

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Molekularbiologische, histologische und immunhistochemische
Analyse des initialen Frakturhämatoms unter rigider und kritischer
Fixation zum Zeitpunkt 4 Tage post Osteotomie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Melanie Spies

aus Peine

Gutachter: 1. PD Dr. med. H. Bail
2. Prof. Dr. med. S. Ruchholtz
3. Prof. Dr. med. U. Stöckle

Datum der Promotion: 21.11.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Stand der Wissenschaft	4
2.1	Knochen	4
2.2	Fraktur	6
2.3	Frakturheilung	6
2.3.1	Direkte Frakturheilung	7
2.3.2	Indirekte Frakturheilung.....	7
2.4	Frakturhämatom	9
2.5	Fixateur externe.....	10
2.6	Einflussfaktoren auf die Frakturheilung.....	10
2.6.1	Wachstumsfaktoren	12
2.6.1.1	Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)	12
2.6.1.1.1	Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2).....	13
2.6.1.1.2	Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4).....	13
2.6.1.1.3	Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7).....	14
2.6.1.2	Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)	14
2.6.1.3	Platelet Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB)	15
2.6.1.4	Vascular Endothelial Growth Factor-A ₁₆₅ (VEGF-A ₁₆₅)	15
2.6.2	Zytokine	16
2.6.2.1	Interleukin-1 (IL-1)	16
2.6.2.2	Interleukin-6 (IL-6)	16
2.6.2.3	Transforming Growth Factor- β_1 (TGF- β_1).....	17
2.6.2.4	Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α).....	18
2.6.3	Extrazelluläre Matrixproteine	18
2.6.3.1	Cysteine-rich Protein 61 (CYR61).....	18
2.6.3.2	Kollagen-Typ II (Coll II).....	19
2.6.3.3	Osteopontin (OPN).....	19
2.6.4	Transkriptionsfaktoren	20
2.6.4.1	Hypoxia-inducible Factor-1 α (HIF-1 α).....	20
2.6.5	Matrixdegradierende Proteasen.....	21
2.6.5.1	Matrix Metalloproteinase-13 (MMP-13)	21

2.7	Tiermodell	21
3	Material und Methoden	23
3.1	Versuchsablauf	23
3.2	Versuchstiere	24
3.3	Fixateur externe	24
3.4	Operatives Vorgehen	25
3.5	Nachsorge	27
3.6	Blutgewinnung	27
3.7	Hämatomgewinnung	27
3.8	Tötung	28
3.9	Sägen	28
3.10	Molekularbiologie	29
3.10.1	RNA-Isolierung	29
3.10.2	Photometrische Messung	30
3.10.3	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion	31
3.10.4	Semiquantitative PCR	32
3.10.5	Gelelektrophorese	33
3.10.6	Real-time PCR	34
3.11	Histologie	35
3.11.1	Entwässerung und Einbettung	35
3.11.2	Vorbereitung der Schnittpräparate	36
3.11.3	Herstellung der Schnittpräparate	36
3.11.4	Histologische Färbungen	37
3.11.4.1	Masson-Goldner-Trichomfärbung (MGT)	37
3.11.4.2	Safranin Orange/von Kossa-Färbung	37
3.11.4.3	Safranin Orange/Lichtgrün-Färbung	38
3.11.5	Histologische Auswertung	38
3.12	Immunhistochemie	39
3.12.1	Entkalkung und Einbettung	39
3.12.2	Schneiden der Paraffinpräparate	40
3.12.3	Hämatoxylin Eosin- (HE-)Färbung	40
3.12.4	Movat-Pentachrom-Färbung	41
3.12.5	Immunhistochemische Färbungen	41

3.12.6	Immunhistochemische Auswertung	43
3.12.6.1	CTR-Expression	43
3.12.6.2	α -SMA-Expression.....	44
3.13	Statistische Analyse.....	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Molekularbiologie	46
4.1.1	Semiquantitative PCR	46
4.1.2	Real-time PCR.....	47
4.1.3	Zusammenfassung der molekularbiologischen Ergebnisse.....	51
4.2	Histologie	51
4.2.1	Deskriptive Betrachtung.....	51
4.2.1.1	Frakturhämatom	51
4.2.1.2	2-Wochenzeitpunkt	53
4.2.2	Histomorphometrie.....	55
4.2.3	Zusammenfassung der Histologie	57
4.3	Immunhistochemie	57
4.3.1	Deskriptive Betrachtung.....	57
4.3.1.1	Frakturhämatom	57
4.3.1.2	2-Wochenzeitpunkt	58
4.3.2	Osteoklasten	58
4.3.3	Vaskularisierung.....	60
4.3.4	Zusammenfassung der Immunhistochemie.....	61
5	Diskussion	63
5.1	Material und Methoden	64
5.1.1	Versuchsaufbau	64
5.1.2	Operation	65
5.1.3	Sägen	65
5.1.4	Molekularbiologie	65
5.1.5	Histologie	66
5.1.6	Immunhistochemie	66
5.2	Ergebnisse	67
5.2.1	Molekularbiologie	67
5.2.2	Histologie	74

5.2.2.1	Frakturhämatom	74
5.2.2.2	2-Wochenzeitpunkt	75
5.2.3	Immunhistochemie	80
5.2.3.1	Osteoklasten	80
5.2.3.2	Vaskularisierung.....	82
6	Zusammenfassung.....	86
7	Literaturverzeichnis.....	88
8	Anhang	101
8.1	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	101
8.2	Tabellenverzeichnis.....	104
8.3	Abbildungsverzeichnis	104
	Danksagung.....	106
	Erklärung an Eides Statt	108
	Lebenslauf	109

1 Einleitung

Die Frakturheilung und ihre bestmögliche Versorgung lenkten das Interesse der Menschen in verschiedenen Epochen auf sich. Bereits in der Antike in den Schriften Hippokrates ist zu lesen, dass für die Heilung einer Fraktur eine Art äußerer Schienung zur Ruhigstellung notwendig ist. Im 16. Jahrhundert behandelte Ambroise Paré [9] eine ausbleibende Kallusbildung mit Hilfe von Wickeln, die von zentral nach peripher an die entsprechende Extremität angelegt wurden. Dadurch kam es zu einer venösen Stase, die die Kallusbildung förderte. Im Jahr 1892 veröffentlichte Julius Wolff sein „Gesetz der Transformation des Knochens“, in dem es heißt, dass wechselnde mechanische Belastungen eine Veränderung der Knochenarchitektur mit sich führen [108]. Anfang des 20. Jahrhunderts wurde die Lehrmeinung vertreten, dass für die Frakturheilung zwei Dinge essentiell seien, zum einen die ausreichende Zufuhr von Nährstoffen und zum anderen der Wachstumsreiz. So gab es Versuche, diesen Reiz bei einer verzögerten Heilung zu imitieren, indem Stoffe wie Alkohol, Jodtinktur, Milchsäure oder Terpentinöl in das Frakturgebiet eingespritzt wurden. Auch mechanische Provokationen, wie das Reiben der Knochenfragmente aneinander oder das Beklopfen der Bruchstelle führten häufig zu einer verbesserten Heilung. Genauere Untersuchungen zeigten jedoch, dass diese Reizungen eine Entzündung im Bereich der Frakturrenden hervorriefen, die eine vermehrte Zufuhr von Nährstoffen zur Folge hatte. Aufgrund dieser Beobachtungen formulierte August Bier 1905, dass die zwischen und um die Fraktur ergossenen Blutmengen die natürlichen Verhältnisse für eine Heilung darstellen. Räumte er damals aufgrund chirurgischer Eingriffe das Frakturhämatom aus und stillte sorgfältig die Blutung, kam es zu einer verzögerten Kallusbildung. Daraus entwickelte er eine Therapie für Frakturen, die verzögert heilten oder bereits Pseudarthrosen ausbildeten. August Bier spritzte erfolgreich Blut in das Frakturgebiet [8]. 1930 bestätigte Arthur W. Ham [54] mit einer histologischen Studie die Wichtigkeit des Frakturhämatoms für die Knochenheilung. Andere Wissenschaftler (z.B. Berton A. Rahn *et al.* [117], Sven Olerud *et al.* [99]) dagegen postulierten 1971 die Bedeutungslosigkeit des Hämatoms für die Heilung.

Die Frakturheilung ist ein komplexer Vorgang, der durch das Zusammenspiel unterschiedlicher Zellsysteme und Signalkaskaden gesteuert wird. Dabei nehmen unter anderem biologische und biomechanische Faktoren Einfluss.

Im Rahmen dieser Studie sollte die frühe Phase einer standardisierten Osteotomie am Schafmodell in Abhängigkeit von definierten biomechanischen Rahmenbedingungen untersucht werden. Mit einem rigiden Fixateur externe wurde eine „optimale“ Stabilisierung für die Heilung

geschaffen. Dem entgegengesetzt wurde ein kritischer Fixateur externe, dessen mechanische Eigenschaften zu einer Verzögerung der Frakturheilung führten.

Ausgehend von der Hypothese, dass die Biomechanik schon während der initialen Phase der Frakturheilung als wichtiger Einflussfaktor fungiert, wurde ein Zeitpunkt dieser Phase genauer untersucht. Die Initiierung der Frakturheilung ist durch die Ausbildung und Organisation eines Frakturhämatoms, das eine Schlüsselrolle für den gesamten weiteren Heilungsverlauf spielt, gekennzeichnet. Zur Charakterisierung dieser Initialphase, unter Berücksichtigung unterschiedlicher mechanischer Bedingungen (rigide versus kritisch), wurde an zwei Gruppen á sechs Tieren eine Tibiaosteotomie durchgeführt. Vier Tage nach der Operation wurde das im Osteotomiespalt entstandene Hämatom entfernt und sowohl hinsichtlich bestimmter knochenheilungsrelevanter regulatorischer Faktoren molekularbiologisch als auch histologisch und immunhistochemisch analysiert. Zusätzlich erfolgten histologische, histomorphologische und immunhistochemische Untersuchungen des Osteotomiegebietes nach der Hämatomentnahme unter Berücksichtigung der mechanischen Rahmenbedingungen zwei Wochen post operationem.

Molekularbiologisch wurde die Synthese der Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) verschiedener regulatorischer Faktoren (z.B. Zytokine und Wachstumsfaktoren) untersucht. Bekannt ist, dass mechanische Signale die Expression bestimmter biologischer Mediatoren beeinflussen [93]. Unklar ist jedoch, inwieweit sich das Expressionsmuster unter optimalen bzw. biomechanisch-kritischen Bedingungen ändert. Für diese Studie ergab sich hieraus die Hypothese, dass unterschiedliche mechanische Rahmenbedingungen schon in der Initialphase der Frakturheilung die Expression regulatorischer Faktoren beeinflussen. Es wurde vermutet, dass es im Vergleich zur rigiden Fixation unter mechanisch-kritischen Bedingungen zu einer verstärkten Hochregulierung der Expression inflammatorischer Zytokine und zu einer verminderten Hochregulierung der Expression von Wachstumsfaktoren im frühen Hämatom kommt. Darüber hinaus wurde angenommen, dass die im Hämatom vorliegende Hypoxie unter kritischer Fixation verstärkt wird, was sich in einer erhöhten Expression des Transkriptionsfaktors Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) sowie seiner Zielgene äußert.

Histologisch und immunhistochemisch wurde die Heilung nach Hämatomentnahme unter Berücksichtigung der Biomechanik nach 14-tägiger Standzeit untersucht. Die Hypothese ist, dass kritische Bedingungen die Heilung verzögern und die Entfernung des Frakturhämatoms zu einer zusätzlichen Verlängerung führt. Als verzögerte Heilung wurde eine histologisch schlechte Kallusgewebsbildung mit wenig organisiertem Gewebe im Osteotomiespalt sowie eine

Reduzierung der Gefäßdichte und eine Erhöhung des Osteoklastenaufkommens im Kallus angesehen.

Im klinischen Alltag werden derzeit in Deutschland bei ca. 10-20% [52] der Fälle Frakturheilungsstörungen beobachtet. Das Ziel der Forschung beinhaltet somit eine Optimierung der Frakturversorgung im Sinne einer Beschleunigung und Effizienz der Heilung. Dies erfolgt zum einen durch die stetigen Verbesserungen der Operationsverfahren und Implantationen. Zum anderen wird eine Aufschlüsselung der auf molekularbiologischer Ebene ablaufenden Prozesse angestrebt, um diese gezielt beeinflussen zu können. Weitgehend unbekannt ist dabei der Zusammenhang von definierten mechanischen Bedingungen, wie den interfragmentären Bewegungen im Frakturspalt und den daraus resultierenden molekularbiologischen Prozessen. Unklar ist auch, über welche biologischen Signalkaskaden die Biomechanik einen Einfluss auf den Heilungsverlauf nimmt.

Ziel dieser Studie war es, Kenntnisse über den Einfluss biomechanischer Rahmenbedingungen in der Initialphase der Frakturheilung zu gewinnen und entscheidende Faktoren der verzögerten Heilung aufzuzeigen. Nur ein detailliertes Verständnis der komplexen Zusammenhänge zwischen mechanischen und biologischen Verhältnissen im Frakturgebiet kann über eine gezielte Beeinflussung der Biomechanik und ggf. über Substitution biologischer Faktoren die Frakturheilung optimieren.

2 Stand der Wissenschaft

2.1 Knochen

Knochen ist ein hochdifferenziertes Gewebe. Es ermöglicht Bewegung, trägt und schützt wichtige Organe, wie z.B. Gehirn und Rückenmark [109]. Zusätzlich dient der Knochen dem Organismus als Calcium- und Phosphatspeicher.

Nach ihrem Aufbau wird zwischen langen, kurzen, platten und unregelmäßigen Knochen unterschieden. Die Tibia zählt zu den langen Röhrenknochen. Dieser Knochentyp gliedert sich in drei Abschnitte. Die Epiphyse (Gelenkende) ist mit Knorpel überzogen und bildet die Gelenkfläche. Mit Ausnahme der Finger- und Zehenendglieder weisen alle Röhrenknochen zwei Epiphysen auf. Der von den beiden Gelenkenden begrenzte Anteil wird als Diaphyse (Schaft) bezeichnet und umschließt die Markhöhle [78]. Diese enthält neben der vaskulären und der lymphatischen Versorgung auch Fettgewebe und einige hämatopoetische Zellen [121]. Zwischen Epiphyse und Diaphyse ist die Metaphyse lokalisiert. Sie stellt während der Knochenentwicklung das Reservoir für das Längenwachstum dar. Röhrenknochen werden wie alle anderen Knochen auch vom Periost, der Knochenhaut, umhüllt. Es besteht aus zwei Schichten, der dem Knochen direkt anliegenden knochenbildenden Schicht (Stratum osteogenicum) und der äußeren Faserschicht (Stratum fibrosum). Darüber hinaus ist das Periost reich an Blutgefäßen und Nerven [78].

Knochen besteht aus ca. 70% anorganischem Material. Den Hauptanteil bilden Calcium und Phosphat in Form von Hydroxylapatit. Darüber hinaus lassen sich auch Karbonate, Natrium, Magnesium und Eisen nachweisen. Die restlichen 30% sind organischen Ursprungs und umfassen extrazelluläre Matrix und gewebespezifische Zellen. Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix sind Kollagene, zu 90% Kollagen-Typ I. Daneben lassen sich noch Proteoglykane und Glukosaminoglykane finden. Zu den im Knochengewebe vorkommenden Zellen gehören Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten [121]. Sie ermöglichen in ihrer Gesamtheit die ständigen An-, Ab- und Umbauprozesse im Knochen. Erst durch dieses Remodeling wird eine Anpassung an die sich stets ändernden Druck- und Zugkräfte im Knochen gewährleistet. Die Regulierung der Umbauprozesse basiert auf zentralen, hormonbildenden und auf peripheren, wechselwirkenden Mechanismen [7].

Die Osteoblasten dienen dem Knochenaufbau. Sie differenzieren sich aus mesenchymalen Stammzellen und sind in den Havers'schen Systemen lokalisiert, in denen die Knochenformation

stattfindet. Dort synthetisieren sie Osteoid, die unverkalkte Knochengrundsubstanz, die hauptsächlich aus Kollagen-Typ I und Proteoglykanen besteht. Die Osteoblasten geben das Osteoid an den Extrazellulärraum ab. Ca. 10% der Zellen mauern sich dadurch vollständig ein und differenzieren zu Osteozyten. Über zytoplasmatische Fortsätze stehen die einzelnen Osteozyten miteinander in Verbindung [121]. Diese Fortsätze dienen dem Nährstofftransport zwischen Blutgefäßen und den einzelnen Zellen [78], um diese funktionsfähig zu halten [121].

Die Osteoklasten dienen dem Knochenabbau. Sie sind mehrkernige Riesenzellen, die durch Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen der Monozyten/Makrophagen entstehen. Durch die Auflösung des Knochens bedingt, liegen diese Zellen überwiegend in Knochenvertiefungen, den Howship-Lakunen, oder sie sind auf der Knochenoberfläche lokalisiert. Dort heften sich die Osteoklasten an, um das mineralisierte Gewebe abzubauen. Dabei wird der Rand der Anheftungszone durch Integrine abgedichtet. Durch die Expression von Carboanhydrase II und der Ausbildung von vakuolären Protonenpumpen wird der pH-Wert in dem entstandenen Reaktionsraum erniedrigt. Aufgrund dieser Ansäuerung werden die anorganischen Knochenbestandteile aufgelöst. Lysosomale und nicht-lysosomale Enzyme, wie Kathepsin K und Metalloproteinasen, bauen die organischen Anteile des Knochens ab [7].

Anhand der Histologie lassen sich zwei Knochenformen unterscheiden, Geflecht- und Lamellenknochen [132]. Entwicklungsgeschichtlich stellt der Geflechtknochen die ältere Knochenform dar und kann als verknöchertes Bindegewebe angesehen werden [92]. Seinen Ursprung nimmt er in einer starken Kapillarisation und der Anreicherung von Mesenchymzellen, die im Weiteren zu Osteoblasten differenzieren. Diese Zellen synthetisieren Kollagene, die einen ungerichteten Verlauf aufweisen. So entsteht ein dichtes Geflecht, das im Verlauf mineralisiert wird [78]. Der Geflechtknochen wird in der Regel in Lamellenknochen umgebaut und lässt sich zeitlebens nur noch in den Deckknochen des Schädels, dem knöchernen Gehörgang sowie in den Ansatzstellen von Sehnen und Bändern nachweisen [7].

Der Lamellenknochen besteht aus wiederkehrenden und gleichmäßig aufgebauten Einheiten. Diese werden Osteone oder nach ihrem Erfinder „Havers'sche Systeme“ genannt. Ein jedes Osteon weist ein Zentrum, den Havers'schen Kanal auf. In ihm verlaufen Nerven, Blut- und Lymphgefäße, eingebettet in mesenchymales Bindegewebe. Abzweigend von den Zentralkanälen gehen Querverbindungen, die Volkmannschen Kanäle aus. Sie stellen eine Verbindung zwischen den einzelnen Osteonen sowie den Gefäßsystemen dar. Der Aufbau eines Osteons ist durch eine jahresringähnliche Anordnung der Lamellen charakterisiert [132].

Knochen ist ein sehr vitales Gewebe. Es unterliegt nicht nur einem ständigen Umbau, sondern wird auch von bis zu 400 ml Blut pro Minute durchströmt. Das sind ca. 6% des Herzzeitvolumens [7]. Über drei miteinander verbundene Teilsysteme, die afferente, die efferente und die gemischte Blutversorgung, fließt dieses Blut durch den Knochen [121]. Es dient der Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen und dem Abtransport der Stoffwechselprodukte und des Kohlendioxids [132].

2.2 Fraktur

Werden die mechanischen Eigenschaften eines Knochens, Festigkeit und Elastizität, überschritten, kommt es zur Fraktur [110, 136]. Diese ist definitionsgemäß eine Kontinuitätsunterbrechung des Skeletts, die mit Schmerzen und Funktionsverlust einhergeht [135]. Ursächlich werden vier Frakturmechanismen unterschieden, die direkte Fraktur, die indirekte Fraktur, die pathologische bzw. Spontanfraktur und die Ermüdungsfraktur. Die direkte Fraktur wird durch äußere adäquate Gewalteinwirkung auf den gesunden Knochen hervorgerufen, die indirekte durch Abriss, Biegung, Dehnung, Stauchung bzw. Scherung des Knochens. Die pathologische Fraktur setzt einen krankhaft veränderten Knochen voraus, der durch inadäquate Gewalteinwirkung zu Bruch kommt. Die Ermüdungsfraktur wird durch lang andauernde mechanische Überanspruchung ohne eigentliches Unfallereignis verursacht [96].

Eine Fraktur setzt im Organismus eine Abfolge von lokalen und generalisiert systemischen Mechanismen in Gang, die die Wiederherstellung der Struktur und Funktion des Knochens zum Ziel haben [136].

2.3 Frakturheilung

Die Frakturheilung stellt einen sehr komplexen Vorgang dar, der eine Reihe von mechanischen, biochemischen und zellulären Ereignissen umfasst. Sie setzt sich aus Migrations-, Proliferations- sowie Differenzierungsprozessen zusammen und führt letztlich dazu, dass das neu gebildete Gewebe in eine biomechanisch kompetente Struktur umgewandelt wird [64]. Am Ende des Heilungsprozesses wird der Knochen nicht durch Narbengewebe überbrückt, sondern es entsteht ein, dem ursprünglichen Gewebe entsprechendes Regenerat [13, 84].

Darüber hinaus stellt die Frakturheilung einen spezialisierten postnatalen Heilungsprozess dar, der Aspekte der embryonalen Knochenentwicklung aufgreift. Viele molekulare Mechanismen, die die zelluläre Differenzierung und das Wachstum während der Embryogenese steuern, wiederholen sich während der Frakturheilung [47].

In Abhängigkeit von der Entfernung der Frakturrenden lassen sich zwei Formen der Frakturheilung unterscheiden, die direkte und die indirekte Frakturheilung [13, 20, 121].

2.3.1 Direkte Frakturheilung

Die direkte Frakturheilung verläuft ohne radiologisch sichtbare Kallusbildung und setzt einen engen Kontakt der Knochenfragmente voraus. Zusätzlich müssen die Frakturrenden ausreichend vaskularisiert und weitestgehend stabil versorgt sein [13]. Sind diese Bedingungen erfüllt, werden die Frakturrenden durch ein direktes Vordringen der Havers'schen Systeme miteinander verbunden. Genauer gesagt überbrücken die Osteoklasten den Frakturspalt direkt und bohren einen Kanal in das gegenüberliegende Fragment. Den Osteoklasten folgen unmittelbar eine kapillare Gefäßschlinge und mesenchymale Stammzellen, aus denen sich Osteoblasten differenzieren. Diese füllen den entstandenen Kanal letztlich mit Knochen auf [13, 121].

2.3.2 Indirekte Frakturheilung

Die indirekte Frakturheilung lässt sich anhand der Histologie in vier ineinander übergehende Phasen einteilen (Abb. 1), die Entzündungsphase, die Phase des weichen Kallus, die Phase des harten Kallus und die Phase des Remodeling [14, 18, 96, 136]. Einige Autoren betrachten den Mechanismus vom Eintritt der Gewalteinwirkung bis zum Moment der Fraktur als vorgeschaltete erste Phase der Frakturheilung [13, 64].

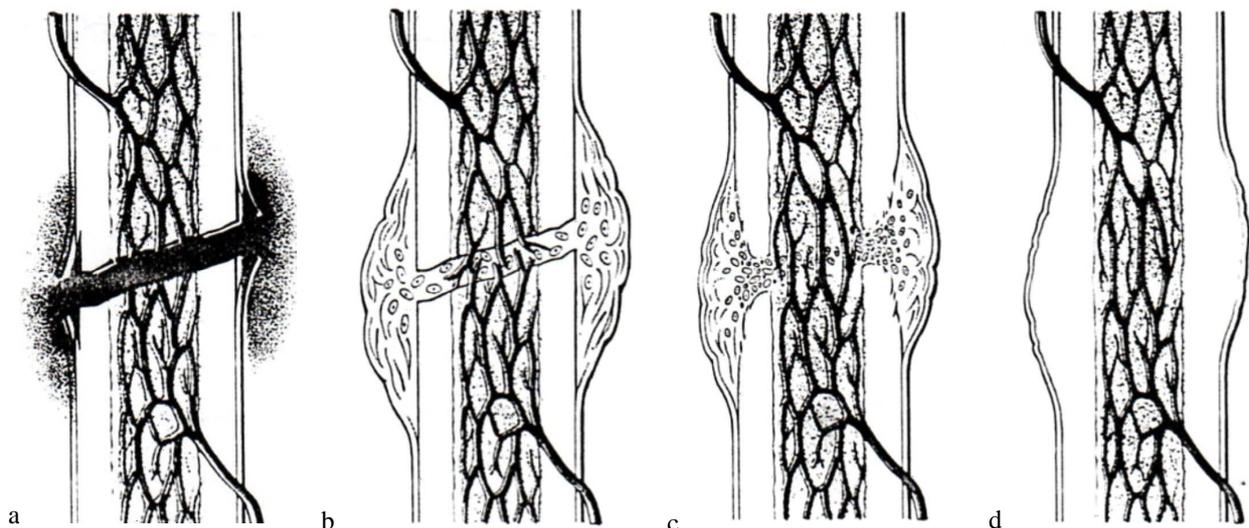


Abb. 1: Schematische Darstellung der indirekten Frakturheilung.

a: Entzündungsphase, b: Phase des weichen Kallus, c: Phase des harten Kallus, d: Phase des Remodeling

Quelle: Oestern, H.-J., Dürig, M., 2003 [96]

Durch die Fraktur kommt es zu Zerreißungen nutritiver Gefäße [136]. Diese sind im Knochen, dem Knochenmark und dem Periost, sowie in dem umliegenden Weichteilgewebe lokalisiert. Die Zerstörung der Gefäße führt zu einer Einblutung in das Frakturgebiet. Das so entstandene

Frakturhämatom leitet die Entzündungsphase ein [13]. Diese dauert beim Menschen ein bis drei Tage [13, 14], nach David J. Simmons [136] sogar fünf Tage. Die bei einer Fraktur entstehenden Gewebetrümmer, bestehend aus Knochenfragmenten, Periost, Endost, Knochenmark und Weichteilgewebe, zerfallen und lösen eine Inflammation aus. Daraufhin überschwemmen Entzündungsmediatoren das Frakturgebiet [109], so dass Entzündungszellen, wie Lymphozyten, polymorphkernige Leukozyten, Histiocyten, Monozyten und Makrophagen [136], angelockt werden. Diese Zellen stammen aus dem Blut und besitzen die Fähigkeit, die Kallusbildung zu induzieren [101]. Zusätzlich werden Kaskaden proteolytischer Enzyme aktiviert, die eine Koagulation des Blutes hervorrufen und damit die Inflammation verstärken [109]. An den Frakturrenden kommt es aufgrund der Gefäßzerreißen zu einem Sauerstoffmangel und zur Nekrosebildung. Die Hypoxie und der daraus resultierende erniedrigte pH-Wert stimulieren die Freisetzung von Zytokinen aus neutrophilen Granulozyten [113]. Makrophagen und Lymphozyten beseitigen mögliche Bakterien und sezernieren zusätzlich Wachstumsfaktoren und angiogene Faktoren. Ebenfalls in der frühen Entzündungsphase nachweisbare Osteoklasten resorbieren das abgestorbene Knochengewebe [109]. Lysosomale Enzyme, die aus den zerstörten Osteozyten austreten, führen zur Auflösung der sie umgebenden organischen Matrix [113].

Das Abklingen von Schwellung und Schmerzen kennzeichnet den fließenden Übergang von der Entzündungsphase in die Phase des weichen Kallus [14], auch Granulationsphase genannt. Sie dauert beim Menschen etwa drei Wochen. Während dieser Zeit wird das Frakturhämatom, in dem sich bereits ein lichtetes Netzwerk aus Fibrin und Kollagenfibrillen befindet, von Granulationsgewebe durchsetzt. Dieses Gewebe besteht aus Fibroblasten, neu gebildeten Kollagenen und weiteren Kapillaren [13]. Die hohe Vaskularisierung, hervorgerufen durch Kapillareinsprossungen in den Frakturspalt, und die hohe Zelldichte kennzeichnen diese Phase der Heilung [14]. Der weiche Kallus führt zur ersten Brückenbildung zwischen den Frakturrenden [13]. Er besitzt jedoch nicht genügend Stabilität, um das Überleben von Osteoblasten zu sichern. Um diese Steifigkeit zu erreichen, werden Kalksalze eingelagert [116]. Diese Mineralisierung leitet die Phase des harten Kallus ein. Sie dauert beim Menschen drei bis vier Monate. In dieser Zeit härtet der Kallus aufgrund der fortschreitenden Mineralisierung der Grundsubstanz und des Knorpelgewebes aus. Es entsteht primitiv angeordneter Geflechtknochen, der sich entlang der Kapillaren ausrichtet [13]. Dieser Knochen agiert als Platzhalter, jedoch nicht als wirkliche Verbindung zwischen den Frakturrenden. Osteone nutzen ihn in der Phase des Remodeling als Leitstruktur, um, ausgehend von den Frakturrenden, Lamellenknochen im Frakturspalt entstehen zu lassen. Dies führt zu einer vorübergehenden paradoxen Auflockerung des kortikalen

Knochens [20]. Das Remodeling dauert beim Menschen Monate bis Jahre und endet mit der Wiederherstellung der normalen Knochenkontur und der Kontinuität des Markraums [13], sowie mit der Revaskularisierung der ehemaligen Frakturrenden [20].

2.4 Frakturhämatom

Bereits einige Minuten nach dem Frakturereignis beginnt das im Frakturspalt befindliche Blut zu gerinnen [119]. Die dabei entstehenden Fibrinnetzwerke verspannen die Frakturrenden und dienen später als Leitstruktur für die Kapillareinsprossung [28]. Thrombozyten aggregieren aufgrund der durch die Gefäßzerreißung freigesetzten Mediatoren. Zusätzlich sezernieren diese aktivierten Blutplättchen unter anderem Wachstumsfaktoren, wie Platelet Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB) und Transforming Growth Factor- β_1 (TGF- β_1) [113], die eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen übernehmen [37].

Nach ca. einer Stunde erreichen die ersten Entzündungszellen über Chemotaxis das Frakturgebiet [119]. Sie sezernieren Zytokine, wie Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6), die für die Regulation der frühen Frakturheilungsphase entscheidend sind [37]. Darüber hinaus aktivieren diese Zytokine proteolytischen Enzyme, die die weitere Koagulation und Inflammation fördern [121].

Das Frakturhämatom stellt demnach eine Quelle an Signalmolekülen dar, die eine Kaskade zellulärer Ereignisse initiieren und somit den Heilungsverlauf beeinflussen [37]. Das anfangs im Frakturhämatom herrschende saure Milieu unterstützt diese Ereignisse. Der niedrige pH-Wert stellt einen Proliferations- und Differenzierungsanreiz für die Zellen dar [28].

Weitere wissenschaftliche Untersuchungen des Frakturhämatoms lieferten zusätzliche Erkenntnisse. Die intramuskuläre Transplantation eines vier Tage alten Hämatoms führte zur ektopen Knochenneubildung, was darauf schließen lässt, dass das Frakturhämatom osteogenes Potential besitzt [89]. Zusätzlich konnte ein angiogenes Potential nachgewiesen werden [139].

Wird das Frakturhämatom bis zum vierten Tag nach dem Frakturereignis entfernt, lässt sich eine minimierte Kallusproduktion und ein herabgesetztes Biegemoment im Heilungsverlauf beobachten [51]. Doch nicht nur die einmalige, sondern auch wiederholte Entfernungen des Hämatoms beeinflussen den Heilungsverlauf. Es kommt zur Entstehung verzögerter Frakturheilungen bis hin zur Ausbildung atrophischer Pseudarthrosen [106].

2.5 Fixateur externe

Der Begriff Fixateur externe stammt aus dem Französischen und bedeutet wörtlich übersetzt „äußerer Spanner“ [114]. Seit dem 19. Jahrhundert wird der Fixateur externe zur Stabilisierung von Knochenbrüchen eingesetzt [17]. Die Indikation in der heutigen Medizin ist vor allem die Versorgung von Polytraumata und Schaftfrakturen langer Röhrenknochen mit höhergradigen Weichteilschäden [83]. Die externe Fixierung führt zu einer stabilen Osteosynthese, die jedoch noch Mikrobewegungen zwischen den Frakturrenden erlaubt. Eine sekundäre Knochenheilung ist die Regel [141].

Der Fixateur externe weist eine Vielzahl an Montagemöglichkeiten auf. So wird zwischen linearen Fixateuren und Ringfixateuren, unilateralen und bilateralen, sowie uniplanaren und biplanaren Systemen unterschieden. Gemeinsam haben alle Systeme die stabilisierenden Elemente (Pins), die in den Knochen eingebracht und mittels Stangen oder Ringen fest miteinander verbunden werden [73]. Es entsteht ein variables Konstrukt, das an die jeweilige Situation angepasst werden kann. Nachteilig bleiben durch die exponierte Lage eine Einschränkung des Komforts [127] und die regelmäßig durchzuführende Pflege der Pinaustrittsstellen zur Vermeidung von Infekten [83]. Doch durch diese Art der Montage werden weitere Traumatisierungen [133] sowie die Zerstörung des Gefäßsystems verhindert, so dass das Auftreten von Knochennekrosen minimiert werden kann [141].

2.6 Einflussfaktoren auf die Frakturheilung

Die Voraussetzungen für eine ungestörte Frakturheilung sind sowohl mechanischer als auch biologischer Art. So sind eine Ruhigstellung der Fragmentenden, ein hinreichender Kontakt der Bruchflächen sowie eine ausreichende Gefäßfunktion, Vitalität und Regenerationspotenz des Kontaktgewebes notwendig [125]. Neben diesen Voraussetzungen für eine optimale Ausheilung existiert eine Vielzahl an lokalen und systemischen Einflussfaktoren, die den Heilungsprozess positiv oder negativ beeinflussen können. Die lokalen Faktoren sind hierbei weitaus wichtiger als die systemischen, die gegenwärtig kontrovers diskutiert werden. So kann, laut Literatur, eine hyperbare Oxygenierung die Heilung verzögern, fördern oder keinen Effekt hervorrufen. Auch der Antikoagulation wurde sowohl ein unterstützender als auch ein verzögernder Einfluss zugeschrieben. Wachstumsfaktoren können die Heilung positiv unterstützen oder gar keinen Effekt erzielen. Bei anderen systemisch wirkenden Faktoren, wie bestimmten Medikamenten oder auch Krankheitsbildern besteht ein Konsens [14]. So gehören z.B. Kortikosteroide, nichtsteroidale Antiphlogistika, Zytostatika [125], hypovolämische Anämie, Eisenmangelanämie

und chronisch systemische Hypoxie zu den Faktoren, die die Frakturheilung verzögern. Unterstützende Faktoren sind z.B. anabole Steroide, Vitamin A, Vitamin D, Thyroxin, L-Dopa und Insulin [14].

Auch das Alter des Patienten zählt zu den systemischen Faktoren. Je jünger ein Patient ist, desto schneller und ausgiebiger verheilt ein Knochenbruch [125].

Die lokalen Einflussgrößen beinhalten unter anderem die Lokalisation der Fraktur. Mechanische Unterschiede und verschiedene Durchblutungsverhältnisse in der Knochenarchitektur lassen z.B. Frakturen am distalen Tibiaschaft langsamer heilen als solche im mittleren oder proximalen Bereich. Darüber hinaus spielt die Knochenstruktur eine Rolle. Spongiose Knochen heilen nach einer Fraktur schneller als Kortikalisfrakturen [125]. Durch ausgedehnte Verletzungen, Unterbrechung der lokalen Blutversorgung im Frakturgebiet und interponiertes Weichteilgewebe wird die Heilung behindert. Auch eine inadäquate Immobilisierung, das Auftreten von Infektionen oder malignen Prozessen im Frakturgebiet sowie Knochennekrosen verzögern die Heilung. Demgegenüber stehen die lokalen Einflussgrößen, die eine Frakturheilung positiv unterstützen. So führen die topische Gabe von Fluoriden, die Injektion von Chondroitinsulfaten in den Kallus und die Durchführung einer venösen Abschnürung proximal des Frakturgeschehens zu einer Förderung der Heilung [14].

Biomechanische Faktoren zählen ebenfalls zu den lokalen Größen, die die Frakturheilung beeinflussen können [14]. Wird ein Fixateur externe als Osteosynthesystem genutzt, kann durch eine Steigerung der Schanzschrauben- bzw. der Pin-Anzahl, durch Erhöhung des Schraubendurchmessers [35] und durch Verringerung des Abstandes zwischen Fixateurstange und Knochen das System stabiler gemacht und somit dessen Steifigkeit erhöht werden [26]. Steifere Systeme reduzieren im Allgemeinen die interfragmentären Bewegungen, wohingegen weichere Systeme größere Bewegungen zulassen [48]. Es konnte gezeigt werden, dass geringe axiale interfragmentäre Bewegungen zwischen 0,2 mm und 1,0 mm bessere Frakturheilungsergebnisse liefern als Bewegungen über 2 mm [157]. Hierbei ist ein Zusammenhang zwischen mechanischer Instabilität und dem entstehenden Kallusvolumen zu beobachten [110]. Rigide Fixationen rufen eine kleinere Kallusbildung hervor. Systeme, die größere interfragmentäre Bewegungen zulassen, führen zwar zu einer vermehrten Kallusproduktion, müssen jedoch nicht zwangsläufig qualitativ guten und damit mechanisch belastbaren Kallus hervorbringen. So lassen sich häufig trotz erheblicher Kallusmenge keine Fragmentüberbrückungen nachweisen. Dies kann zu einer verzögerten bis hin zur ausbleibenden Heilung (hypertrophe Pseudarthrose) führen [26].

Ein entsprechendes Maß an Mikrobewegungen im Frakturspalt löst unter anderem über feine piezoelektrische Änderungen die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren aus. Diese Faktoren, aber auch Zytokine und andere regulatorische Proteine, besitzen verschiedenste Effekte auf die Zellproliferation und -differenzierung während der Frakturheilung und werden von den unterschiedlichen Zellarten, die sich im Frakturgebiet befinden, synthetisiert [121].

2.6.1 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind körpereigene Substanzen [114], die als Transmitter dienen. Sie sind Teil eines komplexen zellulären Kommunikationsnetzwerkes und beeinflussen die Zellteilung, die Synthese der extrazellulären Matrix und die Gewebedifferenzierung. Somit spielen Wachstumsfaktoren bei der Knorpel- und Knochenformation und bei der Wiederherstellung von muskuloskeletalem Gewebe eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression bestimmter Faktoren während der verschiedenen Phasen der Frakturheilung induziert wird [74].

2.6.1.1 *Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)*

Bone Morphogenetic Proteins gehören mit Ausnahme von BMP-1, einem Enzym [118], zur Transforming Growth Factor- β - (TGF- β -) Superfamilie [50]. Seitdem Marshall R. Urist 1965 [147] zeigte, dass demineralisierte Knochenmatrix ein osteoinduktives Potential besitzt, konnten mehr als 15 unterschiedliche BMPs identifiziert werden [50]. Aufgrund ihres molekularen Aufbaus werden sie in drei Unterklassen gegliedert. Die erste beinhaltet unter anderem BMP-2 und BMP-4, die zweite BMP-5, BMP-6, BMP-7 sowie BMP-8 und die dritte BMP-3 [158].

BMPs sind nicht nur an der Entstehung von Knorpel und Knochen, sondern auch an der Entwicklung von Nieren, Hoden, Zähnen, Haut und Herz beteiligt [161]. Als Signalmoleküle spielen sie eine wichtige Rolle während der Embryogenese und den Regenerationsvorgängen im Verlauf des Lebens [58]. Sie regulieren unter anderem die Hämatopoiese, stimulieren die Synthese der extrazellulären Matrix und beeinflussen die Apoptose [118]. Zusätzlich induzieren BMPs die Migration, Proliferation und Differenzierung knochenbildender Zellen und deren Vorläufern [165].

Im Rahmen der Frakturheilung besitzen BMPs eine Wirkung auf die Osteoprogenitorzellen. Diese pluripotenten Zellen werden während einer Fraktur über BMP-Bindung an transmembranösen Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren aktiviert [156]. Im Detail bindet BMP an einen Typ-II-Rezeptor, der einen Typ-I-Rezeptor phosphoryliert. Dieser Rezeptorkomplex phosphoryliert intrazelluläre Proteine, die so genannten „Small mothers against decapentaplegic“ (Smads) [31]. Sie dringen nach der Formation zu heterodimeren Komplexen in den Zellkern ein

und initiieren die Transkription ihrer Zielgene [160]. Als Folge werden Makromoleküle synthetisiert, die an der Knochen- und Knorpelentwicklung, sowie der Differenzierung mesenchymaler Zellen zu Chondrozyten oder Osteoblasten beteiligt sind [118].

Eine entscheidende Rolle bei der Frakturheilung spielen BMP-2, BMP-4 und BMP-7, da sie die Differenzierung mesenchymaler Zellen zu Osteoblasten und Chondroblasten stimulieren [74].

2.6.1.1.1 Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)

Wozney *et al.* [159] isolierten und sequenzierten 1988 das BMP-2-Gen. Es ist auf Chromosom 20 lokalisiert [118] und kodiert für ein Protein mit einer Länge von 396 Aminosäuren (AS) und einem Molekulargewicht von 44,7 kDa. BMP-2 wird von mesenchymalen Zellen, Chondroblasten und Osteoblasten gebildet [11]. Nach einem Frakturereignis weist die mRNA-Synthese von BMP-2 in der Maus sowohl am ersten als auch am 21. Tag nach dem Trauma ein Maximum auf [23]. BMP-2 induziert die Differenzierung mesenchymaler Zellen zu Osteoblasten, die weiteres BMP-2 sezernieren [134]. Darüber hinaus stimuliert es die Proliferation von Chondrozyten und Osteoblasten [66] und fördert die Chemotaxis der Osteoblasten und Monozyten [29].

Auf genregulatorischer Ebene steigert BMP-2 die mRNA-Synthese von BMP-3 und BMP-4, assoziiert mit einer zunehmenden Expression des Knochendifferenzierungsmarkers Osteopontin (OPN). Zusätzlich kann eine Autoregulation beobachtet werden. BMP-2 steigert seine eigene mRNA-Synthese und Promotor-Aktivität [22]. Es weist angiogenes Potential auf, indem die Entstehung neuer Blutgefäße durch die Stimulierung der Vascular Endothelial Growth Factor- (VEGF-) Expression induziert wird [18]. Auch die mRNA-Synthese von TGF- β_1 wird durch den Einfluss von BMP-2 erhöht [29].

2.6.1.1.2 Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4)

Parallel zu BMP-2 isolierten und sequenzierten Wozney *et al.* [159] das BMP-4-Gen. Es ist auf Chromosom 14 lokalisiert [118] und kodiert für ein 408 AS langes und 46,5 kDa schweres Protein.

BMP-4 wird nach einem Frakturereignis von mesenchymalen Zellen, Chondroblasten [11] und undifferenzierten Osteoprogenitorzellen exprimiert [91]. Es stimuliert die Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Osteoblasten [134] und unterstützt die Chemotaxis jener Zellen [42]. Somit fördert BMP-4 wie auch BMP-2 bei einer Fraktur die Knorpel- und Knochenbildung [22].

Der zeitliche Verlauf der mRNA-Synthese von BMP-4 im Mausmodell wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben. Nakase *et al.* [91] konnten die mRNA nur in der frühen Phase der

Frakturheilung mit einem Maximum am zweiten Tag nach dem Trauma nachweisen, wohingegen Cho *et al.* [23] eine klar begrenzte Expression zwischen dem 14. und 21. Tag zeigten.

2.6.1.1.3 Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7)

Reddi *et al.* [119] konnten 1987 das BMP-7-Gen isolieren. Es ist auf Chromosom 20 lokalisiert [118]. Das Translationsprodukt hat eine Länge von 431 AS und wiegt 49,3 kDa. Es stimuliert die Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Zellen, Osteoprogenitorzellen [18] sowie Chondrozyten [50] und unterstützt so die Frakturheilung. Genau wie für BMP-2 konnte auch für BMP-7 eine Induktion der ektopen Knochenentwicklung nachgewiesen werden [18].

BMP-7 fördert die Kollagensynthese [50], kann Angiogenese initiieren und die angiogene Aktivität von TGF- β_1 steigern [18]. Auf genregulatorischer Ebene stimuliert BMP-7 die mRNA-Synthese von BMP-6 und reduziert die von BMP-2 und BMP-4 [58]. Nach einem Frakturereignis zeigt BMP-7 bei Mäusen ein ähnliches Expressionsmuster wie BMP-4 mit einem Maximum vom 14. bis zum 21. Tag nach dem Trauma [23].

2.6.1.2 Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)

Gegenwärtig sind zwei Insulin-like Growth Factors (IGFs) bekannt, IGF-1 und IGF-2 [74]. IGF-1 ist ein 195 AS langes und 21,8 kDa schweres Protein, das 1978 von Rinderknecht und Humbel [122] isoliert wurde. Das kodierende Gen ist auf Chromosom 12 lokalisiert.

IGF-1 wird von Chondroblasten [113], Osteoblasten [92] sowie Osteozyten [93] exprimiert und bindet an den IGF-1 Rezeptor (IGF-1R). Durch Phosphorylierung werden unter anderem Mitogen-activated protein kinase (MAPK) und Phosphoinositid 3-Kinase (PI3Kinase) aktiviert [36]. Auf diese Weise nimmt IGF-1 Einfluss auf die Knochenentwicklung, das Wachstum und die Reparaturvorgänge im Knochen [77], indem es die Proliferation und Differenzierung von Osteoblastenvorläuferzellen, Osteoblasten, Fibroblasten und Osteoklastenprogenitorzellen stimuliert [92]. Somit kann IGF-1 sowohl die Knochenformation, als auch die Resorption positiv beeinflussen [77]. Zusätzlich regt es die Kollagensynthese an [93] und induziert die mRNA-Synthese von VEGF [18].

Im Rahmen der Frakturheilung wird IGF-1 bei Ratten ab dem ersten Tag nach dem Trauma synthetisiert [97]. Am achten Tag erreicht die mRNA-Konzentration ihr Maximum [113].

2.6.1.3 Platelet Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB)

Die Familie der Platelet Derived Growth Factors (PDGF) setzt sich aus PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C und PDGF-D zusammen, die Homo- bzw. Heterodimere bilden [120]. PDGF-BB ist ein 241 AS langes und 27,3 kDa schweres Protein, das 1981 von Della-Favera *et al.* [30] isoliert wurde. Das kodierende Gen ist auf Chromosom 22 lokalisiert.

PDGF-BB wird von Makrophagen [113], mesenchymalen Zellen, Osteoblasten, Osteoklasten und Chondrozyten exprimiert. In der frühen Phase der Frakturheilung sezernieren vor allem degranulierte Blutplättchen das Protein [12]. Eine mRNA-Synthese in der Ratte lässt sich ab dem vierten Tag nach dem Frakturereignis nachweisen [145].

Das sezernierte PDGF-BB bindet sowohl an den PDGF Rezeptor- α (PDGFR- α) als auch an PDGFR- β , die daraufhin Dimere bilden und durch Phosphorylierung MAPK und PI3Kinase aktivieren [88]. Dadurch werden sowohl Migration als auch Proliferation der Fibroblasten und Osteoblasten stimuliert. Zusätzlich erhöht PDGF-BB die Kollagensynthese, aktiviert die Expression von Cysteine-rich Protein 61 (CYR61) [53] und steigert unter hypoxischen Bedingungen die VEGF-Expression [12].

2.6.1.4 Vascular Endothelial Growth Factor- A_{165} (VEGF- A_{165})

VEGF- A_{165} ist ein Mitglied der VEGF-Familie [55]. Durch alternatives Splicen entstehen drei Transkripte, VEGF- A_{121} , VEGF- A_{165} und VEGF- A_{189} [146]. Das Gen ist auf Chromosom 6 lokalisiert. 1980 konnten Brown *et al.* [15] die VEGFs identifizieren. VEGF- A_{165} ist ein 412 AS langes und 45,5 kDa schweres Protein, das von Blutplättchen, Monozyten [140], Chondrozyten Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten und Osteoklasten [146] exprimiert wird. Es bindet sowohl an VEGF Rezeptor-1 (VEGFR-1) als auch an VEGFR-2 und induziert so jeweils eine Homodimerbildung des entsprechenden Rezeptors. Diese aktiviert unter anderem den MAPK-Pathway [81]. Dadurch wird die Chemotaxis, Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten und Osteoklasten erhöht [18]. Zusätzlich stimuliert VEGF- A_{165} die Formation neuer Blutgefäße, indem es die Proliferation, Migration und Permeabilität der Endothelzellen aktiviert [81]. Während der Frakturheilung regt es somit auch die Kallusvaskularisierung an [138]. Besonders unter hypoxischen Bedingungen lässt sich eine gesteigerte mRNA-Synthese des VEGF- A_{165} nachweisen [55].

Im Rahmen der Frakturheilung wird in der Ratte ab dem ersten Tag die VEGF- A_{165} mRNA synthetisiert. Am fünften Tag nach dem Trauma erreicht die Konzentration ein Maximum [146].

2.6.2 Zytokine

Zytokine stellen eine Gruppe von Proteinen dar, die sowohl hematopoietische als auch immunologische Funktionen regulieren. Sie sind involviert in inflammatorische Reaktionen, Angiogenese, Knorpel- und Knochenmetabolismus und werden in diesen Zusammenhängen von aktivierten Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoblasten exprimiert [38]. Die Zytokine vermitteln ihre Wirkung über verschiedene Oberflächenrezeptoren [69]. Auch bei der Frakturheilung spielen sie eine wichtige Rolle [38].

2.6.2.1 Interleukin-1 (IL-1)

IL-1 wurde im Jahr 1984 von Auron *et al.* [5] isoliert und ist ein 271 AS langes und 30,6 kDa schweres Protein. Das kodierende Gen ist auf Chromosom 2 lokalisiert [41].

IL-1 wird von Phagozyten, Fibroblasten, T- und B-Lymphozyten [41], von Monozyten/Makrophagen, Osteoblasten [92] und mesenchymalen Zellen [68] exprimiert. Es induziert durch seine Rezeptorbindung die Formation eines Heterokomplexes aus dem Typ 1 Rezeptor (IL-1R1) und dem Rezeptorassoziierten Protein (IL-1RAcP). Dies führt zur Rekrutierung von Adapter-Molekülen und rezeptorassoziierten Kinasen, die die Aktivität von Nuclear factor-kappaB (NF- κ B) und Jun N-terminal kinase (JNK) vermitteln [69]. Zusätzlich aktiviert IL-1 den MAPK-Pathway [143]. Dadurch wird die Differenzierung hematopoietischer Vorläuferzellen stimuliert und die resorptive Kapazität der Osteoklasten unterstützt. Zusätzlich fördert IL-1 die Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten und regt in Anwesenheit von Vitamin D₃ und Parathormon die Kollagensynthese an [68]. Es fördert die T-Zell-Proliferation [41] und die Angiogenese. Neutrale Proteasen werden durch IL-1 aktiviert, um frühes Kallusgewebe für die Gefäßinvasion und Kalzifizierung abzubauen [38]. Die mRNA-Synthese von Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) [92], IGF-1 [77], IL-6 [69] und Matrix Metalloproteinase-13 (MMP-13) [124] wird durch IL-1 stimuliert.

Im Rahmen der Frakturheilung lässt sich im Mausmodell am ersten Tag nach dem Trauma ein Maximum der mRNA-Konzentration von IL-1 nachweisen [68].

2.6.2.2 Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 gehört zur gp130 Zytokinfamilie [69]. Das Protein wurde 1986 von Zilberstein *et al.* [166] isoliert und ist 212 AS lang und 23,7 kDa schwer. Das Gen liegt auf Chromosom 7 [41].

IL-6 wird von Phagozyten, T-Zellen, Fibroblasten, Monozyten/Makrophagen [41], Osteoblasten und Osteoklasten [92] exprimiert. Das sezernierte Protein bindet an den IL-6 Rezeptor (IL-6R),

so dass sich das 130 kDa Glykoprotein (gp130) anlagern kann. Dies initiiert eine Serie von intrazellulären Signaltransduktionen [41], wie die Aktivierung der Januskinase. Die ausgelösten Kaskaden führen unter anderem zu einer erhöhten Expression osteoklastenaktivierender Faktoren [103], so dass die Formation der Osteoklastenvorläufer stimuliert und die Osteoklastogenese vermittelt wird [92]. Zusätzlich fördert IL-6 die Synthese extrazellulärer Matrix, rekrutiert fibrogene Zellen und stimuliert die Angiogenese [68]. Es induziert die T-Zell-Aktivierung sowie deren Differenzierung und unterstützt die finale Reifung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen [41].

Im Rahmen der Frakturheilung konnte in der Ratte eine mRNA-Synthese des IL-6 ab dem dritten Tag nachgewiesen werden [38].

2.6.2.3 *Transforming Growth Factor- β_1 (TGF- β_1)*

Es sind fünf Isoformen des TGF- β bekannt, TGF- β_1 , TGF- β_2 , TGF- β_3 , TGF- β_4 und TGF- β_5 . Sie alle sind Mitglieder der TGF- β -Superfamilie [74]. TGF- β_1 wurde 1985 von Derynck *et al.* isoliert und synthetisiert [32]. Das Gen ist auf Chromosom 19 lokalisiert und kodiert für ein 390 AS langes und 44,3 kDa schweres Protein.

TGF- β_1 lässt sich in vielen Geweben nachweisen. Im Knorpel bzw. Knochen wird es während der Knochenentwicklung, des Wachstums und der Frakturheilung von Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten [23] und hypertrophen Chondrozyten [16] exprimiert. Aber auch T-Zellen, Blutplättchen und Monozyten synthetisieren TGF- β_1 [41]. Die Blutplättchen z.B. geben das Protein nach Degranulierung in der inflammatorischen Phase der Frakturheilung [11] an das sich bildende Hämatom ab [74]. So erreicht die mRNA-Synthese schon am ersten Tag nach dem Frakturereignis im Mausmodell ein Maximum [23].

TGF- β_1 bindet an den gleichen Rezeptorkomplex wie andere Mitglieder der TGF- β -Superfamilie [77], mit dem Unterschied, dass andere Smads als intrazelluläre Mediatoren phosphoryliert werden [71]. Auf diese Weise wird die Proliferation und Differenzierung mesenchymaler Zellen zu Osteoblasten, Osteoklasten und Chondroblasten stimuliert [121], Osteoblastenvorläufer werden rekrutiert und die Kollagensynthese in Fibroblasten angeregt [16]. Auch die Migration der Fibroblasten und Monozyten wird aktiviert [113]. TGF- β_1 induziert die mRNA-Synthese von BMP-2 [77], IL-6 [92], CYR61 [53], VEGF [18] und Osteoblasten-Differenzierungsmarkern, wie OPN. Zusätzlich kann eine Autoregulation beobachtet werden [77]. TGF- β_1 senkt die Expression der IL-1-Rezeptoren [71] und inhibiert die Kollagenasen-Synthese [41].

2.6.2.4 *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α)

Es lassen sich zwei Tumor Necrosis Factors (TNFs) unterscheiden, TNF- α und TNF- β [46]. TNF- α weist ein Gewicht von 25,6 kDa und eine Länge von 233 AS auf. 1984 konnte es von Pennica *et al.* [107] isoliert werden. Das kodierende Gen liegt auf Chromosom 6 [41].

Monozyten/Makrophagen, Osteoblasten [92], Fibroblasten, Mastzellen [41] mesenchymale Zellen und hypertrophe Chondrozyten [46] exprimieren TNF- α . Dieses kann an zwei Rezeptortypen binden, TNF Rezeptor-1 (TNFR1 (p55)) und TNFR2 (p75) [46]. Stellt es den Liganden für TNFR1 dar, so wird eine Kaspasen-Kaskade aktiviert. Bindet TNF- α an TNFR2, so werden NF- κ B und JNK aktiviert. [69]. Über diese Liganden-Rezeptor-Bindungen können Zellen in Apoptose gehen bzw. ihr Überleben gesteuert werden [46]. Zusätzlich induziert TNF- α die Expression von Hypoxia-inducible Factor-1 α (HIF-1 α) [1] sowie Akute Phaseproteinen wie IL-1 [92] und IL-6 [69]. Es erhöht die Adhäsionsfähigkeit von Leukozyten an die Gefäßendotheloberflächen und reguliert während der Frakturheilung die resorptive Kapazität der Osteoklasten [67]. Darüber hinaus nimmt es Einfluss auf die Osteoblastenaktivität, indem die Differenzierung hematopoietischer Vorläuferzellen stimuliert wird. TNF- α besitzt darüber hinaus auch ein angiogenes Potential [113].

Im Rahmen der Frakturheilung zeigt die mRNA-Synthese von TNF- α in der Maus schon am ersten Tag nach dem Trauma ein Maximum. Ein erneuter Peak lässt sich nach 28 Tagen nachweisen [68].

2.6.3 Extrazelluläre Matrixproteine

Matrixproteine sind Bestandteile der extrazellulären Matrix. Hauptstrukturprotein der extrazellulären Matrix des Knochens und des Knorpels ist Kollagen [37]. Zusätzlich lassen sich noch weitere nicht-kollagene Proteine, wie z.B. Osteonectin, Osteopontin, andere Glykoproteine und Proteoglykane nachweisen [92]. Auch während der Frakturheilung spielen viele dieser Vertreter der extrazellulären Matrixproteine eine wichtige Rolle [37].

2.6.3.1 *Cysteine-rich Protein 61* (CYR61)

CYR61 ist eines von sechs Mitgliedern [40] der CCN-Familie [53]. 1985 entdeckten Lau und Nathans [72] dieses Protein, das eine Länge von 381 AS und ein Molekulargewicht von 42,0 kDa aufweist. Das kodierende Gen ist auf Chromosom 1 lokalisiert [60].

CYR61 fungiert als Ligand verschiedener Integrinrezeptoren wie $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ und $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ [90]. Es wird in unreifen und proliferierenden Chondrozyten, Osteoblasten, Fibroblasten,

mesenchymalen Zellen sowie Muskelzellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Knorpel- und Knochenformation, indem es die Chondrogenese und Angiogenese stimuliert [53]. Aufgrund der Anwesenheit von CYR61 adhären, migrieren und proliferieren Endothelzellen und Fibroblasten. Knockout Mäuse weisen keine Lebensfähigkeit auf, sie sterben schon pränatal oder überleben maximal 24 Stunden [90]. Auf genregulatorischer Ebene steigert CYR61 die Expression von VEGF und Kollagen-Typ II (Coll II) [21].

Während der Frakturheilung im Rattenmodell lässt sich die mRNA-Synthese ab dem dritten Tag nach dem Trauma mit einem Maximum am siebten Tag nachweisen [53].

2.6.3.2 *Kollagen-Typ II (Coll II)*

Coll II gehört zu der Familie der Kollagene und ist der Hauptbestandteil des Knorpels [163]. Das Gen ist auf Chromosom 12 lokalisiert und kodiert für ein Protein mit einer Länge von 1487 AS und einem Molekulargewicht von 141,8 kDa.

Exprimiert wird Kollagen-Typ II von proliferierenden Chondrozyten [37], die im weiteren Verlauf zu hypertrophen Chondrozyten differenzieren. Mit Beginn dieses Differenzierungsgrades stellen die Zellen ihre Kollagen-Typ II Synthese ein [163].

Im Rahmen der Frakturheilung lässt sich die mRNA-Synthese des Coll II im Mausmodell ab dem fünften Tag nach dem Frakturereignis nachweisen [37] und erreicht um den zehnten Tag ein Maximum [152]. Abgebaute Coll II-Fasern können eine Migration von Gefäßendothelzellen induzieren. Unklar ist jedoch, ob das native Kollagen direkt von Osteoklasten abgebaut werden kann [163].

2.6.3.3 *Osteopontin (OPN)*

OPN wurde 1985 von Franzén und Heinegard isoliert [43]. Das entsprechende Gen liegt auf Chromosom 4 und kodiert für ein 300 AS langes und 33,8 kDa schweres Glykoprotein.

Als multifunktionelles Protein wird OPN in verletzten Organen, wie Gehirn, Leber, Gastrointestinaltrakt, Lunge, Niere und Knochen vermehrt exprimiert. Während der Inflammation sezernieren epitheliale, mesenchymale und immunkompetente Zellen, wie T-Lymphozyten und Makrophagen dieses Protein [137]. Im Rahmen der embryonalen Knochenentwicklung und der Frakturheilung wird Osteopontin von Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten exprimiert [164]. Das in diesem Zusammenhang an die extrazelluläre Matrix abgegebene OPN bindet an verschiedene Zell-Oberflächen-Rezeptoren [137]. Unter anderem dient es als Ligand für den CD44-Rezeptor [37]. Diese Interaktion

induziert die Chemotaxis von Fibroblasten [164] und stimuliert die Synthese von Zytokinen und Metalloproteinasen in den CD44-tragenden Zellen [137]. Darüber hinaus ist OPN ein wichtiges Ankerprotein, das die Adhäsion der Osteoklasten mit der extrazellulären Matrix reguliert [56]. Es ist beteiligt an der physiologischen Gewebemineralisierung [164], an der Entstehung pathologischer Kalzifizierungen, wie Atherosklerose [93] und im Verlauf der Frakturheilung an der Mineralisierung des Kallus und dessen Remodeling. In diesem Zusammenhang lässt sich eine mRNA-Synthese von OPN in der Ratte ab dem dritten Tag nach dem Frakturgeschehen nachweisen [164].

2.6.4 Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die an regulatorische Sequenzen der DNA binden und damit die Rate der Gentranskription erhöhen. Sie lassen sich in verschiedene Familien, Helix-turn-helix-, Homeodomain-, Helix-loop-helix-, Zink-Finger- und Leucin-Zipper-Familie unterteilen. Auch in der Frakturheilung spielen sie eine wichtige Rolle [6].

2.6.4.1 *Hypoxia-inducible Factor-1 α* (HIF-1 α)

HIF-1 α ist ein Mitglied der Basic Helix-Loop-Helix-Familie [34]. Diese Proteinuntereinheit wiegt 92,7 kDa und umfasst 826 AS. Sie wurde 1995 von Wang *et al.* [151] isoliert und das kodierende Gen ist auf Chromosom 14 lokalisiert.

HIF-1 α wird von myeloischen Zellen, Makrophagen [34], Fibroblasten [45], Chondrozyten und Osteoblasten [67] exprimiert. Je kleiner der pO₂-Wert an der Zellmembran ist, desto mehr HIF-1 α wird von den Zellen synthetisiert [154]. Zusätzlich findet eine Regulation des bereits translatierten Proteins statt. Unter Normoxie wird HIF-1 α ubiquitin-vermittelt abgebaut, wohingegen hypoxische Bedingungen zur Stabilisierung und Aktivierung des Proteins führen [67]. Dieses wird dann in den Zellkern transloziert, wo es mit HIF-1 β einen HIF-1-Komplex bildet. Dieser Komplex bindet an regulatorische DNA-Abschnitte hypoxieinduzierter Gene [34]. Auf diese Weise steigert HIF-1 α die Expression ca. 60 verschiedener Zielgene [45], wie z.B. die von VEGF [34], IL-1, TNF- α [45] und anderen Genen, wie Erythropoietin und glykolytischen Enzymen. So löst es Gefäßwachstum aus, regt die Erythropoese an, bewirkt Vasodilatation und stimuliert den anaeroben Stoffwechsel [154].

Im Rahmen der Frakturheilung lässt sich eine mRNA-Synthese im Rattenmodell ab dem dritten Tag nach dem Trauma mit einem Peak am zehnten Tag nachweisen [67]. Doch nicht nur Hypoxie, sondern auch Zytokine, wie TNF- α , können die Expression des Proteins während der

frühen Inflammation steigern. So lässt sich die HIF-1 α mRNA in der Maus schon sechs Stunden nach einer Verletzung in inflammatorischen Zellen nachweisen [1].

2.6.5 Matrixdegradierende Proteasen

Die Familie der Matrix Metalloproteinasen (MMPs) beinhaltet etwa 20 Mitglieder, wobei diese sich in vier Untergruppen gliedern, die Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und membranassoziierte MMPs [163]. Als proteolytische Enzyme [100], mit einem pH-Optimum im neutralen Bereich [148], nehmen sie sowohl am physiologischen als auch am pathologischen Knorpelumsatz teil, indem sie die extrazelluläre Matrix abbauen [163]. So werden MMPs z.B. während des pathologischen Knorpelumsatzes bei rheumatoiden und osteoarthritischen Prozessen aktiviert. Zusätzlich sind sie bei der Vaskularisierung und der Proteolyse kollagener Gewebe beteiligt [152]. Während der Frakturheilung stellen MMP-2, MMP-9, MMP-13 und MMP-14 die wichtigsten Vertreter dieser Familie dar [155], wobei MMP-9 und MMP-13 vorherrschend im Skelett nachweisbar sind [148].

2.6.5.1 Matrix Metalloproteinase-13 (MMP-13)

MMP-13 ist ein 471 AS langes und 53,8 kDa schweres Protein, dessen Gen auf Chromosom 11 lokalisiert ist. Freije *et al.* [44] identifizierten es 1994.

MMP-13 gehört zur Untergruppe der Kollagenasen und wird auch als Kollagenase-3 bezeichnet. Als proteolytisches Enzym spaltet es vor allem Kollagen-Typ II im Knorpel und initiiert während der Frakturheilung den Abbau knorpeliger Matrix. Die Resorption und das Remodeling des Kallus werden eingeleitet. Zusätzlich induziert es während der enchondralen Ossifikation die Gefäßinvasion in den Knorpel. Zum Zeitpunkt der embryonalen Knochenentwicklung sezernieren hyperthrophe Chondrozyten sowie Osteoblasten MMP-13. Auch im Verlauf der Frakturheilung lässt sich dieses Enzym in hypertrophen Chondrozyten und unreifen Osteoblasten nachweisen. In der inflammatorischen Phase exprimieren vor allem Osteoprogenitorzellen MMP-13. Schon am ersten Tag nach dem Trauma zeigt sich im Mausmodell eine mRNA-Synthese. Zwei Wochen später erreicht sie ein Maximum [163].

2.7 Tiermodell

Für diese Studie wurde das Schaf als Modelltier ausgewählt. Zwar unterscheidet sich die ovine Knochenanatomie von der des Menschen, dennoch liegt bei der für die Osteotomie genutzten Tibia eine funktionelle Ähnlichkeit vor. Die menschliche Tibia ist ein dickwandiger und relativ englumiger Röhrenknochen, der sich in der Tragachse des Skelettes befindet. Die Schafttibia

steht ebenfalls in der Tragachse des Tieres und ähnelt zudem in Struktur und Form der humanen. Die Knochengröße des Tieres erlaubt den Einsatz von humanem Osteosynthesematerial [142]. Auch die maximale Belastung bei normaler Laufphase [70] sind beim Menschen und beim Schaf vergleichbar.

Ein weiterer Vorteil des Schafes als Modelltier ist, dass es nach der Operation die entsprechende Extremität frühzeitig belastet [94, 142], was die Heilung positiv beeinflusst [128]. Zusätzlich zeigt sich das Tier von der Fixateurversorgung und dem Wundverschluss unbeeindruckt. So kommt es weder vom Schaf selbst noch durch die Herde zu Manipulationen. Dies unterstützt eine komplikationslose Heilung.

Nachteilig erscheint lediglich die große Regenerationspotenz der Schaftibia im Vergleich zum Menschen, jedoch kommt das ovine Regenerationsverhalten dem des Menschen am nächsten [142].

Auch in der Literatur [26, 65, 76, 141, 142] dient das Schaf als Modelltier bei Studien zur Knochenheilung. Die Ergebnisse, die am Tiermodell erhoben werden, müssen allerdings abschließend durch klinische Studien bestätigt bzw. widerlegt werden [94].

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsablauf

Zwölf zufällig ausgewählte Schafe wurden randomisiert in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe (Gruppe 1) bestand aus sechs Tieren und erhielt einen rigiden Fixateur externe. Die zweite Gruppe (Gruppe 2) umfasste ebenfalls sechs Tiere und wurde mit einem kritischen Fixateur externe versorgt.

An den Tieren wurde im diaphysären Bereich der rechten medialen Tibiakante eine Osteotomie durchgeführt (Abb. 2). Aus dem entstandenen Osteotomiespalt wurde das Frakturhämatom vier Tage nach der Operation (OP) gewonnen. Die Schafe wiesen eine Standzeit von insgesamt 14 Tagen auf.

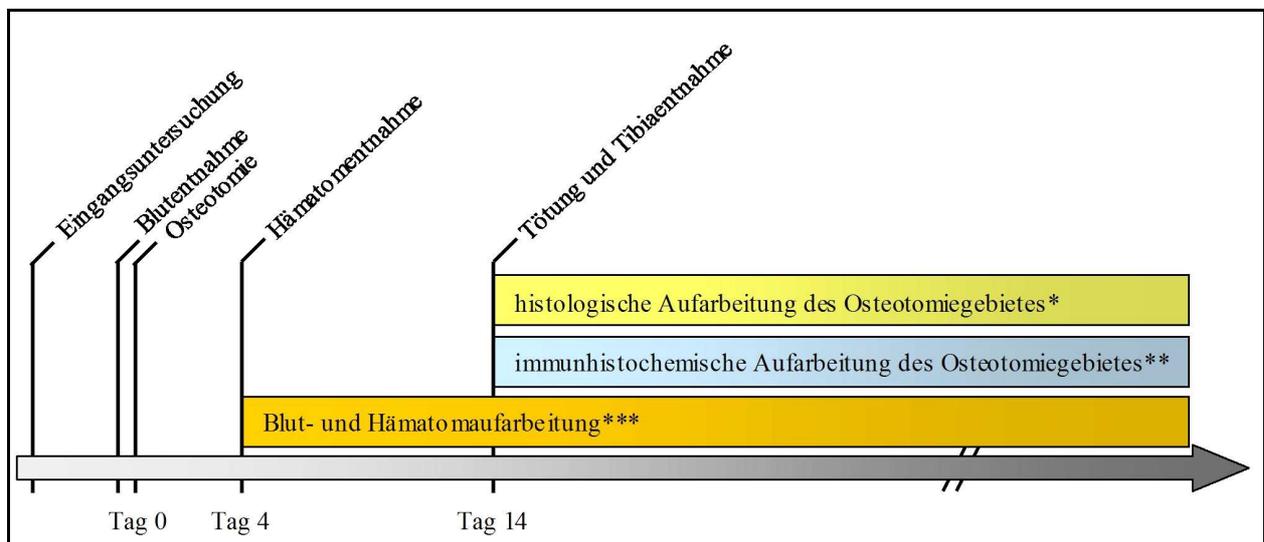


Abb. 2: Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufes.

* Herstellung der Schnittpräparate und histologische Färbungen

** Herstellung der Parafinschnitte und immunhistochemische Färbungen

*** RNA-Isolierung, Reverse Transkription-PCR, Semiquantitative PCR und Real-time PCR

Vor dem Eingriff fand eine Blutentnahme statt (Abb. 2). Dieses Blut sollte als Ausgangswert dienen, um einen Vergleich zwischen der regulär stattfindenden mRNA-Synthese im peripheren Blut und der entsprechenden Expression der mRNA im sich bildenden Frakturhämatom ziehen zu können.

Die Proben, bestehend aus peripherem Blut und Frakturhämatom, wurden molekularbiologisch auf die Expression folgender Faktoren hin untersucht: Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2), BMP-4, BMP-7, Cysteine-rich Protein 61 (CYR61), Hypoxia-inducible Factor-1 α (HIF-1 α), Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), Interleukin-1 (IL-1), IL-6, Kollagen-Typ II (Coll II),

Matrix Metalloproteinase-13 (MMP-13), Osteopontin (OPN), Platelet Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB), Transforming Growth Factor- β_1 (TGF- β_1), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) und Vascular Endothelial Growth Factor- A_{164} (VEGF- A_{164}). Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente als Referenzgen und wurde stets mit untersucht.

Nach der 14-tägigen Standzeit wurden das Osteotomiegebiet und Teile des zuvor entnommenen Frakturhämatoms für histologische und immunhistochemische Analysen aufgearbeitet (Abb. 2).

3.2 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um zwölf gesunde weibliche Merinomix-Schafe. Die Tiere wiesen ein mittleres Alter von drei Jahren auf und wogen im Durchschnitt 69,5 kg ($\pm 9,5$ kg) (Gruppe 1: 62,1 kg ($\pm 5,4$ kg) und Gruppe 2: 77,0 kg ($\pm 6,4$ kg)).

Die Schafe wurden in den Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin (FEM) der Charité – Universitätsmedizin Berlin am Campus Virchow-Klinikum gehalten und versorgt. Die Genehmigung des Tierversuchvorhabens erteilte das Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin am 25.11.2004 (Genehmigungsnummer: 0172-04).

Die Tiere wurden nach der Anlieferung durch den Schäfer (Schäferei Bildt, Gutshof Langerwisch, Langerwisch, Deutschland) auf ihren guten Gesundheitszustand hin überprüft.

3.3 Fixateur externe

Der monolaterale rigide Fixateur externe (Abb. 3a) bestand aus sechs Schanzschrauben (\varnothing 5 mm, Synthes, Bochum, Deutschland) und zwei Karbonstangen (\varnothing 10 mm, Synthes), die untereinander mit zwölf Klemmbacken verbunden waren. Der Abstand zwischen den einzelnen Schrauben betrug 2,1 cm–3,4 cm–3 cm–3,4 cm–2,1 cm und die Distanz zwischen der Haut und der inneren Karbonstange war mit 15 mm bemessen. Der monolaterale kritische Fixateur externe (Abb. 3b) bestand ebenfalls aus sechs Schanzschrauben, die, an die Tibia montiert, den gleichen Abstand untereinander aufwiesen. Die Schrauben wurden über eine Fixationsstange (\varnothing 20 mm) mit Hilfe von zwei Klemmplatten, einer oberen Klemme und einem

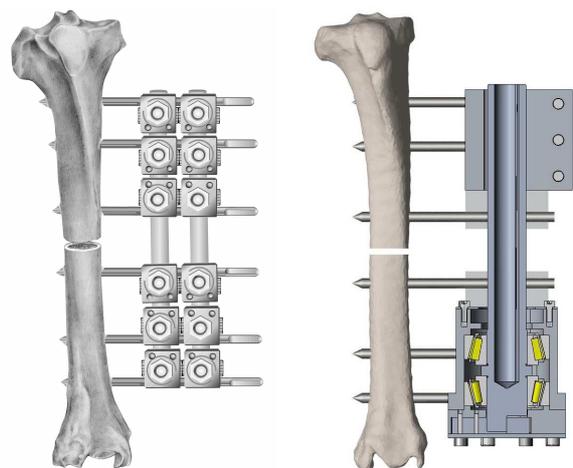


Abb. 3a

Abb. 3b

Abb. 3: Schematische Darstellung des rigiden (a) und des kritischen Fixateur externe (b), montiert an einer Schafttibia.

unteren Gehäuse miteinander verbunden. Die Distanz zwischen der Haut und der Stange betrug 20 mm.

Die *in-vivo* Messungen der interfragmentären Bewegungen ergaben initial (7. Tag post OP) für den rigiden Fixateur externe eine Rotation von 1,1°, eine Scherung von 0,7 mm und eine axiale Kompression von 0,4 mm und für den kritischen eine Rotation von 11,6°, eine Scherung von 9,5 mm und eine axiale Kompression von 2,5 mm.

Die Pinkanäle wurden von proximal nach distal mit den Nummern 1 bis 6 benannt. Die Montage beider Fixateure erfolgte auf identische Weise medial an der rechten Tibia.

3.4 Operatives Vorgehen

Sowohl die Narkose als auch die Operation erfolgten nach einem im Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin etablierten und standardisierten Verfahren [65].

Die Versuchstiere wurden vor der Operation zwölf Stunden nüchtern gehalten und lediglich mit Wasser versorgt. Als Vorbereitung erhielt jedes Schaf einen venösen Zugang in die Vena cephalica antebrachii zur Applikation von 10 mg Thiopental-Natrium (Trapanal® 2,5 g, Altana Pharma Deutschland GmbH, Konstanz, Deutschland) pro Kilogramm Körpergewicht. Im Anschluss wurde das Tier unter Laryngoskopkontrolle intubiert und an ein Beatmungsgerät angeschlossen. Die Beatmung erfolgte mit einem Isofluran-Lachgas-Sauerstoff-Gemisch. Zeitgleich wurde das Operationsfeld (rechter Hinterlauf) enthaart und gründlich gereinigt.

Im Operationssaal wurde der rechte Hinterlauf großzügig mit Povidon-Iod (Braunol®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert und danach der gesamte Körper des Tieres unter Aussparung des Operationsbereiches steril abgedeckt.

Während der Narkose wurden die Vitalparameter des Schafes per EKG, Sauerstoffsättigung und CO₂-Expirationskonzentration kontrolliert. Die Atemfrequenz wurde, CO₂-adaptiert bei einem vorgegebenen expiratorischen CO₂-Partialdruck von etwa 38 mmHg, auf zehn bis zwölf Atemzüge pro Minute eingestellt.

Die Tiere erhielten vor der Operation 100 ml Amoxicillin/Clavulansäure (Augmentan® i.v. 2,2 g, GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, München, Deutschland) intravenös als Antibiotika-Prophylaxe und wurden während des Eingriffes mit 500 ml plasmaisotoner Vollelektrolytlösung versorgt. Unmittelbar vor dem Beginn der Operation bekam das Schaf einen Bolus von 5 ml Fentanyl Dihydrogencitrat (Fentanyl-Janssen® 0,5 mg, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) als Analgetikum intravenös appliziert.

Die Osteotomie erfolgte im diaphysären Bereich der rechten medialen Tibiakante. Zur standardisierten Montage des Fixateur externe diente eine Schablone, die an den Malleolus medialis angelegt, der Anatomie angepasst, ausgerichtet und manuell fixiert wurde. Mit Hilfe der Schablone konnten kleine Hautinzisionen für die spätere Schraubenpositionierung gesetzt werden. In die Inzision durch die Schablonenöffnung wurde jeweils eine Bohrhülse direkt auf das Periost der Tibia aufgesetzt. Diese Hülse diente zum einen als Richtungsweiser für die Bohrung und zum anderen als Gewebeschutz vor der Hitzeentwicklung. Mit einem druckluftbetriebenen Spiralbohrer und unter Spülung mit 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) wurden sechs Kanäle in der Tibia eröffnet, in die die Schanzschrauben mit einem Handbohrfutter bikortikal eingedreht wurden. Bei der Montage des rigiden Fixateur externe wurden die sechs Schrauben mit zwei Karbonstangen und zwölf Klemmbacken untereinander fest verbunden. Bei der Montage des kritischen Fixateur externe sorgte eine Fixationsstange, zwei Klemmplatten, eine obere Klemme und ein unteres Gehäuse für die Schraubenverbindung. Ein geeigneter Abstandshalter gewährleistete eine standardisierte Distanz zwischen der Haut und dem Fixateurkonstrukt von 15 mm (rigider Fixateur externe) bzw. 20 mm (kritischer Fixateur externe).

Die Osteotomie wurde so durchgeführt, dass drei der sechs Schanzschrauben proximal und drei distal des Osteotomiespaltes lagen. Über eine Sägeschablone konnte die exakte Stelle durch eine Inzision der Haut und des Periost markiert werden. Die Tibia wurde nun von dem umliegenden Muskel- und Weichteilgewebe durch stumpfes Präparieren freigelegt. Zwei Homannhaken unter dem Knochen schützten dieses Gewebe während der Osteotomie zusätzlich. Die Osteotomie wurde mit einem oszillierenden, druckluftbetriebenen Sägeblatt und unter Spülung durchgeführt.

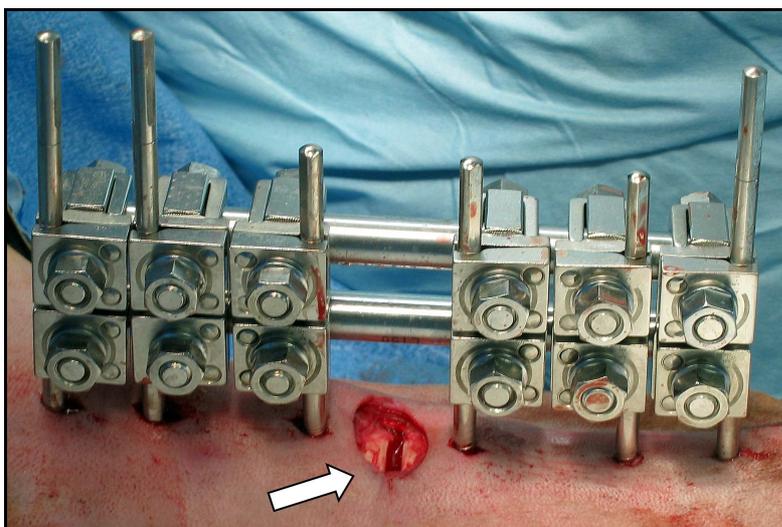


Abb. 4: Fertig montierter rigider Fixateur externe mit Blick auf das frisch eingeblutete Osteotomiehämatom (Pfeil).

Nach der vollständigen Durchtrennung der Tibia wurden die distal des Bruches gelegenen Klemmbanken bzw. die Klemmplatte gelockert. Es folgte die Distraction der Knochenenden und die Einstellung des Osteotomiespalt über einen Abstandshalter mit einer definierten Breite von 3 mm (Abb. 4). Die Klemmbanken bzw. die Klemmplatte wurden wieder festgezogen, die Wunde genäht und das Bein mit dem Fixateur externe steril bandagiert.

An die Operation schloss sich eine Röntgenkontrolle bei 73 kV und 2,5 mAs mit cranio-caudalem Strahlengang und die Gabe von 2 ml Flunixin-Meglumin (Finadyne[®] RP, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland) subkutan als Analgetikum an.

3.5 Nachsorge

Die postoperative Wundversorgung bestand in einer täglichen Wundkontrolle, bei der die Eintrittspforten der Schanzschrauben und der Nahtbereich gereinigt und mit Ethacridinlactat (Rivanol[®], Riedel-de Haën AG, Seelze, Deutschland) gespült wurden. Im Anschluss erfolgte eine Neuanlage des Verbandes. Die Schafe erhielten bis einschließlich fünf Tage nach der Operation 2 ml Finadyne[®] subkutan als Schmerzprophylaxe.

Röntgenaufnahmen (Abb. 5) mit cranio-caudalem Strahlengang dienten der Dokumentation des klinischen Verlaufes der Frakturheilung und wurden wöchentlich durchgeführt.

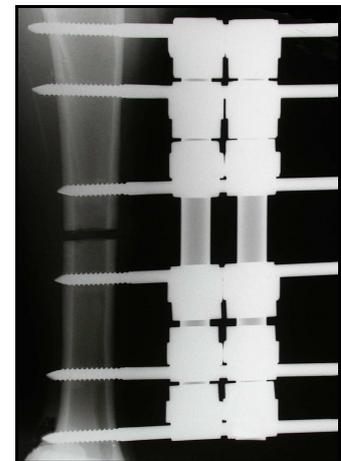


Abb. 5: Röntgenaufnahme eines Tieres mit rigider Fixateurversorgung post OP.

3.6 Blutgewinnung

Direkt vor dem Eingriff wurde den Schafen eine Blutprobe mit einem Volumen von 5 ml entnommen. Als Punktionsstelle diente die Vena cephalica antebrachii. Das Blut wurde physiologisch zur Gerinnung gebracht und durch Zugabe von 10 µl/mg Probe an RNAlater (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) stabilisiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

3.7 Hämatomgewinnung

Für die Hämatomgewinnung am vierten postoperativen Tag wurden die Schafe erneut narkotisiert und für eine Operation vorbereitet.

Die Probenentnahme begann mit der Eröffnung der Hautnähte. Das sich im Osteotomiespalt befindliche Hämatom (Abb. 6) wurde mit Hilfe einer Pinzette und einer Präparierschere entnommen und in 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Im Anschluss kam das

Blutgerinnsel in ein 50 ml-Sammelröhrchen, das mit 10 µl/mg Probe RNAlater gefüllt war. Die Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

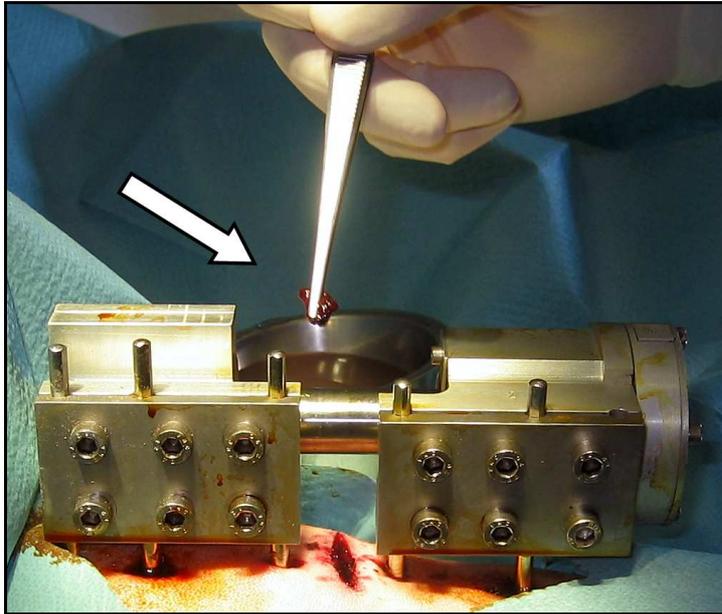


Abb. 6: Teil eines entnommenen vier Tage alten Hämatomes (Pfeil) bei einem Tier mit kritischer Fixateurversorgung.

Die Wundränder im Osteotomiegebiet wurden mit der Präparierschere angefrischt und erneut vernäht. Der Hinterlauf erhielt zum Abschluss der Operation einen sterilen Verband.

3.8 Tötung

Zur Tötung wurde den Schafen ein venöser Zugang in die Vena cephalica antebrachii gelegt. Über diesen Zugang erhielten die Tiere 2,5 g Trapanal[®] auf 50 ml. Zusätzlich wurde 100 ml 1M-Kaliumchlorid-Lösung (Fresenius Kabi Deutschland GmbH) verabreicht. Nach der Feststellung des Herzstillstandes durch Auskultation wurde die rechte Tibia mit dem montierten Fixateur externe abgesetzt und für drei Tage in einer Fixierungslösung aufbewahrt. Ein Liter dieser Lösung beinhaltete 324 ml 36%iges Formaldehyd (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 540 ml 100%igen Alkohol (Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland), 130 ml Barbitol-Natrium-Puffer (0,1 molar, pH 7,4; Apotheke Charité, Berlin, Deutschland) und 6 g Glucose (Merck KGaA).

3.9 Sägen

Nach der dreitägigen Fixierung wurden mit Hilfe einer Diamant-Bandsäge, die eine Bandstärke von 1 mm aufwies, (Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) Knochenscheiben aus der Tibia herausgeschnitten.

Zuerst wurde der Knochen durch einen transversalen Schnitt distal des Pinkanals 3 zerteilt. Der dabei entstandene distale Teil des Knochens wurde so in der Zwinde fixiert, dass der nächste

Schnitt mittig durch den Markraum bis zum nächsten Pinkanal (Pinkanal 4) verlief. Auf diese Weise erfolgte ein frontaler Schnitt in der Tibialängsachse. Anschließend wurden vier 3 mm breite Scheiben in anteriorer bzw. posteriorer Richtung gesägt (Abb. 7), die durch einen weiteren transversalen Schnitt durch den Pinkanal 4 abgesetzt wurden.

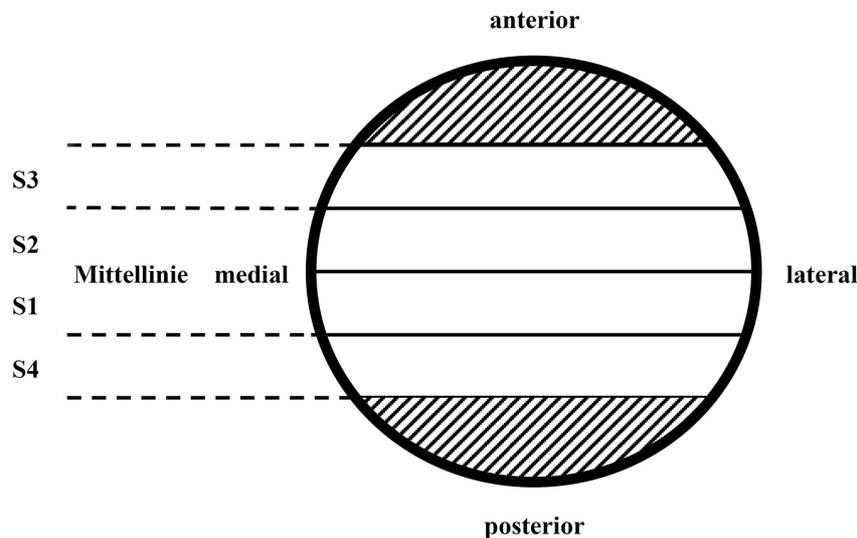


Abb. 7: Sägeschema der Tibia für die Scheiben S1 bis S4 in der Querachse von proximal nach distal blickend. Die schraffierten Randstücke wurden verworfen.

Die gewonnenen Knochenscheiben (Abb. 8) erhielten jeweils zur Orientierung medial proximal eine Markierung. Die Präparate wurden drei Tage auf einem Laborschüttler (HS 501 digital, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) nachfixiert.

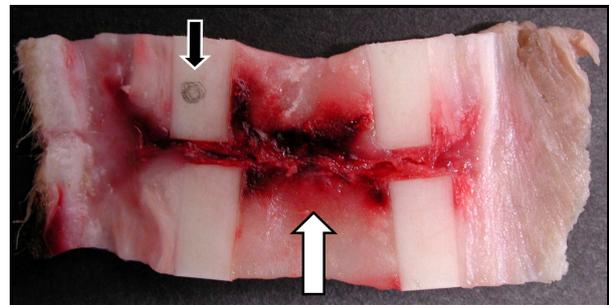


Abb. 8: Sägepräparat S1 eines Tieres mit kritischer Fixateurversorgung. Das sich neu gebildete Hämatom (weißer Pfeil) und die Markierung (schwarzer Pfeil) sind deutlich zu erkennen.

3.10 Molekularbiologie

Alle molekularbiologischen Arbeiten erfolgten unter Verwendung von Einweghandschuhen sowie sterilen Sammelröhrchen und Pipettenspitzen.

3.10.1 RNA-Isolierung

Die Ribonukleinsäure (RNA) wurde aus den Gewebeproben (Hämatom und peripheres Blut) unter Zuhilfenahme eines RNeasy® Maxi Kit (Qiagen GmbH) isoliert. Das Kit selbst setzte sich aus zwölf 50 ml-Sammelröhrchen, zwölf Filtersäulen mit einer Silica-Gel-Membran in 50 ml-Sammelröhrchen, 220 ml RLT-Puffer, 220 ml RW1-Puffer, 55 ml RPE-Puffer und 50 ml RNase

freiem Wasser zusammen. Vor der Verwendung des Kits wurde dem RLT-Puffer 2-Mercaptoethanol (β -ME; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) in einem Verhältnis von 100:1 hinzugefügt und der RPE-Puffer mit 220 ml 96%igen Ethanol aufgefüllt.

Für die Isolierung (Abb. 9) wurde 1 g Gewebe in 15 ml RLT-Puffer + β -ME bei 19.000 1/min für 60 Sekunden mit Hilfe des Ultra Turrax[®] T²⁵ Basic (IKA[®] Werke GmbH & Co. KG) homogenisiert. Der RLT-Puffer hat die Eigenschaft, Zellmembranen zu zerstören und β -ME verhindert die Bildung von Disulfidbrücken zwischen freigesetzten Proteinen. Eine anschließende zehnmünütige Zentrifugation (Jouan GR 412 Zentrifuge, Jouan GmbH, Hessen, Deutschland) bei 4500 x g und 0°C lieferte einen klaren Überstand, der in ein 50 ml-Sammelröhrchen überführt wurde. Dieser Überstand wurde mit 15 ml 70%igem Ethanol versetzt, gemischt, auf eine Filtersäule aufgetragen und fünf Minuten zentrifugiert. Die Silica-Gel-Membran der Filtersäule beinhaltet nach diesem Arbeitsschritt Desoxyribonukleinsäure (DNA), Nukleasen, Proteine, RNA und Salze aus der Gewebeprobe. Die Zugabe des RW1-Puffers (15 ml) und fünfminütiger Zentrifugation, sowie des RPE-Puffers (10 ml) und zweiminütiger Zentrifugation führte zur Säuberung der Membran. Sie enthielt am Ende der Prozedur ausschließlich RNA. Zur Trocknung der Membran wurden 10 ml RPE-Puffer

hinzugegeben und zehn Minuten zentrifugiert. Die Filtersäule wurde im Anschluss in ein neues 50 ml-Sammelröhrchen gegeben und die Membran mit 800 μ l RNase freiem Wasser benetzt. Eine einminütige Inkubation bei Raumtemperatur (RT) mit anschließender dreiminütiger Zentrifugation folgte. Auf diese Weise wurde die RNA aus der Membran gelöst. Um eine möglichst hohe RNA-Konzentration zu erhalten, wurde der Vorgang mit demselben Volumen zweimal wiederholt. Die Aufbewahrung der RNA erfolgte bei -80°C.

3.10.2 Photometrische Messung

Im Anschluss an die RNA-Isolierung erfolgte eine photometrische Konzentrationsmessung, um die gewonnene Menge an RNA zu bestimmen. Das Absorptionsmaximum lag bei einer

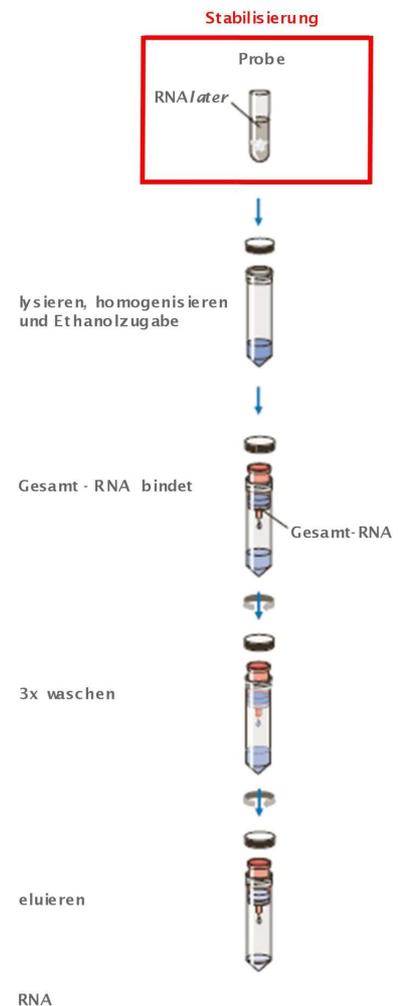


Abb. 9: Schematische Abfolge der RNA-Isolierung (modifiziert nach: RNeasy[®] Midi/Maxi Handbook).

Wellenlänge von 260 nm. Das Photometer (GeneQuant II RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg, Deutschland) wurde anfangs mit Hilfe von 100 µl RNase freiem Wasser auf einen Nullwert kalibriert. Es folgte die Messung der RNA-Konzentration in 100 µl Probe. Zusätzlich wurde noch auf das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm (Ratio) geachtet. Dies erlaubte eine Aussage über mögliche Verunreinigungen der RNA-Probe mit Proteinen. Der Reinheitsgrad sollte bei allen Proben zwischen 1,5 und 1,8 liegen.

3.10.3 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion

Auf die photometrische Messung der Konzentration folgte die Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR), eine Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus der gewonnenen RNA.

Bei durchschnittlich 2% der gesamten RNA handelt es sich um Messenger-RNA (mRNA). Diese besitzt eine Poly-A-Sequenz, das heißt, sie weist mehr als 50 Adenylreste am 3'-OH-Ende auf. Mit Hilfe von Random-Primern, bestehend aus Thymidin-Basen, bildet sich ein Primer-Annealing an dieser Poly-A-Sequenz aus. Hierfür wurden etwa 80 ng bzw. maximal 8 µl RNA mit 1 µl eines 10 mM dNTP-Mixes (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 1 µl Random-Primer (Invitrogen GmbH) und Wasser (Aqua ad iniectabilia Braun, B. Braun Melsungen AG) versetzt, um ein Gesamtvolumen von 10 µl zu erhalten. Dieser Ansatz wurde fünf Sekunden zentrifugiert (Spectrafuge™ Mini Centrifuge, Labnet International, Inc, Woodbridge, USA) und in einem Thermocycler (Mastercycler®, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) fünf Minuten bei 65°C inkubiert. Es folgte eine Kühlung auf Eis. Dem Ansatz wurden 4 µl M-MLV 5x Reaktionspuffer (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland), 1 µl RNase-Inhibitor (40U/µl; Promega GmbH) und 4,5 µl Wasser (Aqua ad iniectabilia Braun) hinzugefügt, erneut zentrifugiert und zwei Minuten bei 42°C inkubiert. Im Anschluss wurde 1 µl M-MLV RT (H-) (200 U/µl; Promega GmbH), eine Reverse Transkriptase, hinzupipettiert, der Ansatz zentrifugiert und 50 Minuten bei 42°C inkubiert. Das Enzym Reverse Transkriptase erkennt Annealing-Primer, bindet an diese und schreibt die RNA-Einzelstränge in cDNA-Doppelstränge um. Nach 50 Minuten wurde der Ansatz 15 Minuten bei 70°C inkubiert, was zu einer Denaturierung der Proteine führte. Abschließend wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt, 1 µl RNase-H (250 U/µl, Promega GmbH) hinzugegeben und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Dies gewährleistete den Verdau der restlichen RNA, die sich noch in der Probe befand. Mit Hilfe der RT-PCR wurden 21,5 µl reine cDNA gewonnen, die bei -20°C gelagert wurden.

3.10.4 Semiquantitative PCR

Die gewonnene cDNA diente als Ausgangsmaterial (Template) für eine qualitative Beurteilung der mRNA-Synthese des Referenzgenes GAPDH.

Für diese Beurteilung wurden die Gensequenzen mittels Endpunkt-PCR exponentiell vervielfacht (amplifiziert). Die PCR setzt sich aus mehreren Zyklen zusammen. Ein solcher Zyklus beinhaltet stets einen Denaturierungsschritt, einen Annealingschritt und einen Elongationsschritt. Die Denaturierung gewährleistet, dass sich die doppelsträngige Template-DNA in zwei Einzelstränge trennt, indem die Wasserstoffbrückenbindungen der Basenpaare gelöst werden. Im Annealingschritt lagern sich im Überschuss vorhandene Oligonucleotidprimer an den komplementären DNA-Abschnitten des entsprechenden Genes an. Während der Elongation bindet das Enzym Taq-Polymerase an die Primer und vervollständigt den DNA-Einzelstrang zu einem Doppelstrang, welcher der ursprünglichen Template-DNA exakt gleicht. Somit kommt es pro Zyklus theoretisch zu einer Verdoppelung des Ausgangsmaterials.

Zusätzlich wurde mit Hilfe der semiquantitativen PCR eine Primerselektionierung durchgeführt. Für jeden zu untersuchenden Parameter existierten vier Primer. Die Primerkombination (Tabelle 1) mit der höchsten Effizienz (intensivste Bande) wurde für die folgenden Analysen verwendet. Die eigentliche PCR begann mit der Herstellung eines Reaktionsansatzes. Pro Template wurden 12 µl Wasser (Aqua ad iniectabilia Braun), 2 µl 10 x HotMaster Taq Puffer inkl. 25 mM MgCl (Eppendorf AG), 2 µl dNTP-Mix (2 mM; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland), 0,5 µl Primer forward (for) (Tib Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland), 0,5 µl Primer reverse (rev) (Tib Molbiol Syntheselabor GmbH) und 1 µl HotMaster Taq Polymerase (0,5 U; Eppendorf AG) benötigt. Als Ausgangsmaterial diente die umgeschriebene cDNA in einer Verdünnung von 1:10. Der Reaktionsansatz wurde mit 2µl Template versetzt und in einen Thermocycler (Mastercycler[®], Eppendorf AG) gegeben. Für jeden verwendeten Primer wurde zur Kontrolle eine Negativprobe, ohne Zugabe von Template, mitgeführt.

Das PCR-Programm setzte sich aus einer initialen Denaturierung von drei Minuten bei 94°C und 37 Zyklen zusammen. Ein solcher Zyklus bestand aus einer Denaturierung von 30 Sekunden bei 94°C, einem Annealing von 40 Sekunden bei 61°C und einer Elongation von 30 Sekunden bei 72°C. Final erfolgte eine Elongation von zehn Minuten bei 72°C. Anschließend kühlte das Programm auf 4°C hinunter.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Primer mit zusätzlichen Informationen über Genlokalisierung, Gengröße und Primersequenz.

RNA	for/rev	Genlokus	Größe in bp	Sequenz 5' → 3'
BMP-2	for	AF508028	203	CTTTGCACCAAGATGAGC
BMP-2	rev			CGCAACGATCCAGTCATT
BMP-4	for	AF508312	121	TTCCACCACGAAGAACATCT
BMP-4	rev			GTCGAAGCTCGGCAGAC
BMP-7	for	AF508311	101	CCAACGTCGCAGAAAACA
BMP-7	rev			GATGATCCAGTCCTGCCA
Coll II	for		81	GCCAACGTCCAGATGACC
Coll II	rev			AATGCTGTTCTTGCAGTGGTAGG
CYR61	for		195	TCTTTACACCCCTTCTTCACATGG
CYR61	rev			CCCTTTTTCAGGCTGCTGTAC
GAPDH	for	AF030943	95	CAAGGTCATCCATGACCACTTT
GAPDH	rev			CGGGGGCCATCCACA
HIF-1 α	for	AF233078	160	TGGATTGAAGATGAAATGAAGGCA
HIF-1 α	rev			CTGTGTCCAGTTAGTTCAAACTGAGT
IGF-1	for	M31736	159	CCCAAGGCTCAGAAGGAAGTA
IGF-1	rev			TCTTCTGGTGTGTAACAGGTAA
IL-1	for	X56972	96	TTGGGTATCAGGGACAAGAATCT
IL-1	rev			GGGGTAGACTTTGGGGTCTACTT
IL-6	for	X68723	127	ATCTGGGTTCAATCAGGCCA
IL-6	rev			GCTCTGCAACTCCATGACAGTT
MMP-13	for	AF267157	144	GAGCACCCCTCCCATGACC
MMP-13	rev			AAGGGCTGCACTGATCTTTTTTAA
OPN	for	AF152416	103	GCTCTGAGGAAAAGCAGCTTAA
OPN	rev			GAATTCTGGGGTTCTAGGAAAGT
PDGF-BB	for	X97123	122	TGCATGGAGACTCCTTAGATGA
PDGF-BB	rev			GACCGTTGGGGAACCTAG
TGF- β_1	for	X76916	91	CAAGGGCTACCACGCCAAT
TGF- β_1	rev			GTTGTACAGGGCCAGGACCT
TNF- α	for	AY289202	100	GGCAGGTCTACTTTGGGATCA
TNF- α	rev			GATGAGGAGGGTCTGAAGGAGTAAAT
VEGF-A ₁₆₄	for	AF071015	91	GTTCAACATCACCATGCAGATT
VEGF-A ₁₆₄	rev			TTCACATTTGTTATGCTGTAGGAA

3.10.5 Gelelektrophorese

Das Ergebnis der Amplifizierung wurde im Anschluss an die semiquantitative PCR elektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei stellen sich die DNA-Fragmente ihrer Größe (Anzahl der Basenpaare) entsprechend als Bande dar.

Für die Gelelektrophorese diente ein 2%iges Agarose-Gel auf Tris-Acetat-EDTA-Puffer-Basis (1 x TAE). Der zuvor geschmolzenen Agarose (Ultra Pure™ Agarose, Life Technologies, Paisley, Schottland) wurde Ethidiumbromid (EtBr; Merck KGaA) in einem Verhältnis von 0,05 μ l/ml hinzugefügt, um die DNA im Gel später sichtbar zu machen. Zur Erhöhung der Dichte der DNA-Lösung wurde das PCR-Produkt mit einem glycinhaltigen Probenpuffer mit Farbstoffzusatz (Blue/Orange 6 x Loading Dye; Promega GmbH) in einem Verhältnis von 5:1

versetzt. 11 µl der Probe wurden in eine Geltasche pipettiert. Zusätzlich wurde jeweils die erste Tasche eines Agarose-Geles mit einem Größenmarker (50-1000 bp), bestehend aus 6 µl PCR Marker (Promega GmbH) und 2 µl Blue/Orange 6 x Loading Dye befüllt.

An eine Elektrophoresekammer, die mit dem Gel und 1 x TAE bestückt war, wurden 80 Volt angelegt. Nach etwa 45 Minuten waren die DNA-Fragmente aufgetrennt. Das Gel konnte unter UV-Licht (Eagle Eye™ II, Stratagene® Europe, Amsterdam, Niederlande) visualisiert und digital fotografiert werden.

3.10.6 Real-time PCR

Die gewonnene cDNA diente ebenfalls als Ausgangsmaterial für die Real-time PCR. Es wurden ausgewählte Zytokine (IL-1, IL-6, TGF-β₁ und TNF-α), Wachstumsfaktoren (BMP-2, BMP-4, BMP-7, IGF-1, PDGF-BB und VEGF-A₁₆₄ (schafspezifische Variante des humanen VEGF-A₁₆₅)), extrazelluläre Matrixproteine (Coll II, CYR61 und OPN), Transkriptionsfaktoren (HIF-1α) und eine matrixdegradierende Protease (MMP-13) in den Gewebeproben untersucht. Als Referenzgen diente GAPDH. Im Vergleich zur Endpunkt-PCR sind bei dieser Methode Aussagen über die Ausgangs-DNA-Verhältnisse bzw. -RNA-Verhältnisse in den Proben zum Entnahmezeitpunkt möglich.

Für einen Reaktionsansatz wurden 12,5 µl eines iQ™ Supermixes (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland), bestehend aus 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl (pH 8,4), 1,6 mM dNTPs, iTaq DNA Polymerase (50 U/ml), 6 mM MgCl₂ und Stabilisatoren, mit jeweils 0,5 µl Primer for und Primer rev (Tib Molbiol Syntheselabor GmbH), 1 µl Absolute™ Max QRT-PCR Sybr® Green Fluorescein Mix (100 x 50 µl; Abgene Inc., Hamburg, Deutschland) und 9,5 µl Wasser (Aqua ad iniectabilia Braun) vermischt. Der Ansatz wurde mit je 2 µl des entsprechenden Templates in einer Verdünnung von 1:10 in eine 96-Loch-Platte (Abgene Inc.) pipettiert und mit Ultra Clear Cap Strips (Abgene Inc.) verschlossen. Die Platte wurde nach Zentrifugation (Universal 32 R, Hettich Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) für 30 Sekunden bei 60 x g und 20°C in ein iCycler-System (Bio-Rad Laboratories GmbH) gegeben. Hier erfolgte die Amplifizierung mit einer initiale Denaturierung von viereinhalb Minuten bei 95°C und 32 Zyklen. Ein Zyklus beinhaltete eine Denaturierung von 30 Sekunden bei 95°C, ein Annealing von 30 Sekunden bei 62°C und eine Elongation von 30 Sekunden bei 72°C.

Um eine Kontamination mit Fremd-DNA auszuschließen, wurde für jeden Primer zusätzlich eine Negativkontrolle, ohne Zugabe von Template, durchgeführt. Zusätzlich erfolgte für jeden Primer eine Dreifachbestimmung, damit die Reproduzierbarkeit gesichert war.

Sybr-Green, ein Fluoreszenzfarbstoff, lagerte sich unspezifisch in die Doppelstrang-DNA ein. Dadurch kam es bei fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Fluoreszenzanstieg. Dieser Anstieg konnte gemessen und somit die Expression der Kandidatenfaktoren bestimmt werden. Die Quantifizierung der PCR basierte auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten Threshold Cycle (Ct-Wert). Der Ct-Wert entspricht jenem PCR-Zyklus, bei dem der Fluoreszenzanstieg exponentiell erfolgt.

Für die Auswertung wurde die Methode der relativen Quantifizierung von Genexpressionen genutzt. Für jede untersuchte Probe erfolgte eine Normalisierung durch Subtraktion des Ct-Wertes des Referenzgenes von dem Ct-Wert des jeweiligen Zielgenes, mit dem ΔCt -Wert als Ergebnis. Zusätzlich wurde für das jeweilige Zielgen ein Kalibrator- ΔCt -Wert ermittelt. Dieser entsprach dem Medianwert für das Gen in den Hämatomen unter rigider Versorgung. Zusätzlich wurde dieser Kalibrator-Wert als 1 definiert. Die Differenz aus dem ΔCt -Wert der Probe und dem ΔCt -Wert des Kalibrators bildete negativiert den Exponenten zur Basis zwei nach folgender arithmetischer Formel: $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$ [79]. Mit Hilfe dieser Berechnung konnten die Unterschiede in der Genexpression zwischen den Proben dargestellt werden.

3.11 Histologie

3.11.1 Entwässerung und Einbettung

Die Knochenpräparate mit der Scheibenbezeichnung S1 und S3 dienten den histologischen Auswertungen. Hierfür mussten die Präparate entwässert werden. Zuerst wurden die Proben 30 Minuten unter fließendem Wasser formalinfrei gewaschen und anschließend nach einem festen Schema (Tabelle 2) in aufsteigenden Ethanolkonzentrationen eingelegt. Für die optimale Infiltration des Alkohols erfolgte die Entwässerung der Proben auf dem Laborschüttler. Im Anschluss wurden die Knochenpräparate zur Entfettung vier Stunden in Xylol (Mallinckrodt Baker Inc., Griesheim, Deutschland) gelegt.

Tabelle 2: Protokoll für die histologische Entwässerung.

Substanz	Zeit in Tagen
Ethanol 70%ig	7
Ethanol 80%ig	7
Ethanol 80%ig	7
Ethanol 96%ig	7
Ethanol 96%ig	7
Ethanol 100%ig	7
Ethanol 100%ig	7
Ethanol 100%ig	7

Für die folgenden Arbeitsschritte der Präparateinbettung wurde Technovit[®] 9100 NEU (Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim/Ts., Deutschland) verwendet. Es handelt sich um ein Set, bestehend aus fünf Einzelkomponenten. Die Basislösung musste vor dem Gebrauch

entstabilisiert werden. Hierfür durchlief sie eine mit 50 g Aluminiumoxid (Merck KGaA) befüllte Chromatographiesäule.

Nachdem die Knochenpräparate aus dem Xylol genommen wurden, erfolgte eine Überführung in Präinfiltrationslösung. Diese bestand aus 200 ml entstabilisierter Basislösung und 1 g Härter 1. Die Präparate wurden eine Woche auf dem Schüttler aufbewahrt, bevor sie sieben Tage in Infiltrationslösung kamen. Hierfür wurden 20 g Pulver und 1g Härter 1 mit der entstabilisierten Basislösung auf 250 ml aufgefüllt. Die Aufbewahrung der Präparate umfasste ebenfalls sieben Tage und erfolgte im Kühlschrank.

Für das Einbetten mussten zwei Stammlösungen (Stammlösung A und Stammlösung B) hergestellt werden. Stammlösung A bestand aus 80 g Pulver und 3 g Härter 1, die auf 500 ml mit der entstabilisierten Basislösung aufgefüllt wurde. Stammlösung B setzte sich aus 4 ml Härter 2, 2 ml Regler und 44 ml entstabilisierter Lösung zusammen. Das eigentliche Polymerisationsgemisch beinhaltete neun Volumenanteile der Stammlösung A und einen Volumenanteil der Stammlösung B.

Eine Einbettform wurde mit dem Polymerisationsgemisch befüllt und das Knochenpräparat mit der Markierung nach unten hineingelegt. Die Form wurde luftdicht verschlossen und zur Polymerisation für etwa 48 Stunden auf Eis gestellt.

3.11.2 Vorbereitung der Schnittpräparate

Um die Kunststoffblöcke optimal im Hartschnittmikrotom positionieren zu können, wurden die auspolymerisierten Präparate mit Technovit[®] 3040 (Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG) aufgebockt. Die entstandenen Plastikblöcke wurden nach der Polymerisation auf der Handschleifmaschine Phoenix 3000 (Jean Wirtz GmbH & Co. KG, Düsseldorf, Deutschland) so angeschliffen, dass die gegenüberliegenden Seiten parallel zueinander standen.

3.11.3 Herstellung der Schnittpräparate

Mit Hilfe einer Wasserwaage wurde der Kunststoffblock so in das Mikrotom (Leica[®] SM 2500S, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) eingespannt, dass die Schnittebene waagrecht zum Messer (16 cm, 40°) lag. Eine Schneideflüssigkeit, bestehend aus entmineralisiertem Wasser und Seifenlauge, diente während des Schneidevorganges dem Benetzen des Blockes und des Messers. Es wurden 6 µm dicke Schnitte aus drei Ebenen gewonnen und auf Objektträger (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshafen, Deutschland) gezogen. Die entstandenen Schnitte wurden mit einer Streckflüssigkeit, bestehend aus 30 ml 2-Butoxyethyl-Acetat (Merck KGaA) und 70 ml 70%igem Ethanol, beschichtet. Mit

Hilfe einer Kisolfolie (Kettenbach GmbH & Co. KG, Eschenburg, Deutschland) wurden die Präparate gestreckt und mit Filterpapier (Whatman, Dassel, Deutschland) bedeckt. Die Schnitte wurden abschließend unter Schraubzwingendruck 48 Stunden in einem Wärmeschrank bei 60°C zum Trocknen aufbewahrt. Im Anschluss an die Trocknung erfolgte die eigentliche Färbung.

3.11.4 Histologische Färbungen

Ausgewählte Schnittpräparate wurden zunächst dreimal 30 Minuten in 2-Methoxyethylacetat (MEA; Merck KGaA) entplastet und in einer absteigenden Alkoholreihe (Tabelle 3) rehydriert.

Tabelle 3: Protokoll für die Rehydrierung.

Substanz	Zeit in Minuten
Xylol	10
Xylol	10
Ethanol 100%ig	2
Ethanol 100%ig	2
Ethanol 96%ig	2
Ethanol 80%ig	2
Ethanol 70%ig	2
Aqua dest.	0,5

3.11.4.1 Masson-Goldner-Trichomfärbung (MGT)

Bei der MGT-Färbung handelt es sich um eine Übersichtsfärbung. Die entplasteten und rehydrierten Präparate wurden für die Kernfärbung zwei Minuten in Weigerts Eisenhämatoxylin, bestehend aus Weigerts Eisenhämatoxylin A und B (Waldeck GmbH & Co Division Chroma, Münster, Deutschland) im Mischungsverhältnis 1:1, gegeben und unter fließendem Wasser zehn Minuten gespült. Sie wurden anschließend fünf Minuten in Säurefuchsin-Ponceau (Waldeck GmbH & Co Division Chroma) gefärbt. Es folgte eine Spülung in 1%iger Essigsäure (Herbeta-Arzneimittel) und eine 15-minütige Differenzierung in Phosphormolybdänsäure-Orange G, bestehend aus 50 g Phosphormolybdänsäure (Merck KGaA), 20 g Orange G (Merck KGaA) und 1000 ml entmineralisiertem Wasser. Die Schnitte wurden in Essigsäure gespült und zehn Minuten in Lichtgrün, bestehend aus 2 g Lichtgrün (Waldeck GmbH & Co Division Chroma), 2 ml Eisessig (Herbeta-Arzneimittel) und 1000 ml entmineralisiertem Wasser, gegengefärbt. Nach erneuter Spülung in Essigsäure schloss sich eine dreimalige Entwässerung in absolutem Alkohol an. Die Präparate wurden zweimal fünf Minuten in Xylol entfettet, um mit Vitroclud® (Langenbrink, Emmerdingen, Deutschland) eingedeckelt werden zu können. Die MGT-Färbung stellt Zellkerne braun-schwarz, Zytoplasma ziegelrot, Erythrozyten orangegelb, Bindegewebe grün, Osteoid rot, mineralisiertes Knochengewebe leuchtend grün und verkalktes Knochengewebe hellgrün dar.

3.11.4.2 Safranin Orange/von Kossa-Färbung

Diese Färbung diente der Darstellung von mineralisiertem Gewebe. Die entplasteten und rehydrierten Präparate wurden fünf Minuten in 3%iger wässriger Silbernitratlösung, bestehend

aus 30 g Silbernitrat (Merck KGaA) und 1000 ml entmineralisiertem Wasser, gegeben und in entmineralisiertem Wasser gespült. Es folgte eine zweiminütige Reduktion in Natrium-Formaldehydlösung, bestehend aus 50 g Natriumkarbonat (Merck KGaA), 250 ml Formaldehyd (Merck KGaA) und 750 ml entmineralisiertem Wasser. Die Schnitte wurden zehn Minuten unter fließendem Wasser gewaschen und fünf Minuten in 5%iges Natriumthiosulfat, bestehend aus 50 g Natriumthiosulfat (Merck KGaA) und 1000 ml entmineralisiertem Wasser, gegeben. Danach wurden sie erneut zehn Minuten gewässert, in entmineralisiertem Wasser gespült und acht Minuten in Safranin Orange, bestehend aus 10 g Safranin Orange (Merck KGaA) und 1000 ml entmineralisiertem Wasser, gefärbt. Die Präparate wurden in entmineralisiertem Wasser gespült, jeweils zwei Minuten zweimal in 96%igem Alkohol und zweimal in absolutem Alkohol entwässert, zweimal fünf Minuten in Xylol entfettet und mit Vitroclud[®] eingedeckelt. Die Safranin Orange/von Kossa-Färbung stellt mineralisierten Knorpel und Knochen schwarz und nicht-mineralisierten Knorpel und Bindegewebe rot dar.

3.11.4.3 Safranin Orange/Lichtgrün-Färbung

Diese Färbung diente der Darstellung von Knorpelgewebe. Die entplasteten und rehydrierten Präparate wurden acht Minuten in Safranin Orange gefärbt, in entmineralisiertem Wasser gespült und zehn Minuten in Pikrinsäure (Riedel-de Haën AG) gegeben. Es folgte eine erneute Spülung in entmineralisiertem Wasser und danach in 1%iger Essigsäure. Die Schnitte wurden acht Minuten in Lichtgrün gegeben, wieder in Essigsäure gespült, dreimal zwei Minuten in absolutem Alkohol entwässert und zweimal fünf Minuten in Xylol entfettet. Im Anschluss an die Färbung wurden die Schnitte mit Vitroclud[®] eingedeckelt. Die Safranin Orange/Lichtgrün-Färbung stellt nicht-mineralisierten Knorpel rot und Knochen, mineralisierten Knorpel und Bindegewebe grün dar.

3.11.5 Histologische Auswertung

Um eine Quantifizierung der durch Hämatomentnahme vier Tage nach der Osteotomie bedingten Veränderungen in der Kallusgewebeentwicklung zu erreichen, wurden strukturelle Parameter, wie Gesamtkallusfläche, Gesamtfläche mineralisierten Knochens und Gesamtbindegewebebefläche gemessen.

Für die Auswertung in der computergestützten Bildanalyse dienten die Safranin Orange/von Kossa gefärbten Schnitte. Zusätzlich wurden auch die Movat-Pentachrom gefärbten Präparate (siehe Immunhistochemie) zur Bestimmung der Bezugsflächen für die Vaskularisierung des Kallusgewebes der Bildanalyse zugeführt. Die Präparate wurden hierfür auf einen Leuchttisch

(Kaiser prolite basic, Kaiser Fototechnik GmbH & Co KG, Buchen, Deutschland) gelegt und mit einer Digitalkamera (Nikon Coolpix 990, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) so fotografiert, dass die Vergrößerung möglichst hoch und scharf war. Zur späteren Kalibrierung erschien auf jedem Foto ein Lineal als Maßstab.

Für die Erhebung der gewünschten Parameter diente ein benutzerdefiniertes Makro, ein den Messzwecken angepasstes Computerprogramm. Hierzu wurde der Safranin Orange/von Kossa bzw. Movat-Pentachrom gefärbte Schnitt eines Tieres vom Programm geladen, und der Anwender folgte danach Schritt für Schritt den Anweisungen des Makros. Zunächst wurde das System kalibriert und der Durchmesser des Gesamtkallus und des knöchernen Kallus bestimmt. Mit Hilfe des Durchmessers des Gesamtkallus, der sich in der Querachse des Osteotomiespaltes befand, wurde eine Region of Interest (ROI) definiert und im digitalen Bild festgehalten. Die ROI betrug in der Höhe 12 mm, je 6 mm proximal und distal von der Spaltmitte aus gesehen. Die Breite wurde individuell bei jedem Tier durch die Gesamtkallusbreite bestimmt. Alle weiteren Messungen des Makros erfolgten innerhalb dieser definierten ROI.

Zusätzlich wurden die Grenzen zwischen medialem und lateralem Bereich sowie zwischen periostalem und endostalem Bereich festgelegt. Daraus ergaben sich weitere Unterteilungen der ROI, um später auch einen differenzierteren Blick auf bestimmte Bereiche, wie z.B. periostal-medial zu werfen.

Anfangs wurde die Kortikalis durch den Auswertenden markiert. Die folgende Gewebedifferenzierung erfolgte halbautomatisch. Das Programm gab nacheinander die Flächenanteile des Knochen- und Bindegewebes an. Der Benutzer konnte diese Einschätzung mittels Farbwertreglern nach oben bzw. unten korrigieren. Auch der mineralisierte Kallus wurde differenziert betrachtet. Aus den Informationen errechnete das Programm die Flächenanteile der unterschiedlichen Gewebetypen bezogen auf die verschiedenen Lokalisationen innerhalb der ROI.

3.12 Immunhistochemie

3.12.1 Entkalkung und Einbettung

Die Knochenpräparate S2 und S4 dienten den immunhistochemischen Untersuchungen. Hierfür mussten die Präparate entkalkt werden. Zuerst wurden die Proben 30 Minuten unter fließendem Wasser formalinfrei gewaschen und danach zwei Monate in EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure; Herbeta-Arzneimittel) gegeben, das wöchentlich erneuert wurde. Für die optimale Entmineralisierung erfolgte die Aufbewahrung der Proben bei 37°C. Im Anschluss an die Entkalkung wurden die Präparate in einem Gewebeeinfiltrationsautomaten (Leica TP 1020,

Leica Microsystems Nussloch GmbH) entwässert. Das entsprechende Programm lief nach einem festen Schema (Tabelle 4) ab. Im Anschluss wurden die Präparate eingebettet. Hierfür wurde 60°C warmes Paraffin (Paraplast plus, Kendall, tyco Healthcare, Mansfield, USA) mit Hilfe eines Paraffinspenders (Leica EG 1120, Leica Microsystems Nussloch GmbH) in eine Schablone gegossen, die Proben mit der Markierung nach unten aufgelegt und erneut mit warmen Paraffin übergossen. Auf einer Kälteplatte (Leica EG 1130, Leica Microsystems Nussloch GmbH) kühlte der Paraffinblock aus.

3.12.2 Schneiden der Paraffinpräparate

Die Paraffinblöcke wurden mit einem manuellen Rotationsmikrotom (Leica[®] RM 2125, Leica Microsystems Nussloch GmbH) geschnitten, wobei sie während der gesamten Prozedur immer wieder auf Eis gekühlt wurden. Der jeweilige Block wurde in das Gerät eingespannt und das Paraffin entfernt, bis sich der gesamte Knochen in einer Schnittebene darstellte. Nun folgte die Gewinnung 4 µm dicker Präparate, die in ein Wasserbad (entmineralisiertes Wasser) gegeben wurden. Mit Hilfe eines Pinsels wurden Unebenheiten im Präparat herausgetupft und auf einen beschrifteten Objektträger (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG) gezogen. Zur Entfaltung des Präparates wurde der Objektträger in ein 46°C warmes Wasserbad getaucht. Dem Schneiden schloss sich eine dreitägige Lagerungsphase bei 37°C an, bevor mit der Färbung begonnen werden konnte.

3.12.3 Hämatoxylin Eosin- (HE-)Färbung

Die HE-Färbung diente als Übersichtsfärbung. Die Schnitte wurden nach dem Trocknungsvorgang entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (Tabelle 3) rehydriert. Die Kernfärbung erfolgte sieben Minuten in Hämatoxylin nach Harris (Papanicolaous Lösung 1a Harris, Hämatoxylinlösung; Merck KGaA). Danach wurden die Präparate dreimal in entmineralisiertem Wasser gespült, in HCl-Alkohol (Herbeta-Arzneimittel) getaucht und zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser belassen. Es schloss sich ein viermaliger Tauchvorgang in Eosin (Accustain[®] Eosin y solution aqueous; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), das mit drei Tropfen 99%iger Essigsäure (Merck KGaA) versetzt war, an. Daraufhin folgte die Entwässerung und Entfettung, bei der die Präparate zweimal in

Tabelle 4: Protokoll für die immunhistochemische Entwässerung.

Substanz	Zeit in Stunden
Ethanol 70%ig	24
Ethanol 80%ig	24
Ethanol 80%ig	12
Ethanol 96%ig	24
Ethanol 96%ig	12
Ethanol 100%ig	24
Ethanol 100%ig	12
Ethanol 100%ig	12
Xylol	5
Xylol	5
Paraffin 60°C	4
Paraffin 60°C	4

96%igem Alkohol, zweimal in 100%igem Alkohol und einmal in Xylol getaucht wurden. Die gefärbten Schnittpräparate wurden mit Vitroclud[®] eingedeckelt.

3.12.4 Movat-Pentachrom-Färbung

Diese Färbung ermöglicht die Unterscheidung der verschiedenen Hart- und Weichgewebekomponenten im Frakturgebiet. Die entparaffinierten und in einer absteigenden Alkoholreihe (Tabelle 3) rehydrierten Präparate wurden für zehn Minuten in Alcianblau, bestehend aus 10 g Alcianblau (Waldeck GmbH & Co Division Chroma), 10 ml Eisessig und 1000 ml entmineralisiertem Wasser, gegeben und anschließend fünf Minuten mit Wasser gespült. Es folgte eine 60-minütige Stabilisierung in alkalischem Alkohol, bestehend aus 100 ml Ammoniumhydroxid (Merck KGaA) und 900 ml 96%igem Alkohol. Die Schnitte wurden zehn Minuten unter fließendem Wasser gewaschen, in entmineralisiertes Wasser getaucht und zehn Minuten in Weigerts Eisenhämatoxylin, bestehend aus Weigerts Eisenhämatoxylin A und B im Mischungsverhältnis 1:1, gegeben. Danach wurden die Schnitte erneut mit entmineralisiertem Wasser gespült, 15 Minuten gewässert und 15 Minuten in Brillant Crocein-Säurefuchsin gefärbt. Hierzu wurde eine Lösung A, bestehend aus 1 g Brillant Crocein R (Waldeck GmbH & Co Division Chroma), 5 ml Eisessig und 995 ml entmineralisiertem Wasser, mit einer Lösung B in einem Verhältnis von 8:2 vermischt. Die Lösung B setzte sich aus 1 g Säurefuchsin, 5 ml Eisessig und 995 ml entmineralisiertem Wasser zusammen. Einer kurzen Spülung in 0,5%iger Essigsäure folgte die 20-minütige Differenzierung in 5%iger Phosphorwolframsäure (Waldeck GmbH & Co Division Chroma). Danach wurden die Präparate zwei Minuten in 0,5%iger Essigsäure und dreimal fünf Minuten in 100%igem Alkohol gespült. Abschließend erfolgte eine 60-minütige Färbung der Schnitte mit Saffron du Gutinaus. Hierzu wurden zuvor 60 g Saffron du Gutinaus (Waldeck GmbH & Co Division Chroma) in 1000 ml 100%igem Alkohol gelöst und in einer luftdicht verschlossenen Flasche 48 Stunden bei 50°C im Brutschrank aufbewahrt. Vor dem Eindeckeln mit Vitroclud[®] wurden die Präparate dreimal drei Minuten in 100%igem Alkohol gespült, entwässert und zweimal fünf Minuten in Xylol entfettet. Die Movat-Pentachrom-Färbung stellt mineralisierten Knochen und Kollagen gelb, mineralisierten Knorpel blau-grün, Knorpel je nach Fixierung rötlich bis gelb, Osteoid dunkelrot, elastische Fasern rot, Zellkerne blauschwarz und Zytoplasma rötlich dar.

3.12.5 Immunhistochemische Färbungen

Die Schnittpräparate des Osteotomiegebietes zum 2-Wochenzeitpunkt und des Hämatoms wurden immunhistochemisch auf α -SMA- (alpha smooth muscle actin), CTR-

(Calzitoninrezeptor) und Coll II-positive Zellen hin untersucht. Die Färbungen erfolgten nach einer modifizierten ABC-Methode, bei der alkalische Phosphatase als gekoppeltes Enzym verwendet wurde. Die getrockneten Schnitte wurden hierzu entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (Tabelle 3). Es folgte eine zweimalige Spülung der Präparate von jeweils fünf Minuten in Phosphatpuffer-Lösung (pH 7,2; Waldeck GmbH & CoKG) in einem Mischungsverhältnis von 200 ml Puffer zu 1800 ml entmineralisiertem Wasser. Die Schnitte wurden mit Hilfe eines Fettstiftes (Pap Pen, The Bining Site, Birmingham, England) umrandet, damit die aufzutragenden Flüssigkeiten nicht verlaufen. Ausschließlich für die immunhistochemische Färbung des Coll II war zusätzlich eine Demaskierung des Antigens erforderlich. Dazu wurden 500 µl Hyaluronidase, bestehend aus 8 mg Hyaluronidase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und 500 ml der Phosphatpuffer-Lösung bei einem pH von 6,7, auf den Schnitt pipettiert und vier Stunden bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Im Folgenden wurden 500 µl 0,1%iges Pepsin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), bestehend aus 300 mg Pepsin, das mit 0,01 molarer Salzsäure (Merck KGaA) auf 300 ml aufgefüllt wurde, auf die Schnitte gegeben und in einer feuchten Kammer bei 37°C für 30 Minuten belassen. Es folgte eine zweimalige Pufferspülung für jeweils fünf Minuten. Im Anschluss an die Spülung begann die eigentliche Färbung (Abb. 10). Als erstes wurden 500 µl Normalserum in einem Mischungsverhältnis von 10 ml der Phosphatpuffer-Lösung zu 100 µl eines Horse Normal Serum (Vectastain[®], Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) auf die Schnitte pipettiert und 20 Minuten bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Die Antikörper des Normalserums banden in dieser Zeit an nicht-spezifische Proteine und blockierten diese. Die Präparate wurden durch Abkippen von dem Serum befreit und mit 500 µl des entsprechenden Primärantikörpers benetzt. Die Primärantikörper wurden mit einem Antikörperverdünner (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland) im folgenden Verhältnis verdünnt: α-SMA: 1:100 (mouse anti-human monoklonal; DakoCytomation GmbH), CTR: 1:100 (rabbit anti-rat polyklonal; Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Deutschland), Coll II: 1:50 (mouse anti-chicken monoklonal; Quartett Immunodiagnostika und Biotechnologie GmbH, Berlin, Deutschland). Die Inkubation bei 37°C in der feuchten Kammer dauerte eine Stunde. In diesem Zeitraum band der Primärantikörper an die darzustellenden Antigene bzw. Proteine. Danach erfolgte eine zweimalige Spülung der Präparate mit der Phosphatpuffer-Lösung für jeweils fünf Minuten. 500 µl eines biotinylierten Zweitantikörpers, bestehend aus 10 ml der Phosphatpuffer-Lösung, 200 µl des Horse Normal Serum (Vectastain[®], Vector Laboratories Inc.) und 200 µl eines biotinylierten Universal-Antikörpers (Vectastain[®], Vector Laboratories Inc.), wurden auf die Schnitte pipettiert und 30 Minuten bei RT in der feuchten Kammer belassen. Der Zweitantikörper band an den

Primärantikörper. Es folgte eine zweimalige Puffer-Spülung für jeweils fünf Minuten. Anschließend wurden die Präparate mit 500 µl eines AB-Komplexes (Alkaline Phosphatase Standard AK-5000, Vector Laboratories Inc.) beschichtet und in der feuchten Kammer 50 Minuten bei RT inkubiert. Dieser Komplex bestand aus 10 ml der Phosphatpuffer-Lösung, 100 µl des Reagenzes A und 100 µl des Reagenzes B, und hatte das Ziel, an den biotinylierten Zweitantikörper zu binden. Es wurde erneut die zweimalige Pufferspülung durchgeführt. Danach wurden die Präparate zweimal fünf Minuten mit einem Chromogenpuffer (pH 8,2), bestehend aus 3,96 g Trizma[®] Hydrochloride (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 0,54 g Trizma[®] Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und 2,63 g Natriumchlorid (Merck KGaA), die mit entmineralisiertem Wasser auf 300 ml aufgefüllt wurden, inkubiert. Unter Sichtkontrolle wurden die Schnitte mit einem AP-Substrat (Alkaline Phosphatase Substrate Kit, Vector Laboratories Inc.) zur Visualisierung der Antikörper-Komplexe inkubiert. Das Substrat wurde mit der Phosphatpuffer-Lösung abgespült und die Schnitte mit Hilfe einer Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer gefärbt. Hierzu wurden die Präparate mit entmineralisiertem Wasser gespült, sechsmal in Hämatoxylin (Mayers Hämalaunlösung, Merck KGaA) getaucht, erneut in entmineralisiertem Wasser gewaschen und zwei Minuten unter fließendem Wasser belassen. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe von 70%igem Alkohol bis Xylol für jeweils eine Minute zur Dehydrierung. Die gefärbten Präparate wurden mit Hilfe von Vitroclud[®] eindeckelt.

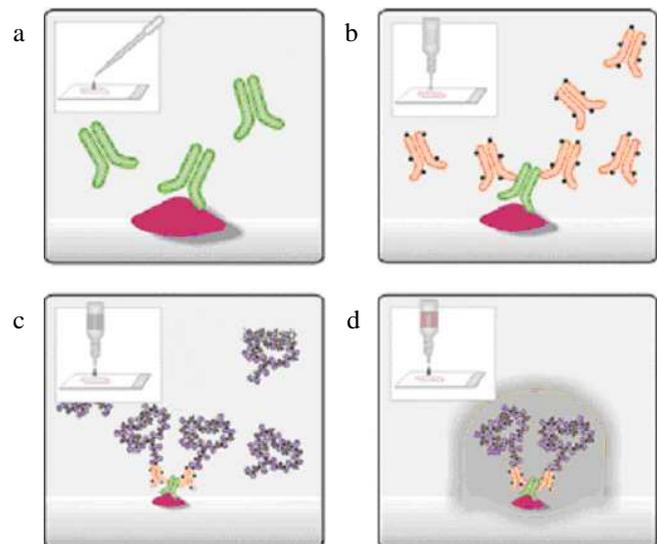


Abb. 10: Prinzip der immunhistochemischen Färbung (modifiziert nach: Vector Laboratories Inc.):

- a: Primärantikörper bindet an die Antigene.
- b: Biotinylierter Zweitantikörper bindet an die Primärantikörper.
- c: AB-Komplex bindet an die biotinylierten Zweitantikörper.
- d: AP-Substrat bindet an die Antikörper-Komplexe. Es kommt zu einer Färbung dieser Komplexe.

3.12.6 Immunhistochemische Auswertung

3.12.6.1 CTR-Expression

Über die CTR gefärbten Schnitte wurde eine ROI gelegt. Sie betrug in ihrer Höhe 12 mm, jeweils 6 mm von der Osteotomiespaltmitte gemessen. Die Breite hing von der individuellen Kallusbreite ab. Die ROI wurde mittig der Kortizes ein weiteres Mal unterteilt, so dass eine

Untergliederung in endostal und periostal vorgenommen werden konnte. Auch der Osteotomiespalt mit seiner Verlängerung in die periostalen Bereiche wurde gesondert betrachtet, so dass eine Unterteilung in zentral und peripher gemacht werden konnte.

Anhand der immunhistochemischen Darstellung der CTR-Expression wurden Osteoklasten (Abb. 11) in einer 200-fachen Vergrößerung unter dem Mikroskop (Leica DMRB, Leica Microsystems Nussloch GmbH) unter Berücksichtigung folgender Kriterien: Positive Färbung, mindestens zwei Kerne und Lage am Knochen, gezählt. Zusätzlich wurde bei der Zählung eine trabekuläre und kortikale Lokalisation unterschieden.

Die trabekulär erhobenen Absolutwerte wurden auf die entsprechende, bildanalytisch ermittelte Trabekelfläche bezogen, um Aussagen über die Osteoklastendichte treffen zu können.

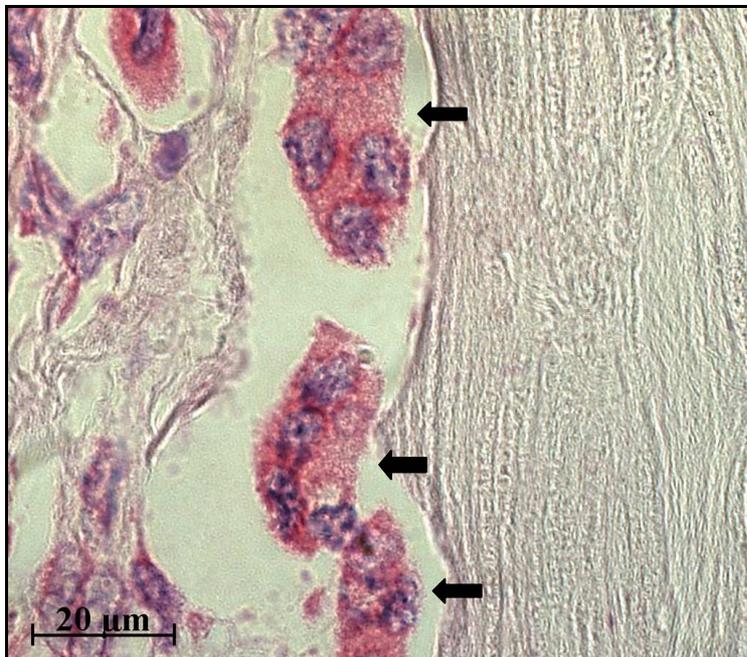


Abb. 11: Immunhistochemische CTR-Färbung. Osteoklasten (Pfeile) in ihren Howship-Lakunen lokalisiert an der Kortikalis.

3.12.6.2 α -SMA-Expression

Die α -SMA gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogrammes (Mosaix; Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena, Deutschland) in ihrer Gesamtheit in 100-facher Vergrößerung eingelesen. Die entstandenen Bilder wurden in eine Bildbearbeitungssoftware (Adobe Photoshop Version 6.0) geladen und mit einer ROI versehen. Diese betrug in ihrer Höhe 12 mm. Die Breite wurde individuell durch die Gesamtkallusbreite bestimmt. Eine Gliederung der ROI beinhaltete die Unterscheidung in endostal und periostal, sowie in zentral und peripher. Dabei umfasste der zentrale Bereich der ROI den Osteotomiespalt und dessen gedachte Verlängerung im periostalen Kallus. Zusätzlich wurde noch ein Maßstab von 40 μ m Durchmesser in das Bild eingefügt.

Mit Hilfe dieser Färbung wurden Gefäße (Abb. 12) gezählt. Anhand ihrer Größe wurde zwischen großen Gefäßen ($\geq 40 \mu\text{m}$) und kleinen Gefäßen ($< 40 \mu\text{m}$) unterschieden. Ferner wurde bei der Zählung auf trabekuläre und nicht-trabekuläre Lokalisation geachtet.

Die so erhobenen Absolutwerte wurden auf die entsprechende, bildanalytisch ermittelte Bindegewebsfläche bezogen, um Aussagen über die Gefäßdichte treffen zu können.

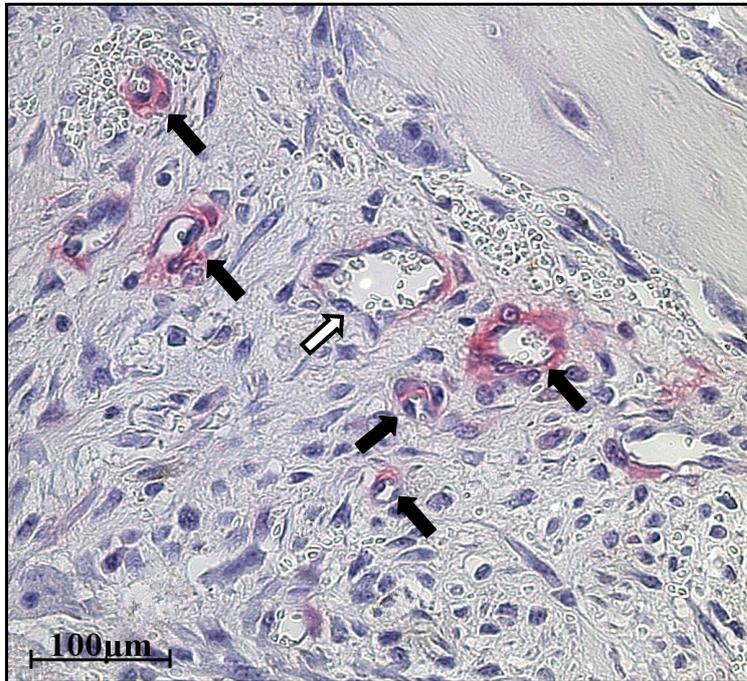


Abb. 12: Immunhistochemische α -SMA-Färbung. Periostal lokalisierte kleine (schwarze Pfeile) und große (weißer Pfeil) Blutgefäße, die zum Teil mit Erythrozyten gefüllt sind.

3.13 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS (Version 12.0, SPSS Inc, Chicago, USA). Der Vergleich beider Fixateurgruppen hinsichtlich der mRNA-Expression der untersuchten Faktoren, der Vaskularisierung, der Osteoklastendichte und der histomorphometrisch gewonnenen Parameter wurde mittels Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Zur graphischen Darstellung der Daten wurden Boxplots gewählt. Das Signifikanzniveau wurde bei $p=0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

In die Auswertungen gingen 12 Tiere ein. Alle Schafe wurden im Rahmen der täglichen Wundversorgung und der wöchentlichen Röntgenkontrollen als nicht krank und der Verlauf der Frakturheilung als komplikationslos eingestuft. Infekte im Bereich der Operationsnarbe und den Eintrittspforten der Schanzschrauben wurden nicht beobachtet. Hinsichtlich des Allgemeinbefindens und der Futteraufnahme zeigten die Tiere keinerlei Auffälligkeiten.

4.1 Molekularbiologie

4.1.1 Semiquantitative PCR

In allen untersuchten Geweben (Frakturhämatom und peripheres Blut) konnte eine mRNA-Synthese des Referenzgenes GAPDH nachgewiesen werden (Abb. 13).

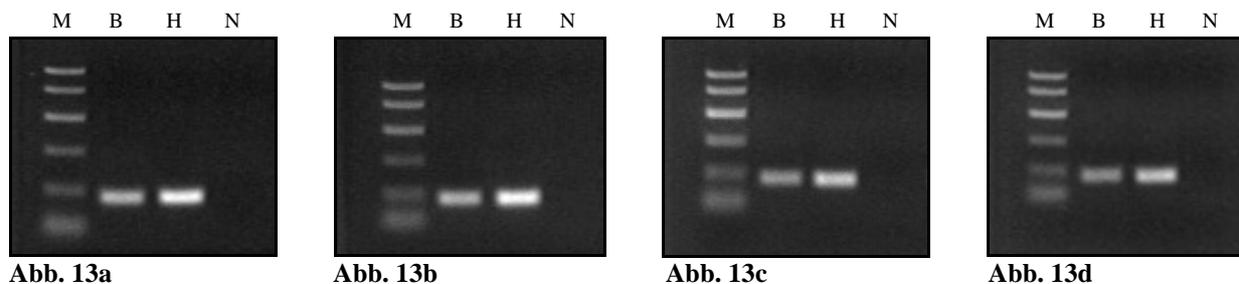


Abb. 13: Semiquantitative Analyse der mRNA-Synthese von GAPDH am Beispiel von zwei Tieren mit rigider (Abb. 13a und Abb. 13b) und zwei Tieren mit kritischer Fixateurversorgung (Abb. 13c und Abb. 13d). Die jeweils erste Bande stellt den Größenmarker (M) dar. Es folgt das peripher entnommene Blut (B) und das entsprechende Frakturhämatom (H). Die letzte Bande zeigt die Negativkontrolle (N).

Zusätzlich wurde mit Hilfe der semiquantitativen PCR eine Primerselektionierung durchgeführt.

Abb. 14 zeigt eine Auswahl von Primerkombinationen am Beispiel von CYR61 und HIF-1 α .

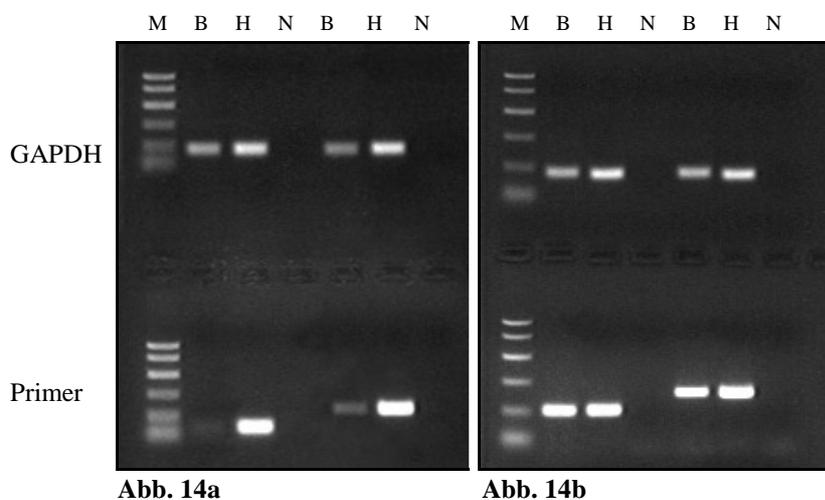


Abb. 14: Semiquantitative Analyse zur Primerselektionierung.

Die ersten Banden stellen den Größenmarker (M) dar. Es folgt das periphere Blut (B), das Frakturhämatom (H) und die Negativkontrolle (N) der Primerkombination A/S. Es schließen sich die Proben der Kombination F/R an. GAPDH diente als Referenzgen. Abb. 14a zeigt CYR61, Abb. 14b HIF-1 α . Aufgrund der Bandenintensität wurde für CYR61 die Kombination F/R und für HIF-1 α A/S gewählt.

4.1.2 Real-time PCR

Im peripheren Blut ließ sich keine mRNA von BMP-7, Coll II, IGF-1, IL-6, MMP-13 und OPN nachweisen. Ganz vereinzelt und im Bereich der Nachweisgrenze war die mRNA der Faktoren BMP-2, CYR-61 und PDGF-BB detektierbar. Die mRNA von BMP-4, IL-1, TNF- α und VEGF wurde in mehreren Proben dokumentiert, doch lagen die Werte ebenfalls nah an der Nachweisgrenze. Lediglich die mRNA von HIF-1 α und TGF- β_1 war zum Entnahmezeitpunkt bei jedem Tier im Blut nachweisbar (Tabelle 5).

Tabelle 5: Rohdaten der untersuchten Primer auf mRNA-Ebene im peripheren Blut. GAPDH wurde als Referenzgen mitgeführt. (N/A bedeutet, dass kein Fluoreszenzanstieg detektierbar war).

	Rigide Fixateurversorgung						Kritische Fixateurversorgung					
Ct - Wert GAPDH	25,8	27,1	26,9	26,1	28,2	26,7	29,5	26,4	29,7	27,3	26,7	26,4
Ct - Wert GAPDH	25,8	26,9	26,9	26,0	27,4	26,8	29,3	26,3	29,7	27,3	26,8	26,2
Ct - Wert BMP-2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	30,1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ct - Wert BMP-2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ct - Wert BMP-2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ct - Wert GAPDH	25,6	26,5	26,7	25,3	27,4	27,0	29,0	25,9	28,1	28,7	27,7	24,8
Ct - Wert GAPDH	25,4	26,2	26,6	25,6	27,1	26,7	29,5	25,1	28,3	28,2	27,6	24,6
Ct - Wert BMP-4	30,1	30,4	N/A	29,9	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	29,4
Ct - Wert BMP-4	30,5	30,4	N/A	30,2	N/A	N/A	N/A	N/A	30,5	N/A	N/A	29,4
Ct - Wert BMP-4	30,1	N/A	N/A	29,6	N/A	N/A	N/A	29,9	N/A	N/A	N/A	29,8
Ct - Wert GAPDH	24,9	25,3	25,9	24,6	26,9	27,3	28,6	25,0	29,7	25,9	25,8	25,7
Ct - Wert GAPDH	24,7	24,4	26,2	24,6	27,0	26,7	28,8	25,0	29,2	25,4	25,9	25,3
Ct - Wert CYR-61	30,1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	30,5	N/A	N/A
Ct - Wert CYR-61	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	29,9	N/A	N/A
Ct - Wert CYR-61	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ct - Wert GAPDH	25,0	26,9	26,7	25,8	27,8	26,8	29,8	26,3	29,7	26,9	26,0	26,2
Ct - Wert GAPDH	25,1	27,0	26,7	25,5	27,7	26,7	29,6	26,6	29,9	26,9	26,5	26,1
Ct - Wert HIF-1 α	26,9	28,0	27,8	26,5	28,2	28,1	29,6	27,3	30,1	28,1	26,9	27,3
Ct - Wert HIF-1 α	26,9	28,0	27,9	26,6	28,9	27,7	N/A	27,8	N/A	28,0	27,4	27,6
Ct - Wert HIF-1 α	26,8	27,9	27,7	26,7	28,7	27,7	30,0	27,8	N/A	28,2	27,1	27,4
Ct - Wert GAPDH	25,6	26,8	26,8	25,5	27,0	26,7	29,4	26,2	29,3	26,4	25,6	25,9
Ct - Wert GAPDH	25,6	26,7	26,9	25,0	27,8	26,6	29,0	26,6	29,5	26,5	26,0	26,1
Ct - Wert IL-1	29,6	28,6	28,9	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ct - Wert IL-1	29,7	29,2	29,2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ct - Wert IL-1	29,7	29,0	28,4	N/A	N/A	30,3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

	Rigide Fixateurversorgung						Kritische Fixateurversorgung					
Ct - Wert GAPDH	24,8	26,2	26,6	25,9	27,2	26,7	29,9	26,3	29,9	27,2	26,8	26,5
Ct - Wert GAPDH	25,5	26,7	26,4	25,5	27,3	26,6	30,0	26,7	29,9	27,2	26,8	26,6
Ct - Wert PDGF-BB	N/A	N/A	N/A	29,9	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ct - Wert PDGF-BB	N/A	N/A	N/A	30,3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ct - Wert PDGF-BB	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ct - Wert GAPDH	25,4	26,8	26,7	24,9	27,2	26,8	29,0	26,2	29,5	27,1	26,7	27,0
Ct - Wert GAPDH	25,1	26,8	26,8	25,1	27,7	26,9	29,0	26,9	29,4	27,2	26,4	26,8
Ct - Wert TGF- β_1	26,7	27,1	28,2	26,4	28,2	27,9	29,2	27,6	N/A	27,2	28,5	N/A
Ct - Wert TGF- β_1	26,9	27,6	28,5	26,7	28,0	27,8	29,5	28,2	N/A	28	N/A	N/A
Ct - Wert TGF- β_1	26,7	27,7	28,1	26,7	28,8	27,4	29,3	28,8	29,9	27,8	N/A	29,3
Ct - Wert GAPDH	25,0	26,5	26,8	25,2	27,1	26,6	29,9	24,8	28,4	27,3	26,9	24,4
Ct - Wert GAPDH	25,3	26,7	26,9	25,0	27,7	26,6	29,5	24,9	28,0	27,8	27,1	24,5
Ct - Wert TNF-1 α	30,3	N/A	N/A	29,4	N/A	N/A	N/A	29,7	N/A	N/A	N/A	29,4
Ct - Wert TNF-1 α	30,5	N/A	N/A	29,7	N/A	N/A	N/A	30,0	N/A	N/A	N/A	29,8
Ct - Wert TNF-1 α	30,1	N/A	N/A	29,7	N/A	N/A	N/A	29,9	N/A	N/A	N/A	29,3
Ct - Wert GAPDH	25,3	26,7	26,6	25,2	27,6	26,5	28,6	25,8	29,7	N/A	25,9	25,9
Ct - Wert GAPDH	25,1	26,7	26,5	25,0	27,6	26,9	28,7	25,3	29,3	26,6	26,0	26,0
Ct - Wert VEGF	29,7	29,7	30,5	29,7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ct - Wert VEGF	30,1	30,1	N/A	30,4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ct - Wert VEGF	30,3	N/A	N/A	30,3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Im Frakturhämatom eines jeden Tieres zeigte sich eine mRNA-Synthese der Faktoren BMP-2, BMP-4, BMP-7, Coll II, CYR61, HIF-1 α , IL-1, IL-6, OPN, PDGF-BB, TNF- α , TGF- β_1 und VEGF. Die mRNA von IGF-1 konnte unter rigider Versorgung in allen sechs Hämatomen nachgewiesen werden, wohingegen unter kritischer Versorgung nur fünf Hämatome eine mRNA-Expression aufwiesen. In jeweils fünf Hämatomen beider Gruppen wurde die mRNA des Faktors MMP-13 synthetisiert.

Bezüglich der Wachstumsfaktoren BMP-2, BMP-4, BMP-7, IGF-1, PDGF-BB und VEGF konnte keine statistisch signifikante differentielle Expression im Frakturhämatom zwischen der rigiden und der kritischen Fixateurversorgung dokumentiert werden (Abb. 15). Lediglich BMP-4 ließ einen Trend ($p=0,093$) zur geringeren mRNA-Synthese im kritischen System erkennen.

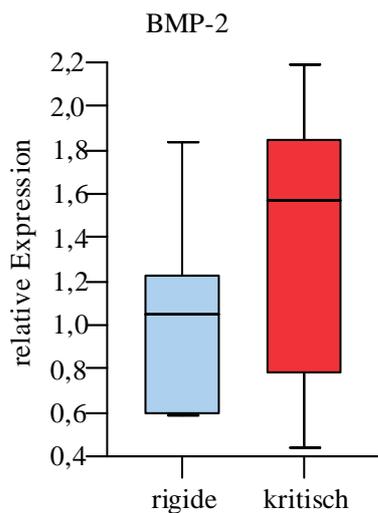


Abb. 15.1

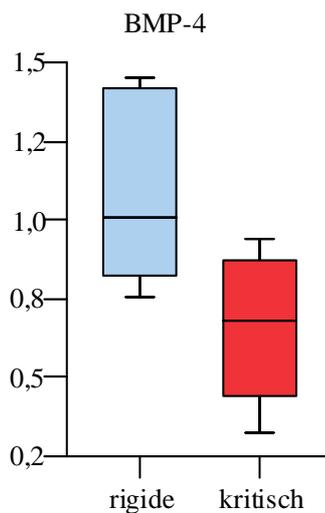


Abb. 15.2

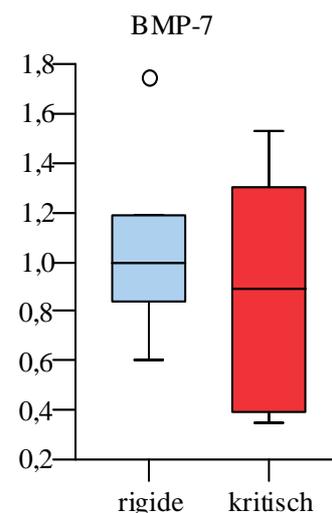


Abb. 15.3

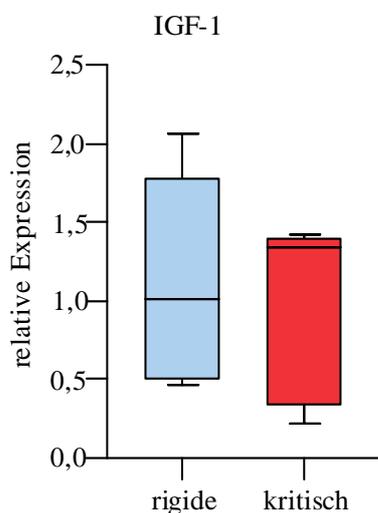


Abb. 15.4

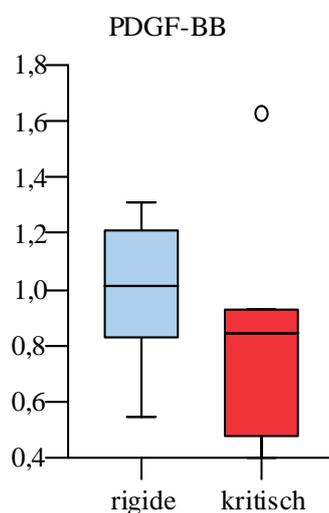


Abb. 15.5

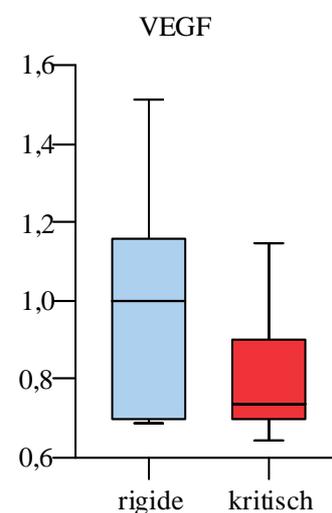


Abb. 15.6

Abb. 15: Relative Expression der Wachstumsfaktoren BMP-2 (Abb. 15.1), BMP-4 (Abb. 15.2), BMP-7 (Abb. 15.3), IGF-1 (Abb. 15.4), PDGF-BB (Abb. 15.5) und VEGF (Abb. 15.6) im Frakturhämatom nach rigider und kritischer Fixateurversorgung.

Die mRNA-Synthese der Zytokine IL-1, TGF- β_1 und TNF- α zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Dagegen wurde die mRNA des IL-6 signifikant geringer ($p=0,004$) in den Hämatomen der Tiere mit kritischer Fixateurversorgung exprimiert (Abb. 16).

In den Frakturhämatomen wiesen der Transkriptionsfaktor HIF-1 α (Abb.18) und die extrazellulären Matrixproteine Coll II, CYR-61 und OPN (Abb.17) Mediane ohne signifikante Expressionsniveaus auf. Lediglich die Matrix Metalloproteinase MMP-13 zeigte einen signifikanten Unterschied ($p=0,016$). In der Gruppe mit kritischer Fixateurversorgung konnte eine geringere MMP-13 Expression im Frakturhämatom dokumentiert werden (Abb. 18).

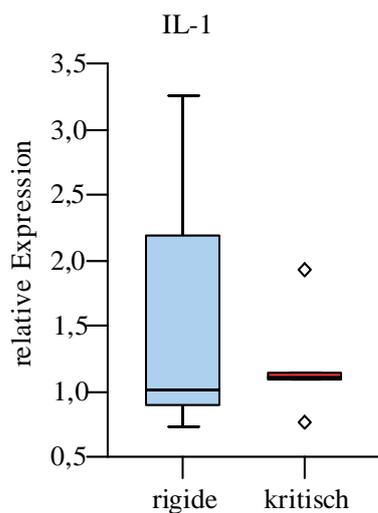


Abb. 16.1

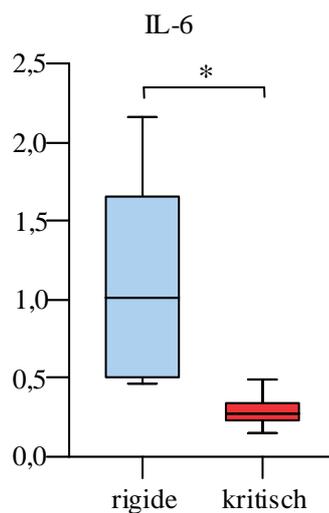


Abb. 16.2

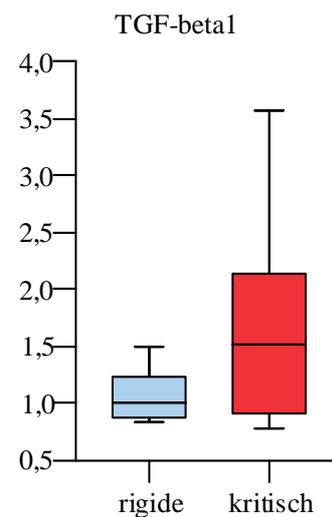


Abb. 16.3

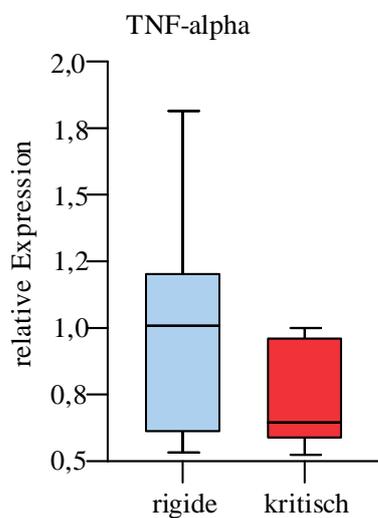


Abb. 16.4

Abb. 16 (oben und links): Relative Expression der Zytokine IL-1 (Abb. 16.1), IL-6 (Abb. 16.2), TGF- β_1 (Abb. 16.3) und TNF- α (Abb. 16.4) im Frakturhämatom nach rigider und kritischer Fixateurversorgung ($p^*=0,004$).

Abb. 17 (unten): Relative Expression der extrazellulären Matrixproteine Coll II (Abb. 17.1), CYR61 (Abb. 17.2) und OPN (Abb. 17.3) im Frakturhämatom nach rigider und kritischer Fixateurversorgung.

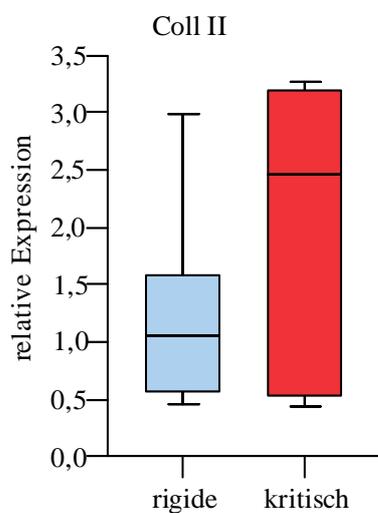


Abb. 17.1

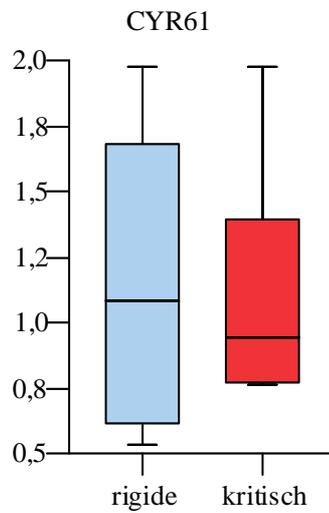


Abb. 17.2

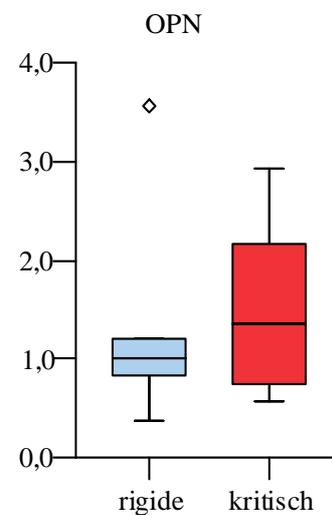


Abb. 17.3

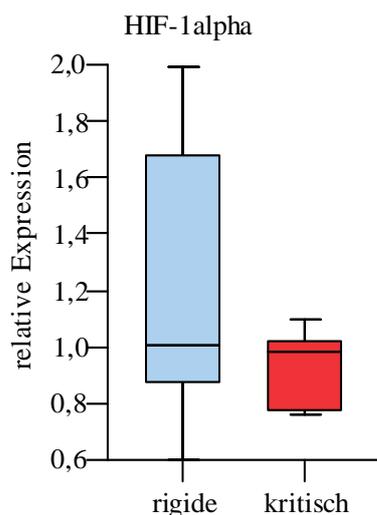


Abb. 18.1

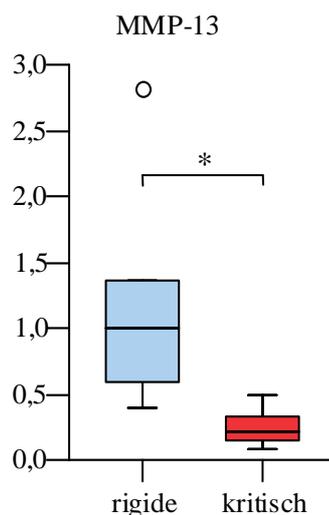


Abb. 18.2

Abb. 18: Relative Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 α (Abb. 18.1) und der Matrix Metallproteinase MMP-13 (Abb. 18.2) im Frakturhämatom nach rigider und kritischer Fixateurversorgung ($p^*=0,016$).

4.1.3 Zusammenfassung der molekularbiologischen Ergebnisse

Zusammenfassend hat sich gezeigt, dass im peripheren Blut nur die mRNA von HIF-1 α und TGF- β_1 bei jedem Tier nachgewiesen werden konnte. Die mRNA von BMP-2, BMP-4, CYR-61, IL-1, PDGF-BB, TNF- α und VEGF war in wenigen Proben schwach detektierbar. Die Expression der anderen untersuchten Faktoren ließ sich im peripheren Blut nicht nachweisen.

Im Frakturhämatom konnte eine mRNA-Synthese aller untersuchten Faktoren dokumentiert werden. Der Vergleich beider Gruppen zeigte bezüglich MMP-13 und IL-6 eine signifikant geringere Expression, bezüglich BMP-4 einen Trend zu einer geringeren Expression in der Gruppe mit kritischer Fixateurversorgung. Die Expressionsniveaus von HIF-1 α , der untersuchten extrazellulären Matrixproteine sowie der übrigen Zytokine und Wachstumsfaktoren zeigten keinen Unterschied zwischen den Gruppen.

4.2 Histologie

4.2.1 Deskriptive Betrachtung

Sowohl das vier Tage alte Frakturhämatom als auch das Regeneratgewebe zehn Tage nach der Hämatomentnahme wurden mit Hilfe der histologischen Färbungen deskriptiv betrachtet.

4.2.1.1 Frakturhämatom

Das vier Tage alte Frakturhämatom zeigte in beiden Fixateurgruppen ein sehr heterogenes Bild. Es ließen sich Bereiche nachweisen, die ausschließlich aus Erythrozyten bestanden. An anderen Stellen wurden diese Erythrozytenkomplexe von Fibrinnetzen durchsetzt (Abb.19). Entzündungszellen zeigten sich inhomogen im Gewebe verteilt. Ganz vereinzelt fanden sich

Areale im Frakturhämatom, die von Zellen infiltriert waren, die in ihrer Größe die Entzündungszellen übertrafen. Zusätzlich wiesen diese Zellen eine erniedrigte Kern-Zytoplasma-Relation auf (Abb. 20).

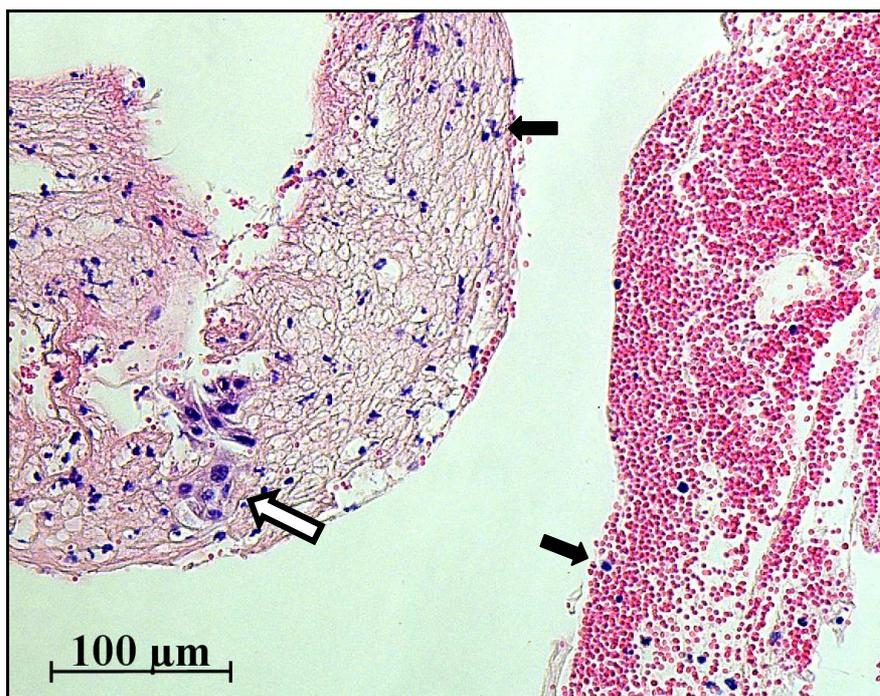
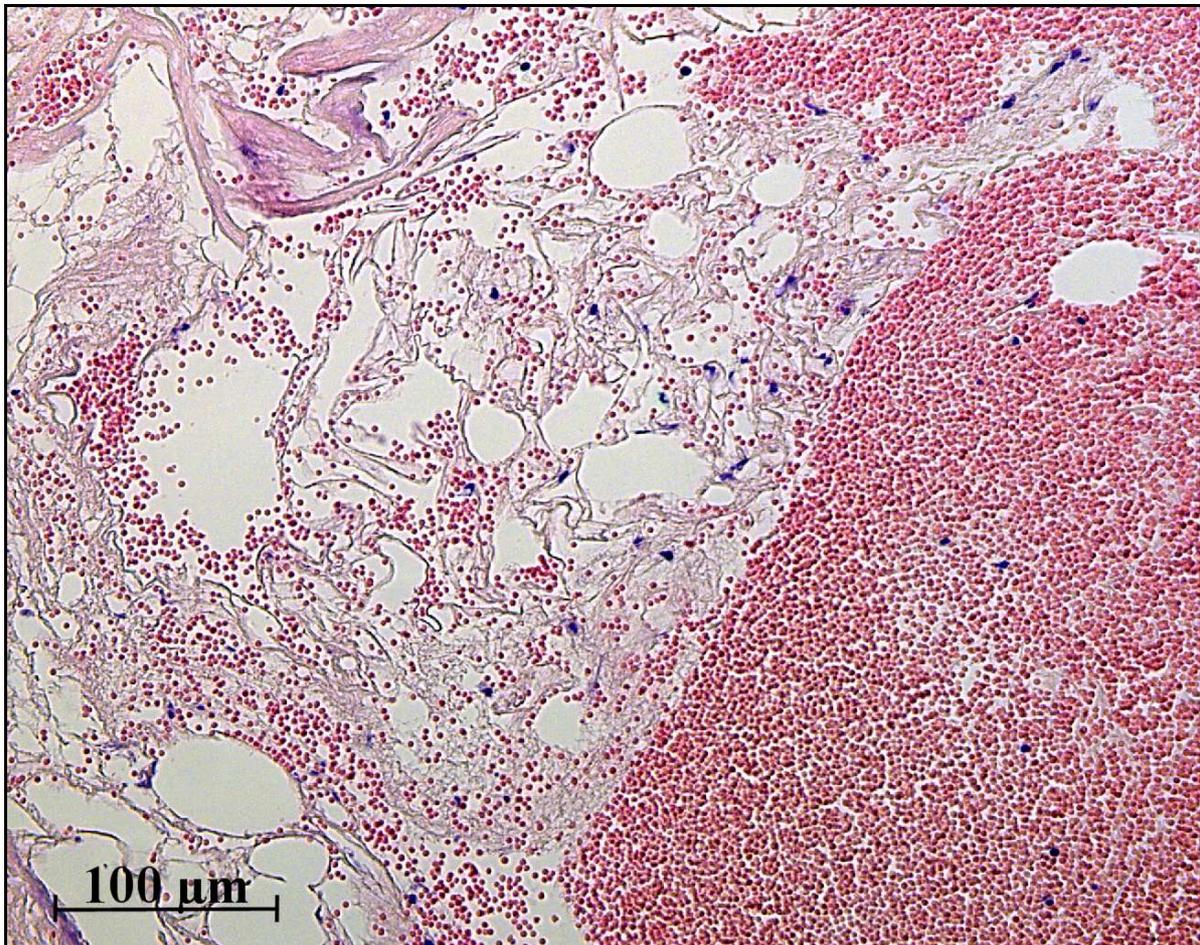


Abb. 19 (oben): HE-Färbung des vier Tage alten Frakturhämatoms. Das Hämatom weist neben den Erythrozytenkomplexen noch Gebiete auf, in denen diese von Fibrinnetzen aufgelockert werden.

Abb. 20 (links): HE-Färbung des vier Tage alten Frakturhämatoms. Neben den Entzündungszellen (\varnothing ca. 9 μm ; schwarze Pfeile) lassen sich vereinzelt in Gruppen lokalisierte Zellen (\varnothing ca. 22 μm ; weißer Pfeil) finden, die in ihrer Größe die Entzündungszellen übertreffen.

4.2.1.2 2-Wochenzeitpunkt

Zum 2-Wochenzeitpunkt der Frakturheilung nach vorangegangener Hämatomentnahme am vierten Tag war in beiden Fixateurgruppen zu beobachten, dass die durch die Osteotomie erzeugten scharfen und rechtwinkligen Kanten der Kortizes sich mikroskopisch überwiegend leicht abgerundet darstellten (Abb. 21). Schon in dieser Phase der Frakturheilung ließen sich im Bereich der Kortizes und kleiner Knochenabsplitterungen vereinzelt Resorptionsvorgänge, erkennbar am Osteoklastenaufkommen, nachweisen (Abb. 22).

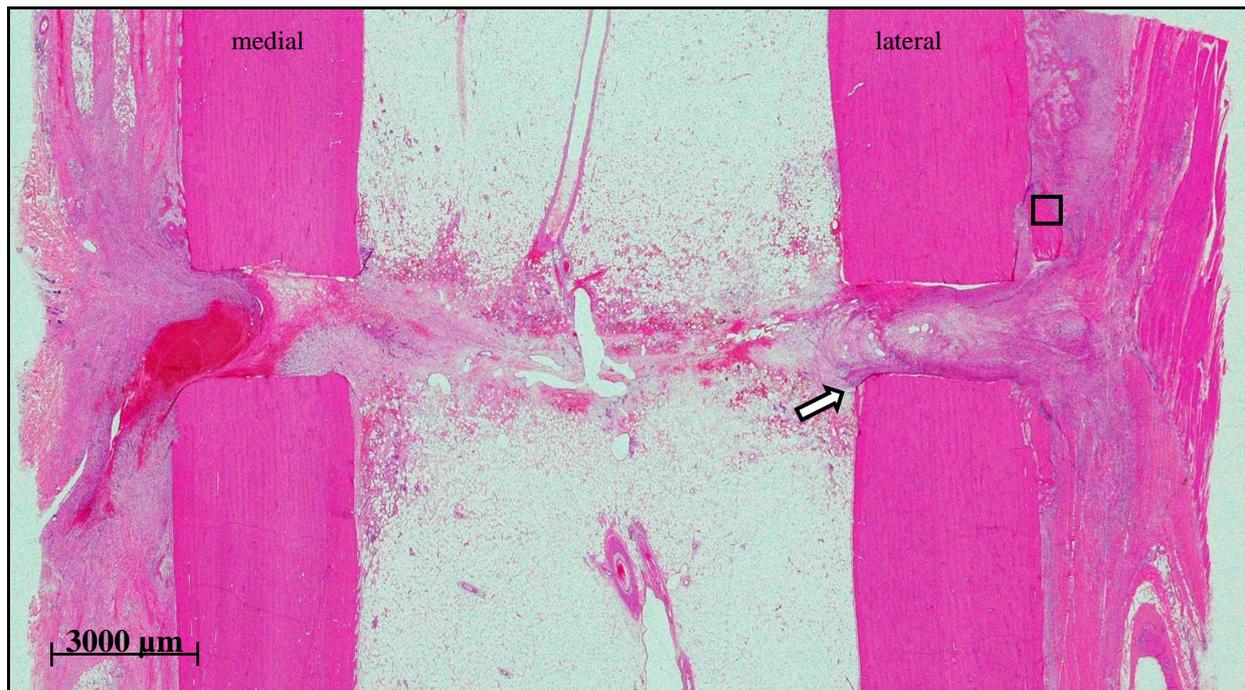


Abb. 21 (oben): HE- Färbung des Osteotomiegebietes nach rigider Fixation. Die Kanten der Kortizes stellen sich nach 14-tägigem Heilungsverlauf leicht abgerundet dar (Pfeil).

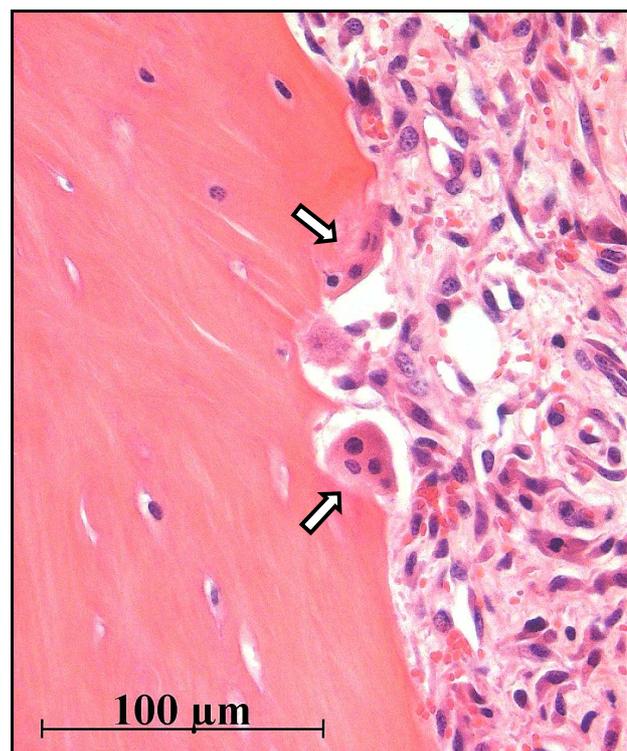


Abb. 22 (rechts): Ausschnittsvergrößerung der HE-Färbung des Osteotomiegebietes nach rigider Fixation. Die Ausschnittsvergrößerung der Abb. 21 zeigt Osteoklasten (Pfeile) in ihren Howship-Lakunen lokalisiert an einem Knochensplitter.

Im Osteotomiespalt dominierte interkortikal die Anwesenheit von Hämatom- und Bindegewebe. Das Bindegewebe verlief größtenteils senkrecht zur Knochenachse. Auch periostal auf Höhe des Spaltes konnte noch Hämatomgewebe nachgewiesen werden (Abb. 23). Vor allem periostal zeigten sich distal und proximal des Osteotomiespaltes erste fingerförmige Knochenausläufer, die so genannten Trabekel (Abb. 24).

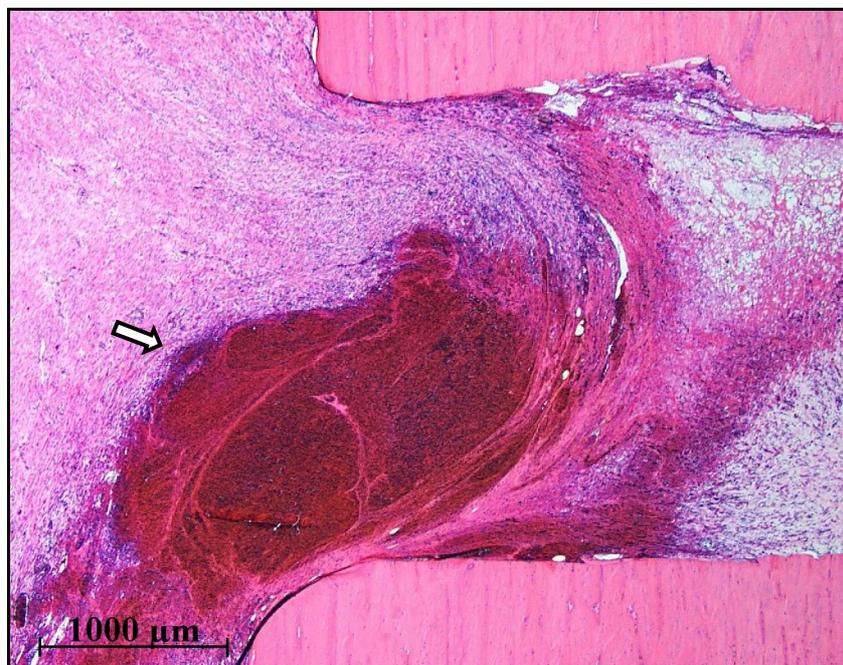


Abb. 23 (links): HE-Färbung des medialen Osteotomiespaltes nach rigider Fixation.

Die Abbildung zeigt das teils interkortikal, teils periostal erhaltenden Frakturhämatoms (Pfeil) zwei Wochen nach der Osteotomie.

Abb. 24 (unten): Safranin Orange/von Kossa-Färbung des Osteotomiegebietes nach rigider Fixation.

Die Übersichtsaufnahme des Osteotomiegebietes zeigt diskontinuierliche Mineralisierungen des Kallusgewebes (Pfeil).



4.2.2 Histomorphometrie

Nach der Entnahme des Frakturhämatoms vier Tage post operativ und einer weiteren Standzeit von zehn Tagen wurde der im Osteotomiegebiet befindliche Kallus bezüglich seiner Gesamtfläche betrachtet. Dabei zeigte sich im Vergleich zum rigiden System eine tendenziell ($p=0,065$) größere Kallusfläche nach kritischer Fixateurversorgung (Abb. 25). Um im Folgenden die Qualität des entstandenen Regeneratgewebes beurteilen zu können, wurden die Gewebeanteile des Kallus aufgeschlüsselt. Den Großteil der Fläche bildete in beiden Gruppen das Bindegewebe (Abb. 26). Der Anteil des mineralisierten Knochens an der Gesamtkallusfläche war somit verhältnismäßig gering (Abb. 27). Doch sowohl der Bindegewebsanteil als auch der Anteil an mineralisiertem Knochen im Kallus verhielten sich im rigiden und kritischen System sehr ähnlich.

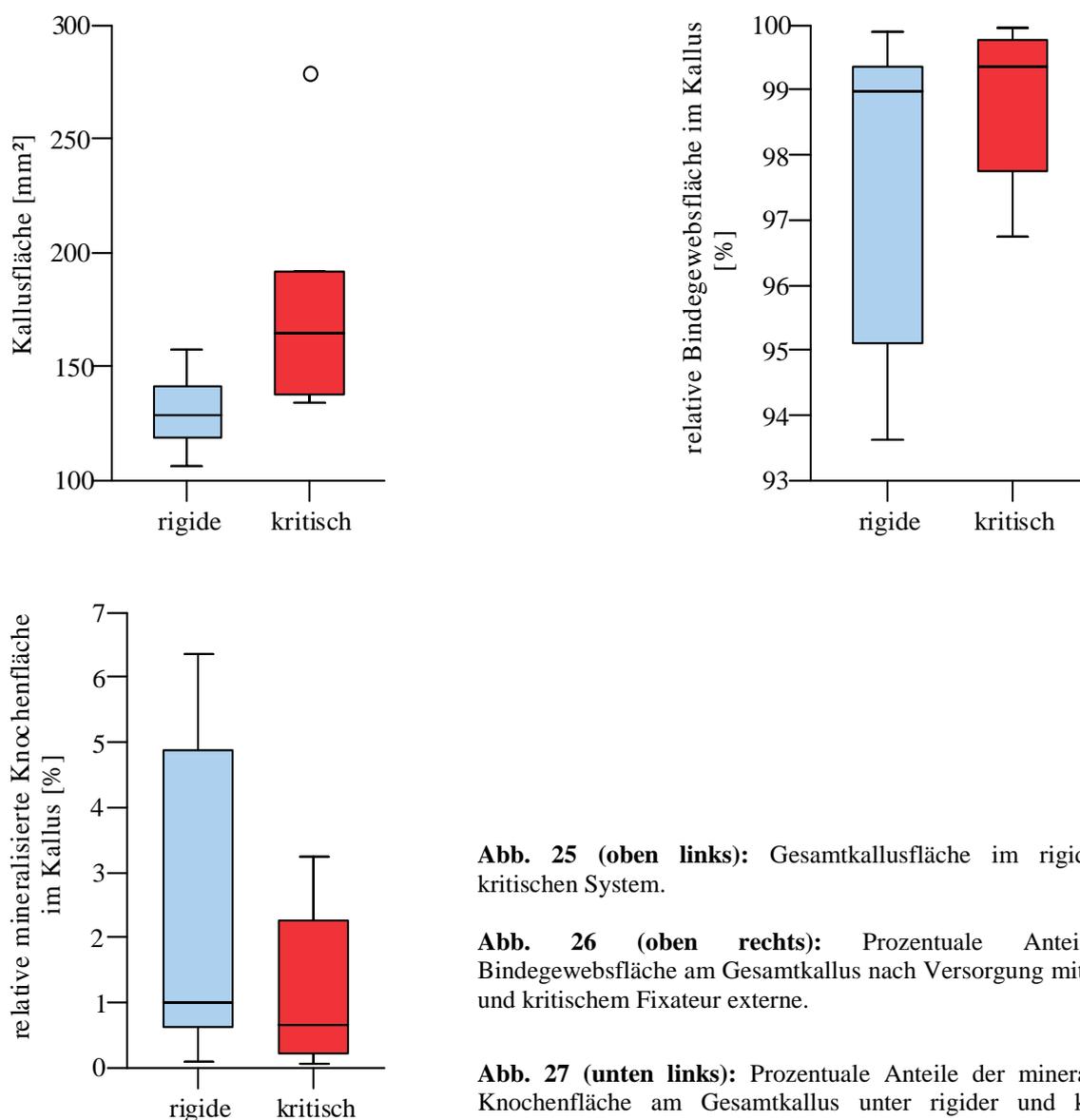


Abb. 25 (oben links): Gesamtkallusfläche im rigiden und kritischen System.

Abb. 26 (oben rechts): Prozentuale Anteile der Bindegewebsfläche am Gesamtkallus nach Versorgung mit rigidem und kritischem Fixateur externe.

Abb. 27 (unten links): Prozentuale Anteile der mineralisierten Knochenfläche am Gesamtkallus unter rigider und kritischer Fixateurversorgung.

Auch die differenzierte Betrachtung dieser Gewebe bezüglich ihrer Lokalisation (periostal/endostal und medial/lateral) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fixateurgruppen (Abb. 28, Abb. 29).

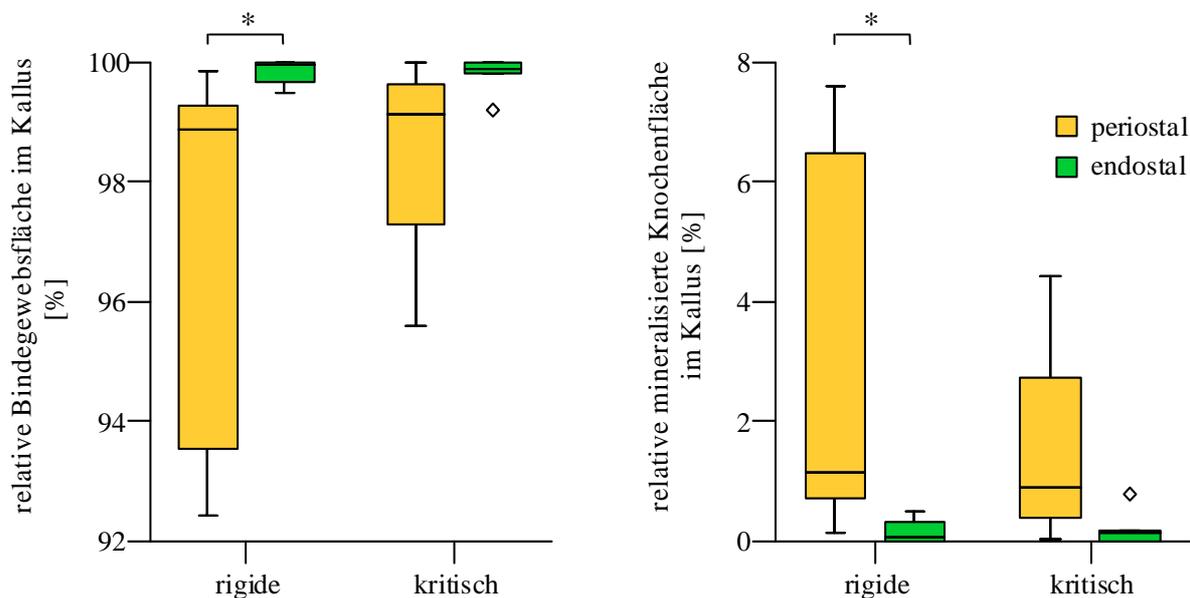


Abb. 28: Prozentuale Anteile der Bindegewebsfläche (links) und der mineralisierten Knochenfläche (rechts) am Gesamtkallus differenziert nach periostal und endostal im rigiden und kritischen System ($p^*=0,031$).

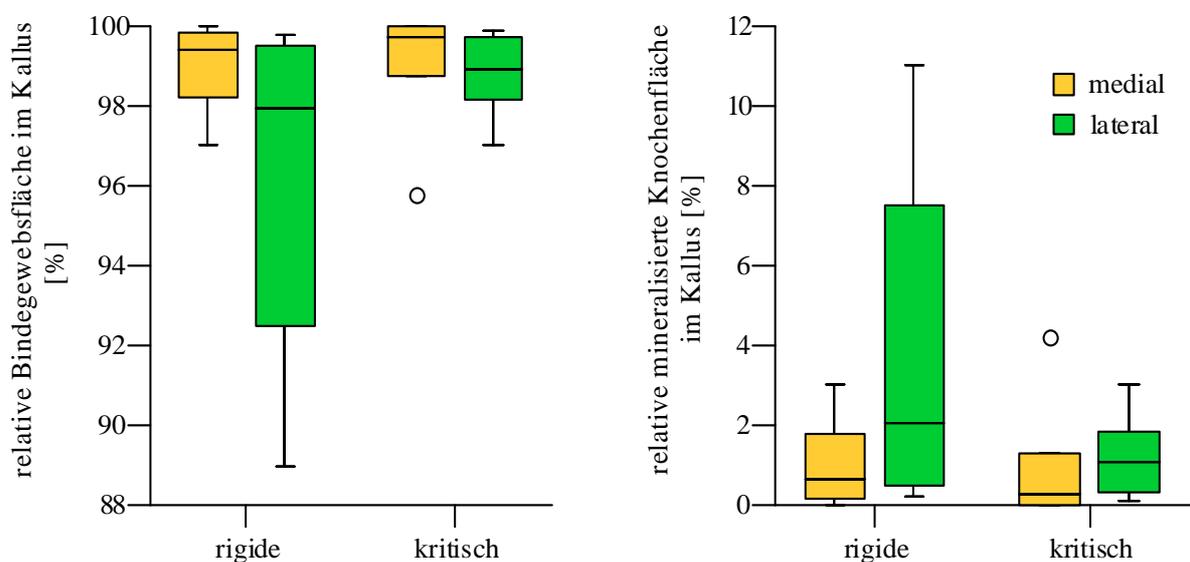


Abb. 29: Prozentuale Anteile der Bindegewebsfläche (links) und der mineralisierten Knochenfläche (rechts) am Gesamtkallus differenziert nach medial und lateral im rigiden und kritischen System.

Innerhalb der Gruppen konnten Unterschiede in den Gewebeverteilungen nachgewiesen werden. Es fanden sich im rigiden System sowohl für die relative Bindegewebsfläche als auch für die relative mineralisierte Knochenfläche im Kallus signifikante Unterschiede ($p=0,031$) zwischen periostaler und endostaler Lokalisation. Endostal dominierte der Bindegewebsanteil, wohingegen sich periostal mehr mineralisierter Knochen zeigte (Abb. 28). Im kritischen System wies diese

Verteilung der Gewebe verglichen zwischen periostal und endostal sehr starke Tendenzen ($p=0,063$) auf. Bei der differenzierten Betrachtung des medialen und lateralen Osteotomiegebietes konnte lediglich bei den Tieren mit rigider Fixateurversorgung ein Trend ($p=0,094$) zur vermehrten Bindegewebsfläche und zur verminderten mineralisierten Knochenfläche im medialen Kallus nachgewiesen werden (Abb. 29).

Der Anteil des Knorpels am Kallusgewebe ließ sich aufgrund der flächenmäßig sehr kleinen Areale histomorphometrisch nicht bestimmen.

4.2.3 Zusammenfassung der Histologie

Das vier Tage alte Frakturhämatom zeigte histologisch in beiden Gruppen ein ähnliches Bild. Neben den Bereichen, die ausschließlich aus Erythrozytenkomplexen bestanden, fanden sich Areale in denen diese von Fibrin durchzogen wurden. Entzündungszellen ließen sich im gesamten Hämatom nachweisen. Vereinzelt wurde das Gewebe von Zellen infiltriert, die in ihrer Größe die Entzündungszellen übertrafen, jedoch eine geringere Kern-Zytoplasma-Relation aufwiesen.

Auch zum frühen Zeitpunkt zwei Wochen nach der Osteotomie mit zusätzlicher Hämatomentfernung zeigte sich in beiden Gruppen ein ähnliches Bild. Interkortikal war neben Bindegewebe noch Hämatomgewebe nachweisbar, welches sich auch periostal auf Höhe des Osteotomiespaltes finden ließ. Neben ersten trabekulären Knochenausläufern ließen sich ebenfalls Osteoklasten im Osteotomiegebiet beobachten.

Diese deskriptiven Ergebnisse wurden durch die Histomorphometrie bestätigt. Weder in der Gesamtkallusfläche noch in der Zusammensetzung des Kallus konnten signifikante Unterschiede zwischen dem rigiden und dem kritischen System nachgewiesen werden. Beide Fixateursysteme zeigten ähnliche Gewebeverteilungen im Kallus mit rund 99% Bindegewebsanteil und nur 1% mineralisiertem Kallus.

4.3 Immunhistochemie

4.3.1 Deskriptive Betrachtung

Sowohl das vier Tage alte Frakturhämatom als auch das Regeneratgewebe zwei Wochen nach der Osteotomie wurden mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen deskriptiv betrachtet.

4.3.1.1 Frakturhämatom

Immunhistochemisch ließen sich im vier Tage alten Frakturhämatom weder α -SMA- noch Coll II- oder CTR-positive Zellen nachweisen.

4.3.1.2 2-Wochenzeitpunkt

Knorpelgewebe ließ sich zum 2-Wochenzeitpunkt der Frakturheilung nach Entfernung des Frakturhämatoms am vierten Tag in beiden Fixateurgruppen nur sehr vereinzelt als wenige Knorpelzellen umfassende Inseln nachweisen. Diese selten vorkommenden und flächenmäßig kleinen Areale waren, wenn überhaupt vorhanden, im periostalen Gewebe auf Höhe des Osteotomiespalt zu finden (Abb. 30, Abb. 31).

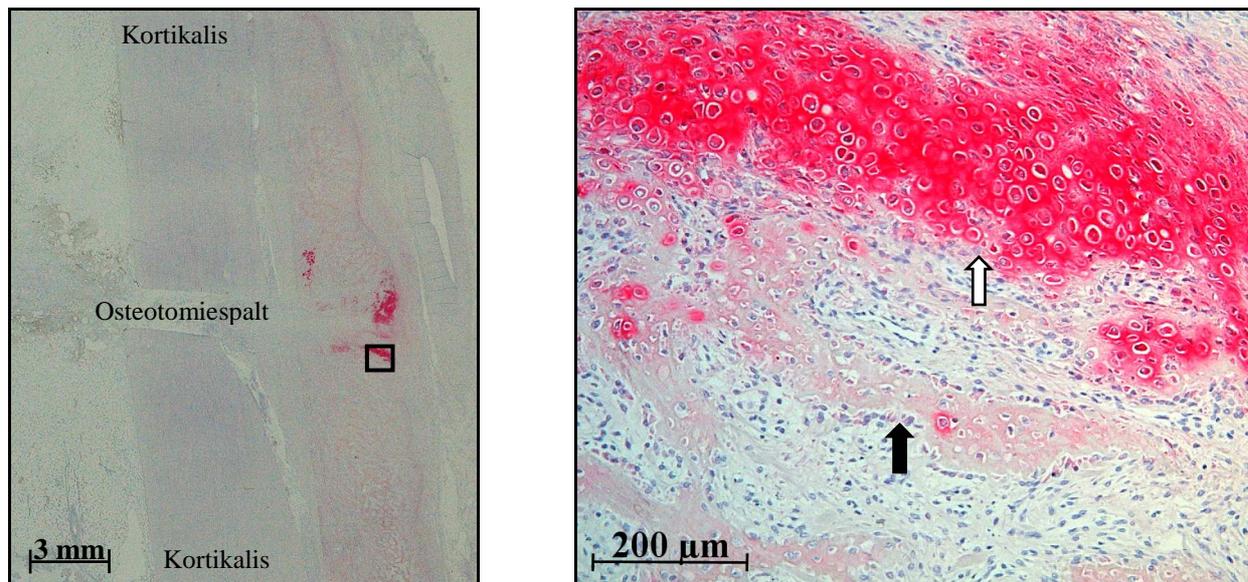


Abb. 30 (links): Immunhistochemische Coll-II-Färbung des lateralen Osteotomiegebietes 14 Tage post Osteotomie. Dargestellt ist das Tier mit dem fortgeschrittensten Heilungsverlauf.

Abb. 31 (rechts): Ausschnittsvergrößerung der immunhistochemischen Coll-II-Färbung.

Die Vergrößerung der Abb. 30 zeigt eine Insel Kollagen II-positiver Knorpelzellen (weißer Pfeil). Zusätzlich lassen sich Knochenstrabekel (schwarzer Pfeil) erkennen.

4.3.2 Osteoklasten

Für die Auswertung der Osteoklasten musste ein Tier der kritischen Fixateurgruppe ausgeschlossen werden, da nur zwei Kortizes im Präparat angeschnitten waren.

Sowohl im endostalen als auch im zentralen Kallus ließen sich in beiden Fixateurgruppen keine bzw. eine verschwindend geringe Anzahl an Osteoklasten nachweisen. Die absolute Anzahl der Osteoklasten in Abhängigkeit des Fixateursystems nach Hämatomentnahme und insgesamt zweiwöchiger Standzeit ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Absolute Anzahl der Osteoklasten im Bereich der Region of Interest.

Fixateur	periostaler Kallus	endostaler Kallus	peripherer Kallus	zentraler Kallus
	Median [Min-Max]	Median [Min-Max]	Median [Min-Max]	Median [Min-Max]
rigide	20 [13-81]	3 [0-5]	22 [13-81]	1 [0-3]
kritisch	38 [20-69]	0 [0-3]	38 [23-69]	0 [0-0]

Die Anzahl kortikal lokalisierter Osteoklasten zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Fixateurgruppen (Abb. 32). Trabekulär hingegen zeigte sich eine Tendenz ($p=0,082$) zur gesteigerten Osteoklastendichte im Osteotomiegebiet nach kritischer Fixateurversorgung (Abb. 33).

Dieser Trend ließ sich jedoch bei der differenzierten Betrachtung der periostal (Abb. 34) bzw. endostal (Abb. 35) lokalisierten Trabekel nicht bestätigen.

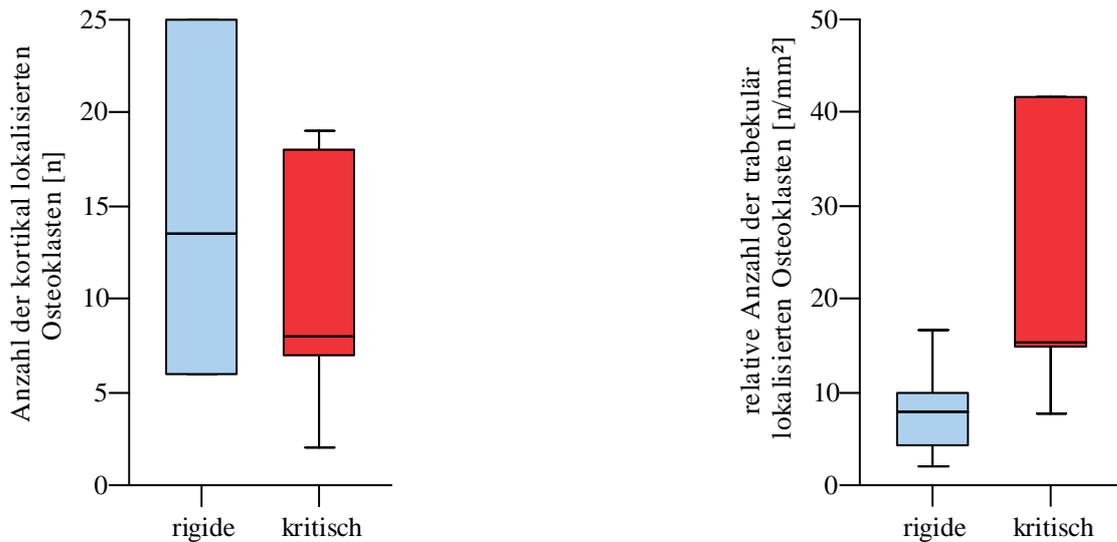


Abb. 32 (links): Absolute Anzahl der kortikal lokalisierten Osteoklasten nach rigider und kritischer Fixation.

Abb. 33 (rechts): Relative Anzahl der trabekulär lokalisierten Osteoklasten im rigiden und kritischen System. Graphisch nicht dargestellt ist ein Extremwert von 229 Osteoklasten pro mm^2 im Osteotomiegebiet eines Tieres mit kritischem Fixateur externe.

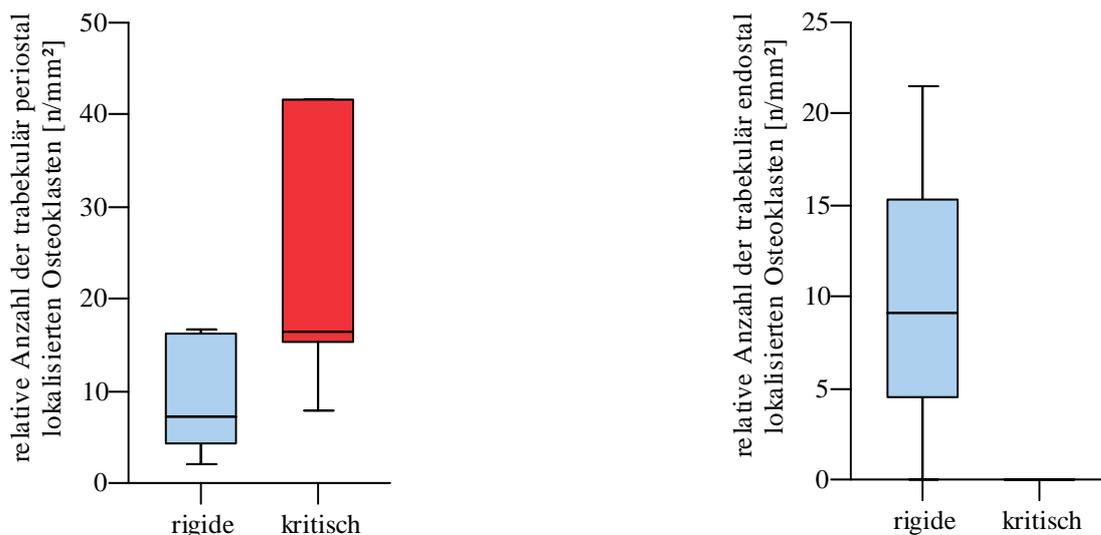


Abb. 34 (links): Anzahl der trabekulär periostal lokalisierten Osteoklasten bezogen auf die periostale Trabekelfläche nach rigider und kritischer Fixation.

Graphisch nicht dargestellt ist ein Extremwert von 800 Osteoklasten pro mm^2 im Osteotomiegebiet eines Tieres mit kritischem Fixateur externe.

Abb. 35 (rechts): Anzahl der trabekulär endostal lokalisierten Osteoklasten bezogen auf die endostale Trabekelfläche im rigiden und kritischen System.

4.3.3 Vaskularisierung

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fixateurgruppen in der Gefäßdichte (Anzahl der Blutgefäße pro mm² Bindegewebsfläche) im Kallus zum 2-Wochenzeitpunkt des Heilungsverlaufes nach vorangegangener Hämatomentnahme (Abb. 36).

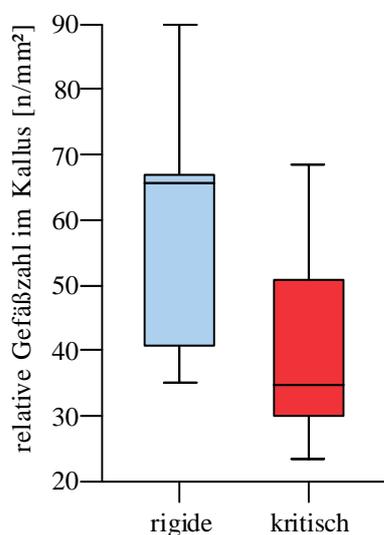


Abb. 36: Vaskularisierung des Kallusgewebes im rigiden und kritischen System. Die Anzahl der Gefäße wurde auf die Bindegewebsfläche im Kallus bezogen.

Doch die differenzierte Betrachtung der Gefäßdichte in Hinblick auf ihre Lokalisation ließ Unterschiede erkennen. Im Gegensatz zum endostalen Kallus konnten periostal im rigiden System signifikant ($p=0,009$) mehr Gefäße nachgewiesen werden (Abb. 37). Die Unterteilung in den Osteotomiebereich (zentral) und peripheren Bereich der ROI zeigte ähnliche Gefäßverteilungen zwischen den Fixateurgruppen (Abb. 38).

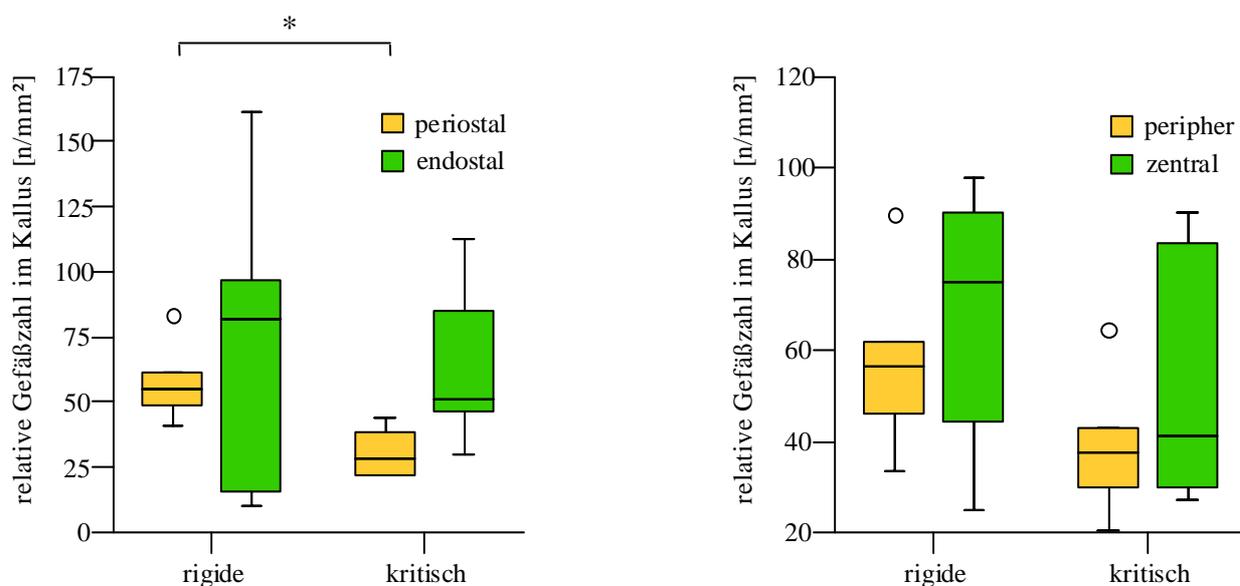


Abb. 37 (links): Periostale und endostale Vaskularisierung des Kallusgewebes nach rigider und kritischer Fixation ($p^*=0,009$).

Abb. 38 (rechts): Periphere und zentrale Vaskularisierung des Kallusgewebes nach rigider und kritischer Fixation.

Generell wurde die Gefäßdichte durch die Anzahl der kleinen Blutgefäße bestimmt (Abb. 39). Zeigte die Anzahl der kleinen Gefäße bezogen auf die Bindegewebsfläche im Kallus keine Unterschiede zwischen den Fixateursystemen (Abb. 39), fanden sich bei der differenzierten Betrachtung periostal (Abb. 40) signifikant ($p=0,009$) mehr kleine Blutgefäße in der rigiden im Vergleich zur kritischen Fixateurgruppe.

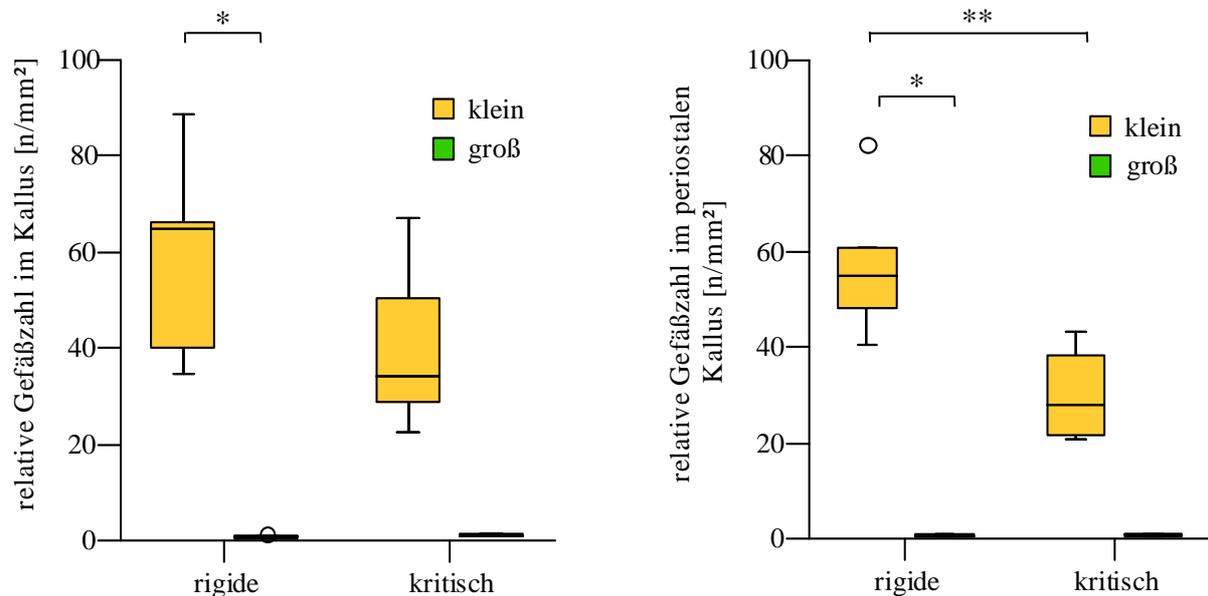


Abb. 39 (links): Gefäßdichte im Kallusgewebe differenziert nach der Größe unter rigider und kritischer Fixateurversorgung ($p^*=0,031$).

Abb. 40 (rechts): Gefäßdichte im periostalen Kallusgewebe differenziert nach der Größe unter rigider und kritischer Fixation ($p^{**}=0,009$, $p^*=0,031$).

Innerhalb der Fixateurgruppen ließen sich ebenfalls signifikante Unterschiede nachweisen. So zeigten die Tiere mit kritischer Fixateurversorgung endostal tendenziell ($p=0,063$) eine höhere Vaskularisierung als periostal (Abb. 37). Bei der Betrachtung der größenspezifischen Gefäßverteilung fiel in der rigiden Fixateurgruppe ein statistischer Unterschied auf. Es ließen sich im Osteotomiegebiet mehr kleine als große Gefäße finden (Abb. 39, Abb. 40). Die Versorgung mit dem kritischen Fixateur externe zeigte diesbezüglich lediglich einen starken Trend ($p=0,063$).

4.3.4 Zusammenfassung der Immunhistochemie

Im vier Tage alten Frakturhämatom fanden sich immunhistochemisch weder α -SMA- noch Coll II- oder CTR-positive Zellen.

Nach der Hämatomentnahme und einer weiteren Standzeit von zehn Tagen ließen sich nur vereinzelt flächenmäßig kleine Knorpelzellen umfassende Inseln im Osteotomiegebiet

nachweisen. Diese Zellen waren, wenn überhaupt vorhanden, periostal auf Höhe des Osteotomiespaltes zu finden.

Das Osteoklastenaufkommen konzentrierte sich ebenfalls auf das periostale Osteotomiegebiet. Die Anzahl im endostalen und zentralen Bereich war dagegen verschwindend gering. Kortikal konnten innerhalb der Region of Interest keine Unterschiede zwischen den Fixateurgruppen ausgemacht werden, wohingegen die Dichte trabekulär im kritischen System tendenziell erhöht war.

Die unterschiedliche Fixateurversorgung führte im Osteotomiegebiet zu keinen signifikanten Unterschieden hinsichtlich der Gefäßanzahl bezogen auf die Gesamtbindegewebsfläche im Kallus. Eine differenzierte Betrachtung zeigte jedoch im periostalen Kallusgebiet eine signifikant geringere Gefäßdichte nach kritischer Fixation als nach rigider. Diese Ergebnisse konnten auch bei der Unterscheidung der Gefäßgröße für kleine Blutgefäße bestätigt werden. Generell war festzustellen, dass sowohl bei der gesamten als auch bei der differenzierten Betrachtung signifikant mehr kleine als große Gefäße im rigiden System zu finden waren. Im kritischen Fixateursystem zeigte die größenspezifische Gefäßverteilung lediglich einen starken Trend.

5 Diskussion

Die Frakturheilung und ihre bestmögliche Versorgung stehen schon seit vielen Epochen im Fokus der Forschung. Trotz aller therapeutischen Fortschritte zeigt der klinische Alltag in Deutschland derzeit bei ca. 10-20 % der Frakturen Heilungsverzögerungen [52]. Diese Tatsache und der Wunsch des Patienten nach immer schnellerer Rehabilitation ohne Funktionsverlust rechtfertigt auch heutzutage noch die unfallchirurgische Grundlagenforschung zum besseren Verständnis der Frakturheilung.

Ziel dieser Studie war es, Kenntnisse über den Einfluss mechanischer Rahmenbedingungen auf die initiale Phase der Frakturheilung zu gewinnen. Hierzu wurde in der frühen Heilungsphase einer standardisierten Osteotomie am Schafmodell in Abhängigkeit von definierten biomechanischen Bedingungen das entstandene Hämatom entfernt und hinsichtlich der Expression bestimmter knochenheilungsrelevanter regulatorischer Faktoren molekularbiologisch analysiert und histologisch charakterisiert. Zusätzlich erfolgte eine histologische und immunhistochemische Analyse des Regeneratgewebes zwei Wochen nach der Osteotomie unter Berücksichtigung der Hämatomentnahme sowie der mechanischen Rahmenbedingungen.

Die eingangs formulierte Hypothese, dass die Biomechanik bereits während der initialen Phase der Frakturheilung als wichtiger Einflussfaktor fungiert, konnte für den vierten Tag des Heilungsverlaufes nicht eindeutig bestätigt werden. Zwar wurde die Expression von zwei der betrachteten regulatorischen Faktoren (IL-6 und MMP-13) durch die unterschiedlichen mechanischen Bedingungen signifikant beeinflusst, jedoch konnten die dazu aufgestellten Vermutungen nicht verifiziert werden. Im Vergleich zur rigiden Fixation kam es unter mechanisch-kritischen Bedingungen zu keiner erniedrigten Hochregulation der Expression der untersuchten Wachstumsfaktoren und zu keiner verstärkten Hochregulation der Expression der untersuchten inflammatorischen Zytokine. Der Vergleich beider Gruppen zeigte bezüglich des Zytokins IL-6 und der Matrix Metalloproteinase MMP-13 eine signifikant geringere mRNA-Synthese unter mechanisch-kritischen Rahmenbedingungen.

Die zweite Hypothese lautete, dass mechanisch-kritische Rahmenbedingungen die Heilung verzögern. Hierzu konnten histomorphologisch keine Aussagen getroffen werden. Vergleiche mit der Vorgängerstudie von Schell *et al.* [130], in der ein identisches rigides Fixateursystem verwendet wurde, zeigten, dass die als verzögerte Heilung angesehene schlechte Kallusgewebsbildung mit wenig organisiertem Gewebe im Osteotomiespalt allein durch die Entfernung des Frakturhämatoms vier Tage nach der Osteotomie in einer maximalen Ausprägung (99%

bindegewebiger Anteil im Kallus) hervorgerufen wurde. Die immunhistochemische Auswertung des Regeneratgewebes konnte die zusätzlich geforderten Aspekte einer verzögerten Heilung jedoch bestätigen. Verglichen mit der rigiden Osteosynthese führten die erhöhten interfragmentären Bewegungen zwei Wochen nach der Osteotomie zu einer signifikanten Reduzierung der Gefäßdichte und zu einer tendenziellen Erhöhung des Osteoklastenaufkommens im Kallusgewebe.

Werden die Ergebnisse der vorliegenden Studie mit den Vorgängerstudien von Lienau *et al.* [75] bzw. Schell *et al.* [130], in denen ein identisches rigides Fixateursystem zur Anwendung kam, verglichen, scheint auch die Ausräumung des vier Tage alten Frakturhämatoms einen heilungsverzögernden Einfluss, bezogen auf die Gefäß- und Osteoklastendichte, zu besitzen. So trifft auch die letzte Hypothese, dass die Entfernung des Hämatoms die Frakturheilung verzögert, zu.

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau dieser Arbeit basierte auf dem im Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin etablierten Tiermodell aus dem Jahr 2003 [65]. Nachfolgende Studien der Arbeitsgruppe [75, 76, 130, 131] orientierten sich an diesem experimentellen Frakturmodell, bei dem an der rechten Tibia eine Osteotomie mit einer Spaltgröße von 3 mm durchgeführt wurde. Die mediale Montageebene des Fixateur externe wurde auf Grund der günstigen anatomischen Gegebenheiten gewählt. Ohne Traumatisierung des umliegenden Weichteilmantels konnte hier das Osteosynthesematerial angebracht werden, so dass eine standardisierte komplikationslose Heilung erreicht wurde. Auch Studien anderer Arbeitsgruppen [4, 49], die Aspekte der Frakturheilung am Schafmodell untersuchten, basierten auf einer Osteosynthese an der rechten Tibia und einem 3 mm breiten Osteotomiespalt.

Die in dieser Studie gewählte Distanz zwischen Haut und Fixateurstange unterschied sich je nach Fixateur. Tiere, die mit dem rigiden System versorgt wurden, wiesen einen Abstand von 15 mm auf. Die Stange des kritischen Fixateur externe wurde 20 mm von der Haut entfernt montiert. Dies beruht auf der Tatsache, dass je größer der Abstand zwischen der Tibia und dem Fixateur ist, desto instabiler werden seine Eigenschaften [26]. So wurde eine zusätzliche Möglichkeit genutzt, das kritische System noch instabiler zu gestalten.

5.1.2 Operation

Die Operation der Schafe verlief komplikationslos. Lediglich bei der Durchtrennung der Kortizes kam es vereinzelt zu Knochenabsplitterungen. Diese konnten anhand von Röntgenaufnahmen direkt postoperativ nachgewiesen werden. Die länglichen bis dreieckigen Knochenfragmente zeigten sich auch in den histologischen und immunhistochemischen Präparaten. Im Bereich der Splitter fand sich beispielsweise eine vermehrte Anzahl an Osteoklasten und damit einhergehend erhöhte Resorptionsvorgänge. So scheint es, dass die Knochenabsplitterungen Einfluss auf die Frakturheilung nehmen.

5.1.3 Sägen

Zum Entnahmezeitpunkt der Tibiapräparate zwei Wochen nach der Osteotomie waren im Osteotomiespalt vorrangig bindegewebige Strukturen und Hämatomgewebe zu finden. Die Frakturrenden wurden somit nur von labilen Gewebebrücken zusammengehalten. Die dreitägige Fixierung in einer formaldehydhaltigen Lösung ermöglichte eine problemlose Gewinnung der Präparate aus der Gruppe mit der rigiden Fixateurversorgung. Im kritischen System waren die Gewebebrücken noch labiler, so dass es beim Sägen vereinzelt zu Rissen im Osteotomiespaltgewebe kam. Das kritische System wies jedoch noch ein weiteres Problem auf. Durch die zugelassene initiale Scherung von 9,5 mm standen die Frakturrenden nicht mehr in einer Ebene. Trotz Anpassung der Sägevorgänge an die Röntgenbilder wurden Präparate gewonnen, auf denen nicht alle vier Kortizes in einer Ebene lagen.

5.1.4 Molekularbiologie

Die RNA-Gewinnung basierte auf der Menge von 1 g Material. Jedoch unterschieden sich sowohl das Frakturhämatom als auch das periphere Blut in ihrer Konsistenz. Dies zeigte sich besonders bei der photometrischen Messung der RNA-Menge, die zum Teil große Unterschiede zwischen den Proben lieferte. Das bedeutet, dass in den einzelnen Ausgangsmaterialien eine unterschiedliche Menge an Zellen vorhanden war. Diese Tatsache konnte bei der Umschreibung in cDNA durch eine angepasste RNA-Menge ausgeglichen werden. Zusätzlich zeigte sich bei der photometrischen Messung, dass die Ratio der Proben im oberen Grenzbereich lag. Die Ratio steht für den Grad der Verunreinigung der jeweiligen Probe und sollte zwischen 1,5 und 1,8 liegen. Wird dieser Wert überschritten, so lassen sich neben der isolierten RNA noch weitere Zellbestandteile, sprich Verunreinigungen finden.

Die Quantifizierung des Expressionsmusters der untersuchten Faktoren mittels Real-time PCR erfolgte relativ, wobei die Expression der Zielgene mit Hilfe eines nicht regulierten

Referenzgens, in diesem Fall GAPDH, normalisiert wurde. Dabei werden nicht die absoluten Ausgangskonzentrationen bestimmt, sondern die Expression des zu untersuchenden Gens wird auf das zweite ubiquitär und homogen exprimierte Gen bezogen. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse. Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der Reversen Transkription innerhalb eines Laufes betreffen sowohl den untersuchten Faktor als auch das Referenzgen [111].

Die im Blut untersuchten Faktoren lagen im Gegensatz zum Frakturhämatom zu nah an der Nachweisgrenze, so dass eine anschließende relative Quantifizierung der Genexpression im peripheren Blut nicht erfolgte. Demnach konnte in der vorliegenden Arbeit auf keinen Ausgangswert Bezug genommen werden, um einen Vergleich zwischen der mRNA-Synthese im Blut und der Expression im Frakturhämatom zu erzielen.

5.1.5 Histologie

Ziel in der Erforschung der Frakturheilung ist das Verständnis der dreidimensionalen Verhältnisse [104]. Um dieser dreidimensionalen Abbildung näher zu kommen, wurden für die Histologie Serienschnitte aller Knochenproben angefertigt und jeweils drei Präparate mit annähernd gleichen Abständen untereinander für die Auswertung herangezogen.

Ein qualitatives Problem ergab sich bei der Safranin Orange/Lichtgrün-Färbung zur Knorpeldarstellung. Durch eine unzureichende Entfärbung, die trotz mehrfacher Protokolländerungen nicht behoben werden konnte, stellten sich neben dem Knorpel auch bindegewebige Strukturen rot dar. Diese Tatsache machte eine histomorphometrische Analyse unmöglich. Um den Knorpelanteil nach der 14-tägigen Standzeit dennoch bestimmen zu können, wurde zusätzlich Kollagen-Typ II, der Hauptbestandteil des Knorpels, immunhistochemisch gefärbt.

Eine potentielle Fehlerquelle stellte die Region of Interest dar. Obwohl sie in ihrer Höhe mit 12 mm, jeweils 6 mm von der Mitte des Osteotomiespaltes aus gesehen, fest definiert war, wurde sie in ihrer Breite durch die vom Untersucher zu markierende maximale Kallusbreite festgelegt. Durch diese Definition war es möglich, die ROI der Kallusgewebsausdehnung anpassen zu können. Auch andere Arbeitsgruppen [24] nutzten eine benutzerdefinierte Breitenanpassung der ROI.

5.1.6 Immunhistochemie

Als Grundlage für die Gefäßzählung diente eine Studie von Claes *et al.* [24] aus dem Jahr 2002. Sie basiert auf der Unterscheidung zwischen kleinen, mittleren und großen Gefäßen. Diese

Einteilung wurde in der vorliegenden Arbeit vereinfacht, so dass nur zwischen kleinen Gefäßen mit einem äußeren Gefäßdurchmesser von $< 40 \mu\text{m}$ und großen mit einem äußeren Gefäßdurchmesser von $\geq 40 \mu\text{m}$ unterschieden wurde. Da für die Immunhistochemie keine Serienschnitte angefertigt wurden, zeigt die Zählung nur ein zweidimensionales Bild.

Als problematisch erwies sich lediglich die Auswertung der Kollagen-Typ II-positiven Knorpelareale. Nach der Entfernung des Frakturhämatoms vier Tage nach der Osteotomie war nach der insgesamt 14-tägigen Standzeit nur wenig Knorpel im Osteotomiegebiet vorhanden. Diese sehr kleinen Areale machten eine histomorphometrischen Analyse unmöglich. Es erfolgte somit nur eine deskriptive Beurteilung des Knorpelvorkommens.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Molekularbiologie

Die Frakturheilung ist ein komplexer und multifaktorieller Vorgang, der durch das Zusammenspiel unterschiedlicher Zellsysteme, regulatorischer Faktoren und extrazellulärer Matrixproteinen gesteuert wird.

Unabhängig vom Fixateursystem fand sich im vier Tage alten Frakturhämatom die mRNA jedes des in der vorliegenden Studie untersuchten regulatorischen Faktors. Diese Ergebnisse stehen im Konsens mit der Literatur (siehe Stand der Wissenschaft). Der Vergleich zwischen den Systemen (rigide versus kritisch) zeigte jedoch nur bezüglich des Zytokines IL-6 und der Matrix Metalloproteinase MMP-13 eine signifikant geringere Expression unter den mechanisch-kritischen Rahmenbedingungen. Zusätzlich konnte eine tendenziell erniedrigte mRNA-Menge des Bone Morphogenetic Proteins BMP-4 im kritischen System nachgewiesen werden.

Die Arbeitsgruppe um Ralph Meyer [33, 85, 87] beschäftigte sich ebenfalls mit der verzögerten Frakturheilung und den daraus resultierenden Änderungen in der Genexpression. Die verzögerte Heilung wurde jedoch nicht durch biomechanische Rahmenbedingungen, sondern durch das Alter der Versuchstiere geschaffen. In einer Frakturstudie an der Ratte fanden Meyer *et al.* [86] heraus, dass alte Ratten eine verlängerte Heilungszeit aufweisen als junge Tiere. Auf dieser Erkenntnis basierte ihr Modell. Die gesetzten Femurschaftfrakturen der Tiere, die ein Alter von sechs Wochen bzw. 12-15 Monate besaßen, wurden mit Drähten versorgt. Nach jeweils einer, zwei, vier und sechs Wochen wurde das entstandene Regeneratgewebe gewonnen und aufgearbeitet. 2001 veröffentlichten Meyer und seine Mitarbeiter [87] unter anderem die Ergebnisse der Expressionen von BMP-2, BMP-4 und Coll II. Sieben Tage nach der Osteotomie zeigte sich kein differenzielles Expressionsmuster von Coll II und BMP-2 zwischen jungen und

alten Tieren. Lediglich die mRNA von BMP-4 wies bei den alten Ratten eine tendenziell erhöhte Expression auf. 2003 erschien eine Nachfolgerstudie von Desai *et al.* [33], die ebenfalls auf dem Altersunterschied der Versuchstiere basierte. Neben den bereits zuvor veröffentlichten BMP-2-, BMP-4- und Coll II-Ergebnissen wurden in dieser Studie unter anderem auch die zeitlichen Expressionsmuster von BMP-7, IGF-1, IL-1, IL-6, PDGF, TGF- β und VEGF betrachtet. Eine Woche nach der Osteotomie fand sich nur bei IL-6 ein signifikanter Unterschied. Die mRNA des Zytokins wurde von den alten Tieren verstärkt synthetisiert. Im selben Jahr veröffentlichten Meyer und seine Mitarbeiter [85] unter anderem die Ergebnisse der Expressionsanalysen der regulatorischen Faktoren BMP-2, BMP-4, BMP-7, Coll II, TGF- β und VEGF. Als Unterschied zu den Vorgängerstudien betrachteten sie in dieser Arbeit zusätzlich einen früheren Zeitpunkt der Frakturheilung. Drei Tage nach der Osteotomie zeigten die alten Ratten eine signifikant erniedrigte mRNA-Synthese der Faktoren BMP-2 und Coll II.

In der vorliegenden Studie konnten keine Unterschiede für das Bone Morphogenetic Protein und das extrazelluläre Matrixprotein gezeigt werden. Der von Meyer *et al.* [87] gesehene Trend des BMP-4 zur erhöhten Genexpression unter verzögerter Heilung war auch im vier Tage alten Frakturhämatom nachweisbar. Ein signifikanter Unterschied in der Expression des Zytokins IL-6 fand sich auch in der vorliegenden Studie. Jedoch war die mRNA-Synthese in der Gruppe der verzögerten Heilung nicht erhöht, sondern erniedrigt. Diese zum Teil abweichenden Ergebnisse könnten auf der Verwendung unterschiedlicher Spezies (Ratte versus Schaf) sowie der Betrachtung unterschiedlicher Untersuchungszeitpunkte basieren. Darüber hinaus wichen die Methoden zur Erzeugung einer verzögerten Frakturheilung stark voneinander ab. Meyer und seine Mitarbeiter nutzten die durch das Alter hervorgerufene physiologische Verzögerung der Frakturheilung, wohingegen die vorliegende Studie an Tieren gleichen Alters durchgeführt wurde. Eine Verzögerung der Heilung wurde durch die biomechanischen Rahmenbedingungen geschaffen.

IL-6 war das einzige der untersuchten Zytokine, das einen signifikanten Unterschied in der Genexpression aufwies. Diese Tatsache lässt sich damit erklären, dass andere proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 und TNF- α bereits ab dem ersten Tag nach einer Verletzung exprimiert werden, gefolgt von IL-6 [149]. Diese zeitlich festgelegte Abfolge in der Synthese der Zytokine kann auch für die Interpretation der in der vorliegenden Studie gemachten Ergebnisse herangezogen werden. Es scheint, dass vier Tage nach der Osteotomie die Genexpression des IL-6 im kritischen System noch nicht ihr Maximum erreicht hat, erkennbar an der signifikant erniedrigten mRNA-Synthese in diesem System verglichen mit der rigiden

Fixateurversorgung. Die proinflammatorischen Zytokine, die bereits zu Beginn einer Verletzung exprimiert werden, weisen demnach keine signifikanten Werte mehr auf. Das in der vorliegenden Studie untersuchte Zeitfenster ist hierfür zu spät. Somit scheint es, dass es durch erhöhte interfragmentäre Bewegungen nicht wie in den eingangs formulierten Hypothesen zu einer verstärkten Hochregulierung der Genexpression der Zytokine kommt, sondern zu einer verzögerten. Der Peak in der Expression im kritischen System könnte demnach zu einem späteren Zeitpunkt nachweisbar sein, wenn im rigiden System die Zytokinexpression bereits wieder nachlässt.

Neben den Zytokinen spielen auch die Wachstumsfaktoren in der frühen Phase der Frakturheilung eine wichtige Rolle. Die mRNA von BMP-4 ist bereits 12 Stunden nach der Fraktur im Hämatom detektierbar [91] und zeigte in der vorliegenden Studie als einziger der untersuchten Wachstumsfaktoren einen Trend in Bezug auf die eingangs formulierte Hypothese, dass kritische Rahmenbedingungen vier Tage nach der Osteotomie zu erniedrigten mRNA-Werten im Vergleich zum rigiden System führen. BMP-4 lässt sich als eines der ersten Wachstumsfaktoren nach einer Fraktur nachweisen, so dass zu dem in dieser Studie untersuchten Zeitpunkt bei den anderen Faktoren noch kein Einfluss der biomechanischen Rahmenbedingungen auf das Expressionsniveau sichtbar ist.

Fang und seine Mitarbeiter [39] entwickelten ein Mausmodell des craniofacialen Skeletts, um Faktoren aufzudecken, die für die abnormale Frakturheilung, besonders der Pseudarthrosebildung, verantwortlich sind. Hierzu wurde die Osteotomie der Mandibula mit einem speziellen Fixateur externe versorgt, der eine Distraktionsvorrichtung aufwies. Um die Frakturheilung zu verzögern, wurden die Frakturrenden auf 3,2 mm distrahiert. Für die normale Heilung erfolgte die Distraktion schrittweise über 120 Stunden. Sie untersuchten unter anderem die Genexpression von OPN. Fünf Tage nach der Osteotomie fanden sich erniedrigte mRNA-Werte bei der verzögerten im Vergleich zur normalen Heilung.

Unabhängig von der Frakturheilung untersuchten Terai und seine Mitarbeiter [144] den Einfluss von mechanischem Stress auf den gesunden Knochen und die daraus resultierenden Expressionsänderungen des OPN-Genes. An einem Zahn-Modell der Ratte brachten sie im interradikulären Septum der Wurzel des ersten Molaren elastische Bänder an. Dieser mechanische Stress rief auch noch vier Tage nach der Manipulation erhöhte mRNA-Werte des extrazellulären Matrixproteins hervor. In der vorliegenden Studie fanden sich keine Unterschiede im Expressionsmuster zwischen dem kritischen und dem rigiden System bezogen auf das OPN.

Zwar sind die betrachteten Zeitpunkte vergleichbar, jedoch unterscheiden sich die angewandten Methoden und die daraus resultierenden unterschiedlichen Expressionsmuster des extrazellulären Matrixproteins.

Für den Faktor TNF- α finden sich in der Literatur im Zusammenhang mit der verzögerten Frakturheilung keine Studien, die die Genexpression untersuchten. Shahidul Islam und seine Mitarbeiter [59] quantifizierten das Protein im Osteotomiegebiet mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen. Ein Osteoporosemodell der Ratte diente ihnen als Grundlage für die verzögerte Heilung. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war eine Woche nach der Osteotomie kein signifikanter Unterschied in der TNF- α -Expression zu finden. Auch im vier Tage alten Frakturhämatom konnte kein differenzielles Expressionsmuster zwischen den Fixateurgruppen nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse von Shahidul Islam *et al.* basieren auf einem anderen Modell. Nicht die Stabilität des Osteosynthesematerials, sondern die bei der Osteoporose vorherrschende reduzierte Knochensubstanz verzögerte die Frakturheilung. Dennoch zeigten die Ergebnisse einen ähnlichen Trend.

Auch CYR61 wurde gegenwärtig nur immunhistochemisch auf Proteinebene nachgewiesen. Lienau und Mitarbeiter [76] untersuchten die Lokalisation des extrazellulären Matrixproteins sowie die Größe des resultierenden immunpositiven Flächenanteils im Osteotomiegebiet. Das zugrunde liegende Frakturmodell setzt sich aus unterschiedlichen mechanischen Rahmenbedingungen (rigide versus semirigide) zusammen, die auf das Osteotomiegebiet wirken. Lienau *et al.* konnten zeigen, dass durch vermehrte interfragmentäre Bewegungen zwei Wochen nach der Osteotomie ein deutlicher Trend zum erniedrigten immunpositiven Flächenanteil im Vergleich zur rigiden Osteotomiefixation hervorgerufen wurde. Im vier Tage alten Frakturhämatom fanden sich noch keine Unterschiede in der Genexpression des CYR61. Der untersuchte Zeitpunkt ist vermutlich auch hierfür zu früh.

Der Einfluss von biomechanischen Rahmenbedingungen auf das Expressionsmuster des Transkriptionsfaktors HIF-1 α wurde gegenwärtig nur auf immunhistochemischer Ebene bestimmt. Pufe und seine Mitarbeiter [115] setzten Knorpelscheiben einmalig einer starken Kompression aus. Vier Tage nach der mechanischen Überbelastung führten sie eine immunhistochemische Analyse durch. Sie fanden eine erhöhte Anzahl HIF-1 α -positiver Chondrozyten im Vergleich zu den Knorpelscheiben, die keiner Kompression ausgesetzt waren. Die Ergebnisse bestätigen, dass HIF-1 α nicht nur durch Hypoxie, sondern auch durch mechanischen Stress stabilisiert wird [63]. Dennoch fanden sich im vier Tage alten

Frakturhämatom keine Unterschiede in der Genexpression bezogen auf die biomechanischen Rahmenbedingungen. Dies liegt vermutlich am betrachteten Zeitpunkt. Vier Tage nach der Osteotomie sind neben den Erythrozyten nur wenige Zellen im Hämatom zu finden (siehe Ergebnisse der histologischen Auswertung des Frakturhämatoms), vor allem nicht die der Studie von Pufe *et al.* zugrundeliegenden Chondrozyten. Ebenfalls nicht darzustellen waren Gefäße, als Reaktion auf die bestehende Hypoxie.

Neben HIF-1 α betrachteten Pufe und seine Mitarbeiter unter anderem auch die Proteinverteilung der Matrix Metalloproteinase MMP-13 in den Knorpelscheiben. Die mechanische Überbelastung führte zu einer Erhöhung der immunpositiven Chondrozyten im Vergleich zu den nicht beeinflussten Scheiben. Im vier Tage alten Frakturhämatom konnte durch erhöhte interfragmentäre Bewegungen eine erniedrigte Genexpression nachgewiesen werden. Jedoch stehen die Ergebnisse in keinem Zusammenhang. Im Rahmen der vorliegenden Studie fanden sich vier Tage nach der Osteotomie keine, der Arbeit von Pufe *et al.* zugrunde liegenden, MMP-13 exprimierenden Chondrozyten. Im Rahmen der Frakturheilung wird MMP-13 in der Phase des weichen Kallus von den hypertrophen Chondrozyten exprimiert. Zu diesem Zeitpunkt spaltet die Proteinase vor allem Kollagen-Typ II, um die knorpelige Matrix abzubauen und das Remodeling des Kallus zu initiieren. Dennoch wird die mRNA des MMP-13 in der initialen Phase der Frakturheilung, in der noch kein Knorpel im Frakturgebiet zu finden ist, synthetisiert. Hiller und seine Mitarbeiter [57] fanden heraus, dass unter anderem diese Matrix Metalloproteinase den Abbau des Fibrinogens durch einen plasminunabhängigen Fibrinolysemechanismus unterstützt und somit während inflammatorischer Reaktionen eine wichtige Rolle spielt. Auch in der vorliegenden Studie ließ sich während der inflammatorischen bzw. initialen Phase der Frakturheilung eine mRNA-Synthese des MMP-13 nachweisen. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass die Genexpression nicht nur während der Phase des weichen Kallus [115], sondern auch initial von den mechanischen Rahmenbedingungen abhängt. Generell fiel auf, dass nicht bei jedem Tier eine mRNA-Synthese aller untersuchten regulatorischen Faktoren im vier Tage alten Frakturhämatom zu finden war. Auch die Menge, die nachgewiesen werden könnte, unterschied sich. Claes und seine Mitarbeiter [25] beobachteten diese individuellen Unterschiede des Heilungsverlaufs ebenfalls in einer klinischen Studie an 100 Patienten mit Tibiaschaftfrakturen. Sie erklärten dieses Phänomen mit der Tatsache, dass der Prozess der Frakturheilung durch eine Vielzahl an Faktoren beeinflusst wird. Dazu zählen unter anderem das Alter, Grunderkrankungen, Medikamenteneinnahmen sowie Frakturlokalisierung und die Osteosynthesestabilität. Die meisten dieser Faktoren konnten in der

vorliegenden Studie durch das standardisierte Tiermodell ausgeschlossen werden. Dennoch gibt es auch bei den Versuchstieren immer noch individuelle Unterschiede, auf die kein Einfluss genommen werden kann. Lediglich eine Vergrößerung der Fallzahl würde die individuellen Unterschiede im Heilungsverlauf minimieren.

Eine Betrachtung der im Frakturhämatom untersuchten Faktoren auf Proteinebene war nicht möglich. Gegenwärtig existieren keine schafspezifischen Antikörper für diese regulatorischen Faktoren, so dass keine Aussagen über die im Frakturhämatom wirkenden Proteine bzw. deren Menge gemacht werden konnten. Zum Nachweis des Transkriptionsproduktes diente die Real-time PCR, eine amplifizierende Methode. Sie ist Mittel der Wahl, um Gene nachzuweisen, die nur von wenigen Zellen bzw. auf einem geringen Niveau exprimiert werden [10]. Obwohl dies auf die vorliegende Arbeit zutraf, weisen solche Studien einen großen Nachteil auf. Die Anwesenheit von mRNA korreliert nicht unbedingt mit der Produktion und Sekretion der entsprechenden biologisch aktiven Proteine [19]. Im Organismus vorhandene Kontrollsysteme, wie die RNasen, beeinflussen die Proteinsyntheserate, indem sie bereits synthetisierte mRNA abbauen, bevor eine Translation stattgefunden hat. Darüber hinaus werden bestimmte Proteine, wie z.B. MMPs als inaktive Vorstufen gebildet, die erst im Verlauf aktiviert und damit biologisch wirksam werden. Posttranslationale Modifikationen, wie die Ubiquitinylierung, beeinflussen ebenfalls die Proteinmenge durch den daraus resultierenden vorzeitigen Abbau. Diesem Regulationsmechanismus unterliegt beispielsweise HIF-1 α , das im Rahmen einer Studie von Komatsu und Hadjiargyrou [67] differenzierter betrachtet wurde. Das bei einer Femurschaftfraktur entstandene Hämatom bzw. der sich daraus bildende Kallus untersuchten sie mittels Real-time PCR, Western Blots und immunhistochemische Färbungen im zeitlichen Verlauf. Sowohl die HIF-1 α -mRNA als auch das Protein wiesen zehn Tage nach der Osteotomie einen Expressionspeak auf. Trotz der vielen Systeme, die die Proteinsyntheserate beeinflussen können, zeigt die Studie von Komatsu und Hadjiargyrou, dass das Expressionsniveau der mRNA mit dem des Proteins korreliert.

Um einen Vergleich zu ziehen, wurden die Expressionsmuster der im Frakturhämatom untersuchten Faktoren zusätzlich präoperativ im peripheren Blut analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Mengen im Blut größtenteils außerhalb der Nachweisgrenzen lagen. Somit war eine Normalisierung der Werte, wie beim Hämatom, nicht möglich. Das periphere Blut setzt sich aus Plasma und zellulären Bestandteilen zusammen. Diese Blutzellen werden nach Morphologie und Funktion in drei Gruppen unterteilt: Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten. Die Erythrozyten sind zahlenmäßig allen anderen Blutzellen weit überlegen. Sie

machen ca. 94% aus. Reife Erythrozyten enthalten jedoch weder einen Zellkern noch Zellorganellen, so dass sie keine mRNA synthetisieren können [78]. Die Thrombozyten besitzen ebenfalls keinen Zellkern, verfügen jedoch über geringe Mengen mRNA, die noch von ihren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, vorhanden sind [153]. Sie umfassen ca. 5,5% der zellulären Blutbestandteile. Den geringsten Anteil mit ca. 0,2% machen die Leukozyten aus. Nur diese sehr kleine Zellpopulation besitzt einen Kern und kann eigenständig mRNA synthetisieren [78]. Die Morphologie der zellulären Bestandteile erklärt die geringen, an der Nachweisgrenze liegenden mRNA-Mengen des Referenzgenes im peripheren Blut, so dass lediglich eine Betrachtung der Rohdaten erfolgen konnte.

Die untersuchten Zytokine wiesen unterschiedliche Expressionsmuster auf. Die mRNA des IL-6 fand sich in keiner der Proben, die des IL-1 und TNF- α nur in einigen wenigen. Lediglich das TGF- β_1 konnte auf mRNA-Ebene bei jedem Tier im Blut nachgewiesen werden. Auch in der Literatur finden sich Studien, die die mRNA dieser Zytokine im Blut nachgewiesen haben. Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes synthetisieren sowohl IL-1-, IL-6-, TNF- α - [149] als auch TGF- β_1 -mRNA [126]. Eine mögliche Erklärung für das fehlende bzw. geringe Vorkommen in der vorliegenden Studie könnte die Konzentration des Ausgangsmaterials sein, die im Verlauf der Diskussion noch detaillierter besprochen wird.

Ein mRNA-Nachweis für die untersuchten Wachstumsfaktoren IGF-1 und BMP-7 gelang bei keinem Tier. Die mRNA des BMP-2 und des PDGF-BB war nur vereinzelt in sehr wenigen Proben detektierbar. Hingegen zeigten BMP-4 und VEGF ein mRNA-Vorkommen in mehreren Blutproben.

Der Nachweis von Wachstumsfaktoren im peripheren Blut ist in den in der Literatur beschriebenen Studien auf die Proteinebene limitiert. Mittels ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) können im menschlichen Blut IGF-1, PDGF und VEGF [61, 140] detektiert werden. BMP-2 und BMP-4 lassen sich dagegen nicht im Serum finden [167]. Das Vorhandensein von BMP-7 wurde derzeit noch nicht untersucht.

Die mRNA der extrazellulären Matrixproteine Coll-II und OPN fand sich nicht im Blut. Lediglich die des CYR61 konnte ganz vereinzelt nachgewiesen werden. In der Literatur fehlen Angaben zum Vorhandensein von Coll II und CYR61 im peripheren Blut sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Das extrazelluläre Matrixproteine OPN dagegen wurde im Rattenmodell mittels ELISA nachgewiesen [62].

Ein mRNA-Nachweis der Matrix Metalloproteinase MMP-13 gelang in keiner der untersuchten Proben. Hingegen war die mRNA des Transkriptionsfaktors HIF-1 α in jedem Tier detektierbar.

Oda und seine Mitarbeiter [95] zeigten, dass auch im humanen Blut, genauer gesagt in Monozyten/Makrophagen HIF-1 α synthetisiert wird. Einen Nachweis der Matrix Metalloproteinase führten Mercado und seine Mitarbeiter [149] mittels Real-time PCR. Sie zeigten, dass die mRNA des MMP-13 von mononukleären Zellen des peripheren Blutes synthetisiert wird. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie, bei der in keiner Probe eine mRNA-Synthese zu finden war. Als Ausgangsmaterial dienten Mercado *et al.* jedoch ausschließlich kernhaltige zelluläre Blutbestandteile und nicht wie hier das gesamte periphere Blut, einschließlich Plasma und Erythrozyten. Somit war die nachweisbare mRNA-Konzentration pro Gramm Material generell minimiert. Dies zeigte sich an den an der Nachweisgrenze liegenden Werten der untersuchten Faktoren, einschließlich des Referenzgenes. Zusammenfassend hat sich gezeigt, dass im vier Tage alten Frakturhämatom eine Expression aller untersuchten Gene dokumentiert werden konnte. Der Einfluss biomechanischer Rahmenbedingungen auf die mRNA-Synthese ist zu diesem Zeitpunkt jedoch überwiegend noch nicht bzw. nicht mehr sichtbar. Im Vergleich beider Fixateursysteme ließ sich lediglich bezüglich MMP-13 und IL-6 eine signifikant geringere mRNA-Synthese, bezüglich BMP-4 ein Trend zu einer geringeren Expression in der Gruppe mit kritischer Fixateurversorgung nachweisen. Die Analysen des präoperativ gewonnenen peripheren Blutes zeigten im Wesentlichen mRNA-Werte außerhalb der Nachweisgrenzen.

Die gewonnenen Ergebnisse weisen eine klinische Relevanz auf. Durch die im klinischen Alltag häufig stattfindende Hämatomausräumung wird Gewebe mit hohem biologischem Potential entfernt. Die Beseitigung des Frakturhämatoms, in dem bereits zu diesem frühen Zeitpunkt viele knochenheilungsrelevante Faktoren unterschiedlichster Funktion exprimiert werden, kann nicht ohne Einfluss auf den Heilungsverlauf bleiben. Jedoch stellt der untersuchte Zeitpunkt nur eine Momentaufnahme in diesem Verlauf dar. So sind weitere Studien notwendig, um den Einfluss biomechanischer Rahmenbedingungen auf die Genexpression über den gesamten Heilungsverlauf beobachten zu können und um weitere Faktoren zu untersuchen bzw. aufzudecken, die an diesem komplexen und multifaktoriellen Prozess beteiligt sind.

5.2.2 Histologie

5.2.2.1 Frakturhämatom

Das vier Tage alte Frakturhämatom zeigte in beiden Fixateurgruppen eine sehr ähnliche Morphologie. Erythrozytenkomplexe, die teilweise durch Fibrinnetze aufgelockert wurden, prägten das histologische Bild. Neben den Entzündungszellen fanden sich ganz vereinzelt Areale

im Hämatom, die von Zellen infiltriert waren, die die Entzündungszellen in ihrer Größe übertrafen, jedoch eine erniedrigte Kern-Zytoplasma-Relation aufwiesen. Bei diesen Arealen handelt es sich vermutlich um die ersten Anzeichen der Granulationsgewebsbildung mit Auftreten von Fibroblasten und Vorläuferzellen. Der fehlende Nachweis von α -SMA-, Coll II- und CTR-positiven Zellen im Hämatom bekräftigt die Vermutung, dass die Hämatomorganisation zu diesem Zeitpunkt noch nicht weit fortgeschritten ist.

5.2.2.2 2-Wochenzeitpunkt

Die biomechanischen Rahmenbedingungen spielen eine wichtige Rolle im Verlauf der Frakturheilung. Besonders die initial auf das Frakturgebiet wirkenden interfragmentären Bewegungen beeinflussen das Langzeitergebnis der Heilung [65, 130].

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass nach vorausgegangener Hämatomentfernung zwei Wochen post Osteotomie histologisch keine signifikanten Unterschiede zwischen dem rigiden und dem kritischen System nachweisbar waren. Lediglich die Gesamtkallusfläche war nach der Versorgung mit dem kritischen Fixateur externe tendenziell größer. Dennoch führten beide Fixateure zu einer ähnlichen Gewebeverteilung im Kallus mit ca. 99% Bindegewebe und nur 1% mineralisiertem Knochen. Vergleiche mit der Vorgängerstudie von Schell *et al.* [130], in der das identischen rigiden Fixateursystem zur Anwendung kam, das auch in der vorliegenden Studie genutzt wurde, zeigten, dass die Hämatomentnahme vier Tage nach der Osteotomie den Heilungsverlauf stark negativ beeinflusste. Der Kallus der Tiere, die keine Manipulation am Hämatom erfahren hatten, bestand aus ca. 45% Bindegewebe, ca. 45% mineralisiertem Knochen und ca. 10% Knorpel [130]. Eine mögliche Verzögerung der Heilung durch erhöhte interfragmentäre Bewegungen blieb demnach verborgen.

Im Gegensatz zu den bereits erwähnten Studien, die in der initial wirkenden interfragmentären Bewegung eine Beeinflussung der Langzeitergebnisse der Heilung sehen, wies McKibbin [84] 1978 in seiner Beschreibung über die Biologie der Frakturheilung darauf hin, dass die primäre Kallusantwort im Wesentlichen unabhängig von den biomechanischen Rahmenbedingungen sei. Vielmehr würde diese Antwort von dem biologischen Potential des Frakturhämatoms vorangetrieben werden. Auch Mark und seine Mitarbeiter [80] konnten 2004 in einer Studie an der Ratte zeigen, dass die Rigidität in der frühen Heilungsphase keinen Einfluss auf die Knochenformation besitzt. Die unterschiedliche axiale Steifigkeit *in vivo* wurde durch die Variation der Osteotomiespaltbreite bei identischen Fixateursystemen geschaffen. Histologisch fanden sich keine Unterschiede während der frühen Frakturheilungsphase. Mark *et al.*

vermuteten daher, dass die Knochenformation initial von der Art des Traumas und den daraus resultierenden Modulationsprozessen, sowie von der Differenzierung der Osteoprogenitorzellen aufgrund biologischer Signale abhängt und nicht von der Rigidität der Fraktur.

Im Gegensatz dazu konnten Claes und seine Mitarbeiter [27] in einer Studie am Schaf zeigen, dass erhöhte interfragmentäre Bewegungen zwar die Kallusformation stimulieren, nicht aber die Gewebequalität. Sie führten Osteotomien durch, die mit einem speziellen Ringfixateur versorgt wurden. Dieser ließ kontrollierte interfragmentäre Bewegungen zu. Die Tiere erhielten abhängig von ihrer Gruppeneinteilung drei unterschiedliche Osteotomiespaltbreiten. Darauf wirkten entweder große oder kleine interfragmentäre Bewegungen. So entstanden sechs Gruppen, die nach neunwöchiger Standzeit radiologisch und histologisch ausgewertet wurden. Claes *et al.* sahen eine größere Kallusformation hervorgerufen durch erhöhte interfragmentäre Bewegungen. Jedoch wurde die Gewebequalität nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse konnten auch in der vorliegenden Studie gesehen werden. Tiere, die mit dem kritischen Fixateur externe versorgt wurden, wiesen zum 2-Wochenzeitpunkt tendenziell eine größere Kallusmenge auf. Die prozentuale Zusammensetzung unterschied sich jedoch nicht vom Kallus der rigiden Fixateurgruppe, wobei dies eindeutig auf die Hämatomentfernung zurückzuführen ist.

Das Gewebe, das 14 Tage nach der Osteotomie den geringsten Anteil im Kallus ausmachte, war das Knorpelgewebe. Diese flächenmäßig kleinen Areale fanden sich, wenn überhaupt vorhanden, periostal auf Höhe des Osteotomiespaltes. Palmar und seine Mitarbeiter [102] sehen den Entstehungsort des Knorpels im Kalluszentrum, zwischen den Fragmentenden. Dort sei die Blutversorgung und demnach auch die Sauerstoffspannung limitiert. In der Hypoxie sehen auch Probst und Spiegel [113] ein geeignetes Milieu für die Entstehung von Knorpelgewebe. In der vorliegenden Studie fanden sich die ersten Knorpelzellen bezogen auf die Longitudinalachse zwar im Kalluszentrum, jedoch nicht zwischen den Fragmentenden, sondern periostal. Scammall und Roach [129] untersuchten am Kaninchen den Kallus, der sich vier Wochen nach der Osteotomie bildete. Aufgrund ihrer Beobachtungen gehen sie davon aus, dass sich Knorpel auch in gut vaskularisierten Gebieten entwickeln kann.

Abweichend von dem ansonsten einheitlichen geringen Knorpelvorkommen konnten bei einem Tier mit rigider Fixateurversorgung vermehrt Knorpelzellen nachgewiesen werden. Bei genauer Betrachtung der histologischen Schnitte fiel ein längs abgesprengtes Kortikalisfragment, verursacht durch das Setzen der Osteotomie, auf. Die vermehrte Knorpelbildung in diesem Kallus ließe sich damit erklären, dass durch das Fragment selbst Umbauvorgänge initiiert

wurden. Die dadurch verstärkte Rekrutierung von Vorläuferzellen und Mediatoren aus dem Blut könnte die Phase des weichen Kallus der Frakturheilung schneller einleiten.

Grundsätzlich wird in der Literatur kontrovers über den Einfluss interfragmentärer Scherbewegungen auf die Frakturheilung diskutiert. Schon 1955 postulierten Yamagishi und Yoshimura [162], dass sich Scherbewegungen nachteilig auf die Knochenheilung auswirken. Sie versorgten transversale Osteotomien am Kaninchen mit unterschiedlich rigiden Fixateuren. Die Auswertung der radiologischen und histologischen Ergebnisse bestätigte, dass Scherbewegungen eine verzögerte Frakturheilung hervorrufen bzw. die Bildung einer Pseudarthrose unterstützen können. Aufgrund fehlender standardisierter Methoden ist die Studie von Yamagishi und Yoshimura jedoch kritisch zu beurteilen. Dennoch wurden ihre Ergebnisse durch eine Arbeit von Augat und seinen Mitarbeitern [3] bestätigt. Augat *et al.* versorgten am Schaf gesetzte Tibiaosteotomien unter anderem mit einem Fixateur externe, der eine maximale Scherbewegung mit einer Amplitude von 1,5 mm erlaubte. Nach einer Standzeit von acht Wochen erfolgte die radiologische, biomechanische und histologische Auswertung. Als Vergleich diente eine Fixateurgruppe, die eine axiale Beweglichkeit mit einer Amplitude von 1,5 mm aufwies. Bezugnehmend auf die Vergleichsgruppe zeigten Augat *et al.*, dass interfragmentäre Scherbewegungen die Heilung verzögerten. Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Park und seinen Mitarbeitern [105], die den Einfluss von Scherbewegungen auf die Frakturheilung am Kaninchenmodell untersuchten. Die Tiere wurden in vier Gruppen eingeteilt. Nach der Osteotomie erfolgte eine externe Fixation. Die Gruppen unterschieden sich in der auf den Osteotomiespalt wirkenden Biomechanik. Der Kallus, auf den interfragmentäre Scherbewegungen wirkten, wies das größte Volumen auf. Es erfolgten auch histologische Färbungen des Kallusgewebes. Eine histomorphometrische Betrachtung der Kalluszusammensetzung blieb jedoch aus. Zusätzlich konnten Park *et al.* durch Torsionstestungen zeigen, dass das Osteotomiegebiet zum 2-Wochenzeitpunkt verglichen mit den anderen Gruppen instabiler war. Trotz dieser anfänglich schlechten biomechanischen Ergebnisse zeigte der gleiche Kallus vier Wochen nach der Osteotomie die besten biomechanischen Testergebnisse und damit die größte Stabilität. Park und seine Mitarbeiter sehen somit in der interfragmentären Scherbewegung einen die Frakturheilung unterstützenden Faktor. Auch in der vorliegenden Studie haben größere interfragmentäre Bewegungen zum 2-Wochenzeitpunkt tendenziell ein größeres Kallusvolumen hervorgerufen, wobei bei der initialen Scherbewegung von 9,5 mm nicht von einem stimulierenden Effekt auszugehen ist. Bereits initiale (3 Tage post OP) Bewegungen von 0,8 mm führten in der Studie von Schell und Mitarbeitern [130] zu schlechten Heilungsergebnissen. Sie verglichen die Kallusformation im zeitlichen Verlauf unter rigider und

semirigider Fixation. In dieser Vorgängerstudie am Schaf wurde der Frakturkallus einer Tibiaschaftfraktur in der zweiten, dritten, sechsten und neunten Woche postoperativ unter anderem histologisch ausgewertet. Zum 2-Wochenzeitpunkt fanden sich weder in der Kallusfläche noch in dessen Zusammensetzung signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Diese zeigten sich erst im Verlauf der Frakturheilung und manifestierte sich in reduzierter Kallusstabilität und -steifigkeit.

Doch nicht nur die biomechanischen Rahmenbedingungen, sondern auch eine Hämatomausräumung vier Tage nach der Fraktur wirkt sich auf das Kallusgewebe aus. Verglichen mit der Vorgängerstudie von Schell *et al.* [130], wies das Regeneratgewebe zwei Wochen nach der Osteotomie eine andere Zusammensetzung auf. Der Kallus der Tiere, die von Schell *et al.* mit dem rigiden Fixateur externe versorgt wurden, der auch in der vorliegenden Studie zur Anwendung kam, bestand aus ca. 45% Bindegewebe, ca. 45% mineralisiertem Knochen und ca. 10% Knorpel. Die Hämatomentnahme vier Tage nach der Osteotomie brachte ein Regeneratgewebe hervor, das zum 2-Wochenzeitpunkt aus ca. 99% Bindegewebe und ca. 1% mineralisiertem Knochen bestand. Knorpelzellen konnten nur vereinzelt nachgewiesen werden. Somit scheint eine Hämatomausräumung vier Tage nach der Fraktur die Kallusformation zu verzögern.

Schon 1905 stellte Bier [8] fest, dass das Frakturhämatom das „natürliche Verhältnis“ für eine Frakturheilung darstellt. Auch Cruess und Dumont [28] sprachen dem Hämatom eine wichtige Rolle zu. Sie sahen darin ein Gerüst, das die Fragmentenden untereinander verbindet. Brighton [14] dagegen postulierte, dass es sich beim Frakturhämatom lediglich um einen Abstandshalter zwischen den Fragmentenden handele.

1990 betrachteten Mizuno und seine Mitarbeiter [89] das Frakturhämatom zu unterschiedlichen Zeitpunkten. In einer Studie am Rattenmodell implantierten sie Frakturhämatome zwei bzw. vier Tage nach einer Femurschaftfraktur unter anderem in den Glutealmuskel des entsprechenden Tieres. Als Kontrolle dienten Blutgerinnsel aus peripherem Blut, die ebenfalls implantiert wurden. Eine radiologische und histologische Auswertung erfolgte von der ersten bis zur vierten Woche nach der Implantation. Das vier Tage alte Frakturhämatom zeigte eine intramuskuläre Knochenformation, die weder bei der Kontrollgruppe, noch bei dem zwei Tage alten Hämatom gesehen wurde. Daraus schlossen Mizuno *et al.*, dass das Frakturhämatom vier Tage nach dem Frakturgeschehen osteogenes Potential aufweist. Zwei Tage nach der Fraktur sei dieses Potential noch nicht vorhanden.

Auch Grundnes und Reikeras [51] untersuchten die Relevanz des Frakturhämatoms zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf die Heilung. In ihrer Studie an der Ratte entfernten sie nach 30 Minuten, zwei bzw. vier Tagen das entstandene Hämatom einer herbeigeführten Femurschaftfraktur. Vier Wochen nach der Osteotomie folgten die radiologischen und mechanischen Auswertungen des Regeneratgewebes. Die Ausräumung des frühen Frakturhämatoms, das noch keine Organisation zeigte, führte zu einer schnellen Reproduktion des Hämatoms. Dieses besaß ein leicht eingeschränktes osteogenes Potential. Das zwei bzw. vier Tage alte Frakturhämatom dagegen wies Anfänge von Organisation auf. Eine Ausräumung zu diesen Zeitpunkten bedeutete die Entfernung des osteogenen Stimulus und damit die Verlängerung der Frakturheilung.

Park und Mitarbeiter [106] untersuchten ebenfalls die Auswirkungen einer Hämatomentfernung auf das Ergebnis der Frakturheilung. Ihr Hauptaugenmerk legten sie in ihrer Studie am Kaninchen auf die wiederholte Ausräumung. Als Grundlage dienten Tibiaosteotomien, die mit einem externen Fixateur versorgt wurden. Die Tiere wurden in vier Gruppen aufgeteilt. Der Kontrollgruppe entfernten sie nur im Rahmen der OP das frisch eingeblutete Hämatom. In den anderen Gruppen folgten zusätzliche Ausräumungen am dritten bzw. vierten Tag. Einigen Tiere wurde das Hämatom während der OP, am ersten und zweiten Tag nach der Osteotomie entfernt. Wöchentlich erfolgten Auswertungen der Röntgen- und Computertomographie-Kontrollen. Diese ergaben, dass je häufiger und je später das Frakturhämatom entfernt wurde, desto häufiger kam es zum Ausbleiben einer kallösen Brückenbildung zwischen den Fragmentenden. Zusätzlich reduzierte sich auch der Anteil mineralisierten Gewebes im Kallus. Park *et al.* demonstrierten mit dieser Studie, dass wiederholte Ausräumungen des Frakturhämatoms abhängig vom Zeitpunkt den Heilungsverlauf verzögern bzw. verhindern.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass biomechanische Rahmenbedingungen einen Einfluss auf die Frakturheilung besitzen. Kritische Fixateursysteme führen tendenziell zu einer erhöhten Kallusproduktion. Die Zusammensetzung des Regeneratgewebes weist jedoch zwei Wochen nach der Fraktur keine Unterschiede zum rigiden System auf. Ob sich das im Verlauf der Heilung ändert, muss in weiteren Studien geklärt werden. Eine vorangegangene Hämatomentfernung scheint die Gewebeszusammensetzung allerdings stark zu beeinflussen. Statt Bindegewebe und mineralisierter Kallussubstanz zu gleichen Teilen überwiegt der bindegewebige Anteil. Klinisch bedeuten diese Ergebnisse, dass besonders die Entfernung des Hämatoms, die zum klinischen Alltag gehört, eine kritische Rolle in der Kallusentwicklung

einnimmt. So sind weitere Studien notwendig, um die Folgen dieser Hämatomausräumung im weiteren Heilungsverlauf zu untersuchen.

5.2.3 Immunhistochemie

5.2.3.1 Osteoklasten

Bei der Frakturheilung spielen neben den dem Knochenaufbau dienenden Osteoblasten auch die Osteoklasten eine wichtige Rolle. Schon während der frühen Entzündungsphase sind diese Zellen im Frakturgebiet nachweisbar. Die Osteoklasten resorbieren zu diesem Zeitpunkt das durch die Fraktur entstandene nekrotische Knochengewebe [109].

Es konnte gezeigt werden, dass zwei Wochen nach der Osteotomie mit zusätzlicher Hämatomentfernung verglichen mit dem rigiden System ein Trend zur erhöhten Osteoklastendichte nach kritischer Fixateurversorgung zu finden war.

In der Literatur lassen sich zahlreiche Artikel über die Funktion der Osteoklasten und deren Wechselwirkungen mit anderen Zellen, wie Osteoblasten, finden. Jedoch ist wenig über deren Anzahl und Lokalisation während der Frakturheilung bekannt. Ebenso fehlen Erkenntnisse über die Abhängigkeit der Osteoklastendichte von den biomechanischen Eigenschaften der Osteosynthese.

Aro und seine Mitarbeiter [2] veröffentlichten 1990 eine Untersuchung zur Osteoklasten-Population während der Frakturheilung in einem Rattenmodell. Die höchste Osteoklastendichte wurde zwei Wochen nach der Osteotomie mit anschließender Abnahme über den Heilungsverlauf dokumentiert. Die Studie von Aro *et al.* unterschied sich jedoch nicht nur im Tiermodell von der vorliegenden Studie. Als Osteosynthesematerial diente ein intramedullärer Nagel und für die Quantifizierung der Osteoklastendichte wurde der Empfehlung der ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research) von 1987 (Anzahl an Osteoklasten/mm Oberfläche) Folge geleistet. Diese Methode erlaubt aber nicht den Vergleich zwischen kortikalem Knochen und den mineralisierten Knochentrabekeln im Kallus, weil die Oberfläche des mineralisierten Gewebes, bestehend aus Kortikalis und den davon ausgehenden Trabekeln, nur in seiner Gesamtheit betrachtet werden kann. Daher basierte die Quantifizierung der Dichte in der vorliegenden Studie auf der etablierten Methode von Schell und Mitarbeitern [131], die die Anzahl der Osteoklasten auf die jeweilige Knochenfläche bezogen. Schell *et al.* konnten am Schafmodell ebenfalls zeigen, dass Osteoklasten schon während der frühen Phase der Frakturheilung eine wichtige Rolle spielen. Diese Vorgängerstudie quantifizierte das Osteoklastenaufkommen im zeitlichen Verlauf der Frakturheilung nach Versorgung mit dem

rigiden Fixateur externe, der auch in dieser Studie Verwendung fand. Als methodischer Unterschied ist die bildliche Darstellung der Zellen zu nennen. Während Schell und ihre Mitarbeiter die Osteoklasten mit Hilfe der TRAP- (Tartrat resistant acid phosphatase) Färbung nachwiesen, wurden diese Zellen in der vorliegenden Studie durch eine immunhistochemische Anfärbung ihrer Calzitoninrezeptoren [112] dargestellt. Schell *et al.* fanden unter dieser rigiden Fixateurversorgung zwei Wochen nach der Osteotomie periostal ca. 1 Osteoklasten pro mm^2 Knochen und endostal eine Dichte, die gegen Null tendierte. Unter rigider Fixateurversorgung zeigten sich in der vorliegenden Studie sowohl periostal als auch endostal Osteoklastendichten von ca. 10 Zellen pro mm^2 Knochen. Die durchgeführte Hämatomentnahme lässt somit im Vergleich zur Frakturheilung ohne Ausräumung einen Trend zur erhöhten Zelldichte erkennen. Dies könnte mit der durch die Hämatomentfernung bedingten erneuten Einblutung in das Frakturgebiet erklärt werden. Durch das Blut gelangen nicht nur Erythrozyten, sondern auch Vorläuferzellen zwischen die Fragmentenden, so dass zusätzliche Monozyten/Makrophagen für die Osteoklastengnese zur Verfügung stehen und die Dichte der Osteoklasten im Vergleich zur nicht manipulierten Frakturheilung ansteigt. Eine weitere Erklärung wäre, dass durch die Hämatomausräumung entsprechende Zellen und Proteine fehlen, die die initiale Osteoklastengnese zum Abbau des nekrotischen Knochenmaterials wieder unterdrücken. Auch eine Kombination aus beidem wäre möglich, um das initial durch die Hämatomentfernung hervorgerufene gesteigerte Osteoklastenaufkommen zu begründen.

Unabhängig von der Frakturheilung untersuchten Terai und seine Mitarbeiter [144] den Einfluss der Biomechanik auf die Osteoklastenzahl. In einem Zahn-Modell an der Ratte betrachteten sie die Anzahl der Osteoklasten im interradikulären Septum der Wurzel des ersten Molaren. Mechanischer Stress in Form von elastischen Bändern führte nach vorangegangener erhöhter OPN-Expression zu einer gesteigerten Anzahl an Osteoklasten. Auch während der Frakturheilung beeinflussen biomechanische Rahmenbedingungen die Osteoklastendichte. Mayer und seine Mitarbeiter [82] verglichen 1983 am Schafmodell drei unterschiedliche Fixationssysteme. Die Osteotomie wurde intraoperativ unter Kompression gesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass je stärker die Knochenfragmente gegeneinander verschieblich waren, desto größer war auch die Osteoklastenaktivität im Osteotomiegebiet. In der vorliegenden Studie ist die Anzahl der Osteoklasten unter vergrößerten interfragmentären Bewegungen ebenfalls erhöht. Zusammenfassend zeigte die Betrachtung der Osteoklasten, dass diese Zellen schon zwei Wochen nach der Osteotomie im Frakturgebiet zu finden waren. Darüber hinaus beeinflussen die biomechanischen Rahmenbedingungen ihre Dichte. Erhöhte interfragmentäre Bewegungen im

Osteotomiegebiet führten zu einer erhöhten Anzahl an Osteoklasten verglichen mit dem rigiden Fixateursystem. Die Hämatomentnahme schien im Vergleich mit der Vorgängerstudie [131] die Osteoklastendichte zusätzlich zu erhöhen. Dies könnte mit der erneuten Einblutung und der damit verbundenen Steigerung der Vorläuferzellen im Frakturgebiet erklärt werden. Darüber hinaus wäre eine Mitentfernung entsprechender Zellen und Proteine, die die initiale Osteoklastengnese zum Abbau des nekrotischen Knochenmaterials unterdrücken, eine mögliche Begründung. Auch die Kombination aus beidem wäre möglich, um die initial durch die Hämatomentfernung hervorgerufene gesteigerte Osteoklastendichte zu deuten.

Vom klinischen Standpunkt aus zeigen die Ergebnisse, dass die mechanische Stabilität der Osteosynthese und die Hämatomentfernung einen entscheidenden Einfluss auf das Osteoklastenaufkommen im Frakturgebiet besitzen. Dennoch sind weitere Studien notwendig, um die Auswirkungen der im klinischen Alltag immer wieder auftretenden Hämatomausräumung auf die Osteoklastendichte insbesondere im weiteren zeitlichen Heilungsverlauf zu untersuchen.

5.2.3.2 Vaskularisierung

Im Verlauf der Frakturheilung spielt die Vaskularisierung eine wesentliche Rolle. Die durch Angiogenese entstehenden Gefäße dienen zum einen der Neubildung eines Kapillar- und Gefäßnetzwerkes, das für die Wiederherstellung der Knochenstruktur erforderlich ist und zum anderen dem Abtransport nekrotischen Gewebes aus dem Frakturgebiet [98].

Es konnte gezeigt werden, dass biochemische Rahmenbedingungen zwei Wochen nach der Osteotomie auf die initiale Vaskularisierung Einfluss nehmen. Das durch kritische Fixateurversorgung entstandene Regeneratgewebe wies periostal eine signifikant erniedrigte Gefäßdichte im Vergleich zum rigiden System auf. Auch Wallace und seine Mitarbeiter [150] konnten nachweisen, dass die initiale Vaskularisierung des Kallusgewebes sehr empfindlich gegenüber mechanischen Rahmenbedingungen ist. Sie quantifizierten den cortico-medullären Blutfluss im tibialen Osteotomiegebiet zwei und sechs Wochen nach der Operation. Die Osteosynthese erfolgte mittels externen Fixateuren, die sich in ihrer axialen Steifigkeit unterschieden. Im Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie zeigten Wallace *et al.*, dass größere interfragmentäre Bewegungen in der frühen Heilungsphase eine vierfach erhöhte cortico-medulläre Blutversorgung zur Folge hatten. Die unterschiedlichen Ergebnisse basieren vermutlich neben den differenten biomechanischen Bedingungen auch auf weiteren Abweichungen im Studiendesign. So haben Wallace und seine Mitarbeiter den Blutfluss jeweils 10 mm proximal und distal des Osteotomiespaltes gemessen, wohingegen in dieser Studie eine

Region of Interest von insgesamt 12 mm zu Grunde lag. Darüber hinaus besteht keine strenge Korrelation zwischen dem Blutfluss und der eigentlichen Gefäßdichte. Wallace *et al.* konnten somit nicht ermitteln, ob der gemessene cortico-medulläre Blutfluss lediglich die Konsequenz einer erhöhten Perfusion schon bestehender Gefäße war oder doch die Auswirkungen von Angiogenese im Osteotomiegebiet darstellte. Auch eine Kombination aus beidem könnte in Betracht gezogen werden.

Lienau *et al.* [75] konnten ebenfalls zeigen, dass die initiale Vaskularisierung von der Stabilität der Osteosynthese beeinflusst wird. Diese Vorgängerstudie basierte auf einem identischen Versuchsaufbau mit der Ausnahme, dass der verwendete semirigide Fixateur externe sieben Tage post OP Scherbewegungen von nur 1 mm zuließ. Der in dieser Studie montierte kritische Fixateur wies im Vergleich dazu fast zehnfach vergrößerte Scherbewegungen von 9,5 mm auf. Im Gegensatz zu Wallace *et al.*, jedoch in Übereinstimmung mit der vorliegenden Studie zeigten Lienau und ihre Mitarbeiter eine durch vergrößerte interfragmentäre Bewegung hervorgerufene reduzierte initiale Vaskularisierung des Kallusgewebes. Es fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zum 2-Wochenzeitpunkt. Eine differenzierte Betrachtung der initialen Vaskularisierung des Kallusgewebes veröffentlichten Lienau und ihre Mitarbeiter [76] 2006. Basierend auf den Ergebnissen der Vorgängerstudie [75] betrachteten sie unter anderem die Gefäßdichte im Frakturspalt. Zum 2-Wochenzeitpunkt ließen sich im Spalt signifikant weniger Gefäße bezogen auf die entsprechende Bindegewebsfläche nach semirigider im Vergleich zur rigiden Fixation nachweisen.

Darüber hinaus fanden Lienau *et al.* [75], unabhängig vom Fixateursystem, eine höhere Dichte an kleinen Blutgefäßen im periostalen im Vergleich zum endostalen Regeneratgewebe. Dies konnte in der vorliegenden Studie nur teilweise bestätigt werden. Lediglich nach kritischer Fixateurversorgung zeigte sich ein Trend zur erhöhten Anzahl kleiner Gefäße jedoch im endostalen und nicht im periostalen Kallusgebiet. Generell lässt sich aber festhalten, dass im rigiden System eine signifikant erhöhte Anzahl an kleinen im Vergleich zu den großen Gefäßen nachzuweisen war. Bei der kritischen Fixateurversorgung stellte sich dieser signifikante Unterschied nur als Trend dar, was damit zusammenhängen könnte, dass zum 2-Wochenzeitpunkt die generelle Gefäßdichte in diesem System geringer war. Eine bei der Angiogenese stattfindende Bildung großer Blutgefäße durch Fusion von Kapillaren [123] zeigt bei reduzierter Gefäßzahl nur tendenzielle und keine signifikanten Auswirkungen.

Auch Claes *et al.* [24] beschäftigten sich mit der Vaskularisierung in Abhängigkeit von den biomechanischen Rahmenbedingungen. Das Hauptaugenmerk lag jedoch auf einem späteren

Zeitpunkt im Heilungsverlauf. Sie quantifizierten den Effekt unterschiedlicher axialer Bewegungen auf die Vaskularisierung in einem Metatarsal-Modell am Schaf. Claes und seine Mitarbeiter fanden heraus, dass eine vermehrte axiale Bewegung zu einem signifikanten Unterschied in der Verteilung zwischen kleinen und großen Gefäßen zugunsten der kleinen führte. Diese Ergebnisse, die zum 9-Wochenzeitpunkt gewonnen wurden, konnten auch in der vorliegenden Studie für den 2-Wochenzeitpunkt bestätigt werden. Dennoch wiesen beide Studien unabhängig von den betrachteten Zeitpunkten ein unterschiedliches Studiendesign im Hinblick auf die biomechanischen Rahmenbedingungen und die definierte Region of Interest auf. Claes *et al.* betrachteten lediglich Teile des Osteotomiespaltes, wohingegen in dieser Studie fast die gesamte Kallusfläche innerhalb der ROI lag.

Zusätzlich zu den biomechanischen Rahmenbedingungen scheint sich auch die vorangegangene Hämatomentfernung auf die Gefäßdichte im Osteotomiegebiet auszuwirken. Street und seine Mitarbeiter [139] konnten nachweisen, dass das Frakturhämatom ein angiogenes Potential aufweist. Durch subkutane Implantation des Blutgerinnsels in ein Wundmodell der Maus fand sich nach einer Woche eine signifikant erhöhte Gefäßdichte gegenüber der Kontrolle. Verglichen mit der Vorgängerstudie von Lienau *et al.* [75], die die Vaskularisierung des Kallus in zwei unterschiedlich steifen Fixateurgruppen betrachtete, lässt sich generell vermuten, dass die Hämatomentnahme die Gefäßdichte beeinflusst. Es scheint, dass das Regeneratgewebe nach der vorangegangenen Hämatomausräumung eine erhöhte Anzahl kleiner Blutgefäße aufweist als ohne Entfernung. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Resultaten von Street *et al.* [139]. Jedoch lässt sich bezogen auf die Vorgängerstudie [75] eine stark reduzierte Anzahl an großen Gefäßen pro mm² Bindegewebsfläche vermuten. Trotz der methodisch unterschiedlichen Quantifizierung der Gefäße zeigt der Vergleich, dass die Neovaskularisierung und die Fusion kleiner Gefäße zu größeren nach einer Hämatomausräumung noch nicht so weit fortgeschritten ist wie ohne Manipulation. Diese fusionierten Gefäße stellen die Blutversorgung der ausheilenden Fraktur sicher. Somit bestätigt die vorliegende Studie indirekt, dass das Frakturhämatom wichtig für die schnelle Vaskularisierung des Frakturgebietes und damit auch für den Heilungsverlauf von besonderer Bedeutung ist.

Die Auswertung der Vaskularisierung der vorliegenden Studie weist jedoch auch Einschränkungen auf, die zu berücksichtigen sind. Zum einen wurden zur immunhistochemischen Darstellung der Gefäße keine endothelzell-spezifischen Marker gewählt, sondern es erfolgte eine Färbung von alpha-smooth muscle actin, welches von glatten Muskelzellen sowie Perizyten exprimiert wird. Daraus ergibt sich, dass sich neu bildende

Kapillaren, die anfangs ausschließlich aus Endothelzellen bestehen [55], nicht erfasst werden konnten. Es lässt sich festhalten, dass die Anzahl der in dieser Studie dargestellten Gefäße kleiner sein muss, als eigentlich im Kallusgewebe enthalten ist. Eine exakte mikroskopische Überprüfung des Regeneratgewebes zeigte jedoch, dass nur ein marginaler Prozentsatz nicht anfärbbarer Gefäße nachzuweisen war. Eine Beeinflussung der signifikanten Unterschiede ist demnach auszuschließen.

Zum anderen kann keine wahre Beziehung zwischen der Stabilität der Osteosynthese und der davon abhängigen Vaskularisierung hergestellt werden, da lediglich zwei unterschiedliche biomechanische Voraussetzungen untersucht wurden.

Zusätzlich konnten aus technischen Gründen keine standardisierten Bedingungen für die Hämatomentfernung geschaffen werden, so dass mögliche Einflüsse von Hämatomrückständen im Osteotomiegebiet auf die Vaskularisierung nicht ausgeschlossen werden können.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die biomechanischen Rahmenbedingungen, geschaffen durch unterschiedlich steife Fixateursysteme, die initiale Vaskularisierung des Kallusgewebes beeinflussen. Große interfragmentäre Scherbewegungen waren mit einer reduzierten initialen Gefäßdichte assoziiert. Eine vorangegangene Hämatomentfernung scheint die Anzahl der großen Blutgefäße im Osteotomiegebiet drastisch zu minimieren und ebenfalls einen Einfluss auf die Blutversorgung des Kallusgewebes zu nehmen.

Vom klinischen Standpunkt aus bedeuten die Ergebnisse, dass die mechanische Stabilität der Osteosynthesen und die Hämatomausträumung eine kritische Rolle bei der Vaskularisierung des Frakturgebietes einnehmen. Dennoch zeigte das biologische Potential des vier Tage alten Frakturhämatoms keine Unterschiede in den Expressionsmustern der in der vorliegenden Studie untersuchten angiogenen Faktoren zwischen den Fixateurgruppen. Der untersuchte Zeitpunkt stellt jedoch nur eine Momentaufnahme im Verlauf der Heilung dar. So sind weitere Studien notwendig, um die Rolle der Stabilität in Bezug auf die Regulation der Angiogenese während der Frakturheilung zu ermitteln und um die Folgen der im klinischen Alltag immer wieder stattfindenden Hämatomausträumung genauer zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Die Frakturheilung ist ein komplexer und multifaktorieller Vorgang, der durch das Zusammenspiel unterschiedlicher Zellsysteme und Signalkaskaden gesteuert wird. Biomechanische Rahmenbedingungen, wie interfragmentäre Bewegungen, und Manipulationen, wie die im klinischen Alltag häufig stattfindende Hämatomausräumung, nehmen Einfluss auf diesen Heilungsprozess. Um die Folgen unterschiedlicher interfragmentärer Bewegungen auf die Genexpression im Frakturhämatom und den daraus resultierenden Heilungsverlauf, sowie die Auswirkungen der Hämatomentfernung zu untersuchen, wurde eine standardisierte Osteotomie am Schafmodell durchgeführt. Die Versorgung erfolgte mittels zweier identisch montierter externer Fixateure, die unterschiedlich große interfragmentäre Bewegungen (rigide versus kritisch) zuließen. Vier Tage nach der Osteotomie wurde das im Spalt befindliche Frakturhämatom entfernt und molekularbiologisch auf die Expression folgender heilungsrelevanter Faktoren untersucht: Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2), BMP-4, BMP-7, Cysteine-rich Protein 61 (CYR61), Hypoxia-inducible Factor-1 α (HIF-1 α), Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), Interleukin-1 (IL-1), IL-6, Kollagen-Typ II (Coll II), Matrix Metalloproteinase-13 (MMP-13), Osteopontin (OPN), Platelet Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB), Transforming Growth Factor- β_1 (TGF- β_1), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) und Vascular Endothelial Growth Factor-A₁₆₄ (VEGF-A₁₆₄). Zusätzlich erfolgte eine histologische und immunhistochemische Aufarbeitung des Hämatomgewebes. Zehn Tage nach der Hämatomentfernung und somit zwei Wochen post operationem, wurden histologische, histomorphometrische und immunhistochemische Untersuchungen des Osteotomiegebietes durchgeführt.

Im vier Tage alten Frakturhämatom konnte eine Expression aller untersuchten Faktoren dokumentiert werden. Der Vergleich beider Fixateursysteme zeigte lediglich bezüglich MMP-13 und IL-6 eine signifikant geringere mRNA-Synthese, bezüglich BMP-4 einen Trend zu einer geringeren Expression in der Gruppe mit kritischer Fixateurversorgung (erhöhte interfragmentäre Bewegungen). Histologisch fanden sich im Hämatomgewebe unabhängig von der Osteosynthesestabilität Erythrozytenkomplexe, die teilweise von Fibrinnetzen und inhomogen verteilten Entzündungszellen durchsetzt waren. Zusätzlich wurde das Hämatom vereinzelt von Zellen infiltriert, die in ihrer Größe die Entzündungszellen übertrafen und eine erniedrigte Kern-Zytoplasma-Relation aufwiesen.

Auch zwei Wochen nach der Osteotomie mit zusätzlicher Hämatomentfernung zeigte sich in beiden Gruppen ein ähnliches Bild. Weder in der Gesamtkallusfläche noch in der Zusammensetzung des Kallus mit ca. 99% Bindegewebsanteil und nur 1% mineralisiertem Kallus konnten signifikante Unterschiede zwischen dem rigiden und dem kritischen System nachgewiesen werden. Das Osteoklastenaufkommen konzentrierte sich auf das periostale Osteotomiegebiet, wobei die Dichte trabekulär tendenziell im kritischen System erhöht war.

Die unterschiedliche Fixateurversorgung führte im Osteotomiegebiet zu keinen signifikanten Unterschieden hinsichtlich der Gefäßdichte im Gesamtkallus. Eine differenzierte Betrachtung zeigte jedoch im periostalen Kallusgebiet eine signifikant niedrigere Dichte nach kritischer Fixation als nach rigider. Diese Ergebnisse wurden auch bei der Unterscheidung der Gefäßgröße für kleine Blutgefäße bestätigt. Generell war festzustellen, dass sowohl bei der gesamten als auch bei der differenzierten Betrachtung signifikant mehr kleine als große Gefäße im rigiden System zu finden waren. Im kritischen Fixateursystem wies die größenpezifische Gefäßverteilung lediglich einen starken Trend auf.

Die Ergebnisse zeigen, dass schon im vier Tage alten Frakturhämatom trotz der sehr geringen Organisation viele knochenheilungsrelevante Faktoren unterschiedlichster Funktion exprimiert werden. Der Einfluss biomechanischer Rahmenbedingungen auf die Genexpression zu diesem Zeitpunkt scheint jedoch überwiegend noch nicht bzw. nicht mehr sichtbar zu sein. Der Vergleich mit der Vorgängerstudie von Schell *et al.* [130] konnte zeigen, dass eine Entfernung des Hämatomgewebes in dieser initialen Phase der Frakturheilung den Verlauf stark zu beeinträchtigen scheint, so dass unabhängig von den wirkenden interfragmentären Bewegungen zwei Wochen nach der Osteotomie Kallusgewebe mit wenig organisierten Anteilen im Osteotomiespalt vorherrscht. Auch die Gegenüberstellung der Osteoklasten- bzw. Gefäßdichte mit den entsprechenden Vorgängerstudien von Lienau *et al.* [75] bzw. Schell *et al.* [130] weist auf eine Beeinflussung der Dichte durch die Hämatomausräumung hin. Jedoch scheint diese nicht maximal ausgeprägt zu sein, so dass eine Auswirkung biomechanischer Rahmenbedingungen auf den Heilungsprozess dokumentiert werden konnte.

Diese Studie hat gezeigt, dass sowohl erhöhte interfragmentäre Bewegungen als auch die im klinischen Alltag häufig stattfindende Hämatomausräumung den Heilungsverlauf beeinflussen und verzögern.

7 Literaturverzeichnis

1. Albina JE, Mastrofrancesco B, Vessella JA, et al. 2001. HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1alpha induction in primary inflammatory cells by TNF-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C1971-7.
2. Aro HT, Wippermann BW, Hodgson SF, Chao EY. 1990. Internal remodeling of periosteal new bone during fracture healing. *J Orthop Res* 8: 238-46.
3. Augat P, Burger J, Schorlemmer S, et al. 2003. Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model. *J Orthop Res* 21: 1011-7.
4. Augat P, Merk J, Ignatius A, et al. 1996. Early, full weightbearing with flexible fixation delays fracture healing. *Clin Orthop*: 194-202.
5. Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, et al. 1984. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 7907-11.
6. Barnes PJ. 2006. Transcription factors in airway diseases. *Lab Invest* 86: 867-72.
7. Beck T. 2003. Der Knochen - lebendig und stoffwechselaktiv. *Pharm. Ztg.* 148: 30-39.
8. Bier A. 1905. Die Bedeutung des Blutergusses für die Heilung des Knochenbruches. Heilung von Pseudarthrosen und von verspäteter Callusbildung durch Bluteinspritzung. *Medizinische Klinik* 1: 6-7.
9. Bier A. 1913. Hyperemia as a therapeutic agent. Betz, Hammond Ind.
10. Bolander ME. 1992. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 200: 165-70.
11. Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, et al. 1995. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* 13: 357-67.
12. Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, et al. 2002. Factors in the fracture microenvironment induce primary osteoblast angiogenic cytokine production. *Plast Reconstr Surg* 110: 139-48.
13. Braun W, Ruter A. 1996. Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects. *Unfallchirurg* 99: 59-67.
14. Brighton CT. 1984. The biology of fracture repair. *Instr Course Lect* 33: 60-82.

15. Brown RA, Weiss JB, Tomlinson IW, et al. 1980. Angiogenic factor from synovial fluid resembling that from tumours. *Lancet* 1: 682-5.
16. Brownlow HC, Reed A, Simpson AH. 2001. Growth factor expression during the development of atrophic non-union. *Injury* 32: 519-24.
17. Brug E, Winckler S. 1991. [A return to callus healing using dynamic osteosynthesis procedures. Principles, indications, complications, x-ray diagnosis of interlocking nailing and dynamic monofixators in comparison with conventional bone plates]. *Radiologe* 31: 165-71.
18. Carano RA, Filvaroff EH. 2003. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 8: 980-9.
19. Cavallo MG, Pozzilli P, Thorpe R. 1994. Cytokines and autoimmunity. *Clin Exp Immunol* 96: 1-7.
20. Chao EY, Aro HT, Lewallen DG, Kelly PJ. 1989. The effect of rigidity on fracture healing in external fixation. *Clin Orthop*: 24-35.
21. Chen CC, Mo FE, Lau LF. 2001. The angiogenic factor Cyr61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 276: 47329-37.
22. Chen D, Harris MA, Rossini G, et al. 1997. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 60: 283-90.
23. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. 2002. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 17: 513-20.
24. Claes L, Eckert-Hubner K, Augat P. 2002. The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J Orthop Res* 20: 1099-105.
25. Claes L, Grass R, Schmickal T, et al. 2002. Monitoring and healing analysis of 100 tibial shaft fractures. *Langenbecks Arch Surg* 387: 146-52.
26. Claes L, Wolf S, Augat P. 2000. [Mechanical modification of callus healing]. *Chirurg* 71: 989-994.

27. Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, et al. 1998. Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clin Orthop Relat Res* 355 Suppl: S132-47.
28. Cruess RL, Dumont J. 1975. Fracture healing. *Can J Surg* 18: 403-13.
29. Cunningham NS, Paralkar V, Reddi AH. 1992. Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor beta 1 mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 11740-4.
30. Dalla-Favera R, Gelmann EP, Gallo RC, Wong-Staal F. 1981. A human onc gene homologous to the transforming gene (v-sis) of simian sarcoma virus. *Nature* 292: 31-5.
31. de la Pena LS, Billings PC, Fiori JL, et al. 2005. Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP), a disorder of ectopic osteogenesis, misregulates cell surface expression and trafficking of BMPRIA. *J Bone Miner Res* 20: 1168-76.
32. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, et al. 1985. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 316: 701-5.
33. Desai BJ, Meyer MH, Porter S, et al. 2003. The effect of age on gene expression in adult and juvenile rats following femoral fracture. *J Orthop Trauma* 17: 689-98.
34. Distler O. 2003. Hypoxie und Angiogenese in rheumatischen Erkrankungen. *Z Rheumatol* 62: 43-45.
35. Duda GN, Kassi JP, Hoffmann JE, et al. 2000. Mechanical behavior of Ilizarov ring fixators. Effect of frame parameters on stiffness and consequences for clinical use. *Unfallchirurg* 103: 839-45.
36. Dupont J, Dunn SE, Barrett JC, LeRoith D. 2003. Microarray analysis and identification of novel molecules involved in insulin-like growth factor-1 receptor signaling and gene expression. *Recent Prog Horm Res* 58: 325-42.
37. Einhorn TA. 1998. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop*: S7-21.
38. Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, et al. 1995. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* 10: 1272-81.

39. Fang TD, Nacamuli RP, Song HM, et al. 2004. Creation and characterization of a mouse model of mandibular distraction osteogenesis. *Bone* 34: 1004-12.
40. Fataccioli V, Abergel V, Wingertsmann L, et al. 2002. Stimulation of angiogenesis by Cyr61 gene: a new therapeutic candidate. *Hum Gene Ther* 13: 1461-70.
41. Feghali CA, Wright TM. 1997. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 2: d12-26.
42. Fiedler J, Roderer G, Gunther KP, Brenner RE. 2002. BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem* 87: 305-12.
43. Franzen A, Heinegard D. 1985. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J* 232: 715-24.
44. Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, et al. 1994. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 269: 16766-73.
45. Gaber T, Dziurla R, Tripmacher R, et al. 2005. Hypoxia inducible factor (HIF) in rheumatology: low O₂! See what HIF can do! *Ann Rheum Dis* 64: 971-80.
46. Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, et al. 2003. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res* 18: 1584-92.
47. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, et al. 2003. Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 88: 873-84.
48. Goodship AE. 1992. Mechanical stimulus to bone. *Ann Rheum Dis* 51: 4-6.
49. Goodship AE, Kenwright J. 1985. The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures. *J Bone Joint Surg [Br]* 67: 650-5.
50. Granjeiro JM, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC, et al. 2005. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Braz J Med Biol Res* 38: 1463-73.
51. Grundnes O, Reikeras O. 1993. The importance of the hematoma for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 64: 340-2.
52. Haas NP. 2000. Callus modulation - fiction or reality? *Chirurg* 71: 987-988.

-
53. Hadjiargyrou M, Ahrens W, Rubin CT. 2000. Temporal expression of the chondrogenic and angiogenic growth factor CYR61 during fracture repair. *J Bone Miner Res* 15: 1014-23.
 54. Ham A. 1930. A histological study of the early phase of bone repair. *J Bone Joint Surg* 12: 827-44.
 55. Harry LE, Paleolog EM. 2003. From the cradle to the clinic: VEGF in developmental, physiological, and pathological angiogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69: 363-74.
 56. Hayami T, Endo N, Tokunaga K, et al. 2000. Spatiotemporal change of rat collagenase (MMP-13) mRNA expression in the development of the rat femoral neck. *J Bone Miner Metab.* 18: 185-93.
 57. Hiller O, Lichte A, Oberpichler A, et al. 2000. Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII. *J Biol Chem* 275: 33008-13.
 58. Honda Y, Knutsen R, Strong DD, et al. 1997. Osteogenic protein-1 stimulates mRNA levels of BMP-6 and decreases mRNA levels of BMP-2 and -4 in human osteosarcoma cells. *Calcif Tissue Int* 60: 297-301.
 59. Islam AA, Rasubala L, Yoshikawa H, et al. 2005. Healing of fractures in osteoporotic rat mandible shown by the expression of bone morphogenetic protein-2 and tumour necrosis factor-alpha. *Br J Oral Maxillofac Surg* 43: 383-91.
 60. Jay P, Berge-Lefranc JL, Marsollier C, et al. 1997. The human growth factor-inducible immediate early gene, CYR61, maps to chromosome 1p. *Oncogene* 14: 1753-7.
 61. Karachaliou FH, Stamogiannou L, Maravelias K, et al. 1996. Long bone fracture healing: IGF-I concentrations and specific binding to erythrocytes. *J Pediatr Endocrinol Metab* 9: 491-5.
 62. Katakam AK, Chipitsyna G, Gong Q, et al. 2005. Streptozotocin (STZ) mediates acute upregulation of serum and pancreatic osteopontin (OPN): a novel islet-protective effect of OPN through inhibition of STZ-induced nitric oxide production. *J Endocrinol* 187: 237-47.

63. Kim CH, Cho YS, Chun YS, et al. 2002. Early expression of myocardial HIF-1alpha in response to mechanical stresses: regulation by stretch-activated channels and the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Circ Res* 90: E25-33.
64. Klaushofer K, Peterlik M. 1994. [Pathophysiology of fracture healing]. *Radiologe* 34: 709-14.
65. Klein P, Schell H, Streitparth F, et al. 2003. The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions. *J Orthop Res* 21: 662-669.
66. Kloss FR, Schlegel KA, Felszeghy E, et al. 2004. [Applying an osteoinductive protein complex for regeneration of osseous defects]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 8: 12-7.
67. Komatsu DE, Hadjiargyrou M. 2004. Activation of the transcription factor HIF-1 and its target genes, VEGF, HO-1, iNOS, during fracture repair. *Bone* 34: 680-8.
68. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, et al. 2001. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 16: 1004-14.
69. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, et al. 2004. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 15: 49-60.
70. Lanyon LE, Hampson WG, Goodship AE, Shah JS. 1975. Bone deformation recorded in vivo from strain gauges attached to the human tibial shaft. *Acta Orthop Scand* 46: 256-68.
71. Larsson J, Karlsson S. 2005. The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene* 24: 5676-92.
72. Lau LF, Nathans D. 1985. Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells. *Embo J* 4: 3145-51.
73. Lewis DD, Cross AR, Carmichael S, Anderson MA. 2001. Recent advances in external skeletal fixation. *J Small Anim Pract* 42: 103-12.
74. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. 2002. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 84-A: 1032-44.
75. Lienau J, Schell H, Duda GN, et al. 2004. Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability. *J Orthop Res* 23: 639-645.

-
76. Lienau J, Schell H, Epari DR, et al. 2006. CYR61 (CCN1) protein expression during fracture healing in an ovine tibial model and its relation to the mechanical fixation stability. *J Orthop Res* 24: 254-62.
 77. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. 1996. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 19: 1S-12S.
 78. Lippert H. 2000. *Lehrbuch Anatomie. Allgemeine Anatomie*. Urban & Fischer Verlag, München
 79. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* 25: 402-8.
 80. Mark H, Nilsson A, Nannmark U, Rydevik B. 2004. Effects of fracture fixation stability on ossification in healing fractures. *Clin Orthop*: 245-50.
 81. Matsumoto T, Mugishima H. 2006. Signal transduction via vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and their roles in atherogenesis. *J Atheroscler Thromb* 13: 130-5.
 82. Mayer G, Wolf E. 1983. Animal experiments to examine the histology of fracture healing in osteosynthesis with external fixation and compression. *Arch Orthop Trauma Surg* 101: 111-20.
 83. Mayr E. 2002. [Tibial fractures]. *Chirurg* 73: 642-61.
 84. McKibbin B. 1978. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 60-B: 150-62.
 85. Meyer RA, Jr., Meyer MH, Tenholder M, et al. 2003. Gene expression in older rats with delayed union of femoral fractures. *J Bone Joint Surg Am* 85-A: 1243-54.
 86. Meyer RA, Jr., Tsahakis PJ, Martin DF, et al. 2001. Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *J Orthop Res* 19: 428-35.
 87. Meyer RA, Meyer MH, Phieffer LS, Banks DM. 2001. Delayed union of femoral fractures in older rats: decreased gene expression. *BMC Musculoskelet Disord* 2: 2.
 88. Millette E, Rauch BH, Kenagy RD, et al. 2006. Platelet-derived growth factor-BB transactivates the fibroblast growth factor receptor to induce proliferation in human smooth muscle cells. *Trends Cardiovasc Med* 16: 25-8.

-
89. Mizuno K, Mineo K, Tachibana T, et al. 1990. The osteogenetic potential of fracture haematoma. Subperiosteal and intramuscular transplantation of the haematoma. *J Bone Joint Surg Br* 72: 822-9.
 90. Mo FE, Muntean AG, Chen CC, et al. 2002. CYR61 (CCN1) is essential for placental development and vascular integrity. *Mol Cell Biol* 22: 8709-20.
 91. Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, et al. 1994. Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* 9: 651-9.
 92. Ng KW, Romas E, Donnan L, Findlay DM. 1997. Bone biology. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 11: 1-22.
 93. Nomura S, Takano-Yamamoto T. 2000. Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol* 19: 91-6.
 94. Nunamaker DM. 1998. Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop*: S56-65.
 95. Oda T, Hirota K, Nishi K, et al. 2006. Activation of hypoxia-inducible factor 1 during macrophage differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: C104-13.
 96. Oestern HJ, Dürig M: Traumatologie. In: *Duale Reihe - Chirurgie*, 2. korrigierte Auflage ed, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003
 97. Okazaki K, Jingushi S, Ikenoue T, et al. 2003. Expression of parathyroid hormone-related peptide and insulin-like growth factor I during rat fracture healing. *J Orthop Res* 21: 511-20.
 98. Olerud S, Danckwardt-Lilliestrom G. 1968. Fracture healing in compression osteosynthesis in the dog. *J Bone Joint Surg Br* 50: 844-51.
 99. Olerud S, Danckwardt-Lilliestrom G. 1971. Fracture healing in compression osteosynthesis. An experimental study in dogs with an avascular, diaphyseal, intermediate fragment. *Acta Orthop Scand Suppl* 137: 1-44.
 100. Onodera S, Nishihira J, Yamazaki M, et al. 2004. Increased expression of macrophage migration inhibitory factor during fracture healing in rats. *Histochem Cell Biol* 121: 209-17.
 101. Owen M. 1970. The origin of bone cells. *Int Rev Cytol* 28: 213-38.

102. Palmer RH, Hulse DA, Hyman WA, Palmer DR. 1992. Principles of bone healing and biomechanics of external skeletal fixation. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 22: 45-68.
103. Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. 2002. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol* 169: 3353-62.
104. Parfitt AM. 1988. Bone histomorphometry: proposed system for standardization of nomenclature, symbols, and units. *Calcif Tissue Int* 42: 284-6.
105. Park SH, O'Connor K, McKellop H, Sarmiento A. 1998. The influence of active shear or compressive motion on fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am* 80: 868-78.
106. Park SH, Silva M, Bahk WJ, et al. 2002. Effect of repeated irrigation and debridement on fracture healing in an animal model. *J Orthop Res* 20: 1197-204.
107. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, et al. 1984. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312: 724-9.
108. Pennig D. 1990. The biology of bones and of bone fracture healing. *Unfallchirurg* 93: 488-91.
109. Perren SM. 1979. Physical and biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation. *Clin Orthop*: 175-96.
110. Perren SM. 1992. [Biomechanical basis of fracture treatment]. *Orthopäde* 21: 3-10.
111. Pfaffl MW. 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 10: 92-95.
112. Pondel M. 2000. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *Int J Exp Pathol* 81: 405-22.
113. Probst A, Spiegel HU. 1997. Cellular mechanisms of bone repair. *J Invest Surg* 10: 77-86.
114. Pschyrembel W. 1998. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter, Berlin
115. Pufe T, Lemke A, Kurz B, et al. 2004. Mechanical overload induces VEGF in cartilage discs via hypoxia-inducible factor. *Am J Pathol* 164: 185-92.

-
116. Radasch RM. 1999. Biomechanics of bone and fractures. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29: 1045-82, V-VI.
 117. Rahn BA, Gallinaro P, Baltensperger A, Perren SM. 1971. Primary bone healing. An experimental study in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am* 53: 783-6.
 118. Reddi AH. 2001. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1: S1-6.
 119. Reddi AH, Wientroub S, Muthukumaran N. 1987. Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am* 18: 207-12.
 120. Reigstad LJ, Varhaug JE, Lillehaug JR. 2005. Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family. *Febs J* 272: 5723-41.
 121. Remedios A. 1999. Bone and bone healing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29: 1029-44, V.
 122. Rinderknecht E, Humbel RE. 1978. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253: 2769-76.
 123. Risau W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-4.
 124. Rossa C, Jr., Liu M, Patil C, Kirkwood KL. 2005. MKK3/6-p38 MAPK negatively regulates murine MMP-13 gene expression induced by IL-1beta and TNF-alpha in immortalized periodontal ligament fibroblasts. *Matrix Biol* 24: 478-88.
 125. Rössler H, Rütter, W. 2005. Orthopädie und Unfallchirurgie. *Traumatologie*. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München
 126. Rudick RA, Ransohoff RM, Peppler R, et al. 1996. Interferon beta induces interleukin-10 expression: relevance to multiple sclerosis. *Ann Neurol* 40: 618-27.
 127. Runkel M, Klepsch, M. 1999. Wandel bei der Behandlung der Unterschenkelschaftfraktur. *Trauma Berufskrankh* 1: 229-239.
 128. Sarmiento A, Schaeffer JF, Beckerman L, et al. 1977. Fracture healing in rat femora as affected by functional weight-bearing. *J Bone Joint Surg [Am]* 59: 369-75.
 129. Scammell BE, Roach HI. 1996. A new role for the chondrocyte in fracture repair: endochondral ossification includes direct bone formation by former chondrocytes. *J Bone Miner Res* 11: 737-45.

-
130. Schell H, Epari DR, Kassi JP, et al. 2005. The course of bone healing is influenced by the initial shear fixation stability. *J Orthop Res* 23: 1022-1028.
 131. Schell H, Lienau J, Epari DR, et al. 2006. Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing. *Bone* 38: 547-554.
 132. Schiebler TH, Schmidt W. 2003. *Anatomie. Histologie, Gewebelehre und Allgemeine Anatomie des Bewegungsapparates*. Springer-Verlag, Berlin
 133. Schmickal T, Hochstein P, Wentzensen A. 1999. Behandlung von Unterschenkelschaftfrakturen im Fixateur externe. *Trauma Berufskrankh*: 240-246.
 134. Schmokel HG, Weber FE, Seiler G, et al. 2004. Treatment of nonunions with nonglycosylated recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered from a fibrin matrix. *Vet Surg* 33: 112-8.
 135. Siewert JR. 2000. *Chirurgie*. Springer-Verlag, Berlin
 136. Simmons DJ. 1985. Fracture healing perspectives. *Clin Orthop* 200: 100-13.
 137. Sodek J, Batista Da Silva AP, Zohar R. 2006. Osteopontin and mucosal protection. *J Dent Res* 85: 404-15.
 138. Street J, Bao M, deGuzman L, et al. 2002. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9656-61. Epub 2002 Jul 12.
 139. Street J, Winter D, Wang JH, et al. 2000. Is human fracture hematoma inherently angiogenic? *Clin Orthop*: 224-37.
 140. Street JT, Wang JH, Wu QD, et al. 2001. The angiogenic response to skeletal injury is preserved in the elderly. *J Orthop Res* 19: 1057-66.
 141. Stürmer KM. 1984. [Histologic finding of fracture healing using external fixation and its clinical significance]. *Unfallchirurgie* 10: 110-22.
 142. Stürmer KM, Schuchardt W. 1980. [New aspects of closed intramedullary nailing and marrow cavity reaming in animal experiments. I. The tibia of the sheep, as a model for intramedullary nailing (author's transl)]. *Unfallheilkunde* 83: 341-5.
 143. Taneja N, Coy PE, Lee I, et al. 2004. Proinflammatory interleukin-1 cytokines increase mesangial cell hexokinase activity and hexokinase II isoform abundance. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C548-57.

-
144. Terai K, Takano-Yamamoto T, Ohba Y, et al. 1999. Role of osteopontin in bone remodeling caused by mechanical stress. *J Bone Miner Res* 14: 839-49.
 145. Tyndall WA, Beam HA, Zarro C, et al. 2003. Decreased platelet derived growth factor expression during fracture healing in diabetic animals. *Clin Orthop Relat Res*: 319-30.
 146. Uchida S, Sakai A, Kudo H, et al. 2003. Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats. *Bone* 32: 491-501.
 147. Urist MR. 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science* 150: 893-9.
 148. Uusitalo H, Hiltunen A, Soderstrom M, et al. 2000. Expression of cathepsins B, H, K, L, and S and matrix metalloproteinases 9 and 13 during chondrocyte hypertrophy and endochondral ossification in mouse fracture callus. *Calcif Tissue Int.* 67: 382-90.
 149. Vazquez-Del Mercado M, Delgado-Rizo V, Munoz-Valle JF, et al. 1999. Expression of interleukin-1 beta, tumor necrosis factor alpha, interleukins-6, -10 and -4, and metalloproteinases by freshly isolated mononuclear cells from early never-treated and non-acute treated rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol* 17: 575-83.
 150. Wallace AL, Draper ER, Strachan RK, et al. 1994. The vascular response to fracture micromovement. *Clin Orthop*: 281-290.
 151. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5510-4.
 152. Wang K, Vishwanath P, Eichler GS, et al. 2006. Analysis of fracture healing by large-scale transcriptional profile identified temporal relationships between metalloproteinase and ADAMTS mRNA expression. *Matrix Biol* 25: 271-81.
 153. Wang L, Ostberg O, Wihlborg AK, et al. 2003. Quantification of ADP and ATP receptor expression in human platelets. *J Thromb Haemost* 1: 330-6.
 154. Weiss C. 2004. Normoxie? *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 39: 32-37.
 155. Weiss S, Zimmermann G, Baumgart R, et al. 2005. Systemic regulation of angiogenesis and matrix degradation in bone regeneration--distraction osteogenesis compared to rigid fracture healing. *Bone*. 37: 781-90. Epub 2005 Oct 3.

156. Windhagen H, Witte F, Thorey F, et al. 2004. [Injectable carrier system for growth factor application in minimally invasive stimulation of bone healing]. *Orthopade* 33: 1378-85.
157. Wolf S, Janousek A, Pfeil J, et al. 1998. The effects of external mechanical stimulation on the healing of diaphyseal osteotomies fixed by flexible external fixation. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 13: 359-364.
158. Wozney JM. 2002. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine* 27: S2-8.
159. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242: 1528-34.
160. Wurzler KK, Emmert J, Eichelsbacher F, et al. 2004. [Evaluation of the osteoinductive potential of genetically modified BMP-2 variants]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 8: 83-92.
161. Wurzler KK, Heisterkamp M, Bohm H, et al. 2004. [Mandibular reconstruction with autologous bone and osseointegrative implant in the Gottingen minipig]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 8: 75-82.
162. Yamagishi M, Yoshimura Y. 1955. The Biomechanics of Fracture Healing. *J Bone Joint Surg* 37-A: 1035-68.
163. Yamagiwa H, Tokunaga K, Hayami T, et al. 1999. Expression of metalloproteinase-13 (Collagenase-3) is induced during fracture healing in mice. *Bone*. 25: 197-203.
164. Yamazaki M, Nakajima F, Ogasawara A, et al. 1999. Spatial and temporal distribution of CD44 and osteopontin in fracture callus. *J Bone Joint Surg Br* 81: 508-15.
165. Yoon ST, Boden SD. 2002. Osteoinductive molecules in orthopaedics: basic science and preclinical studies. *Clin Orthop* 395: 33-43.
166. Zilberstein A, Ruggieri R, Korn JH, Revel M. 1986. Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *Embo J* 5: 2529-37.
167. Zimmermann G, Henle P, Kusswetter M, et al. 2005. TGF-beta1 as a marker of delayed fracture healing. *Bone* 36: 779-85.

8 Anhang

8.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Die verwendeten Einheiten entsprechen dem internationalen Standard (SI-Einheiten).

α -SMA	alpha smooth muscle actin
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäuren
ASBMR	American Society for Bone and Mineral Research
β -ME	2-Mercaptoethanol
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
Coll-II	Kollagen-Typ II
Ct	Threshold Cycle
CTR	Calzitoninrezeptor
CYR61	Cysteine-rich Protein 61
Δ Ct	Delta Threshold Cycle
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiographie
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
FEM	Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin
for	forward

g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
gp130	130 kDa Glykoprotein
HCl	Wasserstoffchlorid
HE	Hämatoxylin Eosin
HIF-1	Hypoxia-inducible Factor-1
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGF-1R	Insulin-like Growth Factor-1 Rezeptor
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
IL-1RAcp	Interleukin-1 Rezeptorassoziiertes Protein
JNK	Jun N-terminal kinase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
M	Mol
MAPK	Mitogen-activated protein Kinase
mAs	Milliampere-Sekunden
MEA	2-Methoxyethylacetat
mg	Milligramm
MgCl	Magnesiumchlorid
MGT	Masson-Goldner-Trichomfärbung
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Kubikmillimeter
mM	Millimol
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	Messenger-RNA
n	Anzahl
N/A	kein Fluoreszenzanstieg detektierbar
NF- κ B	Nuclear factor-kappaB
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OP	Operation
OP-1	Osteogenic Protein-1
OPN	Osteopontin
p	asymptotische Signifikanz
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Rezeptor
pH	potentia hydrogenii
PI3Kinase	Phosphoinosited 3-Kinase
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of Interest
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
Smads	Small mothers against decapentapligic
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta
Tris-HCl	Tris-Wasserstoffchlorid
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Rezeptor
TRAP	Tartrat resistant acid phosphatase
U	Units
UV	Ultraviolett

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor
x g	Beschleunigung
z.B.	zum Beispiel
°	Grad
°C	Grad Celsius
Ø	Durchmesser
%	Prozent

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Primer	33
Tabelle 2: Protokoll für die histologische Entwässerung.....	35
Tabelle 3: Protokoll für die Rehydrierung.	37
Tabelle 4: Protokoll für die immunhistochemische Entwässerung	40
Tabelle 5: Rohdaten der untersuchten Primer auf mRNA-Ebene im peripheren Blut.....	47
Tabelle 6: Absolute Anzahl der Osteoklasten im Bereich der Region of Interest.	58

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der indirekten Frakturheilung.	7
Abb. 2: Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufes.	23
Abb. 3: Schematische Darstellung des rigiden und des kritischen Fixateur externe.....	24
Abb. 4: Fertig montierter rigider Fixateur externe mit Blick auf das Osteotomiehämatom.	26
Abb. 5: Röntgenaufnahme eines Tieres mit rigider Fixateurversorgung post OP.....	27
Abb. 6: Teil eines entnommenen vier Tage alten Hämatomes.....	28
Abb. 7: Sägeschema der Tibia für die Scheiben S1 bis S4 in der Querachse.	29
Abb. 8: Sägepräparat S1 eines Tieres mit kritischer Fixateurversorgung	29
Abb. 9: Schematische Abfolge der RNA-Isolierung.	30
Abb. 10: Prinzip der immunhistochemischen Färbung.	44
Abb. 11: Immunhistochemische CTR-Färbung.....	44
Abb. 12: Immunhistochemische α -SMA-Färbung.	45
Abb. 13: Semiquantitative Analyse der mRNA-Synthese von GAPDH.....	46
Abb. 14: Semiquantitative Analyse zur Primerselektionierung.	46
Abb. 15: Relative Expression der Wachstumsfaktoren im Frakturhämatom.	49

Abb. 16: Relative Expression der Zytokine im Frakturhämatom.....	50
Abb. 17: Relative Expression der extrazellulären Matrixproteine im Frakturhämatom.	50
Abb. 18: Relative Expression des Transkriptionsfaktors und der Matrix Metallproteinase.	51
Abb. 19: HE-Färbung des vier Tage alten Frakturhämatoms.....	52
Abb. 20: HE-Färbung des vier Tage alten Frakturhämatoms.....	52
Abb. 21: HE- Färbung des Osteotomiegebietes nach rigider Fixation.....	53
Abb. 22: Ausschnittsvergrößerung der HE- Färbung des Osteotomiegebietes.	53
Abb. 23: HE-Färbung des medialen Osteotomiespaltes nach rigider Fixation.	54
Abb. 24: Safranin Orange/von Kossa-Färbung des Osteotomiegebietes nach rigider Fixation...54	
Abb. 25: Gesamtkallusfläche im rigiden und kritischen System.....	55
Abb. 26: Prozentuale Anteile der Bindegewebsfläche am Gesamtkallus.	55
Abb. 27: Prozentuale Anteile der mineralisierten Knochenfläche am Gesamtkallus.....	55
Abb. 28: Prozentuale Anteile der Bindegewebsfläche und der mineralisierten Knochenfläche am Gesamtkallus differenziert nach periostal und endostal.....	56
Abb. 29: Prozentuale Anteile der Bindegewebsfläche und der mineralisierten Knochenfläche am Gesamtkallus differenziert nach medial und lateral.....	56
Abb. 30: Immunhistochemische Coll-II-Färbung des lateralen Osteotomiegebietes.....	58
Abb. 31: Ausschnittsvergrößerung der immunhistochemischen Coll-II-Färbung.	58
Abb. 32: Absolute Anzahl der kortikal lokalisierten Osteoklasten.	59
Abb. 33: Relative Anzahl der trabekulär lokalisierten Osteoklasten.....	59
Abb. 34: Anzahl der trabekulär periostal lokalisierten Osteoklasten.	59
Abb. 35: Anzahl der trabekulär endostal lokalisierten Osteoklasten.....	59
Abb. 36: Vaskularisierung des Kallusgewebes im rigiden und kritischen System.	60
Abb. 37: Periostale und endostale Vaskularisierung des Kallusgewebes.	60
Abb. 38: Periphere und zentrale Vaskularisierung des Kallusgewebes.	60
Abb. 39: Gefäßdichte im Kallusgewebe differenziert nach der Größe.	61
Abb. 40: Gefäßdichte im periostalen Kallusgewebe differenziert nach der Größe.....	61

Danksagung

Bedanken möchte ich mich an erster Stelle bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Bail für die Überlassung des Themas und die sich daraus ergebende Chance, in einem tollen Team das wissenschaftlich-experimentelle Arbeiten kennen und lieben zu lernen.

Herrn Professor Dr.-Ing. Georg Duda danke ich für die Möglichkeit, mein Thema in seiner Forschungseinrichtung in die Praxis umsetzen zu können, sowie die kritische Auseinandersetzung mit meinen Vorträgen im Vorfeld der Doktorandenkolloquia.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Jasmin Lienau für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Jederzeit stand sie mir für die unendlichen Fragen sowie die kleinen Problemchen zur Verfügung und las meine ersten Entwürfe und alles was darauf folgte Korrektur.

Auch Dr. Hanna Schell möchte ich für die angenehme und lehrreiche Zeit im OP danken. Seitdem konnte ich auf Fragen wie „Hast Du Dich schon mal steril gemacht?“ „Hast Du schon mal intubiert?“ „Hast Du schon mal ne Flexüle geschoben?“ antworten „Ja, beim Schaf!“

Danken möchte ich auch Camilla Bergmann, Gabriele Hardung und Martin Wolny für die geduldige Betreuung im Labor. Ohne sie wäre mancher Block und die ein oder andere Färbung nicht mehr zu retten gewesen. Aber auch ihre Gesellschaft mit den teils ernsthaften und teils nicht so ernst zu nehmenden Gesprächen versüßte mir die Laborarbeit.

Meinen Mitdoktoranden danke ich für die unvergessliche Zeit im OP und im Labor. Sie duldeten mich auf diversen Fotos, wenn auch nur als blauen Hintergrund. Dabei entstanden zusätzliche Schnappschüsse, die noch lange die Gemüter erheitern werden.

Auch meiner Familie gilt ein besonderer Dank. Fabian, Du hast immer an mich geglaubt, Dir mit mir die Nächte im Labor um die Ohren geschlagen, mir mit hilfreichen Formulierungen über manch holprige Stelle geholfen, den ein oder anderen Nervenzusammenbruch ertragen und mich immer wieder aufgebaut. Danke!

Papa, Dir danke ich für die Korrektur der Arbeit. Obwohl Du nicht wirklich etwas verstanden hast, fand Dein Ehrgeiz kein Ende, sogar mit studierten Personen diskutierst Du am Gartenzaun über diverse Schreibweisen.

Mama, Dir Danke ich dafür, dass Du immer an mich geglaubt, mich niemals aufgeben, sondern immer wieder aufgefangen hast.

Schwesterherz, ohne Dich wären mir viele Fachbegriffe der Molekularbiologie und deren korrekte Anwendung verwehrt geblieben. Dafür Danke! Auch wenn der Biologe immer noch die Hände über dem Kopf zusammenschlagen würde.

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen Schafen bedanken, die für jedes Leckerli zu haben waren und ohne die es meine Doktorarbeit so nicht gegeben hätte.

Auch dem Sicherheitsdienst gilt mein Dank. Sie ließen mich nachts unbehelligt eine PCR nach der anderen laufen und wachten in den intermittierenden arbeitsfreien Pausen über meinen Schlaf.

Meinem Computer danke ich, dass er mich nur gelegentlich zur Verzweiflung brachte und mich vor größeren Abstürzen bewahrte.

Erklärung an Eides Statt

„Ich, Melanie Spies, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Molekularbiologische, histologische und immunhistochemische Analyse des initialen Frakturhämatoms unter rigider und kritischer Fixation zum Zeitpunkt 4 Tage post Osteotomie selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen wurde auf die Veröffentlichung des Lebenslaufes in der elektronischen Version der Dissertation verzichtet.