach jetzigem Stand in dieser Hinsicht leider keine klare Aussage. Einige Autoren bringen die Fusion einer Suture mit einer gesteigerten Apoptose-Rate in Verbindung. Insbesondere künstlich induzierte syndromale Kraniosynostosen wie das Apert-Syndrom wurden in dem Zusammenhang untersucht. Auch Kraftereinwirkungen, die zu einer Fusion führen, bewirkten einen Anstieg von Apoptose in der Suture (Mansukhani *et al.*, 2000; Lemonnier *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003; Holmes *et al.*, 2009; Vij & Mao, 2006; Zhang *et al.*, 2003; Zimmermann *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu zeigten einige Studien, dass Apoptose für die Durchgängigkeit und somit für den offenen Status einer Suture wichtig ist (Furtwängler *et al.*, 1985; Rice *et al.*, 1999; Opperman *et al.*, 2000a; Agresti & Gosain, 2005). Der programmierte Zelltod von Zellen in der Suture soll den Kontakt der osteogenen Fronten verhindern und damit auch die Fusion. Auch eine syndromale Kraniosynostose wurde untersucht und eine signifikante Reduktion der Apoptose-Rate verzeichnet (Dry *et al.*, 2001). Wieder andere Studien konnten keinen Unterschied des Maßes an Apoptose bei einem Vergleich von offenen und fusionierenden Suturen feststellen (Fong *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). Die Vermutung eines verfrühten Fugenschlusses bei brachycephalen Hunden konnte bereits belegt werden (Schmidt *et al.*, 2013; Farke, 2017). Infolgedessen ist die erhöhte Apoptose-Rate bei den brachycephalen Hunden dieser Studie womöglich mit einer zeitnahen Verknöcherung in Zusammenhang zu bringen. Das Alter der untersuchten Hunde in dieser Studie lässt keine Aussage zum Zeitpunkt des Fugenschlusses zu, sondern bietet nur eine Untersuchung zu einem gewissen Zeitpunkt vor dem Schluss. Da der Zeitpunkt des Fugenschlusses aber nicht genau

bekannt ist, steht auch nicht fest, ob die Suturen der brachycephalen Hunde kurz vor der Fusion stehen. Der Abstand zwischen den osteogenen Fronten ist aber teilweise sehr schmal und bei dem untersuchten drei Monate alten Mops ist bei einer der Suturen bereits histologisch eine Synostose zu verzeichnen.

Die durchschnittliche Apoptose-Rate ist bei der Sutura sagittalis am höchsten und bei der Sutura lambdoidea am niedrigsten. Auch hier stellt sich die Frage, ob dadurch eine Aussage über eine bevorstehende Fusion getroffen werden kann. Beim Menschen verknöchert die Sutura frontalis als erste, gefolgt von der Sutura sagittalis. Die Sutura lambdoidea verknöchert erst sehr spät (Schünke *et al.*, 2009). Angenommen die Reihenfolge der Verknöcherung ist beim Hund vergleichbar, dann könnte die niedrige Apoptose-Rate bei der spät verknöchernden Sutura lambdoidea darauf hindeuten, dass eine Fusion mit einer hohen Apoptose-Rate korreliert.

Die verstärkte Anhäufung von apoptotischen Zellen an den Enden der Suture, oder auch nur an einem Ende, könnte ebenfalls darauf hinweisen, dass eine Fusion vom endokranielen oder ektokranielen Ende der Suture ausgeht oder aber gerade dieses Ende an einer Fusion gehindert werden soll. Studien an Mensch und Maus dokumentieren einen endokranielen Beginn der Verknöcherung einer Suture, während eine Studie am Schwein eine ektokraniale Fusion zu Beginn nachweist (Todd & Lyon, 1924; Bradley *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2004). Eine Zuordnung, welches Ende das endo- oder ektokraniale ist, war in dieser Studie in vielen Fällen nicht möglich. Außerdem zeigte auch immer wieder keines der Suturenden oder auch beide Suturenden eine Häufung von TUNEL-positiven Zellen. Eine Beurteilung über die Aussagekraft der Apoptose an den Suturenden kann daher erst vorgenommen werden, wenn man weiß, wann welche Suture beim Hund fusioniert und wie der physiologische morphologische Ablauf der Fusion vonstatten geht.

Bei der Verteilung von apoptotischen Zellen innerhalb der Suture beschreiben viele Studien eine Anhäufung an den Knochenfronten (Furtwängler *et al.*, 1985; Rice, Kim & Thesleff, 1999; Opperman *et al.*, 2000a; Agresti & Gosain, 2005; Holmes *et al.*, 2009). Dies konnte in dieser Studie ebenfalls beobachtet werden. Schon früh wurde die Vermutung geäußert, dass Apoptose an den Rändern der Knochenfronten, die sich zu sehr angenähert haben, den Verschluss der Suture verhindern sollen (Furtwängler *et al.*, 1985; Rice *et al.*, 1999). Mansukhani *et al.* vermuteten, dass der programmierte Zelltod die Mineralisation an den Knochenfronten durch die

Beseitigung von alten Zellen begünstigt. Dies würde dann zu einer Fusion der Suturen führen (Mansukhani *et al.*, 2000). Die Lokalisation der apoptotischen Zellen an den osteogenen Fronten, die bei anderen Spezies und eben auch beim Hund durchgehend beobachtet werden kann, unterliegt sicherlich keiner Willkür. Unabhängig davon, ob die verstärkte Anwesenheit der apoptotischen Zellen an den Knochenfronten die Fuge offen hält oder vielmehr eine Verknöcherung begünstigt, lässt die beständige und scheinbar gezielte Anordnung vermuten, dass Apoptose eine bedeutende Einflussgröße für die Physiologie einer Suture ist. Durch den programmierten Tod von bestimmten Zellen wird das sensible Gleichgewicht innerhalb der Suture aufrechterhalten, welches wichtig ist, um das Schädelwachstum zu gewährleisten, ohne dass es zu einer Verknöcherung kommt.

Bei den randständigen TUNEL-positiven Zellen handelte es sich in dieser Studie hauptsächlich um Osteoblasten. In Studien zur Apoptose in Suturen an der Maus wurden Veränderungen der Apoptoserate ebenfalls vorwiegend bei Osteoblasten beobachtet (Lemonnier *et al.*, 2001; Dry *et al.*, 2001). Apoptose von Osteoblasten gehört zur normalen Homöostase von Knochengewebe unweigerlich dazu. Proliferation und Apoptose regulieren dabei die Anzahl der Osteoblasten. Die genaue Funktion des Absterbens von Osteoblasten ist allerdings bis jetzt noch nicht vollständig geklärt (Jilka *et al.*, 1998; Hock *et al.*, 2001). Die Hauptaufgabe der Osteoblasten an den osteogenen Fronten der Suture besteht in der Bildung von Knochen. Die Osteoklasten als ihre Gegenspieler sorgen zusammen mit den Osteoblasten für die Regeneration und den Knochenumbau. Das Absterben von Osteoblasten bedingt eine verminderte Osteoblastenzahl, wodurch auch das Maß der Knochenbildung reduziert sein könnte (Jilka *et al.*, 1998). Ob die Apoptose von Osteoblasten in Suturen als knochenbildende Zellen einer Fusion entgegenwirkt bleibt allerdings fraglich. Die Knochenformation der Osteoblasten begünstigt das Wachstum der Schädelknochen auch ohne eine Verknöcherung der Fuge zu verursachen. Es kann auch lediglich das Wachstum der Schädelknochen, welche die Suture bilden, verringert sein.

Auch das vermehrte Auftreten von apoptotischen Zellen im konkaven Kurvenbereich bei verzahnten Suturen und in Ausbuchtungen der Suture, wie es in dieser Studie beobachtet wurde, könnte für eine geringere Knochenbildung in diesem Bereich sprechen. Da es sich bei den TUNEL-positiven Zellen insbesondere um

Osteoblasten handelte, reduziert ihr verstärktes Absterben möglicherweise auch hier die Synthese von kollagener Knochenmatrix. Die beiden Lokalisationen könnten für eine Reduktion der Knochenbildung sprechen. Denn Ausbuchtungen der Suturen in den Knochen hinein bedingen eine Verdrängung des Knochens von der eigentlich verlaufenden Knochenkante. Bei den konkaven Bereichen einer verzahnten Suturen könnte eine reduzierte Knochenbildung hilfreich sein, um die Verzahnung zu intensivieren oder beizubehalten.

Trotz der deutlichen Dominanz der randständigen Osteoblasten, welche TUNEL-positiv waren, ließen sich in den eigenen Untersuchungen auch immer wieder positiv angefärbte Zellen mittig in der Suturen finden. Auch die Apoptose zentral in der Suturen wird zweifellos das Gleichgewicht der Suturen beeinflussen und einen Beitrag zu ihrer Aufrechterhaltung leisten. In den Suturen der untersuchten Hunde waren die betroffenen Zellen oftmals als Fibrozyten oder Fibroblasten anzusprechen. Eine Regulation der fibrogenen Matrix ist ebenfalls notwendig, da ein streng reguliertes Gleichgewicht zwischen fibrogenen und osteogenen Zellen Voraussetzung für das Verbleiben der Suturen in einem unverknöcherten Status ist (De Pollack *et al.*, 1996; Mao & Nah, 2004).

Zum Zeitpunkt der Fusion wird sicherlich das Ausmaß an Apoptose, die betroffenen Zellen und die Lokalisation dieser Zellen eine entscheidende Rolle spielen. Die Wichtigkeit einer physiologischen Apoptose ist für alle Gewebe im Körper bekannt und wird auch in den Schädelfugen des Hundes eine bedeutende Aufgabe erfüllen. Für eine abschließende Beurteilung der Funktion von Apoptose in Suturen bedarf es allerdings nicht nur beim Hund weiterer Forschung - sowohl am physiologischen als auch am pathologischen Fugenschluss, wie es beispielsweise bei Kraniosynostosen der Fall ist. Weitere Studien über Apoptose in Suturen auch im Hinblick auf die Brachycephalie des Hundes sind wünschenswert.

4.15 Schlussfolgerung und Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit ist es gelungen eine systematische Beschreibung von Schädelsuturen des Hundes auf morphologischer wie auch auf geweblicher und zellulärer Ebene zu etablieren. Die erarbeiteten Resultate ergänzen nicht nur

vorangegangene Forschungsarbeiten (Schmidt *et al.*, 2013; Farke, 2017) zur Relevanz der morphologischen Dynamik von Schädelsturen bei der Entstehung von Malformationen des Schädels, sondern stellen auch eine methodische Basis für weiterführende, vergleichende Studien zur caninen Schädelentwicklung an ausgewählten Altersgruppen und Rassen dar.

Apoptose, Osteoklasten und Blutgefäße innerhalb der Sturen des Schädels sind gut zu untersuchende Parameter und sollten in weiteren Studien bei der Suche nach der Ursache für die kanine Brachycephalie mit einbezogen werden. Wenn sich gewisse Zellen oder Abläufe bei brachycephalen von mesozephalen Hunden unterscheiden, könnte dies auf einen Defekt bestimmter Gene hindeuten. Durch genomweite Analysen könnten Kandidatengene ausfindig gemacht werden, welche zelluläre Prozesse bei brachycephalen Hunden beeinflussen, und somit der genetische Hintergrund weiter erforscht werden.

Insbesondere im Hinblick auf die gesundheitlichen Probleme, die mit der kaninen Brachycephalie einhergehen, und der sich daraus entwickelten Diskussion über den Aspekt der Qualzucht, ist eine weiterführende Forschung wünschenswert.

5 Zusammenfassung

Suturen fungieren als Wachstumszentren des Schädels und ermöglichen auch nach der Geburt ein fortwährendes Wachstum der Schädelknochen. Voraussetzung ist, dass sie für eine bestimmte Zeit in einem unverknöcherten, offenen Zustand bleiben. In der Humanmedizin ist bekannt, dass zeitliche Abweichungen im Schluss der Schädeluturen zu Deformationen der normalen Schädelform führen. Studien geben Hinweise darauf, dass der brachyzepale Schädeltyp von Hunden ebenfalls auf eine frühzeitige Verknöcherung verschiedener Schädelwachstumszonen zurückzuführen ist. Wichtig erscheinen in dem Zusammenhang auch Veränderungen auf zellulärer Ebene, die histologisch und immunhistochemisch gezeigt werden können. Kollagenfasern, Blutgefäße, Osteoklasten und Apoptose beeinflussen die Entwicklung von Suturen.

Ziel dieser Studie ist eine morphologisch histologische Beschreibung der Schädelwachstumsfugen des Hundes um die Morphologie und Entwicklung der Schädelwachstumsfugen bei Hunden unterschiedlicher Schädeltypen zu beschreiben und zu definieren. Die Darstellung von Osteoklasten, Kollagenfasern, Blutgefäßen und apoptotischen Zellen soll eine Deskription auf zellulärer Ebene ermöglichen.

Die Suturen von 14 Hunden im Alter von 1 bis 4 Monaten wurden untersucht. Dabei lag der Fokus auf 5 Suturen: Sutura interfrontalis, Sutura sagittalis, Sutura coronalis, Sutura squamosa und Sutura lambdoidea. Die Schnittpräparate wurden histologisch, enzym- und immunhistochemisch untersucht. Es gelang eine umfassende Beschreibung der Suturen des Hundeschädels im Alter von 1 bis 4 Monaten.

Sowohl erhobene morphologische Daten (Suturverlauf) als auch morphometrische Daten (Breite des Suturspaltes) weisen auf positionstypische und vom Schädeltyp abhängige Charakteristika hin.

Die Kollagenfasern innerhalb der Sutura scheinen an die Zugrichtung der Kräfte, die auf die Sutura wirken, angepasst zu sein. Je stärker die Verzahnung, umso schräger sind die Fasern zu den Knochenfronten angeordnet. Mithilfe der Piko-Siriusrot-

Färbung wurde eine Verwebung der Kollagenfasern in alle drei Raumrichtungen ersichtlich.

Bei 5 von 14 Hunden konnte in jeweils zwei der fünf untersuchten Suturen keine osteoklastische Aktivität verzeichnet werden. In der Sutura lambdoidea und Sutura squamosa waren immer Osteoklasten zu finden. Die Anzahl der Osteoklasten innerhalb der Suturen war sehr inhomogen. Osteoklasten sind insbesondere im konkaven Kurvenverlauf an den osteogenen Fronten und in Ausbuchtungen, welche mit einem Blutgefäß assoziiert sind, lokalisiert.

Blutgefäße liegen in der Sutura hauptsächlich zentral und sind überwiegend kleinlumig. Bei verzahnten Suturen sind die Blutgefäße in Kurven jedoch vermehrt randständig und im konkaven Kurvenbereich angeordnet. Ausbuchtungen sind stets mit einem oder mehreren großlumigeren Blutgefäßen assoziiert. Bei brachycephalen Rassen waren die Blutgefäße auffallend weitlumiger und erstreckten sich teilweise über die gesamte Breite der Sutura.

Apoptotische Zellen häuften sich bei 30 von 51 ausgewerteten Suturen an einem oder an beiden Enden der Sutura an. Innerhalb der Sutura konnten vor allem randständige Osteoblasten als apoptotisch angesprochen werden. Insbesondere in Ausbuchtungen und konkaven Kurvenbereichen war eine vermehrte Anzahl apoptotischer Zellen vorhanden.

Mit der vorliegenden Arbeit ist es gelungen eine systematische Beschreibung von Schädeluturen des Hundes auf morphologischer wie auch auf geweblicher und zellulärer Ebene zu etablieren. Die erarbeiteten Resultate dienen als methodische Basis für weiterführende, vergleichende Studien zur caninen Schädelentwicklung an ausgewählten Altersgruppen und Rassen.

6 Summary

Cranial sutures function as growth centres of the skull and allow a continual growth of the cranial bones after birth. Therefore the sutures are required to maintain in an unossified, open status. In human medicine temporal aberrations in the closure time of cranial sutures are known to lead to deformations of the normal skull shape. There are studies that indicate that the brachycephalic skull type of dogs is attributed to premature closure of cranial sutures and cranial base synchondroses. In this context variations of the cellular level which can be shown histological and immunohistochemical seems to be important. Collagen fibers, blood vessels, osteoclasts and apoptosis impact the sutural development.

The objective of the present study was the morphological and histological examination of the dogs cranial sutures to highlight and define the morphology and development of different skull types of the dog. The account of osteoclasts, collagen fibers, blood vessels and apoptotic cells allows a description on a cellular level.

Sutures of 14 dogs between the ages of 1 to 4 months were examined. It was focused on 5 sutures: sutura interfrontalis, sutura sagittalis, sutura coronalis, sutura squamosa und sutura lambdoidea. Section preparations were used for histology, enzyme histochemistry and immunohistochemistry studies. It showed a comprehensive evaluation of the sutures from the dogs skull in the age of 1 to 4 months.

Collected morphological data (course of suture) as well as morphometric data (width of suture) exhibit position-typical and skulltype dependent characteristics.

The collagen fibers seem to match the direction of compression and tension which affects the suture. The more intense the sutural interdigitation, the more diagonally-angled the arrangement of the fibres relative to the suture edges. Using Picrosirius Red Staining the enmeshment of collagen fibers in all three directions of space became evident.

Five out of fourteen dogs didn't show any osteoclastic activity in two of the five evaluated sutures. Osteoclasts were always found in lambdoid suture and squamosal suture. The amount of osteoclasts in the suture was quite inhomogeneous. Osteoclasts show the greatest activity along concave suture regions of the osteogenic fronts and also in suture bulges that are associated with blood vessels.

Blood vessels within the suture are mostly located centrally and have a small lumen. In case of interdigitated sutures the blood vessels are mostly marginal arranged and along concave suture regions. Suture bulges always come along with one or more vessel with bigger lumen size. The sutural blood vessels of brachycephalic breeds are conspicuously larger and extend over the whole suture width.

In 30 out of 51 evaluated sutures apoptotic cells accumulate in the area of one or both suture endings. Within the suture particularly marginal osteoblasts are apoptotic. Especially suture bulges and concave suture regions showed a larger amount of apoptotic cells.

This study provides a systematic description of cranial sutures of the dog on a morphological and as well cellular level. The compiled results serve as a methodical basis for pursued, comparative studies of canine skull development with selected age groups and breeds.

Literaturverzeichnis

- Agresti, M. & Gosain, A.K. (2005) Detection of apoptosis in fusing versus nonfusing mouse cranial sutures. *Journal of Craniofacial Surgery*. 16 (4), pp. 572–578.
- Alroy, J., Orgad, U., DeGasperi, R., Richard, R., Warren, C.D., Knowles, K., Thalhammer, J.G. & Raghavan, S.S. (1992) Canine GM1-gangliosidosis. A clinical, morphologic, histochemical, and biochemical comparison of two different models. *The American journal of pathology*. 140 (3), pp. 675.
- Andreis, M.E., Polito, U., Veronesi, M.C., Faustini, M., Di Giancamillo, M. & Modena, S.C. (2018) Novel contributions in canine craniometry: Anatomic and radiographic measurements in newborn puppies. Carlos E Ambrósio (ed.). *PLoS one*. 13 (5), pp. e0196959.
- Azoury, S.C., Reddy, S., Shukla, V. & Deng, C.-X. (2017) Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2) Mutation Related Syndromic Craniosynostosis. *International journal of biological sciences*. 13 (12), pp. 1479–1488.
- Bannasch, D., Young, A., Myers, J., Truvé, K., Dickinson, P., Gregg, J., Davis, R., Bongcam-Rudloff, E., Webster, M.T., Lindblad-Toh, K. & Pedersen, N. (2010) Localization of canine brachycephaly using an across breed mapping approach. *PLoS one*. 5 (3), pp. e9632.
- Bar-Shavit, Z. (2007) The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *Journal of Cellular Biochemistry*. 102 (5), pp. 1130–1139.
- Beederman, M., Farina, E.M. & Reid, R.R. (2014) Molecular basis of cranial suture biology and disease: Osteoblastic and osteoclastic perspectives. *Genes & diseases*. 1 (1), pp. 120–125.
- Beederman, M., Kim, S.H., Rogers, M.R., Lyon, S.M., He, T.-C. & Reid, R.R. (2015) Osteoprotegerin deficiency results in disruption of posterofrontal suture closure in mice: implications in nonsyndromic craniosynostosis. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 135 (6), pp. 990e–999e.
- Biel, M., Kramer, M., Forterre, F., Jurina, K., Lautersack, O., Failing, K. & Schmidt, M.J. (2013) Outcome of ventriculoperitoneal shunt implantation for treatment of congenital internal hydrocephalus in dogs and cats: 36 cases (2001–2009). [dx.doi.org](https://doi.org/10.1186/1745-6215-36-1).
- Bourez, R.L.J.H., Mathijssen, I.M.J., Vaandrager, J.M. & Vermeij-Keers, C. (1997) Apoptotic Cell Death During Normal Embryogenesis of the Coronal Suture. *Journal of Craniofacial Surgery*. 8 (6), pp. 441–445.
- Böcker, W., Denk, H., Heitz, P.U., Moch, H., Höfler, G. & Kreipe, H. (2012) *Patholo-*

- gie. 5. Auflage, Urban & Fischer Verlag, 12-13 und 31-33.
- Bradley, J.P., Levine, J.P., Blewett, C., Krummel, T., McCarthy, J.G. & Longaker, M.T. (1996) Studies in Cranial Suture Biology: In Vitro Cranial Suture Fusion. *The Cleft palate-craniofacial journal : official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association*. 33 (2), pp. 150–156.
- Brandi, M.L. & Collin-Osdoby, P. (2006) Vascular biology and the skeleton. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 21 (2), pp. 183–192.
- Brehm, V.H., Loeffler, K. & Komeyli, H. (1985) Schädelformen beim Hund. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 14 (4), pp. 324–331.
- Buezas, G., Becerra, F. & Vassallo, A. (2017) Cranial suture complexity in caviomorph rodents (Rodentia; Ctenohystrica). *Journal of Morphology*. 278 (8), pp. 1125–1136.
- Burrows, A.M., O'Loughlin, V.D., Mooney, M.P., Smith, T.D., Losken, H.W. & Siegel, M.I. (2001) Endocranial vascular patterns in a familial rabbit model of coronal suture synostosis. *The Cleft palate-craniofacial journal : official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association*. 38 (6), pp. 615–621.
- Byron, C.D. (2006) Role of the osteoclast in cranial suture waveform patterning. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*. 288 (5), pp. 552–563.
- Byron, C.D., Borke, J., Yu, J., Pashley, D., Wingard, C.J. & Hamrick, M. (2004) Effects of increased muscle mass on mouse sagittal suture morphology and mechanics. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*. 279A (1), pp. 676–684.
- Carrera, I., Dennis, R., Mellor, D.J., Penderis, J. & Sullivan, M. (2009) Use of magnetic resonance imaging for morphometric analysis of the caudal cranial fossa in Cavalier King Charles Spaniels. *dx.doi.org*.
- Cate, Ten, A.R., Freeman, E. & Dickinson, J.B. (1977) Sutural development: structure and its response to rapid expansion. *American Journal of Orthodontics*. 71 (6), pp. 622–636.
- Cendekiawan, T., Wong, R.W.K. & Rabie, A.B.M. (2010) Relationships Between Cranial Base Synchondroses and Craniofacial Development: A Review. *The Open Anatomy Journal*. 2 (1), pp. 67–75.
- Chen, L., Adar, R., Yang, X., Monsonego, E.O., Li, C., Hauschka, P.V., Yayon, A. & Deng, C.X. (1999) Gly369Cys mutation in mouse FGFR3 causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 104 (11), pp. 1517–1525.
- Chen, L., Li, D., Li, C., Engel, A. & Deng, C.-X. (2003) A Ser250Trp substitution in mouse fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) results in craniosynostosis. *Bone*. 33 (2), pp. 169–178.

- Cinalli, G., Sainte-Rose, C., Kollar, E.M., Zerah, M., Brunelle, F., Chumas, P., Arnaud, E., Marchac, D., Pierre-Kahn, A. & Renier, D. (1998) Hydrocephalus and craniosynostosis. *Journal of neurosurgery*. 88 (2), pp. 209–214.
- Cohen, M.M. (1979) Craniosynostosis and syndromes with craniosynostosis: incidence, genetics, penetrance, variability, and new syndrome updating. *Birth defects original article series*. 15 (5B), pp. 13–63.
- Cohen, M.M. (1993) Sutural biology and the correlates of craniosynostosis. *American Journal of Medical Genetics*. 47 (5), pp. 581–616.
- Cohen, M.M. & Kreiborg, S. (1996) Suture formation, premature sutural fusion, and suture default zones in Apert syndrome. *American Journal of Medical Genetics*. 62 (4), pp. 339–344.
- Cohen, M.M., Walker, G.F. & Phillips, C. (1985) A morphometric analysis of the craniofacial configuration in achondroplasia. [online]. *Journal of craniofacial genetics and developmental biology. Supplement*. 1pp. 139–165.
- Constantine, V.S. & Mowry, R.W. (1968) Selective staining of human dermal collagen. II. The use of picosirius red F3BA with polarization microscopy. *Journal of Investigative Dermatology*. 50 (5), pp. 419–423.
- Couly, G.F., Coltey, P.M. & Le Douarin, N.M. (1993) The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras. *Development*. 117 (2), pp. 409–429.
- Davis, M.S., Cummings, S.L. & Payton, M.E. (2017) Effect of brachycephaly and body condition score on respiratory thermoregulation of healthy dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 251 (10), pp. 1160–1165.
- De Pollack, C., Renier, D., Hott, M. & Marie, P.J. (1996) Increased bone formation and osteoblastic cell phenotype in premature cranial suture ossification (craniosynostosis). *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 11 (3), pp. 401–407.
- de Stefani, A., de Risio, L., Platt, S.R., Matiasek, L., Pascual, A.L.F. & Garosi, L.S. (2011) Surgical Technique, Postoperative Complications and Outcome in 14 Dogs Treated for Hydrocephalus by Ventriculoperitoneal Shunting. *Veterinary Surgery*. 40 (2), pp. 183–191.
- Decker, J.D. & Hall, S.H. (1985) Light and electron microscopy of the new born sagittal suture. *The Anatomical Record*. 212 (1), pp. 81–89.
- Dry, G.M., Yasinskaya, Y.I., Williams, J.K., Ehrlich, G.D., Preston, R.A., Hu, F.Z., Gruss, J.S., Ellenbogen, R.G. & Cunningham, M.L. (2001) Inhibition of apoptosis: a potential mechanism for syndromic craniosynostosis. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 107 (2), pp. 425–432.
- Ducy, P., Starbuck, M., Priemel, M., Shen, J., Pinero, G., Geoffroy, V., Amling, M. & Karsenty, G. (1999) A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes & development*. 13 (8), pp. 1025–1036.

- Ellenberger, W. & Baum, H. (2013) *Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere*. Berlin: Springer-Verlag, 73-80.
- Ellis, J.L., Thomason, J., Kebreab, E., Zubair, K. & France, J. (2009) Cranial dimensions and forces of biting in the domestic dog. *Journal of Anatomy*. 214 (3), pp. 362–373.
- Eswarakumar, V.P., Lax, I. & Schlessinger, J. (2005) Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine & growth factor reviews*. 16 (2), pp. 139–149.
- Evans, H.E. & DeLahunta, A. (2012) *Miller's Anatomy of the Dog*. Philadelphia: Saunders, 1: 26-41, 83-110 und 158-162.
- Farke, D. (2017) Suturen und Synchronrosen am Hundeschädel : ein Vergleich meso- und brachycephaler Rassen mittels Magnetresonanztomographie, Computertomographie und Histologie. *GEB-IDN/13430*.
- Filipowska, J., Tomaszewski, K.A., Niedźwiedzki, Ł., Walocha, J.A. & Niedźwiedzki, T. (2017) The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning. *Angiogenesis*. 20 (3), pp. 291–302.
- Fitch, N. (1961) A mutation in mice producing dwarfism, brachycephaly, cleft palate and micromelia. *Journal of Morphology*. 109 (2), pp. 141–149.
- Fong, K.D., Song, H.M., Nacamuli, R.P., Franc, B.L., Mari, C., Fang, T.D., Warren, S.M., Contag, C.H., Blankenberg, F.G. & Longaker, M.T. (2004) Apoptosis in a Rodent Model of Cranial Suture Fusion: In Situ Imaging and Gene Expression Analysis. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 113 (7), pp. 2037.
- Fragale, A., Tartaglia, M., Bernardini, S., Di Stasi, A.M., Di Rocco, C., Velardi, F., Teti, A., Battaglia, P.A. & Migliaccio, S. (1999) Decreased proliferation and altered differentiation in osteoblasts from genetically and clinically distinct cranio-synostotic disorders. *The American journal of pathology*. 154 (5), pp. 1465–1477.
- Fricke-Zech, S., Gruber, R.M., Dullin, C., Zapf, A., Kramer, F.-J., Kubein-Meesenburg, D. & Hahn, W. (2011) *Measurement of the midpalatal suture width*. A comparison of flat-panel volume computed tomography to histomorphometric analysis in a porcine model.
- Furtwängler, J.A., Hall, S.H. & Koskinen-Moffett, L.K. (1985) Sutural Morphogenesis in the Mouse Calvaria: The Role of Apoptosis. *Cells Tissues Organs*. 124 (1-2), pp. 74–80.
- Gagan, J.R., Tholpady, S.S. & Ogle, R.C. (2007) Cellular dynamics and tissue interactions of the dura mater during head development. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*. 81 (4), pp. 297–304.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Bensasson, S.A. (1992) Identification of Programmed Cell-Death Insitu via Specific Labeling of Nuclear-Dna Fragmentation. *The Journal of Cell Biology*. 119 (3), pp. 493–501.
- Geiger, M. & Haussman, S. (2016) Cranial Suture Closure in Domestic Dog Breeds

- and Its Relationships to Skull Morphology. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*. 299 (4), pp. 412–420.
- Goodwin, D., Bradshaw, J.W.S. & Wickens, S.M. (1997) Paedomorphosis affects agonistic visual signals of domestic dogs. *Animal Behaviour*. 53 (2), pp. 297–304.
- Greenwald, J.A., Mehrara, B.J., Spector, J.A., Warren, S.M., Fagenholz, P.J., Smith, L.P., Bouletreau, P.J., Crisera, F.E., Ueno, H. & Longaker, M.T. (2001) In Vivo Modulation of FGF Biological Activity Alters Cranial Suture Fate. *The American journal of pathology*. 158 (2), pp. 441–452.
- Guo, Y., Yuan, Y., Wu, L., Ho, T.-V., Jing, J., Sugii, H., Li, J., Han, X., Feng, J., Guo, C. & Chai, Y. (2018) BMP-IHH-mediated interplay between mesenchymal stem cells and osteoclasts supports calvarial bone homeostasis and repair. *Bone research*. 6 (1), pp. 30.
- Hackshaw, A., Rodeck, C. & Boniface, S. (2011) Maternal smoking in pregnancy and birth defects: a systematic review based on 173 687 malformed cases and 11.7 million controls. *Human reproduction update*. 17 (5), pp. 589–604.
- Haskins, M.E. (1991) Animal model of human disease: mucopolysaccharidosis type VII (Sly syndrome). Beta-glucuronidase-deficient mucopolysaccharidosis in the dog. *American Journal of Pathology*.
- Haworth, K., Breen, M., Binns, M., Hopkinson, D.A. & Edwards, Y.H. (2001a) The canine homeobox gene *MSX2*: sequence, chromosome assignment and genetic analysis in dogs of different breeds. *Animal genetics*. 32 (1), pp. 32–36.
- Haworth, K.E., Islam, I., Breen, M., Putt, W., Makrinou, E., Binns, M., Hopkinson, D. & Edwards, Y. (2001b) Canine *TCOF1*; cloning, chromosome assignment and genetic analysis in dogs with different head types. *Mammalian Genome*. 12 (8), pp. 622–629.
- Hecht, S. (2012) *Röntgendiagnostik in der Kleintierpraxis*. 2. Auflage, Stuttgart: Schattauer Verlag, 316.
- Herring, S.W. (1972) Sutures--a tool in functional cranial analysis. *Acta anatomica*. 83 (2), pp. 222–247.
- Herring, S.W. & Ochareon, P. (2005) Bone--special problems of the craniofacial region. *Orthodontics & craniofacial research*. 8 (3), pp. 174–182.
- Herring, S.W. & Teng, S. (2000) Strain in the braincase and its sutures during function. *American Journal of Physical Anthropology*. 112 (4), pp. 575–593.
- Hock, J.M., Krishnan, V., Onyia, J.E., Bidwell, J.P., Milas, J. & Stanislaus, D. (2001) Osteoblast Apoptosis and Bone Turnover. *Journal of Bone and Mineral Research*. 16 (6), pp. 975–984.
- Holmes, G., Rothschild, G., Roy, U.B., Deng, C.-X., Mansukhani, A. & Basilico, C. (2009) Early onset of craniosynostosis in an Apert mouse model reveals critical

- features of this pathology. *Developmental Biology*. 328 (2), pp. 273–284.
- Howie, R.N., Durham, E.L., Black, L., one, G.B.P.2016 (2016) Effects of in utero thyroxine exposure on murine cranial suture growth. *Journals.plos.org*
- Huang, G.T.J. & Thesleff, I. (2013) *Stem Cells in Craniofacial Development and Regeneration*. John Wiley & Sons.
- Hünemeier, T., Salzano, F.M. & Bortolini, M.C. (2009) TCOF1 T/Ser variant and brachycephaly in dogs. *Animal genetics*. 40 (3), pp. 357–358.
- Iseki, S., Wilkie, A.O. & Morriss-Kay, G.M. (1999) Fgfr1 and Fgfr2 have distinct differentiation- and proliferation-related roles in the developing mouse skull vault. *Development*. 126 (24), pp. 5611–5620.
- Iseki, S., Wilkie, A.O., Heath, J.K., Ishimaru, T., Eto, K. & Morriss-Kay, G.M. (1997) Fgfr2 and osteopontin domains in the developing skull vault are mutually exclusive and can be altered by locally applied FGF2. *Development*. 124 (17), pp. 3375–3384.
- James, A.W., Levi, B., Xu, Y., Carre, A.L. & Longaker, M.T. (2010) Retinoic acid enhances osteogenesis in cranial suture-derived mesenchymal cells: potential mechanisms of retinoid-induced craniosynostosis. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 125 (5), pp. 1352–1361.
- Jasinowski, S.C., Reddy, B.D., Louw, K.K. & Chinsamy, A. (2010) Mechanics of cranial sutures using the finite element method. *Journal of Biomechanics*. 43 (16), pp. 3104–3111.
- Jaslow, C.R. (1990) Mechanical properties of cranial sutures. *Journal of Biomechanics*. 23 (4), pp. 313–321.
- Jentink, J., Loane, M.A., Dolk, H., Barisic, I., Garne, E., Morris, J.K., de Jong-van den Berg, L.T.W.EUROCAT Antiepileptic Study Working Group (2010) Valproic acid monotherapy in pregnancy and major congenital malformations. *The New England journal of medicine*. 362 (23), pp. 2185–2193.
- Jiang, X., Iseki, S., Maxson, R.E., Sucov, H.M. & Morriss-Kay, G.M. (2002) Tissue origins and interactions in the mammalian skull vault. *Developmental Biology*. 241 (1), pp. 106–116.
- Jilka, R.L., Weinstein, R.S., Bellido, T., Parfitt, A.M. & Manolagas, S.C. (1998) Osteoblast Programmed Cell Death (Apoptosis): Modulation by Growth Factors and Cytokines. *Journal of Bone and Mineral Research*. 13 (5), pp. 793–802.
- Jin, S.-W., Sim, K.-B. & Kim, S.-D. (2016) Development and Growth of the Normal Cranial Vault : An Embryologic Review. *Journal of Korean Neurosurgical Society*. 59 (3), pp. 192–196.
- Johnson, D., Iseki, S., Wilkie, A. & Morriss-Kay, G. (2000) Expression patterns of Twist and Fgfr1, -2 and -3 in the developing mouse coronal suture suggest a key role for Twist in suture initiation and biogenesis. *Mechanisms of Development*. 91

(1-2), pp. 341–345.

- Julian, L.M., Tyler, W.S., Hage, T.J. & Gregory, P.W. (1957) Premature closure of the spheno-occipital synchondrosis in the horned Hereford dwarf of the short-headed variety. *The American journal of anatomy*. 100 (2), pp. 269–287.
- Junqueira, L.C.U., Bignolas, G. & Brentani, R.R. (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical Journal*. 11 (4), pp. 447–455.
- Kawata, T., Tokimasa, C., Fujita, T., Kawasoko, S., Kaku, M., Sugiyama, H. & Tanne, K. (1998) Midpalatal suture of osteopetrotic (op/op) mice exhibits immature fusion. *Experimental animals*. 47 (4), pp. 277–281.
- Kim, H.J., Rice, D.P., Kettunen, P.J. & Thesleff, I. (1998) FGF-, BMP- and Shh-mediated signalling pathways in the regulation of cranial suture morphogenesis and calvarial bone development. *Development*. 125 (7), pp. 1241–1251.
- Kopher, R.A. & Mao, J.J. (2003) Suture Growth Modulated by the Oscillatory Component of Micromechanical Strain. *Journal of Bone and Mineral Research*. 18 (3), pp. 521–528.
- Koskinen, L., Isotupa, K. & Koski, K. (1976) A note on craniofacial sutural growth. *American Journal of Physical Anthropology*. 45 (3), pp. 511–516.
- Köhler, C., Menzel, A.K., Alef, M., Oechtering, G. & Kiefer, I. (2016) Vergleich der Gaumensegeldicken von normo- und brachycephalen Hunden mit Atemnotsyndrom anhand sagittaler CT-Bilder des Kopfes. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 129. 9pp. 444–452.
- König, H.E. (2012) *Anatomie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praixs*. 5. Auflage, Stuttgart: Schattauer Verlag 9-20 und 47-76.
- Kutkowska-Kaźmierczak, A., Gos, M. & Obersztyn, E. (2018) Craniosynostosis as a clinical and diagnostic problem: molecular pathology and genetic counseling. *Journal of applied genetics*. 23 (2), pp. 135–15.
- Lang, G. (2006) *Histotechnik. Praixslehrbuch für die biomedizinische Analytik*. Wien: Springer Science & Business Media, 198 und 238.
- Lattouf, R., Younes, R., Lutomski, D., Naaman, N., Godeau, G., Senni, K. & Changotade, S. (2014) Picrosirius Red Staining. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 62 (10), pp. 751–758.
- Lee, J.C., Spiguel, L., Shenaq, D.S., Zhong, M., Wietholt, C., He, T.-C. & Reid, R.R. (2011) Role of RANK-RANKL-OPG axis in cranial suture homeostasis. *The Journal of craniofacial surgery*. 22 (2), pp. 699–705.
- Lemonnier, J., Haÿ, E., Delannoy, P., Fromigué, O., Lomri, A., Modrowski, D. & Marie, P.J. (2001) Increased osteoblast apoptosis in apert craniosynostosis: role of protein kinase C and interleukin-1. *The American journal of pathology*. 158 (5), pp. 1833–1842.

- Lenton, K.A., Nacamuli, R.P., Wan, D.C., Helms, J.A. & Longaker, M.T. (2005) Cranial suture biology. *Current topics in developmental biology*. 66pp. 287–328.
- Levi, B., Wan, D.C., Wong, V.W., Nelson, E., Hyun, J. & Longaker, M.T. (2012) Cranial suture biology: from pathways to patient care. *The Journal of craniofacial surgery*. 23 (1), pp. 13–19.
- Levine, J.P., Bradley, J.P., Roth, D.A., McCarthy, J.G. & Longaker, M.T. (1998) Studies in cranial suture biology: regional dura mater determines overlying suture biology. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 101 (6), pp. 1441–1447.
- Lin, D.K.Y., Nolen, M.A.A., Gampper, D.T.J., Jane, D.J.A., Opperman, D.L.A. & Ogle, D.R.C. (2017) Elevated Levels of Transforming Growth Factors Beta 2 and Beta 3 in Lambdoid Sutures from Children with Persistent Plagiocephaly: *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 34 (4), pp. 331–337.
- Liu, N.-C., Troconis, E.L., Kalmar, L., Price, D.J., Wright, H.E., Adams, V.J., Sargan, D.R. & Ladlow, J.F. (2017) Conformational risk factors of brachycephalic obstructive airway syndrome (BOAS) in pugs, French bulldogs, and bulldogs. *PLoS one*. 12 (8), pp. e0181928.
- Liu, Y.H., Tang, Z., Kundu, R.K., Wu, L., Luo, W., Zhu, D., Sangiorgi, F., Snead, M.L. & Maxson, R.E. (1999) Msx2 gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull: a possible mechanism for MSX2-mediated craniosynostosis in humans. *Developmental Biology*. 205 (2), pp. 260–274.
- Lomri, A., Lemonnier, J., Hott, M., de Parseval, N., Lajeunie, E., Munnich, A., Renier, D. & Marie, P.J. (1998) Increased calvaria cell differentiation and bone matrix formation induced by fibroblast growth factor receptor 2 mutations in Apert syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 101 (6), pp. 1310–1317.
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M. & Myrtek, D. (2014) *Der Experimentator: Immunologie*. 4. Auflage, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 156-166.
- Lüllmann-Rauch, R. (2009) *Taschenlehrbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag.
- Mackensen, H., Furler-Mihali, A., Moritz, J., Rickert, D. & Cermak, R. (2017) Beurteilung von brachycephalen Hunderassen hinsichtlich Qualzuchtmerkmalen am Beispiel des Mopses. *Deutsches Tierärzteblatt*. 65 (2), pp. 910–915.
- Mansukhani, A., Bellosta, P., Sahni, M. & Basilico, C. (2000) Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. *The Journal of Cell Biology*. 149 (6), pp. 1297–1308.
- Mao, J.J. & Nah, H.D. (2004) Growth and development: hereditary and mechanical modulations. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 125 (6), pp. 676–689.
- Marchant, T.W., Johnson, E.J., McTeir, L., Johnson, C.I., Gow, A., Liuti, T., Kuehn,

- D., Svenson, K., Bermingham, M.L., Drögemüller, M., Nussbaumer, M., Davey, M.G., Argyle, D.J., Powell, R.M., et al. (2017) Canine Brachycephaly Is Associated with a Retrotransposon-Mediated Missplicing of SMOC2. *Current biology : CB.* 27 (11), pp. 1573–1584.e1576.
- Marks, S.C., Lundmark, C., Wurtz, T., Odgren, P.R., MacKay, C.A., Savas, A.M. & Popoff, S.N. (1999) Facial development and type III collagen RNA expression: Concurrent repression in the osteopetrotic (Toothless, *tl*) rat and rescue after treatment with colony-stimulating factor-1. *Developmental Dynamics.* 215 (2), pp. 117–125.
- Mathijssen, I.M., van Leeuwen, H., Vermeij-Keers, C. & Vaandrager, J.M. (2001) *FGF-4* or *FGF-2* administration induces apoptosis, collagen type I expression, and mineralization in the developing coronal suture. In: July 2001 pp. pp. 399–400.
- Maxhimer, J.B., Bradley, J.P. & Lee, J.C. (2015) Signaling pathways in osteogenesis and osteoclastogenesis: Lessons from cranial sutures and applications to regenerative medicine. *Genes & diseases.* 2 (1), pp. 57–68.
- McGreevy, P., Grassi, T.D. & Harman, A.M. (2004) A strong correlation exists between the distribution of retinal ganglion cells and nose length in the dog. *Brain, behavior and evolution.* 63 (1), pp. 13–22.
- Meola, S.D. (2013) Brachycephalic Airway Syndrome. *Topics in Companion Animal Medicine.* 28 (3), pp. 91–96.
- Migheli, A., Attanasio, A. & Schiffer, D. (1995) Ultrastructural detection of DNA strand breaks in apoptotic neural cells by in situ end-labelling techniques. *The Journal of pathology.* 176 (1), pp. 27–35.
- Mishina, Y. & Snider, T.N. (2014) Neural crest cell signaling pathways critical to cranial bone development and pathology. *Experimental cell research.* 325 (2), pp. 138–147.
- Mitchell, L.A., Kitley, C.A., Armitage, T.L., Krasnokutsky, M.V. & Rooks, V.J. (2011) Normal Sagittal and Coronal Suture Widths by Using CT Imaging. *AJNR. American journal of neuroradiology.* 32 (10), pp. 1801–1805.
- Monteiro, L.R. & Lessa, L.G. (2000) Comparative analysis of cranial suture complexity in the genus *Caiman* (Crocodylia, alligatoridae). *Revista Brasileira de Biologia.* 60 (4), pp. 689–694.
- Montes, G.S., Junqueira, L.C.U. & (null) (1991) The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *SciELO Brasil.* 86 (3), pp. 1–11.
- Mooney, M.P., Shand, J.M., Burrows, A., Smith, T.D., Caccamese, J.F., Cooper, G.M., Cray, J.J., Gilbert, J., Costello, B.J., Losee, J.E., Moursi, A.M. & Siegel, M.I. (2018) Rescue of Premature Coronal Suture Fusion with TGF- β 2 Neutralizing Antibody in Rabbits with Delayed-Onset Synostosis. *The Cleft palate-*

- craniofacial journal* : official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association. 28 (1), pp. 16065.
- Morriss-Kay, G.M. & Wilkie, A.O.M. (2005) Growth of the normal skull vault and its alteration in craniosynostosis: insights from human genetics and experimental studies. *Journal of Anatomy*. 207 (5), pp. 637–653.
- Moss, M.L. (1957) Experimental alteration of sutural area morphology. *The Anatomical Record*. 127 (3), pp. 569–589.
- Moss, M.L. (1960) Inhibition and Stimulation of Sutural Fusion in the Rat Calvaria. *The Anatomical Record*. 136 (4), pp. 457–467.
- Moss, M.L. & Young, R.W. (1960) A functional approach to craniology. *American Journal of Physical Anthropology*. 18 (4), pp. 281–292.
- Most, D., Levine, J.P., Chang, J., Sung, J., McCarthy, J.G., Schendel, S.A. & Longaker, M.T. (1998) Studies in Cranial Suture Biology: Up-Regulation of Transforming Growth Factor- β 1 and Basic Fibroblast Growth Factor mRNA Correlates with Posterior Frontal Cranial Suture Fusion in the Rat. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 101 (6), pp. 1431.
- Müller, U., Steinberger, D. & Kunze, S. (1997) Molecular genetics of craniosynostotic syndromes. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 235 (9), pp. 545–550.
- Nakamura, Y., Noda, K., Kuwahara, Y., Minyeong, L., Tanaka, S., Kawasaki, K. & Kobayashi, K. (1999) Magnetic resonance images and histology of the sphenoccipital synchondrosis in young monkeys (*Macaca fuscata*). *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics* : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics. 115 (2), pp. 138–142.
- Nickel, R., Frewein, J., Schummer, A. & Seiferle, E. (2004) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. 8.Auflage, Berlin, Hamburg: Parey, 128-186.
- Nicolay, C.W. & Vaders, M.J. (2006) Cranial suture complexity in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of Morphology*. 267 (7), pp. 841–849.
- Nikolova, S., Toneva, D., Georgiev, I. & Lazarov, N. (2019) Sagittal suture maturation: Morphological reorganization, relation to aging, and reliability as an age-at-death indicator. *American Journal of Physical Anthropology*. 169 (1), pp. 78–92.
- Nöller, C., Hueber, J., Aupperle, H., Seeger, J., Oechtering, T.H., Niestroock, C. & GU, O. (2008) *New Aspects of Brachycephalia in Dogs & Cats Basics: Insights Into Embryology, Anatomy & Pathophysiology*. San Antonio, TX, USA: ACVIM Forum.
- O'Loughlin, V.D. (1996) Comparative endocranial vascular changes due to craniosynostosis and artificial cranial deformation. *American Journal of Physical Anthropology*. 101 (3), pp. 369–385.

- Oechtering, T.H., Oechtering, G.U. & Nöller, C. (2018) Strukturelle Besonderheiten der Nase brachyzephaler Hunderassen in der Computertomographie. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere / Heimtiere*. 35 (03), pp. 177–187.
- Ogle, R.C., Tholpady, S.S., McGlynn, K.A. & Ogle, R.A. (2004) Regulation of Cranial Suture Morphogenesis. *Cells Tissues Organs*. 176 (1-3), pp. 54–66.
- Okamoto, K., Ito, J., Tokiguchi, S. & Furusawa, T. (1996) High-resolution CT findings in the development of the sphenooccipital synchondrosis. *AJNR. American journal of neuroradiology*. 17 (1), pp. 117–120.
- Onar, V. (1999) A Morphometric Study on the Skull of the German Shepherd Dog (Alsatian). *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 28 (4), pp. 253–256.
- Opperman, L.A. (2000) Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. *Developmental Dynamics*. 219 (4), pp. 472–485.
- Opperman, L.A., Adab, K. & Gakunga, P.T. (2000a) Transforming growth factor- β 2 and TGF- β 3 regulate fetal rat cranial suture morphogenesis by regulating rates of cell proliferation and apoptosis. *Developmental Dynamics*. 219 (2), pp. 237–247.
- Opperman, L.A., Adab, K. & Gakunga, P.T. (2000b) Transforming growth factor- β 2 and TGF- β 3 regulate fetal rat cranial suture morphogenesis by regulating rates of cell proliferation and apoptosis. *Developmental Dynamics*. 219 (2), pp. 237–247.
- Opperman, L.A., Chhabra, A., Nolen, A.A., Bao, Y. & Ogle, R.C. (1999) Dura Mater Maintains Rat Cranial Sutures in Vitro by Regulating Suture Cell Proliferation and Collagen Production. *Journal of Craniofacial Surgery*. 10 (2), pp. 169.
- Opperman, L.A., Nolen, A.A. & Ogle, R.C. (1997) TGF- β 1, TGF- β 2, and TGF- β 3 Exhibit Distinct Patterns of Expression During Cranial Suture Formation and Obliteration In Vivo and In Vitro. *Journal of Bone and Mineral Research*. 12 (3), pp. 301–310.
- Opperman, L.A., Passarelli, R.W., Morgan, E.P., Reintjes, M. & Ogle, R.C. (1995) Cranial sutures require tissue interactions with dura mater to resist osseous obliteration in vitro. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 10 (12), pp. 1978–1987.
- Opperman, L.A., Passarelli, R.W., Nolen, A.A., Gampper, T.J., Lin, K.Y.K. & Ogle, R.C. (1996) Dura mater secretes soluble heparin-binding factors required for cranial suture morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 32 (10), pp. 627–632.
- Opperman, L.A., Persing, J.A., Sheen, R. & Ogle, R.C. (1994) In the absence of periosteum, transplanted fetal and neonatal rat coronal sutures resist osseous obliteration. *Journal of Craniofacial Surgery*. 5 (5), pp. 327–332.
- Opperman, L.A., Sweeney, T.M., Redmon, J., Persing, J.A. & Ogle, R.C. (1993) Tissue interactions with underlying dura mater inhibit osseous obliteration of developing cranial sutures. *Developmental Dynamics*. 198 (4), pp. 312–322.

- Ornitz, D.M. & Itoh, N. (2015) The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. 4 (3), pp. 215–266.
- Packer, R., Hendricks, A., (null)(null) (2012) Do dog owners perceive the clinical signs related to conformational inherited disorders as 'normal' for the breed? A potential constraint to improving canine welfare. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 129.
- Packer, R.M.A., Hendricks, A. & Burn, C.C. (2015) Impact of Facial Conformation on Canine Health: Corneal Ulceration Carlos Eduardo Ambrósio (ed.). *PLoS one*. 10 (5).
- Packer, R.M.A., Hendricks, A., Tivers, M.S. & Burn, C.C. (2015) Impact of Facial Conformation on Canine Health: Brachycephalic Obstructive Airway Syndrome Carlos E Ambrósio (ed.). *PLoS one*. 10 (10).
- Pilegaard, A.M., Berendt, M., Holst, P., Møller, A. & McEvoy, F.J. (2017) Effect of Skull Type on the Relative Size of Cerebral Cortex and Lateral Ventricles in Dogs. *Frontiers in veterinary science*. 4pp. 30.
- Poncet, C.M., Dupre, G.P., Freiche, V.G. & Bouvy, B.M. (2006) Long-term results of upper respiratory syndrome surgery and gastrointestinal tract medical treatment in 51 brachycephalic dogs. *Journal of Small Animal Practice*. 47 (3), pp. 137–142.
- Powell, T.V. & Brodie, A.G. (1963) Closure of the spheno-occipital synchondrosis. *The Anatomical Record*. 147 (1), pp. 15–23.
- Power, R.A., Parkhill, J. & de Oliveira, T. (2017) Microbial genome-wide association studies: lessons from human GWAS. *Nature Reviews Genetics*. 18 (1), pp. 41–50.
- Pritchard, J.J., Scott, J.H. & Girgis, F.G. (1956) The structure and development of cranial and facial sutures. *Journal of Anatomy*. 90 (Pt 1), pp. 73.
- Proff, P., Weingärtner, J., Bayerlein, T., Reicheneder, C., Fanghänel, J. & Bill, J. (2006) Histological and histomorphometric study of growth-related changes of cranial sutures in the animal model. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 34 Suppl 2pp. 96–100.
- Rafferty, K.L. & Herring, S.W. (1999) Craniofacial sutures: morphology, growth, and in vivo masticatory strains. *Journal of Morphology*. 242 (2), pp. 167–179.
- Regelsberger, J., Milovanovic, P., Schmidt, T., Hahn, M., Zimmermann, E.A., Tsokos, M., Zustin, J., Ritchie, R.O., Amling, M. & Busse, B. (2012) Changes to the Cell, Tissue and Architecture Levels in Cranial Suture Synostosis Reveal a Problem of Timing in Bone Development. *European Cells & Materials*. 24pp. 441–458.
- Regodón, S., Vivo, J.M., Franco, A., Guillén, M.T. & Robina, A. (1993) Craniofacial angle in dolicho-, meso- and brachycephalic dogs: radiological determination and

- application. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*. 175 (4), pp. 361–363.
- Reinhold, F.P., Widholm, S.M., Ek-Rylander, B. & Andersson, G. (1990) Ultrastructural localization of a tartrate-resistant acid ATPase in bone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 5 (10), pp. 1055–1061.
- Rice, D.P. (2008) Craniofacial sutures. Development, disease and treatment. Preface. *Frontiers of oral biology*. 12pp. xi.
- Rice, D.P., Aberg, T., Chan, Y., Tang, Z., Kettunen, P.J., Pakarinen, L., Maxson, R.E. & Thesleff, I. (2000) Integration of FGF and TWIST in calvarial bone and suture development. *Development*. 127 (9), pp. 1845–1855.
- Rice, D.P., Kim, H.J. & Thesleff, I. (1999) Apoptosis in murine calvarial bone and suture development. *European journal of oral sciences*. 107 (4), pp. 265–275.
- Rice, D.P., Kim, H.J. & Thesleff, I. (1997) Detection of gelatinase B expression reveals osteoclastic bone resorption as a feature of early calvarial bone development. *Bone*. 21 (6), pp. 479–486.
- Rice, D.P.C., Rice, R. & Thesleff, I. (2003) Fgfr mRNA isoforms in craniofacial bone development. *Bone*. 33 (1), pp. 14–27.
- Rich, L. & Whittaker, P. (2005) Collagen and picosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz. J. morphol. Sci.* 22 (2), pp. 97–104.
- Rizk, O.T. (2012) *Insight into the Genetic Basis of Craniofacial Morphological Variation in the Domestic Dog, Canis familiaris*.
- Roberts, T., McGreevy, P. & Valenzuela, M. (2010) Human induced rotation and reorganization of the brain of domestic dogs. *PLoS one*. 5 (7), pp. e11946.
- Roedler, F.S., Pohl, S. & Oechtering, G.U. (2013) How does severe brachycephaly affect dog's lives? Results of a structured preoperative owner questionnaire. *The Veterinary Journal*. 198 (3), pp. 606–610.
- Roessner, A. (2008) *Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie*. 11. Auflage, München: Elsevier, Urban&FischerVerlag, 29-31.
- Roth, D.A., Bradley, J.P., Levine, J.P., McMullen, H.F., McCarthy, J.G. & Longaker, M.T. (1996) Studies in cranial suture biology: part II. Role of the dura in cranial suture fusion. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 97 (4), pp. 693–699.
- Ruggeri, Z.M. (2003) Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1 (7), pp. 1335–1342.
- Rusbridge, C., Knowler, S.P., Pieterse, L. & McFadyen, A.K. (2009) Chiari-like malformation in the Griffon Bruxellois. *Journal of Small Animal Practice*. 50 (8), pp. 386–393.

- Rüsse, I. & Sinowatz, F. (1998) *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. 2. Auflage, Berlin: Parey Buchverlag, 379-394.
- Samuelson, D.A. (2007) *Textbook of Veterinary Histology*. W B Saunders Company, 107-128.
- Satokata, I., Ma, L., Ohshima, H., Bei, M., Woo, I., Nishizawa, K., Maeda, T., Takanono, Y., Uchiyama, M., Heaney, S., Peters, H., Tang, Z., Maxson, R. & Maas, R. (2000) Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nature genetics*. 24 (4), pp. 391–395.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. 9 (7), pp. 676–682.
- Schmidt, M.J., Kampschulte, M., Enderlein, S., Gorgas, D., Lang, J., Ludewig, E., Fischer, A., Meyer-Lindenberg, A., Schaubmar, A.R., FAILING, K. & Ondreka, N. (2017) The Relationship between Brachycephalic Head Features in Modern Persian Cats and Dymorphologies of the Skull and Internal Hydrocephalus. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 31 (5), pp. 1487–1501.
- Schmidt, M.J., Neumann, A.C., Amort, K.H., Failing, K. & Kramer, M. (2011) Cephalometric measurements and determination of general skull type of Cavalier King Charles Spaniels. *Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*. 52 (4), pp. 436–440.
- Schmidt, M. & Ondreka, N. (2019) Hydrocephalus in Animals. *Pediatric Hydrocephalus*. pp. 53–95.
- Schmidt, M.J., Volk, H., Klingler, M., Failing, K., Kramer, M. & Ondreka, N. (2013) Comparison of closure times for cranial base synchondroses in mesaticephalic, brachycephalic, and Cavalier King Charles Spaniel dogs. *Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*. 54 (5), pp. 497–503.
- Schmitz, S. & Desel, C. (2018) *Der Experimentator Zellbiologie*. Springer Spektrum.
- Schnorr, B. & Kressin, M. (2011) *Embryologie der Haustiere*. 5. Auflage, Urban & Fischer Verlag 12-13 und 31-33.
- Schoenebeck, J.J. & Ostrander, E.A. (2013) The genetics of canine skull shape variation. *Genetics*. 193 (2), pp. 317–325.
- Schoenebeck, J.J., Hutchinson, S.A., Byers, A., Beale, H.C., Carrington, B., Faden, D.L., Rimbault, M., Decker, B., Kidd, J.M., Sood, R., Boyko, A.R., Fondon, J.W., Wayne, R.K., Bustamante, C.D., et al. (2012) Variation of BMP3 contributes to dog breed skull diversity. *PLoS genetics*. 8 (8), pp. e1002849.
- Schünke, M., Schulte, E. & Schumacher, U. (2009) *Prometheus - Lernatlas der Anatomie*. 2. Auflage, Thieme Verlag, 17.

- Seiferle, E. (1966) Zur Topographie des Gehirns bei Lang- und kurzköpfigen Hunderrassen. *Cells Tissues Organs*. 63 (3), pp. 346–362.
- Selby, L.A., Hayes, H.M. & Becker, S.V. (1979) Epizootiologic features of canine hydrocephalus. *American journal of veterinary research*. 40 (3), pp. 411–413.
- Senarath-Yapa, K., Chung, M.T., McArdle, A., Wong, V.W., Quarto, N., Longaker, M.T. & Wan, D.C. (2012) Craniosynostosis: molecular pathways and future pharmacologic therapy. *Organogenesis*. 8 (4), pp. 103–113.
- Senarath-Yapa, K., Li, S., Meyer, N.P., Longaker, M.T. & Quarto, N. (2013) Integration of multiple signaling pathways determines differences in the osteogenic potential and tissue regeneration of neural crest-derived and mesoderm-derived calvarial bones. *International journal of molecular sciences*. 14 (3), pp. 5978–5997.
- Shihab, N., Davies, E., Kenny, P.J., Loderstedt, S. & Volk, H.A. (2011) Treatment of Hydrocephalus with Ventriculoperitoneal Shunting in Twelve Dogs. *Veterinary Surgery*. 40 (4), pp. 477–484.
- Shirley, N.R. & Jantz, R.L. (2011) Spheno-Occipital Synchronosis Fusion in Modern Americans*, †. *Journal of forensic sciences*. 56 (3), pp. 580–585.
- Slater, B.J., Lenton, K.A., Kwan, M.D., Gupta, D.M., Wan, D.C. & Longaker, M.T. (2008) Cranial sutures: a brief review. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 121 (4), pp. 170e–8e.
- Smith, L.B., Bannasch, D.L., Young, A.E., Grossman, D.I., Belanger, J.M. & Oberbauer, A.M. (2008) Canine fibroblast growth factor receptor 3 sequence is conserved across dogs of divergent skeletal size. *BMC genetics*. 9 (1), pp. 67.
- Snider, T.N. & Mishina, Y. (2014) Cranial neural crest cell contribution to craniofacial formation, pathology, and future directions in tissue engineering. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*. 102 (3), pp. 324–332.
- Stockard, C.R. (1941) *The Genetic and Endocrinic Basis for Differences in Form and Behavior*. American Anatomical Memories 19: 153-195.
- Sun, Z., Lee, E. & Herring, S.W. (2007) Cell proliferation and osteogenic differentiation of growing pig cranial sutures. *Journal of Anatomy*. 211 (3), pp. 280–289.
- Sun, Z., Lee, E. & Herring, S.W. (2004) Cranial sutures and bones: growth and fusion in relation to masticatory strain. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*. 276 (2), pp. 150–161.
- Teitelbaum, S.L. (2000) Bone Resorption by Osteoclasts. *Science*. 289 (5484), pp. 1504–1508.
- Tholpady, S.S., Abdelaal, M.M., Dufresne, C.R., Gampper, T.J., Lin, K.Y., Jane, J.A.S., Morgan, R.F. & Ogle, R.C. (2004) Aberrant Bony Vasculature Associated With Activating Fibroblast Growth Factor Receptor Mutations Accompanying Crouzon Syndrome. *Journal of Craniofacial Surgery*. 15 (3), pp. 431.

- Todd, T.W. & Lyon, D.W. (1924) Endocranial suture closure. Its progress and age relationship. Part I.—Adult males of white stock. *American Journal of Physical Anthropology*. 7 (3), pp. 325–384.
- Vastardis, H., Mulliken, J.B. & Glowacki, J. (2004) Unilateral coronal synostosis: a histomorphometric study. *The Cleft palate-craniofacial journal : official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association*. 41 (4), pp. 439–446.
- Vij, K. & Mao, J.J. (2006) Geometry and cell density of rat craniofacial sutures during early postnatal development and upon in vivo cyclic loading. *Bone*. 38 (5), pp. 722–730.
- Vischer, U.M. (2006) von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 4 (6), pp. 1186–1193.
- Wang, Y., Xiao, R., Yang, F., Karim, B.O., Iacovelli, A.J., Cai, J., Lerner, C.P., Richtsmeier, J.T., Leszl, J.M., Hill, C.A., Yu, K., Ornitz, D.M., Elisseeff, J., Huso, D.L., et al. (2005) Abnormalities in cartilage and bone development in the Apert syndrome FGFR2+/S252W mouse. *Development*. 132 (15), pp. 3537–3548.
- Warren, S.M., Greenwald, J.A., Spector, J.A., Bouletreau, P., Mehrara, B.J. & Longaker, M.T. (2001) New developments in cranial suture research. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 107 (2), pp. 523–540.
- Wei, X., Hu, M., Mishina, Y. & Liu, F. (2016) Developmental Regulation of the Growth Plate and Cranial Synchondrosis. *Journal of Dental Research*. 95 (11), pp. 1221–1229.
- Weinreb, M., Shinar, D. & Rodan, G.A. (1990) Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 5 (8), pp. 831–842.
- Wilkie, A., Tang, Z.Q., Elanko, N., Walsh, S., Twigg, S., Hurst, J.A., Wall, S.A., Chrzanowska, K.H. & Maxson, R.E. (2000) Functional haploinsufficiency of the human homeobox gene MSX2 causes defects in skull ossification. *Nature genetics*. 24 (4), pp. 387–390.
- Winograd, J.M., Im, M.J. & Vander Kolk, C.A. (2001) Enzymatic activation associated with programmed fusion of the posterior interfrontal sutures in rats. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 108 (4), pp. 927–937.
- Winograd, J.M., Im, M.J. & Vander Kolk, C.A. (1997) Osteoblastic and osteoclastic activation in coronal sutures undergoing fusion ex vivo. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 100 (5), pp. 1103–1112.
- Wozney, J.M. (1992) The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Molecular Reproduction and Development*. 32 (2), pp. 160–167.
- Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitscock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M. & Wang, E.A. (1988) Novel Regulators of Bone-Formation - Molecular Clones and Activities. *Science*. 242 (4885), pp. 1528–1534.

- Yen, E.H., Yue, C.S. & Suga, D.M. (1989) The effect of sutural growth rate on collagen phenotype synthesis. *Journal of Dental Research*. 68 (6), pp. 1058–1063.
- Yoshimi Furuya, Michael S B Edwards, Charles E Alpers, Brian M Tress, Douglas K OusterhoutDavid Norman (2009) Computerized tomography of cranial sutures. *dx.doi.org*. 61 (1), pp. 53–58.
- Zettl, U.K., Lehmitz, R. & Mix, E. (2005) *Klinische Liquordiagnostik*. 2. Auflage, de Gruyter Verlag, 75.
- Zhang, X., Carpenter, D., Bokui, N., Soo, C., Miao, S., Truong, T., WU, B., Chen, I., Vastardis, H., Tanizawa, K., Kuroda, S.I. & Ting, K. (2003) Overexpression of *Nell-1*, a Craniosynostosis-Associated Gene, Induces Apoptosis in Osteoblasts During Craniofacial Development. *Journal of Bone and Mineral Research*. 18 (12), pp. 2126–2134.
- Zhao, G.Q. (2003) Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *genesis*. 35 (1), pp. 43–56.
- Zhou, Y.-X., Xu, X., Chen, L., Li, C., Brodie, S.G. & Deng, C.-X. (2000) A Pro250Arg substitution in mouse *Fgfr1* causes increased expression of *Cbfa1* and premature fusion of calvarial sutures. *Human molecular genetics*. 9 (13), pp. 2001–2008.
- Zimmermann, B., Moegelin, A., de Souza, P. & Bier, J. (1998) Morphology of the development of the sagittal suture of mice. *Anatomy and Embryology*. 197 (2), pp. 155–165.

Danksagung

Ich möchte mich hiermit herzlich bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Vielen Dank an Carsten Staszky und Martin Schmidt für die Korrekturen, Anregungen und stete Unterstützung. Ich habe mich sehr gut aufgehoben gefühlt.

Jörg und Jutta möchte ich danken für die großartige Unterstützung im Labor. Die netten Gespräche haben die Zeit vergehen lassen wie im Flug.

Ich habe unbeschreibliches Glück eine Freundin wie Christina im Studium gefunden zu haben, die mir auch danach in allen Lebenslagen mit Rat und Tat zur Seite steht und mich versteht wie keine andere. Danke!

Ich möchte mich von Herzen bei meinen Eltern bedanken, die mich immerwährend bei der Verfolgung und Durchführung meiner Ziele ermutigen und mir eine unentbehrliche Stütze sind.

Basti, vielen Dank für deinen Rückhalt, deine Ermutigungen und dein stetes Vertrauen. Auch in schwierigen Zeiten kann ich mich immer auf dich verlassen.

Ich danke meinem Seelenhund Zoe, die immer an meiner Seite war, mich fast das gesamte Studium begleitet hat und in so mancher Prüfungsphase mein felliges Taschentuch war.

Pippa, meine treue Begleiterin und mein Herzenshund – ein gemeinsamer Spaziergang lässt alle Sorgen vergessen und erinnert mich daran, was wirklich wichtig ist.

A whole new world
A new fantastic point of view
No one to tell us "No", or where to go
Or say we're only dreaming
- Aladdin



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-7071-7



9 783835 970717