

DISSERTATION

Der Einfluss von traumatischer Weichteilschädigung auf die Frakturheilung. Eine immunhistochemische Untersuchung am Rattenmodell.

The influence of traumatic soft tissue damage on fracture healing. An immunohistochemical investigation in the rat model.

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Annette Lauffer

Erstbetreuer*in: Univ.- Prof. Dr.-Ing. Georg Duda

Datum der Promotion: 30.11.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Abstrakt	4
2	Abstract	6
3	Einleitung	8
3.1	Allgemeines	8
3.2	Der Bewegungsapparat	11
3.2.1	Die Skelettmuskulatur	11
3.2.2	Knochen	15
3.2.3	Das Periost	24
3.3	Heilung der Skelettmuskulatur	24
3.4	Frakturheilung	27
4	Ziele und Hypothesen	34
5	Material und Methoden	35
5.1	Tierexperimentelles Modell	35
5.1.1	Versuchstiere	35
5.1.2	Studiendesign	35
5.1.3	Anästhesie	36
5.1.4	Vorbereitung der Versuchstiere	37
5.1.5	Weichteilschaden	37
5.1.6	Fraktur	38
5.1.7	Kombinationsverletzung	38
5.1.8	Röntgenkontrolle	38
5.2	Aufarbeitung der Tibiae	39
5.2.1	Fixierung	39
5.2.1.1	Theoretischer Hintergrund	39
5.2.1.2	Durchführung	39
5.2.2	Dekalzifizierung	40
5.2.2.1	Theoretischer Hintergrund	40
5.2.2.2	Durchführung	40
5.2.3	Gewebeentwässerung	41
5.2.4	Einbettung in Paraffin	42
5.2.4.1	Theoretischer Hintergrund	42
5.2.4.2	Durchführung	42

5.2.5	Paraffinschnitte	43
5.3	Histologie.....	44
5.3.1	Allgemeines	44
5.3.2	Übersichtsfärbung (HE-Färbung).....	44
5.3.2.1	Theoretischer Hintergrund	44
5.3.2.2	Durchführung	44
5.3.3	Immunhistologie.....	46
5.3.3.1	Theoretischer Hintergrund	46
5.3.3.2	Problembehandlung	52
5.3.3.3	Durchführung	52
5.4	TRAP-Färbung	57
5.4.1	Theoretischer Hintergrund	57
5.4.2	Durchführung.....	57
5.5	Auswertung	59
5.5.1	Allgemeines	59
5.5.2	Übersichtsfärbung.....	59
5.5.3	Immunhistologie/TRAP-Färbung.....	60
5.5.3.1	Granulozyten, Makrophagen, Gefäße	60
5.5.3.2	Osteoblasten, Osteoklasten	61
5.5.4	Statistik	62
6	Ergebnisse.....	63
6.1	HE-Färbung.....	63
6.2	Immunhistologie/TRAP-Färbung	63
6.2.1	Allgemeines	63
6.2.2	Granulozyten	64
6.2.3	Makrophagen.....	70
6.2.4	Gefäße.....	74
6.2.5	Osteoblasten.....	78
	Osteoklasten	82
7	Diskussion	84
7.1	HE-Färbung.....	84
7.2	Immunhistologie/TRAP-Färbung	85
7.2.1	Granulozyten	85
7.2.2	Makrophagen.....	87

7.2.3	Gefäße.....	90
7.2.4	Osteoblasten.....	95
7.2.5	Osteoklasten.....	97
7.3	Schlussfolgerung.....	100
8	Literatur.....	104
9	Eidesstattliche Versicherung	114
10	Lebenslauf	116
11	Publikationsliste.....	118
12	Danksagung.....	119

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des Skelettmuskels (Quelle Schünke [93])	13
Abbildung 3-2: Schematische Darstellung des Röhrenknochens, modifiziert nach Schünke [93].....	20
Abbildung 3-3: Schematische Darstellung des Lamellenknochens, modifiziert nach Schünke [93].....	22
Abbildung 3-4: Schematische Darstellung der sekundären Frakturheilung, modifiziert nach Schünke [93]	29
Abbildung 5-1: Induktion eines standardisierten Weichteilschadens am Rattenunterschenkel.....	37
Abbildung 5-2: Erzeugung einer standardisierten Unterschenkelfraktur an der Ratte.....	38
Abbildung 5-3: Schematische Darstellung von Immunglobulinen ,modifiziert nach Naish [62]	48
Abbildung 5-4: Schematische Darstellung der ABC Methode, modifiziert nach Boenisch [10]	50
Abbildung 5-5: Schematische Darstellung der Untersuchungsbereiche (ROI: Region Of Interest).....	60
Abbildung 4-1: Immunhistologischer Nachweis von Granulozyten im Periost des peripheren Untersuchungsbereiches 24 Stunden nach Fraktur.....	64
Abbildung 6-2: Anzahl von Granulozyten im gesamten Periost.....	65
Abbildung 6-3: Regionaler Vergleich des Granulozytenaufkommens im Periost nach isolierter Verletzung	66
Abbildung 6-4: Regionaler Vergleich des Granulozytenaufkommens im Periost nach Kombinationsverletzung	67
Abbildung 6-5: Anzahl von Granulozyten im Gesamtkallus	68
Abbildung 6-6: Granulozyten im Strukturvergleich.....	69
Abbildung 4-7: Immunhistologischer Nachweis von Makrophagen im Periost des peripheren Untersuchungsbereiches 48 Stunden nach Fraktur und Weichteilschaden.	70
Abbildung 6-8: Anzahl von Makrophagen im gesamten Periost	71
Abbildung 6-9: Regionaler Vergleich des Makrophagenaufkommens im Periost	72
Abbildung 6-10: Anzahl von Makrophagen im gesamten Kallus.....	73
Abbildung 6-11: Immunhistologischer Nachweis von Gefäßen im Periost des peripheren Untersuchungsbereiches 24 Stunden nach Fraktur.....	74
Abbildung 6-12: Anzahl von Gefäßen im gesamten Periost	75
Abbildung 6-13: Anzahl von Gefäßen im gesamten Kallus.....	76
Abbildung 6-14: Gefäße im Strukturvergleich	77
Abbildung 6-15: Anzahl von Osteoblasten im gesamten Periost	78
Abbildung 6-16: Immunhistologischer Nachweis von Osteoblasten im Kallus des peripheren Untersuchungsbereiches eine Woche nach Fraktur.	79
Abbildung 6-17: Anzahl von Osteoblasten im gesamten Kallus.....	79
Abbildung 6-18: Osteoblasten im Strukturvergleich für das Zentrum der Schädigung (ROI 1)	80
Abbildung 6-19: Osteoblasten im Strukturvergleich für den peripheren Bereich (ROI 2) nach Fraktur und Kombinationsverletzung	81
Abbildung 6-20: Osteoblasten im Strukturvergleich für den peripheren Bereich (ROI 2) nach Fraktur .	81

Abbildung 6-21: Nachweis von Osteoklasten mittels TRAP-Färbung im Kallus des peripheren Untersuchungsbereiches eine Woche nach Fraktur.	82
Abbildung 6-22: Anzahl von Osteoklasten im gesamten Kallus.....	82
Abbildung 6-23: Osteoklasten im Strukturvergleich	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 5-1: Untersuchungsgruppen	36
Tabelle 5-2: Schema der automatischen Gewebeentwässerung.....	41
Tabelle 5-3: Angewendetes Protokoll für die HE-Färbung.....	46
Tabelle 5-4: Allgemeines Protokoll immunhistologischer Untersuchungen	55
Tabelle 5-5: Verwendete Primärantikörper und Substrat-Chromogen-Lösungen.....	56
Tabelle 5-6: Angewendetes Protokoll für die TRAP-Färbung	58
Tabelle 5-7: Immunreaktiver Score, modifiziert nach Remmele [81]	62

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
<	kleiner als
>	größer als
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BMP-2	Bone Morphogenetic Protein 2
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
Ca ²⁺ -	Kalziumion
CCL2	Chemokin-Ligand-2
CD 31	Cluster of differentiation 31
cm	Zentimeter
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMCN	Endomucin
Fa.	Firma
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystalline
h	Stunden
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HO·	Hydroxylradikal
hPa	Hektopascal
IFN-γ	Interferon-γ
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M

IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
IL-13	Interleukin-13
IL-1 β	Interleukin-1 β
IRS	Immunreaktiver Score
lat.	lateinisch
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
mg	Milligramm
min	Minute
μ m	Mikrometer
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase-9
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
O ²⁻	Hyperoxidanion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PIGF	Placental growth factor
POD	Peroxidase
RANK	Receptor Activator of NF- κ B
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
ROI	Region Of Interest
RUNX 2	Runt-Related Transcription Factor 2
sog.	sogenannt
TGF- β	Transforming growth factor β
TNF- α	Tumor necrosis faktor- α
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase
V-ATPase	vakuoläre Protonen-ATPase

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor
vs. versus

1 Abstrakt

Frakturen gehen immer auch mit der Schädigung des angrenzenden, vorwiegend aus Skelettmuskulatur aufgebauten Weichteilmantels einher [117].

Eine erfolgreiche Therapie von Frakturen richtet sich deshalb vor allem nach der korrekten Einschätzung und Behandlung des begleitenden Weichteilschadens [66, 68, 89, 97].

Fehleinschätzungen der Weichteilsituation können dagegen zu schwerwiegenden Komplikationen bis hin zum Tod des Patienten führen [117].

Gelänge es jedoch, den pathogenetischen Einfluss der begleitenden Weichteilverletzung auf die Frakturheilung aufzudecken, ließen sich neue spezifische Therapieansätze entwickeln, die mit einer Verminderung der Komplikationsrate einhergehen.

Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, Kenntnisse darüber zu gewinnen, inwieweit sich ein zusätzlicher Weichteilschaden auf die zelluläre Reaktion von Granulozyten, Makrophagen, Osteoblasten und Osteoklasten sowie auf die Einsprossung von Gefäßen während der Frakturheilung auswirkt.

Dazu wurde bei jeweils sechs männlichen Sprague--Dawley-Ratten am distalen linken Unterschenkel entweder eine separate, schwere geschlossene Weichteilschädigung, eine isolierte Fraktur oder die Kombination beider Verletzungen induziert. Sechs Tiere dienten als Kontrollgruppe und blieben unverletzt. Nach Ablauf von unterschiedlichen Zeiträumen (24 Stunden, 48 Stunden, eine Woche, drei Wochen) wurden die Tiere getötet, ihre linken Unterschenkel entnommen, Längsschnitte der Tibiae gefertigt und diese mittels ABC-Methode immunhistologisch auf die Präsenz von Granulozyten, Makrophagen, Osteoblasten und Gefäßen sowie mittels TRAP-Färbung auf das Vorhandensein von Osteoklasten hin untersucht.

Anschließend wurden die Ergebnisse innerhalb festgelegter Untersuchungsbereiche jeweils für das Periost, den periostalen sowie den endostalen Kallus quantitativ ausgewertet.

Die Auswertung der immunhistologischen Analysen des Periosts zeigten innerhalb der ersten 48 Stunden nach Intervention unabhängig vom Verletzungsmuster insgesamt eine Erhöhung der Granulozyten-, Makrophagen und Gefäßanzahl.

Zusätzlich konnte hier eine deutliche Zunahme der frakturbedingten Gefäßeinsprossung durch die zusätzliche Weichteilschädigung festgestellt werden.

Dagegen war während des gesamten Untersuchungszeitraums nur eine geringe Anzahl von Osteoblasten sowie ein völliges Fehlen von Osteoklasten im verletzten Periost erkennbar.

Darüber hinaus zeigte die Analyse des Kallus unabhängig vom Interventionsmuster jeweils eine deutliche Präsenz von Granulozyten, Makrophagen, Gefäßen, Osteoblasten sowie Osteoklasten. Eine Einflussnahme der zusätzlichen Weichteilschädigung auf die frakturbedingte zelluläre sowie vaskuläre Reaktion konnte dabei jedoch nicht festgestellt werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen lassen sich Forschungsansätze erarbeiten, die den pathogenetischen Einfluss einer schweren Weichteilschädigung auf die Frakturheilung weiter aufklären und dadurch zukünftig zu einer Verbesserung der Heilungsergebnisse führen.

2 Abstract

Fractures are always accompanied by damage to the adjacent soft tissues, which are predominantly composed of skeletal muscle [117].

Successful treatment of fractures therefore depends primarily on correct assessment and treatment of the soft tissue injury [66, 68, 89, 97].

Incorrect treatment of the soft tissues, on the other hand, can lead to serious complications and even death of the patient [117].

However, new specific therapeutic approaches can be developed if the pathogenetic soft tissue injury on fracture healing is identified. That would mean a reduction of complications.

Therefore, to gain knowledge about the extent to which additional soft tissue damage affects the cellular response of granulocytes, macrophages, osteoblasts, osteoclasts and the sprouting of vessels during fracture healing was the aim of the presented work.

For this purpose, six male Sprague--Dawley rats were divided into three groups. One group was induced a separate severe closed soft tissue injury, one group was induced an isolated fracture and the last group was induced a combination of both injuries on the distal left lower leg. Six animals served as controls and remained uninjured. At the end of different time periods (24 hours, 48 hours, one week, three weeks), the animals were killed, their left lower legs were removed, longitudinal sections of the tibiae were made, and these were examined immunohistologically for the presence of granulocytes, macrophages, osteoblasts and vessels by ABC method and for the presence of osteoclasts by TRAP staining.

Subsequently, the results were quantitatively examined within defined areas in which the periosteum, the periosteal callus and the endosteal callus were analyzed.

Immunohistochemical analysis of the periosteum showed an overall increase in the number of granulocytes, macrophages and vessels within the first 48 hours after intervention, regardless of the kind of injury.

In addition, a significant increase in fracture-related vascular sprouting due to the additional soft tissue damage was observed here.

In contrast, only a low number of osteoblasts and a complete absence of osteoclasts were observed in the injured periosteum throughout the study period.

Abstract

Furthermore, the analysis of the callus showed an increased number of granulocytes, macrophages, vessels, osteoblasts as well as osteoclasts in each case - regardless of the kind of injury. However, an influence of the additional soft tissue injury could not be found, neither to the fracture-related cellular nor to the fracture-related vascular response.

Based on these results, further research can develop new approaches to understand the pathogenetic influence of severe soft tissue damage on fracture healing and thus lead to an improvement of healing results in the future.

3 Einleitung

3.1 Allgemeines

Frakturen stellen im Gesundheitswesen ein ernst zu nehmendes Problem dar. So wurden in der Bundesrepublik Deutschland allein im Jahr 2021 insgesamt 685714 Patientinnen oder Patienten aufgrund von Frakturen stationär aufgenommen und behandelt [103].

Mit Ausnahme pathologischer Ursachen wie Osteoporose, Osteomalazie oder Knochenmetastasen entsteht jede Fraktur durch äußere Gewalteinwirkung und ist somit fast immer von einer zusätzlichen Schädigung des angrenzenden, vorwiegend aus Skelettmuskulatur aufgebauten Weichteilmantels begleitet [113].

Dabei beeinflusst der begleitende Weichteilschaden die Frakturheilung negativ. Gerade schwere, ausgedehnte Weichteilverletzungen führen häufig zu Komplikationen wie Infektion, verzögerter Knochenregeneration oder Pseudarthrose [21, 30, 46].

Darüber hinaus besteht insbesondere bei Unterschenkelfrakturen die Gefahr einer sekundären Weichteilschädigung in Form des Kompartmentsyndroms der Skelettmuskulatur [51, 108]. Hierbei kommt es zur Gewebedruckerhöhung in den anatomisch durch Faszien geschlossenen Muskelkompartimenten, sowie einer daraus resultierenden lokalen Mikrozirkulationsstörung [51, 108]. Die Folgen sind ischämische Schädigungen an Nerven und Muskeln bis hin zum vollständigen Verlust der neuromuskulären Funktion [42, 51]. Unbehandelt kann das Kompartmentsyndrom schwerwiegende Komplikationen wie eine Volkmann-Kontraktur oder den Extremitätenverlust verursachen und durch systemische Auswirkungen sogar zum Tod des Patienten führen [51, 64].

Von daher besitzt der zusätzliche Weichteilschaden zentrale Bedeutung für das Frakturmanagement. So richtet sich die Wahl eines geeigneten Behandlungskonzeptes nicht nur nach dem knöchernen Defekt [68]. Vielmehr bestimmen das Ausmaß und der Schweregrad des begleitenden Weichteilschadens maßgeblich über die therapeutische Strategie sowie den weiteren Heilungsverlauf [66, 89, 97].

Dabei basiert das Behandlungsergebnis im Wesentlichen auf einer möglichst genauen Beurteilung und davon abgeleiteten konsequenten Therapie der Weichteilverletzung [36, 42, 112]. Hierzu erfolgt in Abhängigkeit vom Zustand des Hautmantels im

geschädigten Gebiet zunächst eine Einteilung in offene und geschlossene Frakturen [80, 113]. Für beide Formen stehen bisher mehrere Klassifikationssysteme zur Verfügung, mit deren Hilfe das Ausmaß sowie der Schweregrad des Weichteilschadens in Bezug auf den knöchernen Defekt beurteilt und daraus die jeweils geeignete Behandlung abgeleitet werden kann [36, 80].

Trotzdem gestaltet sich eine genaue Einschätzung der Weichteilverletzung zur Festlegung des therapeutischen Regimes im klinischen Alltag häufig als außerordentlich schwierig [42]. Insbesondere bei geschlossenen Frakturen bleibt die Beurteilung des Weichteilschadens aufgrund dessen Unzugänglichkeit hauptsächlich auf indirekte, erst sekundär entstehende Zeichen wie Schwellungen, Hautnekrosen, Spannungsblasen, Mikrozirkulationsstörungen und Änderungen im peripheren Neurostatus beschränkt, so dass er initial häufig unterschätzt oder sogar ignoriert wird [42, 51, 64, 67, 68]. Dabei wirft der geschlossene Weichteilschaden unter Umständen sogar größere therapeutische Probleme auf als etwa die Hautdurchspießung einer offenen Fraktur [42, 67, 68]. So können bereits einfache Hautkontusionen zur Nekrose mit anschließender Infektion führen und dadurch schwerwiegende Komplikationen während der Behandlung verursachen [64, 67, 68]. Aber auch bei offenen Frakturen ist die Weichteilverletzung nicht immer von vornherein klar einzuschätzen. Zwar besteht hier eine vollständige Kontinuitätsdurchtrennung der Hautbarriere im Bereich des knöchernen Defektes. Jedoch können geschädigte Weichteile trotzdem zum Teil unter noch intaktem Gewebe verborgen liegen und deren genaue Beurteilung deshalb letztendlich erst im Rahmen der chirurgischen Versorgung erfolgen [42].

Zur initialen Bewertung des Weichteilschadens offener sowie geschlossener Frakturen müssen von daher zunächst indirekte Zeichen wie äußeres Erscheinungsbild, Unfallmechanismus aber auch klinische und röntgenologische Befunde herangezogen werden [36, 64]. So lassen beispielsweise ausgedehnte Fragmentdislokationen, starke Knochenzertrümmerungen oder Fremdkörper- und Lufteinsprengungen im konventionellen Röntgenbild bereits Rückschlüsse auf das Vorhandensein bzw. den Schweregrad einer Weichteilverletzung zu [42, 64, 67, 68]. Die exakte Einteilung des Fraktur begleitenden Weichteilschadens in entsprechende Klassifikationssysteme ist jedoch letztendlich nur intraoperativ möglich [64].

Das Management offener und geschlossener Frakturen erfordert Wissen, Erfahrung sowie ein klares, prioritätenorientiertes Therapiekonzept [42]. Der Behandlungserfolg

wird dabei im Wesentlichen vom Ausmaß bzw. Schweregrad des zusätzlichen Weichteilschadens bestimmt [36, 97]. So gehen beispielsweise Unterschenkelfrakturen, die zumeist von erheblichen Weichteilverletzungen begleitet werden, mit einer vergleichsweise hohen Rate an Infektionen und Knochenheilungsstörungen einher [35, 108, 118].

Durch verbesserte Osteosyntheseverfahren in Verbindung mit der Erkenntnis, dass dem frühzeitigen Management des geschädigten Weichteilmantels höchste Priorität zukommt, ließ sich die Komplikationsrate hier in den letzten Jahren zwar bereits deutlich reduzieren [35]. Dennoch führt der Fraktur begleitende Weichteilschaden immer noch zu komplexen diagnostischen und therapeutischen Problemen [118].

Bis heute ist unklar, über welche spezifischen Pathomechanismen eine Weichteilverletzung die Frakturheilung negativ beeinflusst.

Möglicherweise führt der begleitende Weichteilschaden zu direkten zellulären Veränderungen im Bereich des verletzten Knochens. Dabei ist denkbar, dass es zu einer vermehrten Anflutung inflammatorischer Zellen kommt, die als unmittelbare Antwort auf traumatische Veränderungen in den Frakturspalt entlassen werden. Im Einzelnen sind hier vor allem Granulozyten und Makrophagen von entscheidender Bedeutung. Gleichzeitig ist eine verletzungsbedingte Beeinflussung auf Zellen des Knochenstoffwechsels vorstellbar. So führt der zusätzliche Weichteilschaden möglicherweise zu einer gesteigerten Bildung von Osteoklasten und Osteoblasten, die als Knochen abbauende bzw. aufbauende Zellen wesentlich in den Prozess der Frakturheilung involviert sind.

Darüber hinaus könnte sich der begleitende Weichteilschaden negativ auf die vaskuläre Situation im Frakturgebiet auswirken. Gefäße sind im Rahmen reparativer Vorgänge allgemein als Quelle für nutritive Substanzen und Sauerstoff von ausschlaggebender Bedeutung. Insofern ist es denkbar, dass eine traumatisch bedingte Reduktion der Vaskularisierung durch die zusätzliche Weichteilschädigung zur Minderversorgung des Frakturgebietes sowie einer damit verbundenen verzögerten oder ausbleibenden Knochenbruchheilung führt.

Zusätzlich ist die indirekte Einflussnahme des begleitenden Weichteilschadens auf den Regenerationsprozess wahrscheinlich.

Dabei kommt dem Periost eine zentrale Bedeutung zu. Es bildet die Grenze zwischen Knochenmatrix und Skelettmuskulatur und ist als Gefäß- sowie Nerven führendes

Gewebe entscheidend an der Aufrechterhaltung des Knochenstoffwechsels beteiligt. Sowohl dessen anatomische Lage als auch seine enge funktionelle Verknüpfung mit dem Knochen lassen Rückschlüsse auf Mechanismen zu, die sich negativ auf den Verlauf der Frakturheilung auswirken können. Dabei ist eine zusätzliche Ruptur des Periosts infolge der begleitenden Weichteilschädigung und die damit verbundene Veränderung der Stoffwechsellage im Frakturgebiet ebenso denkbar wie eine unmittelbare Beeinflussung des Muskeltraumas auf die zelluläre sowie vaskuläre Situation des intakten Periosts.

So bleibt der Einfluss eines schweren Weichteiltraumas auf Dauer und Qualität der Frakturheilung bis heute auf Hypothesen gestützt.

Gelänge es jedoch, die dem Weichteilschaden zugrundeliegenden zellulären und vaskulären Veränderungen im Frakturgebiet zu identifizieren, könnten neue, spezifische Therapieansätze entwickelt werden, die zu einer Verringerung von Komplikationen wie ausbleibender oder unvollständiger Frakturheilung und somit insgesamt zur Verbesserung der Prognose des Patienten führen.

3.2 Der Bewegungsapparat

3.2.1 Die Skelettmuskulatur

Mit einem Anteil von durchschnittlich 40 % bis 50 % am Gesamtkörpergewicht ist die Skelettmuskulatur das weitaus schwerste menschliche Organ [39, 93]. Sie bildet den aktiven Teil des Bewegungsapparates und dient vor allem dem Ablauf willkürlicher Bewegungen, aber auch der Fixierung von Körperhaltung sowie Gelenkstellung [109]. Die Skelettmuskulatur besteht aus etwa 220 Einzelmuskeln unterschiedlicher Form und Größe [93].

An den einzelnen Skelettmuskeln werden ein unterschiedlich geformter Bauch (Venter) sowie die meist deutlich dünneren Sehnen voneinander unterschieden [93, 109].

Der Venter besteht aus Skelettmuskelzellen und Bindegewebe [109].

Skelettmuskelzellen können ähnlich wie Nervenzellen chemisch sowie elektrisch erregt werden. Ihre Spezialisierung besteht hierbei darin, dass sie infolge der Erregung zur aktiven Verkürzung (Kontraktion) befähigt sind [93].

Aufgrund dieser Besonderheit werden bei Skelettmuskelzellen einzelne Bestandteile anders benannt als sonst üblich [109]. So heißt das endoplasmatische Retikulum hier sarkoplasmatisches Retikulum, beim Zytoplasma spricht man vom Sarkoplasma und die Zellmembran wird als Sarkolemm bezeichnet [41, 93, 109].

Skelettmuskelzellen gehören zu den größten Zellen des menschlichen Körpers [93]. Sie sind üblicherweise schlauchförmig und haben einen Durchmesser von 20-100 µm. Die Länge der Skelettmuskelzellen kann bis zu 10 cm betragen. Aus diesem Grunde werden sie auch als Fasern oder Skelettmuskelfasern bezeichnet [93].

Charakteristisch für Skelettmuskelzellen sind ihre zahlreichen Zellkerne (ca. 50-100 Kerne/mm Länge), die sich unmittelbar unterhalb des Sarkolemm befinden [41, 93, 109].

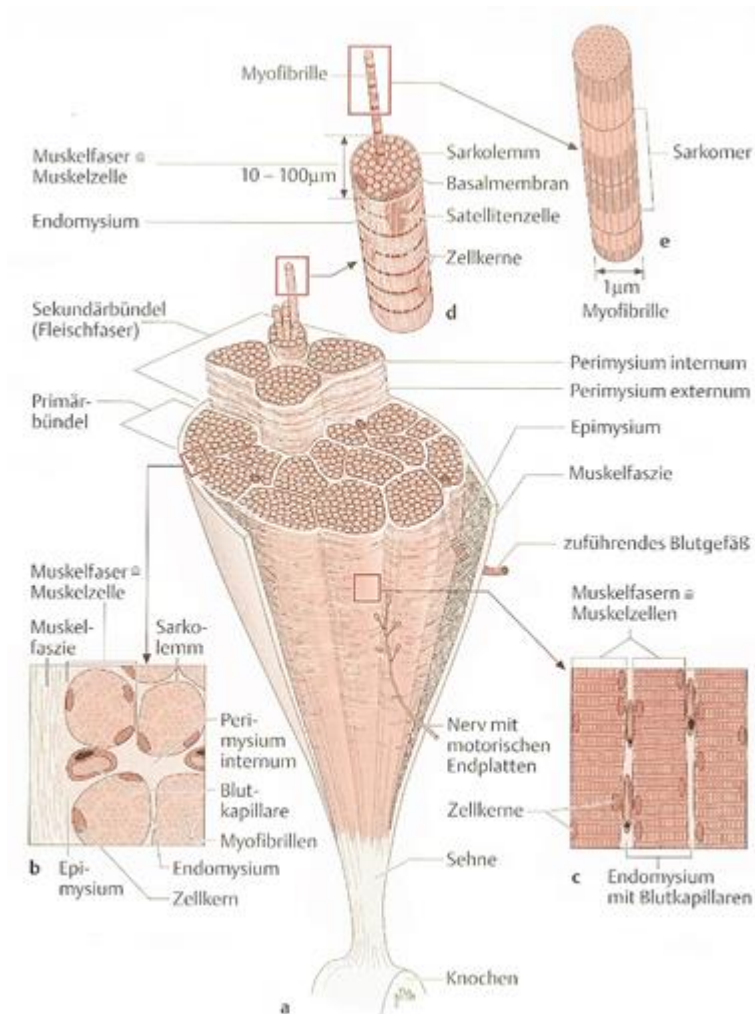
Diese sehr hohe Kernzahl entsteht im Embryonalstadium durch Fusionierung von mehreren hundert einkernigen Myoblasten (Vorläuferzellen der Muskelzellen) zu einem Synzytium [39, 41, 93]. Den Skelettmuskelzellen liegen außen, zwischen Sarkolemm und Basallamina, einige sehr schmale spindelförmige, bis zu 100 µm lange Satellitenzellen auf, die als aus der Embryonalentwicklung erhalten gebliebene Myoblasten angesehen werden können [39, 93]. Satellitenzellen sind dazu befähigt, sich zeitlebens zu teilen. Sie können mit bereits vorhandenen Skelettmuskelfasern verschmelzen oder neue Fasern bilden und sind somit in begrenztem Maße an Wachstum, Regeneration sowie Hypertrophie von Skelettmuskelzellen beteiligt [39, 93]. Das Sarkoplasma der Skelettmuskelfasern ist fast vollständig mit speziellen Eiweißstrukturen (Myofibrillen) ausgefüllt [41, 93, 109].

Myofibrillen bestehen aus dünnen Aktin- sowie dicken Myosinfilamenten [41, 93]. Sie sind parallel zueinander entlang der Längsachse von Skelettmuskelzellen angeordnet und durch quer verlaufende Trennwände (Z-Scheiben) in zahlreiche, etwa 2,5 µm lange Einheiten (Sarkomere) gegliedert [93] (siehe Abbildung 3-1).

Diese regelmäßige Anordnung zeigt sich lichtmikroskopisch als gleichmäßige Hell-Dunkel-Bänderung, welche dem Skelettmuskel auch die Bezeichnung quer gestreifter Muskel zugetragen hat [93].

Myofibrillen stellen den Ausgangspunkt für das Kontraktionsvermögen der Skelettmuskelzellen dar [93, 109]. Die Muskelkontraktion beruht auf einem Gleitfilamentmechanismus. In dessen Verlauf gleiten Aktin- sowie Myosinfilamente unter Energieverbrauch (ATP) aneinander vorbei und die beiden Z-Scheiben eines

Sarkomern nähern sich einander. Dabei verkürzt sich jedes einzelne Sarkomer. Aktin- sowie Myosinfilamente behalten jedoch ihre ursprüngliche Länge [93].



Skelettmuskelfasern sind eng mit Bindegewebe verknüpft [93]. Dabei bilden Muskelbindegewebe und Fasern eine Funktionsgemeinschaft [93, 131]. Das Bindegewebe ist in Form von Hüllen angelegt, welche den Muskel unterteilen. Es übernimmt als Gefäße sowie Nerven führendes Gewebe die Versorgung und ermöglicht, dass sich Skelettmuskelfasern frei untereinander verschieben können. Darüber hinaus vermindert das Muskelbindegewebe durch Herabsetzen des Reibungswiderstandes den Kraftverlust während der Kontraktion [93].

Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des Skelettmuskels (Quelle Schünke [93])

Abbildung lizenziert durch Thieme Verlag

Die meisten Skelettmuskeln werden außen von einer als Muskelfaszie oder Fascia musculorum bezeichneten Hülle aus straffem Bindegewebe umschlossen [93, 131]. Sie hält den Muskel zusammen und ermöglicht ihm, sich gegen seine Umgebung zu verschieben [93].

In Muskelfaszien sind die Kollagenfaserbündel des Bindegewebes scherengitterartig angeordnet [93, 131]. Diese netzartige Struktur gewährleistet, dass sich der Skelettmuskel an seine mit dem Kontraktionszustand wechselnde Form anpassen kann [131].

Einzelne Skelettmuskeln sind jeweils von Einzelfaszien umhüllt. Darüber hinaus werden im Bereich der Extremitäten häufig genetisch und funktionell einheitliche Muskelgruppen durch eine Gruppenfaszie zusammengeschlossen [93, 131].

Gruppenfaszien stoßen meist in Form von Bindegewebssepten (*Septa intermuscularia*) aneinander, die mit dem Knochen verankert sind. Auf diese Weise bilden Gruppenfaszien, *Septa intermuscularia* und Knochen nicht dehnbare osteofibröse Kanäle (Kompartimente), in denen sich Muskeln, Nerven sowie Gefäße befinden [93, 131].

Unmittelbar unter der Muskelfaszie liegt das Epimysium (gr. *epi*, auf + *mys* Muskel) [41, 93, 131]. Hierbei handelt es sich um eine Schicht aus lockerem Bindegewebe, welche die Faszie mit dem Skelettmuskel verbindet. Sie enthält größere Blut- und Lymphgefäße, sowie versorgende Nervenfasern [93].

Vom Epimysium aus erstrecken sich dünne Bindegewebssepten ins Innere des Muskels [93, 131]. Diese schließen als Perimysium (gr. *peri*, um herum) einzelne Skelettmuskelfasern zu größeren Sekundär- sowie kleineren Primärbündeln zusammen [93, 131].

Dabei werden die als Sekundärbündel oder Fleischfasern bezeichneten, mehrere Millimeter dicken und mit bloßem Auge noch gut sichtbaren Bündel von Fasern durch das Perimysium externum zusammengeschlossen [93]. In seinem lockeren Bindegewebe verlaufen Aufzweigungen der Gefäße und Nerven, die so bis zum Muskelinneren gelangen [93].

Sekundärbündel werden durch bindegewebige Abspaltungen des Perimysium externum weiter in Primärbündel untergliedert. Sie besitzen einen mittleren Querschnitt von ca. 1 mm² und enthalten beim Erwachsenen etwa 250 Fasern. Primärbündel sind wiederum jeweils durch das Perimysium internum zusammengefasst [93].

Einzelne Skelettmuskelfasern werden schließlich vom Endomysium (gr. *endo*, innen) umspinnen [39, 41, 93, 131]. In dieser zarten Bindegewebsschicht verlaufen zahlreiche Kapillaren, Lymphgefäße, sowie Endaufzweigungen der Nerven mit ihren motorischen Endplatten [41, 93].

Die Sehnen eines Skelettmuskels bestehen im Wesentlichen aus zugfesten Kollagenfaserbündeln [93, 109]. Diese heften sich am Knochen bzw. an Strukturen des Muskelbindegewebes (z.B. Faszien, *Septa intermuscularia*) fest und übertragen die

beim Kontraktionsvorgang entstehende Zugkraft direkt oder indirekt vom Muskel auf das Skelett [93, 109, 131].

So stellt die Skelettmuskulatur eine Funktionsgemeinschaft aus Muskelzellen, Bindegewebe und Sehnen dar, welche den Ablauf willkürlicher Bewegung ermöglicht.

3.2.2 Knochen

Knochen nehmen ca. 10 % vom menschlichen Körpergewicht ein. Dabei bilden etwa 200 Einzelknochen das Skelett aus, welches den passiven Teil des Bewegungsapparates darstellt [93].

Außerdem bieten Knochen zentralem Nervensystem sowie Thoraxorganen mechanischen Schutz, dienen als Bildungsort für Blutzellen und fungieren darüber hinaus als Speicher für Kalzium- sowie Phosphationen [41].

Die einzelnen Knochen des menschlichen Skelettes sind verschieden geformt. In Abhängigkeit von ihrem äußeren Erscheinungsbild lassen sich hierbei lange (z. B. Röhrenknochen der freien Extremitäten), kurze, platte sowie unregelmäßige Vertreter voneinander unterscheiden [93].

Knochengewebe ist nach dem Zahngewebe die härteste Substanz des menschlichen Organismus [93]. Trotz seiner großen physikalischen Härte besitzt es dabei jedoch zeitlebens die Fähigkeit, sich durch permanente Umbauprozesse an unterschiedliche mechanische Beanspruchungen funktionell anzupassen [41, 93, 109].

Histologisch stellt das Knochengewebe einen Verband von Osteozyten (Knochenzellen) dar, der allseitig von Extrazellulärmatrix umgeben wird [93].

Die Matrix ist aus etwa 30 % organischen sowie 70 % anorganischen Bestandteilen zusammengesetzt [93, 109].

Der organische Anteil wird dabei zu 95 % von Kollagen-I-Fasern gebildet [41, 109]. Die verbleibenden 5 % entfallen hier im Wesentlichen auf Proteoglykane sowie Glykoproteine [41].

Zu den anorganischen Bestandteilen gehören vor allem Kalzium und Phosphat [41, 93, 109]. Diese sind hauptsächlich in Form von Hydroxylapatitkristallen ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) entlang der Kollagenfasern des organischen Matrixanteils angeordnet und verleihen dem Gewebe seine große physikalische Härte [41, 93, 109].

Darüber hinaus kommen in wachsendem sowie im Umbau befindlichen Knochengewebe zusätzlich noch Osteoblasten und Osteoklasten vor [93].

Bei Osteoblasten handelt es sich um Knochen bildende Zellen [93, 109]. Diese produzieren den auch als Osteoid bezeichneten organischen Anteil der knöchernen Extrazellulärmatrix [41, 93, 109].

Osteoblasten entstehen durch Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen und liegen dort, wo Knochengewebe gebildet wird, im epithelartigen Verband (Osteoblastenfront) vor [93]. Sie besitzen ein gut ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum. Hier werden die Bestandteile des Osteoids synthetisiert, dann im Golgi-Apparat modifiziert und verpackt, sowie anschließend ohne vorherige Speicherung (konstitutiv) sezerniert [41]. Während dessen mauern sich die Osteoblasten zunehmend in das neu produzierte Osteoid ein und differenzieren zu Osteozyten [93, 109].

Durch nachfolgende Einlagerung von Kalzium sowie Phosphat entlang der Kollagenfasern des Osteoids (Mineralisation, Verkalkung) entsteht schließlich neues Knochengewebe [41, 93, 109].

Die Mineralisation der organischen Matrix erfolgt ebenfalls mithilfe von Osteoblasten. Dabei findet die Einlagerung des Kalziumphosphates in zwei Phasen statt. In der ersten als vesikulär bezeichneten Phase werden etwa 30-200 nm große mit Kalzium gefüllte Matrixvesikel aus der apikalen Membran der Osteoblasten in die neu gebildete Kollagenmatrix freigesetzt.

Anschließend binden die positiv geladenen Vesikel an die negativ geladenen sulfatierten Proteoglykane der organischen Matrix.

Danach kommt es zum Abbau der Proteoglykane und einem nachfolgenden Ausgleich des Kalziumüberschusses in den Vesikeln. Daneben werden phosphathaltige Verbindungen durch von den Osteoblasten freigesetzte Alkalische Phosphatase abgebaut. Die durch den Abbau entstehenden Phosphationen gelangen nun ins Innere der Matrixvesikel wo sie zusammen mit den Kalziumionen Hydroxylapatitkristalle bilden. Mit zunehmender Hydroxylapatitbildung tritt die zweite als fibrillär bezeichnete Phase ein. Durch den Anstieg der Hydroxylapatitkonzentration zerreißen die Matrixvesikel und Hydroxylapatit wird in die neu gebildete anorganische Knochenmatrix freigesetzt [28, 125].

Der Abbau von Knochengewebe erfolgt dagegen durch Osteoklasten [41, 93, 109]. Hierbei handelt es sich um bewegliche vielkernige Riesenzellen, die bei einem maximalen Durchmesser von 100 µm bis zu 50 Zellkerne enthalten können [41, 93, 109]. Sie entstehen durch Fusionierung sowie anschließender Differenzierung von aus dem Blut eingewanderten Monozyten [41, 93].

Aktive Osteoklasten stehen in engem Kontakt zur Knochenmatrix und bilden an deren Oberfläche Resorptionshöhlen (Howship-Lakunen). Hier findet der Abbau des Knochengewebes statt [93].

In den Resorptionshöhlen herrscht ein saures Milieu vor. Als Folge davon lösen sich zunächst die Hydroxylapatitkristalle der knöchernen Extrazellulärmatrix auf, wodurch das Knochengewebe demineralisiert. Danach kommt es zum Abbau des organischen Matrixanteils mithilfe hydrolytischer Enzyme (Kollagenasen, Kathepsine) aus den Prälysosomen der Osteoklasten. Diese arbeiten optimal im sauren Milieu und hydrolysieren die Kollagenfasern des demineralisierten Knochengewebes [41]. Abschließend wird das so aufgespaltene Kollagen von den Osteoklasten resorbiert sowie intrazellulär abgebaut [93].

Die Kollagenfasern der knöchernen Extrazellulärmatrix können grundsätzlich unterschiedlich angeordnet sein. Abhängig davon lässt sich das Knochengewebe weiter in Geflechtknochen (Primärknochen) und Lamellenknochen (Sekundärknochen) untergliedern [41, 109].

Geflechtknochen ist durch eine zufällige Anordnung der Kollagenfasern charakterisiert [41]. Zudem verlaufen seine Blutgefäße sowie Osteozyten regellos [93].

Im Vergleich zum höher strukturierten Lamellenknochen besitzt Geflechtknochen eine größere Wachstumspotenz mit der Fähigkeit zur Bildung von Leisten und Bälkchen (primäre Spongiosa), aus denen in kurzer Zeit relativ weiträumige Gerüstwerke entstehen können. Allerdings ist er ärmer an Osteozyten, weniger stark mineralisiert und verfügt insgesamt über eine deutlich geringere mechanische Stabilität als Lamellenknochen [93].

Geflechtknochen entsteht während der Knochenentwicklung [41, 93, 109]. Durch höhere funktionelle Beanspruchung, wie beispielsweise das zunehmende Körpergewicht, wird er dann in den ersten Lebensjahren fast überall zu Lamellenknochen umgebaut [93, 109]. Beim Erwachsenen kommt Geflechtknochen

unter anderem noch in bestimmten Bereichen des Schädels, an den Ansatzstellen von Sehnen und Bändern sowie bei der Frakturheilung (siehe Kapitel 3.4) vor [41, 109].

Die Bildung von Geflechtknochen erfolgt grundsätzlich über zwei Wege. Dabei lassen sich desmale (primäre oder direkte) und chondrale (sekundäre oder indirekte) Ossifikation (Verknöcherung) voneinander unterscheiden [109].

Bei der desmalen Ossifikation entwickelt sich das Knochengewebe unmittelbar im Mesenchym (embryonales Bindegewebe) aus mesenchymalen Vorläuferzellen [93].

Den Startpunkt für die Knochenentstehung bildet dabei ein primäres Ossifikationszentrum [41]. Hier wandeln sich zunächst Gruppen von mesenchymalen Zellen in Osteoblasten um. Die organischen Bestandteile der knöchernen Extrazellulärmatrix werden produziert und verkalken anschließend. Dies führt zur Einkapselung einiger Osteoblasten, sowie einer damit verbundenen Bildung von Knochenbälkchen [41]. Zwischen die Bälkchen wachsen Blutgefäße ein. Außerdem differenzieren sich hier weitere Mesenchymzellen in Knochenmarkszellen oder Osteoblasten, wodurch das Ossifikationszentrum wächst. Schließlich verschmelzen die Ossifikationszentren eines Knochens miteinander und ersetzen so das ursprüngliche Bindegewebe [41].

Auf diese Weise entstehen zum Beispiel Schädel- sowie Gesichtsknochen aber auch Bereiche vom Schlüsselbein [93, 109].

Die Entwicklung des Rumpf- und Extremitätenskeletts erfolgt dagegen größtenteils durch chondrale Ossifikation [93].

Auch hier geht das Knochengewebe aus mesenchymalen Zellen hervor. Allerdings erfolgt die Knochenbildung dabei nicht auf direktem Wege. Vielmehr entsteht zunächst ein vorgeformtes Modell des späteren Knochens aus hyalinem Knorpel, der dann mit fortschreitender Entwicklung allmählich abgebaut und im gleichen Umfang durch Knochengewebe ersetzt wird [93, 109].

Die Substitution des Knorpelmodells kann wiederum auf zwei Wegen stattfinden. Je nach Verlauf lassen sich hierbei enchondrale sowie perichondrale Ossifikation voneinander unterscheiden [109].

Bei der enchondralen Ossifikation wird das Knorpelgewebe schrittweise von innen her durch Knochen ersetzt [109].

Dabei vergrößern sich zunächst die Zellen des Knorpels (Chondrozyten), gehen anschließend zugrunde und lassen dadurch Lakunen zurück. Gleichzeitig kommt es zur Mineralisierung der verbleibenden Knorpelmatrix [41, 109].

Später wachsen Blutgefäß- sowie Bindegewebsknospen in die Lakunen ein. Mit den Blutgefäßen dringen mesenchymale Stammzellen vor, welche anschließend zu Chondroklasten (Knorpel abbauende Zellen) differenzieren. Durch deren knorpelauflösende Wirkung entstehen Hohlräume. In diese wandern weitere mesenchymale Stammzellen ein und differenzieren zu Osteoblasten, die dann den organischen Anteil der knöchernen Extrazellulärmatrix produzieren [41, 109].

Durch nachfolgende Mineralisation entsteht schließlich enchondrales Knochengewebe [109].

Bei der perichondralen Ossifikation verknöchert das Knorpelmodell dagegen von außen nach innen. Hier erfolgt die Knochenbildung durch Osteoblasten, welche sich aus mesenchymalen Stammzellen des Perichondriums (Knorpelhaut) differenzieren [109].

Im Vergleich zum Geflechtknochen weist der sekundär gebildete Lammellenknochen einen deutlich höheren Ordnungsgrad auf.

Er ist durch den schichtenartigen Aufbau von helikal verlaufenden, parallel angeordneten Kollagenfaserbündeln mit entsprechender Parallelausrichtung der Hydroxylapatitkristalle charakterisiert [109].

Seine Architektur wird am histologischen Transversalschnitt eines Röhrenknochens besonders deutlich [93] (siehe Abbildung 3-2).

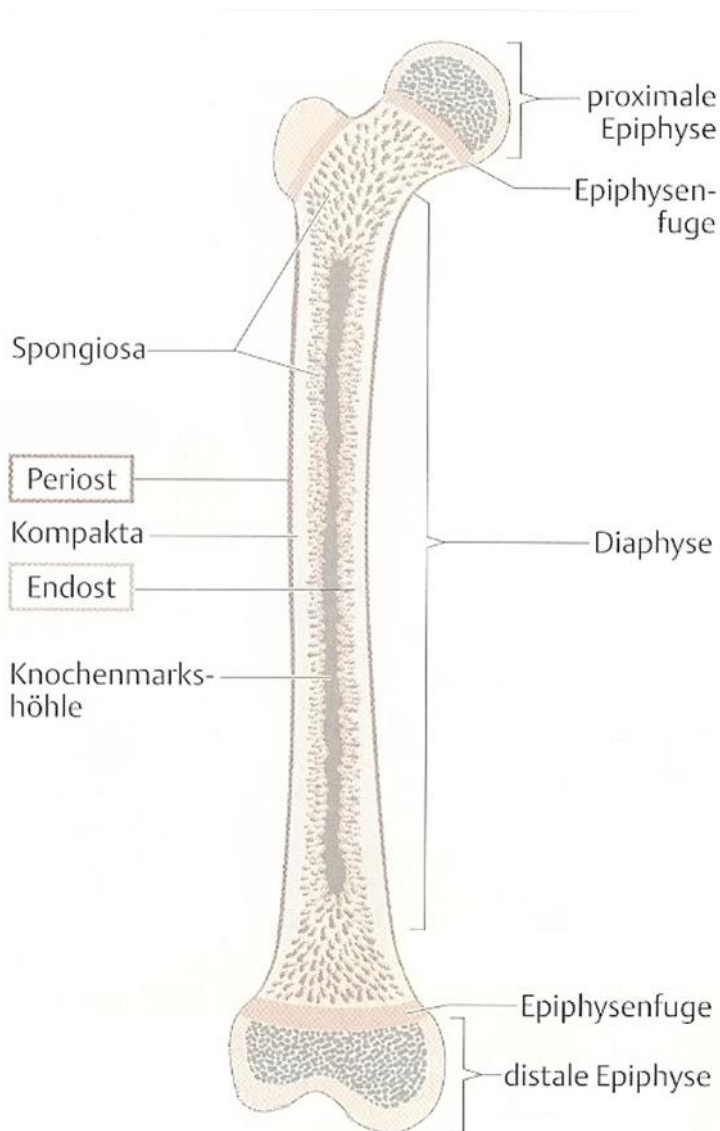


Abbildung 3-2. Schematische Darstellung des Röhrenknochens, modifiziert nach Schünke [93]

Abbildung lizenziert durch Thieme Verlag

Nach abgeschlossenem Längenwachstum verknöchern die Epiphysenfugen und werden dann als Epiphysenlinien bezeichnet [93].

Bereits makroskopisch sind im Querschnitt des Röhrenknochens zwei unterschiedliche Bauformen erkennbar.

Im Einzelnen lassen sich eine äußere kompakte Schicht (Substantia compacta oder Kortikalis) von innenliegenden Gebieten aus feinen Knochenbälkchen (Knochen trabekel) unterscheiden, die nach Art eines Schwammes organisiert sind (Substantia spongiosa) [41, 93].

Beim Röhrenknochen lassen sich grundsätzlich ein länglicher Schaft (Diaphyse) sowie zwei mit Gelenkknorpel überzogene verbreiterte Knochenenden (Epiphysen) voneinander unterscheiden [93].

Juvenile Röhrenknochen weisen darüber hinaus zwischen Epiphysen und Diaphyse jeweils Zonen aus hyalinem Knorpel (Epiphysenfugen, Wachstumsfugen) auf, in denen das Längenwachstum stattfindet. Dabei kommt es durch enchondrale Ossifikation zunächst zur Ausbildung von Geflechtknochen, der später durch Lamellenknochen ersetzt wird. Den Epiphysenfugen benachbarte Teilabschnitte der Diaphyse (Metaphysen) entsprechen dabei jeweils dem Knochenbildungsbereich.

Epiphysen bestehen hauptsächlich aus Substantia spongiosa, die von einer dünnen Schicht Kortikalis überzogen ist [41]. In den Zwischenräumen ihrer Knochen trabekel findet sich das rote, Blut bildende Knochenmark [41, 93, 109].

Die Diaphyse ist dagegen fast vollständig aus Kortikalis aufgebaut, der sich nach innen eine schmale Zone aus Substantia spongiosa anschließt. Ein Großteil des Knochenschafts enthält im Inneren kein Knochengewebe. Dieser Bereich wird auch als Knochenmarkshöhle oder Markhöhle (Cavum medullare) bezeichnet [93].

Bei Neugeborenen enthält die Markhöhle rotes Knochenmark, das jedoch im Laufe von Kindheit und Jugend durch gelbes Fettmark ersetzt wird [41].

Äußere und innere Oberflächen des Lamellenknochens sind nahezu überall von dünnen Bindegewebsschichten bedeckt, die als Periost (Knochenhaut, siehe Kapitel 3.2.3) bzw. Endost bezeichnet werden [41].

Die Substantia compacta ist mit Ausnahme überknorpelter Gelenkflächen und chondral-apophysärer Sehnenansatzzonen außen vom Periost überzogen. Dagegen sind innere Oberflächen der Kortikalis, sowie sämtliche Spongiosatrabekel mit Endost ausgekleidet [93].

Während sich Kortikalis und Substantia spongiosa makroskopisch voneinander unterscheiden, weisen beide Bauformen unter dem Mikroskop die Struktur von Lamellenknochen auf [41].

Sein Aufbau wird am histologischen Transversalschnitt der diaphysären Kompakta eines Röhrenknochens besonders deutlich [93, 109] (siehe Abbildung 3-3).

Im Lamellenknochen bilden Kollagenfasern und übrige Matrix ca. 3-7 µm dicke Lamellen, die in Schichten konzentrisch um einen zentralen Kanal (Havers-Kanal) angeordnet sind [41].

Havers-Kanal sowie Lamellen werden zusammen als Havers-System oder Osteon bezeichnet und stellen den Grundbaustein des Lamellenknochens dar [41]. Innerhalb der Lamellen eines Osteons sind die Kollagenfasern parallel zueinander angeordnet [41]. Dabei wickeln sie sich schraubenförmig um den Havers-Kanal. Die Verlaufsrichtung der Kollagenfasern wechselt von Lamelle zu Lamelle, so dass sich Fasern benachbarter Lamellen annähernd im rechten Winkel schneiden [41]. Zwischen den einzelnen Lamellen befinden sich die Osteozyten, welche untereinander über zahlreiche feine Zytoplasmafortsätze in Verbindung stehen [41, 93]. Osteone sind lange, sich oft aufgabelnde Zylinder [41]. Sie verlaufen entlang der Längsachse des

Knochenschafts [41] und grenzen sich von ihrer Umgebung durch eine Schicht aus kollagenarmer Extrazellulärmatrix (Kitt- bzw. Zementlinie) ab [41, 93, 109].

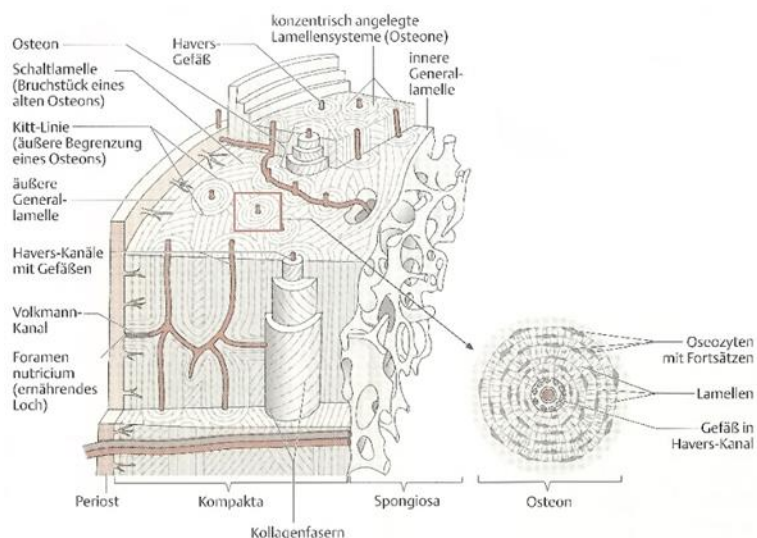


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung des Lamellenknochens, modifiziert nach Schünke [93]

Abbildung lizenziert durch Thieme Verlag

Organisation bestehend aus Osteonen, äußeren und inneren Generallamellen sowie Schaltlamellen [41].

Generallamellen grenzen den Knochen nach außen und innen ab [109]. Dabei sind die äußeren Generallamellen unmittelbar unter dem Periost lokalisiert [41, 109]. Innere Generallamellen liegen dagegen zur Markhöhle hin über dem Endost [109].

Zwischen äußeren und inneren Generallamellen verlaufen zahlreiche Osteone [41, 109]. Daneben finden sich hier auch irregulär geformte Gruppen von Lamellen [41]. Diese werden als Schaltlamellen bezeichnet und stellen Reste früherer Osteone dar, welche durch Umbauprozesse des Knochengewebes entstanden sind [41, 93, 109].

Neben der Kortikalis weist auch die Substantia spongiosa einen lamellären Aufbau von Kollagenfasern sowie Extrazellulärmatrix auf.

Hier liegen die Lamellen jedoch wie beim Sperrholz in Form von Platten aufeinander. Außerdem besitzen Spongiosatrabekel keine eigenen Blutgefäße [93].

Die Bildung des Lamellenknochens beginnt bereits am Ende der Fetalzeit.

Hierbei entsteht die erste Generation von aus Geflechtknochen hervorgehenden Osteonen [93].

Im Rahmen des Umbaus dringen über einsprossende Blutgefäße zunächst Osteoklasten in den Geflechtknochen vor, die hier einen gefäßführenden Kanal

Die Havers-Kanäle von Osteonen enthalten nutritive Blutgefäße, Nerven sowie lockeres Bindegewebe [41, 93, 109]. Untereinander, aber auch mit den Gefäßen von Periost und Markhöhle, stehen sie durch kurze, quer sowie schräg verlaufende Volkmann-Kanäle in Verbindung [41, 93].

In der Kompakta des Röhrenknochens zeigen die Lamellen eine typische

(Resorptionskanal oder -höhle) freilegen. Aus dem gefäßbegleitenden Bindegewebe differenzieren sich Osteoblasten. Diese lagern sich an die gesamte Wand des Resorptionskanals an und sezernieren knöchernen Extrazellulärmatrix. Mit Beginn der Matrixsekretion entsteht die erste konzentrische Knochenlamelle [93]. Durch den Anbau weiterer Lamellen wird das Lumen des Resorptionskanals immer weiter eingeengt, bis schließlich nur noch der Havers-Kanal übrig bleibt [93].

Auf diese Weise ist ein neues Osteon entstanden, welches aus 10 oder mehr konzentrischen Knochenlamellen besteht und dessen mittlerer Durchmesser etwa 250-350 µm beträgt [93].

Im Lamellenknochen finden während des gesamten Lebens Umbauprozesse statt [41, 93]. Dadurch ist er in der Lage, sich verändernden statischen sowie mechanischen Bedingungen permanent anzupassen [93, 109].

Während des Umbaus werden alte Lamellensysteme von Osteoklasten abgebaut und diese anschließend mittels Osteoblasten durch neue ersetzt [93, 109]. Hierbei kommt es im Wachstumsalter vor allem zum Aufbau, wohingegen nach dem 50. Lebensjahr allmählich der Abbau überwiegt [41, 93].

3.2.3 Das Periost

Das Periost überzieht mit Ausnahme überknorpelter Gelenkflächen sowie chondral-apophysärer Sehnenansätze die gesamte Oberfläche der Substantia compacta des Knochens [93]. Es stellt eine gefäß- und nervenreiche Bindegewebshülle dar, die aus zwei funktionell unterschiedlichen Schichten aufgebaut ist. Dabei unterscheidet man das äußere, dem Knochen abgewandte Stratum fibrosum vom innen liegenden Stratum osteogenicum (Kambiumschicht) [22, 90, 93].

Das Stratum fibrosum besteht aus straff angeordneten Kollagenfaserbündeln (Sharpey-Fasern) sowie elastischen Fasergeflechten, die in den Knochen einstrahlen und so das Periost mit der Knochenmatrix verankern. Außerdem enthält es größere Blutgefäße, deren Äste über sog. ernährende Löcher (Foramina nutricia) in das Knocheninnere gelangen [93].

Das Stratum osteogenicum zeichnet sich durch eine lockere Bauweise aus und enthält zahlreiche Gefäße sowie Nervenfasern. Im juvenilen Periost ist es reich an Osteoblasten und deren Vorläuferzellen, die während des Wachstums entscheidend an der Neubildung von Knochengewebe beteiligt sind (siehe Kapitel 3.2.2). Beim Erwachsenen finden sich dagegen deutlich weniger Zellen, so dass eine klare Abgrenzung vom Stratum fibrosum kaum mehr möglich ist [22, 114]. Dabei bleiben hier vor allem Vorläuferzellen erhalten, die bei Bedarf, beispielsweise während der Frakturheilung, zu reifen Osteoblasten differenzieren können [93].

3.3 Heilung der Skelettmuskulatur

Eine Verletzung der Skelettmuskulatur verursacht unabhängig von ihrem Entstehungsmuster immer die Zerstörung einzelner Muskelzellen sowie umliegender Gefäße [76]. Daran schließen sich zahlreiche Reparaturvorgänge an, in deren Verlauf die verletzungsbedingt zerstörten Strukturen zunächst abgebaut und später durch intakte Skelettmuskulatur oder narbiges Bindegewebe ersetzt werden [39, 76, 107]. Dabei lassen sich grundsätzlich vier zeitlich abhängige, miteinander in Beziehung stehende Heilungsphasen unterscheiden, die man als Degeneration, Inflammation, Regeneration sowie Fibrose bezeichnet [39, 76, 107].

Die Degeneration ist im Wesentlichen durch den fortschreitenden Untergang von Muskelzellen charakterisiert [39, 50, 76].

Als direkte Folge der Verletzung kommt es hierbei zunächst zur Zerstörung des Sarkolemmes sowie einem damit verbundenen Einstrom extrazellulärer Kalziumionen ins Sarkoplasma [9, 39, 50, 76, 110, 111].

Der verletzungsbedingte Kalziuminflux ist für verschiedene funktionelle sowie morphologische Veränderungen der Skelettmuskelzellen von zentraler Bedeutung. Durch die erhöhte Kalziumionenkonzentration in den Muskelzellen wird zunächst die Architektur einzelner Myofibrillen zerstört. Außerdem verformen sich Mitochondrien zu runden Zellorganellen und verlieren gleichzeitig ihre regelmäßige Verteilung innerhalb der Muskelzelle. Eine weitere Folge des ungehinderten Kalziumeinstroms ist der Verlust von zellulärem Glykogen [9].

Die Zerstörung der Zellstruktur und die Minderversorgung der Zellen mit Energie sowie Nährstoffen führen zur Muskelzellnekrose.

Gleichzeitig kommt es durch die erhöhte intrazelluläre Kalziumionenkonzentration zur Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Proteasen, die Strukturproteine der Muskelzellen hydrolytisch abbauen und somit die Muskelzellnekrose vorantreiben [9, 39, 50].

Parallel dazu führt die Verletzung der Gefäße des stark vaskularisierten Skelettmuskelgewebes zur Ausbildung eines Hämatoms, das ein weiteres Fortschreiten der Muskelzelledegeneration begünstigt [39, 50].

Durch die Blutung kommt es zur Aktivierung des Gerinnungssystems mit nachfolgender Hypoxie sowie einer damit verbundenen Azidose. Gleichzeitig setzen die während der Gerinnung gebildeten Thrombozytenaggregate chemotaktische Botenstoffe frei, welche für die nachfolgende Inflammation von zentraler Bedeutung sind [42, 67].

Die Inflammation ist durch das Einsprossen kleiner Blutgefäße sowie die Einwanderung von Immunzellen in das nekrotische Skelettmuskelgewebe gekennzeichnet [39, 50, 76]. Etwa eine Stunde nach Eintritt der Verletzung sind neutrophile Granulozyten die ersten Immunzelltypen, die in das geschädigte Gebiet einwandern. Ihre primäre Funktion besteht in der Phagozytose nekrotischer Skelettmuskelfasern und zellulärer Abbauprodukte. Darüber hinaus dienen sie als Quelle für proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-8 (IL-8) und Tumor necrosis faktor- α (TNF- α). Diese führen als chemotaktische Botenstoffe zur Einwanderung von Monozyten ins verletzte Gebiet und treiben dadurch die Inflammation voran [9, 47, 50].

Neutrophilen Granulozyten wird jedoch auch ein negativer Einfluss auf den Heilungsprozess zugeschrieben.

Sie enthalten das lysosomale Enzym Myeloperoxidase sowie die reduzierte Form des Redoxcoenzym Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), welche an der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und freier Radikale wie Hyperoxidanion ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Stickstoffmonoxid (NO) sowie Hydroxylradikal (HO^{\cdot}) beteiligt sind [9, 50].

Welche Rolle diese Moleküle während der Muskelinflammation- und heilung spielen ist bis heute noch nicht vollständig geklärt.

Möglicherweise verursachen sie durch ihre hohe chemische Reaktivität eine direkte Schädigung von Zellstrukturen und beschleunigen dadurch die Muskeldegeneration. Darüber hinaus ist vorstellbar, dass sie als hoch reaktive Verbindungen zur vermehrten Freisetzung proinflammatorischer Proteine wie etwa NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) führen, die als spezifische Transkriptionsfaktoren den Prozess der Inflammation verstärken [9, 50, 52].

Zirka 12 Stunden nach Eintritt der Verletzung hat die Zellzahl neutrophiler Granulozyten ihr Maximum erreicht [50].

Im weiteren Verlauf der Inflammation wandern vermehrt Monozyten in das nekrotische Skelettmuskelgewebe und differenzieren zu Makrophagen [9].

Bislang wurden im Skelettmuskel zwei Subpopulationen von Makrophagen identifiziert. Sie unterscheiden sich hinsichtlich der Expressierung spezifischer Antigene und werden gemäß ihrer Antigenexpression in ED¹⁺- bzw. ED²⁺- Makrophagen unterteilt [9, 50].

ED¹⁺- Makrophagen treten als erste Makrophagenpopulation im verletzten Gebiet auf. Ihre Funktion besteht hauptsächlich in der Fortführung des Abbaus nekrotischer Skelettmuskelfasern und zellulärer Abbauprodukte durch Phagozytose. Etwa 24 Stunden nach Eintritt der Verletzung erreicht die Zellzahl der ED¹⁺- Makrophagen ihren Höchstwert [50].

Danach nimmt die Anzahl der ED²⁺- Makrophagen zu. Sie stellen zum späten Zeitpunkt der Inflammation die prädominante Makrophagen-Subpopulation dar und bleiben darüber hinaus als residente Zellen bis zum Abschluss der Skelettmuskelheilung erhalten. Ihre Funktion im Rahmen der Inflammation ist noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise dienen sie als Quelle für Wachstumsfaktoren wie Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) oder Platelet-derived growth factor (PDGF), so dass sie die Proliferation bzw. Differenzierung von Myoblasten im Rahmen der nachfolgenden Regeneration positiv beeinflussen [9, 50].

Die Regeneration beginnt etwa sieben bis zehn Tage nach Eintritt der Verletzung. Ausgangspunkt der Wiederherstellung von intaktem Skelettmuskelgewebe stellen die zwischen Sarkolemm und Basallamina lokalisierten Satellitenzellen dar (siehe Kapitel 3.2.1). Diese werden unter Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren wie Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) oder Platelet-derived growth factor (PDGF) aktiviert, proliferieren und differenzieren schließlich zu Skelettmuskelfasern [39, 50, 76].

Bis etwa zwei Wochen nach Eintritt der Verletzung nimmt die Regenerationsleistung stetig zu, während die Anzahl gebildeter Skelettmuskelzellen dann bis hin zum Ende des Heilungsprozesses wieder abnimmt. Etwa drei Wochen nach Verletzungseintritt beginnt die Fibrose, welche vor allem durch die Synthese von Kollagen Typ I und Typ III gekennzeichnet ist [39, 50]. Beide Kollagentypen sind Bestandteil des Skelettmuskelbindegewebes und spielen somit für die Wiederherstellung der voll funktionsfähigen Skelettmuskulatur eine entscheidende Rolle [9, 76]. Die Kollagensynthese nimmt bis zum Abschluss der Skelettmuskelheilung, der etwa vier Wochen nach Eintritt der Verletzung erreicht ist, stetig zu [39].

Die Zunahme der Bindegewebsdichte auf der einen Seite und die verminderte Bildung von Skelettmuskelfasern auf der anderen Seite kann zu einer eingeschränkten Skelettmuskelregeneration sowie einer damit verbundenen Narbenbildung führen. Insofern stellt die Heilung der Skelettmuskulatur ein empfindliches Gleichgewicht zwischen Muskelfaserregeneration und Synthese von Bindegewebe dar, dessen Lage den Erfolg des Heilungsverlaufs entscheidend mitbestimmt [9, 39, 76].

3.4 Frakturheilung

Eine Fraktur geht immer mit der Zerstörung von Knochenmatrix, versorgenden Blutgefäßen sowie angrenzender Weichteile einher [7, 14, 77].

Die sich anschließende Frakturheilung führt zur Wiederherstellung vollständig funktionsfähigen Knochengewebes (Restitutio ad integrum) [18, 102]. Eine im Rahmen regenerativer Prozesse üblicherweise auftretende Narbenbildung unterbleibt hier fast vollständig [14, 24, 26, 102].

Grundsätzlich unterscheidet man primäre (direkte) und sekundäre (indirekte) Frakturheilung [14, 57, 88, 95].

Primäre Frakturheilung setzt eine weitestgehende mechanische Stabilität voraus, die praktisch nur nach rigider Fixation durch Anwendung entsprechender Osteosyntheseverfahren gegeben ist [14, 57, 88]. In Abhängigkeit vom Abstand der Bruchenden kann sie über zwei verschiedene Wege ablaufen. Dabei lassen sich Kontakt- und Spaltheilung voneinander unterscheiden [88]. Grenzen die Bruchenden unmittelbar aneinander, werden diese durch Zusammenwachsen von Havers'schen Systemen direkt miteinander verbunden (Kontaktheilung) [14].

Im Einzelnen geschieht dies dadurch, dass kegelförmig angeordnete Osteoklasten zunächst Verbindungskanäle zwischen den benachbarten Fragmenten ausbilden („cutter-heads“), in welche dann osteogene Vorläuferzellen eingebracht werden. Diese differenzieren zu Osteoblasten und füllen die Kanäle schließlich mit Lamellenknochen auf [14].

Liegt dagegen ein mikroskopisch erkennbarer Spalt vor, verläuft der Regenerationsprozess in zwei Schritten. Dabei entsteht im Raum zwischen den Bruchenden zunächst Geflechtknochen, der erst im zweiten Schritt zu mechanisch stabilem Lamellenknochen umgebaut wird (Spaltheilung) [53].

Sekundäre Frakturheilung findet bereits ohne entsprechende Versorgung des entstandenen Defektes statt und stellt insofern die natürliche Form der Knochenregeneration dar [14].

Darüber hinaus kommt sie aber auch im Rahmen konservativer Knochenbruchbehandlung sowie bei der Verwendung von Osteosyntheseverfahren vor, durch die keine komplette Rigidität erreicht wird [53, 55].

Die Bezeichnung sekundär erklärt sich dadurch, dass der Regenerationsprozess über eine vorübergehende Bildung von Kallusgewebe (Kallus: lat. Schwielen) verläuft, das erst später allmählich zu mechanisch stabilem Lamellenknochen umgebaut wird [14, 88, 102]. Grundsätzlich lässt sich die sekundäre Frakturheilung in drei teilweise überlappende Abschnitte unterteilen, die als Entzündungsphase (Inflammation), Reparaturphase sowie Umbauphase (Remodeling) bezeichnet werden [57, 95] (siehe Abbildung 3-4).

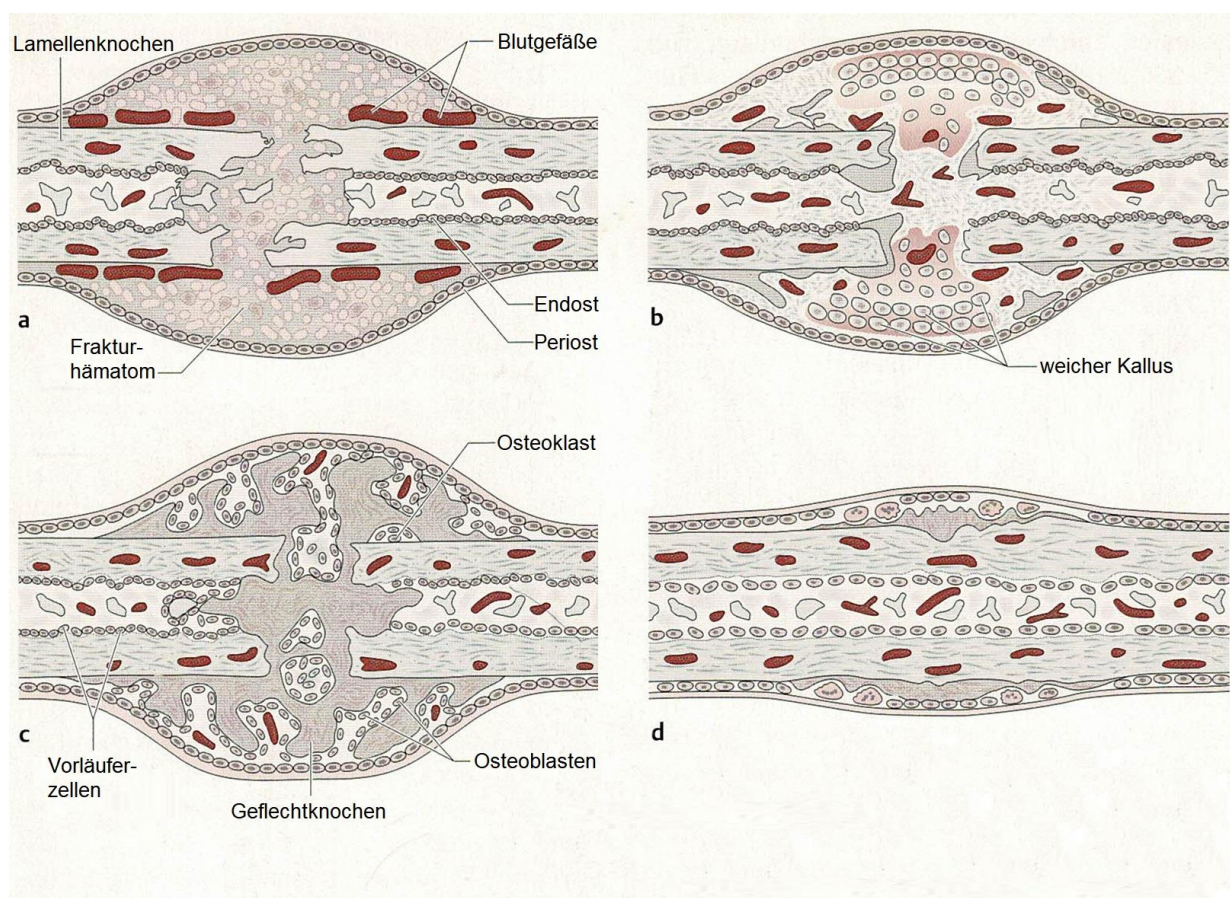


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung der sekundären Frakturheilung, modifiziert nach Schünke [93]

- a: Inflammation, Ausbildung des Frakturhämatoms**
- b: frühe Reparaturphase, Bildung des weichen Kallus**
- c: späte Reparaturphase, Bildung von Geflechtknochen**
- d: Remodeling, Umbau zu Lamellenknochen**

Abbildung lizenziert durch Thieme Verlag

Die initiale Phase der sekundären Frakturheilung beginnt unmittelbar im Anschluss an die Verletzung. Infolge der Zerstörung von Blutgefäßen in Knochengewebe, Endost, Periost, Knochenmark sowie umliegenden Weichteilen kommt es zunächst zur Ausbildung eines Hämatoms zwischen den Frakturenden [53, 57, 70, 95].

Durch die Destruktion der vaskulären Integrität wird im Frakturhämatom eine Abfolge von chemischen und zellulären Prozessen ausgelöst, die den Stillstand der Blutung herbeiführen und gleichzeitig die Inflammation in Gang setzen.

Zunächst lagern sich Thrombozyten an die Endothelschicht verletzungsbedingt zerstörter Blutgefäßwände [43, 77].

Durch die Anlagerung werden die Thrombozyten aktiviert, aggregieren anschließend und bilden einen Thrombozytenpfropf, der die Gefäßwandläsionen vorübergehend abdichtet [77].

Während der Aggregation setzen aktivierte Thrombozyten aus ihren Granula verschiedene Zytokine frei, die als chemotaktische Botenstoffe zur Einwanderung von Immunzellen in das Frakturhämatom führen [43, 70, 77, 95].

Parallel dazu wird das Blutgerinnungssystem aktiviert [23, 43, 53, 77, 95].

Als Folge davon entsteht ein Fibrinnetz, das die Blutgefäße dauerhaft verschließt und gleichzeitig als erste provisorische Matrix für einwandernde Immunzellen fungiert [23, 53, 95].

Etwa eine Stunde nach Eintritt der Verletzung wandern neutrophile Granulozyten als erste Immunzelltypen in das Frakturhämatom ein [43, 53, 57, 61].

Ihre Aufgabe besteht in der Beseitigung von Fragmenten verletzungsbedingt zerstörter Zellen durch Phagozytose [57, 61].

Darüber hinaus sezernieren Granulozyten proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6) sowie Chemokin-Ligand-2 (CCL2). Diese fungieren als chemotaktische Botenstoffe und führen so zur Einwanderung weiterer Immunzellen [53, 61].

Etwa 24 Stunden nach Eintritt der Verletzung wandern Makrophagen als zweite Immunzelltypen in das Frakturhämatom ein [61].

Makrophagen lassen sich grundsätzlich in residente und entzündliche Vertreter untergliedern [15, 33, 79].

Entzündliche Makrophagen können als Reaktion auf Reize in ihrer Mikroumgebung unterschiedliche Phänotypen ausbilden, die als klassisch aktivierte, proinflammatorische Makrophagen (M1) oder alternativ aktivierte, entzündungshemmende Makrophagen (M2) bezeichnet werden [15, 33, 58, 78, 123].

M1-Makrophagen sezernieren proinflammatorische Zytokine wie Tumor necrosis faktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) sowie Interleukin-6 (IL-6) und unterstützen die Entzündungsreaktion während des frühen Stadiums der Inflammation [17, 33, 127, 129].

Mit fortschreitender Heilung kommt es zur vermehrten Ausbildung des M2-Phänotyps. M2-Makrophagen sind vor allem für das Abklingen der Inflammation von Bedeutung [5, 15, 33, 79, 129].

Sie sezernieren Signalmoleküle wie Interleukin-10 (IL-10), Transforming growth factor β (TGF- β), Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) sowie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und sind an der Fortführung der Beseitigung von Fragmenten, der Gewebereparatur sowie der Angiogenese im Frakturhämatom beteiligt [5, 15, 33, 79, 123, 129].

Zu den residenten Makrophagen des Knochengewebes gehört eine Population von Zellen, die man als osteale Makrophagen oder Osteomacs bezeichnet [15, 94, 104, 119, 127].

Sie befinden sich an den periostalen sowie endostalen Oberflächen des Knochengewebes in unmittelbarer Nachbarschaft zu Osteoblasten. Osteomacs sind vor allem für die Osteoblastenreifung sowie Knochenneubildung während der späten Phasen der Frakturheilung von Bedeutung [15, 17, 61, 119, 127].

Die Entzündungsphase hat etwa 48 Stunden nach Eintritt der knöchernen Verletzung ihren Höhepunkt erreicht und ist nach circa einer Woche beendet [57, 95].

Noch bevor die Entzündungsphase vollständig abgeschlossen ist, beginnt bereits die Reparaturphase [91, 95].

Etwa 72 Stunden nach Eintritt der knöchernen Verletzung wird das Fibrinnetz im Frakturhämatom schrittweise durch Granulationsgewebe ersetzt, das reich an Fibroblasten, neu gebildetem Kollagen sowie zahlreichen Kapillaren ist [14, 53, 87].

Gleichzeitig bewirkt die unzureichende Zufuhr von Sauerstoff vor allem im Zentrum der Schädigung eine Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Chondrozyten, die zunächst zentral und später im gesamten Frakturspalt Knorpelgewebe produzieren [53]. Dadurch entsteht zwischen den Fraktarenden eine Überbrückung aus Granulations- und Knorpelgewebe. Diese Überbrückung wird auch als weicher Kallus bezeichnet und bietet der Fraktur eine erste mechanische Stabilität [53, 95].

Parallel zur Entwicklung des weichen Kallus beginnt in einiger Entfernung zur Frakturstelle die Bildung von Geflechtknochen durch desmale Ossifikation [25]. Dabei differenzieren Vorläuferzellen aus der Kambiumschicht des Periosts zu Osteoblasten, die anschließend Geflechtknochen produzieren [53].

Die desmale Ossifikation schreitet mit der Zeit von der Peripherie in Richtung des Zentrums der Schädigung fort [53], wobei das Volumen des gebildeten Geflechtknochens von peripher nach zentral zunimmt [73]. Schließlich ist die äußere Oberfläche des weichen Kallus vollständig mit Geflechtknochen überzogen, der durch

seinen relativ großen Durchmesser vor allem im zentralen Bereich eine zusätzliche mechanische Stabilisierung der Frakturstelle bewirkt [53, 73].

Im weiteren Heilungsverlauf wird das Granulationsgewebe im weichen Kallus vollständig durch Knorpel ersetzt [95]. Etwa zwei Wochen nach Eintritt der Fraktur kommt es dann zu einer Verknöcherung des Knorpelgewebes durch enchondrale Ossifikation [95].

Dabei werden die Chondrozyten des Knorpelgewebes zunächst hypertroph und sezernieren Wachstumsfaktoren wie Placental growth factor (PIGF), Platelet-derived growth factor (PDGF) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [3, 4].

Gleichzeitig kommt es zur Einlagerung von Kalziumsalzen in die extrazelluläre Matrix des Knorpelgewebes [3, 4, 13, 25].

Vermittelt durch die Endothelwachstumsfaktoren sprossen Gefäße in die verkalkte Knorpelmatrix ein und übernehmen deren Versorgung mit Sauerstoff, nutritiven Substanzen sowie für die Knochenentwicklung notwendigen Zellen [3, 4, 13].

Mit zunehmender Vaskularisierung gehen die hypertrophen Chondrozyten durch Apoptose zugrunde [3, 13, 25].

Anschließend wird die verbleibende Knorpelmatrix von Chondroklasten abgebaut [3, 18]. Gleichzeitig differenzieren über das Gefäßsystem in die Matrix eingebrachte Vorläuferzellen zu Osteoblasten [53]. Die Osteoblasten produzieren schließlich Geflechtknochen, durch den die zuvor abgebaute Knorpelmatrix dann schrittweise ersetzt wird [3].

Nach etwa drei Wochen sind die Frakturrenden durch eine Überbrückung aus Geflechtknochen stabilisiert, die man als harten Kallus bezeichnet [58, 61]. Mit der Bildung des harten Kallus ist die Reparaturphase abgeschlossen. In der sich anschließenden letzten Phase der Frakturheilung kommt es zur Rekonstruktion der ursprünglichen Knochenstruktur [5, 57].

Hierbei bauen Osteoklasten den vorübergehend gebildeten Geflechtknochen ab, der dann von Osteoblasten durch voll funktionsfähigen Lamellenknochen ersetzt wird [5, 70]. Dieser dynamische Umbauprozess führt schließlich zur vollständigen Wiederherstellung der ursprünglichen Struktur, Form, Größe sowie mechanischen Festigkeit des Knochens und erstreckt sich über einen Zeitraum von mehreren Wochen bis hin zu Jahren [5, 57, 70].

Die Frakturheilung bleibt nicht ausschließlich auf den Knochen begrenzt. Vielmehr sind auch Periost sowie umliegendes muskuloskelettales Weichteilgewebe am Regenerationsprozess beteiligt [7, 24, 26].

Das Periost spielt im Zusammenhang mit der Frakturheilung eine duale Rolle. Zum einen ist es für die Versorgung des Frakturgebiets mit Sauerstoff, nutritiven Substanzen sowie zur Regeneration notwendigen Zellen von entscheidender Bedeutung. So entwickelt sich unmittelbar nach Eintritt der Fraktur vom Periost ausgehend ein dichtes Geflecht an Gefäßen, das sich strahlenförmig zum Frakturspalt hin orientiert [43]. Dabei kommt es vor allem innerhalb des frühen Heilungszeitraumes zu einer vorübergehenden Flussumkehr der Blutversorgung. Während die Ernährung der Kortikalis im gesunden Knochen hauptsächlich von Markraumgefäßen ausgeht, erfolgt deren Versorgung während der Inflammation größtenteils durch periostale Gefäße [14]. Zum anderen stellt das Periost eine direkte Quelle für Vorläuferzellen von Osteoblasten dar (siehe Kapitel 3.2.3) und ist insofern wesentlich an der Knochenneubildung während des Regenerationsprozesses beteiligt [7, 24, 46, 122].

Neben dem Periost bringen auch Gefäße des umliegenden Skelettmuskelgewebes nutritive Substanzen, Sauerstoff sowie Vorläuferzellen von Osteoblasten ins Schadensareal mit ein [115].

Dies macht deutlich, dass sowohl das Periost als auch das dem Frakturgebiet angrenzende Weichteilgewebe wesentlich zur Wiederherstellung voll funktionsfähigen Knochengewebes beitragen.

So stellt die Frakturheilung insgesamt ein komplexes Geschehen dar, dessen Verlauf entscheidend vom Stabilisierungsgrad des Defektes sowie dem Ausmaß der Schädigung von Periost und umliegendem Weichteilmantel abhängig ist.

4 Ziele und Hypothesen

Ziel der Arbeit war es, Kenntnisse über den pathogenetischen Einfluss schwerer traumatischer Weichteilschädigungen auf die Frakturheilung zu erhalten.

Dazu wurde am linken Rattenunterschenkel jeweils unter standardisierten Bedingungen entweder eine isolierte Fraktur, ein separater, schwerer geschlossener Weichteilschaden oder die Kombination beider Verletzungen induziert. Mithilfe immunhistologischer Analyseverfahren sollten anschließend detaillierte Aussagen über die zelluläre Reaktion von Granulozyten, Makrophagen, Osteoblasten sowie hinsichtlich der Gefäßeinsprossung getroffen und darüber hinaus mittels TRAP-Färbung mögliche Auswirkungen auf die Osteoklastenpräsenz gewonnen werden.

Hierbei wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

- Im Rahmen der Frakturheilung wirkt sich eine zusätzliche Weichteilverletzung auf die zelluläre Antwort sowie Vaskularisierung von Periost und Kallus aus.
- Das Periost wird durch isolierte Fraktur, separate Schädigung des angrenzenden Weichteilmantels oder eine Kombination beider Verletzungen in Bezug auf die zelluläre Antwort sowie die Gefäßeinsprossung während der Inflammation auch über das Zentrum der Schädigung hinaus beeinflusst.
- Unabhängig vom Interventionsmuster nimmt die Intensität der verletzungsbedingten zellulären sowie vaskulären Veränderungen vom Periost zum periostalen Kallus bis hin zum endostalen Kallus ab.

5 Material und Methoden

5.1 Tierexperimentelles Modell

5.1.1 Versuchstiere

Für die Tierversuche wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten¹ mit einem initialen Körpergewicht von 250 bis 300 Gramm verwendet. Ihre Unterbringung erfolgte in Käfigen mit bis zu sechs Tieren unter Einhaltung eines künstlichen 12-Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus. Futter und Wasser standen jeweils ad libitum zur Verfügung. Jeglichen Eingriffen ging eine dreitägige Adaptionsphase voraus. Nach Abschluss der Versuche wurden die verletzten Tiere in separaten Käfigen untergebracht. Eine Immobilisierung fand dabei nicht statt.

Sämtliche Tierversuche wurden von der Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales des Landes Berlin (Genehmigungsnummer G 0278/00) genehmigt.

5.1.2 Studiendesign

Zur Durchführung der Tierversuche wurden vier verschiedene Untersuchungsgruppen festgelegt (siehe Tabelle 5-1).

Dabei erhielten insgesamt 72 Ratten unter standardisierten Bedingungen am distalen linken Unterschenkel entweder eine separate, schwere geschlossene Weichteilschädigung, eine isolierte Fraktur oder die Kombination beider Verletzungen. Nach Ablauf von unterschiedlichen Zeiträumen (24 Stunden, 48 Stunden, eine Woche, drei Wochen) wurden dann jeweils sechs Tiere pro Untersuchungsgruppe getötet.

Als Vorbereitung auf nachfolgende histologische Untersuchungen fand anschließend die Entnahme ihrer linken Unterschenkel sowie deren Fixierung in Formaldehydlösung statt (siehe Kapitel 5.2.1). Zusätzlich dienten sechs weitere Ratten als Kontrollgruppe. Diese wurden drei Wochen nach Erwerb unverletzt getötet, ihre linken Unterschenkel als Vergleichsproben für die Histologie entnommen und ebenfalls in Formaldehydlösung fixiert.

¹Lieferant: Fa. Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland

Intervention	Tötungszeitpunkt	Anzahl der Tiere
Weichteilschaden	24 h	6
	48 h	6
	1 Woche	6
	3 Wochen	6
Fraktur	24 h	6
	48 h	6
	1 Woche	6
	3 Wochen	6
Kombinationsverletzung	24 h	6
	48 h	6
	1 Woche	6
	3 Wochen	6
Keine Verletzung	3 Wochen	6

Tabelle 5-1: Untersuchungsgruppen

5.1.3 Anästhesie

Die Vorbereitung der Versuchstiere, sämtliche invasive Maßnahmen und Röntgenkontrollen (siehe Kapitel 5.1.5 bis 5.1.8) fanden unter Einfluss einer Inhalationsnarkose statt.

Dazu wurden initial Isofluran² (5 %), Sauerstoff (0,5 l/min), sowie Distickstoffmonoxid (1l/min) für drei Minuten in entsprechend präparierte Käfige eingeleitet. Anschließend erfolgte die Fortführung der Narkose mit Isofluran (1,5–2,5 Vol-%), Sauerstoff (0,3 l/min) und Distickstoffmonoxid (0,5 l/min) über eine Kopfmaske.

² Fa. Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland

5.1.4 Vorbereitung der Versuchstiere

Vor Beginn jeglicher Eingriffe wurde die linke distale Extremität der Tiere mittels Schergerät³ und handelsüblicher Depilationscreme enthaart. Danach erfolgte eine gründliche Reinigung des freigelegten Areals mit 70 %-igem Ethanol⁴. Anschließend wurden die Ratten auf einer Wärmeplatte (Temperatur 37 °C) gelagert, um ihre Körpertemperatur während der nachfolgenden Versuchsdurchführungen aufrecht erhalten zu können.

5.1.5 Weichteilschaden

Zur Induktion des geschlossenen, standardisierten Weichteilschadens fand ein eigens zu diesem Zweck entwickeltes Gerät⁵ Verwendung.

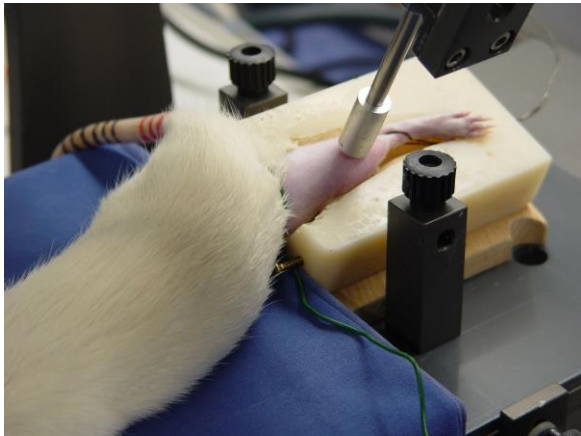


Abbildung 5-1: Induktion eines standardisierten Weichteilschadens am Rattenunterschenkel

eigene Abbildung

Dazu wurden die linken Rattenhinterläufe jeweils voll ausgestreckt in einer dafür vorgesehenen anatomischen Vorrichtung medial fixiert und der Weichteilschaden anschließend durch den Aufprall eines pneumatisch betriebenen Stahlzylinders (Aufpralldruck 6,894 hPa) lateral im Bereich des maximalen Unterschenkelumfangs erzeugt (siehe Abbildung 5-1), ohne dabei Perforationen oder äußere Blutungen zu verursachen.

³ Solac ideal, Fa. Solac Vertrieb GmbH, Freiberg, Deutschland

⁴ Fa. Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland

⁵ Virginia Commonwealth University, USA

5.1.6 Fraktur

Die standardisierte Frakturherzeugung basierte auf dem Modell der Dreipunktbiegung [11, 37, 92].

Hierfür fand eine speziell entwickelte Apparatur⁶ Verwendung. Dazu wurden die voll ausgestreckten linken Rattenhinterläufe in Außenrotation auf der Guillotine des Gerätes fixiert (siehe Abbildung 5-2) und anschließend ein an definierter Position angebrachtes Fallgewicht gelockert. Danach erfolgte die Stabilisierung der Fraktur durch sterile Kirschnerdrähte⁷.

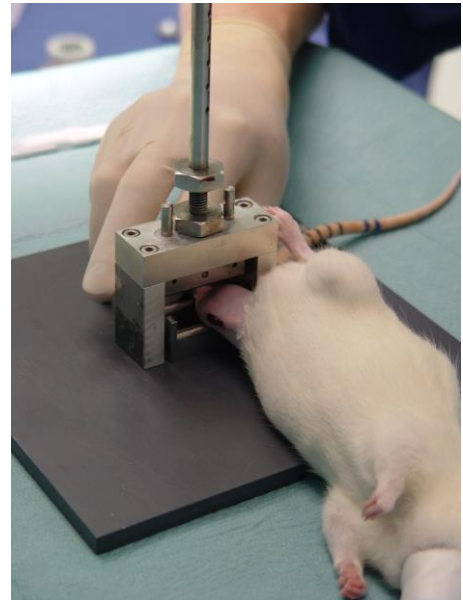


Abbildung 5-2: Erzeugung einer standardisierten Unterschenkelfraktur an der Ratte
eigene Abbildung

5.1.7 Kombinationsverletzung

Zur Durchführung der Kombinationsverletzung wurde gemäß bereits vorangehend beschriebener Einzelmethodik (siehe Kapitel 5.1.5 und 5.1.6) verfahren. Dabei fand die Induktion des Weichteilschadens grundsätzlich zuerst statt.

5.1.8 Röntgenkontrolle

Die Frakturherzeugung und -stabilisierung erfolgte unter permanenter Röntgenkontrolle mithilfe eines isozentrischen C-Bogens⁸.

Darüber hinaus wurden zur Beobachtung des Heilungsverlaufes zehn Tage, sowie abschließend ein bzw. drei Wochen nach Intervention jeweils zusätzliche Röntgenaufnahmen angefertigt.

⁶ TSZ Charité Campus Rudolph Virchow

⁷ Kirschnerdrähte 1,0 mm steril, Fa. Mathys Medical Ltd., Bettlach Schweiz

⁸ Siremobil Iso-C^{3D}, Fa. Siemens AG, München, Deutschland

5.2 Aufarbeitung der Tibiae

5.2.1 Fixierung

5.2.1.1 Theoretischer Hintergrund

Ein übliches Verfahren zur Verbesserung der Haltbarkeit von Gewebeproben stellt die Fixierung dar. Hierfür wird häufig Formaldehyd verwendet. Es reagiert mit basischen Aminosäuren des Gewebes unter Ausbildung quervernetzender Hydroxymethylenbrücken, so dass sich die Permeabilität für Makromoleküle und das damit verbundene Risiko einer Kontamination der Proben verringert [10].

5.2.1.2 Durchführung

Zur Durchführung der Fixierung wurden die Unterschenkel in Zentrifugenröhrchen⁹ gegeben, vollständig mit 4%-iger Formaldehydlösung¹⁰ bedeckt und für drei Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt. Während dieses Zeitraums fand jeweils nach 24 Stunden ein vollständiger Austausch des Fixativs statt.

⁹ Falcon®, Fa. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

¹⁰ Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

5.2.2 Dekalzifizierung

5.2.2.1 Theoretischer Hintergrund

Um die Fertigung von Paraffinschnitten (siehe Kapitel 5.2.5) an Knochenmaterial durchführen zu können ist es erforderlich, vorher das Kalzium aus der Matrix zu entfernen (Dekalzifizierung), um das Gewebe zu enthärten.

Im Hinblick auf nachfolgende immunhistologische Untersuchungen (siehe Kapitel 5.3) wird hierfür häufig Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) verwendet. Diese ermöglicht eine schonende Enthärtung des Gewebes, da sie das Kalzium durch Bildung wasserlöslicher, ungefärbter Komplexe aus der Knochenmatrix herauslöst [44], ohne dabei Proteinstrukturen, wie z.B. Antigene zu verändern.

5.2.2.2 Durchführung

Zur Durchführung der Dekalzifizierung wurden die Unterschenkel in entsprechend beschriftete Gewebekästen¹¹ gegeben, für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült, um Formaldehydreste zu entfernen, danach vollständig mit EDTA-Lösung¹² benetzt und anschließend über vier Wochen bei 37 °C im Trockenschrank¹³ aufbewahrt.

Während dieses Zeitraums fand alle drei Tage ein vollständiger Austausch des Dekalzifizierungsmediums statt.

¹¹ Tissue Tek® Uni-Kassetten, Fa. Bayer Diagnostics, Hampshire, U.K.

¹² Fa. Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland

¹³ Fa. Haereus, Hanau, Deutschland

5.2.3 Gewebeentwässerung

Der Dekalzifizierung schloss sich ein zehnmütiger Spülvorgang mit fließendem Leitungswasser an, um Rückstände von Ethylendiamintetraessigsäure auszuwaschen. Anschließend erfolgte die Dehydratation der Unterschenkel mithilfe eines Entwässerungsautomaten¹⁴. Dabei wurde das Gewebe gemäß nachfolgenden Schemas (siehe Tabelle 5-2) in Ethanol¹⁵ aufsteigender Konzentration, Xylen¹⁶ sowie flüssiges Hartparaffingemisch¹⁷ (nachfolgend als Paraffin bezeichnet) eingebracht.

Reagenzien	Verweildauer
Ethanol 70 %	4 Stunden
Ethanol 80 %	4 Stunden
Ethanol 80 %	4 Stunden
Ethanol 96 %	8 Stunden
Ethanol 96 %	10 Stunden
Ethanol 100 %	10 Stunden
Ethanol 100 %	10 Stunden
Ethanol 100 %	10 Stunden
Xylen	1 Stunde
Xylen	1,5 Stunden
Paraffin	2,5 Stunden
Paraffin	2 Stunden

Tabelle 5-2: Schema der automatischen Gewebeentwässerung

¹⁴ TP 1020, Fa. Leica, Bensheim, Deutschland

¹⁵ Fa. Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland

¹⁶ Fa. T J Baker, Deventer, Holland

¹⁷ Paraplast plus, Fa. Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, USA

5.2.4 Einbettung in Paraffin

5.2.4.1 Theoretischer Hintergrund

Ein gebräuchliches Verfahren zur Vorbereitung auf nachfolgende histologische Untersuchungen (siehe Kapitel 5.3) stellt die Einbettung von Gewebeproben in Paraffin dar. Es nutzt den Wechsel der Aggregatzustände bei unterschiedlichen Temperaturen. Hierfür wird häufig ein Gemisch aus Hartparaffin, Kunststoffpolymeren definierten Molekulargewichts, sowie Dimethylsulfoxid verwendet (Hartparaffingemisch, siehe Kapitel 5.2.3). Bei Temperaturen oberhalb von 56 °C liegt es im flüssigen Aggregatzustand vor. Dadurch können Gewebeproben eingebracht und wie gewünscht positioniert werden.

Bei Raumtemperatur ist es dagegen verfestigt. Somit bleiben die zuvor eingebrachten Proben fixiert und lassen sich so weiterverarbeiten.

5.2.4.2 Durchführung

Zur Einbettung der Rattenunterschenkel fand ein Paraffinspender mit integrierter Heizplatte¹⁸ Verwendung. Dazu erfolgte zunächst dessen Einstellung auf die Betriebstemperatur von 60 °C. Daraufhin wurden Edelstahlausgießformen für zehn Minuten auf der Heizplatte temperiert, zu einem Drittel mit verflüssigtem Paraffin gefüllt, anschließend einzelne Rattenunterschenkel per Pinzette jeweils fest am vorgewärmten Gefäßboden angedrückt und diese sofort vollständig mit Paraffin bedeckt. Danach erfolgte die zehnminütige Aufbewahrung der Edelstahlausgießformen auf einer Kühlplatte¹⁹ (Betriebstemperatur -12 °C). Dadurch entstanden Paraffinblöcke. Diese wurden anschließend mithilfe eines Messers aus den Edelstahlausgießformen entnommen und konnten so weiterverarbeitet werden.

¹⁸ Fa. Leica, Bensheim, Deutschland

¹⁹ Fa Leica, Bensheim, Deutschland

5.2.5 Paraffinschnitte

Nach der Paraffineinbettung erfolgte die Fertigung von Gewebelängsschnitten der Tibia. Hierfür war es zunächst erforderlich, zur Frakturstabilisierung eingebrachtes Material zu entfernen. Dazu wurden entsprechende Paraffinblöcke unter Verwendung eines Messers im Bereich der Tibiaköpfe ausgeschält. Danach erfolgte die Freipräparation zur Frakturstabilisierung eingebrachter Kirschnerdrähte mittels Skalpell sowie deren anschließende Eliminierung per Nadelhalter. Daraufhin wurden einzelne Paraffinblöcke zunächst auf Eis gekühlt, jeweils horizontal in der Halterung eines Mikrotoms²⁰, eingespannt und äußere Knochenbereiche in 20 µm dicken Schichten bis zum Markraum entfernt. Danach erfolgte die erneute Kühlung entsprechender Paraffinblöcke auf Eis. Diese wurden dann nochmals horizontal in der Halterung des Mikrotoms eingespannt, anschließend zwanzig Serienschnitte mit einer Schichtdicke von vier µm gefertigt, diese nacheinander in zwei verschiedene Wasserbäder aufsteigender Temperatur (25 °C bzw. 45 °C) überführt, auf silanisierte Objektträger aufgebracht und für 24 Stunden bei 37 °C im Trockenschrank aufbewahrt.

²⁰ Rotationsmikrotom RM 2125, Fa. Leica, Bensheim, Deutschland

5.3 Histologie

5.3.1 Allgemeines

Zur Durchführung der nachfolgend aufgeführten Gewebedeparaffinisierung, -entwässerung und- rehydratisierung, sämtlicher Spülvorgänge, Färbungen sowie der Inhibierung endogener Peroxidase (siehe Kapitel 5.3.2.2, 5.3.3.3, 5.4.2) wurden Färbegestelle mit jeweils zehn Paraffinschnitten bestückt und anschließend in Glasküvetten eingebracht, die mit den notwendigen Reagenzien gefüllt waren.

5.3.2 Übersichtsfärbung (HE-Färbung)

5.3.2.1 Theoretischer Hintergrund

Um die Beschaffenheit von Gewebeproben mikroskopisch beurteilen zu können, werden Paraffinschnitte häufig einer HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) unterzogen. Dabei stellt Hämatoxylin Zellkerne blau und Eosin das Zytoplasma rot dar [41].

5.3.2.2 Durchführung

Für die HE-Färbung wurde das Gewebe durch Xylen deparaffinisiert, anschließend in Ethanol absteigender Konzentration sowie demineralisiertem Wasser²¹ rehydratisiert und zunächst mit Hämatoxylin rot gefärbt. Danach fand ein Spülvorgang in demineralisiertem Wasser statt. Nachfolgend wurde das Gewebe in Salzsäure-Alkohol-Lösung gegeben und dadurch die Entfärbung des Zytoplasmas induziert.

Dem schloss sich die Spülung unter fließendem Leitungswasser an. Dadurch wurde ein Farbumschlag der Zellkerne von rot nach blau induziert (Bläuen der Kerne). Danach erfolgte die Färbung des Zytoplasmas mit Eosin.

Abschließend wurde das Gewebe erneut entwässert, in Xylen überführt und unter Verwendung eines entsprechenden Einschlußmittels²² jeweils mit Deckgläsern²³ versehen. Der gesamte Prozess erfolgte gemäß dem nachfolgend aufgeführten Protokoll (siehe Tabelle 5-3).

²¹ Aqua Spüllösung, Fa. Delta Select, Pfullingen, Deutschland

²² Vitro-Clud® Einschlußmittel für mikroskopische Technik, Fa. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland

²³ Deckgläser 24 x 60 mm, Fa. Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland

Protokoll für die HE-Färbung	
1. Deparaffinisierung	
Reagenz	Einwirkzeit
Xylen	10 min
Xylen	10 min
2. Rehydratisierung	
Reagenz	Einwirkzeit
Ethanol 100%	2 min
Ethanol 100%	2 min
Ethanol 96 %	2 min
Ethanol 80%	2 min
Ethanol 70 %	2 min
Demineralisiertes Wasser	2 min
3. Herstellung des Kernfärbungsreagenzes	
Verdünnung von Hämatoxylinlösung ²⁴ mit demineralisiertem Wasser im Verhältnis 1 zu 2	
4. Kernfärbung	
Reagenz	Einwirkzeit
Kernfärbungsreagenz	7 min
5. Spülung	
Reagenz	Einwirkzeit
Demineralisiertes Wasser.	3-4 x eintauchen
6. Herstellung des Entfärbungsreagenzes	
Verdünnung von Salzsäure-Alkohollösung ²⁵ mit Ethanol 70 % im Verhältnis 1 zu 3	
7. Entfärben des Gewebes	
Reagenz	Einwirkzeit
Entfärbungsreagenz	kurz eintauchen
8. Kerne bläuen	
Reagenz	Einwirkzeit
Fließendes Leitungswasser	10 min

²⁴ Papanicolaus Lösung 1 a Harris, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

²⁵ Salzsäure Alkohol 1,44 %, Fa. Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland

9. Färbung des Zytoplasmas	
Reagenz	Einwirkzeit
Eosin	3-4 x eintauchen
10. Entwässerung des Gewebes	
Reagenz	Einwirkzeit
Ethanol 96%	2 x kurz eintauchen
Ethanol 96%	2 x kurz eintauchen
Ethanol 100%	2 x kurz eintauchen
Ethanol 100%	2 x kurz eintauchen
Xylen	Kurzfristige Aufbewahrung bis zum Versehen des Gewebes mit Deckgläsern
11. Versehen des Gewebes mit Deckgläsern	

Tabelle 5-3: Angewendetes Protokoll für die HE-Färbung

5.3.3 Immunhistologie

5.3.3.1 Theoretischer Hintergrund

Die Immunhistologie ermöglicht den gezielten Nachweis einzelner Zellen oder Gewebe in unterschiedlichen Präparaten, wie Blutaussstrichen und histologischen Schnitten. Grundlage des Verfahrens stellt eine Antigen-Antikörper-Reaktion dar. Sie ist wesentlicher Bestandteil des spezifischen Immunsystems im Säugerorganismus und dient der Eliminierung Körper schädigender Substanzen (Antigenes). Dabei lösen charakteristische Teilstrukturen der Antigene (Epitope, antigene Determinanten) zunächst die gezielte Ausbildung von Abwehrstoffen (Antikörpern) aus. Anschließend kommt es zur Bindung der Antikörper an die jeweiligen Determinanten und einer damit verbundenen Ausbildung komplexer Moleküle (Immunkomplexe). Aufgrund dieser Reaktion verlieren die Antigene in den meisten Fällen ihre schädigende Wirkung und können infolge von Präzipitation, Agglutination, Zytolyse, Opsonisierung (Förderung der Phagozytose durch Einwirkung von als Opsoninen bezeichneter Stoffe) oder Immobilisation aus dem Organismus eliminiert werden [109]. Das Verfahren der Immunhistologie nutzt diesen Mechanismus, indem es die Entstehung von Immunkomplexen hervorruft

und sie durch Verwendung geeigneter Reagenzien zu farbigen Reaktionsprodukten umsetzt.

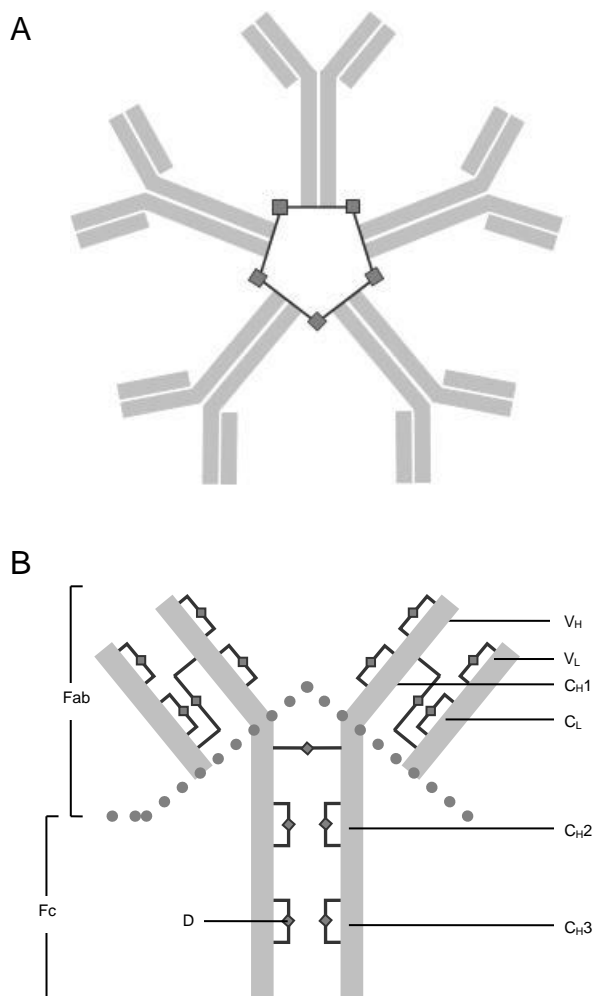


Abbildung 5-3: Schematische Darstellung von Immunglobulinen ,modifiziert nach Naish [62]

A: Immunglobulin M (IgM)

Das Molekül besteht aus fünf Untereinheiten, deren Aufbau dem der IgG-Moleküle entspricht

B: Immunglobulin G (IgG)

Das Molekül ist aus jeweils zwei schweren (H) und leichten (L) Peptidketten aufgebaut, die durch Disulfidbrücken (D) miteinander verbunden sind.

Die Antigen bindenden Molekülabschnitte (Fab) besitzen konstante (C) und variable (V) Regionen, während der kristalline Teil (Fc) ausschließlich konstante Regionen aufweist.

Abbildung: © Agilent Technologies, Inc.

mit freundlicher Genehmigung, Courtesy of Agilent Technologies, Inc.

Antikörper stellen eine zur Fraktion der Gammaglobuline gehörende heterogene Gruppe von Glykoproteinen dar und werden auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet. Sie sind aus Peptidketten unterschiedlichen Molekulargewichts (leichte, L- Ketten *light chains*, bzw. schwere, H-Ketten *heavy chains*) aufgebaut, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.

Hinsichtlich ihrer Größe, Struktur und Funktion lassen sie sich in fünf verschiedene Klassen unterteilen (IgG, IgM, IgA, IgD und IgE) [12].

Für immunhistologische Untersuchungen spielen vor allem Antikörper des Typs G oder M (siehe Abbildung 5-3) eine entscheidende Rolle [10]. Ihre Struktur konnte mithilfe enzymatischer Abbaustudien aufgeklärt werden. So lassen sich durch die Inkubation von Antikörpern der Klasse G mit Papain zwei identische Molekülabschnitte erzeugen. Sie sind zur spezifischen Bindung an die Determinanten der jeweiligen Antigene befähigt und werden demzufolge als Fab (Fragment antigen binding) bezeichnet. Daneben entsteht ein weiterer Molekülbezirk.

Er besitzt keine Spezifität für Antigene, ist aber Träger einer Reihe wichtiger biologischer Funktionen, wie beispielsweise der Bindung an Oberflächenrezeptoren von Monozyten oder basophilen Granulozyten. In freier Form neigt er dazu auszukristallisieren und wird aufgrund dieser Eigenschaft auch Fc (Fragment crystalline) genannt [109].

Eine weitere Untergliederung der IgG-Antikörper ergibt sich aus dem Aufbau ihrer Peptidketten. So haben Strukturanalysen gezeigt, dass die Antigen bindenden Molekülabschnitte über Bereiche verfügen, deren Aminosäuresequenzen nicht einheitlich zusammengesetzt sind. Diese werden deshalb auch als variable Regionen bezeichnet. Sie bilden charakteristische Muster von reaktionsfähigen Gruppen und ermöglichen so eine spezifische Bindung mit den verschiedenen Antigenen. Die verbleibenden Molekülbezirke weisen dagegen nur geringfügige Unterschiede im Aufbau ihrer Peptidketten auf. Infolgedessen können sie als konstant angesehen werden.

Antikörper der Klasse M liegen als ringförmige Pentamere vor. Jede ihrer fünf Untereinheiten lässt sich ebenso wie IgG-Moleküle in Antigen bindende und kristalline Abschnitte aufspalten, die jeweils über variable sowie konstante Regionen verfügen. Um Antikörper für immunhistologische Zwecke zu erhalten, werden Säugetieren, bevorzugt Mäusen oder Kaninchen, diejenigen Strukturen appliziert, deren Nachweis später erfolgen soll. Diese fungieren als Antigene und lösen eine spezifische Immunantwort aus. Daraufhin produziert der Organismus Antikörper, die durch verschiedene Verfahren aus B-Lymphozyten von Milz oder Lymphknoten, bzw. dem Blut der Tiere gewonnen und nach entsprechender Aufarbeitung verwendet werden können [10].

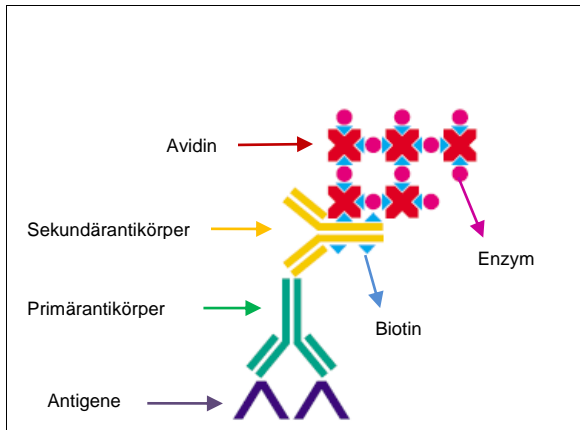


Abbildung 5-4: Schematische Darstellung der ABC Methode, modifiziert nach Boenisch [10]

Abbildung: © Agilent Technologies, Inc.

mit freundlicher Genehmigung, Courtesy of Agilent Technologies, Inc.

Für immunhistologische Untersuchungen stehen grundsätzlich unterschiedliche Techniken zur Verfügung, von denen die sog. ABC-Methode (ABC: Avidin-Biotin-Complex) häufig favorisiert wird (siehe Abbildung 5-4). Dabei handelt es sich um ein Verfahren hoher Sensitivität, das die Darstellung einzelner Zellen oder Gewebe in mehreren Schritten ermöglicht und den Einsatz unterschiedlicher

Reagenzien erforderlich macht. Dabei kommt es zunächst zur Anwendung von Antikörpern (Erstantikörpern, Primärantikörpern), die eine spezifische Bindung mit den antigenen Determinanten der nachzuweisenden Strukturen eingehen. Anschließend werden zusätzliche, Biotin assoziierte Zweitantikörper (Sekundärantikörper, Brückenantikörper) eingesetzt. Sie richten sich gegen die zur Gewinnung der Erstantikörper herangezogenen Spezies, so dass es zu einer Bindung von Sekundär- und Primärantikörpern kommt.

Um diese Reaktion zu lokalisieren, finden Avidin-Biotin-Komplexe Verwendung, die jeweils mit Enzymen, wie z.B. Alkalischer Phosphatase (AP) oder Peroxidase (POD), konjugiert sind (Avidin-Biotin-Enzymkomplexe). Sie verfügen über mindestens eine freie Koordinationsstelle und binden infolgedessen an das Biotinmolekül der Zweitantikörper. Den letzten Schritt des Verfahrens stellt die Visualisierung dar. Dabei werden zur Konjugation der ABC-Komplexe verwendete Enzyme mithilfe von Substrat-Chromogen-Lösungen zu farbigen Reaktionsprodukten umgesetzt.

Dem liegen unterschiedliche Mechanismen zu Grunde. So werden beispielsweise Naphtholphosphatester (Substrate) durch Alkalische Phosphatase im basischen Milieu zu Phenolkomponenten und Phosphaten hydrolysiert. Die Phenole reagieren anschließend mit Diazoniumsalzen (Chromogene) zu unlöslichen Azofarbstoffen.

Der Visualisierung von Peroxidase konjugierten Avidin-Biotin-Komplexen liegt dagegen eine Redox-Reaktion zu Grunde. Hierbei fungiert Wasserstoffperoxid als Substrat. Es reagiert zunächst mit Peroxidase zu komplexen Molekülen (Enzym-Substrat-Komplexe), die anschließend Elektronendonatoren (Chromogene) durch Oxidation zu gefärbten Endprodukten umsetzen [62].

5.3.3.2 Problembehandlung

Ein häufiges Problem bei der Durchführung immunhistologischer Untersuchungen stellen unspezifische Anfärbungen des untersuchten Gewebes (Hintergrundfärbungen) dar.

Die Hauptursache hierfür liegt in den chemischen Eigenschaften von Peptiden begründet. Sie sind hydrophob und neigen deshalb dazu, sich im wässrigen Milieu zusammen zu lagern [106]. Dadurch kann es zu Bindungen von Antikörpern an Gewebeproteine kommen, denen keine spezifische Immunreaktion zugrunde liegt. Dieser Effekt lässt sich durch den Einsatz proteinreicher Reagenzien abschwächen. Im Rahmen der vorangehend beschriebenen ABC-Methode (siehe Kapitel 5.3.3.1) finden hierfür häufig sog. Normalseren Verwendung, mit denen das Gewebe zu Beginn von immunhistologischen Untersuchungen vorbehandelt wird. Diese stammen aus derjenigen Spezies, die zur Gewinnung der Sekundärantikörper herangezogen wurde. Dadurch lassen sich unspezifische Bindungen von Primärantikörpern an Gewebeproteine minimieren, ohne dass es anschließend zu Wechselwirkungen mit den Sekundärantikörpern kommt.

Darüber hinaus kann im Rahmen der ABC-Methode bei entsprechender Enzymkonjugation endogene Peroxidaseaktivität des untersuchten Gewebes zu Hintergrundfärbungen führen.

Um dieses Problem weitestgehend auszuschließen, erfolgt üblicherweise eine zusätzliche Vorbehandlung mit Wasserstoffperoxidlösung im Überschuss. Dadurch kommt es zur Ausbildung katalytisch inaktiver Enzym-Substrat-Komplexe, die bei Fehlen von Elektronendonatoren reversibel blockiert werden [62].

5.3.3.3 Durchführung

Für die immunhistologischen Analysen wurden einzelne Gewebelängsschnitte für den gesamten Beobachtungszeitraum (siehe Kapitel 5.1.2) hinsichtlich der Präsenz von Granulozyten, Makrophagen sowie Gefäßen und darüber hinaus zu den Untersuchungszeitpunkten von ein und drei Wochen auf die zelluläre Reaktion von Osteoblasten hin untersucht.

Die Durchführung erfolgte gemäß der ABC-Methode (modifiziert nach Hsu [38]) entsprechend des nachfolgend aufgeführten allgemeinen Protokolls (siehe Tabelle 5-4).

Allgemeines Protokoll immunhistologischer Untersuchungen	
1. Herstellung gebrauchsfertiger Lösungen	
Lösung	Herstellung
Phosphatpuffer pH 7,2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Verdünnung von Phosphatpufferlösung²⁶ mit demineralisiertem Wasser auf 1000 ml
Primärantikörper	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Verdünnung der Antikörperlösung mit Hintergrund minimierender Lösung²⁷ in jeweils vom Hersteller empfohlener Konzentration
Methanolische Wasserstoffperoxidlösung 3 %	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Verdünnung von 20 ml 30 %-iger wässriger Wasserstoffperoxidlösung²⁸ mit 180 ml Methanol
Normalserum	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mischung von 100 µl Normalserum²⁹ mit 5 ml Phosphatpuffer pH 7,2
Chromogenpuffer pH 8,2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lösung von 3,69g Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrachlorid, 0,54g Tris(hydroxymethyl)aminomethan und 2,63g Natriumchlorid³⁰ in 200 ml demineralisiertem Wasser ▪ Einstellung des pH- Wertes mittels 2 molarer Natriumhydroxidlösung ▪ Auffüllung des Volumens durch demineralisiertes Wasser auf 300 ml
ABC–Komplexe ^{31 32}	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vermischung von 50µl Reagenz A und B mit 5 ml Phosphatpuffer pH 7,2 ▪ Einhaltung von 30 Minuten Mindestreaktionszeit vor der Anwendung
Methylgrün-Färbelösung	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lösung von 2 g Methylgrünpulver³³ in 200 ml demineralisiertem Wasser ▪ Zugabe von 30 ml 100 %-igem Ethanol ▪ Durchmischung mittels Magnetrührers³⁴ für 10 Minuten

²⁶ Phosphatpufferlösung pH 7,2, Fa. Waldeck GmbH & Co KG, Münster, Deutschland

²⁷ Antibody Diluent with Background Reducing Components, Fa. DAKO, Hamburg, Deutschland

²⁸ Wasserstoffperoxidlösung 30% per analysi, Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

²⁹ Pferde-Normalserum, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.

³⁰ Zur Herstellung des Chromogenpuffers verwendete Feststoffe: Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

³¹ Vectastain ABC-AP KIT, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.

³² Vectastain ABC KIT, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.

³³ Methylgrün Zinkchloridsalz für die Mikroskopie, Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

³⁴ Magnetrührer MR 3001 K 3001, Fa. Heidolph Elektro GmbH & Co KG, Kelkheim, Deutschland

Substrat-Chromogenlösung zur Visualisierung von mit Alkalischer Phosphatase konjugierten ABC-Komplexen ³⁵	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vermischung von 2,5 ml Chromogen-Puffer mit einem Tropfen Reagenz 1 ▪ Zugabe eines Tropfens Reagenz 2 und anschließende Mischung der Lösungen ▪ Zugabe von einem Tropfen Reagenz 3 und erneute Durchmischung
Substrat-Chromogenlösung zur Visualisierung von mit Peroxidase konjugierten ABC-Komplexen ³⁶	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vermischung von 2,5 ml demineralisiertem Wasser mit einem Tropfen Phosphatpuffer ▪ Zugabe von zwei Tropfen Reagenz 1 und anschließende Mischung der Lösungen ▪ Zugabe von einem Tropfen Reagenz 2 und erneute Durchmischung
Biotinylierter Sekundärantikörper ³⁷	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Verdünnung von 100 µl Antikörperlösung mit 100 µl Normalserum ▪ Mischung mit 5 ml Phosphatpuffer pH 7,2
2. Deparaffinisierung und Rehydratisierung des Gewebes (siehe Kapitel 5.3.2.2)	
3. Inhibierung der endogenen Peroxidase mittels 3 %-iger methanolischer Wasserstoffperoxidlösung für 10 Minuten (nur bei Verwendung Peroxidase konjugierter ABC-Komplexe)	
4. Zweimalige Spülung mit Phosphatpuffer für jeweils 5 Minuten (nur bei Verwendung Peroxidase konjugierter ABC-Komplexe)	
5. Umrandung des Gewebes mittels Fettstiftes³⁸, um ein anschließendes Verlaufen der verwendeten Lösungen zu verhindern	
6. Inkubation mit Normalserum für 20 Minuten	
7. Inkubation mit Primär-Antikörper für 24 Stunden bei einer Temperatur von + 8°C	
8. Zweimalige Spülung mit Phosphatpuffer für jeweils 5 Minuten	
9. Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper für 30 Minuten	
10. Zweimalige Spülung mit Phosphatpuffer für jeweils 5 Minuten	
11. Inkubation mit ABC-Komplex für 50 Minuten	
12. Zweimalige Spülung mit Phosphatpuffer für jeweils 5 Minuten	
13. Zweimalige Inkubation mit Chromogenpuffer für jeweils 2 Minuten (nur bei Verwendung mit Alkalischer Phosphatase konjugierter ABC-Komplexe)	

³⁵ Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A

³⁶ DAB Substrate Kit For Peroxidase, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A

³⁷ Biotinylated Anti-Mouse IgG (H+L)-Affinity-Purified-Rat absorbed, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A

³⁸ Pap Pen, Fa. The Binding Site, Birmingham, U.K.

14. Inkubation mittels entsprechender Substrat-Chromogen-Lösung für 1 Minute
15. Lichtmikroskopische Betrachtung eines Paraffinschnittes bei 20-facher Vergrößerung bis zur Anfärbung der positiven Zellen bzw. Gefäße (Entwicklung)
16. Einmalige Spülung mit Phosphatpuffer für 5 Minuten
17. Kerngegenfärbung durch kurzes Eintauchen der Gewebelängsschnitte in Methylgrün-Färbelösung
18. Entwässerung des Gewebes (siehe Kapitel 5.3.2.2)
19. Versehen des Gewebes mit Deckgläsern (siehe Kapitel 5.3.2.2)

Tabelle 5-4: Allgemeines Protokoll immunhistologischer Untersuchungen

Abweichungen ergaben sich lediglich durch Verwendung unterschiedlicher Primärantikörper sowie zur Visualisierung eingesetzter Substrat-Chromogen-Lösungen (siehe Tabelle 5-5). Für die Analysen wurde jeweils ein Gewebelängsschnitt pro Primärantikörper, Versuchsgruppe und Untersuchungszeitpunkt herangezogen. Sämtliche Schritte wurden, soweit nicht anders aufgeführt, bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Deparaffinisierung, Entwässerung, Spülung und Rehydratisierung des Gewebes, sowie die Inhibierung endogener Peroxidaseaktivität erfolgte gemäß der bereits in Kapitel 5.3.1 beschriebenen Vorgehensweise.

Zur Durchführung der Inkubation wurden dagegen jeweils 20 µl des entsprechend verwendeten Reagenzes auf die Tibialängsschnitte pipettiert³⁹ und diese in einem mit zwei befeuchteten Einmalhandtüchern ausgelegten Instrumentenkasten aufbewahrt, um einer Austrocknung des Gewebes vorzubeugen.

Zielstruktur	Primärantikörper	Substrat-Chromogen-Lösung
Makrophagen	Monoclonal Antibody to Rat Monocytes/Macrophages Fa. Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Deutschland	Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I Fa. Vector Laboratories–Burlingame, U.S.A.
Granulozyten	HIS 48 Mouse IgM K, Fa. BD PharMingen, Heidelberg, Deutschland	DAB Substrate Kit for Peroxidase, Fa. Vector Laboratories–Burlingame, U.S.A.
Gefäße	Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin, Clone 1 A 4 Fa. DakoCytomation, Denmark A/S	Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I Fa. Vector Laboratories–Burlingame, U.S.A.
Osteoblasten	Klon E 11, Departement Klinische Forschung, Universität Bern	Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I Fa. Vector Laboratories–Burlingame, U.S.A.

Tabelle 5-5: Verwendete Primärantikörper und Substrat-Chromogen-Lösungen

³⁹ Verwendete Pipette: Eppendorf Reference variabel, Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland

5.4 TRAP-Färbung

5.4.1 Theoretischer Hintergrund

Die TRAP-Färbung ermöglicht den Nachweis von Osteoklasten. Dabei wird Fast-Red-Violett-Salz durch von den Zellen sezernierte Tartrat-resistente saure Phosphatase (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) zu einem rot-violett gefärbten Produkt umgesetzt.

5.4.2 Durchführung

Für die TRAP-Färbung wurde zu den Untersuchungszeitpunkten von einer und drei Wochen jeweils ein Gewebelängsschnitt pro Versuchsgruppe entsprechend dem nachfolgend aufgeführten Protokoll (siehe Tabelle 5-6) analysiert. Die Durchführung der einzelnen Schritte erfolgte gemäß der in Kapitel 5.3.1 beschriebenen Vorgehensweise. Da Xylen zur Herabsetzung der Farbtintensität TRAP positiver Zellen führt, entfiel die im Rahmen der Übersichtsfärbung sowie immunhistologischer Analysen durchgeführte Gewebeentwässerung im Anschluss an den Färbeprozess. Deshalb wurde als Einschlussmittel für das abschließende Versehen des Gewebes mit Deckgläsern wasserlösliche Methylzellulose verwendet.

Protokoll für die TRAP-Färbung	
1. Herstellung gebrauchsfertiger Lösungen	
Lösung	Herstellung
TRAP-Puffer pH 5,0	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lösen von 3,2g Natriumacetat und 46,01g Natriumtartrat⁴⁰ in 150 ml demineralisiertem Wasser ▪ Einstellung des pH-Wertes mittels 2 molarer Natriumhydroxidlösung. ▪ Auffüllung des Volumens mit demineralisiertem Wasser auf 200 ml.
TRAP-Färbelösung	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lösen von 40 mg Naphtol AS-MIX Phosphat, 240 mg Fast Red Violett LB Salt, 2 ml Triton X und 4 ml N-N-Dimethylformamid⁴¹ in 200 ml TRAP-Puffer
2. Deparaffinisierung und Entwässerung des Gewebes (siehe Kapitel 5.3.2.2)	
3. Spülung mit TRAP-Puffer für 10 Minuten	
4. Aufbewahrung der Schnitte in der TRAP-Färbelösung für 2 Stunden bei 37°C	
5. Spülung mit demineralisiertem Wasser für 1 Minute	
6. Kerngegenfärbung mit Methylgrün (siehe Kapitel 5.3.3.3)	
7. Kurzes Eintauchen in Ethanol 70 %	
8. Spülung mit demineralisiertem Wasser für 1 Minute	
9. Versehen des Gewebes mit Deckgläsern	

Tabelle 5-6: Angewendetes Protokoll für die TRAP-Färbung

⁴⁰ Feststoffe: Fa. Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland

⁴¹ Feststoffe und flüssige Reagenzien: Fa. Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland

5.5 Auswertung

5.5.1 Allgemeines

Sämtliche histologische Analysen wurden unter Verwendung eines konventionellen Lichtmikroskops⁴² in 20-facher Vergrößerung ausgewertet.

5.5.2 Übersichtsfärbung

Die Auswertung der HE-Färbung erfolgte deskriptiv. Dazu wurde jeweils ein Gewebelängsschnitt pro Versuchsgruppe und Untersuchungszeitpunkt vollständig im Hinblick auf dessen Morphologie untersucht.

⁴² Leica DMRB Mikroskop, Fa. Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, 35530 Wetzlar, Deutschland

5.5.3 Immunhistologie/TRAP-Färbung

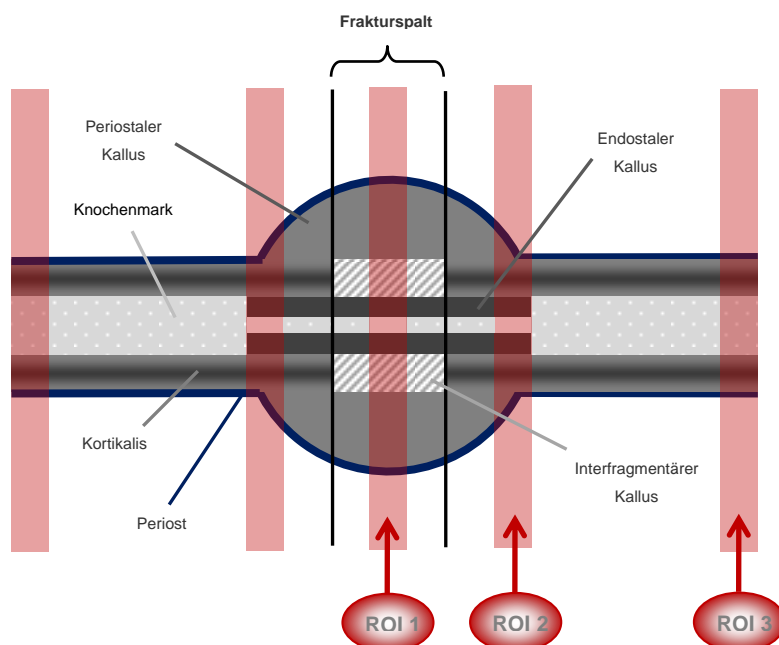


Abbildung 5-5: Schematische Darstellung der Untersuchungsbereiche (ROI: Region Of Interest)

ROI 1: Zentrum der Fraktur bzw. Weichteiltraumatisierung

ROI 2: Peripherie: Jeweils zwei Gesichtsfelder (20-fache Vergrößerung, siehe Kapitel 5.5.1) proximal sowie distal vom Zentrum der Schädigung entfernter Bereich

ROI 3: Außenbereich: Maximal vom Zentrum der Schädigung entfernter Bereich des Periosts

eigene Abbildung

5.5.3.1 Granulozyten, Makrophagen, Gefäße

Die Auswertung immunhistologischer Untersuchungen bezüglich der verletzungsbedingten Reaktion von Granulozyten, Makrophagen sowie Gefäßen erfolgte quantitativ mithilfe eines computergestützten Bildanalyse-Systems⁴³. Dieses erlaubte es, mikroskopische Bilder auf dem Monitor eines Rechners maßstabsgetreu darzustellen, so dass die Auswertung im makroskopischen Bereich stattfinden konnte. Dazu wurden Periost, periostaler, interfragmentärer sowie endostaler Kallus jeweils

Die Auswertung immunhistologischer Analysen und der TRAP-Färbung erfolgte quantitativ bzw. semiquantitativ (siehe Kapitel 5.5.3.1 und 5.5.3.2).

Hierfür wurden Periost, periostaler, interfragmentärer sowie endostaler Kallus, soweit vorhanden, innerhalb festgelegter

Untersuchungsbereiche (ROI: region of interest, siehe Abbildung 5-5) jeweils vollständig auf die Präsenz von Granulozyten, Makrophagen, Gefäßen, Osteoblasten sowie Osteoklasten hin überprüft.

⁴³ Bildanalyse-System: KS 400, Carl Zeiss Jena, Deutschland

mittels Computermouse gekennzeichnet und deren Fläche durch das Bildanalyse-System berechnet. Anschließend erfolgte die Markierung von positiven Zellen bzw. Gefäßen per Mausklick durch den Beobachter. Dabei wurden alle ermittelten Werte automatisch vom Bildanalyse-System gespeichert, den jeweils untersuchten Strukturen zugeordnet und die Anzahl der Zellen bzw. Gefäße auf einen mm^2 normiert. Danach erfolgte jeweils die Bildung des arithmetischen Mittels der für das Periost, den periostalen, interfragmentären sowie endostalen Kallus erhaltenen Ergebnisse. Anschließend wurde durch Addition der entsprechenden Mittelwerte die Gesamtanzahl positiver Zellen bzw. Gefäße für das Periost und den Kallus berechnet.

5.5.3.2 Osteoblasten, Osteoklasten

Die analytische Auswertung von Osteoblasten und Osteoklasten erfolgte semiquantitativ, modifiziert nach Remmele [81].

Dazu wurde durch zwei unabhängige Beobachter sowohl die prozentuale Verteilung positiver Zellen als auch deren Farbintensität bestimmt, jeweils entsprechenden Werteskalen zugeordnet und aus dem Produkt der ermittelten Einzelwerte ein immunreaktiver Score (IRS) gebildet (siehe Tabelle 5-7).

Anschließend erfolgte die Berechnung des arithmetischen Mittels, jeweils bezogen auf das Periost, den periostalen, interfragmentären sowie endostalen Kallus. Danach wurde durch Addition der entsprechenden Mittelwerte die Immunreaktivität von Osteoblasten bzw. die Präsenz von Osteoklasten des gesamten Periosts sowie Kallus bestimmt.

Farbintensität Prozentuale Zellverteilung	Keine Farbintensität: Wert = 0	Schwache Farbintensität: Wert = 1	Mäßige Farbintensität: Wert = 2	Starke Farbintensität: Wert = 3
Keine positiven Zellen: Wert = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0
< als 10% positive Zellen: Wert = 1	IRS = 0	IRS = 1	IRS = 2	IRS = 3
10 - 50% positive Zellen: Wert = 2	IRS = 0	IRS = 2	IRS = 4	IRS = 6
51 - 80% positive Zellen: Wert = 3	IRS = 0	IRS = 3	IRS = 6	IRS = 9
> als 80% positive Zellen: Wert = 4	IRS = 0	IRS = 4	IRS = 8	IRS = 12

Tabelle 5-7: Immunreaktiver Score, modifiziert nach Remmele [81]

5.5.4 Statistik

Die statistische Auswertung unabhängiger Parameter erfolgte mittels univariater Varianzanalyse. Dazu wurden die ermittelten Gesamtwerte von Periost und Kallus jeweils auf das Auftreten signifikanter Unterschiede hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs sowie der verschiedenen Versuchsgruppen überprüft. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich für den periostalen Kallus zum Untersuchungszeitpunkt von einer Woche erhaltener Werte (siehe Kapitel 6.1) zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.

Zur Überprüfung regionaler Unterschiede innerhalb des Periosts sowie Struktur bedingter Unterschiede (Periost, periostaler, endostaler und interfragmentärer Kallus) wurde pro Versuchsgruppe eine univariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen durchgeführt.

6 Ergebnisse

6.1 HE-Färbung

In der Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin/Eosin stellte sich nach isoliertem Weichteilschaden ein intaktes, gegenüber der Kortikalis klar abgegrenztes Periost dar. Dabei konnte innerhalb der ersten Woche nach Intervention zwischen geschädigtem Muskel und intakter Kortikalis eine deutliche Verdickung des Periosts beobachtet werden, die sich nach drei Wochen wieder zurückbildete. Darüber hinaus zeigte sich zum Untersuchungszeitpunkt von einer Woche ein vorwiegend aus Geflechtknochen bestehender Kallus, der monokortikal zwischen unbeschädigter Kortikalis und verdicktem Periost lokalisiert war.

Daneben ließ sich 24 und 48 Stunden nach isolierter Fraktur oder Kombinationsverletzung die Entstehung eines durchgehenden Bruchspaltes sowie eine partielle Ablösung des Periosts von der angrenzenden intakten Kortikalis und die damit verbundene Ausbildung eines ausgedehnten Hämatoms feststellen.

Nach einer Woche konnte die vollständige Überbrückung des Frakturspaltes durch einen aus Bindegewebe, Knorpel und Geflechtknochen bestehenden Kallus beobachtet werden, der gegenüber dem umliegenden Weichteilmantel von einer deutlich verbreiterten Knochenhaut abgegrenzt wurde.

Zum Untersuchungszeitpunkt von drei Wochen zeigte sich dagegen ein erheblich verkleinerter Kallus mit fehlenden Bindegewebsanteilen, dem ein zweischichtiges intaktes Periost auflag.

6.2 Immunhistologie/TRAP-Färbung

6.2.1 Allgemeines

Die immunhistologischen Untersuchungen sowie die TRAP-Färbung des periostalen Kallus zum Untersuchungszeitpunkt von einer Woche ergaben in keinem Fall signifikante Unterschiede der Zell- bzw. Gefäßanzahl zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.

6.2.2 Granulozyten

Als unmittelbare Reaktion auf Verletzung konnte zu den Untersuchungszeitpunkten von 24 und 48 Stunden für das Periost ein verstärktes Granulozytenaufkommen festgestellt werden (siehe Abbildung 6-1).

Dabei waren infolge eines isolierten Muskeltraumas annähernd gleichbleibende Zellzahlen nachweisbar. Dagegen konnte nach isolierter Fraktur eine leichte Reduktion der Granulozytendichte von 24 bis hin zu 48 Stunden beobachtet werden, während diese innerhalb des gleichen Zeitraums infolge einer Kombinationsverletzung signifikant zunahm. Gleichzeitig waren deutliche Unterschiede der Zellanzahl in Abhängigkeit vom Verletzungsmuster erkennbar. So konnte innerhalb der ersten zwei Tage nach

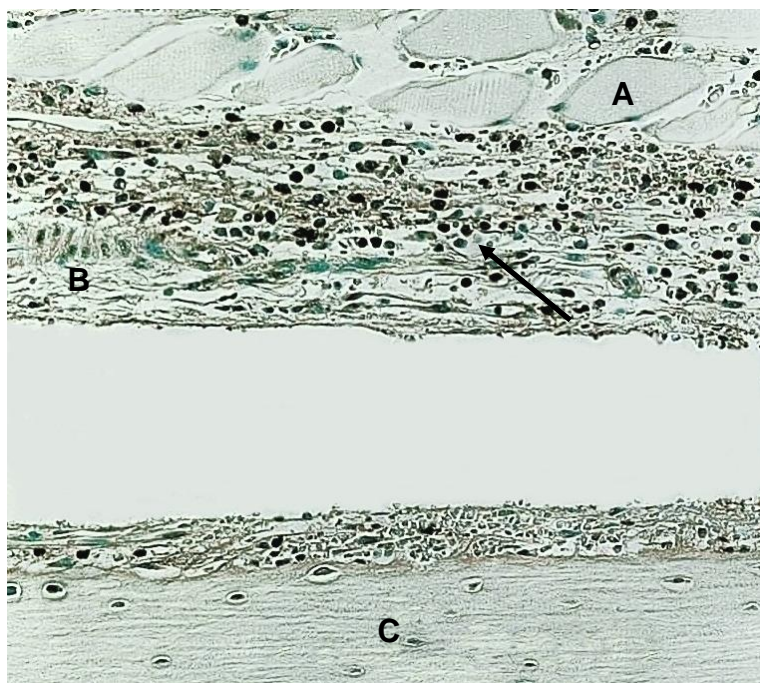


Abbildung 6-1: Immunhistologischer Nachweis von Granulozyten im Periost des peripheren Untersuchungsgebietes 24 Stunden nach Fraktur.

Zwischen Muskelzellen (A) und Kortikalis (C) zeigt sich ein verletzungsbedingt zerstörtes Periost (B) mit braun angefärbten Granulozyten (siehe Pfeil).

eigene Abbildung

oder Kombinationsverletzung.

isoliertem Weichteilschaden, separater Fraktur oder Kombinationsverletzung jeweils eine bedeutsame Erhöhung der Granulozytenanzahl im Vergleich zum unverletzten Periost festgestellt werden. Außerdem ließen sich nach 24 Stunden aufgrund einer separaten Fraktur signifikant mehr Zellen nachweisen als infolge isolierter Weichteilverletzung. Daneben zeigten sich zum Untersuchungszeitpunkt von 48 Stunden nach separatem Weichteilschaden signifikant weniger Granulozyten als aufgrund einer isolierten Fraktur

Nach einer Woche konnte dann insgesamt eine evidente Reduktion der Granulozytendichte auf Werte unterhalb des Kontrollniveaus festgestellt werden. Dabei ließen sich unabhängig vom Verletzungsmuster jeweils signifikant weniger Zellen nachweisen als zu den Untersuchungszeitpunkten von 24 und 48 Stunden. Nach drei Wochen nahm die Granulozytendichte dagegen wieder leicht zu, wobei sich infolge isolierter Weichteilschädigung oder Fraktur eine signifikante Erhöhung der Zellanzahl im Vergleich zum Untersuchungszeitpunkt von einer Woche nachweisen ließ. Allerdings war die Granulozytendichte nach drei Wochen im Vergleich zum frühen Beobachtungszeitraum immer noch wesentlich verringert. So zeigte sich hier für alle Verletzungsmuster eine bedeutsame Verminderung der Zellanzahl gegenüber dem Untersuchungszeitpunkt von 24 Stunden. Gleichzeitig ließen sich signifikant weniger Granulozyten nachweisen als 48 Stunden nach isolierter Fraktur oder Kombinationsverletzung (siehe Abbildung 6-2).

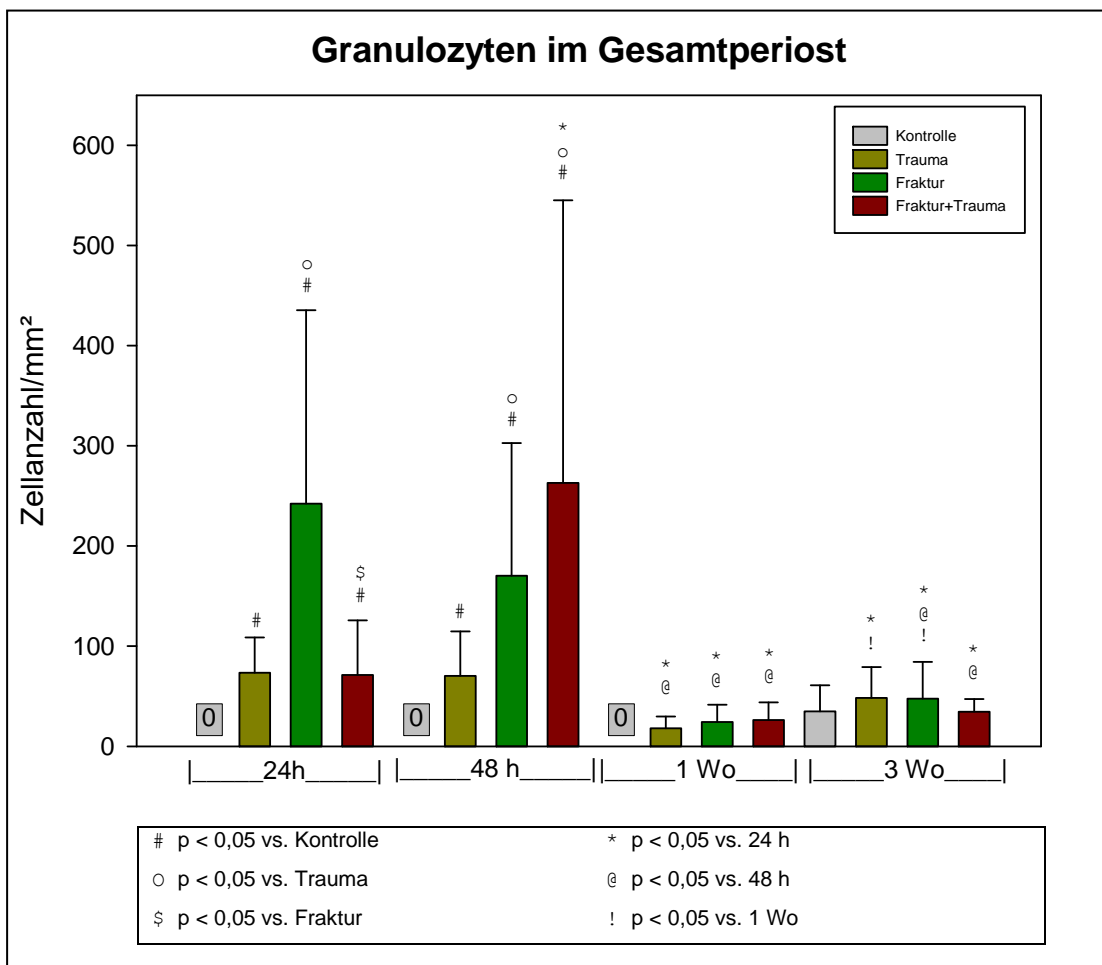
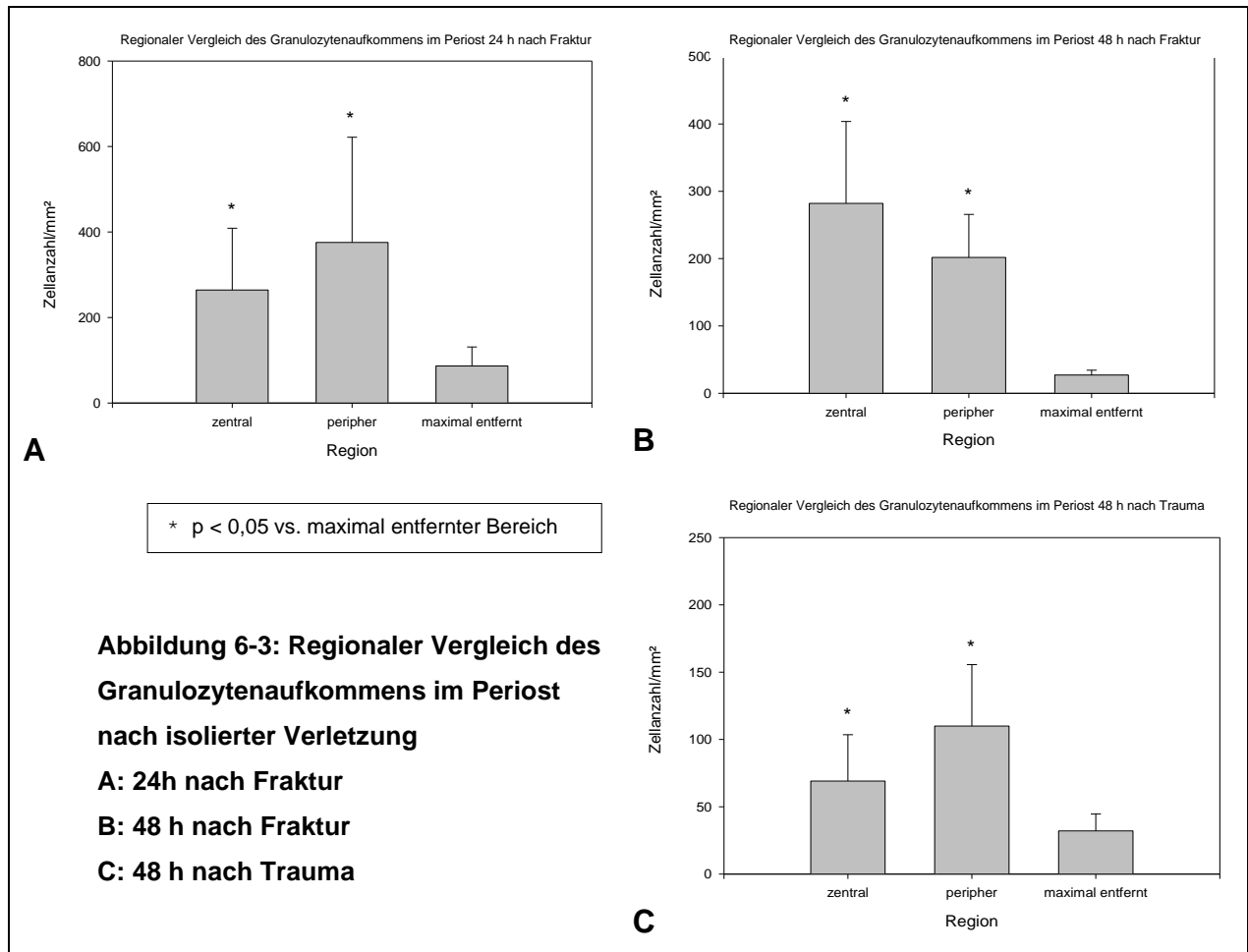


Abbildung 6-2: Anzahl von Granulozyten im gesamten Perioist

Daneben wies das Periost deutliche regionale Unterschiede in der Granulozytenpräsenz auf.

So zeigte sich 24 Stunden infolge einer separaten Fraktur sowie 48 Stunden nach isolierter Weichteilschädigung oder Fraktur sowohl zentral als auch peripher eine bedeutsame Erhöhung der Zellanzahl im Vergleich zum Außenbereich (siehe Abbildung 6-3).



Zusätzlich ließen sich zu den Untersuchungszeitpunkten von 24 und 48 Stunden infolge einer Kombinationsverletzung im Zentrum der Schädigung signifikant mehr Zellen nachweisen als im Außenbereich. Weiterhin konnte drei Wochen nach Kombinationsverletzung in der Peripherie eine bedeutsame Erhöhung der Granulozytendichte gegenüber dem Außenbereich festgestellt werden (siehe Abbildung 6-4).

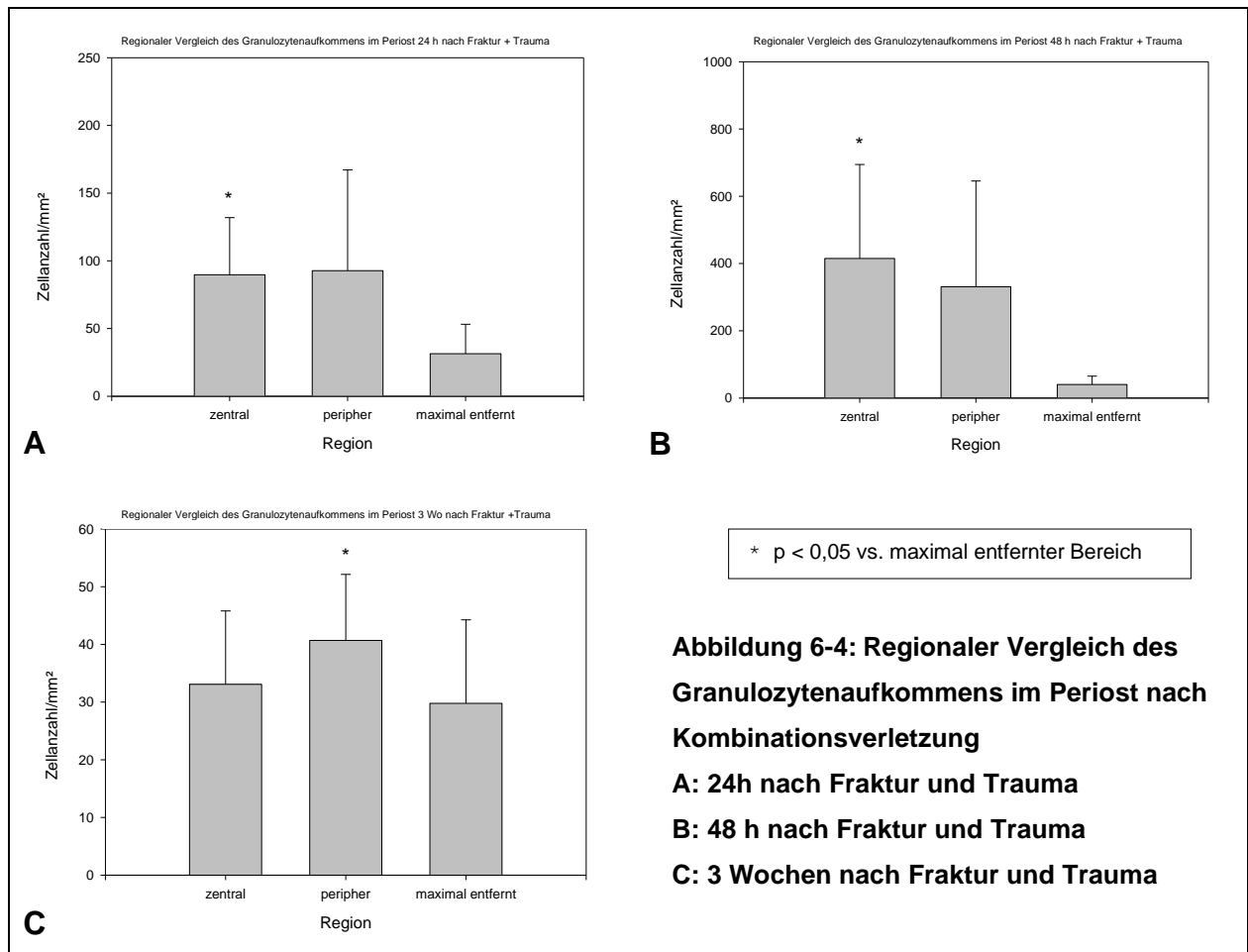


Abbildung 6-4: Regionaler Vergleich des Granulozytenaufkommens im Periost nach Kombinationsverletzung
A: 24h nach Fraktur und Trauma
B: 48 h nach Fraktur und Trauma
C: 3 Wochen nach Fraktur und Trauma

Im Kallus zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Zellanzahl. Jedoch konnte infolge isolierter Fraktur eine leichte Reduktion der Granulozytendichte von einer bis hin zu drei Wochen beobachtet werden,

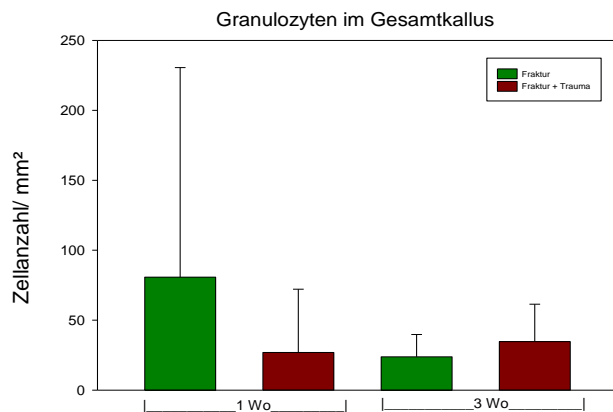


Abbildung 6-5: Anzahl von Granulozyten im Gesamtkallus

während aufgrund einer Kombinationsverletzung innerhalb dieses Zeitraums ein geringfügiger Anstieg der Zellanzahl erkennbar war. Gleichzeitig ließen sich nach einer Woche infolge isolierter Fraktur mehr Granulozyten nachweisen als aufgrund einer Kombinationsverletzung. Im Gegensatz dazu zeigte sich zum Untersuchungszeitpunkt von drei Wochen

infolge isolierter Fraktur eine geringere Zelldichte als nach Kombinationsverletzung (siehe Abbildung 6-5).

Im Vergleich der einzelnen Strukturen ließen sich dagegen erhebliche Unterschiede des Granulozytenaufkommens feststellen (siehe Abbildung 6-6).

So konnte im Zentrum der Schädigung nach drei Wochen infolge isolierter Fraktur für das Periost eine signifikante Erhöhung der Zellanzahl gegenüber dem periostalen Kallus festgestellt werden.

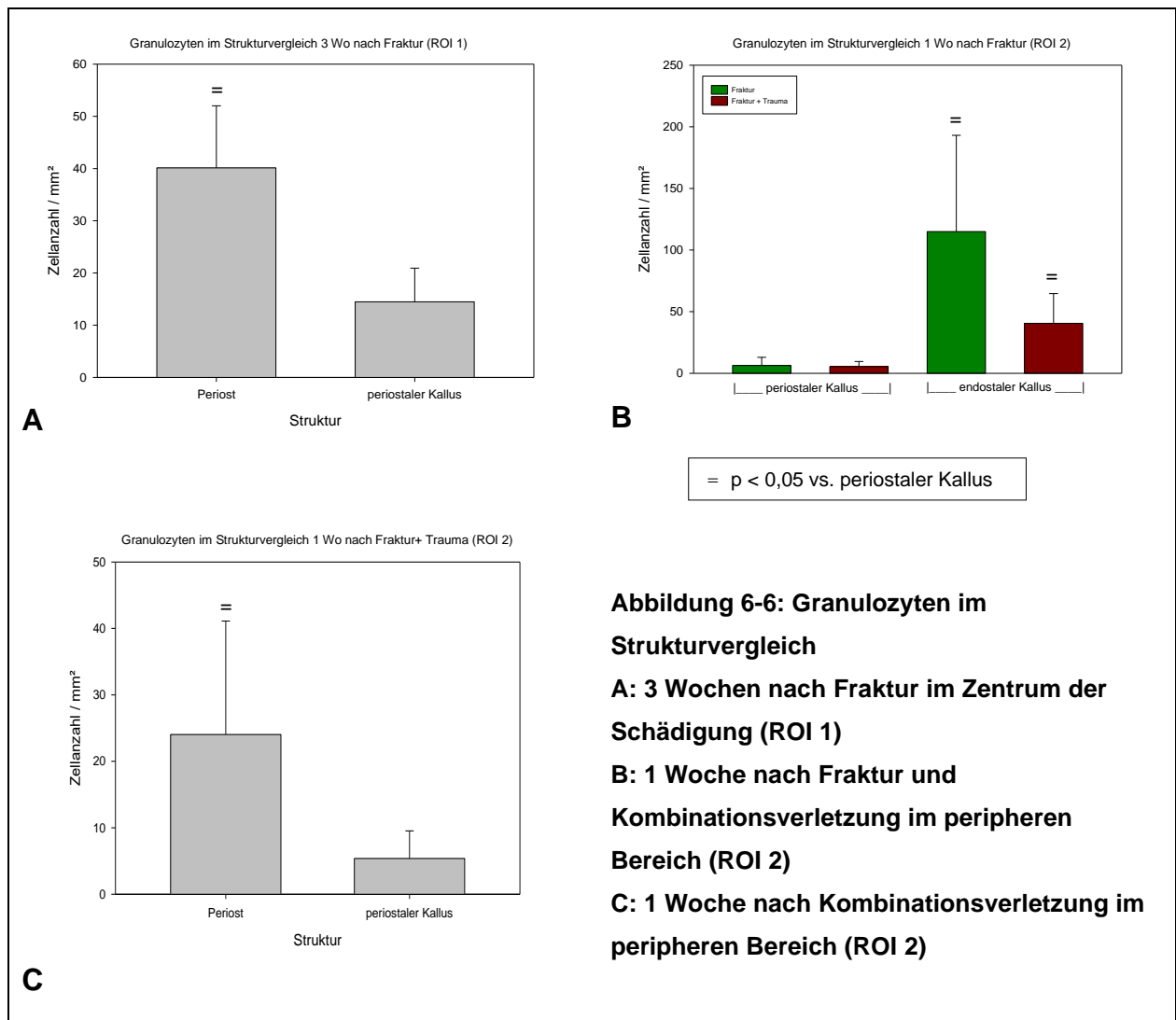


Abbildung 6-6: Granulozyten im Strukturvergleich

A: 3 Wochen nach Fraktur im Zentrum der Schädigung (ROI 1)

B: 1 Woche nach Fraktur und Kombinationsverletzung im peripheren Bereich (ROI 2)

C: 1 Woche nach Kombinationsverletzung im peripheren Bereich (ROI 2)

Darüber hinaus zeigten sich in der Peripherie zum Untersuchungszeitpunkt von einer Woche wesentliche Unterschiede der Granulozytendichte. So konnte infolge isolierter Fraktur oder Kombinationsverletzung im endostalen Kallus eine bedeutsame Erhöhung der Zellanzahl gegenüber dem periostalen Kallus festgestellt werden. Zusätzlich ließen sich hier im Periost aufgrund einer Kombinationsverletzung signifikant mehr Granulozyten nachweisen als im periostalen Kallus.

6.2.3 Makrophagen

Der immunhistologische Nachweis von Makrophagen zeigte vor allem während des frühen Beobachtungszeitraums eine verletzungsbedingte Erhöhung der Zelldichte im Periost (siehe Abbildung 6-7). Dabei ließ sich 24 Stunden nach isoliertem Weichteiltrauma die maximale Zellanzahl nachweisen. Daneben konnte infolge von separater Fraktur oder Kombinationsverletzung eine leichte Erhöhung der Makrophagendichte gegenüber dem unverletzten Periost festgestellt werden, die innerhalb des Beobachtungszeitraums von 24 bis hin zu 48 Stunden jeweils leicht zunahm.

Darüber hinaus zeigten sich wesentliche Unterschiede der Zellanzahl in Abhängigkeit vom Verletzungsmuster. So ließen sich zum Untersuchungszeitpunkt von 24 Stunden

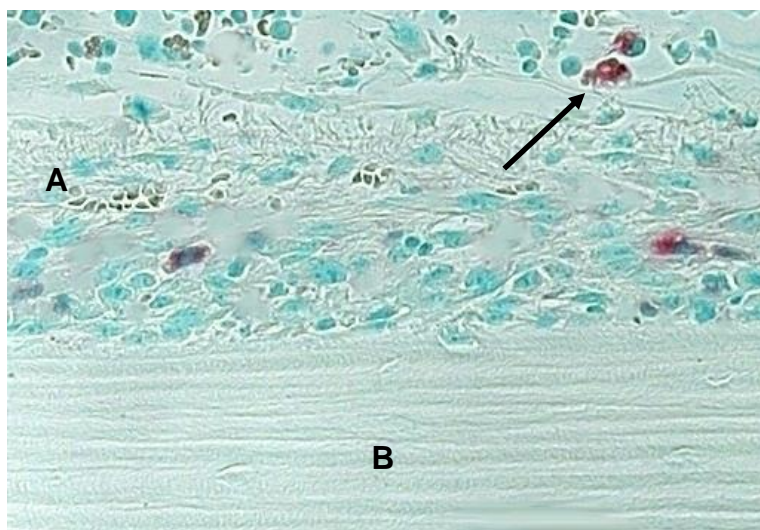


Abbildung 6-7: Immunhistologischer Nachweis von Makrophagen im Periost des peripheren Untersuchungsgebietes 48 Stunden nach Fraktur und Weichteilschaden.

Der Kortikalis (B) liegt ein verletzungsbedingt verdicktes Periost (A) auf, in dem sich rot angefärbte Makrophagen zeigen (siehe Pfeil).

eigene Abbildung

aufgrund eines isolierten Weichteilschadens signifikant mehr Makrophagen nachweisen als nach separater Fraktur oder Kombinationsverletzung.

Zusätzlich konnte 24 und 48 Stunden infolge einer isolierten Weichteilschädigung sowie 48 Stunden nach Kombinationsverletzung jeweils eine bedeutsame Erhöhung der Zellanzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

Zum Untersuchungszeitpunkt von einer Woche war dann insgesamt ein deutlicher Rückgang der

Makrophagendichte mit signifikant weniger Zellen im Vergleich zum frühen Beobachtungszeitraum erkennbar. Gleichzeitig konnten hier durchschnittlich weniger Makrophagen nachgewiesen werden als im unverletzten Periost.

Nach drei Wochen stieg die Zelldichte erneut an und erreichte damit in etwa wieder das Kontrollniveau, wobei sich infolge einer isolierten oder zusätzlichen Weichteilschädigung immer noch signifikant weniger Makrophagen nachweisen ließen als während des frühen Beobachtungszeitraums (siehe Abbildung 6-8).

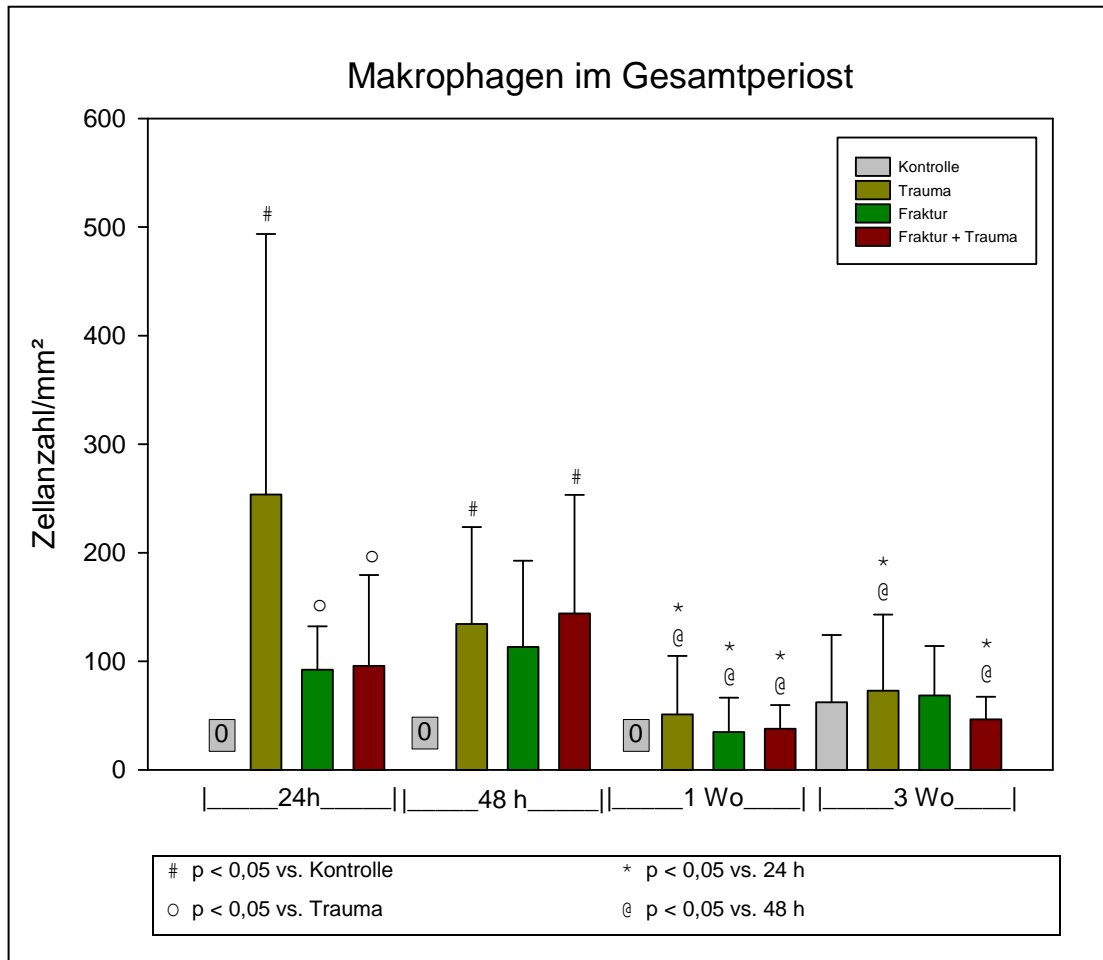
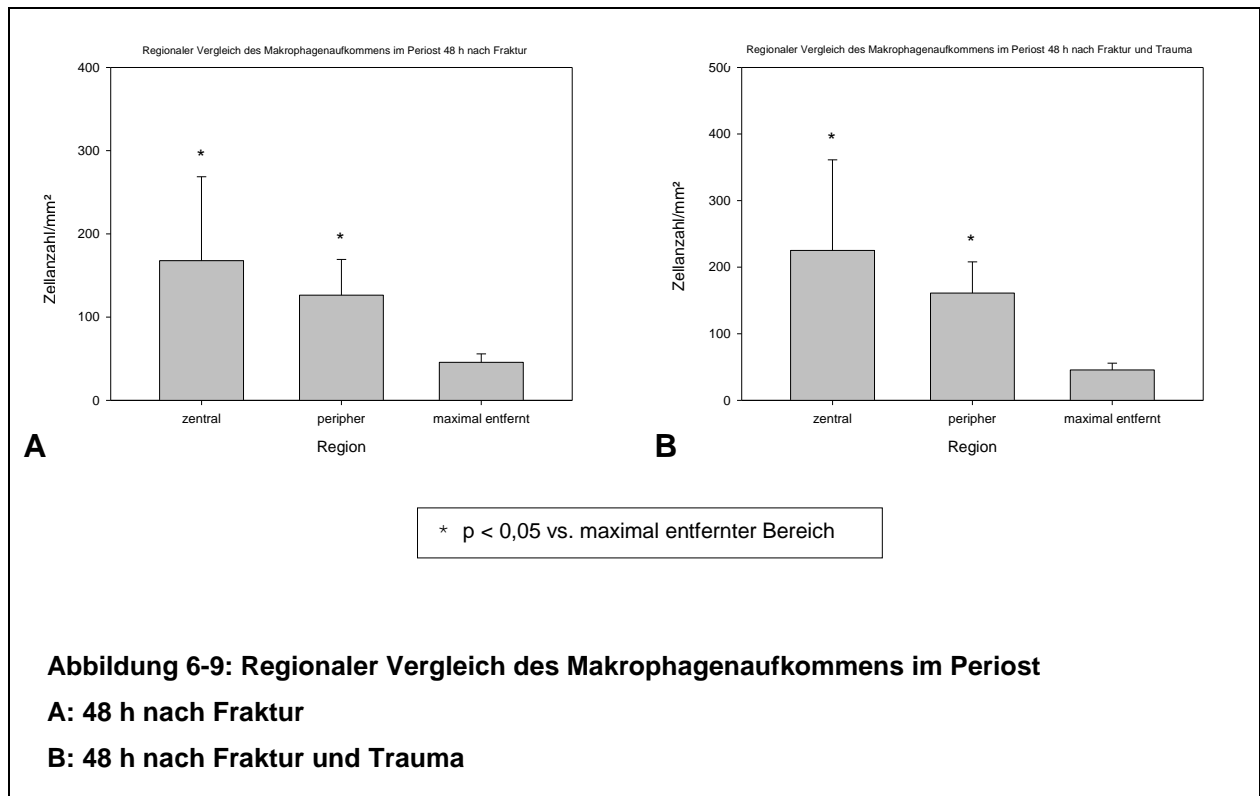


Abbildung 6-8: Anzahl von Makrophagen im gesamten Perioist

Darüber hinaus zeigte der regionale Vergleich des Periosts zum Untersuchungszeitpunkt von 48 Stunden infolge isolierter Fraktur oder Kombinationsverletzung für das Zentrum der Schädigung und die periphere Zone jeweils eine bedeutsame Erhöhung der Makrophagenanzahl im Vergleich zum Außenbereich (siehe Abbildung 6-9).



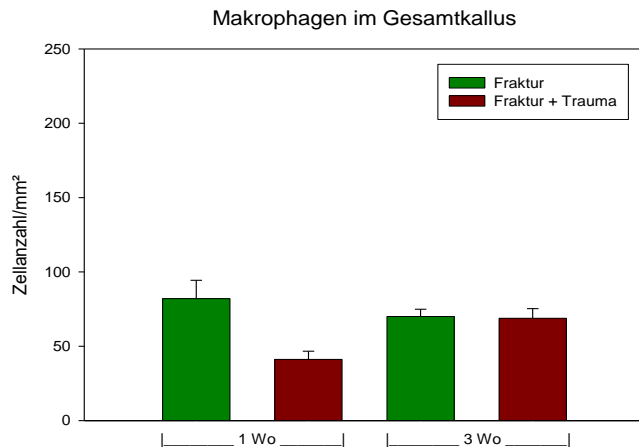


Abbildung 6-10: Anzahl von Makrophagen im gesamten Kallus

Im Kallus waren dagegen keine signifikanten Unterschiede der zellulären Reaktion erkennbar. Allerdings konnte infolge isolierter Fraktur eine geringfügige Abnahme der Zellanzahl von einer bis hin zu drei Wochen beobachtet werden, wohingegen diese innerhalb des gleichen Zeitraums aufgrund einer Kombinationsverletzung leicht zunahm. Dabei ließen sich zum Untersuchungszeitpunkt von einer Woche infolge isolierter Fraktur geringfügig mehr Makrophagen nachweisen als nach Kombinationsverletzung, während zum Untersuchungszeitpunkt von drei Wochen so gut wie kein Unterschied der Zellanzahl zwischen den einzelnen Versuchsgruppen mehr erkennbar war (siehe Abbildung 6-10). Darüber hinaus zeigte der Vergleich von Periost, periostalem, endostalem und interfragmentären Kallus ebenfalls keine signifikanten Unterschiede des Makrophagenaufkommens.

Im Kallus waren dagegen keine signifikanten Unterschiede der zellulären Reaktion erkennbar. Allerdings konnte infolge isolierter Fraktur eine geringfügige Abnahme der Zellanzahl von einer bis hin zu drei Wochen beobachtet werden, wohingegen diese innerhalb des gleichen Zeitraums aufgrund einer Kombinationsverletzung leicht zunahm. Dabei ließen sich zum Untersuchungszeitpunkt von einer Woche infolge isolierter Fraktur geringfügig mehr Makrophagen nachweisen als nach Kombinationsverletzung, während zum Untersuchungszeitpunkt von drei Wochen so gut wie kein Unterschied der Zellanzahl zwischen den einzelnen Versuchsgruppen mehr erkennbar war (siehe Abbildung 6-10). Darüber hinaus zeigte der Vergleich von Periost, periostalem, endostalem und interfragmentären Kallus ebenfalls keine signifikanten Unterschiede des Makrophagenaufkommens.

6.2.4 Gefäße

Der immunhistologische Nachweis von Gefäßen zeigte für das Periost insgesamt eine verletzungsbedingte Erhöhung der Vaskularisierung (siehe Abbildung 6-11).

Dabei konnte während des frühen Beobachtungszeitraums unabhängig vom Interventionsmuster jeweils eine leichte Reduktion der vaskulären Dichte von 24 bis hin zu 48 Stunden beobachtet werden. Gleichzeitig waren hier zwischen den einzelnen Versuchsgruppen teilweise deutliche Unterschiede der Gefäßanzahl erkennbar. So zeigte sich 24 und 48 Stunden nach Kombinationsverletzung sowie 24 Stunden infolge isolierter Weichteilschädigung jeweils eine bedeutsame Erhöhung der vaskulären Dichte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusätzlich ließen sich zum Untersuchungszeitpunkt von 24 Stunden infolge isolierter Fraktur signifikant weniger

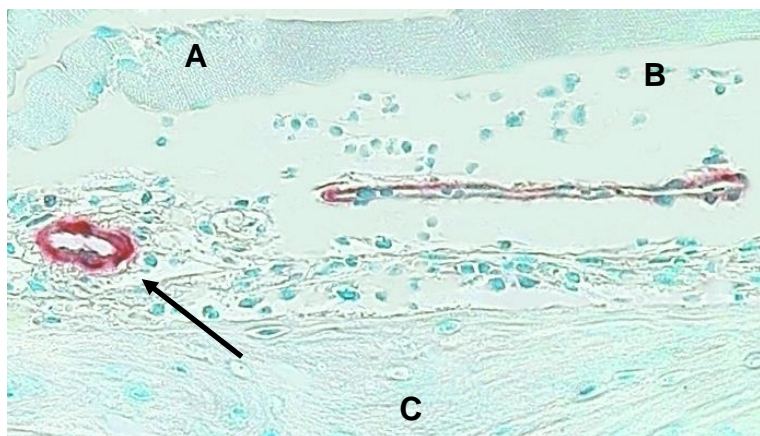


Abbildung 6-11: Immunhistologischer Nachweis von Gefäßen im Periost des peripheren Untersuchungsgebietes 24 Stunden nach Fraktur.

Zwischen Muskelzellen (A) und Kortikalis (C) zeigt sich ein verletzungsbedingt zerstörtes Periost (B) mit rot angefarbten Gefäßen (siehe Pfeil).

eigene Abbildung

dem frühen Beobachtungszeitraum, während sich die Gefäßanzahl nach Kombinationsverletzung hier weiter verringerte.

Gefäße nachweisen als nach separatem Weichteilschaden oder Kombinationsverletzung. Darüber hinaus konnte 48 Stunden nach Kombinationsverletzung eine signifikant höhere Gefäßanzahl nachgewiesen werden als aufgrund isolierter Fraktur oder Weichteilschädigung.

Nach einer Woche zeigte sich infolge separater Fraktur oder Weichteilschädigung wieder eine leichte Zunahme der Vaskularisierung gegenüber

sich die Gefäßanzahl nach

Drei Wochen nach Intervention konnte dann unabhängig vom Verletzungsmuster eine leichte Erhöhung der vaskulären Dichte gegenüber dem Untersuchungszeitpunkt von einer Woche festgestellt werden. Darüber hinaus ließen sich für den späten Beobachtungszeitraum im Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen jeweils ein und drei Wochen nach isolierter Weichteilschädigung oder Kombinationsverletzung sowie drei Wochen infolge separater Fraktur signifikant mehr Gefäße nachweisen als in der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 6-12).

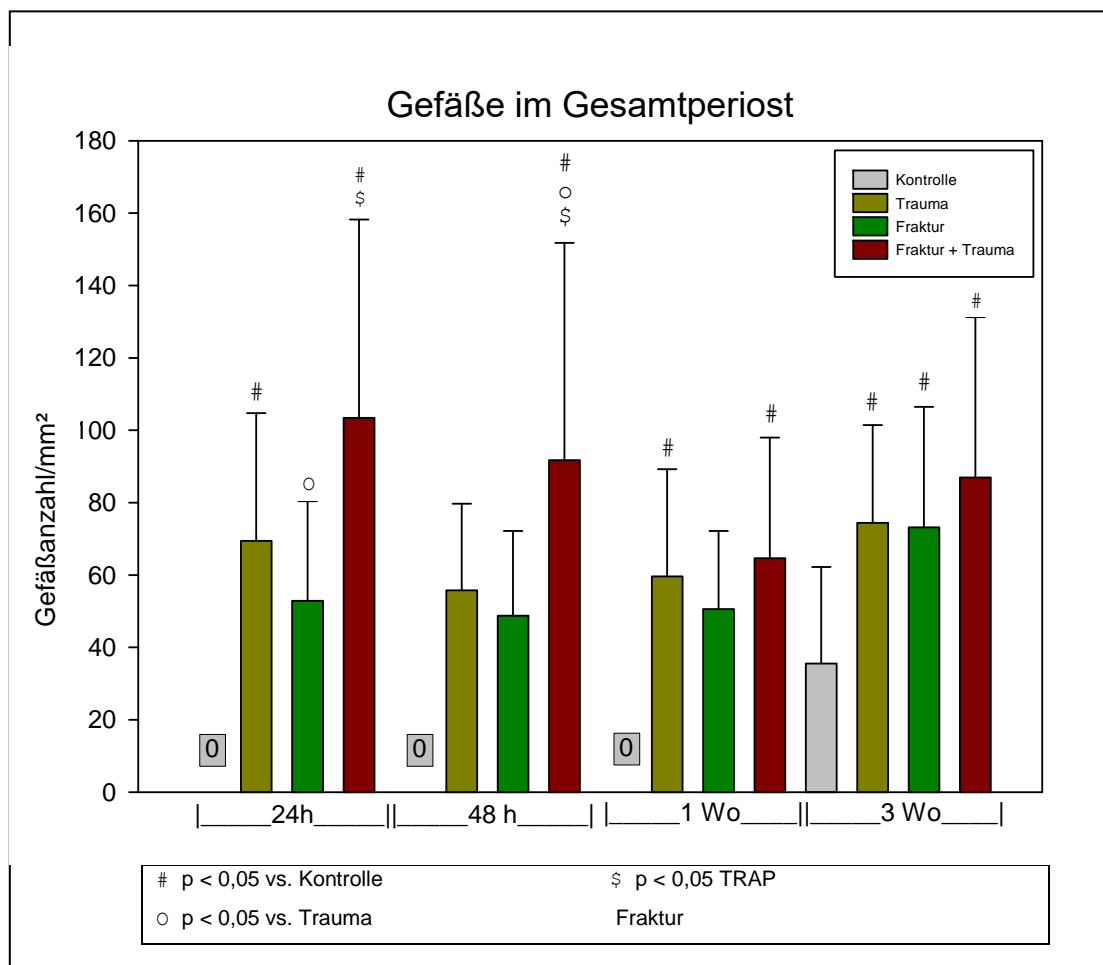
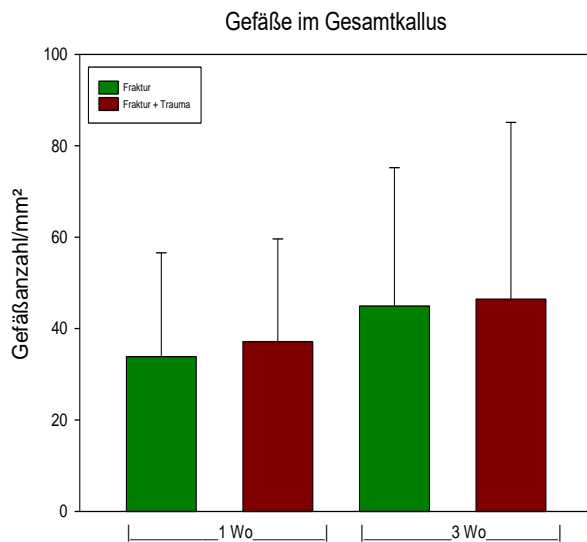


Abbildung 6-12: Anzahl von Gefäßen im gesamten Periost

Zwischen den einzelnen Regionen des Periosts zeigten sich dagegen keine bedeutsamen Unterschiede in Bezug auf deren Vaskularisierung.

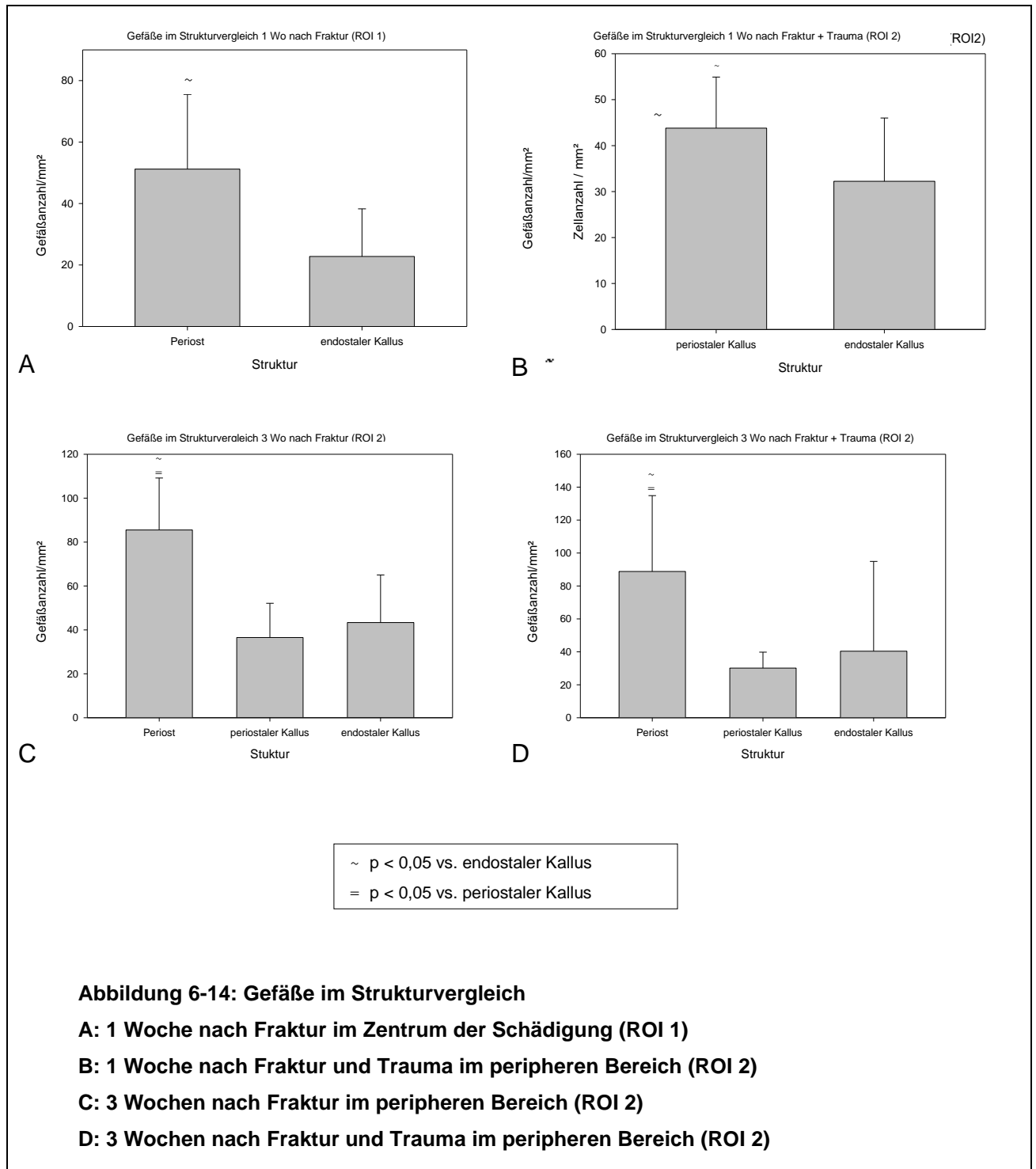


Auch im Kallus waren keine signifikanten Unterschiede der Gefäßanzahl erkennbar. Jedoch konnte hier insgesamt eine leichte Zunahme der Vaskularisierung von einer bis hin zu drei Wochen beobachtet werden. Dabei lieÙen sich aufgrund einer Kombinationsverletzung jeweils geringfügig mehr GefäÙe nachweisen als infolge isolierter Fraktur (siehe Abbildung 6-13).

Abbildung 6-13: Anzahl von GefäÙen im gesamten Kallus

Dagegen zeigten sich im Strukturvergleich deutliche Unterschiede der Vaskularisierung (siehe Abbildung 6-14). So konnte eine Woche nach isolierter Fraktur im zentralen Untersuchungsbereich für das Periost eine bedeutsame Erhöhung der Gefäßanzahl gegenüber dem endostalen Kallus festgestellt werden. In der Peripherie lieÙen sich darüber hinaus eine Woche infolge einer Kombinationsverletzung im periostalen Kallus signifikant mehr GefäÙe nachweisen als im endostalen Kallus.

AuÙerdem zeigte sich im peripheren Untersuchungsbereich eine und drei Wochen nach Fraktur sowie Kombinationsverletzung im Periost jeweils eine signifikante Erhöhung der Gefäßanzahl im Vergleich zum periostalen und endostalen Kallus.



6.2.5 Osteoblasten

Der immunhistologische Nachweis von Osteoblasten zeigte für das Periost eine schwach ausgeprägte Immunreaktivität infolge isolierter Fraktur oder Kombinationsverletzung.

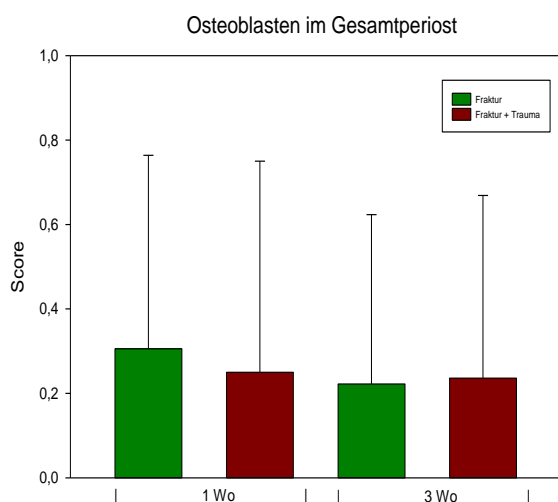


Abbildung 6-15: Anzahl von Osteoblasten im gesamten Periost

Dabei war unabhängig vom Interventionsmuster eine leichte Reduktion der Werte von einer bis hin zu drei Wochen erkennbar. Gleichzeitig konnte infolge isolierter Fraktur zum Untersuchungszeitpunkt von einer Woche eine geringfügig stärkere und zum Untersuchungszeitpunkt von drei Wochen eine geringfügig schwächere Immunreaktion beobachtet werden als nach Kombinationsverletzung (siehe Abbildung 6-15).

Für das unverletzte Periost ließ sich dagegen keine Immunreaktivität feststellen. Im Vergleich der verschiedenen Regionen des Periosts konnten signifikante Unterschiede der Immunreaktion beobachtet werden, die vor allem im vollständigen Fehlen positiver Zellen innerhalb einzelner Untersuchungsbereiche begründet lagen. So zeigte sich unabhängig von Untersuchungszeitpunkt und Interventionsmuster für den Außenbereich in keinem Fall eine positive Immunreaktion. Darüber hinaus ließ sich im Zentrum der Schädigung eine Woche nach Kombinationsverletzung sowie drei Wochen infolge von isolierter Fraktur oder Kombinationsverletzung jeweils keine Immunreaktivität nachweisen.

Dagegen zeigte sich in der Peripherie durchgängig eine positive Immunreaktion. Dadurch konnte hier eine Woche nach Kombinationsverletzung sowie drei Wochen infolge von isolierter Fraktur oder Kombinationsverletzung jeweils eine bedeutsame Erhöhung der Werte im Vergleich zum Zentrum der Schädigung sowie gegenüber dem Außenbereich festgestellt werden. Parallel dazu ließ sich eine Woche nach isolierter Fraktur für das Zentrum der Schädigung eine signifikant erhöhte Immunreaktivität im Vergleich zum Außenbereich nachweisen.

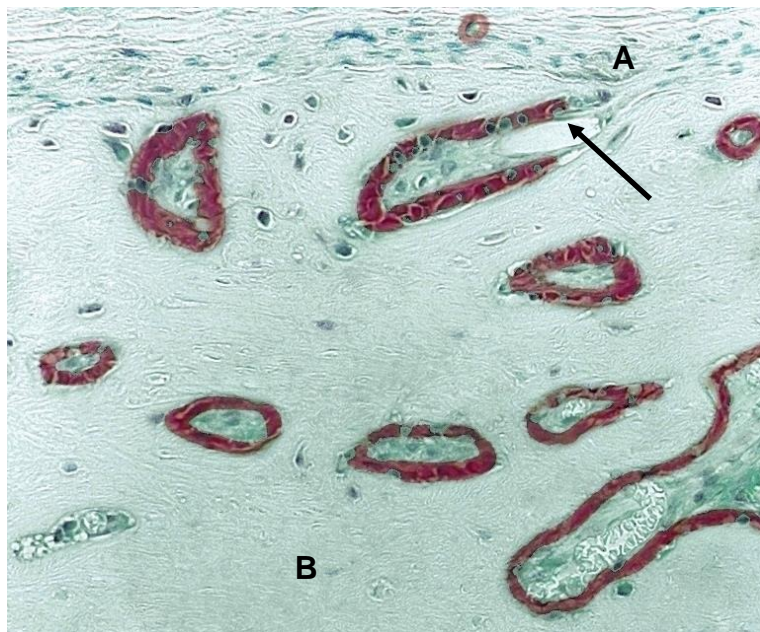


Abbildung 6-16: Immunhistologischer Nachweis von Osteoblasten im Kallus des peripheren Untersuchungsgebietes eine Woche nach Fraktur.

Ausgehend vom Periost (A) wandern Osteoblasten (siehe Pfeil) in den Kallus (B) ein und liegen im Knochenbildungsbereich als Osteoblastenfront (rot angefärbt) vor.

eigene Abbildung

Darüber hinaus zeigten sich im Vergleich der einzelnen Strukturen wesentliche Unterschiede der Immunreaktion.

So ließen sich im Zentrum der Schädigung eine Woche nach isolierter Fraktur sowie drei Wochen nach Kombinationsverletzung im periostalen Kallus signifikant höhere Werte nachweisen als im endostalen Kallus. Zusätzlich konnte hier zum Untersuchungszeitpunkt von einer Woche infolge isolierter Fraktur für den

Im Kallus zeigte sich insgesamt eine stärkere Immunreaktion als im Periost (siehe Abbildung 6-16), die unabhängig vom Interventionsmuster von einer bis hin zu drei Wochen leicht zunahm. Dabei konnten infolge isolierter Fraktur zum Untersuchungszeitpunkt von einer Woche geringfügig niedrigere und zum Untersuchungszeitpunkt von drei Wochen geringfügig höhere Werte festgestellt werden als aufgrund einer Kombinationsverletzung (siehe Abbildung 6-17).

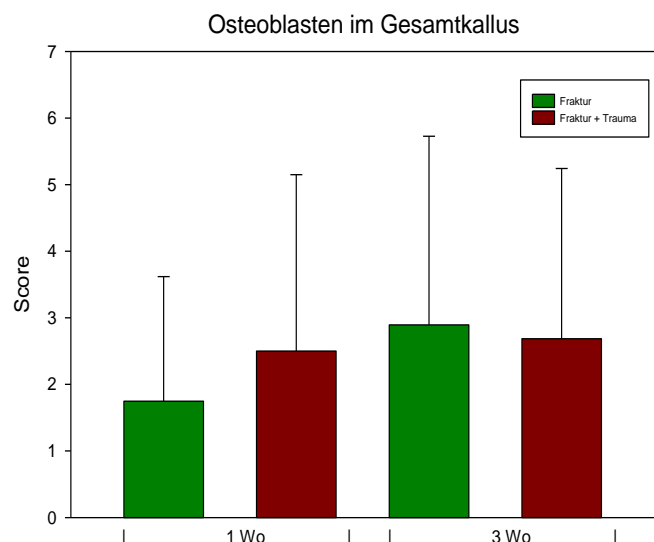
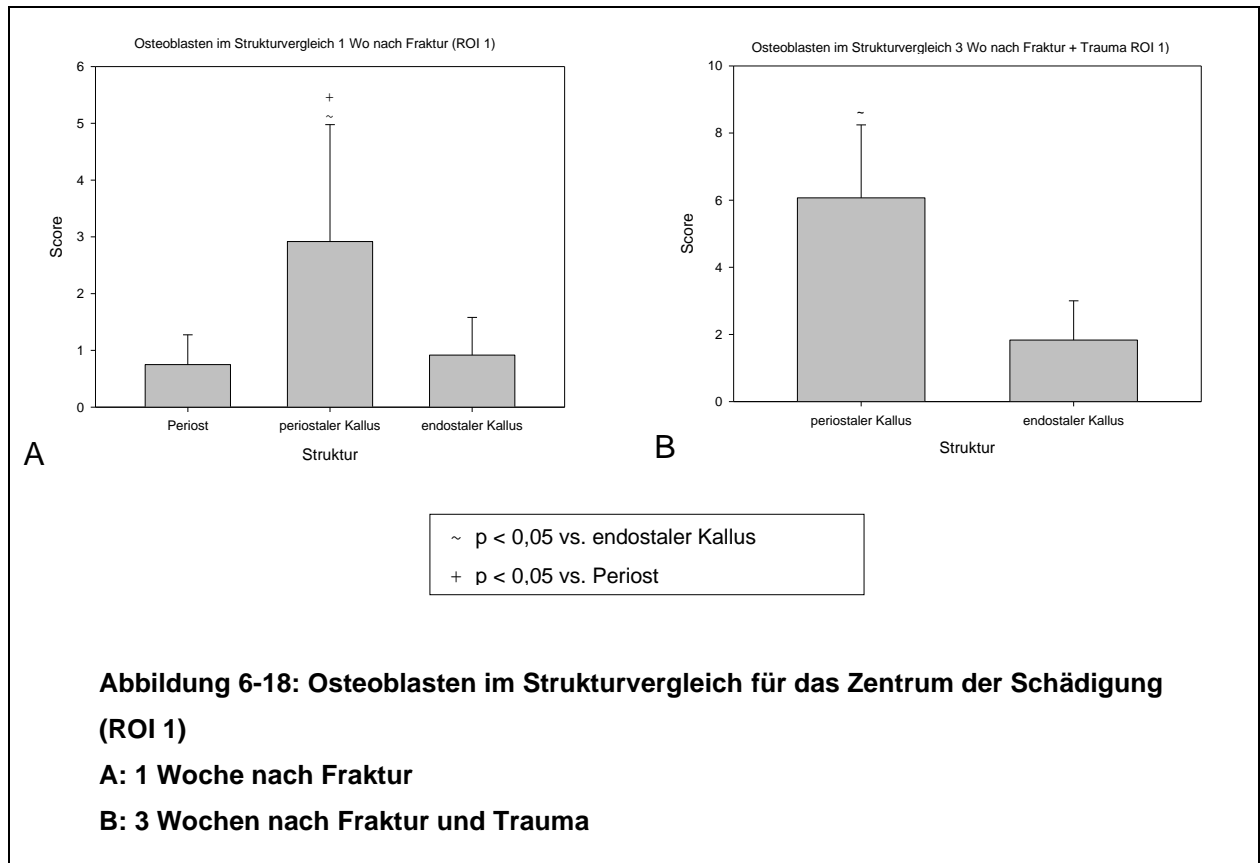
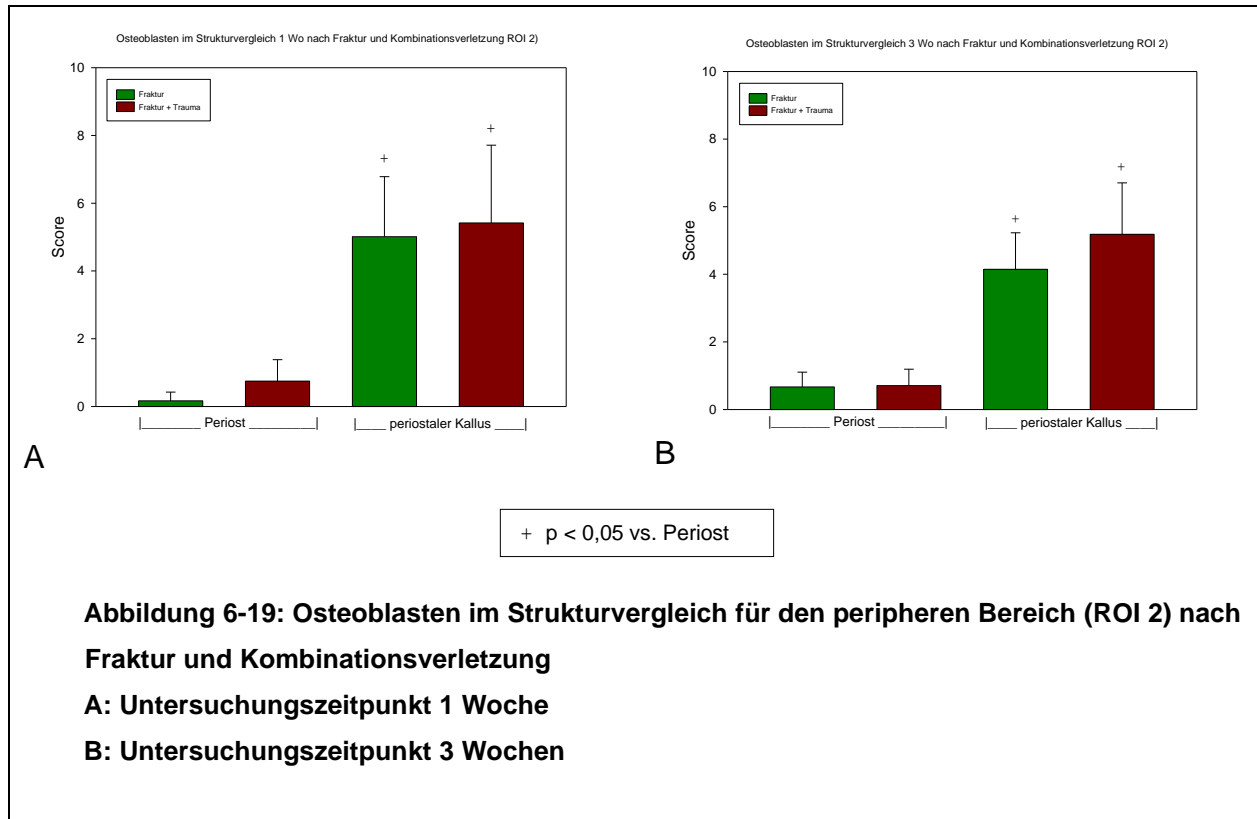


Abbildung 6-17: Anzahl von Osteoblasten im gesamten Kallus

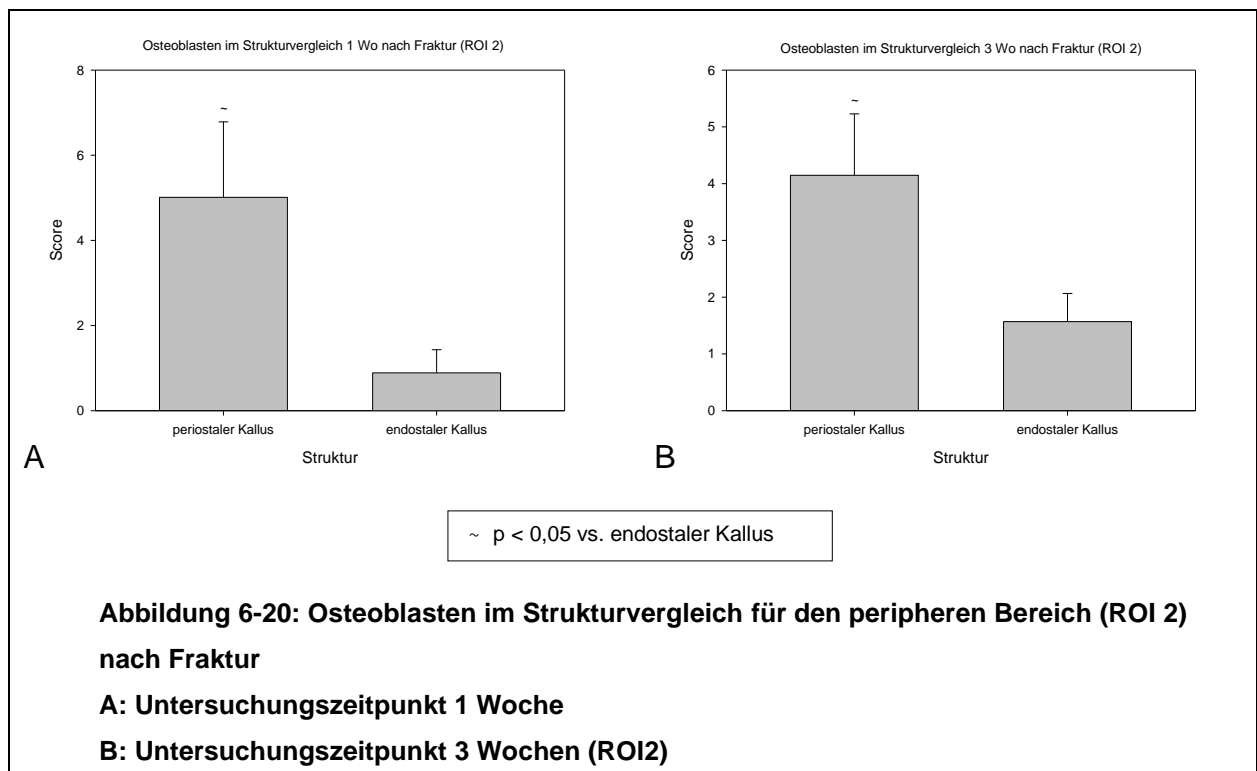
periostalen Kallus eine signifikante Erhöhung der Immunreaktivität gegenüber dem Periost festgestellt werden (siehe Abbildung 6-18).



Darüber hinaus zeigte sich in der Peripherie, unabhängig von Interventionsmuster oder Untersuchungszeitpunkt, im periostalen Kallus eine signifikante Erhöhung der Immunreaktivität im Vergleich zum Periost (siehe Abbildung 6-19).



Gleichzeitig ließ sich hier ein und drei Wochen nach isolierter Fraktur für den periostalen Kallus eine bedeutsame Erhöhung der Immunreaktivität gegenüber dem endostalen Kallus nachweisen (siehe Abbildung 6-20).



Osteoklasten

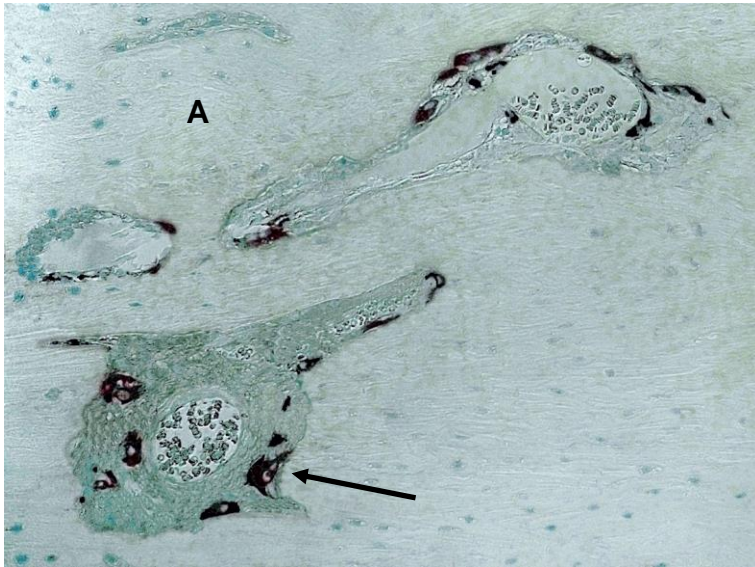


Abbildung 6-21: Nachweis von Osteoklasten mittels TRAP-Färbung im Kallus des peripheren Untersuchungsbereiches eine Woche nach Fraktur.

Im Bereich des knöchernen Kallus' (A) zeigen sich rot angefärbte Osteoklasten (siehe Pfeil).

eigene Abbildung

geringfügig höheres Osteoklastenaufkommen beobachtet werden als nach Kombinationsverletzung (siehe Abbildung 6-22). Darüber hinaus zeigten sich im Vergleich der einzelnen Strukturen wesentliche Unterschiede in der Osteoklastenpräsenz.

So ließen sich sowohl im zentralen Untersuchungsbereich aufgrund von isolierter Fraktur oder Kombinationsverletzung als auch in der Peripherie infolge isolierter Fraktur

Der Nachweis von Osteoklasten mittels TRAP-Färbung zeigte für das Periost in keinem Fall eine positive Reaktion.

Im Gegensatz dazu war im Kallus eine deutliche Osteoklastenpräsenz erkennbar (siehe Abbildung 6-21). Dabei ließ sich unabhängig vom Interventionsmuster eine signifikante Zunahme der Werte von einer bis hin zu drei Wochen feststellen.

Gleichzeitig konnte hier infolge isolierter Fraktur jeweils ein

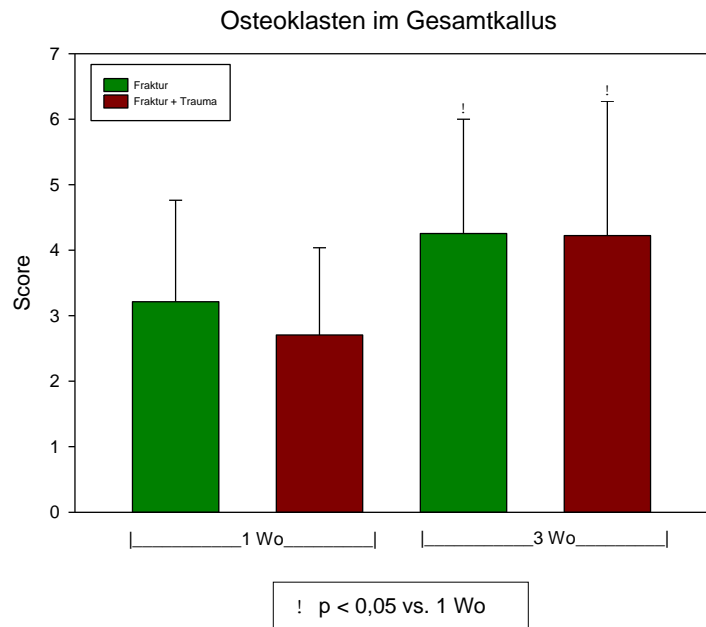
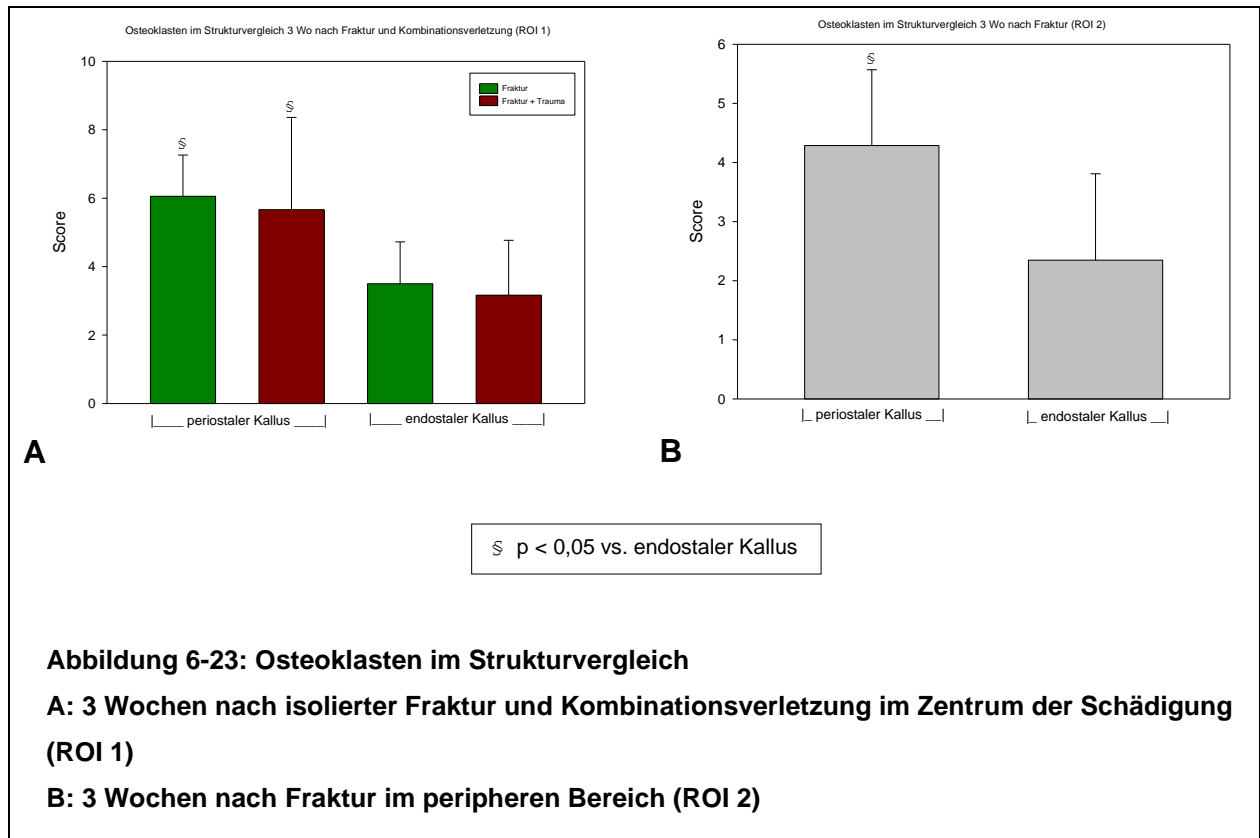


Abbildung 6-22: Anzahl von Osteoklasten im gesamten Kallus

zum Untersuchungszeitpunkt von drei Wochen im periostalen Kallus jeweils signifikant höhere Werte nachweisen als im endostalen Kallus (siehe Abbildung 6-23).



7 Diskussion

7.1 HE-Färbung

Die histochemische Untersuchung des Einflusses von traumatischer Weichteilschädigung auf die Frakturheilung am Transversalschnitt der Rattentibia zeigte infolge eines isolierten Weichteiltraumas, einer separaten Unterschenkelfraktur oder der Kombination beider Verletzungen deutliche Veränderungen der Knochenmatrix sowie des angrenzenden Periosts. Dabei ließ sich bereits in der Übersichtsfärbung als unmittelbare Reaktion auf eine Fraktur erwartungsgemäß die deutliche Ruptur von Periost und Knochenmatrix mit nachfolgender Kallusbildung sowie der damit einhergehenden Wiederherstellung intakter Knochenhaut feststellen. Darüber hinaus konnte eine Woche nach isoliertem Weichteiltrauma, trotz unbeschädigter Kortikalis, die Ausbildung eines Kallus beobachtet werden, dem ein verdicktes Periost auflag. Allerdings zeigte der Kallus hier eine deutlich geringere Größe als infolge einer Fraktur, blieb monokortikal im unmittelbar an den Weichteilschaden grenzenden Bereich lokalisiert und ließ sich zum Untersuchungszeitpunkt von drei Wochen nicht mehr nachweisen.

Die Entstehung eines reduzierten, lokal begrenzten Kallus nach isolierter Weichteilschädigung wurde bereits in der Literatur beschrieben [46]. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomens sehen die Autoren darin, dass es im traumatisierten Weichteilmantel zur Bildung von Knochenzellen beeinflussenden Faktoren kommt, die in den Knochen diffundieren und dort die Ausbildung des Kallus aktivieren. Möglicherweise wirkt sich der Weichteilschaden aber auch direkt auf das angrenzende Periost aus. So könnte das Weichteiltrauma dazu führen, dass Vorläuferzellen im Stratum osteogenicum der Knochenhaut zu reifen Osteoblasten differenzieren, die anschließend neuen Geflechtknochen aufbauen und dadurch die Bildung des subperiostalen Kallus in Gang setzen.

Die mit der Kallusbildung einhergehende Verdickung des Periosts stützt diese Annahme. Auch bei der Frakturheilung lässt sich während der subperiostalen Kallusbildung eine Schwellung des angrenzenden Periosts beobachten [25], die vermutlich in der Proliferation von Vorläuferzellen begründet liegt.

7.2 Immunhistologie/TRAP-Färbung

7.2.1 Granulozyten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte als direkte Folge traumatischer Veränderungen im gesamten Periost innerhalb der ersten 48 Stunden nach Eintritt der Verletzung ein gesteigertes Granulozytenaufkommen mit einer signifikanten Erhöhung der Zellanzahl im Vergleich zur Knochenhaut von unverletzten Tibiae festgestellt werden. Somit zeigte sich auch im Periost als unmittelbare Reaktion auf die Verletzung eine Einwanderung von Granulozyten, wie sie im Rahmen der frühen Inflammation für die Regeneration von Muskel- und Knochengewebe in der Literatur bereits beschrieben wurde [4, 47, 50, 53].

Während hier die Hauptaufgabe von Granulozyten vor allem in der Phagozytose verletzungsbedingt zerstörter Strukturen gesehen wird, ließen sich im Periost jedoch auch nach einer isolierten Weichteilschädigung mit bestehender Gewebeintegrität erhöhte Granulozytenzahlen nachweisen.

Im Vergleich zur Fraktur wirkte sich das isolierte Weichteiltrauma allerdings deutlich schwächer auf die Präsenz der Granulozyten im Periost aus.

So ließen sich 24 und 48 Stunden infolge einer separaten Fraktur sowie zwei Tage nach Kombinationsverletzung jeweils signifikant mehr Granulozyten nachweisen als aufgrund eines isolierten Weichteilschadens.

Möglicherweise wirken sich die traumatischen Veränderungen des geschädigten Weichteilmantels indirekt auf das angrenzende Periost aus.

Dabei ist es denkbar, dass die während der Skelettmuskeldegeneration freigesetzten chemotaktischen Botenstoffe teilweise in das benachbarte Periost übertreten und dort eine Einwanderung von Granulozyten hervorrufen.

Darüber hinaus könnte die Kraft, die bei der Erzeugung des Traumas durch den Aufprall des pneumatischen Zylinders auf den Weichteilmantel übertragen wird, für das Periost einen mechanischen Reiz darstellen, der die Freisetzung von chemotaktischen Botenstoffen sowie eine damit verbundene Einwanderung von Granulozyten auslöst. Trotz der Tatsache, dass es im Periost bereits durch isolierte Weichteilschädigung zur gesteigerten Granulozyteneinwanderung kommt, ließ sich eine Verstärkung der Fraktur

bedingten zellulären Reaktion infolge einer zusätzlichen Weichteilverletzung hier nicht feststellen.

Vielmehr zeigten sich zum Untersuchungszeitpunkt von 24 Stunden im mehrfach verletzten Periost signifikant weniger Granulozyten als nach isolierter Fraktur. Dieses Ergebnis ist im Hinblick auf die bisher gemachten Beobachtungen jedoch kritisch zu betrachten. Die Tatsache, dass sich sowohl eine isolierte Fraktur als auch eine separate Weichteilschädigung deutlich auf die Granulozytendichte im Periost auswirken, macht die demgegenüber starke Verminderung der zellulären Reaktion infolge einer Mehrfachverletzung unverständlich.

Dagegen zeigte der Vergleich der verschiedenen Untersuchungsbereiche des Periosts in Bezug auf die Granulozytenpräsenz eindeutige Ergebnisse.

So ließen sich innerhalb der ersten zwei Tage infolge einer isolierten Fraktur und 48 Stunden nach separater Weichteilschädigung sowohl zentral als auch peripher signifikant mehr Granulozyten nachweisen als im maximal distalen bzw. proximalen Bereich. Zusätzlich war 24 und 48 Stunden nach Kombinationsverletzung im Zentrum der Schädigung eine gegenüber dem Außenbereich deutlich erhöhte Granulozytendichte erkennbar.

Insofern kann die Annahme, dass das Periost durch isolierte Fraktur, separate Weichteilschädigung oder eine Kombination beider Verletzungen hinsichtlich der Einwanderung von Granulozyten während der Inflammation auch über das Zentrum der Schädigung hinaus beeinflusst wird, nicht bestätigt werden. Für den späten Untersuchungszeitraum ab einer Woche nach Intervention zeigte sich im gesamten Periost für alle Verletzungsmuster eine evidente Reduktion der Granulozytenanzahl mit signifikant weniger Zellen als zum Untersuchungszeitpunkt von 24 Stunden.

Dies verdeutlicht, dass Granulozyten auch im Periost vor allem für den frühen Abschnitt der Inflammation von entscheidender Bedeutung sind.

Eine Auswirkung der zusätzlichen Weichteilverletzung auf die zeitliche Präsenz der Granulozyten über die zelluläre Sofortreaktion hinaus konnte hingegen nicht festgestellt werden.

Im Vergleich der verschiedenen Strukturen innerhalb der einzelnen Untersuchungsbereiche zeigten sich keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich des Granulozytenaufkommens.

Zwar konnten sowohl im Zentrum der Schädigung drei Wochen nach isolierter Fraktur als auch in der Peripherie eine Woche nach Kombinationsverletzung im Periost jeweils signifikant mehr Granulozyten nachgewiesen werden als im periostalen Kallus.

Gleichzeitig ließ sich jedoch in der Peripherie zum Untersuchungszeitpunkt von einer Woche infolge isolierter Fraktur oder Kombinationsverletzung im endostalen Kallus eine signifikante Erhöhung der Granulozytenanzahl gegenüber dem periostalen Kallus feststellen.

Insofern kann die Hypothese, dass die verletzungsbedingte Erhöhung der Granulozytenanzahl im Vergleich der verschiedenen Strukturen vom Periost über den periostalen Kallus bis hin zum endostalen Kallus abnimmt, nicht gestützt werden.

7.2.2 Makrophagen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten als direkte Reaktion auf traumatische Veränderungen eine deutliche Erhöhung der Makrophagenanzahl im Periost.

Makrophagen gehören zu den Zellen des angeborenen Immunsystems. Sie lassen sich grundsätzlich in zwei Populationen untergliedern, die man als residente bzw. entzündliche Makrophagen bezeichnet. Residente Makrophagen kommen in praktisch allen Geweben vor und spielen dort eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der physiologischen Homöostase [71, 79].

Entzündliche Makrophagen entstehen temporär in entzündetem oder verletztem Gewebe. Sie entwickeln sich aus Monozyten, die über den Blutweg in das betroffene Areal gelangen und dort zu reifen Makrophagen ausdifferenzieren [79].

In Abhängigkeit von den Bedingungen, die im verletzten Gebiet vorherrschen, reagieren entzündliche Makrophagen mit der Ausbildung unterschiedlicher Phänotypen [6]. Hierbei können grundsätzlich zwei Erscheinungsbilder voneinander unterschieden werden [6, 79, 99].

Makrophagen des Phänotyps 1, auch als M1-Makrophagen oder klassisch aktivierte Makrophagen bezeichnet, entstehen als Reaktion auf proinflammatorische Zytokine wie Tumor necrosis faktor- α (TNF- α) oder Interferon- γ (IFN- γ). Sie sezernieren eine Vielzahl an entzündungsfördernden Mediatoren und hochreaktiven Sauerstoffverbindungen, reinigen das Wundgebiet von zellulären sowie mikrobiellen Zerfallsprodukten durch Phagozytose, und tragen somit wesentlich zur Fortführung der Inflammation während des frühen Zeitraums der Wundheilung bei [6, 71, 99].

Makrophagen des Phänotyps 2 werden auch als M2-Makrophagen oder alternativ aktivierte Makrophagen bezeichnet. Ihre Bildung wird durch antiinflammatorische Zytokine wie Interleukin-4 (IL-4) oder Interleukin-13 (IL-13) stimuliert. Sie produzieren eine Vielzahl entzündungshemmender Botenstoffe, sezernieren Bestandteile der extrazellulären Matrix und unterstützen die Angiogenese. Von daher sind M2-Makrophagen vor allem für die Entzündungshemmung und Gewebereparatur während der fortschreitenden Wundheilung von entscheidender Bedeutung [6, 40, 71, 79].

Im Rahmen der sekundären Frakturheilung spielen Makrophagen eine zentrale Rolle für die erfolgreiche Regeneration des Knochengewebes.

Vor allem während der frühen Phase der Wundheilung wandern sie in das Frakturhämatom ein und leisten dort einen wesentlichen Beitrag für die Wiederherstellung der Gewebehämostase (siehe Kapitel 3.4).

Darüber hinaus konnte in tierexperimentellen Studien gezeigt werden, dass sich Makrophagen auch auf die Knochenregeneration während der Reparaturphase der sekundären Frakturheilung auswirken. Dabei ließ sich eine Einflussnahme sowohl auf die chondrale als auch auf die desmale Ossifikation feststellen [71].

So zeigten Untersuchungen der chondralen Ossifikation im murinen Femur-Frakturmodell, dass es durch eine vollständige Depletion von Makrophagen zu deutlichen Veränderungen in der Ausbildung des weichen Kallus kommt.

Hierbei waren erhebliche Unterschiede in Abhängigkeit vom Depletionszeitpunkt erkennbar.

Im Einzelnen konnte gezeigt werden, dass eine zum Frakturzeitpunkt bestehende Makrophagendepletion das vollständige Ausbleiben der Kallusbildung zur Folge hatte, während die Depletion fünf Tage nach Verletzungseintritt zur Ausbildung eines deutlich verkleinerten weichen Kallus führte [79].

Ähnliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen im murinen Tibia-Frakturmodell. Hier führte die Makrophagendepletion einen Tag vor, sowie drei und sieben Tage nach dem Eintritt der Verletzung zur Ausbildung eines deutlich verkleinerten weichen Kallus, der nur wenige vereinzelt Chondrozyten enthielt und hauptsächlich aus fibrotischem Gewebe aufgebaut war [116].

Darüber hinaus ließ sich eine Einflussnahme von Makrophagen auf die desmale Ossifikation feststellen.

So konnte im murinen Tibia-Frakturmodell nachgewiesen werden, dass eine Depletion von Makrophagen sowohl zum Zeitpunkt der Fraktur als auch drei Tage nach dem Eintritt der Verletzung zur Ausbildung eines stark verkleinerten knöchernen Kallus führte.

Außerdem zeigte hier die zusätzliche Analyse der Makrophagenanzahl im knöchernen Kallus von Tieren, bei denen keine Depletion durchgeführt wurde, deutlich mehr residente als entzündliche Makrophagen, was darauf hinweist, dass hauptsächlich residente Makrophagen einen Beitrag zur desmalen Ossifikation leisten [1].

Diese Ergebnisse verdeutlichen den Stellenwert von Makrophagen für eine erfolgreiche Frakturheilung.

Offenbar wirken sie sich bereits im Laufe der frühen Heilungsphase auf die Größe und Qualität der späteren Kallusbildung aus und leisten so einen entscheidenden Beitrag zur Wiederherstellung intakten Knochengewebes.

Darüber hinaus konnte in tierexperimentellen Studien gezeigt werden, dass sich eine Fraktur vor allem während der frühen Heilungsphase deutlich auf die Makrophagenpräsenz im Periost auswirkt.

So ließen sich im murinen Tibia-Frakturmodell zu den Untersuchungszeitpunkten von fünf, sieben sowie neun Tagen nach Verletzung im traumatisierten Periost jeweils mehr entzündliche und residente Makrophagen nachweisen als in unverletzter Knochenhaut [2].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten ähnliche Ergebnisse erhalten werden.

Als direkte Folge einer Fraktur ließen sich hier innerhalb der ersten 48 Stunden nach dem Eintritt der Verletzung im traumatisierten Periost mehr Makrophagen nachweisen als in unverletzter Knochenhaut. Allerdings war sieben Tage nach dem Eintritt der Verletzung ein deutlicher Rückgang der Zelldichte mit einer signifikanten Reduktion der Makrophagenanzahl im Vergleich zu den Untersuchungszeitpunkten von 24 und 48 Stunden erkennbar.

Darüber hinaus zeigte sich eine deutliche Zunahme der Makrophagen infolge eines Weichteiltraumas.

Im Einzelnen ließen sich hierbei 24 und 48 Stunden nach isoliertem Weichteiltrauma sowie 48 Stunden nach Kombinationsverletzung im traumatisierten Periost signifikant mehr Makrophagen nachweisen als in unverletzter Knochenhaut. Auch hier war nach sieben Tagen eine deutliche Reduktion der Makrophagenanzahl erkennbar.

Gleichzeitig ließen sich zum Untersuchungszeitpunkt von 24 Stunden infolge einer reinen Fraktur oder Kombinationsverletzung signifikant weniger Makrophagen nachweisen als nach isoliertem Weichteiltrauma.

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es infolge einer Fraktur, einer Weichteilschädigung oder der Kombination beider Verletzungen vor allem während des frühen Zeitraums der Knochenregeneration zu einer deutlichen Zunahme von Makrophagen im Periost kommt. Hierbei wirkte sich das isolierte Weichteiltrauma wesentlich stärker auf die Anzahl der Makrophagen aus als die reine Fraktur.

Eine Verstärkung der Fraktur bedingten zellulären Reaktion durch das zusätzliche Weichteiltrauma ließ sich jedoch nicht feststellen.

Die Untersuchung der unterschiedlichen Regionen des Periosts hinsichtlich der Trauma bedingten Makrophagenpräsenz zeigte ausschließlich zum Untersuchungszeitpunkt von 48 Stunden signifikante Unterschiede.

Im Einzelnen ließen sich hier infolge einer isolierten Fraktur oder Kombinationsverletzung innerhalb des Schädigungszentrums sowie in der zentrumsnahen Region jeweils signifikant mehr Makrophagen nachweisen als im Außenbereich.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Trauma bedingte Zunahme der Makrophagen im Periost weitgehend auf das Zentrum der Schädigung begrenzt bleibt.

Eine Beeinflussung der zellulären Reaktion über das geschädigte Areal hinaus konnte dagegen nicht festgestellt werden.

Der Vergleich des Makrophagenaufkommens in den verschiedenen Strukturen im zentralen sowie zentrumsnahen Bereich zeigten in keinem Fall signifikante Unterschiede der Makrophagenanzahl.

Von daher kann die Hypothese, dass die Intensität des verletzungsbedingten Makrophagenaufkommens vom Periost über den periostalen Kallus bis hin zum endostalen Kallus abnimmt, nicht gestützt werden.

7.2.3 Gefäße

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es als direkte Folge traumatischer Veränderungen zu einer deutlichen Erhöhung der Gefäßanzahl im Periost kommt.

Die Gefäße des Periosts lassen sich in vier verschiedene Gefäßsysteme untergliedern [49, 130].

Man unterscheidet das intrinsische Periostsystem, das muskuloperiostale System, das faszioperiostale System sowie die kortikalen Kapillaranastomosen [54, 98].

Das intrinsische System ist zwischen Stratum fibrosum und Stratum osteogenicum des Periosts lokalisiert. Die Blutgefäße liegen hier in drei unterschiedlichen Anordnungen vor. Je nach ihrer Ausrichtung und Form unterscheidet man longitudinal verlaufende Blutgefäße, ringförmig angeordnete Blutgefäße, sowie Blutgefäße ohne geregelte Anordnung [54, 98].

Das muskuloperiostale System stellt die Verbindung zwischen den Gefäßen von Skelettmuskel und Periost her. Es spielt vor allem bei der Kallusbildung im Anschluss an eine Fraktur, aber auch für die Versorgung mit Nährstoffen bei unzureichender intrinsischer Zirkulation des Periosts eine entscheidende Rolle [54, 98].

Das faszioperiostale System verbindet Äste der Knochenarterien mit periostalen Blutgefäßen und ist aufgrund der unterschiedlichen Sehnen- und Faszienansätze für jeden Knochen spezifisch [54, 98].

Die kortikalen Kapillaranastomosen bestehen schließlich aus Kapillaren, die in der Substantia compacta des Knochens verlaufen und Gefäße des Markraumes mit denen des Periosts verbinden [98].

Blutgefäße sind für eine erfolgreiche Knochenregeneration von entscheidender Bedeutung [34, 59, 121]. Während der Reparaturphase der sekundären Frakturheilung übernehmen sie die Versorgung des Kallus mit Sauerstoff, Nährstoffen, Wachstumsfaktoren sowie für den Regenerationsprozess notwendigen Zellen und tragen so wesentlich zur Wiederherstellung von voll funktionsfähigem Knochengewebe bei [4, 34, 59, 72].

Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass sich ein bestimmter Subtyp von Blutkapillaren auf die Regulierung der Knochenneubildung während der Frakturheilung auswirkt [19, 72].

So konnten in einer Studie über die Kopplung von Knochen- und Gefäßneubildung im murinen Tibiamodell zwei Arten von Kapillaren identifiziert werden, die man als Typ-H- bzw. Typ-L-Gefäße bezeichnet und sich in den molekularen sowie morphologischen Eigenschaften ihrer Endothelzellen voneinander unterscheiden [45].

Typ-H-Gefäße sind durch die Expressierung hoher Konzentrationen des Zelladhäsionsmoleküls CD 31 (Cluster of differentiation 31), auch als PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) bezeichnet, sowie des Sialoglykoproteins Endomucin (EMCN) charakterisiert. Sie befinden sich sowohl in der Metaphyse im Bereich der Wachstumsfuge als auch im Periost und Endost des Knochenschafts.

Typ-L-Gefäße bilden ein stark verzweigtes Kapillarnetz in der Knochenmarkshöhle und exprimieren nur geringe Mengen an CD 31 oder Endomucin [19, 45, 72, 100, 128].

Gefäße des Typs L sind von hämatopoetischen Zellen umgeben und werden für die Regulierung der Hämatopoese verantwortlich gemacht [19].

Dagegen sind Typ-H-Gefäße eng mit zahlreichen Knochenvorläuferzellen assoziiert, die schließlich zu reifen Osteoblasten oder Osteozyten differenzieren können. Diese enge Assoziation lässt den Schluss zu, dass Typ-H-Gefäße als Quelle von knochenbildenden Vorläuferzellen die Entstehung von Knochengewebe während der Frakturheilung fördern [19, 72, 128].

Die ausreichende Versorgung mit Blutgefäßen ist essenziell für eine ungestörte Regeneration des Knochengewebes. Eine ungenügende Vaskularisierung kann dagegen zu schwerwiegenden Komplikationen wie der Verzögerung oder dem vollständigen Ausbleiben der Frakturheilung führen [20, 83, 121, 124].

Obwohl das Periost im gesunden Knochen nur etwa 1/3 der Kortikalisoberfläche mit Gefäßen versorgt [27, 49, 63], wirkt sich bereits eine isolierte Unterbrechung des periostalen Blutflusses während der Frakturheilung negativ auf die Knochenregeneration aus.

So konnte im murinen Femurfrakturmodell nachgewiesen werden, dass eine Zerstörung periostaler Gefäße durch Kauterisation des Periosts im Bereich der Bruchstelle zu einem Ausbleiben der Knochenheilung führt [34, 69].

Im Einzelnen zeigte sich hierbei im Femur der Versuchstiere mit kauterisiertem Periost auch 63 Tage nach der Fraktur noch ein deutlich erkennbarer Frakturspalt, der vorwiegend aus Knorpelgewebe bestand, während bei Tieren der Vergleichsgruppe mit intaktem Periost zum gleichen Zeitpunkt bereits eine deutliche knöcherne Durchbauung der Frakturstelle erkennbar war [69].

Demgegenüber wird dem intakten Periost mit erhaltener Vaskularisation eine positive Wirkung auf die Knochenregeneration zugeschrieben.

So konnte im Femurfrakturmodell der Ratte gezeigt werden, dass es im Rahmen der Deckung eines Knochendefektes mittels allogener Transplantation durch die Verwendung von vaskularisierten Periosttransplantaten zu einem gesteigerten Knochenumbau sowie einer vermehrten Vaskularisation des Knochentransplantats und damit zu einer verbesserten Integration des zur Defektdeckung verwendeten Knochengewebes in den Wirtsknochen kommt [31].

Darüber hinaus ließ sich in einer klinischen Kurzzeitstudie an Kindern mit angeborener Pseudarthrose der Tibia eine Verbesserung der Prognose durch die Verwendung eines vaskularisierten Periosttransplantats feststellen.

Im Einzelnen wurde hier bei insgesamt 29 Kindern jeweils ein vaskularisiertes Periosttransplantat aus der kontralateralen Tibia entnommen und zur Behandlung der Pseudarthrose im Bereich des Defektes wieder eingesetzt.

Während im klinischen Alltag trotz chirurgischer Versorgung der Pseudarthrose die ausbleibende Wiederherstellung der knöchernen Einheit ein häufiges Problem darstellt, zeigte sich hier bei allen Probanden nach durchschnittlich 5,1 Wochen die Bildung eines periostalen Kallus [101].

Die Resultate der vorstehend beschriebenen Studien lassen umgekehrt den Schluss zu, dass es als Reaktion auf eine Fraktur auch immer zu einer gesteigerten Bildung von Gefäßen im Periost kommt.

Dies konnte durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch nur teilweise bestätigt werden.

Zwar zeigte sich im Periost während des gesamten Untersuchungszeitraums eine gesteigerte Vaskularisierung infolge isolierter Fraktur. Jedoch ließ sich hier eine signifikante Erhöhung der Gefäßanzahl gegenüber unverletzter Knochenhaut ausschließlich zum Untersuchungszeitpunkt von drei Wochen feststellen.

Dagegen wirkte sich ein Weichteiltrauma deutlich stärker auf die periostale Vaskularisierung aus.

So konnten im Periost sowohl 24 Stunden als auch eine und drei Wochen nach isolierter Weichteilschädigung jeweils signifikant mehr Gefäße nachgewiesen werden als in der intakten Knochenhaut.

Darüber hinaus zeigte sich während des gesamten Untersuchungszeitraums eine signifikante Erhöhung der Gefäßanzahl infolge einer Kombinationsverletzung.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass eine Schädigung des angrenzenden Weichteilmantels zu einer wesentlichen Erhöhung der Vaskularisierung im Periost führt und darüber hinaus die periostale Gefäßneubildung während der Frakturheilung verstärkt.

Dabei waren keine regionalen Unterschiede erkennbar. So konnten im Vergleich der einzelnen Regionen des Periosts keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf ihre Vaskularisierung festgestellt werden.

Insofern lässt sich die Hypothese, dass sich eine Fraktur, die Schädigung des umliegenden Weichteilmantels oder eine Kombination beider Verletzungen auf die periostale Gefäßneubildung auch über das Zentrum der Schädigung hinaus auswirken, nicht bestätigen.

Dagegen zeigte der Vergleich der verschiedenen Strukturen im zentralen und peripheren Untersuchungsbereich jeweils deutliche Unterschiede in der Gefäßanzahl. So ließen sich im Zentrum der Schädigung zum Untersuchungszeitpunkt von einer Woche infolge einer isolierten Fraktur signifikant mehr Gefäße im Periost nachweisen als im endostalen Kallus.

In der Peripherie konnte darüber hinaus eine Woche nach einer Kombinationsverletzung im periostalen Kallus eine signifikante Erhöhung der Gefäßanzahl im Vergleich zum endostalen Kallus festgestellt werden.

Zusätzlich waren im peripheren Bereich zu den Untersuchungszeitpunkten von einer und drei Wochen infolge einer Fraktur oder Kombinationsverletzung im Periost jeweils signifikant mehr Gefäße nachweisbar als im periostalen und endostalen Kallus.

So konnte, entgegen der aufgestellten Hypothese, im Vergleich der einzelnen Strukturen keine abnehmende Intensität der verletzungsbedingten vaskulären Veränderungen vom Periost über den periostalen Kallus bis hin zum endostalen Kallus festgestellt werden.

Allerdings zeigte sich im Periost in Verbindung mit einer Fraktur größtenteils eine deutliche Erhöhung der Gefäßanzahl gegenüber dem periostalen oder endostalen Kallus.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Versorgung des Kallus' während der Frakturheilung vor allem von Gefäßen des Periosts ausgeht.

7.2.4 Osteoblasten

In der vorliegenden Arbeit konnte als Folge von traumatischen Veränderungen eine geringe Anzahl an Osteoblasten im Periost nachgewiesen werden.

Osteoblasten sind quaderförmige Zellen mit einem großen Zellkern, die ein ausgedehntes rauhes endoplasmatisches Retikulum, einen vergrößerten Golgi-Apparat sowie verschiedene sekretorische Vesikel besitzen [8, 28, 125].

Sie befinden sich beim gesunden Erwachsenen entlang der Knochenoberfläche und machen etwa 4-6 % der gesamten Knochenzellen aus [28, 125].

Osteoblasten werden aus mesenchymalen Stammzellen gebildet, die im Periost und im Knochenmark lokalisiert sind [8, 32]. Bei diesen Stammzellen handelt es sich um pluripotente Zellen, die das Potenzial besitzen, sich je nach der Beschaffenheit ihrer Mikroumgebung nicht nur in Osteoblasten, sondern auch in andere Zelltypen wie Adipozyten oder Chondrozyten zu differenzieren [8, 32, 75, 86].

Die Differenzierung in Osteoblasten erfolgt in mehreren Schritten. Dabei entwickeln sich die Stammzellen zunächst zu Osteoprogenitorzellen, wandeln sich dann in Präosteoblasten und differenzieren schließlich zu reifen Osteoblasten aus [8, 28, 75, 86].

Inwieweit sich die pluripotenten Mesenchymzellen in Richtung Osteoblasten entwickeln hängt von verschiedenen molekularen Faktoren sowie der Expression spezifischer Gene ab [28, 75].

Bislang sind die hierfür verantwortlichen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt [86].

Allerdings wird vor allem dem Transkriptionsfaktoren RUNX 2 (Runt-Related Transcription Factor 2) eine entscheidende Rolle an der Differenzierung der Stammzellen in Osteoblasten zugeschrieben [28, 53, 75, 86, 125].

Die Hauptaufgabe von Osteoblasten besteht darin, während der lebenslangen dynamischen Anpassungsprozesse des Knochens, z. B. als Reaktion auf veränderte mechanische Belastungen, neue Knochenmatrix zu synthetisieren [28, 53, 125, 130].

Darüber hinaus spielen sie für die Neubildung von Knochengewebe im Rahmen der Frakturheilung eine wesentliche Rolle.

Dabei werden vor allem Osteoblasten, die aus mesenchymalen Vorläuferzellen des Periosts stammen, während der frühen Reparaturphase der sekundären Frakturheilung

für die Bildung von Geflechtknochen durch desmale Ossifikation verantwortlich gemacht [53, 130].

Die Beteiligung periostaler Osteoblasten an der Knochenregeneration konnte durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. So ließ sich eine Woche sowie drei Wochen nach isolierter Fraktur oder Kombinationsverletzung jeweils eine geringe Anzahl an Osteoblasten im Periost nachweisen.

Im Zusammenhang mit der Knochenneubildung während der sekundären Frakturheilung wird das Periost in der Literatur nicht nur als Quelle von Vorläuferzellen, sondern auch von ausdifferenzierten Osteoblasten beschrieben [49, 74, 120, 130].

Diese Feststellung konnte durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. So ließen sich die Osteoblasten hier zwar im traumatisierten Periost nachweisen, fehlten in der unverletzten Knochenhaut jedoch vollständig.

Auch konnte die in der Literatur beschriebene Einflussnahme eines zusätzlichen Weichteiltraumas auf die periostale Reaktion im Rahmen der Frakturheilung nicht bestätigt werden. Während sich in einer tierexperimentellen Studie am Frakturmodell der Ratte nachweisen ließ, dass eine zusätzliche Schädigung der angrenzenden Skelettmuskulatur die Zunahme der Osteoblastenkonzentration im Periost bewirkt [46], konnte in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Erhöhung der periostalen Osteoblastenanzahl durch das begleitende Weichteiltrauma festgestellt werden.

Dagegen zeigten sich im Vergleich der einzelnen Regionen des Periosts deutliche Unterschiede der Osteoblastenanzahl, die jedoch größtenteils darin begründet lagen, dass sich in einzelnen Untersuchungsbereichen jeweils keine Zellen nachweisen ließen. So konnte unabhängig von Untersuchungszeitpunkt und Interventionsmuster für den Außenbereich ein vollständiges Fehlen von Osteoblasten festgestellt werden, wohingegen sich in der Nähe des Frakturspaltes durchgängig eine deutliche Präsenz von Osteoblasten zeigte. Die konstante Osteoblastenpräsenz in der Peripherie unterstreicht die Tatsache, dass es während der frühen Reparaturphase der sekundären Frakturheilung im Randbereich des Bruchspaltes zur Bildung von Geflechtknochen durch desmale Ossifikation kommt. Eine Ausdehnung des periostalen Osteoblastenvorkommens über den zentralen oder peripheren Bereich hinaus konnte dagegen nicht festgestellt werden.

Währenddessen zeigte der Vergleich der einzelnen Strukturen in den jeweiligen Regionen erhebliche Unterschiede bezüglich der Osteoblastenpräsenz.

So war im Zentrum der Schädigung eine Woche nach isolierter Fraktur sowie drei Wochen nach Kombinationsverletzung im periostalen Kallus eine wesentliche Erhöhung der Osteoblastenzahl im Vergleich zum endostalen Kallus erkennbar. Zusätzlich konnten hier zum Untersuchungszeitpunkt von einer Woche infolge einer isolierten Fraktur im periostalen Kallus signifikant mehr Osteoblasten nachgewiesen werden als im Periost.

Darüber hinaus zeigte sich im zentrumsnahen Bereich, unabhängig von Interventionsmuster oder Untersuchungszeitpunkt, im periostalen Kallus eine deutliche Erhöhung der Osteoblastenzahl gegenüber dem Periost. Gleichzeitig ließen sich hier ein und drei Wochen nach isolierter Fraktur im periostalen Kallus signifikant mehr Osteoblasten nachweisen als im endostalen Kallus.

Insofern konnte durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die hypothetisch angenommene Intensitätsabnahme des verletzungsbedingten Osteoblastenaufkommens ausgehend vom Periost über den periostalen Kallus bis hin zum endostalen Kallus nicht bestätigt werden.

Allerdings lässt die deutliche Akkumulation von Osteoblasten im periostalen Kallus der einzelnen Regionen den Schluss zu, dass die Bildung des Kallus sowohl im Zentrum der Schädigung als auch im fakturnahen Bereich vor allem von periostalen Osteoblasten ausgeht.

7.2.5 Osteoklasten

Osteoklasten besitzen die Fähigkeit, Knochengewebe zu resorbieren [60, 96]. Sie sind im Zusammenspiel mit Osteoblasten maßgeblich an den lebenslangen dynamischen Umbauprozessen des gesunden Skeletts beteiligt, die während der Anpassung an veränderte mechanische Belastungen aber auch bei der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase eine entscheidende Rolle spielen [16, 28, 60, 96]. Darüber hinaus tragen Osteoklasten im Anschluss an pathologische Knochenveränderungen, wie beispielsweise Frakturen, wesentlich zum Erfolg des Heilungsprozesses bei. So bauen sie während der letzten Phase der sekundären Frakturheilung den aus Geflechtknochen bestehenden harten Kallus ab und ermöglichen dadurch die Neubildung von voll funktionsfähigem Lamellenknochen im Bereich der Frakturstelle [4, 5, 126].

Osteoklasten leiten sich von hämatopoetischen Stammzellen der myeloisch/monozytären Linie ab [16, 28, 96, 125].

Ihre Bildung erfolgt unter dem Einfluss des Zytokins M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) und des als Liganden fungierenden Proteins RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand), die jeweils von Stromazellen des Knochenmarks sowie von Osteoblasten sezerniert werden [8, 16, 28, 82, 125].

Im Einzelnen kommt es dabei zunächst zu einer M-CSF vermittelten Proliferation von Monozyten sowie zu deren nachfolgender Differenzierung in mononukleäre Präosteoklasten [16]. Anschließend bindet RANKL an RANK-Rezeptoren (Receptor Activator of NF- κ B), die sich auf den Präosteoklasten befinden [28, 125].

Durch die Rezeptor-Ligand-Bindungen wird schließlich die Fusion der Präosteoklasten zu mehrkernigen Osteoklasten ausgelöst [16, 28, 125].

Osteoklasten weisen während der Knochenresorption einen charakteristischen Phänotyp auf, der durch die Ausbildung von unterschiedlichen Membrandomänen gekennzeichnet ist [84]. Dazu gehört zum einen die apikale Membrandomäne. Diese steht in direktem Kontakt mit der Knochenmatrix und weist wiederum zwei unterschiedliche Domänen auf, nämlich den gekräuselten Rand sowie die Versiegelungszonen [8, 28, 82]. Zum anderen befindet sich von der Knochenoberfläche entfernt die basolaterale Membrandomäne, die eine weitere, als funktionell sekretorisch bezeichnete Domäne umfasst [8, 82].

Der gekräuselte Rand, auch als ruffled boarder bezeichnet, entsteht durch die gezielte Verschmelzung von lysosomalen Säurevesikeln mit der dem Knochen zugewandten Zellmembran [65, 84]. Er ist durch die Ausbildung einer hochgradig gefalteten Struktur charakterisiert und spielt im resorbierenden Osteoklasten vor allem beim Abbau der Knochenmatrix eine wesentliche Rolle [8, 65, 82, 84].

Einerseits fungiert der gekräuselte Rand als Austrittsstelle für hydrolytische Enzyme wie Cathepsin K oder Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9), die wesentlich am Abbau der organischen Knochenmatrixbestandteile beteiligt sind [28, 105, 125].

Andrerseits liefert eine in die Plasmamembran des gekräuselten Randes eingebaute vakuoläre Protonen-ATPase (V-ATPase) großen Mengen an Wasserstoffionen [84, 105]. Dies führt zur Ausbildung eines sauren Milieus, das für die Auflösung der Hydroxylapatitkristalle des Knochens sowie für die Aktivierung der hydrolytischen Enzyme erforderlich ist [82, 84, 105].

Über den gekräuselten Rand gelangt auch das Enzym Tartrat-resistente saure Phosphatase (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) an die Oberfläche der

Knochenmatrix, das häufig als histologischer Marker für Osteoklasten verwendet wird [8, 28, 125].

Welche Rolle dieses Enzym im Rahmen der Knochenresorption spielt, ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es wird jedoch angenommen, dass es während des Matrixabbaus an der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt ist [8].

Neben seiner Mitwirkung an der Resorption des Knochengewebes ist der gekräuselte Rand auch für den Abbau der entstandenen Zersetzungsprodukte von Bedeutung. Im Einzelnen werden hierbei gespaltenes Kollagen sowie gelöste Mineralien zunächst über den gekräuselten Rand in die Osteoklasten aufgenommen, dann mit Hilfe von Vesikeln intrazellulär in Richtung basolateraler Membrandomäne transportiert und schließlich über die funktionelle sekretorische Domäne ausgeschleust [28, 60, 82, 125].

Der gekräuselte Rand wird an den Seiten jeweils von der hauptsächlich aus dicht gepackten Aktinfilamenten bestehenden Versiegelungszone eingegrenzt, die im resorbierenden Osteoklasten eng mit der Knochenmatrix verbunden ist [28, 56, 82, 105, 125]. Durch die enge Verbindung trennen die Versiegelungszonen den gekräuselten Rand von den nicht resorbierenden Bereichen der Zelle ab und gewährleisten darüber hinaus das Anheften der Osteoklasten an die Oberfläche der Knochenmatrix [28, 56].

Trotz der Tatsache, dass es sich bei Osteoklasten um Zellen handelt, die auf die Resorption von Knochengewebe spezialisiert sind, ließen sich im Rahmen einer Untersuchung humaner Periosttransplantate in der Kambiumschicht des menschlichen Periostes Osteoklasten nachweisen [29].

Diese Feststellung konnte durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden.

So ließen sich unabhängig von Untersuchungszeitpunkt und Verletzungsmuster im gesamten Periost keine Osteoklasten nachweisen. Dagegen war im Kallus eine deutliche Osteoklastenpräsenz erkennbar. Dabei konnten unabhängig vom Investitionsmuster drei Wochen nach Eintritt der Verletzung jeweils signifikant mehr Zellen nachgewiesen werden als zum Untersuchungszeitpunkt von einer Woche.

Dies verdeutlicht, dass Osteoklasten vor allem während der späten Phase der sekundären Frakturheilung von Bedeutung sind. Eine verstärkte Präsenz durch die zusätzliche Weichteilschädigung konnte jedoch nicht bestätigt werden.

Darüber hinaus zeigte der Vergleich der einzelnen Strukturen zum Untersuchungszeitpunkt von drei Wochen deutliche Unterschiede hinsichtlich des

Osteoklastenaufkommens. Im Einzelnen ließen sich hier sowohl im Zentrum der Schädigung nach isolierter Fraktur oder Kombinationsverletzung als auch im peripheren Untersuchungsbereich infolge einer separaten Fraktur im periostalen Kallus jeweils signifikant mehr Osteoklasten nachweisen als im endostalen Kallus. So war zwar im endostalen Kallus eine deutliche Verringerung der Osteoklastenzahl gegenüber dem periostalen Kallus erkennbar.

Jedoch konnte die Hypothese, dass die Intensität der verletzungsbedingten zellulären Veränderungen vom Periost über den periostalen Kallus bis hin zum endostalen Kallus abnimmt aufgrund des vollständigen Fehlens von Osteoklasten im Periost nicht bestätigt werden.

7.3 Schlussfolgerung

Frakturen stellen im Gesundheitswesen ein ernst zu nehmendes Problem dar, das in den letzten Jahrzehnten nicht an Aktualität verloren hat. So konnte allein in der Bundesrepublik Deutschland im Zeitraum von 2009 bis 2019 ein deutlicher Anstieg von Knochenverletzungen mit einer Zunahme der Frakturinzidenz um insgesamt 14% beobachtet werden [85].

Für die Behandlung von Frakturen stehen zahlreiche Therapiekonzepte zur Verfügung, die von konservativer Versorgung mittels Schienung über die Anwendung verschiedener operativer Osteosyntheseverfahren reichen [85]. Trotzdem kommt es nach wie vor bei bis zu 10% der Frakturen zu Heilungsstörungen und einer damit verbundenen unzureichenden Wiederherstellung der knöchernen Kontinuität [85].

Frakturen gehen immer mit einer mehr oder minder starken Schädigung des dem Knochen angrenzenden Weichteilmantels einher [117]. Dabei entscheiden das Ausmaß sowie der Schweregrad des begleitenden Weichteilschadens maßgeblich über den Heilungserfolg. Eine unzureichende Berücksichtigung der Weichteilverletzung während der Frakturbehandlung kann zu schwerwiegenden Komplikationen wie Weichteilinfektion, Osteitis, Kompartmentsyndrom oder Amputation führen [117].

Für die Beurteilung der Weichteilsituation werden bis heute unterschiedliche Klassifikationssysteme verwendet, anhand derer das anschließende Therapiekonzept festgelegt wird [48, 117]. Dabei gestaltet sich die Klassifikation vor allem von geschlossenen Weichteilschäden infolge ihrer Unzugänglichkeit durch den darüberliegenden intakten Hautmantel häufig als äußerst schwierig [48].

Eine ungenaue Beurteilung der Weichteilsituation kann jedoch zur Wahl eines ungeeigneten Behandlungskonzepts und einer damit verbundenen Erhöhung des Komplikationsrisikos führen.

So hängt der Erfolg einer Frakturbehandlung bis heute vor allem von der genauen Einschätzung des traumatisierten Weichteilmantels ab, die häufig nur unzureichend erfolgen kann [48].

Wäre es jedoch möglich, den pathogenetischen Einfluss des begleitenden Weichteilschadens auf die Frakturheilung zu identifizieren, könnten neue Therapieansätze entwickelt werden, die zu einer Verringerung der Komplikationsrate und einem damit verbundenen Anstieg des Heilungserfolgs während der Knochenregeneration führen.

Von daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, Kenntnisse darüber zu gewinnen, inwieweit eine zusätzliche Weichteilschädigung die zellulären sowie vaskulären Veränderungen, die während der Frakturheilung stattfinden, beeinflusst.

Hierbei wurde zum einen die Hypothese aufgestellt, dass sich eine schwere Weichteilverletzung auf die Präsenz von Granulozyten, Makrophagen, Osteoblasten, Osteoklasten sowie Gefäßen in Periost und Kallus auswirkt.

Diese Annahme konnte durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch nur teilweise bestätigt werden. Zwar ließen sich im Periost nach einem isolierten Weichteilschaden während des frühen Untersuchungszeitraums deutlich mehr Granulozyten nachweisen als in unverletzter Knochenhaut.

Eine Verstärkung der frakturbedingten zellulären Reaktion durch das zusätzliche Weichteiltrauma konnte hierbei jedoch nicht festgestellt werden.

In Bezug auf das Makrophagenaufkommen zeigten sich ähnliche Ergebnisse. So ließen sich im Periost nach isolierter Weichteilschädigung während des frühen Untersuchungszeitraums deutlich mehr Makrophagen nachweisen als in unverletzter Knochenhaut. Eine Erhöhung der frakturbedingten zellulären Reaktion durch die zusätzliche Weichteilverletzung war jedoch auch hier nicht erkennbar.

Dagegen konnte die Hypothese bezüglich der Gefäßeinsprossung für den frühen Untersuchungszeitraum bestätigt werden.

So ließen sich im Periost innerhalb der ersten 48 Stunden nach einer Kombinationsverletzung signifikant mehr Gefäße nachweisen als infolge einer isolierten Fraktur.

Im Gegensatz dazu ließ sich die Hypothese hinsichtlich der Knochenzellen nicht bestätigen. So konnte im Periost, unabhängig vom Verletzungsmuster, jeweils nur eine geringe Anzahl von Osteoblasten nachgewiesen werden, während der Nachweis von Osteoklasten hier den gesamten Untersuchungszeitraum über in jedem Fall negativ war.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zudem die Hypothese aufgestellt, dass eine isolierte Fraktur, eine separate Weichteilschädigung oder die Kombination beider Verletzungen das Periost während der Inflammation in Bezug auf die zelluläre Antwort sowie die Gefäßeinsprossung auch über das Zentrum der Schädigung hinaus beeinflussen.

Diese Annahme konnte jedoch in keinem Fall bestätigt werden. Vielmehr blieb die traumatisch bedingte Zunahme von Granulozyten, Makrophagen sowie Gefäßen vorwiegend auf den zentralen Bereich des Periosts beschränkt.

Schließlich wurde als dritte Hypothese aufgestellt, dass die Quantität der verletzungsbedingten zellulären sowie vaskulären Veränderungen vom Periost über den periostalen Kallus bis hin zum endostalen Kallus abnimmt.

Auch diese Annahme konnte in keinem Fall bestätigt werden.

So haben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit insgesamt gezeigt, dass sich ein schwerer geschlossener Weichteilschaden deutlich auf die Reaktion von Entzündungszellen sowie Gefäßen im Periost auswirkt, die im Wesentlichen auf das Zentrum der Schädigung begrenzt bleibt.

Eine durch den zusätzlichen Weichteilschaden verursachte Verstärkung der frakturbedingten zellulären sowie vaskulären Reaktionen oder deren Ausdehnung über das Schädigungszentrum hinaus als mögliche Ursache für eine Verschlechterung der Frakturheilung, konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Dagegen war eine Verstärkung der frakturbedingt erhöhten Vaskularisierung des Periosts durch die zusätzliche Weichteilverletzung erkennbar.

Gefäße spielen sowohl während der Wiederherstellung verletzten Skelettmuskelgewebes als auch im Rahmen der Frakturheilung als Quelle von Sauerstoff, nutritiven Substanzen sowie zur Regeneration notwendigen Zellen eine entscheidende Rolle.

So lässt die Verstärkung der periostalen Vaskularisierung den Schluss zu, dass die während der Regeneration des zusätzlichen Weichteilschadens notwendige Versorgung mit Gefäßen teilweise vom Periost ausgeht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Kenntnisse darüber zu gewinnen, inwieweit eine zusätzliche Weichteilschädigung die zellulären sowie vaskulären Veränderungen während der Frakturheilung beeinflusst. Dazu wurden drei Hypothesen aufgestellt, die zum großen Teil nicht bestätigt werden konnten.

Allerdings machten die Ergebnisse der Arbeit deutlich, dass sich ein schwerer geschlossener Weichteilschaden insgesamt auf die Präsenz von Granulozyten, Makrophagen und Gefäßen im Periost auswirkt.

Darüber hinaus war eine Verstärkung der frakturbedingten Vaskularisierung des Periosts durch den zusätzlichen Weichteilschaden erkennbar, die möglicherweise darin begründet liegt, dass periostale Gefäße an der Regeneration der begleitenden Weichteilverletzung beteiligt sind.

Insofern konnten durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit insgesamt Erkenntnisse über den Zusammenhang eines schweren geschlossenen Weichteilschadens in Bezug auf die Reaktion von Granulozyten, Makrophagen und Gefäßen im Periost gewonnen werden.

Auf Grundlage dieser Kenntnisse lassen sich weiterführende Forschungsansätze entwickeln, um den pathogenetischen Einfluss eines Weichteilschadens auf die Frakturheilung weiter aufzuklären und davon spezifische Therapieansätze abzuleiten, die eine Verbesserung der Behandlung von Frakturen mit einem begleitenden schweren geschlossenen Weichteilschaden ermöglichen.

8 Literatur

1. Alexander, K.A., Chang, M.K., Maylin, E.R., Kohler, T., Müller, R., Wu, A.C., Van Rooijen, N., Sweet, M.J., Hume, D.A., Raggatt, L.J., Pettit, A.R., *Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model*. J Bone Miner Res, 2011. **26**(7): p. 1517-32.
2. Alexander, K.A., Raggatt, L.J., Millard, S., Batoon, L., Chiu-Ku Wu, A., Chang, M.K., Hume, D.A., Pettit, A.R., *Resting and injury-induced inflamed periosteum contain multiple macrophage subsets that are located at sites of bone growth and regeneration*. Immunol Cell Biol, 2017. **95**(1): p. 7-16.
3. Bahney, C.S., Hu, D.P., Miclau, T., 3rd and Marcucio, R.S., *The multifaceted role of the vasculature in endochondral fracture repair*. Front Endocrinol (Lausanne), 2015. **6**: p. 4.
4. Bahney, C.S., Zondervan, R.L., Allison, P., Theologis, A., Ashley, J.W., Ahn, J., Miclau, T., Marcucio, R.S., Hankenson, K.D., *Cellular biology of fracture healing*. J Orthop Res, 2019. **37**(1): p. 35-50.
5. Baht, G.S., Vi, L. and Alman, B.A., *The Role of the Immune Cells in Fracture Healing*. Curr Osteoporos Rep, 2018. **16**(2): p. 138-145.
6. Barbosa, J.N. and Vasconcelos, D.P., *Macrophage response to biomaterials*, in *Handbook of Biomaterials Biocompatibility*. 2020, Masoud Mozafari. p. 43-52.
7. Barnes, G.L., Kostenuik, P.J., Gerstenfeld, L.C. and Einhorn, T.A., *Growth factor regulation of fracture repair*. J Bone Miner Res, 1999. **14**(11): p. 1805-15.
8. Bellido, T., Lilian, I. and Bruzzaniti, A., *Bone Cells*, in *Basic and Applied Bone Biology*, D.B. Burr and M.R. Allen, Editors. 2019, Elsevier Inc. p. 37-55.
9. Best, T.M., Hunter, K.D., *Muscle injury and repair*. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2000. **11**(2): p. 251-66.
10. Boenisch, T., *Immunchemische Färbemethoden* 3. Auflage, 2003: DakoCytomation GmbH Hamburg, ISBN 3-00-011868-3.
11. Bonnarens, F., Einhorn, T.A., *Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone*. J Orthop Res, 1984. **2**(1): p. 97-101.
12. Bourne, J.A., *Handbuch I der Immunperoxidase-Färbemethoden* 4. Auflage, 2000: DAKO Diagnostika GmbH Hamburg, ISBN
13. Bragdon, B., Lam, S., Aly, S., Femia, A., Clark, A., Hussein, A., Morgan, E.F., Gerstenfeld, L.C., *Earliest phases of chondrogenesis are dependent upon angiogenesis during ectopic bone formation in mice*. Bone, 2017. **101**: p. 49-61.
14. Braun, W., Rüter, A., *Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects*. Unfallchirurg, 1996. **99**(1): p. 59-67.

15. Chen, L., Cheng, S., Sun, K., Wang, J., Liu, X., Zhao, Y., Yang, J., Zhao, D., Xue, C., Tao, Y., Zhao, S., Zhang, H., Lu, S., Shi, Q., Wang, Y., Shu, B., *Changes in macrophage and inflammatory cytokine expressions during fracture healing in an ovariectomized mice model*. BMC Musculoskelet Disord, 2021. **22**(1): p. 494.
16. Chen, Y.Q., Hu, W.H., Dong, Z.C. and Dong, S.W., *Multi-functional osteoclasts in matrix-based tissue engineering bone*. Chin J Traumatol, 2022. **25**(3): p. 132-137.
17. Clark, D., Brazina, S., Yang, F., Hu, D., Hsieh, C.L., Niemi, E.C., Miclau, T., Nakamura, M.C., Marcucio, R., *Age-related changes to macrophages are detrimental to fracture healing in mice*. Aging Cell, 2020. **19**(3): p. e13112.
18. Codrea, C.I., Croitoru, A.M., Baciuc, C.C., Melinescu, A., Ficai, D., Fruth, V., Ficai, A., *Advances in Osteoporotic Bone Tissue Engineering*. J Clin Med, 2021. **10**(2).
19. Di Maggio, N. and Banfi, A., *The osteo-angiogenic signaling crosstalk for bone regeneration: harmony out of complexity*. Curr Opin Biotechnol, 2022. **76**: p. 102750.
20. Donneys, A., Yang, Q., Forrest, M.L., Nelson, N.S., Zhang, T., Ettinger, R., Ranganathan, K., Snider, A., Deshpande, S.S., Cohen, M.S., Buchman, S.R., *Implantable hyaluronic acid-deferoxamine conjugate prevents nonunions through stimulation of neovascularization*. NPJ Regen Med, 2019. **4**: p. 11.
21. Duda, G.N., Schaser, K.D., Haas, N.P., *Significance of musculo-skeletal soft tissue trauma on pre-operative planning, surgery and healing*. Langenbecks Arch Surg, 2003. **388**(5): p. 279-80.
22. Dwek, J.R., *The periosteum: what is it, where is it, and what mimics it in its absence?* Skeletal Radiol, 2010. **39**(4): p. 319-23.
23. Echeverri, L.F., Herrero, M.A., Lopez, J.M. and Oleaga, G., *Early stages of bone fracture healing: formation of a fibrin-collagen scaffold in the fracture hematoma*. Bull Math Biol, 2015. **77**(1): p. 156-83.
24. Einhorn, T.A., *The cell and molecular biology of fracture healing*. Clin Orthop, 1998(Suppl 355): p. S7-21.
25. Einhorn, T.A. and Gerstenfeld, L.C., *Fracture healing: mechanisms and interventions*. Nat Rev Rheumatol, 2015. **11**(1): p. 45-54.
26. Einhorn, T.A., Lee, C.A., *Bone regeneration: new findings and potential clinical applications*. J Am Acad Orthop Surg, 2001. **9**(3): p. 157-65.
27. Filipowska, J., Tomaszewski, K.A., Niedźwiedzki, Ł., Walocha, J.A., Niedźwiedzki, T., *The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning*. Angiogenesis, 2017. **20**(3): p. 291-302.

28. Florencio-Silva, R., Sasso, G.R., Sasso-Cerri, E., Simões, M.J., Cerri, P.S., *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 421746.
29. Frey, S.P., Jansen, H., Doht, S., Filgueira, L., Zellweger, R., *Immunohistochemical and molecular characterization of the human periosteum*. ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 341078.
30. Gaebler, C., Berger, U., Schandelmaier, P., Greitbauer, M., Schauwecker, H.H., Applegate, B., Zych, G., Vecsei, V., *Rates and odds ratios for complications in closed and open tibial fractures treated with unreamed, small diameter tibial nails: a multicenter analysis of 467 cases*. J Orthop Trauma, 2001. **15**(6): p. 415-23.
31. Gallardo-Calero, I., Barrera-Ochoa, S., Manzanares, M.C., Sallent, A., Vicente, M., López-Fernández, A., De Albert, M., Aguirre, M., Soldado, F., Vélez, R., *Vascularized Periosteal Flaps Accelerate Osteointegration and Revascularization of Allografts in Rats*. Clin Orthop Relat Res, 2019. **477**(4): p. 741-755.
32. Garg, P., Mazur, M.M., Buck, A.C., Wandtke, M.E., Liu, J., Ebraheim, N.A., *Prospective Review of Mesenchymal Stem Cells Differentiation into Osteoblasts*. Orthop Surg, 2017. **9**(1): p. 13-19.
33. Gu, Q., Yang, H. and Shi, Q., *Macrophages and bone inflammation*. J Orthop Translat, 2017. **10**: p. 86-93.
34. Hankenson, K.D., Dishowitz, M., Gray, C. and Schenker, M., *Angiogenesis in bone regeneration*. Injury, 2011. **42**(6): p. 556-61.
35. Heppert, V., Holz, F., Malze, K. and Wentzensen, A., *Unterschenkelfrakturen mit Weichteilschaden*. Trauma und Berufskrankheit, 1999. **1**(3): p. 247-257.
36. Hirner, A., Weise, K., *Chirurgie 2. Auflage*, 2008: Georg Thieme Verlag Stuttgart, ISBN 978-3-13-130842-9.
37. Hoffmann J.-E., S.G., Duda, G. N., Raschke M., *Ein neues standardisiertes Frakturmodell an der Ratte*. Hefte zu "Der Unfallchirurg", 1999. **275**(275-276).
38. Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H., *The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics*. Am J Clin Pathol, 1981. **75**(6): p. 816-21.
39. Huard, J., Li, Y., Fu, F.H., *Muscle injuries and repair: current trends in research*. J Bone Joint Surg Am, 2002. **84-A**(5): p. 822-32.
40. Italiani, P. and Boraschi, D., *From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 514.
41. Junqueira, L.C.U., Carneiro, J., Gratzl, M., *Histologie 6. Auflage*, 2005: Springer Medizin Verlag Heidelberg, ISBN 3-540-21695-X.

42. Krettek, C., *Fraktur und Weichteilschaden*. Der Chirurg, 1998. **69**: p. 684-700.
43. Krukemeyer, M.G. and Spiegel, H.-U., *Chirurgische Forschung* 1. Auflage, 2005: Georg Thieme Verlag Stuttgart, ISBN 3-13-133661-7.
44. Kunze, U.R., Schwedt, G., *Grundlagen der qualitativen und quantitativen Analyse* 4. Auflage, 1996: Georg Thieme Verlag Stuttgart, ISBN 3-13-585804-9.
45. Kusumbe, A.P., Ramasamy, S.K. and Adams, R.H., *Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone*. Nature, 2014. **507**(7492): p. 323-328.
46. Landry, P.S., Marino, A.A., Sadasivan, K.K. and Albright, J.A., *Effect of soft-tissue trauma on the early periosteal response of bone to injury*. J Trauma, 2000. **48**(3): p. 479-83.
47. Laumonier, T. and Menetrey, J., *Muscle injuries and strategies for improving their repair* Journal of Experimental Orthopaedics, 2016. **3**(15): p. 1-9.
48. Lein, H., Engler, K.-J., Moritz, F. and Bonnaire, F., *Erstbehandlung von Frakturen mit offenem und geschlossenen Weichteilschaden*. OP-Journal, 2009. **25**(3): p. 160-168.
49. Li, C. and Fennessy, P., *The periosteum: a simple tissue with many faces, with special reference to the antler-lineage periosteum*. Biol Direct, 2021. **16**(1): p. 17.
50. Li, Y., Cummins, J., Huard, J., *Muscle injury and repair*. Current opinion in orthopedics, 2001. **12**: p. 409-415.
51. Lippert, H., *Wundatlas* 2.Auflage, 2006: Georg Thieme Verlag Stuttgart, ISBN 3-13-140832-4.
52. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. and Sun, S.C., *NF- κ B signaling in inflammation*. Signal Transduct Target Ther, 2017. **2**: p. 17023-.
53. Loi, F., Córdova, L.A., Pajarinen, J., Lin, T.H., Yao, Z., Goodman, S.B., *Inflammation, fracture and bone repair*. Bone, 2016. **86**: p. 119-30.
54. Maia Ferreira Alencar, C.H., Sampaio Silveira, C.R., Cavalcante, M.M., Maia Vieira, C.G., Diógenes Teixeira, M.J., Neto, F.A., de Abreu, A., Chhabra, A., *"Periosteum: An imaging review"*. Eur J Radiol Open, 2020. **7**: p. 100249.
55. Marsell, R. and Einhorn, T.A., *The biology of fracture healing*. Injury, 2011. **42**(6): p. 551-5.
56. Martin, T.J., *Historically significant events in the discovery of RANK/RANKL/OPG*. World J Orthop, 2013. **4**(4): p. 186-97.
57. Maruyama, M., Rhee, C., Utsunomiya, T., Zhang, N., Ueno, M., Yao, Z., Goodman, S.B., *Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing*. Front Endocrinol (Lausanne), 2020. **11**: p. 386.

58. Mende, W., Götzl, R., Kubo, Y., Pufe, T., Ruhl, T., Beier, J.P., *The Role of Adipose Stem Cells in Bone Regeneration and Bone Tissue Engineering*. Cells, 2021. **10**(5).
59. Menger, M.M., Laschke, M.W., Nussler, A.K., Menger, M.D., Histing, T., *The vascularization paradox of non-union formation*. Angiogenesis, 2022. **25**(3): p. 279-290.
60. Merolli, A., Fung, S., Murthy, N.S., Pashuck, E.T., Mao, Y., Wu, X., Steele, J.A.M., Martin, D., Moghe, P.V., Bromage, T., Kohn, J., *"Ruffled border" formation on a CaP-free substrate: A first step towards osteoclast-recruiting bone-grafts materials able to re-establish bone turn-over*. J Mater Sci Mater Med, 2018. **29**(4): p. 38.
61. Muire, P.J., Mangum, L.H. and Wenke, J.C., *Time Course of Immune Response and Immunomodulation During Normal and Delayed Healing of Musculoskeletal Wounds*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 1056.
62. Naish, S.J., *Handbuch II Immunchemischer Färbemethoden* 4. Auflage, 2000: DAKO Diagnostika GmbH Hamburg, ISBN
63. Neagu, T.P., Țigliș, M., Cocoloș, I. and Jecan, C.R., *The relationship between periosteum and fracture healing*. Rom J Morphol Embryol, 2016. **57**(4): p. 1215-1220.
64. Nerlich, M., Berger, A., *Tscherne Unfallchirurgie Weichteilverletzungen und -infektionen* 1. Auflage, 2003: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, ISBN 3-540-63285-9.
65. Ng, P.Y., Brigitte Patricia Ribet, A. and Pavlos, N.J., *Membrane trafficking in osteoclasts and implications for osteoporosis*. Biochem Soc Trans, 2019. **47**(2): p. 639-650.
66. Niethard, F.U., Pfeil, J., Biberthaler, P., *Orthopädie und Unfallchirurgie* 6. Auflage, 2009: Georg Thieme Verlag Stuttgart, ISBN 978-3-13-130816-0.
67. Oestern, H.-J., Tscherne H., *Pathophysiologie und Klassifikation des Weichteilschadens*. Hefte zur Unfallheilkunde, 1983. **162**: p. 1-10.
68. Oestern, H.-J., Tscherne, H., *Pathophysiologie und Klassifikation des Weichteilschadens bei Frakturen*. Orthopäde, 1983. **12**: p. 2-8.
69. Oetgen, M.E., Merrell, G.A., Troiano, N.W., Horowitz, M.C., Kacena, M.A., *Development of a femoral non-union model in the mouse*. Injury, 2008. **39**(10): p. 1119-26.
70. Oryan, A., Monazzah, S. and Bigham-Sadegh, A., *Bone injury and fracture healing biology*. Biomed Environ Sci, 2015. **28**(1): p. 57-71.

71. Pajarinen, J., Lin, T., Gibon, E., Kohno, Y., Maruyama, M., Nathan, K., Lu, L., Yao, Z., Goodman, S.B., *Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing*. *Biomaterials*, 2019. **196**: p. 80-89.
72. Peng, Y., Wu, S., Li, Y. and Crane, J.L., *Type H blood vessels in bone modeling and remodeling*. *Theranostics*, 2020. **10**(1): p. 426-436.
73. Perren, S.M., [*Biomechanical basis of fracture treatment*]. *Orthopade*, 1992. **21**(1): p. 3-10.
74. Perrin, S. and Colnot, C., *Periosteal Skeletal Stem and Progenitor Cells in Bone Regeneration*. *Curr Osteoporos Rep*, 2022. **20**(5): p. 334-343.
75. Ponzetti, M. and Rucci, N., *Osteoblast Differentiation and Signaling: Established Concepts and Emerging Topics*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(13).
76. Prisk, V., Huard, J., *Muscle injuries and repair: the role of prostaglandins and inflammation*. *Histol Histopathol*, 2003. **18**(4): p. 1243-56.
77. Probst, A., Spiegel, H. U., *Cellular mechanisms of bone repair*. *J Invest Surg*, 1997. **10**(3): p. 77-86.
78. Qin, H., Holdbrooks, A.T., Liu, Y., Reynolds, S.L., Yanagisawa, L.L., Benveniste, E.N., *SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation*. *J Immunol*, 2012. **189**(7): p. 3439-48.
79. Raggatt, L.J., Wullschleger, M.E., Alexander, K.A., Wu, A.C., Millard, S.M., Kaur, S., Maugham, M.L., Gregory, L.S., Steck, R., Pettit, A.R., *Fracture healing via periosteal callus formation requires macrophages for both initiation and progression of early endochondral ossification*. *Am J Pathol*, 2014. **184**(12): p. 3192-204.
80. Raschke, M.J., Stange R., *Alterstraumatologie Prophylaxe, Therapie und Rehabilitation* 1. Auflage, 2009: Elsevier GmbH München, ISBN 978-3-437-24390-5.
81. Remmele, W., Stegner, H.E., *Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue*. *Pathologe*, 1987. **8**(3): p. 138-40.
82. Ribet, A.B.P., Ng, P.Y. and Pavlos, N.J., *Membrane Transport Proteins in Osteoclasts: The Ins and Outs*. *Front Cell Dev Biol*, 2021. **9**: p. 644986.
83. Rinderknecht, H., Nussler, A.K., Steinestel, K., Histing, T., Ehnert, S., *Smoking Impairs Hematoma Formation and Dysregulates Angiogenesis as the First Steps of Fracture Healing*. *Bioengineering (Basel)*, 2022. **9**(5).
84. Roy, M. and Roux, S., *Rab GTPases in Osteoclastic Bone Resorption and Autophagy*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(20).

85. Rupp, M., Walter, N., C, P., Lang, S., Kerschbaum, M., Krutsch, W., Baumann, F., Alt, V., *The incidence of fractures among the adult population of Germany—an analysis from 2009 through 2019*. Dtsch Arztebl Int 2021, 2021. **118**: p. 665–9.
86. Rutkovskiy, A., Stensløyken, K.O. and Vaage, I.J., *Osteoblast Differentiation at a Glance*. Med Sci Monit Basic Res, 2016. **22**: p. 95-106.
87. Scharf, H.-P., Rüter A., *Orthopädie und Unfallchirurgie* 1. Auflage, 2008: Elsevier GmbH München, ISBN 978-3-437-24400 - 1.
88. Scharf, H.-P., Rüter A., *Orthopädie und Unfallchirurgie* 1. Auflage, 2009: Elsevier GmbH, München, ISBN 978-3-437-24400 - 1.
89. Schaser, K.D., Vollmar, B., Menger, M.D., Schewior, L., Kroppenstedt, S.N., Raschke, M., Lubbe, A.S., Haas, N.P., Mittlmeier, T., *In vivo analysis of microcirculation following closed soft-tissue injury*. J Orthop Res, 1999. **17**(5): p. 678-85.
90. Schiebler, T.H., Korf, H.-W., *Anatomie* 10. Auflage, 2007: Steinkopffverlag Heidelberg, ISBN 978-3-7985-1770-7.
91. Schlickewei, C.W., Kleinertz, H., Thiesen, D.M., Mader, K., Priemel, M., Frosch, K.H., Keller, J., *Current and Future Concepts for the Treatment of Impaired Fracture Healing*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(22).
92. Schmidmaier, G., *Development and characterization of a standard closed tibial fracture model in the rat*. Eur J Trauma 2004, 2004. **30**: p. 35-42.
93. Schünke, M., *Topographie und Funktion des Bewegungssystems* 1. Auflage, 2000: Georg Thieme Verlag Stuttgart, ISBN 3-13-118571-6.
94. Seyfried, A.N., Maloney, J.M. and MacNamara, K.C., *Macrophages Orchestrate Hematopoietic Programs and Regulate HSC Function During Inflammatory Stress*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 1499.
95. Sfeir, C., Ho, L., Doll, B.A., Azari, K., Hollinger, J.O., *Fracture Repair*, in *Bone Regeneration and Repair*, Jay R. Lieberman and G.E. Friedlaender, Editors. 2005, Humana Press. p. 21-44.
96. Sharma, N., Weivoda, M.M. and Søy, K., *Functional Heterogeneity Within Osteoclast Populations—a Critical Review of Four Key Publications that May Change the Paradigm of Osteoclasts*. Curr Osteoporos Rep, 2022. **20**(5): p. 344-355.
97. Siewert, J.H., *Chirurgie* 8. Auflage, 2006: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, ISBN 978-3-540-30450-0.
98. Simpson, A.H., *The blood supply of the periosteum*. J Anat, 1985. **140 (Pt 4)**(Pt 4): p. 697-704.

99. Sindrilaru, A., Peters, T., Wieschalka, S., Baican, C., Baican, A., Peter, H., Hainzl, A., Schatz, S., Qi, Y., Schlecht, A., Weiss, J.M., Wlaschek, M., Sunderkötter, C., Scharffetter-Kochanek, K., *An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice.* J Clin Invest, 2011. **121**(3): p. 985-97.
100. Sivaraj, K.K. and Adams, R.H., *Blood vessel formation and function in bone.* Development, 2016. **143**(15): p. 2706-15.
101. Soldado, F., Barrera-Ochoa, S., Romero-Larrauri, P., Nguyen, T.Q., Diaz-Gallardo, P., Guerra, E., Knörr, J., *Congenital pseudarthrosis of the tibia: Rate of and time to bone union following contralateral vascularized periosteal tibial graft transplantation.* Microsurgery, 2022. **42**(4): p. 326-332.
102. Soldner, E., Herr, G., *Knochen, Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien.* Trauma und Berufskrankheit, 2001. **3**(4): p. 256-269.
103. Statistisches Bundesamt (Destatis), *Gesundheit 2021 Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik), Operationen und Prozeduren der vollstationären Patientinnen.* 2022.
104. Stefanowski, J., Lang, A., Rauch, A., Aulich, L., Köhler, M., Fiedler, A.F., Buttgerit, F., Schmidt-Bleek, K., Duda, G.N., Gaber, T., Niesner, R.A., Hauser, A.E., *Spatial Distribution of Macrophages During Callus Formation and Maturation Reveals Close Crosstalk Between Macrophages and Newly Forming Vessels.* Front Immunol, 2019. **10**: p. 2588.
105. Stenbeck, G., *Formation and function of the ruffled border in osteoclasts.* Semin Cell Dev Biol, 2002. **13**(4): p. 285-92.
106. Streitwieser, A., Heathcock, C.H., Kosower, E.M. , *Organische Chemie 2.* Auflage, 1994: VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, ISBN 3-527-29005-2.
107. Summan, M., McKinstry, M., Warren, G.L., Hulderman, T., Mishra, D., Brumbaugh, K., Luster, M.I., Simeonova, P.P., *Inflammatory mediators and skeletal muscle injury: a DNA microarray analysis.* J Interferon Cytokine Res, 2003. **23**(5): p. 237-45.
108. Szyszkowitz, R., *Tscherne Unfallchirurgie Unterschenkel* 1. Auflage, 2003: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, ISBN 3-540-63284-0.
109. Thews, G., Mutschler, E. ,Vaupel, P. , *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen* 5. Auflage, 1999: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, ISBN 3-80471616-4.
110. Tidball, J.G., *Inflammatory cell response to acute muscle injury.* Med. Sci. Sports Exerc., 1995. **27**(7): p. 1022-1032.
111. Tidball, J.G., Berchenko, E., Frenette, J., *Macrophage invasion does not contribute to muscle membrane injury during inflammation.* J Leukoc Biol, 1999. **65**(4): p. 492-8.

112. Tscherne, H., *Wundmanagement bei Frakturen mit Weichteilschaden*. Eur J Pediatr Surg, 1983. **38**(1): p. 34-39.
113. Tscherne, H., Regel, G., *Tscherne Unfallchirurgie Traumamanagement 1. Auflage*, 1997: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, ISBN 3-540-61605-5.
114. Ulfing, N., *Bewegungsapparat 1. Auflage*, 2002: Karger AG Basel, ISBN 3-8055-7315-4.
115. Utvag, S.E., Iversen, K.B., Grundnes, O. and Reikeras, O., *Poor muscle coverage delays fracture healing in rats*. Acta Orthop Scand, 2002. **73**(4): p. 471-4.
116. Vi, L., Baht, G.S., Whetstone, H., Ng, A., Wei, Q., Poon, R., Mylvaganam, S., Grynopas, M., Alman, B.A., *Macrophages promote osteoblastic differentiation in vivo: implications in fracture repair and bone homeostasis*. J Bone Miner Res, 2015. **30**(6): p. 1090-102.
117. von Rüden, C., Friederichs, J., Zipplies, S., Langer, S., Morgenstern, M., Bühren, V., *The role of soft tissue damage in fracture treatment*. OUP, 2017. **5**: p. 259–264.
118. Wagner, C., Heppert, V., Wentzensen, A., *Versorgungskonzepte nach traumatischem Weichteilschaden am Unterschenkel - unfallchirurgische Aspekte*. Akt Traumatol, 2004. **34**(4): p. 153-165.
119. Wang, J., Zheng, Z., Huang, B., Wu, H., Zhang, X., Chen, Y., Liu, J., Shan, Z., Fan, S., Chen, J., Zhao, F., *Osteal Tissue Macrophages Are Involved in Endplate Osteosclerosis through the OSM-STAT3/YAP1 Signaling Axis in Modic Changes*. J Immunol, 2020. **205**(4): p. 968-980.
120. Wang, T., Zhang, X. and Bikle, D.D., *Osteogenic Differentiation of Periosteal Cells During Fracture Healing*. J Cell Physiol, 2017. **232**(5): p. 913-921.
121. Watson, E.C. and Adams, R.H., *Biology of Bone: The Vasculature of the Skeletal System*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2018. **8**(7).
122. Whiteside, L.A., Lesker, P.A., *The effects of extraperiosteal and subperiosteal dissection. II. On fracture healing*. J Bone Joint Surg Am, 1978. **60**(1): p. 26-30.
123. Wu, A.C., Raggatt, L.J., Alexander, K.A. and Pettit, A.R., *Unraveling macrophage contributions to bone repair*. Bonekey Rep, 2013. **2**: p. 373.
124. Xu, D., Gan, K., Wang, Y., Wu, Z., Wang, Y., Zhang, S., Peng, Y., Fang, X., Wei, H., Zhang, Y., Ma, W., Chen, J., *A Composite Deferoxamine/Black Phosphorus Nanosheet/Gelatin Hydrogel Scaffold for Ischemic Tibial Bone Repair*. Int J Nanomedicine, 2022. **17**: p. 1015-1030.

125. Yadav, A.M., Bagade, M.M., Ghumnani, S., Raman, S., Saha, B., Kubatzky, K.F., Ashma, R., *The phytochemical plumbagin reciprocally modulates osteoblasts and osteoclasts*. Biol Chem, 2022. **403**(2): p. 211-229.
126. Yahara, Y., Nguyen, T., Ishikawa, K., Kamei, K., Alman, B.A., *The origins and roles of osteoclasts in bone development, homeostasis and repair*. Development, 2022. **149**(8).
127. Yang, D. and Wan, Y., *Molecular determinants for the polarization of macrophage and osteoclast*. Semin Immunopathol, 2019. **41**(5): p. 551-563.
128. Zhang, J., Pan, J. and Jing, W., *Motivating role of type H vessels in bone regeneration*. Cell Prolif, 2020. **53**(9): p. e12874.
129. Zhang, R., Liang, Y. and Wei, S., *M2 macrophages are closely associated with accelerated clavicle fracture healing in patients with traumatic brain injury: a retrospective cohort study*. J Orthop Surg Res, 2018. **13**(1): p. 213.
130. Zhang, W., Wang, N., Yang, M., Sun, T., Zhang, J., Zhao, Y., Huo, N., Li, Z., *Periosteum and development of the tissue-engineered periosteum for guided bone regeneration*. J Orthop Translat, 2022. **33**: p. 41-54.
131. Zilles, K., Tillmann, Bernhard N. Tillmann, *Anatomie*, 2010: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, ISBN 978-3-540-69481-6.

9 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Annette Lauffer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss von traumatischer Weichteilschädigung auf die Frakturheilung. Eine immunhistochemische Untersuchung am Rattenmodell.“ / “The influence of traumatic soft tissue damage on fracture healing. An immunohistochemical investigation in the rat model.“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Eidesstattliche Versicherung

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

10 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11 Publikationsliste

Local cooling restores microcirculatory hemodynamics after closed soft-tissue trauma in rats.

Klaus-D Schaser, John F Stover, Ingo Melcher, Annette Lauffer, Norbert P Haas, Hermann J Bail, Ulrich Stöckle, Gero Puhl, Thomas W Mittlmeier

J Trauma. 2006 Sep;61(3):642-9

Prolonged superficial local cryotherapy attenuates microcirculatory impairment, regional inflammation, and muscle necrosis after closed soft tissue injury in rats.

Klaus-Dieter Schaser, Alexander C Disch, John F Stover, Annette Lauffer, Herman J Bail, Thomas Mittlmeier

Am J Sports Med. 2007 Jan;35(1):93-102

12 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Klaus-Dieter Schaser sowie bei Herrn Univ.- Prof. Dr.-Ing. Georg Duda für die hilfreiche Unterstützung bedanken.

Ebenso danke ich Herrn Markus Appel, Frau Nele Kreutz sowie Herrn Henning Rune für ihre unermüdliche Einsatzbereitschaft.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Frau Camilla Bergmann, Frau Gabriele Hardung und Frau Marzena Princ für ihre kompetente Anleitung und Hilfe in Bezug auf die Durchführung immunhistologischer Untersuchungen.

Besonderer Dank gilt meinem Ehemann, Peer-Kristian Siegel, der mich über viele Jahre hinweg liebevoll unterstützt hat und mir hilfreich zur Seite stand.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meiner Mutter, Frau Margot Lauffer, Schwiegermutter, Frau Bärbel Siegel, sowie meinen Freunden Herrn Dr. Hartmut Bohmhammel, Herrn Peter Unger-Wolff und Frau Birgit Pelz für ihren Beistand bedanken.

Außerdem danke ich Frau Dr. Kuchler für die Beratung hinsichtlich der statistischen Datenanalyse.

Annette Lauffer