

Aus dem Julius Wolff Institut und Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Vergleichende Analyse des zeitlichen Genexpressionsmusters
angiogener Faktoren während einer normalen und einer verzögerten
Osteotomieheilung im Schafmodell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Franek Haschke
aus Potsdam

Gutachter/in:

1. Priv.-Doz. Dr. med. H.-J. Bail
2. Priv.-Doz. Dr. med. G. Matziolis
3. Prof. Dr. med. W. Linhart

Datum der Promotion: 09.09.2011

1	EINLEITUNG	6
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN UND AKTUELLER FORSCHUNGSSTAND	9
2.1	Frakturheilung	9
2.1.1	Direkte Frakturheilung	10
2.1.2	Indirekte Frakturheilung	11
2.2	Phasen der indirekten Frakturheilung	12
2.2.1	Entzündungsphase	12
2.2.2	Proliferationsphase	12
2.2.3	Intramembranöse Knochenbildung	13
2.2.4	Enchondrale Knochenbildung	13
2.2.5	Reifungs-oder Remodellingphase	14
2.3	Verzögerte Frakturheilung	14
2.3.1	Lokale Faktoren	15
2.3.2	Systemische Faktoren	16
2.4	Blutgefäßbildung	16
2.4.1	Vascular Endothelial Growth Factor- A_{165} – (VEGFA ₁₆₅)	19
2.4.2	Angiopoietine – (ANG)	20
2.4.3	Tunica Interna Endothelial Kinase 2 – (TIE2)	21
2.4.4	Cysteine-Rich Protein-61 – (CYR61)	22
2.4.5	Tumor-Necrosis-Factor- α – (TNF α)	23
2.4.6	Matrix-Metalloproteinase-2 /Gelatinase-A – (MMP2)	24
2.4.7	Basic Fibroblast Growth Factor – (bFGF/FGF2)	25
2.4.8	Insulin-Like Growth Factors/Somatomedin-C – (IGF1)	26
2.4.9	Inducible Nitric Oxide Synthase – (iNOS/NOS2)	27
2.4.10	Platelet Derived Growth Factor – (PDGF)	27
2.4.11	Hypoxia-Inducible Factor-1 α – (HIF1 α)	28
2.4.12	Von Willebrand Faktor – (vWF)	29
2.5	Tiermodell	29
3	MATERIAL UND METHODEN	30
3.1	Studiendesign	30
3.2	Versuchstiere	31
3.3	Fixateur externe	31
3.4	Frakturhämatomentnahme	32
3.5	Sakrifizierung	32
3.6	RNA-Gewinnung	33
3.7	RNA-Messung	34
3.8	Reverse Transkription	34
3.9	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	35
3.10	Statistische Analyse	38
4	UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE	39

4.1	vWF	39
4.2	VEGF	40
4.3	VEGFR2	41
4.4	CYR61	42
4.5	ANG1	43
4.6	ANG2	44
4.7	TIE2	45
4.8	FGF2	46
4.9	MMP2	47
4.10	TIMP1	48
4.11	TIMP3	49
4.12	HIF1α	50
4.13	TNFα	51
4.14	PDGF	52
4.15	IGF1	53
4.16	iNOS	54
5	DISKUSSION	55
5.1	Material und Methoden	55
5.1.1	Studiendesign	55
5.1.2	Molekularbiologie	55
5.2	Faktoren	56
5.2.1	VEGF, CYR61, HIF1 α , vWF	56
5.2.2	VEGFR2	58
5.2.3	TIE2	58
5.2.4	ANG1, ANG2	58
5.2.5	TNF α .	59
5.2.6	MMP-2, TIMP-1, TIMP-3	60
5.2.7	FGF2	61
5.2.8	PDGF, IGF1	61
5.2.9	INOS	63
5.3	Kritische Bewertung der Ergebnisse	64
6	ZUSAMMENFASSUNG	66
6.1	Zusammenfassung	66
6.2	Abstract (english)	68
7	LITERATURVERZEICHNIS	69

8 ANHANG	86
8.1 Abkürzungsverzeichnis	86
8.2 Abbildungsverzeichnis	88
DANKSAGUNG	89
ERKLÄRUNG AN EIDES STATT	90
LEBENS LAUF	91
PUBLIKATION	92

1 Einleitung

Im Wertesystem der Gesellschaft nimmt die Gesundheit einen herausragenden Stellenwert ein, weil sie bestimmend ist für die Lebensqualität des Menschen. In Zukunft wird die Gesundheit als wertvolles Lebensgut noch an Bedeutung gewinnen, weil einerseits die Ansprüche jedes einzelnen Individuums an die eigene Gesundheit steigen und andererseits, durch veränderte Lebensbedingungen, Herausforderungen hinsichtlich der körperlichen Beanspruchung entstehen werden, die der menschliche Organismus im Allgemeinen erst nach einer entsprechenden Anpassungsreaktion erfüllen kann. Solange er diesen Ansprüchen nicht genügt, wird das Risiko, sich zu verletzen oder zu erkranken sehr hoch sein. So vollzogen sich mit der Entwicklung neuer Trendsportarten wie z.B. Inlineskaten und Mountainbiken Veränderungen im Freizeitverhalten der Bevölkerung, die vor allem wegen der Komplexität der Bewegungsabläufe sowie auf Grund der Erfordernisse zur Beherrschung des anspruchsvollen Materials Ansatzpunkte für eine Zunahme von Verletzungen lieferten. Ein weiterer Aspekt, der hier beispielhaft genannt werden soll, ergibt sich aus dem Anstieg der Lebenserwartung der Bevölkerung, auch infolge des medizinischen Fortschritts. Vor diesem Hintergrund wird die Gewährleistung von Gesundheit und Selbständigkeit im Alter immer mehr zu einer zentralen Aufgabenstellung unserer Gesellschaft.

Neue interdisziplinäre Konzepte und Lösungsansätze müssen entwickelt und diskutiert werden, um den veränderten Lebensbedingungen besser gerecht zu werden. Dabei spielen nicht nur medizinische, sondern auch ökonomische Faktoren eine wichtige Rolle. Gesundheitsökonomische Berechnungen des Statistischen Bundesamtes im Rahmen der Krankheitskostenrechnung belegen den enormen Anstieg der Ausgaben für die Prävention, Behandlung, Rehabilitation und Pflege von erkrankten Menschen. So erhöhten sich die Krankheitskosten im Jahr 2006 gegenüber 2002, dem ersten Jahr der Berichterstattung, um 17,2 Mrd.€ (+7,8 %), eine Trendwende ist nicht in Sicht [1]. Der steigende Kostendruck im Gesundheitswesen macht es erforderlich, kostengünstigere Behandlungsmethoden zu implementieren, bei gleichzeitiger Verbesserung der Situation für betroffene Patienten. In diesen erweiterten Rahmen ist auch das Thema der vorliegenden Arbeit einzuordnen.

In Deutschland zeigen sich im klinischen Alltag derzeit über 800.000 Frakturen pro Jahr, die eine stationäre Behandlung erfordern. Trotz aller Fortschritte der operativen und konservativen Frakturbehandlung verzögert sich in 5-10 % der Fälle die Heilung oder bleibt ganz aus [2]. Dieser hohe Prozentsatz verdeutlicht die Notwendigkeit, die Frakturversorgung zu optimieren und somit die Effizienz der Heilung zu erhöhen. Von entscheidender Bedeutung für den Heilungsprozess könnten in diesem Zusammenhang molekularbiologisch ablaufende Prozesse sein. Diese zu analysieren und Denkanstöße für einen geeigneten Therapieansatz zu geben, ist das Anliegen dieser Arbeit. Im Mittelpunkt der Untersuchung stehen dabei der Bewegungsapparat im Allgemeinen und der Knochen, nach einer Traumatisierung infolge einer zu hohen Belastung, im Besonderen. Eine traumatische Fraktur liegt vor, wenn eine von außen eintretende Gewaltwirkung auf den Knochen die Ursache des Traumas darstellt [3]. Um die biochemischen und biomechanischen Eigenschaften wieder herzustellen, ist es erforderlich, die Fraktur zu behandeln, sowie die Heilung des Knochens zu unterstützen. Die Vorgänge bei der Vereinigung eines durchtrennten Knochens – nach Frakturen ebenso wie nach Osteotomien – variieren in Abhängigkeit davon, ob die Heilung spontan oder konservativ erfolgt bzw. ob eine Osteosynthese vorgenommen wurde. Darüber hinaus unterliegt die Konsolidierung der Fraktur verschiedenen endogenen und exogenen Einflüssen. Bestimmende Einflussfaktoren sind in diesem Zusammenhang die Art der Fraktur, die Weite des Frakturspalts sowie die Rigidität, mit der die Fraktur fixiert ist. Ebenso von Bedeutung sind das biochemische sowie das zelluläre Milieu [4]. Die strukturelle Integrität und nutritive Perfusion von Periost und umgebenden Weichteilmantel sind hierbei von besonderer Relevanz. So konnte die Arbeitsgruppe Kokubu et al. in einem Tiermodell zeigen, dass nach einer Deperiostierung einer Femurfraktur keine Frakturkonsolidierung erfolgte [5]. Dabei ist die fehlende Perfusion des Kallusgebietes, ausgehend von periostalen Kapillaren, eine Erklärung für die Bedeutung des Periostes. Die Schädigung des muskuloskeletalen Weichteilmantels ist für die Frakturkonsolidierung ebenfalls von Bedeutung. Eine deutlich reduzierte Frakturheilung im Vergleich zu Kontrollfrakturen konnten Utvag et al. feststellen, nachdem die muskulo-periostale Verbindung mechanisch getrennt worden ist [6]. Obwohl die Frakturheilung als ein gut organisierter und regulierter Prozess innerhalb des menschlichen Körpers abläuft, kann es durch die Entwicklung einer verzögerten Frakturheilung (delayed union) oder durch die Herausbildung einer Pseudarthrose

(non-union) zu Problemen in der modernen Knochenbruchbehandlung kommen. Die spezifischen patho-physiologischen Abläufe, die zu einer verzögerten oder fehlerhaften Frakturkonsolidierung führen, werden gegenwärtig noch nicht vollständig verstanden und bieten ausreichend Ansätze für weitergehende Untersuchungen.

Die Angiogenese ist auf molekularer Ebene ein entscheidender Prozess für die Knochenheilung und beinhaltet das Aussprossen von neuen Kapillaren aus bereits vorhandenen Blutgefäßen. Dies ist z.B. notwendig, um in der initialen Phase der Frakturheilung das durch das Trauma entstandene Frakturhämatom zu resorbieren und bindegewebig neu zu organisieren. Die Zusammensetzung und die Form des gebildeten Kallus sind abhängig von der Blutversorgung und beeinflussen entscheidend die Frakturheilungsdauer. Studien in diesem Zusammenhang haben ergeben, dass eine eingeschränkte Angiogenese mit einer verminderten Knochenmasse und Knochenneubildung assoziiert ist [7, 8].

Im Kern befasst sich die vorliegende Arbeit mit der vergleichenden Analyse des zeitlichen Expressionsmusters angiogener Faktoren während einer normalen und einer verzögerten Osteotomieheilung. Ausgehend von der Hypothese, dass die Biomechanik in der initialen Phase der Frakturheilung als bestimmender Einflussfaktor fungiert und mechanische Signale die Expression ausgewählter biologischer Faktoren im Frakturhämatom beeinflussen, wurde angenommen, dass in zwei biomechanisch voneinander differierenden Frakturen unterschiedliche Expressionsmuster angiogener Faktoren auftreten [9]. Die Prüfung der Richtigkeit dieser Annahme erfolgte im Schafmodell. Es wurden zwei Gruppen von Tieren gebildet, wobei zunächst jedes Tier eine Osteotomie der rechten Tibia erhielt. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppierungen resultierte aus der Behandlung mit verschiedenen externen Fixateuren. In der einen Gruppe wurde ein rigider Fixateur verwendet, um eine optimale Heilung zu erzielen, in der anderen Gruppe wurde ein sogenannter „kritischer Fixateur externe“ eingesetzt, dessen Eigenschaften (v.a. mechanische Instabilität) eine Verzögerung der Frakturkonsolidierung bewirkten. In der Folge wurde nach einem vorab festgelegten Zeitplan, nach Ablauf von 7, 9, 11, 14, 21 und 42 Tagen Hämatom/Kallusproben postoperativ gewonnen und hinsichtlich der Expression angiogener Faktoren untersucht. Folgende Hypothesen wurden getestet:

1. Die Regulation der Blutgefäßbildung während einer verzögerten und einer normalen Osteotomieheilung verläuft unterschiedlich.

2. Die Expression angiogener Faktoren ist im biomechanisch kritischen Modell geringer ausgeprägt als im rigiden.

Die Ergebnisse dieser wissenschaftlichen Arbeit sollten zu einem besseren Verständnis der Prozesse während der Frakturheilung beitragen und Zusammenhänge herstellen zwischen angiogenen Expressionsmustern und biomechanisch unterschiedlichen Bedingungen.

2 Theoretische Grundlagen und aktueller Forschungsstand

2.1 Frakturheilung

Die Frakturheilung ist ein einzigartiger Regenerationssprozess und führt im Allgemeinen zu einem erfolgreichen Resultat. Der kaskadenartige Ablauf dieses Prozesses umfasst eine komplexe, gut organisierte und kontrollierte Serie von zellulären und molekularen Mechanismen. Am Ende des Heilungsprozesses wird der Knochen nicht durch Narbengewebe überbrückt, sondern es entsteht ein dem ursprünglichen Gewebe entsprechendes Regenerat [3].

Für den reibungslosen Ablauf der Frakturheilung ist es von entscheidender Bedeutung, dass die Voraussetzungen – mechanischer und biologischer Art – für eine optimale Regeneration des Knochengewebes gegeben sind. Die mechanischen Voraussetzungen für eine ungestörte Frakturheilung bestehen einerseits in der Ruhigstellung der Fragmentenden und andererseits in einem ausreichenden Kontakt der Fragmentflächen [10]. Zudem wird angenommen, daß sog. Mikrobewegungen die Frakturheilung begünstigen, d.h. eine komplette (sehr rigide) Ruhigstellung der Fragmentenden kann u.U. die Frakturheilung verzögern. Die biologischen Gegebenheiten liegen neben einer ausreichenden Gefäßversorgung in der Vitalität und Regenerationspotenz des Kontaktgewebes [10]. Eine insuffiziente Gefäßversorgung während der Knochenheilung kann somit zu einer Heilungsstörung führen und die Entwicklung einer Pseudarthrose begünstigen. Eine Frakturkonsolidierung im menschlichen Organismus erfolgt erfahrungsgemäß innerhalb eines Zeitraumes von 4 bis 6 Monaten [9]. Eine Heilungsstörung oder verzögerte Heilung (delayed union) bezeichnet das Ausbleiben der knöchernen Frakturkonsolidierung oder Osteotomie innerhalb dieses Zeitraumes. Das komplette Ausbleiben der Frakturkonsolidierung nach Ablauf des sechsten Monats wird als Pseudarthrose bezeichnet [9]. Als Ursachen der verzögerten Frakturheilung kommen

z.B. lokale Instabilität, Infektionen, Knochennekrosen sowie Dystrophie bzw. Beschädigung des Weichteilgewebes in Betracht. Im deutschsprachigen Raum beschreibt der Begriff Pseudarthrose einen Zustand, der den definitiven Fehlschlag einer Frakturheilung kennzeichnet. Im angloamerikanischen, zunehmend auch im deutschen Raum, wird jedoch der Begriff "non-union" verwendet. Dieser Begriff ist zutreffender, da er den röntgenologisch sichtbaren und persistierenden Frakturspalt sprachlich exakter erfasst. In Abhängigkeit von den Ursachen für ihr Entstehen werden Pseudarthrosen einerseits in reaktionsfähige, vitale und andererseits in reaktionsunfähige, avitale Pseudarthrosen unterteilt. Für die vitale Form liegt die Ursache in der Mehrzahl der Fälle in einer unzureichenden Ruhigstellung im Frakturspalt und/oder in einer zu großen Distanz zwischen den Fragmentenden. Die vitale Pseudarthrose wird unterschieden in eine hypertrophe, kallusreiche und in eine oligotrophe, kallusarme Form [10]. Während die hypertrophe Form das Ergebnis ungenügender Ruhigstellung oder zu früher Beanspruchung ist, kommt es bei der kallusarmen Form auf Grund insuffizienter biologischer und mechanischer Abläufe nicht zur Bildung eines Fixationskallus.

Bei der reaktionsunfähigen, avitalen Pseudarthrose bleibt die biologische Reaktion auf die Fraktur aus und die Kallusbildung ist demzufolge unzureichend. Auch die avitale Variante wird weiter untergliedert in eine atrophe Pseudarthrose und in eine Defektpseudarthrose. Die atrophe Form ist zumeist das Ergebnis eines Drehkeilbruchs, bei der das Intermediärfragment nur einseitig verwächst und sich zum anderen Hauptfragment hin eine atrophe reaktionslose Zone ausbildet. Die Defektpseudarthrose ist häufig Folge einer Trümmerfraktur bei der durch komplette Deperiostierung der Fragmente und einen insuffizienten Weichteilmantel eher eine resorptive als eine osteoneogenetische Aktivität besteht [10].

Das besondere an der Knochenheilung ist, dass die Aspekte der embryonalen Knochenentwicklung aufgegriffen werden. Viele molekulare Mechanismen, die die zelluläre Differenzierung und das Wachstum während der Embryogenese steuern, wiederholen sich während der Frakturheilung [11].

Generell wird auch zwischen der direkten und indirekten Frakturheilung unterschieden.

2.1.1 Direkte Frakturheilung

Unter einer direkten Frakturheilung wird eine Art der Frakturheilung verstanden, bei der die chondralen Zwischenstufen fehlen und die Knochenbildung direkt erfolgt.

Dabei wird in Abhängigkeit vom Abstand der Frakturrenden zueinander sowie unter Beachtung der histomorphologischen Prozesse differenziert zwischen der Spaltheilung (Frakturspalt < 1 mm) und der Kontaktheilung (Frakturspalt < 0,01 mm). Bei der Kontaktheilung besitzen die Frakturrenden unmittelbaren Flächenkontakt, es wird kein Knochen resorbiert. Voraussetzung dafür sind stabile mechanische Verhältnisse wie sie durch eine starre Kompressionsosteosynthese und einen gut vaskularisierten Knochen gewährleistet werden [3]. Diese Art der Frakturheilung ist durch das Fehlen eines Frakturkallus gekennzeichnet und erfolgt über den sogenannten Havers'schen Umbau. Hierbei bilden Osteoklasten einen Bohrkopf, der ohne Berücksichtigung der bestehenden Osteone den Frakturspalt kreuzt. In der Folge entstehen in dem „Bohrloch“ aus mesenchymalen Stammzellen abgeleitete Osteoblasten, welche 5-20 Osteoidlamellen synthetisieren und somit den vorhandenen Defekt auffüllen [3, 12]. Die Vielzahl der aufgefüllten „Bohrlöcher“ (sog. cutting cones) „verzapft“ die Frakturrenden miteinander. Bei der Spaltheilung hingegen bleiben zwischen den Frakturrenden Stellen offen, die durch Geflecht- und Lamellenknochen ausgefüllt werden. Dieser Spalt wird nachfolgend ebenfalls durch parallel zur Schaftachse ausgerichtete Osteone im Rahmen eines stark gesteigerten Haversschen Knochenumbau ersetzt.

Die direkte Frakturheilung setzt in der Regel einen operativen Eingriff voraus. Nur wenn die Fragmentenden komprimiert werden, ist genügend Ruhe im Frakturspalt vorhanden (sog. „absolute Stabilität“) und die Distanz zwischen den Fragmentenden so gering, dass die oben angeführten Vorgänge ablaufen können.

2.1.2 Indirekte Frakturheilung

Im Gegensatz zur direkten Frakturheilung wird bei der indirekten Form die Struktur des Knochens über chondrale Zwischenstufen und eine Kallusbildung wiederhergestellt. Diese Art der Frakturheilung ist die „natürliche“ ohne chirurgischen Eingriff ablaufende Reaktion eines Organismus auf einen Knochenbruch. Die indirekte Frakturheilung vollzieht sich in fünf Stadien, die zum Teil parallel ablaufen [13].

Dazu gehören:

- Entzündungsphase,
- Proliferationsphase mit Organisation des Blutgerinnsels zu Granulationsgewebe
- Intramembranöse Knochenbildung

- Chondrale Knochenbildung
- Reifungs- oder Remodelingphase [14, 15, 16, 17]

2.2 Phasen der indirekten Frakturheilung

2.2.1 Entzündungsphase

Die Entzündungsphase schließt sich unmittelbar an die durch ein Trauma verursachte Durchtrennung von Blutgefäßen an [17] und dauert beim Menschen ein bis vier Tage [3, 14]. Durch die Zerstörung der Blutgefäße vor allem im Periost, aber auch im Markraum bei Röhrenknochen entsteht ein Frakturhämatom, welches die Entzündung einleitet [3]. Zunächst reagiert der Organismus auf ein Trauma mit dem Prozess der Hämostase. Thrombozyten aggregieren am verletzten Endothel und degranulieren bioaktive Substanzen wie z.B. TGF-Beta, wodurch Makrophagen, Monozyten und Fibroblasten in das Frakturgebiet einwandern [18]. Das intrinsische und das extrinsische Gerinnungssystem werden aktiviert und die Blutung durch ein Zusammenspiel von Fibrin und Thrombozyten gestoppt. Durch die Verletzung der zellulären Integrität sowie der humoralen und zellulären Gerinnung werden weitere Kaskaden wie das Komplementsystem aktiviert. Es kommt zur Freisetzung proteolytischer Enzyme, wodurch ein weiterer chemotaktischer Reiz für das Einwandern von Entzündungszellen in das Frakturgebiet gesetzt wird [18]. Granulozyten sind jene Zellen, die zuerst aus dem Blutstrom in das Wundgebiet gelangen [19], gefolgt von monozytären Phagozyten. Diese differenzieren sich dort zu Makrophagen [14], phagozytieren das nekrotische Material und räumen den Zelldetritus ab. Wong und Wahl betrachten Makrophagen als jene Zellen, die im Zentrum des Geschehens stehen [20] und mit deren Hilfe über 100 biologische Moleküle sezerniert werden können, darunter auch angiogene Peptide. Allerdings ist die Qualität dieses Prozesses abhängig von der vorhandenen Sauerstoffspannung und dem pH-Wert der Umgebung. So steigt die angiogene Potenz von Makrophagen, wenn Sauerstoffspannung und pH-Wert abnehmen. Sie erreicht ihr Maximum bei 15 mmHg und einem pH-Wert von 6,5 [21]. Eine Zunahme von Mesenchymzellen in Relation zu Entzündungszellen kennzeichnet den fließenden Übergang in die Proliferationsphase.

2.2.2 Proliferationsphase

Die Proliferationsphase – auch als Granulationsphase bezeichnet – beginnt beim Menschen etwa vier bis fünf Tage nach einer Fraktur und dauert in der Regel etwa

drei Wochen. In diesem Zeitraum wird durch das Wirken von Fibroblasten in Kombination mit einwandernden Angioblasten das erste Reparaturgewebe – das Granulationsgewebe – synthetisiert. Von den Frakturändern ausgehend wachsen periostal und endostal Kapillaren in das avaskuläre Gewebe ein und tragen so zur Oxygenierung des Gewebes bei [3, 14]. Zunächst verbinden sich Kollagenfibrillen und Bindegewebszellen in dieser Matrix in ungeordneter Form. Erst mit fortschreitender Wundheilung bilden sich Kollagenbündel heraus, die sich den mechanischen Krafftlinien entsprechend ausrichten. Es entsteht ein weicher Kallus, welcher die Frakturenden stabilisiert. Die zwei tragenden Pfeiler dieses Prozesses sind somit die Angiogenese und die Wiederherstellung des mesenchymalen Gewebes im Rahmen der Kallusbildung.

2.2.3 Intramembranöse Knochenbildung

In den ersten 7 bis 10 Tagen bildet sich in der Phase der intramembranösen Knochenbildung vom Periost ausgehend, eine Manschette aus Geflechtknochen um den Frakturspalt herum. Sie entsteht ohne die vorherige Anlage von Knorpelgewebe durch direkte, intramembranöse Ossifikation [22]. Hierbei differenzieren sich mesenchymale Stammzellen aus der inneren Schicht des Periostes zu Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten. Diese Zellen bilden um Zelleib und Fortsätze herum Osteoid. Dabei handelt es sich um die unverkalkte Knochengrundsubstanz, die hauptsächlich aus Kollagen-Typ I und Proteoglykanen besteht. Die Osteoblasten geben das Osteoid an den Extrazellulärraum ab. Die Zellen „mauern“ sich somit vollständig ein und differenzieren zu Osteozyten. Um die so entstandenen Osteozyten lagern sich weitere Osteoblasten ab und fördern ein appositionelles Wachstum mit konsekutiver Kallusbildung [22]. In der Regel kann die intramembranöse Kallusbildung den Frakturspalt nicht überbrücken. Sie benötigt als Voraussetzung eine gewisse mechanische Stabilität, die vorwiegend an den knochennahen Rändern der Frakturzone gegeben ist. Zur Überbrückung und nachfolgenden Verbindung der Fraktur ist die sog. chondrale oder enchondrale Knochenbildung nötig, die auch unter dem Einfluss von Scherkräften ablaufen kann.

2.2.4 Enchondrale Knochenbildung

Bei der enchondralen Ossifikation differenzieren Mesenchymzellen zu Chondroblasten, die zunächst die Matrix des künftigen Knochens aus Knorpel bilden [22]. Dieses findet vor allem entfernt von den Hauptfragmentenden, d.h. im Frakturspalt selbst und zentripetal an den Rändern des Kallus statt. Die

Chondrozyten hypertrophieren in der Folge. Weitere Schritte in diesem Prozess sind die Kalzifizierung der Zwischenzellsubstanz, der Abbau des Knorpelgewebes durch Chondroklasten und das Einwandern von Blutgefäßen und Osteoblasten. Es erfolgt die Neubildung des Geflechtknochens und der Umbau des „weichen Kallus“ bis der Frakturspalt vollständig knöchern überbrückt ist. Dieser Vorgang der Knochenbildung wird als „transchondrale Ossifikation“ bezeichnet. Zu diesem Zeitpunkt kann die Fraktur als stabil betrachtet werden und es schließt sich die Phase des Remodeling an [22].

2.2.5 Reifungs-oder Remodellingphase

Den Abschluss des Frakturheilungsprozesses bildet die Reifungs- oder Remodelingphase, die einen Zeitraum von mehreren Monaten und Jahren umfassen kann und mit der Wiederherstellung der ursprünglichen Struktur und Funktion des Knochens endet. Während dieser Phase wird die Kontinuität des Markraums wiederhergestellt und es erfolgt die Revaskularisierung der ehemaligen Frakturrenden [3].

Zunächst besteht der stabilisierende Kallus des frakturierten Knochens aus Knorpel und Geflechtknochen, in dem die Kollagenfibrillen ungeordnet und ohne Richtung abgelagert sind. In der Folge wird der knorpelige Kallus enchondral zu Geflechtknochen und dieser zu lamellärem Knochen umgebaut. Osteoklasten resorbieren in diesem Prozess den Knochen und bilden Resorptionskanäle, in welche Osteoblasten eindringen und damit die Struktur des lamellären Knochens wiederherstellen. Das Endresultat ist ein reifer Lamellenknochen, der entlang der Belastungslinien ausgerichtet ist und in seiner Morphologie keine Vernarbung aufweist [23].

2.3 Verzögerte Frakturheilung

Während der Frakturheilung können Störungen des Heilungsprozesses auftreten. Bleibt die knöchernende Konsolidierung einer Osteotomie oder eines gebrochenen Knochens nach Ablauf eines Zeitraums von 4-6 Monaten aus, handelt es sich um eine verzögerte Heilung (delayed union) [1]. Das Endergebnis des Heilungsprozesses ist jedoch noch nicht endgültig entschieden. Die Ursachen eines verzögerten Heilungsprozesses sind vielfältig. In der Literatur wird unterschieden zwischen lokalen und systemischen Faktoren [10, 24],.

2.3.1 Lokale Faktoren

Lokale Faktoren sind in ihren Wirkungen auf den Ort der Fraktur begrenzt. Für folgende lokale Faktoren sind Wirkungen hinsichtlich der Frakturkonsolidierung in der Literatur beschrieben:

Die Lokalisation der Fraktur beeinflusst die Frakturheilung. So ist z.B. die Tibia jener Knochen, der am häufigsten von Pseudoarthrose betroffen ist [25]. Durch die intakt gebliebene Fibula kommt es zu einem Scher- und Sperreffekt, der die Fixation des Kallus stört und damit die Frakturkonsolidierung inhibiert [16]. Ebenso von Bedeutung für den Heilungsprozess ist die Lokalisation der Fraktur direkt am Knochen. So heilen Radiusfrakturen besser, wenn sie distal lokalisiert sind, da in diesem Fall günstigere Durchblungsverhältnisse vorzufinden sind als sie z.B. am Schaft gegeben sind [10]. Die Art der Fraktur und das Ausmaß des Weichteilschadens sind weitere Determinanten lokaler Natur, die den Heilungsprozess beeinflussen. Ist die Kontinuität eines Knochens vollständig unterbrochen, sind die Frakturrenden gegeneinander verschoben oder liegt ein höhergradiger Weichteilschaden vor, so resultiert daraus eine gestörte Durchblutung des Gewebes, die eine Verzögerung der Knochenbruchheilung nach sich zieht [26]. Bei Mehrfragmentfrakturen ist das Ausmaß des Weichteil- und Periostschadens für die Frakturheilung entscheidend. In der Regel ist für die Verursachung von Mehrfragmentfrakturen eine hohe kinetische Energie nötig, die einen entsprechenden Weichteilschaden verursacht. Darüber hinaus gibt es geschlossene Mehrfragmentfrakturen, bei denen der Weichteilmantel weitgehend intakt bleibt. Bleiben dann die Fragmente periostiert, heilen diese Frakturen aufgrund ihrer großen osteogenen Oberfläche mit einer erheblichen Kallusbildung und z.T. sogar schneller als z.B. „glatte“ diaphysäre Frakturen. Die Durchblungsverhältnisse innerhalb eines Knochens sind ebenfalls entscheidend für die Frakturheilung [7, 8, 27]. In der Literatur wurden weitere Faktoren beschrieben, die den Fortschritt im Heilungsprozess in Abhängigkeit von Infektionen, nekrotischen Zuständen der Frakturrenden sowie malignen Prozessen beeinflussen [10]. Ebenso bedeutsam für die Frakturheilung ist die biomechanische Komponente [14]. So wird die Kallusformation durch die biomechanischen Rahmenbedingungen am Frakturspalt bestimmt und diese wiederum durch die Stabilität der Fixation [28]. Die Größe des externen mechanischen Stimulus bestimmt das Ausmaß der interfragmentären Bewegung. Diese sog. „Mikrobewegungen“ sind notwendig, um eine erfolgreiche Knochenbruchheilung zu gewährleisten. Tierexperimentelle und humane Messungen

zeigen, dass sich die interfragmentäre Bewegung multidirektional darstellt [22]. Die besten Heilungsergebnisse ließen sich bei einem initialen axialen Bewegungsausmaß von 0,2-1 mm für Spaltgrößen bis zu 3 mm erzielen [28]. Darüber hinaus stellten Schell et al. fest, dass in der initialen Phase der Frakturheilung auch Scherkräfte im Frakturspalt von Bedeutung sind [166]. Es wurde gezeigt, dass bei Scherbewegungen unter 0,8 mm in einem 3 mm Spalt bei moderater axialer Bewegung (~0,5 mm) noch eine optimale Frakturheilung gewährleistet wird [28].

2.3.2 Systemische Faktoren

Faktoren systemischer Natur sind hinsichtlich ihrer Entstehung und Auswirkung nicht ausschließlich auf die Fraktur beschränkt. So ist das Alter des Patienten eine systemische Größe, die Einfluss auf die Frakturheilung nimmt. Im Kindesalter laufen z.B. die Vorgänge der Chondro- und Osteogenese effizienter und schneller ab als mit zunehmendem Lebensalter [10]. Ebenso gehören Medikamente zur Gruppe der systemischen Faktoren, deren Gebrauch den Heilungsprozess erheblich beeinflussen kann. In der Literatur wird in diesem Zusammenhang auf die verzögernde Wirkung im Heilungsfortschritt infolge der Anwendung von nichtsteroidalen Antiphlogistika, Kortison, Zytostatika sowie Hormonen verwiesen [10]. Ein verminderter Calciumspiegel sowie ein Mangel an den Vitaminen C und D werden ebenfalls mit einer verzögerten Frakturheilung in Verbindung gebracht [27], ebenso chronischer Nikotinabusus, Diabetes mellitus sowie Alkoholismus.

2.4 Blutgefäßbildung

Die Blutgefäßbildung ist ein essentieller Prozess für die Wiederherstellung der Knochenarchitektur. Hinsichtlich der Gefäßentstehung werden folgende nicht streng voneinander getrennte, jedoch auf unterschiedliche Voraussetzungen basierende Systeme unterschieden:

- die Vaskulogenese
- die Arteriogenese
- die Angiogenese

Die Vaskulogenese beschreibt die embryonale Anlage und Bildung primitiver Blutgefäße, welche ursprünglich von mesodermalen Zellen abstammen und zunächst unter dem Einfluss von Fibroblast Growth Factor-2 (FGF2/bFGF) zu Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (VEGFR2) positiven Angioblasten

differenzieren (Abb.1). In der Folge vereinen sich die Angioblasten unter dem Einfluss von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) zu Tuben-ähnlichen Strukturen und bilden so das Grundgerüst embryonaler Blutgefäße. Wesentlich für die Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen ist zusätzlich die Aktivierung spezieller Oberflächenproteine, der Integrine [29].

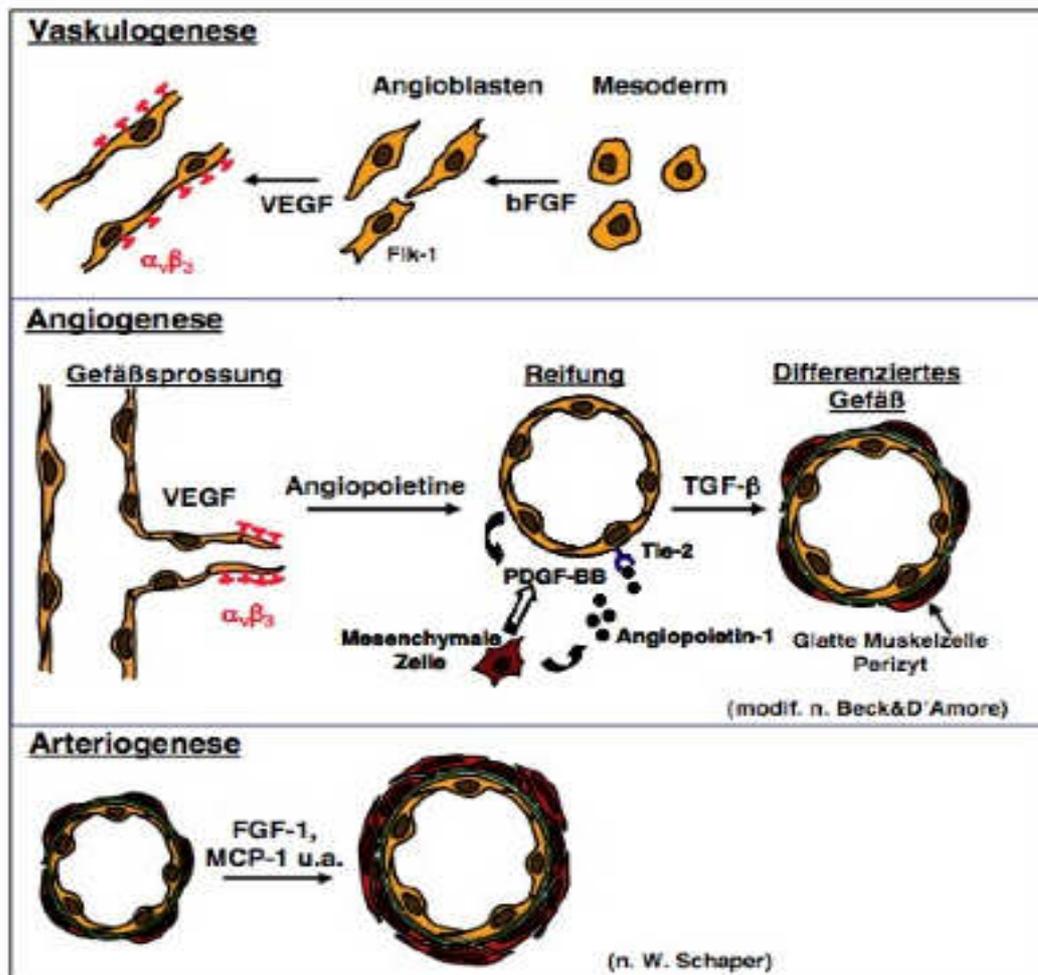


Abb.1 Schematische Abfolge der Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese

Die Arteriogenese bezeichnet das Wachstum prä-existenter Kollateralgefäße. Die flussabhängige Größenzunahme von vorhandenen Kollateralen ist ein wesentlicher Beitrag zur funktionellen Perfusionssteigerung ischämischer Gewebeareale [30].

Die Angiogenese beschreibt den komplexen Prozess der Bildung von Blutgefäßen aus bereits bestehenden Kapillaren [31]. Im Unterschied zur Vaskulogenese, die überwiegend im embryonalen Stadium [32, 33], in geringerem Maße auch in der postnatalen Phase [34] dominiert, ist die Angiogenese vor allem für die Regeneration des ausgereiften Knochens im Erwachsenenalter von Bedeutung. Unter dem Begriff der Angiogenese werden alle Schritte zusammengefasst, die zur Umbildung eines

einfachen Gefäßsystems in ein komplexes Netzwerk beitragen. Dies beinhaltet die Sprossung neuer Gefäße aus einem bestehenden und die Aufteilung eines Blutgefäßes in mehrere kleinere durch das Einfügen endothelialer Trennschichten. Der letztgenannte Vorgang wird als Intussuszeption bezeichnet [35, 36]. Angiogenese ist das Ergebnis eines geordneten Ablaufs bestimmter Ereignisse, die als angiogene Kaskade bezeichnet werden. Hierbei ist die Endothelzelle von zentraler Bedeutung, da nur diese Zelle in der Lage ist, eine Gefäßneubildung zu initiieren. Allerdings ist für den erfolgreichen Abschluss dieses Prozesses die Mitwirkung von periendothelialen Zellen (Perizyten) erforderlich. Diese Zellen werden für die Reifung eines Blutgefäßes benötigt [35].

Im Verlauf der angiogenen Kaskade kommt es nach Aktivierung der Endothelzellen in einem ersten Schritt zur Degradation der Basalmembran und interstitiellen Matrix durch Proteasen wie z.B. Matrix-Metalloproteinasen (MMP). Es schließen sich Migration und Proliferation der Endothelzellen in Richtung des angiogenen Stimulus an. Schließlich organisieren sich die Endothelzellen zu tubulären Strukturen und bilden neue Gefäße mit Lumen. Die Stabilisierung der neu gebildeten Gefäße erfolgt durch die Rekonstruktion der Basalmembran sowie bei den meisten Gefäßen durch die Anlagerung von Perizyten. Diese neu gebildeten Gefäße fusionieren und es entsteht einkontinuierliches System [30, 37].

Die Fraktur eines langen Röhrenknochens ist zwingend mit dem Zerreißen eines Teils des Blutgefäßsystems des Knochens verbunden, was sich aus der Morphologie des Gefäßsystems eines Knochens ableiten lässt. Die Wiederherstellung des Gefäßsystems erfolgt in den ersten Tagen nach dem Eintreten einer Fraktur und ist an die zellbiologischen Abläufe der Angiogenese gebunden. Vom Periost und den umgebenden Weichteilen ausgehend, entwickelt sich ein dichtes Geflecht an Gefäßen, welches sich strahlenförmig zum Frakturspalt hin orientiert [38]. Dabei kommt es zur Ausbildung von Anastomosen zwischen medullären und periostalen Gefäßen über den Frakturspalt hinweg. Die periostalen Gefäße versorgen jedoch nur den Frakturkallus und tragen nicht direkt zur Revaskularisierung bei. Der Frakturkallus fungiert als Stabilisator der Fraktur und garantiert eine ungestörte Entwicklung der Markraumarterien [38]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Angiogenese der grundlegende Prozess der Knochenheilung ist [7, 8], was sich auch im Ergebnis weiterer Studien zu diesem Schwerpunkt bestätigt hat. So wurde u.a. gezeigt, dass die Vaskularisierung des Knorpels während der

enchondralen Knochenheilung für die Apoptose hypertropher Chondrozyten und die Mineralisierung der Matrix [27] von Bedeutung ist. Eine unzureichende Vaskularisierung des Knochens ist demnach mit einer verminderten Knochenneubildung und Knochenmasse assoziiert [7]. Im Rahmen einer weiteren Studie gelang es, die Angiogenese während einer Frakturheilung im Tiermodell zu inhibieren und damit eine atrophe Pseudarthrose zu induzieren [39].

Bereits im Jahr 1963 wurde die Existenz angiogener Faktoren im Frakturgebiet von Trueta postuliert [40]. Im Ergebnis von Forschungsarbeiten, insbesondere in den vergangenen 20 Jahren, wurden zahlreiche Faktoren und Rezeptoren analysiert, die den Prozess der Angiogenese und damit die Frakturheilung wesentlich beeinflussen. Die Angiogenese wird kontrolliert über Signalkaskaden („pathways“), zum einen über den VEGF-pathway und zum anderen über den Angiopoietin-pathway [10, 41, 42], wobei letzterer als der essentiellere betrachtet wird.

2.4.1 Vascular Endothelial Growth Factor-A₁₆₅ – (VEGFA₁₆₅)

Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 – (VEGFR2)

VEGFA₁₆₅ ist ein 34-45 kDa Glykoprotein, das von Thrombozyten, Monozyten [43], Chondrozyten, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten und Osteoklasten [44] exprimiert wird. Es gehört zur Familie der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren, welche aus sieben verschiedenen Proteinen VEGFA – VEGFE, Phosphatidylinositol Glycananchor Biosynthesis Class F (PIGF), sowie Endocrine Gland Derived Vascular Endothelial Growth Factor (EG-VEGF) besteht [45]. VEGFA₁₆₅ gehört zur Untergruppe der VEGFA, welche sich aus vier verschiedenen Transkripten zusammensetzt. Durch alternatives Spleißen entstehen VEGFA₁₆₅, VEGFA₁₂₁, VEGFA₁₈₉ und VEGFA₂₀₅ [46, 47]. VEGF wurde erstmalig im Jahr 1983 als Vascular Permeability Factor (VPF) erklärt und im Jahr 1989 endgültig entdeckt und beschrieben [48, 49]. Zwar wird VEGF in geringen Mengen im menschlichen Gewebe produziert, die Expression an VEGFA₁₆₅ in größerem Umfang erfolgt jedoch vorwiegend in den Gewebestrukturen, wo Angiogenese zur Wirkung kommt. Als Beispiel sind hier die weiblichen Reproduktionsorgane, fötales Gewebe sowie zahlreiche Tumore zu nennen [46]. VEGFA₁₆₅ bindet an drei bekannte Rezeptoren auf der Zellmembran. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um die Tyrosinkinasen Flt-1 (VEGFR1) [50], KDR/Flk1 (VEGFR2) [51] sowie Flt4 (VEGFR3) [52].

In Zusammenhang mit der Wund- und Knochenheilung sind jedoch VEGFR1 und VEGFR2 eher von Bedeutung, da sie auf ruhenden Endothelzellen, Makrophagen,

Monozyten und glatten Muskelzellen exprimiert werden [53, 54]. Der Faktor VEGFR3 ist dagegen wichtig für die Lymphangiogenese [55]. VEGFA₁₆₅ ist relativ spezifisch für Endothelzellen [56] und interagiert mit zwei der o.g. Rezeptoren, mit VEGFR1 und VEGFR2. VEGFA₁₆₅ vermittelt Angiogenese hauptsächlich über die Bindung an VEGFR2. Im Gegensatz dazu wird angenommen, dass VEGFR1 die Aktivität des VEGF beeinträchtigt, indem es die Bindung mit dem VEGFR2 inhibiert [57]. *In vitro* Studien dokumentieren die Fähigkeit von VEGFA₁₆₅, die Entwicklung, Teilung und Migration von Endothelzellen aus bestehendem Endothel zu stimulieren [58]. Andere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass das Frakturhämatom angiogene Aktivität besitzt, was vorrangig auf das Vorhandensein von VEGFA₁₆₅ zurückzuführen ist [59]. Im Frakturkallus folgt die Expression von VEGF dem während der Knochenentwicklung vorhandenen örtlichen und zeitlichen Muster [60]. In weiteren Untersuchungen konnte die Wirkung des VEGF-Rezeptors gezeigt werden. Bei einem geblockten VEGF-Rezeptor wurde sowohl die Gefäßeinsprossung als auch die Knorpel-Knochenbildung supprimiert [7]. Nach Abschluss der Behandlung mit VEGF-Rezeptorblockern wurde in der Folge wieder eine Kapillareinsprossung und Knorpel-Knochenwachstum beobachtet.

Wie in einem Frakturmodell gezeigt wurde, kann neben der Blockierung des Rezeptors auch die direkte Inhibition von VEGFA₁₆₅ während der intramembranösen und enchondralen Ossifikation zur Ausprägung von Non-Union ähnlichem Gewebe führen [41, 61, 62]. Dagegen stimuliert die externe Gabe von VEGFA₁₆₅ die Knochenbildung, sowohl die enchondrale als auch die intramembranöse [63]. Zusammenfassend lässt sich aus diesen Studien ableiten, dass VEGFA₁₆₅ als wesentliches Element der Angiogenese und damit auch der Frakturheilung zu werten ist. Allerdings ist in diesem Zusammenhang die Wechselwirkung zwischen Rezeptorblockern und anderen osteoinduktiven und angiogenen Molekülen zu betrachten. So konnten Yeh und Lee sowie Deckers et al. zeigen, dass Bone Morphogenetic Proteins (BMP) die Expression von VEGFA und seinen Rezeptoren beeinflussen [64, 65]. Auch Angiopoietine sind Moleküle, die mit VEGFA interagieren.

2.4.2 Angiopoietine – (ANG)

Angiopoietine sind ~70 kDa (Dalton) schwere Liganden für den Tyrosin-Kinase Rezeptor Tunica Interna Endothelial Kinase-2 (TIE2). Angiopoietine werden unterteilt in:

- Angiopoietin-1 (ANG1)
- Angiopoietin-2 (ANG2)
- Angiopoietin-3 (ANG3)
- Angiopoietin-4 (ANG4)

Aufgrund ihrer Bedeutung für die Angiogenese liegt der Fokus auf ANG1 und ANG2. Als primärer Agonist bindet das Angiopoietin-1 zunächst an den TIE2 Rezeptor. Es erfolgt eine Dimerisierung des Rezeptors mit nachfolgender Aktivierung der Kinase-Untereinheit sowie einer Autophosphorylierung von Tyrosinresten [66]. Die phosphorylierte Seite wird nunmehr zur Bindungsstelle für einige Effektormoleküle, die in der Folge eine Signalkaskade induzieren und somit zu einer Antwort auf zellulärer Ebene beitragen.

Für ANG1 sind folgende Effekte gezeigt worden:

- *In vitro* stimuliert ANG1 die Aussprossung und Formation von Endothelzellen aus vorhandenem Kapillarendothel [67].
- ANG1 induziert eine Zunahme von Umfang und Stabilität des Endothels [66, 68].
- ANG1 gilt auch als Reifungsfaktor, der mit der Rekrutierung von Perizyten sowie der Vermittlung zwischen Endothel und umgebender Matrix regulierend und stabilisierend wirkt [66].
- Hypoxie, Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) und VEGF führen zu einer gesteigerten ANG1 Synthese [69, 70, 71].

ANG2 gehört ebenfalls zur Familie der Angiopoietine. Es stellt den natürlichen Antagonisten des ANG1 dar.

ANG2 – ein Glykoprotein – bindet ebenfalls an den TIE2 Rezeptor und verhindert die Effekte des ANG1 bezüglich der TIE2 Phosphorylierung [52]. Ferner führt ANG2 zu einer Gefäßdestabilisierung, wenn VEGF inhibiert ist [52]. Es unterstützt mit aktiviertem VEGF eine rapide Zunahme des Kapillardurchmessers, das Remodeling der Basallamina und die Endothelzellproliferation und -migration [37].

2.4.3 Tunica Interna Endothelial Kinase 2 – (TIE2)

TIE2 ist ein 140 kD Tyrosin Kinase Rezeptor mit einer Immunglobulin und Epidermal Growth Factor (EGF) homologen Domäne-2, die eine unabhängig gefaltete Teilstruktur des Proteins ist. Der Rezeptor durchspannt die Zellmembran. Auf der extrazellulären Seite besitzt der Rezeptor zwei verschiedene Domänen, einerseits die EGF-Domäne und andererseits die Immunglobulin-like Domäne. Letztere umgibt

die Bindungsstelle für das Angiopoietin. Bindet ein ANG1 Molekül an diesen Rezeptor, kommt es auf der zytoplasmatischen Seite zu einer Autophosphorylierung mit konsekutiver Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren. Bei diesen Faktoren handelt es sich um New-Ets related Factor-2 (NERF2) und E74-Like Factor-1 (ELF1), welche die Transkription von Genen der Angiogenese induzieren [68, 69]. Im Jahr 1992 wurde dieses Molekül als ein endothelspezifischer Rezeptor entdeckt [72, 73, 74]. Jedoch wurde dieser Rezeptor ebenfalls auf anderen Zellentypen, wie zum Beispiel Karzinomzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Granulozyten, Monozyten, Ganglionzellen, Neuronen und Gliazellen nachgewiesen [75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82].

2.4.4 Cysteine-Rich Protein-61 – (CYR61)

Das Cysteinreiche Protein 61 ist ein extrazelluläres, matrixassoziiertes, angiogenes Protein der CCN-Familie [83, 84, 85, 86], das *in vivo* die Angiogenese induzieren kann [87, 88]. CYR61 unterstützt Zelladhäsion, stimuliert Endothelzell-Migration und ist in der Lage, *in vitro* die durch Wachstumsfaktoren induzierte Zellproliferation anzuregen [56]. Die Expression von CYR61 ist mit der Herausbildung des kardiovaskulären und Skelettsystems während der Embryonalentwicklung assoziiert [89, 90]. Dies bestätigte auch ein Versuch mit CYR61 Knockout Mäusen, die nicht lebensfähig waren, weil infolge des Fehlens dieses Proteins die Angiogenese in der Plazenta insuffizient verlief [91]. Sowohl im Ratten- als auch im Schafmodell konnte gezeigt werden, dass die Expression von CYR61 während der frühen Phase der Frakturheilung hochreguliert ist [92, 93]. Darüber hinaus führten *in vitro* Studien zu der Erkenntnis, dass CYR61 die Proliferation von mesenchymalen Stammzellen, Osteoblasten und Endothelzellen stimuliert [94] und die CYR61-Expression von mesenchymalen Stammzellen während ihrer Differenzierung deutlich abnimmt [95]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CYR61 auch mit anderen angiogenen Faktoren interagiert. So führten Chen et al. aus, dass CYR61 auf genregulatorischer Ebene die Expression von VEGF zu steigern vermag [96]. CYR61 ist jedoch nicht nur für die Angiogenese von großer Bedeutung, sondern es wirkt auch stimulierend auf die Chondrogenese. So haben Hadjiargyrou et al. festgestellt, dass die höchste Expression von CYR61 mit der Chondrogenese im Frakturkallus korreliert [92]. Lienau et al. untersuchten darüber hinaus den Einfluss mechanischer Faktoren auf die CYR61 Expression. Sie konnten zeigen, dass unter der Heilung mit einer semirigidem Fixation in der Frühphase der Frakturheilung sowohl eine

reduzierte CYR61 Expression als auch eine verminderte Vaskularisierung zu verzeichnen war [93]. Als Fazit ergibt sich, dass CYR61 sowohl einen angiogenen Faktor als auch einen chondrogenen Faktor darstellt. Dies mag im ersten Moment widersprüchlich klingen, da Knorpel vorwiegend ein avaskuläres Gewebe darstellt. Jedoch ist die Angiogenese ein zentrales Ereignis in der enchondralen Ossifikation.

2.4.5 Tumor-Necrosis-Factor- α – (TNF α)

TNF α ist ein 26 kDa schweres Zytokin des Immunsystems, welches von Makrophagen bei einer lokalen und systemischen Immunantwort ausgeschüttet wird [97]. Da es sich bei der Frakturheilung ebenfalls um eine Art der Wundheilung handelt, ist die Expression von TNF α im Zusammenhang mit anderen angiogenen Faktoren, sowie seine direkte Wirkung auf die Angiogenese von besonderem Interesse. Folgende Untersuchungsergebnisse sind hierzu in der Literatur dargestellt. TNF α stimuliert die Angiogenese *in vivo* [98], unterstützt die Zellformation von neuen Endothelzellen *in vitro* [99] und inhibiert das endotheliale Zellwachstum [98, 100]. Darüber hinaus ist der Einfluss sowohl als Regulator auf das Remodelling während der Frakturheilung als auch auf die Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung bekannt [101]. Bei ausgewählten Pathologien des Skelettsystems wie Osteoporose und rheumatoider Arthritis sind Veränderungen der Expression von TNF α beschrieben worden [101, 102, 103]. Die Expression von TNF α in einem vergleichenden Mausmodell zwischen einem Maustyp mit insuffizientem TNF α Rezeptor und einem Wildtyp gab Aufschluss über seine Auswirkung auf weitere osteoinduktive und angiogene Faktoren. So konnte eine verminderte Expression von MMP 2, 9, 13, 14 auf RNA-Ebene in der Abwesenheit von TNF α gezeigt werden [104]. Des Weiteren wurde eine verminderte Expression der Angiopoietine und seiner Rezeptoren in der Abwesenheit von TNF α festgestellt, wohingegen die Expression von VEGF und seinen Rezeptoren unverändert blieb [104]. Diese Studie zeigt weiter, dass TNF α einen großen Einfluss auf die enchondrale Knochenheilung hat, indem es die Expression von spezifischen Endothelzellmediatoren und Matrix-Metalloproteinasen reguliert [104].

2.4.6 Matrix-Metalloproteinase-2 /Gelatinase-A – (MMP2)

Tissue Inhibitor of Matrix -Metalloproteinases-1 – (TIMP1)

Tissue Inhibitor of Matrix-Metalloproteinases-3 – (TIMP3)

Der schnelle Abbau bzw. Umbau der extrazellulären Matrix (EZM) ist einer der wichtigsten Schritte während der Frakturheilung. Dieser Prozess ist essentiell für die Knochenneubildung [11] und wird hauptsächlich enzymatisch über die Matrix-Metalloproteinasen (MMP) reguliert. MMP sind Zink-abhängige Proteasen, die in der Lage sind, EZM-Moleküle wie Kollagen, Aggrecan und Elastin enzymatisch zu spalten [105, 106]. Sie werden in vier Gruppen unterteilt:

- Kollagenasen
- Gelatinasen
- Stromelysine
- membranassoziierte MMP (MT-MMP) [107].

Als proteolytische Enzyme [108] mit einem pH-Optimum im neutralen Bereich [109], nehmen sie sowohl am physiologischen als auch am pathologischen Knorpelumsatz teil, indem sie die extrazelluläre Matrix abbauen [110]. MMP2 ist eine Gelatinase und wird in Fibroblasten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert. MMP2 ist in der Lage, Kollagen Typ IV, Elastin und Fibronectin zu denaturieren [110]. Bedeutsamer scheint jedoch zu sein, dass MMP2 auch von Endothelzellen exprimiert wird und somit den Prozess der Angiogenese beeinflusst [112, 113]. Itoh et al. konnten zeigen, dass sich in Gelatinase-A defizienten Mäusen eine verminderte Angiogenese ereignete [107]. Obwohl MMP2 in der enchondralen Ossifikation keine signifikante Rolle zu spielen scheint, ist es jedoch in die intramembranöse Knochenbildung involviert [114].

Die Matrix-Metalloproteinasen werden als inaktive Proformen (Zymogene) gebildet. Ihre Ausschüttung wird bestimmt durch die aktuelle Konzentration sowie durch ihre endogenen Inhibitoren. Bisher wurden vier spezifische Inhibitoren der MMP beschrieben, die zur Familie der Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinases (TIMP1-4) [115] gehören. TIMP1 ist ein ca. 28 kDa großer löslicher Faktor, der in der Lage ist, verschiedene membrangebundene MMP und MMP19 schwach zu inhibieren [116]. Darüber hinaus wird durch TIMP1 eine weitere Gruppe von Proteasen inhibiert, die an der Synthese und der Degradation der EZM beteiligt sind. Hierbei handelt es sich um die a Disintegrin and Metalloproteinase Domain with Thrombospondin Motifs (ADAMTS). TIMP1 inhibiert ADAMTS10 [116]. Des Weiteren

konnten Sobue et al. zeigen, dass TIMP1 die Knochenresorption durch Osteoklasten stimuliert [117]. TIMP3 gehört ebenfalls zur TIMP-Familie und unterscheidet sich von den anderen Molekülen dadurch, dass es sich an EZM binden kann [116]. Auch dieses Protein ist in der Lage, einige Vertreter der ADAMTS-Familie zu inhibieren und damit auf den Stoffwechsel der EZM einzuwirken [116]. TIMP3 wirkt sich aber auch direkt auf die Angiogenese aus. So konnten Qi et al. zeigen, dass TIMP3 die Affinität von VEGF zu seinem Rezeptor VEGFR1/KDR abschwächt und damit die Rezeptor-Ligand Verbindung blockiert [117]. MMP und TIMP sind ein fein justiertes System und essentiell für eine regulierte Proteaseaktivität [100]. Eine spezifische Verbindung konnte bis jetzt nur für TIMP3 und MMP2 gezeigt werden [116]. So ist TIMP3 notwendig, um das Zymogen von MMP2 (pro-MMP2) zu aktivieren [118, 116]. TIMP1 hingegen ist notwendig, um das Zymogen von MMP9 (pro-MMP9) zu aktivieren [116]. Henle et al. konnten in einer vergleichenden Studie zeigen, dass die TIMP1 Expression im Serum von Patienten, die eine Non-Union nach chirurgischer Intervention entwickelten, geringer ausfiel als bei Patienten mit einer regelrechten Frakturkonsolidierung [111]. In einer weiteren Studie konnten Lehmann et al. darstellen, dass in $TNF\alpha$ insuffizienten Mäusen eine verzögerte Frakturheilung mit einer geringeren Expression von TIMP und MMP2, MMP9 und MMP14 Genen einherging [104].

2.4.7 Basic Fibroblast Growth Factor – (bFGF/FGF2)

FGF2 gehört zur Familie der Wachstumsfaktoren. Diese Proteine sind zum größten Teil im Zytoplasma oder in der EZM [119, 120] an Glykosaminoglykan-Heparinrezeptoren gebunden und in der Lage, in den Prozess der Angiogenese sowie der Mitogenese von Mesenchymzellen einzugreifen [121, 122, 123]. So stimuliert FGF2 die Endothelzellproliferation [124] und –migration [125] ebenso wie die durch die Endothelzellen vermittelte Produktion von Plasminogen und Kollagenase [126]. *In vivo* scheint FGF2 nicht die elementare Stellung in der Angiogenese einzunehmen, da FGF2 Knock out Mäuse eine normale Gefäßentwicklung aufwiesen [127]. Jedoch zeigten diese Tiere eine verzögerte Wundheilung [127], was die Schlussfolgerung zulässt, dass FGF2 vor allem dann freigesetzt wird, wenn es durch ein Trauma zu einer Gefäßruptur mit Zerstörung von umliegenden Zellen und Gewebe gekommen ist. Offenbar hat dieses Protein in der frühen Phase der Frakturheilung einen elementaren Einfluss auf das Remodeling von Blutgefäßen und dem umliegenden Gewebe. Auf Grund seiner Bedeutung für die

Angiogenese sowie für die Osteoblasten- und Chondrozytenaktivierung, gab es Untersuchungen, wie durch gezielte Verabreichung von FGF2 die Frakturheilung unterstützt werden kann [128]. Kato et al. analysierten die Effekte einer einfachen Injektion von rekombinantem FGF2 bei Hasen mit segmentalen Knochendefekten der Tibia. Es zeigte sich, dass die Knochenbildung und die Mineralisation erhöht waren im Vergleich zu einer Kontrollgruppe [129]. Nakamura et al. stellten in einer ähnlichen Studie eine beschleunigte Frakturheilung durch Applikation von rekombinantem FGF2 im Hundemodell fest [130].

2.4.8 Insulin-Like Growth Factors/Somatomedin-C – (IGF1)

Unter der Einwirkung des Wachstumshormons Growth hormone (GH), welches aus dem Hypophysenvorderlappen freigesetzt wird, werden in der Leber IGF1 und IGF2 gebildet [131]. Darüber hinaus haben auch andere Zellen Rezeptoren für GH wie z.B. Chondrozyten [132] und Osteoblasten [133], welche IGF1 als Antwort auf das Wachstumshormon produzieren [134]. IGF1 wird als endokriner Faktor betrachtet, der die Effekte des GH in den Zielzellen vermittelt. Zu diesen Effekten gehören die Unterstützung von Zellwachstum, der Aufbau einer anabolen Stoffwechsellage, die Insulinfreisetzung sowie die Inhibierung von Apoptose [135]. Aber auch in der Entzündungsphase scheint IGF1 eine wichtige Stellung einzunehmen. So konnten DiCesare et al. eine verminderte IGF1 mRNA im Knochen nachweisen, nachdem sie Indomethacin, einen Cyclooxygenase-Hemmer, appliziert hatten [131]. Diesen Ansatz bestätigten Fournier et al. durch den Nachweis einer erhöhten IGF1 Produktion in Makrophagen infolge des Wirkens proinflammatorischer Mediatoren wie $TNF\alpha$ und Prostaglandin-E2 [136]. Da IGF1 die Produktion von NO (Nitric oxide) aus den Endothelzellen induzieren kann, nimmt es Einfluss auf die Vasodilatation während der Entzündungsphase [137]. Im Blut zirkuliert IGF1 in einem hochmolekularen Komplex mit einem Insulin-like growth factor binding protein (hauptsächlich IGFBP3) und der acid labile subunit (ALS) [138], wodurch die Halbwertszeit von IGF1 verlängert wird [139]. Im menschlichen Knochen ist IGF2 zwar stärker vertreten als IGF1, jedoch ist letzterer der potentere Wachstumsfaktor und wurde sowohl im Rattenmodell als auch im Menschen während einer Frakturheilung identifiziert [140, 141]. Des Weiteren wurde eine Herunterregulierung von IGF1 sowohl systemisch als auch lokal in Patienten gefunden, welche unter osteoporotischen Frakturen litten [142, 143].

2.4.9 Inducible Nitric Oxide Synthase – (iNOS/NOS2)

Stickstoffmonoxid NO wird durch NO-Synthasen (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff hergestellt. Es handelt sich hierbei um einen Neurotransmitter, welcher im Endothel gebildet wird und in der darunterliegenden Muskelschicht eine Erschlaffung auslöst [144]. Es werden calciumabhängige Synthasen wie constitutively expressed Nitric Oxide Synthase (cNOS), endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) und calciumunabhängige Synthasen wie inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) als Isoformen der NOS unterschieden [145]. Diverse Stimulatoren, wie inflammatorische Zytokine oder (Lipopolysaccharide) LPS, vermögen die Expression von iNOS zu induzieren und dadurch eine größere Menge an NO freizusetzen [146, 147].

Einige Studien deuten daraufhin, dass iNOS ebenfalls von Bedeutung ist für die Wundheilung [148, 149, 150, 151]. Baldik et al. vermuten, dass iNOS in der initialen Entzündungsphase einer Frakturheilung eine wichtige Stellung einnimmt [145]. Sie konnten im Rattenmodell feststellen, dass im unfrakturierten Modell keine mRNA von iNOS nachzuweisen war. Im frakturierten Modell hingegen stellte sich eine erhöhte Expression der iNOS mRNA bis Tag 4 und 7 dar, welche dann kontinuierlich bis Tag 14 abfiel [145]. Yamasaki et al. konnten eine verspätete Wundheilung in iNOS defizienten Mäusen zeigen und dieselbige nach einer Applikation eines adenoviralen Vektors, welcher iNOS cDNA enthielt, rückgängig machen [151]. Diwan et al. fanden heraus, dass bei einer kompetitiven Inhibition von iNOS eine Frakturheilung verhindert wird und durch eine gezielte Gabe von NO dieser Effekt rückgängig gemacht werden kann [152].

2.4.10 Platelet Derived Growth Factor – (PDGF)

Die Familie der Platelet Derived Growth Factor (PDGF) setzt sich aus PDGFA, PDGFB, PDGFC und PDGFD zusammen, welche Homodimere (PDGFAA, PDGFBB, PDGFCC, PDGFDD) oder Heterodimere (PDGFAB) bilden [153]. Diese Faktoren werden aus Thrombozyten in Form von Granula freigesetzt und stimulieren offenbar in der Entzündungsphase neutrophile Granulozyten und Makrophagen zur Freisetzung der Granula [154]. Darüber hinaus werden diese Faktoren von reifen Chondrozyten [155], Fibroblasten und Endothelzellen [156] exprimiert, die in der Lage sind, die Kollagensynthese zu stimulieren [157]. PDGF teilt eine strukturelle Ähnlichkeit mit VEGF, was eine Bedeutung für die Angiogenese vermuten lässt [158]. Unter hypoxischen Bedingungen konnte bereits gezeigt werden, dass

PDGF über die Stimulation von HIF1 α zur erhöhten Expression von VEGF beitragen kann [155]. PDGF steigert aber auch die Expression von Cyr61 [92]. Ein Anstieg der Genexpression von PDGF wurde während einer Frakturheilung im Menschen *in vivo* nachgewiesen [160]. Nash et al. konnten darüber hinaus bei der Knochenheilung im Hasenmodell positive Effekte erzielen, indem sie PDGF lokal applizierten [161]. PDGF scheint aber auch ein Indikator für eine verzögerte Frakturheilung darzustellen [162]. Zimmermann et al. konnten zeigen, dass bis zu vier Wochen nach einer Fraktur die PDGF Konzentration im Serum ansteigt und dass eine verminderte Expression innerhalb dieser vier Wochen die Frakturheilung verzögert [162]. Des Weiteren vermuten Zimmermann et al., dass PDGF und Transforming Growth Factor beta 1 (TGF β 1) einer simultanen Regulation unterliegen, da beide Faktoren in der verzögerten Frakturheilung zum gleichen Zeitpunkt signifikant geringer exprimiert werden [162].

2.4.11 Hypoxia-Inducible Factor-1 α – (HIF1 α)

HIF ist ein Transkriptionsfaktor, der als Heterodimer sowohl aus einer α - als auch aus einer β -Untereinheit besteht. Beide Untereinheiten werden konstant synthetisiert, die Stabilität des HIF1 α -Proteins ist jedoch abhängig vom O₂-Partialdruck. Bei höherem O₂-Partialdruck wird HIF1 α durch eine O₂-abhängige Prolinhydroxylase hydroxyliert. Es erfolgt eine Verbindung des HIF1 α -Produktes mit Ubiquitin, woraus der Abbau im Proteasom resultiert. Bei einem sinkenden O₂-Partialdruck nimmt die Markierung von HIF1 α durch Ubiquitin jedoch ab und die Konzentration von HIF1 α in der Zelle steigt an, woraus eine erhöhte Transkriptionsrate des Erythropoetin-Gens (EPO) ergibt [163]. Der Mechanismus der O₂-abhängigen HIF-Bildung dient den Zellen zum Schutz vor Sauerstoffmangelzuständen. Die Zielgene von HIF1 α bzw. deren Proteinprodukte und die daraus resultierenden Funktionen sind vielfältig. Zu den wichtigen Zielgenen von HIF1 α – diese Arbeit betreffend – gehören VEGF, TNF α , iNOS und MMP2 [164, 165]. Dadurch induziert HIF1 α Stoffwechsellzyme der anaeroben Glykolyse, des Gefäßwachstums und der Vasodilatation [163, 164]. Komatsu et al. konnten im Rahmen einer Untersuchung zur Frakturheilung im Rattenmodell feststellen, dass ab dem dritten Tag post Trauma erstmalig die mRNA Synthese von HIF1 α nachzuweisen war und diese ihren Peak am zehnten Tag erreichte [164].

2.4.12 Von Willebrand Faktor – (vWF)

Benannt nach dem Helsinkier Internisten Erik von Willebrand, stellt das von Megakaryozyten und Endothelzellen produzierte Protein einen zentralen Faktor bei der Thrombozyten-Adhäsion dar [166]. In den Endothelzellen gebildeter vWF wird im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und nach dem Weitertransport im Golgi-Apparat zu größeren vWF-Multimeren zusammengefasst [163]. Der vWF wird entweder ins Blut abgegeben oder in der Endothelzelle in Weibel-Palade-Körpern gespeichert [163]. Im Plasma liegen die vWF-Multimere an Gerinnungsfaktor VIII gebunden vor und sind somit vor dem Abbau durch Proteasen geschützt. Erst im Jahre 2001 konnte die Protease identifiziert werden, die zur Spaltung dieses Komplexes entscheidend beiträgt und damit den vWF biologisch aktiv werden lässt. Bei dieser Protease handelt es sich um ADAMTS13 [167, 168]. In den Thrombozyten befinden sich ca. 10 % des Körperbestandes an vWF, welche nach deren Aktivierung freigesetzt werden [163].

Durch die bei einer Fraktur auftretende Gefäßzerstörung erfolgt eine Bindung des im Blut zirkulierenden vWF an die subendotheliale Matrix sowie an Kollagen I und III [166], wodurch es den Thrombozyten möglich ist, sich an der Stelle des Defektes zu binden und die Gerinnungskaskade zu induzieren.

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Studie soll der vWF als Marker für die vorhandenen Endothelzellen gelten.

2.5 Tiermodell

Für diese Untersuchung wurde das Schaf als Tiermodell gewählt. In der traumatologischen Forschung wird das Schaf vor allem deshalb als Versuchstier eingesetzt, weil die Knochenanatomie der Hintergliedmaßen der des Menschen ähnlich ist [172, 173]. Studien belegen, dass die Dynamik der Knochendefektheilung und die Übertragbarkeit von Untersuchungsergebnissen auf den Menschen am besten bei Versuchen mit Schafen gegeben ist [156]. Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass Schafe nach einem operativen Eingriff schnell wieder alle Gliedmaßen voll belasten können [175]. Der Frakturheilungsprozess – wissenschaftlich untersucht anhand des Schafmodells – ist in der Literatur bereits ausführlich beschrieben und deshalb konnte in diesem Untersuchungsrahmen auf eine breite Erkenntnisbasis zurückgegriffen werden [45, 93, 172].

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

72 Schafe wurden randomisiert in zwei Gruppen zu je 36 Tiere eingeteilt. Alle Tiere erhielten eine standardisierte Osteotomie der rechten Tibiadiaphyse, welche in der Folge mit einem monolateralen externen Fixateur stabilisiert wurde. Im Unterschied zu den Tieren der Gruppe 1, die einen rigiden Fixateur externe erhielten, wurden die Tiere der Gruppe 2 jedoch mit einem mechanisch-kritischen Fixateur externe mit hoher Rotationsinstabilität versehen (Abb. 3), welcher zu einer mehr als 10-fach höheren interfragmentären Bewegung in der ersten postoperativen Woche im Vergleich zur Gruppe 1 führte. Beobachtungszeitpunkte waren 7, 9, 11, 14, 28, 42 Tage nach dem operativen Eingriff, zu denen jeweils das Hämatom/Kallusgewebe direkt bzw. postmortem gewonnen und anschließend für die RNA-Isolierung aufbereitet wurde. Das Reparationsgewebe/Kallusgewebe wurde auf die Expression folgender angiogener Faktoren untersucht:

- CYR61
- VEGF
- VEGFR2
- ANG1
- ANG2
- TIE2
- MMP2
- TIMP1
- TIMP3
- vWF
- FGF2
- PDGF
- TNF α
- IGF1
- HIF1 α
- iNOS

3.2 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um ausgewachsene ca. 2,5 Jahre alte, gesunde weibliche Merinomix-Schafe (Abb.2) Vor Versuchsbeginn wurden alle Schafe einer Eingangsuntersuchung hinsichtlich ihres Gesundheitszustandes unterzogen, um zu gewährleisten, dass nur gesunde Tiere in die Untersuchung einbezogen werden. Alle Tiere wurden nach den geltenden Tierschutzbestimmungen an der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) des Campus Virchow-Klinikum der Charité Berlin gehalten. Die Studie wurde durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin überwacht und genehmigt, (Genehmigungsnummer 0172-04).



Abb.2 Schafmodell mit Fixateur

3.3 Fixateur externe

Während der Operation wurde den Tieren jeweils ein rigider Fixateur externe oder ein sog. kritischer Fixateur externe angelegt (Abb.3). Der monolaterale rigide Fixateur bestand jeweils aus sechs Schanzschrauben (\varnothing 5mm, Synthes, Bochum, Deutschland) und zwei Karbonstangen (\varnothing 10mm, Synthes, Bochum, Deutschland), die untereinander mit zwölf Klemmböcken verbunden waren. Der Abstand zwischen den einzelnen Schrauben betrug 21 mm-34 mm-30 mm-34 mm-21 mm. Die Distanz zwischen Hautoberfläche und innerer Karbonstange wurde mit 15 mm bemessen. Der monolaterale kritische Fixateur externe bestand ebenfalls aus sechs Schanzschrauben, die mit dem gleichen Abstand zueinander an die Tibia montiert wurden wie im Fall des rigiden Fixateurs externe. Die Schrauben wurden über eine Fixationsstange (\varnothing 20 mm) mit Hilfe von zwei Klemmplatten, einer oberen Klemme und einem unteren Gehäuse miteinander verbunden. Die Distanz zwischen Hautoberfläche und Stange betrug 20 mm.

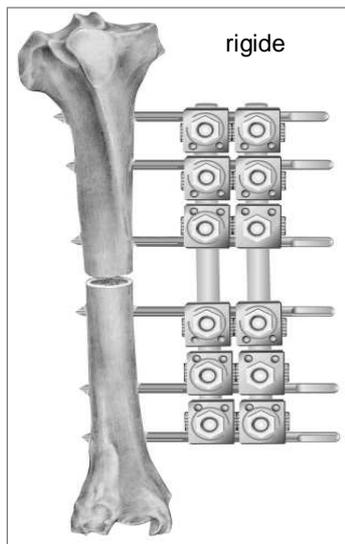


Abb. 3a

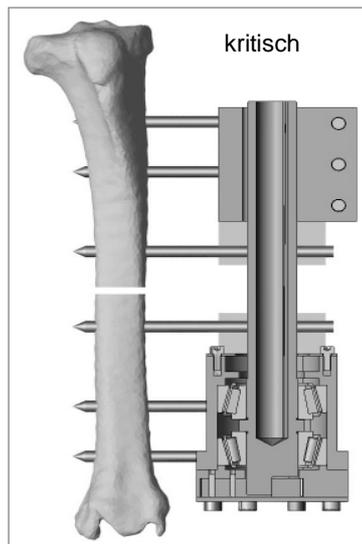


Abb. 3b

Abb. 3 Schematische Darstellung des rigiden (**3a**) und kritischen (**3b**) Fixateur externe

3.4 Frakturhämatomentnahme

Zunächst wurde Hämatom zum gewählten postoperativen Zeitpunkt 7.Tag am lebenden Tier gewonnen. Zu allen anderen Zeitpunkten wurde Kallusgewebe postmortem extrahiert. Wie im Studiendesign beschrieben, wurden zu jedem Zeitpunkt die Proben von den Tieren mit unterschiedlich stabilisierten Frakturen entnommen und zwei Gruppen (kritisch vs. rigide) mit jeweils sechs Tieren gebildet. Für die Hämatomentnahme wurden die Tiere narkotisiert und die Naht vorsichtig wiedereröffnet, ohne dass größere Blutungen auftraten. Anschließend wurden die Gewebeproben möglichst vollständig zwischen den Knochenenden abgenommen und in ein 50ml Sammelröhrchen gegeben, welches mit 10 µl/1 mg Probe RNAlater (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) versetzt war. Die gewonnenen Gewebeproben wurden bei -80°C gelagert bevor sie für die Aufarbeitung genutzt wurden. Für alle späteren Zeitpunkte wurde das Reparationsgewebe/Kallusgewebe postmortem gewonnen.

3.5 Sakrifizierung

Die Tiere erhielten über einen venösen Zugang in die Vena cephalica antebrachii eine Dosis von 2,5 mg in 50 ml gelöst Thiopental-Natrium (Trapanal® Altana Pharma Deutschland GmbH, Konstanz, Deutschland). In tiefer Narkose wurden 100 ml 1M-Kaliumchlorid-Lösung (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) appliziert, um einen raschen Herzstillstand auszulösen. Durch den Ausschluss biologischer Lebenszeichen wurde der Tod festgestellt.

3.6 RNA-Gewinnung

Die Eluierung der RNA aus der Probe wurde mit dem RNeasy Maxi-Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert:

1. In einem 50 ml Tube wurde zunächst ein Ansatz von 150 μ l β -Mercaptoethanol mit 15 ml RLT-Puffer vermischt.
2. Danach erfolgte die Abmessung von ca. 1 g Gewebe der zu untersuchenden Probe, welches dann in das vorher präparierte Tube 1 (siehe Punkt 1) gegeben wurde.
3. Das so hergestellte Gemisch wurde mit einem Ultra-Turrax (Ultra-Turrax T10 Basic, Ika® Werke GmbH Co.KG.) vorsichtig homogenisiert. Hierbei war darauf zu achten, dass der Bohrer das Gemisch nicht überhitzte, was mittels eines vorher präparierten Eisbades gewährleistet wurde.
4. Im Anschluss daran wurde das gut homogenisierte Gemisch für 10 min bei 3000 g zentrifugiert.
5. Der daraus gewonnene Überstand wurde in ein weiteres 50 ml Tube 2 gegeben und mit 15 ml Ethanol (70 %) versetzt. Das Mischen erfolgte hier durch leichtes Schwenken des Tube.
6. Aus dem Qiagen Set wurde ein drittes 50 ml Tube mit einer eingefügten RNA-Säule entnommen und 15 ml des Gemisches aus Tube 2 hinzugegeben.
7. Tube 3 wurde dann wiederum 5 min bei 3000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.
8. Die übrigen 15 ml der Probe aus Tube 2 wurden ebenfalls in Tube 3 gegeben und zentrifugiert.
9. Es wurden 15 ml RW1-Puffer auf die RNA-Säule von Tube 3 gegeben und bei 3000 g zentrifugiert für 5 min. Der Durchfluss wurde verworfen.
10. Sodann wurden 10 ml RPE-Puffer auf die RNA-Säule von Tube 3 gegeben und bei 3000 g zentrifugiert für 2min. Der Durchfluss wurde verworfen.
11. Es wurden erneut 10 ml RPE-Puffer auf die RNA-Säule von Tube 3 gegeben und bei 3000 g zentrifugiert jedoch für 10 min. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein neues Tube 4 aus dem Qiagen-Set gegeben.
12. Abschließend wurden 0,8 ml RNase Freewater auf die Säule gegeben und eine Minute ruhen lassen. Dann erfolgte die Zentrifugation für 3 min bei 3000 g.

13. Der Durchfluss wurde wiederum auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert.

14. Danach wurde der Durchfluss in ein Eppendorfgefäß pipettiert und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren gelagert.

3.7 RNA-Messung

Im Anschluss an die RNA-Isolierung erfolgte eine photometrische Konzentrationsmessung mit dem BioPhotometer der Firma Eppendorf, um die gewonnene Menge an RNA zu bestimmen. Das Absorptionsmaximum lag bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zusätzlich wurde auf das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm (Ratio) geachtet, um eine Aussage über den Grad der Verunreinigung mit Proteinen treffen zu können. Der Reinheitsgrad sollte zwischen 1,8 und 2 liegen.

3.8 Reverse Transkription

Auf die photometrische Messung der Konzentration folgte die Reverse Transkription, die Synthese komplementärer DNA (cDNA) aus gewonnener mRNA. Dies ist der erste Schritt in der Two Step-RT-PCR. Hierbei erfolgte zunächst die cDNA Erststrangsynthese mit RNA als Template (Ausgangsmaterial). Diese Verfahrensweise wurde nach einem im Labor etablierten Protokoll realisiert.

1. Zunächst wurden die Proben und die benötigten Chemikalien aus dem Eisschrank entnommen und allmählich aufgetaut.
2. Für das Umschreiben der RNA wurden folgende Reagenzien verwendet: dNTP-MIX (10 mM Bioron) der, Randomprimer (Invitrogen) sowie dH_2O
3. Es wurde ein Ansatz hergestellt, welcher 1 μl dNTP-MIX, 1 μl Randomprimer, 80 ng mRNA sowie ein Restvolumen Aqua dest (Aqua ad iniectabilia Braun, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) enthielt.
4. Der Ansatz wurde kurz anzentrifugiert und für 5 min bei 65°C im Mastercycler Gradient der Firma Eppendorf inkubiert. Anschließend wurden die Proben eine Minute auf Eis abgekühlt.
5. In der Zwischenzeit wurde ein Reaktions-Mix hergestellt, der 4 μl M-MLV 5x Reaktionspuffer (Promega, GmbH, Mannheim, Deutschland), 1 μl Rnase Inhibitor, 40 U/ μl (Promega, GmbH, Mannheim, Deutschland) sowie 4,5 μl

(Aqua ad iniectabilia Braun, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) destilliertes Wasser enthielt.

6. Der gesamte Reaktions-Mix von 9,5 µl wurde zum ersten Ansatz hinzupipettiert, kurz an zentrifugiert und für 2 min bei 42°C im Mastercycler inkubiert.
7. Im nachfolgenden Schritt wurde 1 µl M-MLV RT (Reverse Transkriptase) (H-), 200 U/µl (Promega, GmbH, Mannheim, Deutschland) im Mastercycler zur Probe hinzugegeben.
8. Dieser Ansatz wurde ebenfalls an zentrifugiert und für 50 min bei 42°C im Mastercycler inkubiert, um ein Umschreiben der RNA in cDNA zu ermöglichen. Es schloss sich eine weitere Inkubation für 15 min bei 70°C an, um die RT (Reverse Transkriptase) zu inhibieren. Es folgte die Kühlung der Proben durch Eis.
9. Zum Schluß erfolgte ein Verdau der verbliebenen RNA mit 1 µl RNase H, 250 U/µl (Promega, GmbH, Mannheim, Deutschland)
10. Es ergab sich ein Endvolumen von 21,5 µl, welches bei -20°C im Eisschrank gekühlt wurde bevor es weiter verarbeitet wurde.

3.9 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Reverse-Transkriptase PCR (qRT-PCR) ist der zweite Schritt der Two-step-RT-PCR. Real time-PCR werden durch Thermocycler ermöglicht, in denen die PCR-Produkte direkt während ihrer Bildung (Echtzeit) erfasst werden können. In der hier gezeigten Real time-PCR wurde der DNA-bindende-Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green 1 verwendet. Diese Methode erlaubt die Quantifizierung durch die Messung der Fluoreszenz in jedem einzelnen Reaktionszyklus, da die Fluoreszenzintensität in jedem Zyklus direkt proportional zur Menge des gebildeten PCR-Produktes ist. Die Quantifizierung der Nukleinsäuren erfolgt absolut oder relativ. Das in diesem Labor verwendete Protokoll benutzt die relative Quantifizierung als Methode. Hierbei wird das Verhältnis der Zielmoleküle zu der Anzahl von endogenen Referenztranskripten bestimmt, welche in allen Proben gleichermaßen enthalten sein sollte. In dem von diesem Labor verwendeten Protokoll wurde Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als sogenanntes Housekeeping-Gen und damit als endogenes Referenzprodukt eingesetzt. Für einen Ansatz sind folgende Reaktionsschritte und Ausgangsprodukte notwendig:

1. Die Ausgangsprobe wurde in einem Verhältnis 1:10 verdünnt, d.h. 9 µl Wasser (Aqua ad iniectabilia Braun, B.Braun Melsungen AG, Deutschland) und 1 µl Ausgangsmaterial (Template oder Produkt der Umschreibung) wurden in ein PCR Tube (PCR TUBES ULTRADÜNN 0,2 ml, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland) gegeben und auf Eis gestellt.
2. In einem nächsten Schritt wurde der Reaktionsansatz hergestellt. Dafür wurden 12,5 µl eines iQTM Supermixes (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) bestehend aus 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8,4, 1,6 mM dNTPs, iTaq DNA Polymerase (50 units/ml), 6 mM MgCl₂, 0,5 µl Primer for und 0,5 µl Primer rev (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland), 1 µl AbsoluteTM MAX QRT-PCR Sybr® Green Fluorescein Mix (100x50 µl, Abgene, Hamburg, Deutschland) und 9,5 µl Wasser (Aqua ad iniectabilia Braun, B. Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gemischt.
3. Danach wurde das Template in der Verdünnung 1:10 mit 2 µl des Reaktionsansatzes in eine 96 Loch Platte (Abgene, Hamburg, Deutschland) pipettiert und mit Ultra Clear Cap Strips (Abgene, Hamburg, Deutschland) verschlossen. Jeder Ansatz wurde dreifach mit GAPDH pipettiert.
4. Dieser Ansatz wurde für 30 Sekunden bei 60 RPM an zentrifugiert. (Universal 32 R.Hettich Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) und in einen iCYCLER (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gegeben.

In dem iCYCLER lief die Amplifizierung der DNA nach einem vorgegebenen Programm ab. Für jedes verwendete Template auf der 96-Loch Platte, erfolgte eine Negativkontrolle, um Kontamination durch Fremd-DNA auszuschließen. Des Weiteren wurden für jeden Primer drei Ansätze verwendet, um die Ergebnisse exakt verifizieren zu können. Das initiale Programm der PCR setzte sich aus einer ersten Denaturierung von drei Minuten bei 94°C zusammen, gefolgt von 40 weiteren Zyklen. Ein PCR Zyklus begann mit der thermischen Denaturierung der zu amplifizierenden DNA für 30 Sekunden bei 94°C. Dadurch entstanden einzelsträngige DNA-Template-Moleküle. Es folgte das Annealing für 40 Sekunden bei 62°C, wobei sich kurze Oligonucleotidsequenzen (Primer) an die komplementären DNA-Abschnitte des Gens anlagerten. An diesen Primer erfolgte bei 72°C die Anlagerung des Enzyms Taq (*Thermus aquaticus*)-Polymerase, welches die komplementäre DNA-Sequenz verlängerte (Elongation). Dieses

Enzym gewährleistet durch seine Hitzestabilität die kontinuierliche Durchführung der PCR-Zyklen, ohne dass zwischen den einzelnen Zyklen neue Enzyme hinzu gegeben werden müssen. Durch die Anlagerung des Fluoreszenzfarbstoffes Sybr-Green an die doppelstrangige DNA, kam es bei fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Fluoreszenzanstieg. Dieser Anstieg wurde registriert und die Expression der einzelnen zu untersuchenden Faktoren bestimmt. Dabei wurde die Primerkombination (Tabelle 1) mit der höchsten Effizienz (intensivste Bande) verwendet.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Primer und Sequenzen

RNA	for/rev	Genlokus	Größe in bp	Sequenz 5'→3'
VEGF	For	AF071015	91	CTGAGGAGTTCAACATCACCAT
VEGF	Rev			CCTTGCTTTATCTTTCTTTGGTCT
VEGFR2	For			ACGGTAGCTTCCACCAAGGA
VEGFR2	Rev			CAGTGGGCTGATGACCAAGA
ANG1	For	AY881028	212	TTTCGAAATCCCTCTGGTG
ANG1	Rev			GGCTGCTCTGTTTTCTGCT
ANG2	For	AY881029	153	GGTGACTGCCACGGTGAATA
ANG2	Rev			TCCCCGCAGTCTCTGAAGAT
wWF	For	762.1	242	GGTCATCTCCGATTCAAGC
wWF	Rev			ATCACGCTTCAGCATCAGGA
CYR61	For		195	CAGCTCCACCGCTCTGAAG
CYR61	Rev			CTCTTGGGGGCACAGAGGA
TIE2	For	AY881030	104	AGCTCAGAAGTGGGGACCTG
TIE2	Rev			CATAAACCCAGGAGGGCAAA
MMP2	For		119	GTGTTCTTGCAGGAACGAACGAATA
MMP2	Rev			GAATTTGTCTCCAGCGAAGATGTATG
TIMP1	For			ATGGAGAGCGTCTGCGGATA
TIMP1	Rev			CTGTTCCAGGGAGCCACAAA
TIMP3	For		133	TCCCACCTCTCCACGAAGTT
TIMP3	Rev			ACATCCACACGGAAGGAGTAAAT
IGF1	For	M31736	159	GACATGCCCAAGGCTCAG
IGF1	Rev			TGGGGGAAATGCCCATCT
iNOS	For		138	CCTCCACCTGTTCTCGTTC
iNOS	Rev			GTGAGGTGCTTCGTGTGCTC
TNF α	For	AY289202	100	ATCGCCTCAGTGCTGAGATCAA
TNF α	Rev			CCAGCCCTGAGCCCTA
HIF1 α	For	AF233078	160	TGGATTGAAGATGAAATGAAGGCA
HIF1 α	Rev			CTGTGTCCAGTTAGTTCAAAGT
PDGF	For	X97123	122	TGCATGGAGACTCCTTAGATGA
PDGF	Rev			GACCGTTGGGGAACCTAG
GAPDH	For			CGGAAGGGCCATCCACA
GAPDH	Rev			CAAGGTCATCCATGACCACTTT
FGF2	For	NM_001009769	165	TGTGCAAACCGTTACCTTGC
FGF2	Rev			CTGCCAGTTCGTTTCAGTG

Die Quantifizierung der PCR basierte auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem Threshold Cycle (C_t -Wert). Dieser Wert entspricht jenem PCR-Zyklus, bei dem der Fluoreszenzanstieg exponentiell erfolgt. Für jedes zu untersuchende Zielgen des Untersuchungsgewebes wurde der entsprechende C_t -Wert ermittelt. Anschließend wurde die Differenz (ΔC_t) berechnet aus dem C_t -Wert des Referenzgens (GAPDH) und des Zielgens. Darüber hinaus wurde für das jeweilige Zielgen ein Standard- ΔC_t -Wert anhand eines anderen Hämatoms (4d rigide) ermittelt und ebenfalls die Differenz aus den beiden C_t -Werten berechnet. Dieser Standardwert wurde aus der Arbeit von Lienau et al. verwendet [183]. Diese Verfahrensweise wurde gewählt, um eine mathematische Formel aufzustellen, mit der quantitativ die Unterschiede in der Genexpression zwischen den Proben dargestellt werden konnten. Die Formel lautete:

$$2^{-(\Delta\Delta C_t)}$$

3.10 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS (Version 14.0, SPSS Inc., Chicago, USA). Statistische Vergleiche innerhalb sowie zwischen den Fixateurgruppen im Zeitlauf wurden mittels Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Hierbei wurde eine deskriptive Statistik ohne Korrektur durchgeführt. Zur graphischen Darstellung der Daten wurden Boxplots gewählt. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

4 Untersuchungsergebnisse

Für alle gemessenen Faktoren konnten zu allen Zeitpunkten mRNA-Werte ermittelt werden. Jedoch sind auch Ausfälle aufgetreten. Damit konnte nicht zu allen Zeitpunkten die Anzahl $n=6$ für die jeweilige Gruppe erreicht werden. Dies betraf alle Faktoren.

4.1 vWF

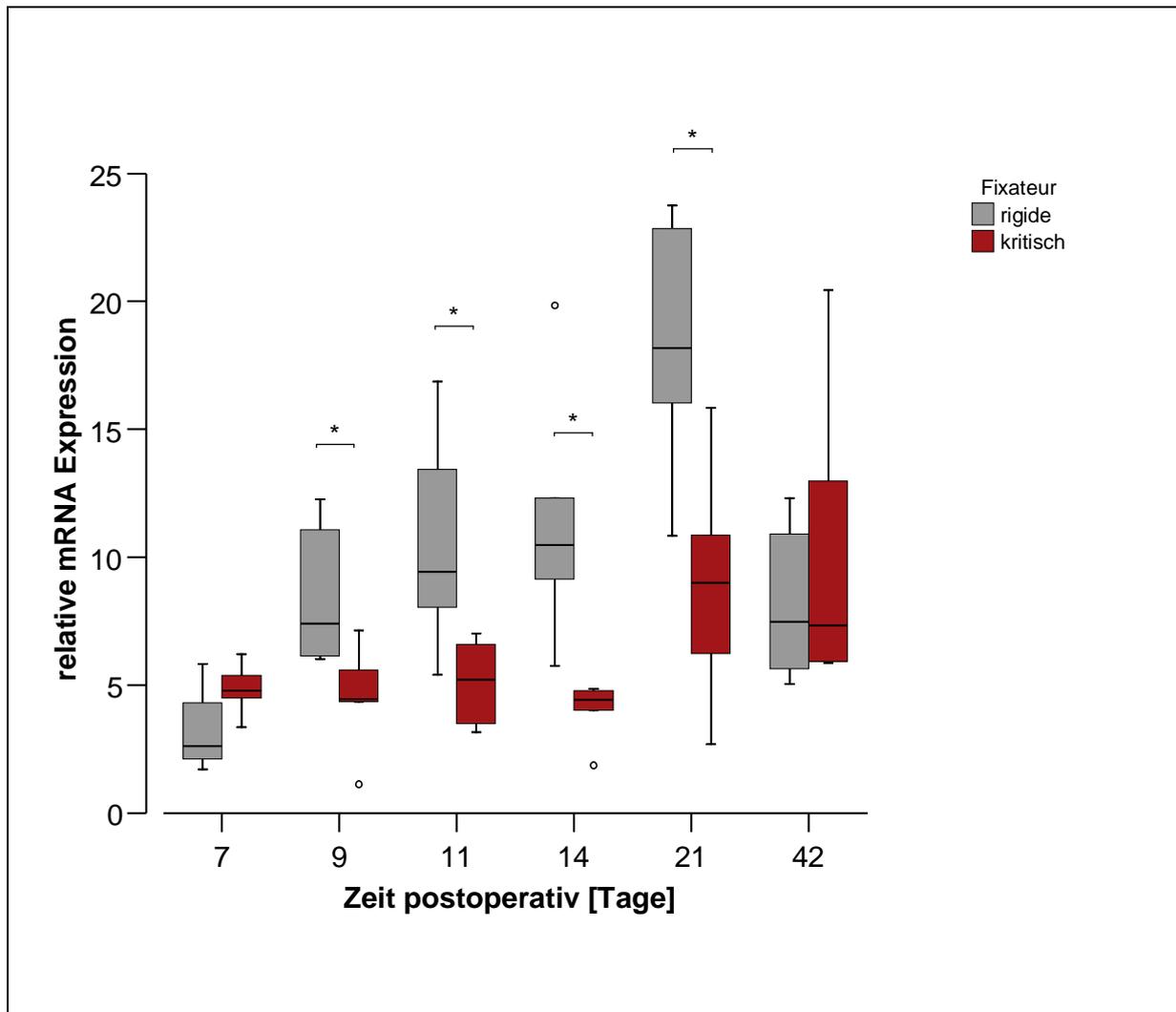


Abb.4:Relative mRNA-Expression von vWF im Frakturhämatom nach rigider (grau) und kritischer (rot) Fixateurversorgung ($p^* < 0.05$, \circ Ausreißer)

In Gruppe 1 (rigider Fixateur) zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der Expression bis zum Tag 21 (Abb.4). Zu diesem Zeitpunkt wurde der maximale Wert gemessen. Anschließend zeigte das Expressionsmuster einen Abfall zum 42 Tag. Für Gruppe 2 (kritischer Fixateur) zeigte sich über die Zeit ein konstantes Niveau der Expression vom 7. bis 14.Tag. Ein Anstieg der Expression war zum Zeitpunkt 21. und 42. Tag zu

verifizieren. In Gruppe 2 war die Genexpression zu den Zeitpunkten Tag 9 ($p=0,032$), Tag 11 ($p=0,015$), Tag 14 ($p=0,002$), Tag 21 ($p=0,017$) signifikant geringer als in Gruppe 1.

4.2 VEGF

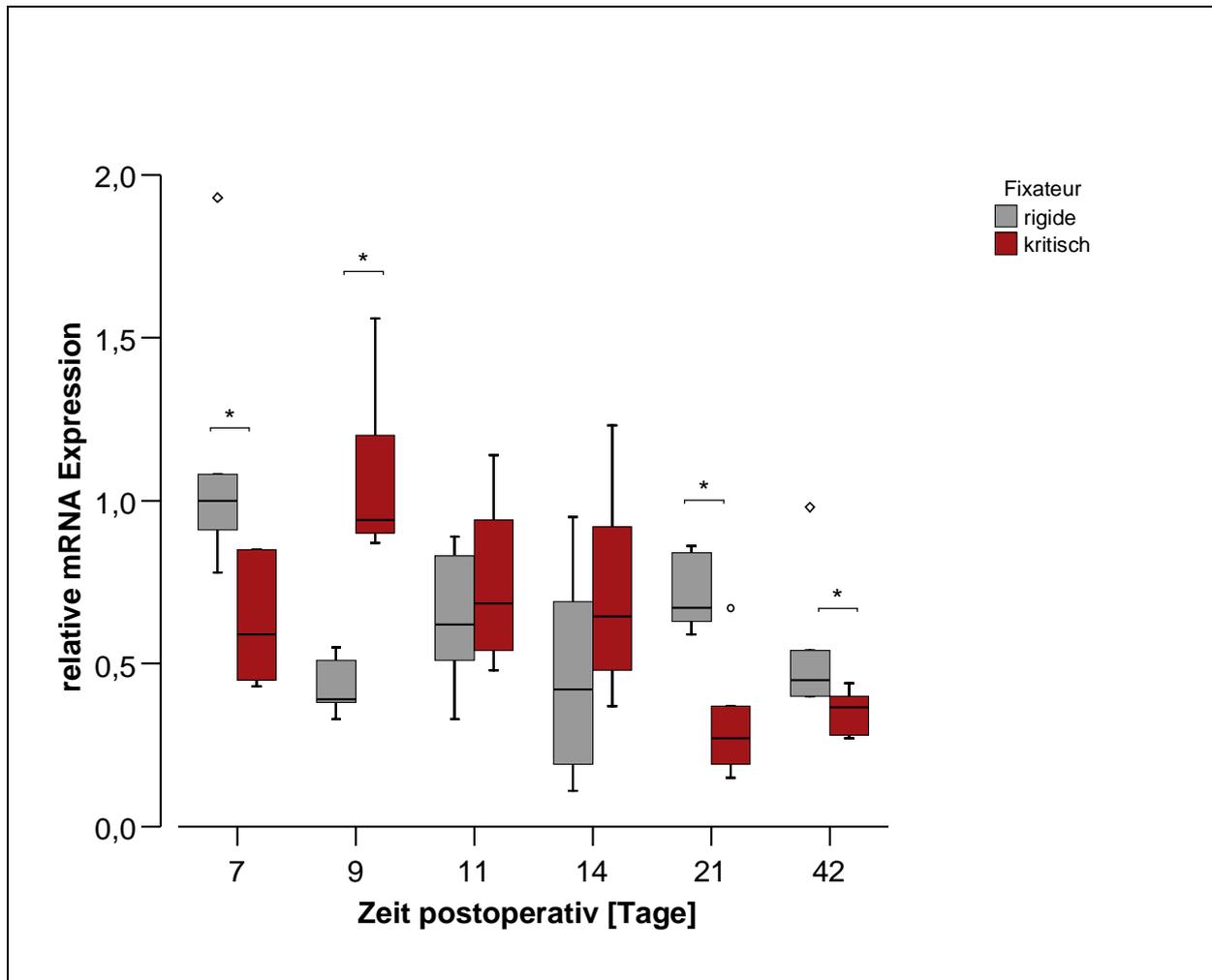


Abb.5:Relative mRNA-Expression von VEGF im Frakturhämatom nach rigider (grau) und kritischer (rot) Fixateurversorgung ($p^* < 0.05$, \circ Ausreißer, \diamond Extremwerte)

Die VEGF-Expression zeigte in Gruppe 1 (rigider Fixateur) am Tag 7 postoperativ die höchste Expression, wogegen die VEGF-Expression in Gruppe 2 (kritischer Fixateur) ihre maximale Expression am Tag 9 aufwies (Abb.5). Zwischen den beiden Gruppen ergaben sich signifikante Unterschiede zu den Beobachtungszeitpunkten Tag 7, 9, 21, 42. Die VEGF-Expression in Gruppe 2 war am Tag 7 ($p=0,009$), Tag 21 ($p=0,019$) sowie Tag 42 ($p=0,022$) signifikant geringer als in Gruppe 1. Zum Zeitpunkt Tag 9 konnte für Gruppe 2 eine signifikant ($p=0,008$) höhere Expression als für Gruppe 1 festgestellt werden. Die geringste Expression wurde für Gruppe 2 am 21.Tag ermittelt.

4.3 VEGFR2

In Gruppe 1 (rigider Fixateur) zeigte die VEGFR2 Expression einen kontinuierlichen Anstieg über die gesamte Heilungsdauer (Abb.6). In Gruppe 2 (kritischer Fixateur) konnte eine maximale Expression an Tag 7 mit signifikant höheren ($p=0.002$) Werten als in Gruppe 1 beobachtet werden. Zum Zeitpunkt 9 ($p=0,002$) und 14 ($p=0.002$) Tag zeigte sich in Gruppe 2 eine signifikant geringere VEGFR2-Expression als in Gruppe 1.

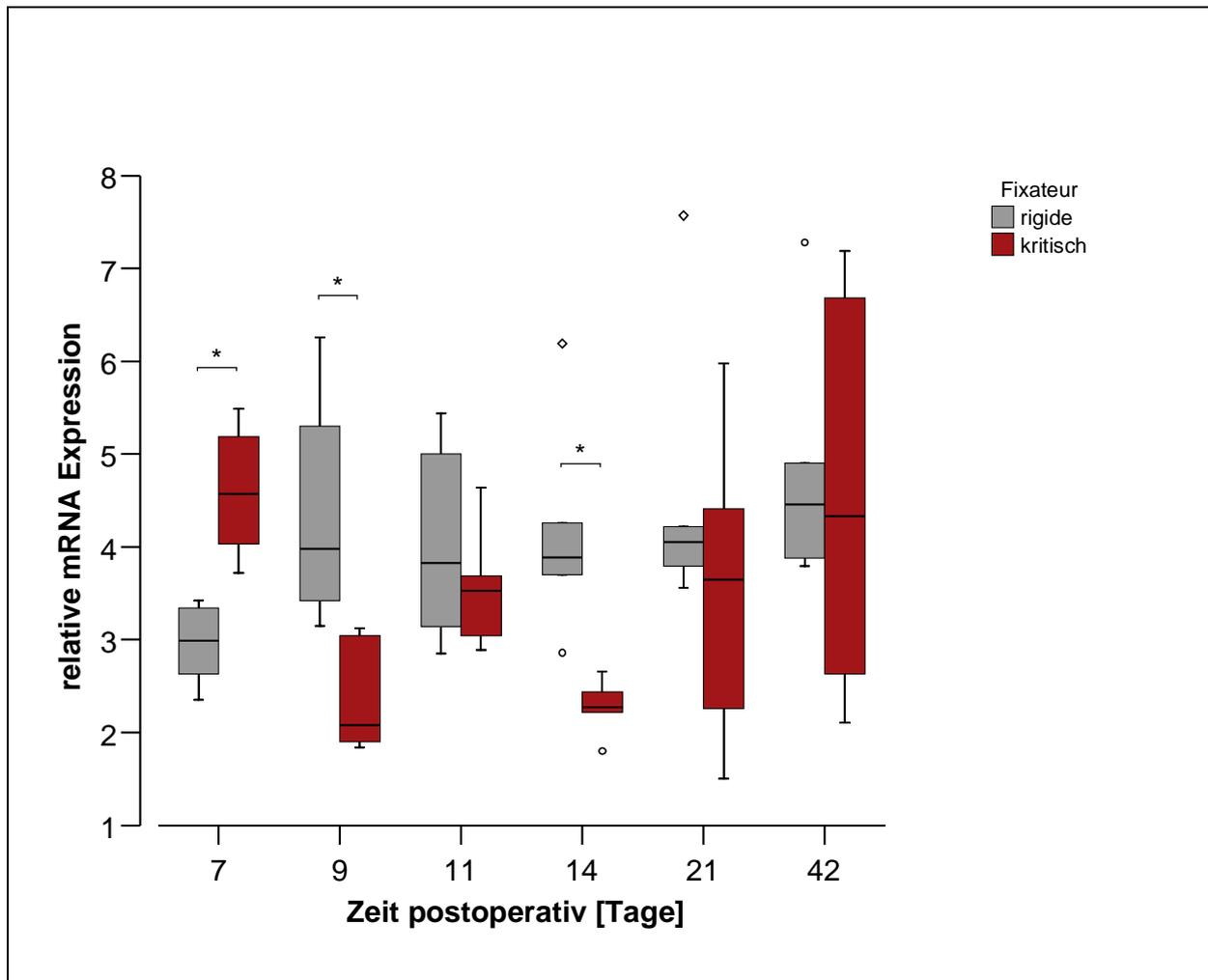


Abb.6:Relative mRNA-Expression von VEGFR2 im Frakturhämatom nach rigider (grau) und kritischer (rot) Fixateurversorgung ($p^* < 0.05$, \circ Ausreißer, \diamond Extremwerte)

4.4 CYR61

Die Genexpression in Gruppe 1 (rigider Fixateur) zeigte einen maximalen Wert am Tag 7. In Gruppe 2 (kritischer Fixateur) stellte sich eine maximale Expression am Tag 9 dar (Abb.7). Signifikante Unterschiede konnten zu den Beobachtungszeitpunkten 7., 9. und 42.Tag gemessen werden. Die Genexpression in Gruppe 2 zum Zeitpunkt Tag 7 ($p=0,041$) fiel signifikant geringer aus als in Gruppe 1. Zum Zeitpunkt Tag 9 ($p=0,016$) und 42 ($p=0,041$) Tage wurden in Gruppe 2 signifikant höhere Werte gemessen als in Gruppe 1.

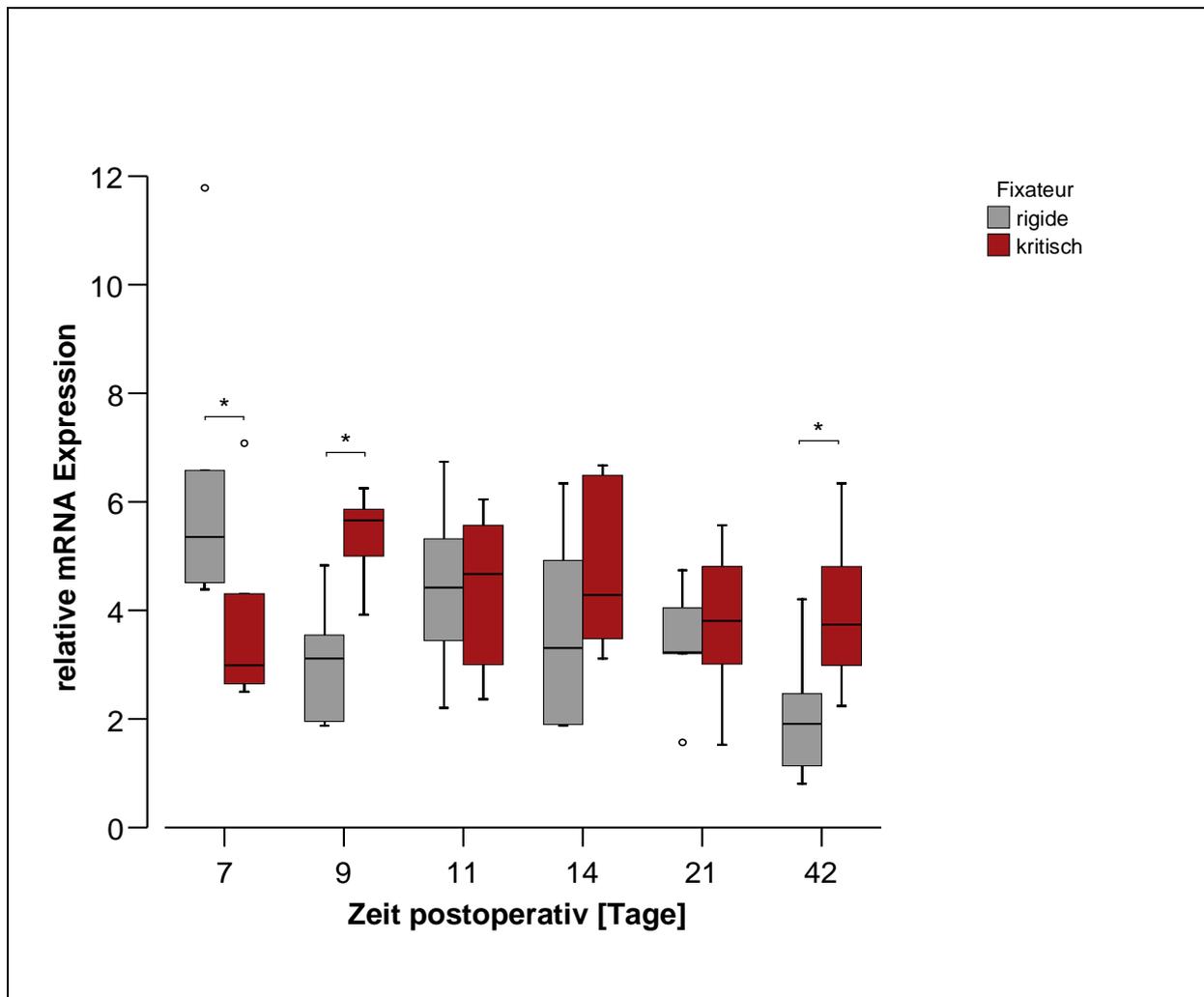


Abb.7:Relative mRNA-Expression von CYR61 im Frakturhämatom nach rigider (grau) und kritischer (rot) Fixateurversorgung ($p^* < 0.05$, \circ Ausreißer)

4.5 ANG1

Die Genexpression zeigte in beiden Gruppen ein Maximum am Tag 21. Für Gruppe 1 (rigider Fixateur) konnte ein Trend mit einem Anstieg der Expression bis zum 21.Tag festgestellt werden (Abb.8). Weiterhin tendierte zu allen Zeitpunkten die Expression in Gruppe 2 (kritischer Fixateur) zu geringeren Werten als in Gruppe 1. Eine signifikant geringere Expression wies Gruppe 2 im Vergleich zu Gruppe 1 zu den Beobachtungszeitpunkten Tag 9 ($p=0.032$) und Tag 14 ($p=0.015$)Tage auf.

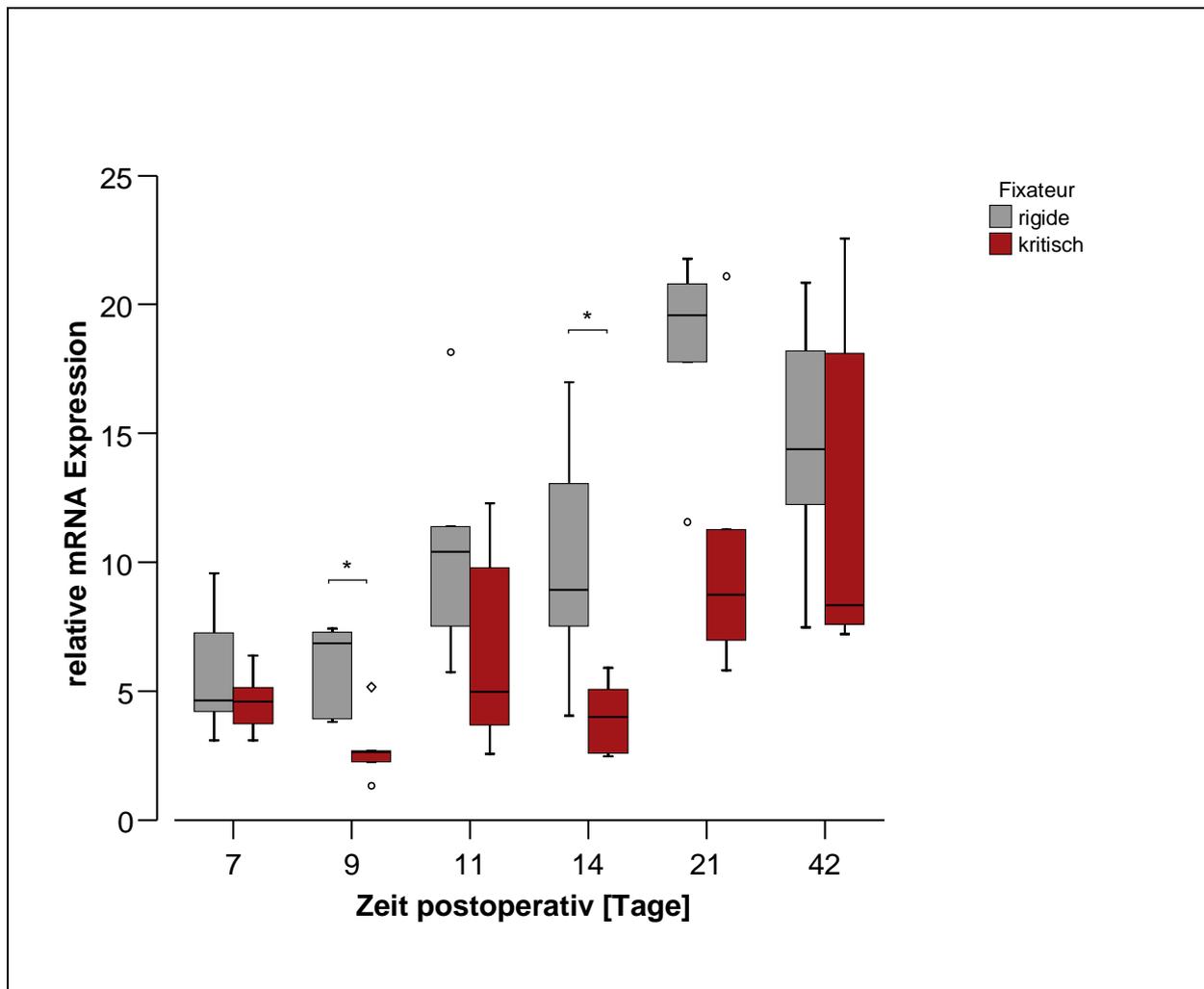


Abb.8:Relative mRNA-Expression von ANG1 im Frakturhämatom nach rigider (grau) und kritischer (rot) Fixateurversorgung ($p^*<0.05$, ○ Ausreißer, ◇ Extremwerte)

4.6 ANG2

Das Expressionsmuster für ANG2 stellte sich uneinheitlich und differierend dar. Tendenziell war in Gruppe 1 (rigider Fixateur) eine höhere Expression zu verzeichnen als in Gruppe 2 (kritischer Fixateur) (Abb.9). Die Analyse der Syntheseparameter ergab für Gruppe 2 ($p < 0,026$) eine signifikant geringere Expression am Tag 14 als in Gruppe 1

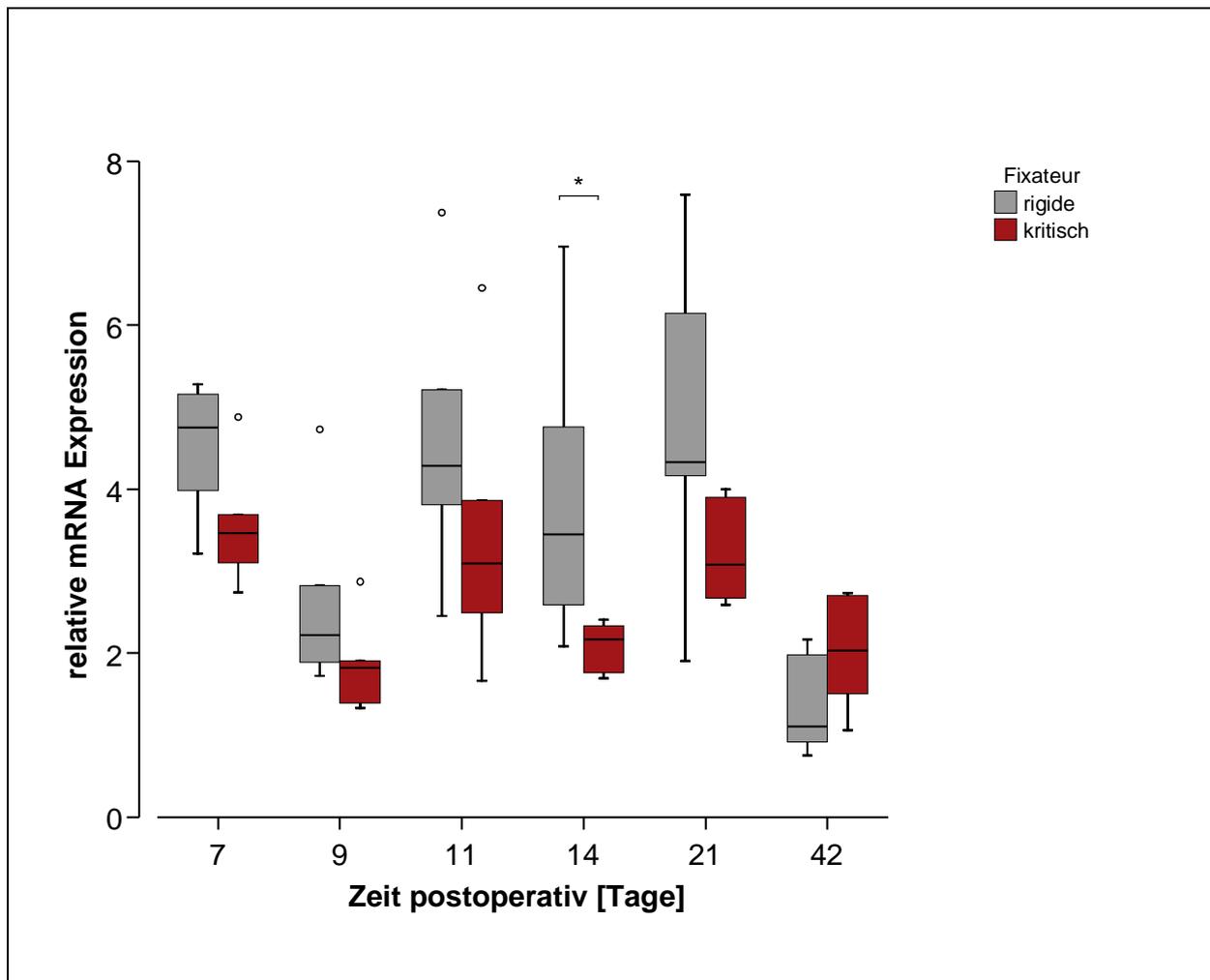


Abb.9:Relative mRNA-Expression von ANG2 im Frakturhämatom nach rigider (grau) und kritischer (rot) Fixateurversorgung ($p^* < 0.05$, \circ Ausreißer)

4.7 TIE2

In Gruppe 1 (rigider Fixateur) war ein kontinuierlicher Anstieg der Syntheseparameter über die gemessene Zeit zu beobachten. In Gruppe 2 (kritischer Fixateur) stellte sich am 21. und 42.Tag eine höhere Expression dar als an davor liegenden Beobachtungszeitpunkten (Abb.10). Des Weiteren ergab sich am Tag 7 ($p=0,002$) eine signifikant geringere Expression in Gruppe 2 als in Gruppe 1

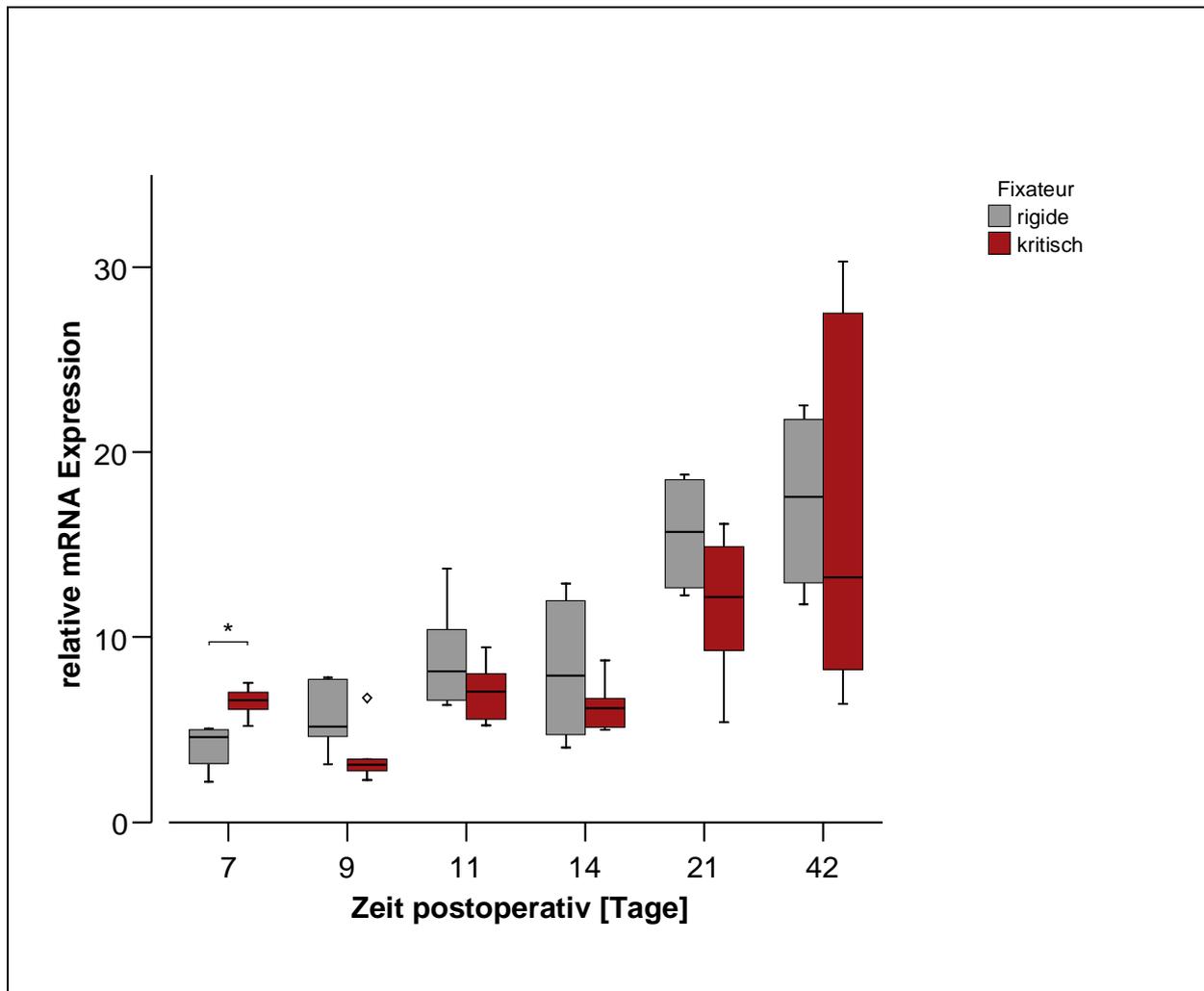


Abb.10:Relative mRNA-Expression von TIE2 im Frakturhämatom nach rigider (grau) und kritischer (rot) Fixateurversorgung ($p^*<0.05$, ◇ Extremwerte)

4.8 FGF2

Tendenziell stellte sich für Gruppe 1 (rigider Fixateur) ein Trend zu höheren Werten bis zum Tag 21 dar. Zu diesem Beobachtungszeitpunkt wurde in Gruppe 1 der maximale Wert erreicht (Abb.11). In Gruppe 2 (kritischer Fixateur) stellte sich kein deutlicher Trend der Syntheseparameter während der Heilungsphase dar. Zu den Zeitpunkten Tag 11 ($p=0,026$), 14 ($p=0,002$), 21 ($p=0,004$) zeigte sich in Gruppe 2 eine signifikant geringere mRNA Synthese als in Gruppe 1.

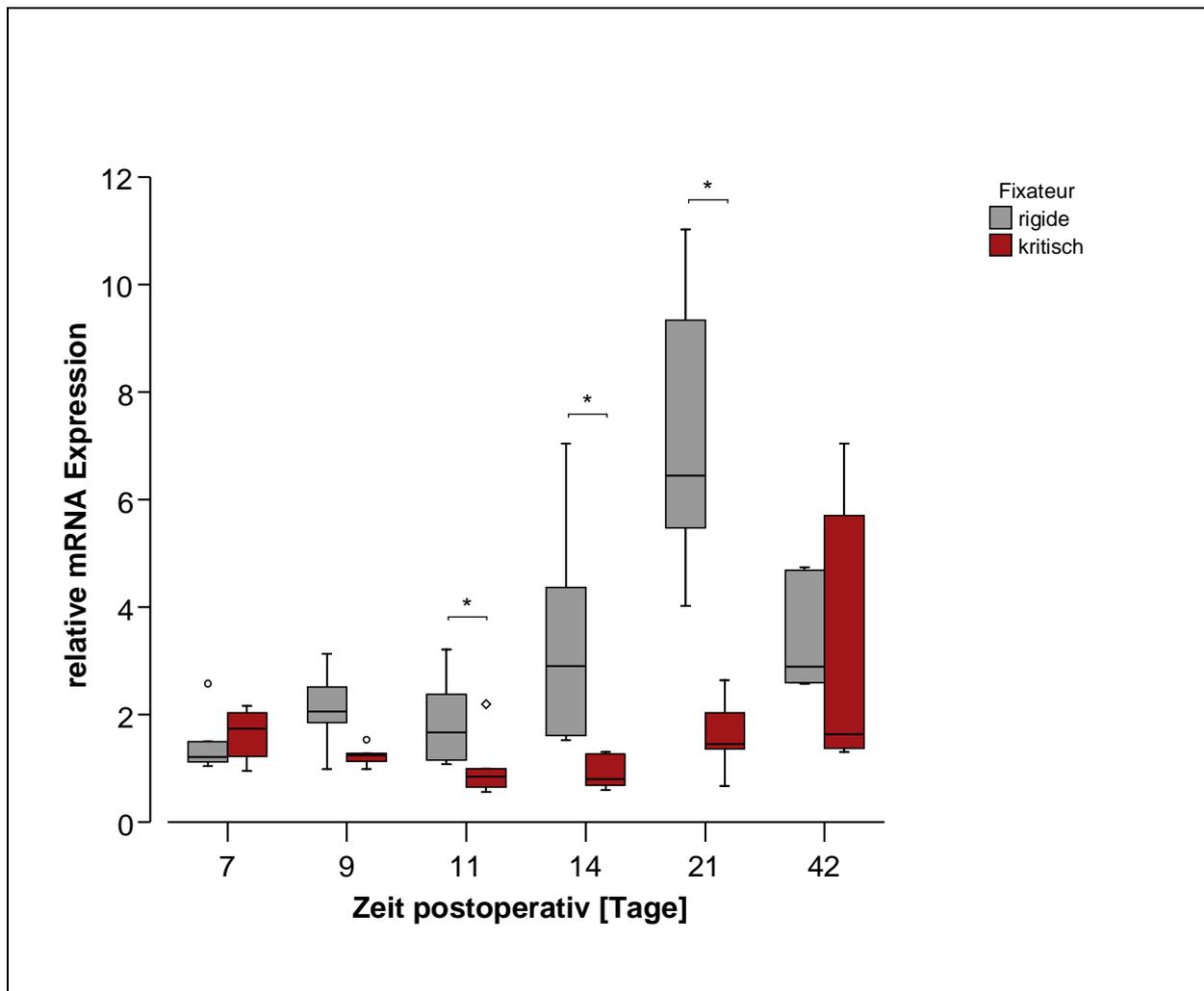


Abb.11:Relative mRNA-Expression von FGF2 im Frakturhämatom nach rigider (grau) und kritischer (rot) Fixateurversorgung ($p^* < 0.05$, ○ Ausreißer, ◇ Extremwerte)

4.9 MMP2

Die gemessenen Werte für MMP2 zeigten zwischen den verschiedenen Heilungsverläufen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede (Abb.12). In beiden Gruppen konnte ein Trend zu kontinuierlich ansteigenden Syntheseparametern im Zeitraum 9. bis 21.Tag festgestellt werden. Die maximale mRNA Expression wurde für den 21.Tag bestimmt.

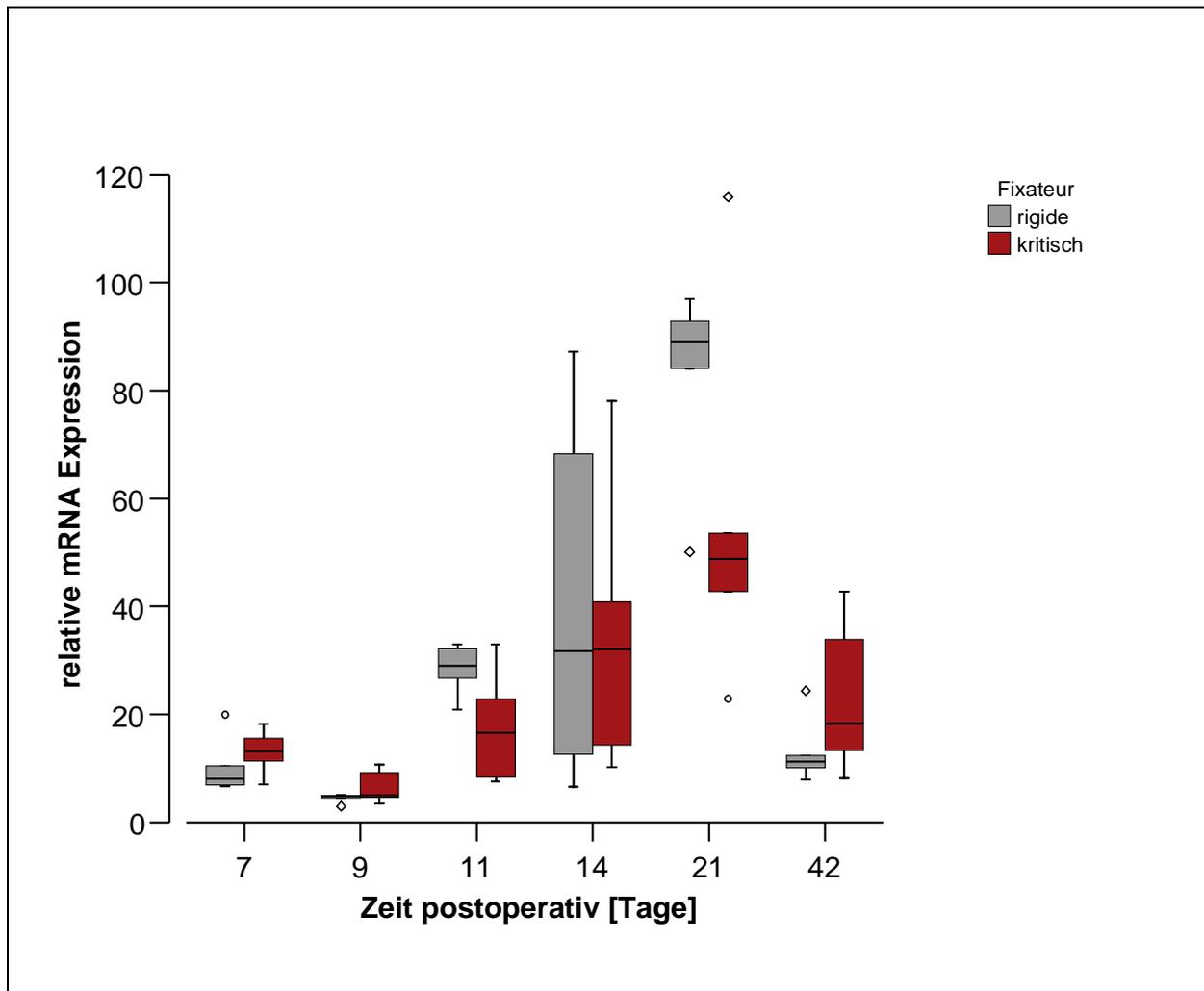


Abb.12:Relative mRNA-Expression von FGF2 im Frakturhämatom nach rigider (grau) und kritischer (rot) Fixateurversorgung ($p^* < 0.05$, \circ Ausreißer, \diamond Extremwerte)

4.10TIMP1

Die ermittelten Daten für TIMP1 zeigten in beiden Gruppen zum Zeitpunkt 7 Tage ihre maximalen Werte (Abb.13). Ein Trend lies sich innerhalb des Expressionsmuster für beide Gruppen nicht erkennen. Zum Zeitpunkt Tag 14 ($p=0,041$), 21 ($p=0,017$), 42 ($p=0,015$) stellten sich in Gruppe 1 (rigider Fixateur) signifikant höhere Syntheseparameter als in Gruppe 2 (kritischer Fixateur) dar.

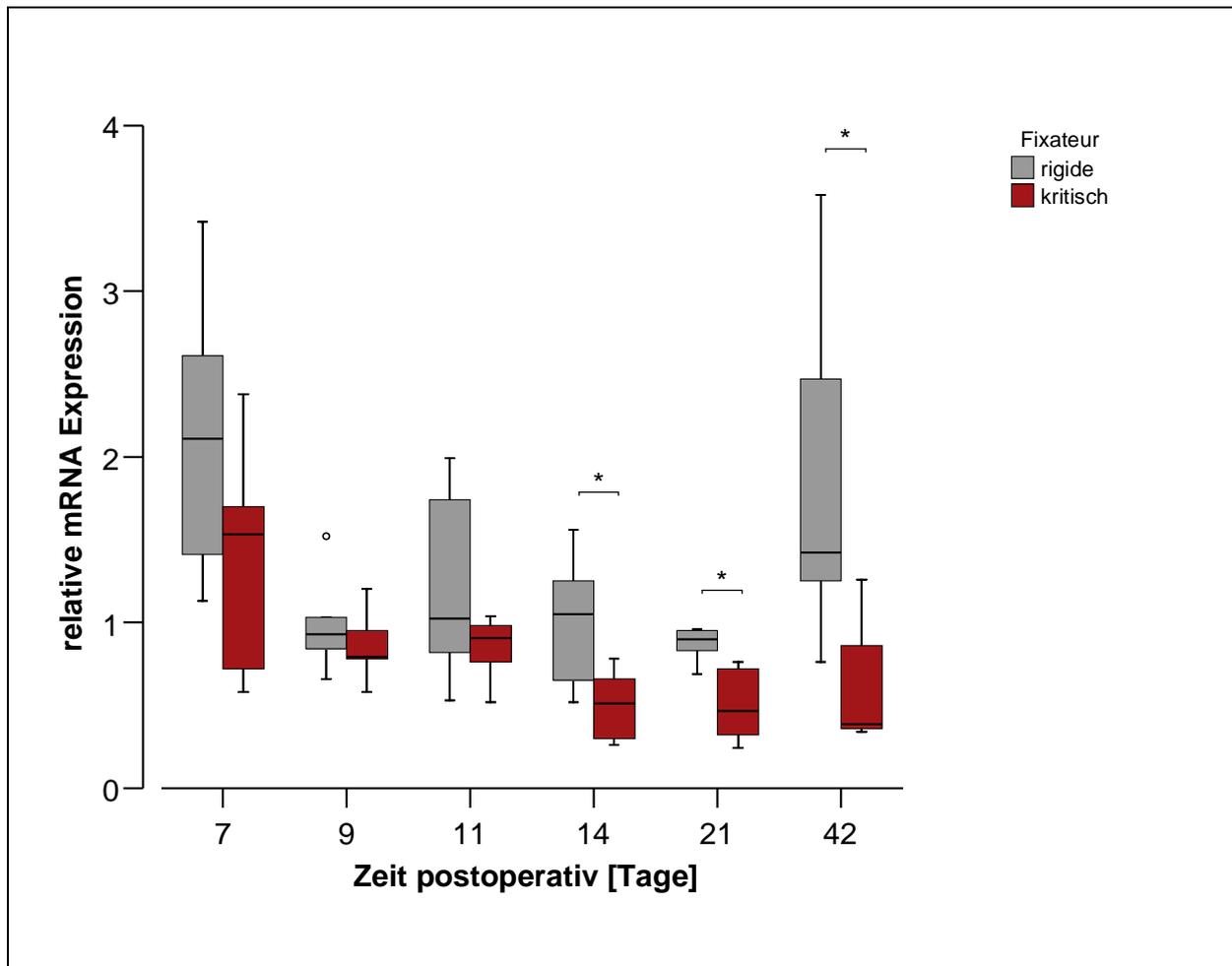


Abb.13:Relative mRNA-Expression von TIMP1 im Frakturhämatom nach rigider (grau) und kritischer (rot) Fixateurversorgung ($p^*<0.05$, o Ausreißer)

4.11 TIMP3

In Gruppe 1 zeigte sich ein Trend zu deutlich höheren Werten zu den Beobachtungszeitpunkten Tag 21 und Tag 42 im Vergleich zu den davor liegenden Zeitpunkten (Abb.14). Dieser Trend lies sich für Gruppe 2 (kritischer Fixateur) ebenfalls beobachten. Zum Zeitpunkt 21.Tag zeigte sich eine signifikant höhere Expression in Gruppe 1 (rigider Fixateur) als in Gruppe 2 (kritischer Fixateur).

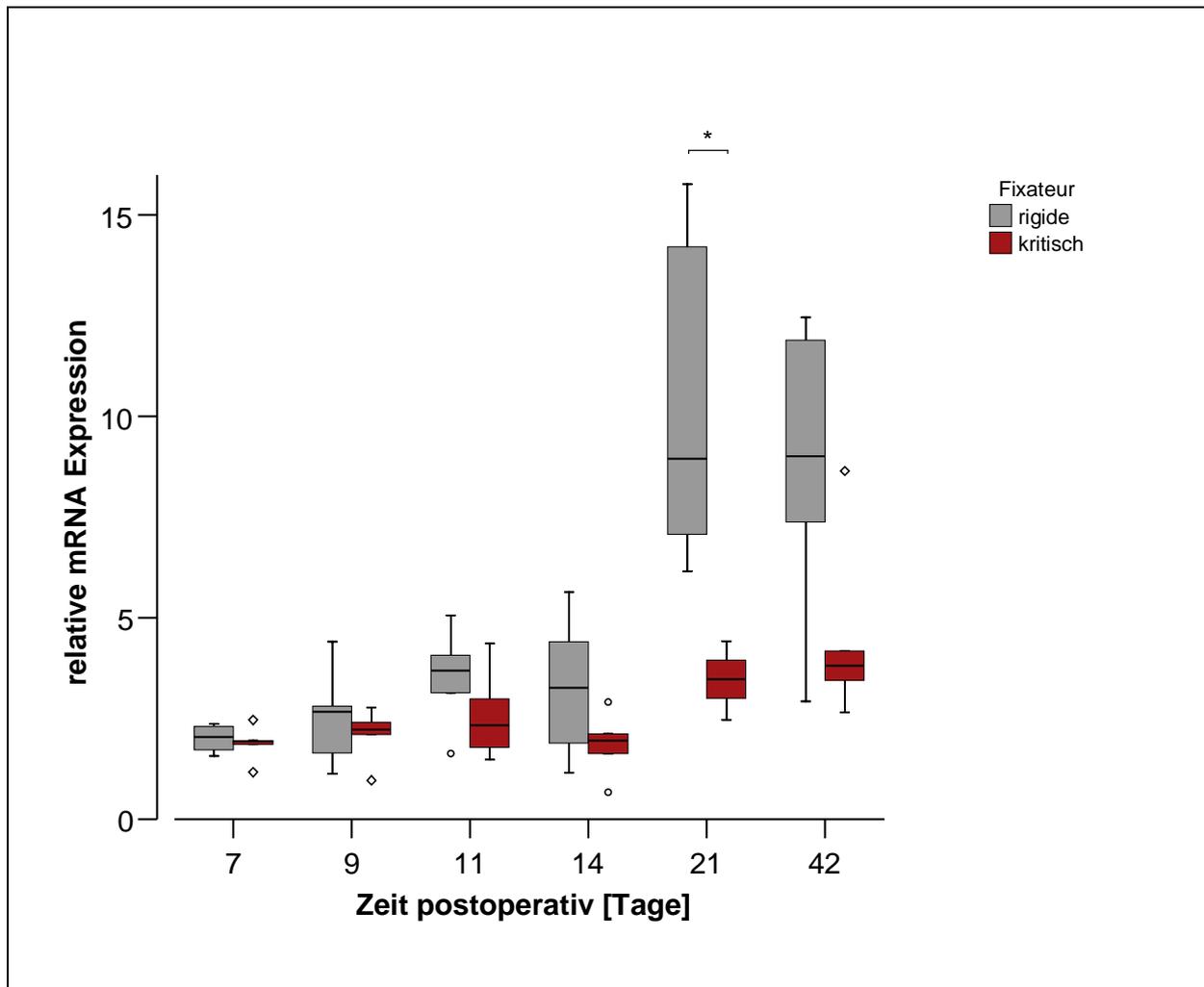


Abb.14:Relative mRNA-Expression von TIMP3 im Frakturhämatom nach rigider (grau) und kritischer (rot) Fixateurversorgung ($p^* < 0.05$, \circ Ausreißer, \diamond Extremwerte)

4.12 HIF1 α

In Gruppe 1 (rigider Fixateur) zeigte sich zum Zeitpunkt 7.Tage ($p=0,002$) sowohl eine signifikant geringere Expression im Vergleich zur Gruppe 2 (kritischer Fixateur) als auch die niedrigsten gemessenen mRNA Werte über den gesamten Zeitraum (Abb.15). Für die übrigen Zeitpunkte lies sich keine Aussage bezüglich eines Trends treffen, da sich die Expressionsmuster für die einzelnen Heilungsverläufe relativ konstant verhielten. Weitere signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren zum Zeitpunkt Tag 14 ($p=0,017$) und 21 ($p=0,015$) zu verzeichnen.

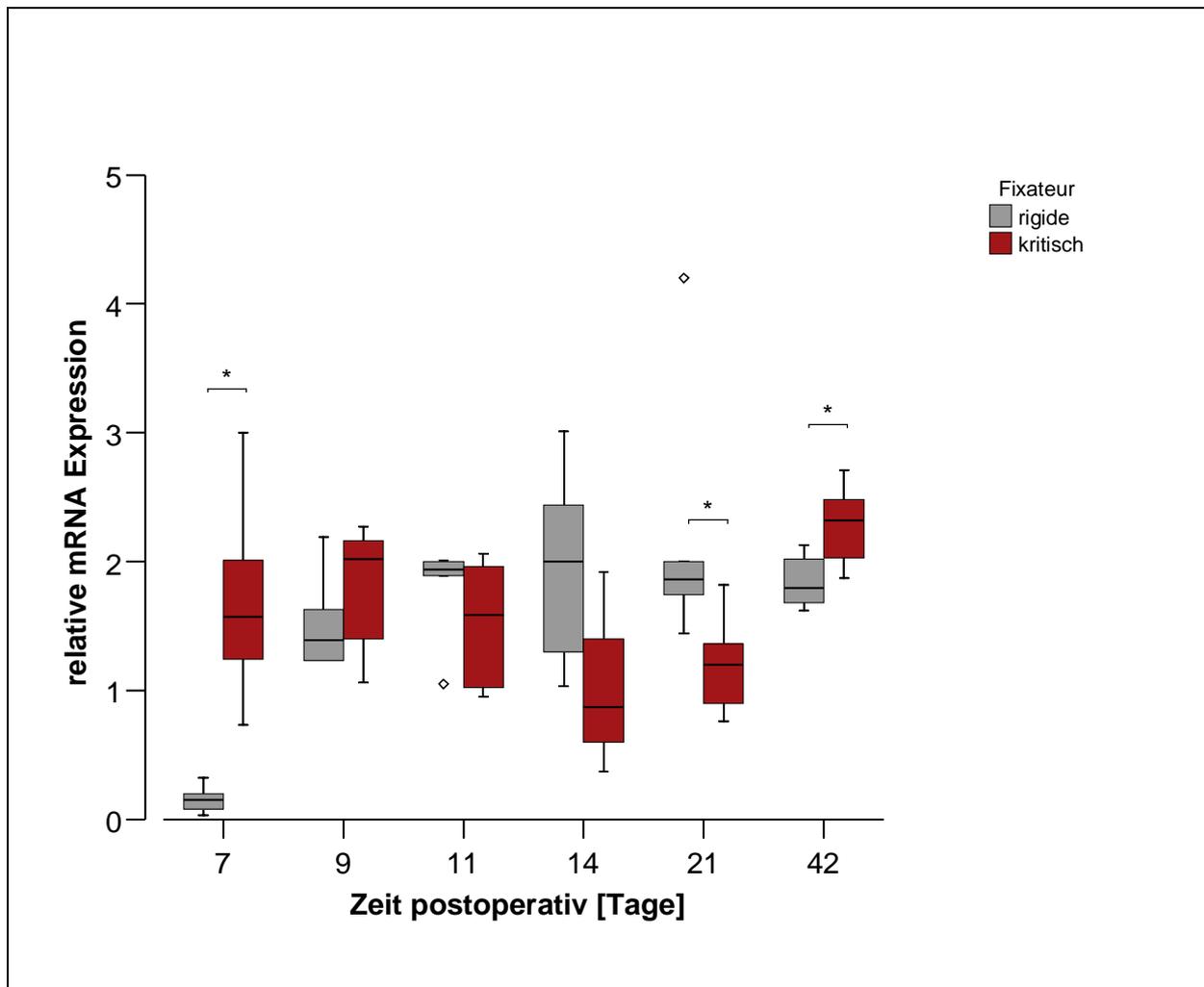


Abb.15:Relative mRNA-Expression von HIF1 α im Frakturhämatom nach rigider (grau) und kritischer (rot) Fixateurversorgung ($p^* < 0.05$, \diamond Extremwerte)

4.13 TNF α

Die gemessenen Daten für TNF α zeigten in Gruppe 1 (rigider Fixateur) ein uneinheitliches Bild. Der maximale Wert wurde in Gruppe 1 zum Zeitpunkt Tag 21 erreicht. In Gruppe 2 (kritischer Fixateur) stellte sich tendenziell ein einheitliches Bild dar, mit Werten die sich auf einem konstant bleibenden Niveau bewegten (Abb.16). Signifikant geringere Werte ergaben sich in Gruppe 2 am Tag 14 ($p=0,026$) im Vergleich zur Gruppe 1.

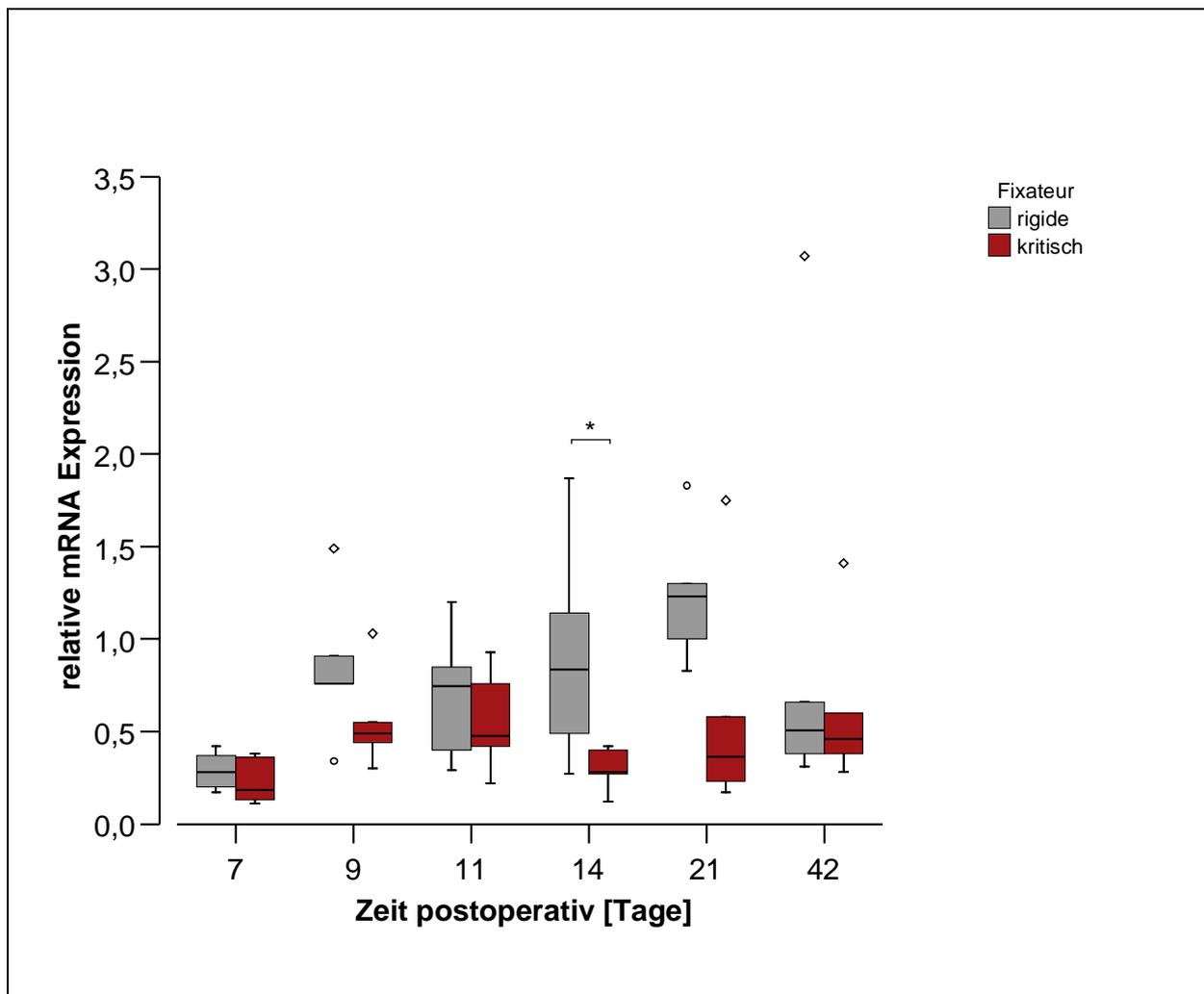


Abb.16:Relative mRNA-Expression von TNF α im Frakturhämatom nach rigider (grau) und kritischer (rot) Fixateurversorgung ($p^*<0.05$, ○ Ausreißer, ◇ Extremwerte)

4.14 PDGF

Sowohl für Gruppe 1 (rigider Fixateur) als auch für Gruppe 2 (kritischer Fixateur) wurden zwei Trends aus dem Expressionsmuster erkennbar (Abb.17). Es stellte sich ein zweigipfliger Verlauf mit einem Anstieg der Syntheseparameter im Zeitraum 9. bis 11.Tag dar, sowie ein erneuter Anstieg im Zeitraum 14. bis 42.Tag. Signifikante Unterschiede ergaben sich zu den Zeitpunkten Tag 14 ($p=0,041$) und 21 ($p=0,004$). Die maximalen Werte wurden in beiden Gruppen zum Zeitpunkt 11 Tage gemessen.

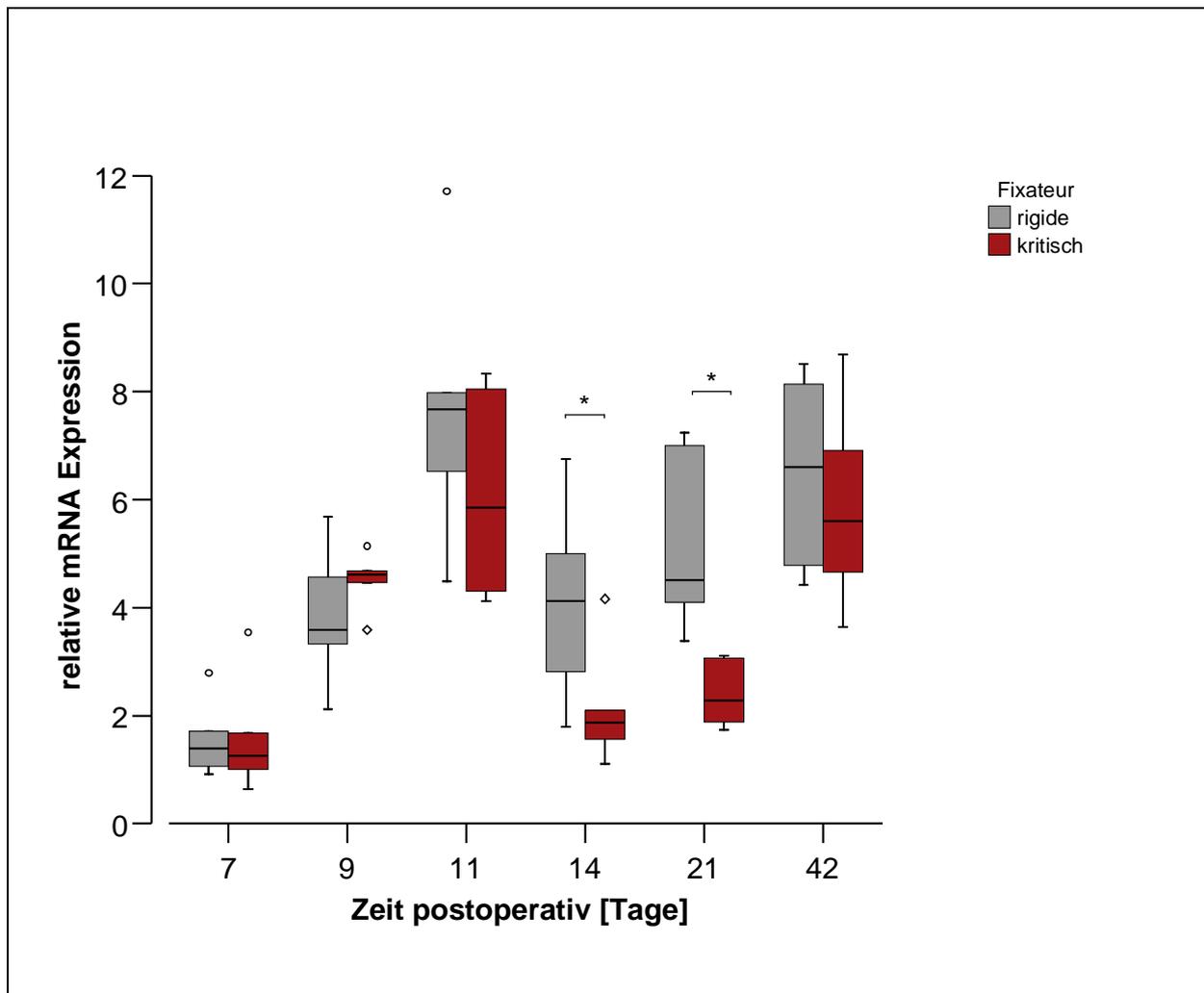


Abb.17:Relative mRNA-Expression von PDGF im Frakturhämatom nach rigider (grau) und kritischer (rot) Fixateurversorgung ($p^*<0.05$, \circ Ausreißer, \diamond Extremwerte)

4.15 IGF1

In beiden Gruppen konnte zum Zeitpunkt 7.Tag die minimale Konzentration an mRNA gemessen werden (Abb.18). Ein eindeutiger Trend ließ sich für beide Gruppen nicht bestimmen. Mit signifikant höheren Werten in Gruppe 1 (rigider Fixateur) als in Gruppe 2 (kritischer Fixateur) zu den Zeitpunkten Tag 11 ($p=0,041$) und 21 ($p=0,017$) wurde eine erhöhte mRNA Synthese im biomechanisch rigiden System verzeichnet.

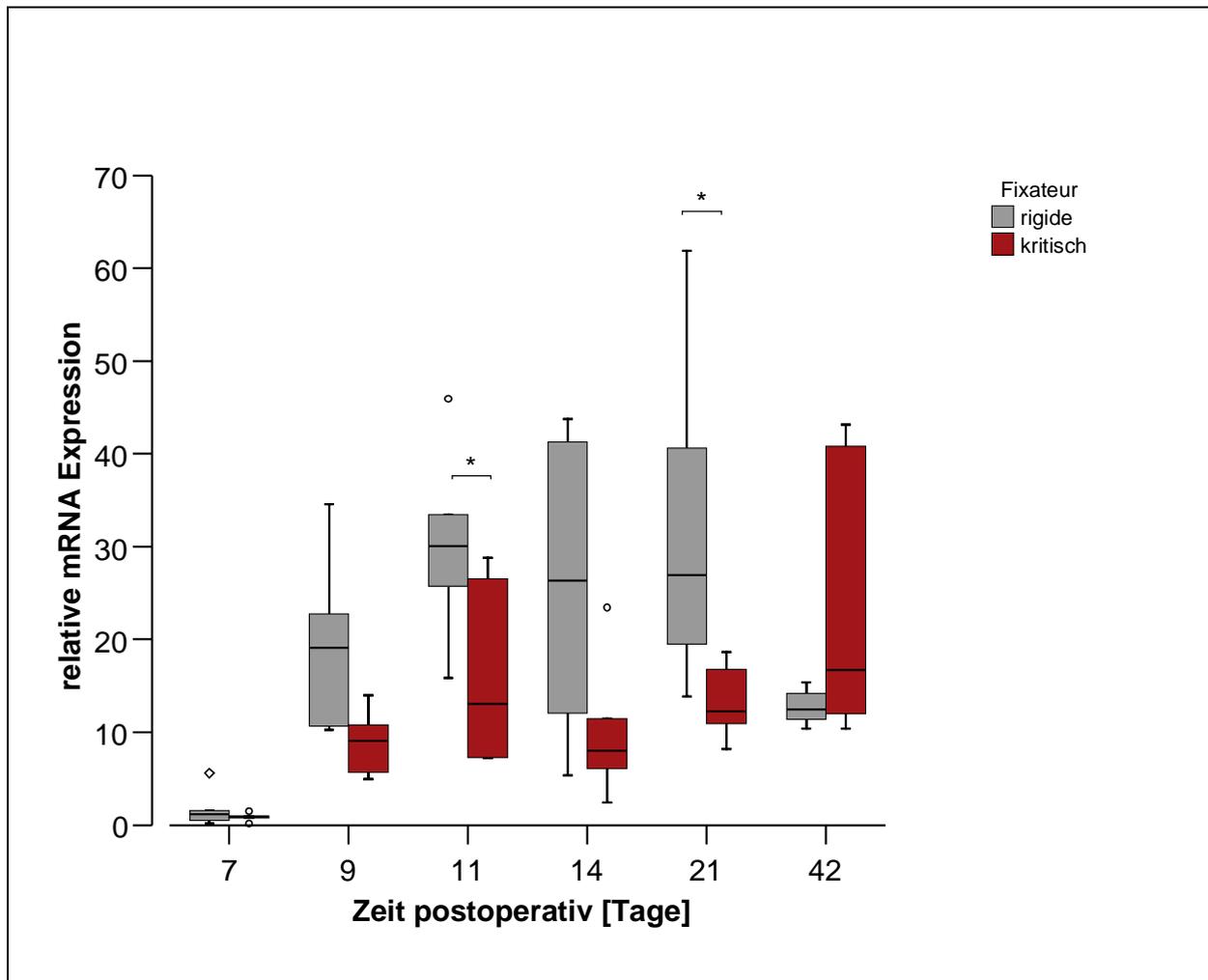


Abb.18:Relative mRNA-Expression von IGF1 im Frakturhämatom nach rigider (grau) und kritischer (rot) Fixateurversorgung ($p^* < 0.05$, \circ Ausreißer, \diamond Extremwerte)

4.16 iNOS

Für beide Gruppen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten maximale Werte gemessen (Abb.19). So zeigte sich in Gruppe 2 (kritischer Fixateur) ein eingipfliger Verlauf mit maximaler Expression am 11.Tag und in Gruppe 1 (rigider Fixateur) eine konstante Expression über die Zeit mit einer maximalen Syntheserate zum Zeitpunkt 42.Tag. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich der einzige signifikant Unterschiede ($p=0,002$) zwischen den einzelnen Heilungsverläufen.

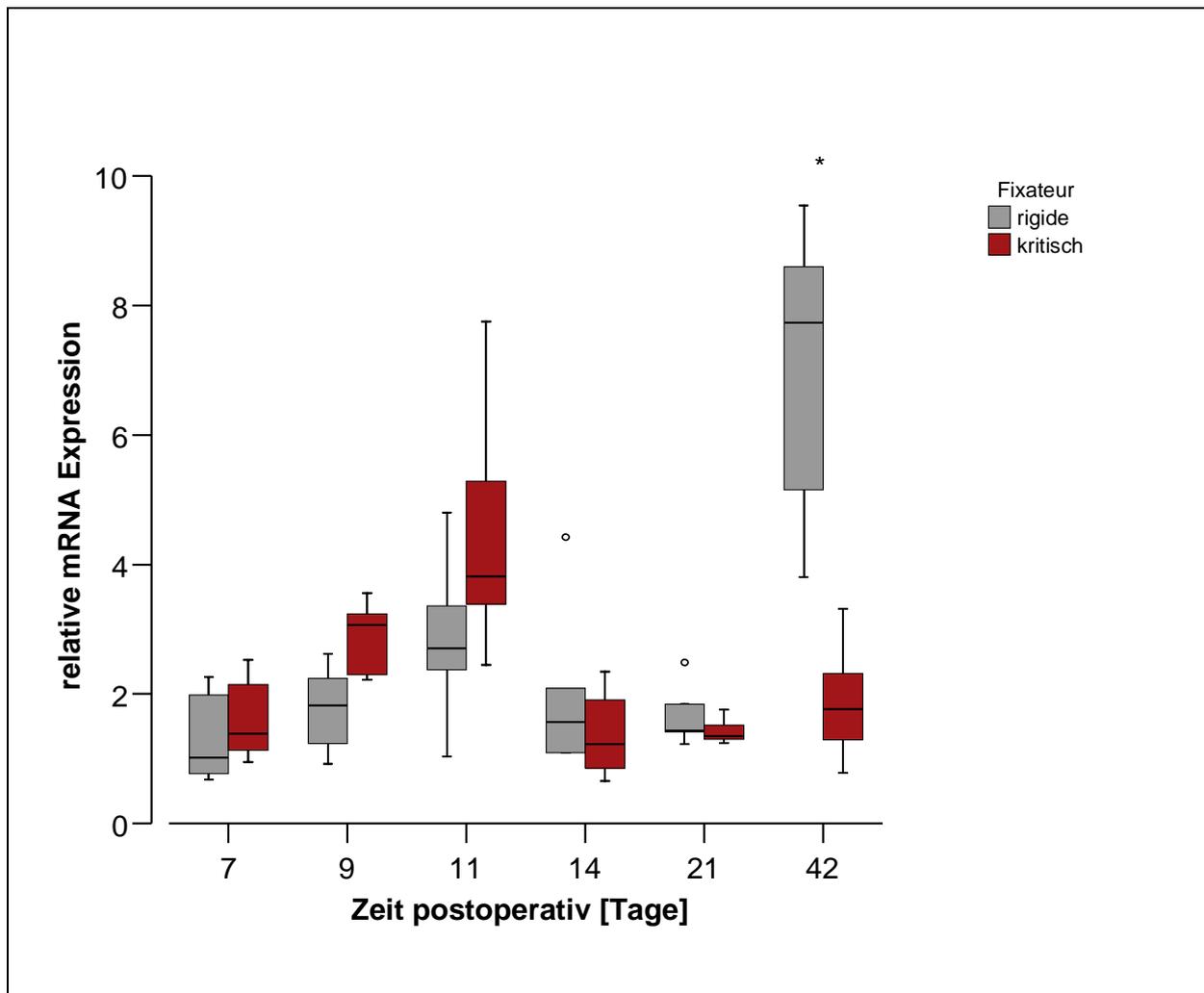


Abb.19:Relative mRNA-Expression von iNOS im Frakturhämatom nach rigider (grau) und kritischer (rot) Fixateurversorgung ($p^* < 0.05$, \circ Ausreißer)

5 Diskussion

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Studiendesign

Der Versuchsaufbau dieser Arbeit basierte auf dem im Julius Wolff Institut der Charité – Universitätsmedizin Berlin etablierten Tiermodell aus dem Jahr 2003 [169]. Nachfolgende Studien der Arbeitsgruppe [93, 170] orientierten sich an diesem experimentellen Frakturmodell, bei dem an der rechten Tibia eine Osteotomie mit einer Spaltgröße von 3 mm durchgeführt wurde. Die mediale Montageebene des Fixateur externe wurde auf Grund der günstigen anatomischen Gegebenheiten gewählt. Ohne Traumatisierung des umliegenden Weichteilmantels konnte hier das Osteosynthesematerial angebracht werden, so dass eine standardisierte komplikationslose Heilung erreicht wurde. Die in dieser Studie gewählte Distanz zwischen Haut und Fixateurstange unterschied sich je nach Fixateur. Bei der Versorgung mit dem rigiden System betrug der Abstand 15 mm. Die Stange des kritischen Fixateur externe dagegen wurde 20 mm von der Haut entfernt montiert. Je größer der Abstand zwischen der Tibia und dem Fixateur ist, desto instabiler werden seine Eigenschaften [171]. So wurde eine zusätzliche Möglichkeit genutzt, das kritische System noch instabiler zu gestalten.

5.1.2 Molekularbiologie

Die RNA-Gewinnung erfolgte auf Grundlage einer Menge von 1 g Material, welches in der Folge einer photometrischen Messung unterzogen wurde, um den Grad der Verunreinigung (Ratio) der jeweiligen Probe zu bestimmen. Dieser Wert wurde bestimmt aus dem Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm. Er sollte zwischen 1,8 und 2 liegen. Wird dieser Wert überschritten, so lassen sich neben der isolierten RNA noch weitere Zellbestandteile, d.h. Verunreinigungen in den Proben finden. Die Quantifizierung des Expressionsmusters der untersuchten Faktoren mittels Real-time PCR erfolgte relativ, wobei die Expression der Zielgene mit Hilfe eines nicht regulierten Referenzgens, in dieser Studie GAPDH, normalisiert wurde. Dabei werden nicht die absoluten Ausgangskonzentrationen bestimmt, sondern die Expression des zu untersuchenden Gens wird auf das zweite ubiquitär und homogen exprimierte Gen bezogen. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse. Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-

Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der Reversen Transkription innerhalb eines Zyklus betreffen sowohl den untersuchten Faktor als auch das Referenzgen [172].

5.2 Faktoren

5.2.1 VEGF, CYR61, HIF1 α , vWF

Werden die Expressionmuster der untersuchten Faktoren zu den festgelegten Beobachtungszeitpunkten in den beiden Gruppen miteinander verglichen, so zeigte sich, dass der 7. und der 21.Tag von besonderer Bedeutung sind. Es stellte sich eine verspätete Hochregulation der VEGF Expression und der CYR61 Expression an Tag 9 in Gruppe 2 (kritischer Fixateur) im Vergleich zu Gruppe 1 (rigider Fixateur) dar. VEGF und CYR61 sind Moleküle, die die Angiogenese vermitteln. Weiterhin ist durch die Arbeitsgruppe Street et al. bekannt, dass das Frakturhämatom angiogene Aktivität besitzt, die vornehmlich auf VEGF zurückzuführen ist [60]. Diese angiogene Potenz kommt jedoch erst zur Geltung, wenn die zytotoxischen Elemente resorbiert und die Auflösung des Blutgerinnsels organisiert ist [60]. So könnte sich erklären lassen, warum in Gruppe 2 die VEGF und CYR61 Expression verspätet auftrat. Die Expression der Moleküle in diesem Frakturhämatom ist verzögert auf Grund einer eventuell verlängerten Gewebehypoxie im Frakturhämatom bei größerer mechanischer Instabilität und einer längeren Persistenz zytotoxischer Elemente. In einer anderen Arbeit wurde das Frakturhämatom einer rigiden und kritischen Fixation zum Zeitpunkt 4 Tage untersucht [183]. Hierbei ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der rigiden und kritischen Fixation für CYR61 und VEGF feststellen. Daraus kann geschlossen werden, dass der 7.Tag einen Schlüsselzeitpunkt in der Vaskularisierung des ovinen Kallus darstellt. Die verminderte Expression von VEGF und CYR61 in Gruppe 2 ging mit einer erhöhten Expression der Rezeptoren VEGFR2 und TIE2 einher. Vermutlich führte eine verminderte frühe Vaskularisierung über einen Feedback Mechanismus zu einer Erhöhung der Transkription dieser Gene.

Weiterhin aufschlussreich zu diesem frühen Zeitpunkt war die HIF1 α Synthese. Diese zeigte in Gruppe 2 eine signifikant höhere Expression am 7.Tag als in Gruppe 1. Einer Studie von Komatsu und Hadjiargyrou zufolge, die Hypoxie als eine Ursache für die HIF1 α vermittelte Induktion von VEGF in Osteoblasten beschreiben [164], könnte sich dahinter eine Erklärung für die verspätete VEGF Synthese in Gruppe 2 verbergen. Da dieses Molekül bei sinkendem pO₂ synthetisiert

wird, könnte eine persistierende Hypoxie am 7.Tag in Gruppe 2 vorhanden sein, die sich auf die Synthese von VEGF am Tag 9 auswirken. Allerdings bleibt unklar, warum weitere Zielgene des HIF1 α wie TNF α , MMP2 und iNOS [164, 165], keinen Anstieg in Gruppe 2 verzeichneten. Speziell für iNOS konnte dieselbe Arbeitsgruppe in einem Frakturmodell für Ratten eine kongruente Erhöhung zu VEGF und HIF1 α 10 Tage nach der Fraktur zeigen [164]. Dies konnte in der vorliegenden Studie nicht dargestellt werden. Dieser Unterschied könnte darin begründet sein, dass mit verschiedenen Studiendesigns (Schafmodell versus Rattenmodell) gearbeitet und der Prozess der verzögerten Frakturheilung nicht untersucht wurde. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die Bestimmung der HIF1 α -Expression auf mRNA Ebene erfolgte und nicht auf Proteinebene.

Die vWF Expression, welche einen Marker für die vorhandenen Endothelzellen darstellt, zeigte an den Tagen 9, 11, 21 und 42 eine signifikant stärkere Expression in Gruppe 1 als in Gruppe 2. Weiterhin stellt sich eine maximale Konzentration an Tag 21 dar. Offensichtlich war in Gruppe 2 eine geringere Anzahl an Endothelzellen vorhanden und damit auch eine insuffiziente Angiogenese. Dieser Zusammenhang könnte sich mit der verminderten Expression von VEGF und CYR61 in Gruppe 2 erklären lassen, da diese beiden Faktoren in der Differenzierung und Rekrutierung von endothelialen Vorläuferzellen eine entscheidende Rolle spielen.

Im Jahre 2003 veröffentlichten Meyer et al. und Desai et al. Studien, in denen sie eine verzögerte mit einer normalen Frakturheilung verglichen und unter anderem das zeitliche Expressionsmuster von VEGF, VEGFR2 (Flk1), ANG1, ANG2 überprüften [30, 173]. Die verzögerte Heilung wurde dabei jedoch nicht - wie in dieser Studie - in Abhängigkeit vom biomechanischen Milieu untersucht, sondern in einen Zusammenhang mit dem Alter der Versuchstiere (Ratten) gestellt. Mit Ausnahme einer signifikant verlängerten Expression von VEGF und VEGFR2 mRNA nach 28 und 42 Tagen bei den älteren Tieren zeigten sich für diese Moleküle jedoch keine signifikanten Unterschiede [173]. Diese Messungen konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Zum Zeitpunkt 21 und 42 Tage stellte diese Arbeit eine signifikant geringere Expression von VEGF in Gruppe 2 dar. Der Grund für die geringere Expression von VEGF in Gruppe 2 könnte in der verminderten Osteoblastendifferenzierung liegen, denn Osteoblasten sind in der Lage sowohl VEGF zu produzieren als auch durch diesen stimuliert zu werden [43].

5.2.2 VEGFR2

Die durch Desai et al. publizierte signifikante Verlängerung der VEGFR2 Expression nach 4 Wochen konnte im Schafmodell nicht nachvollzogen werden. Vielmehr zeigte sich in beiden Gruppen eine annähernd gleiche Expression von VEGFR2 zum Zeitpunkt 21 Tage und 42 Tage. Wobei jedoch anzumerken ist, dass die Werte für VEGFR2 in Gruppe 2 zu diesen Zeitpunkten sehr variabel waren und somit eine vergleichende Aussage schwierig ist. Darüber hinaus bleibt unklar, warum die VEGFR2 Expression in beiden Gruppen in der frühen Phase der Frakturheilung erhöht war, während die VEGF Expression verringert war. Hier scheint es eine mögliche erhöhte Transkription des Rezeptors zu geben, die als Antwort auf die verminderte VEGF Expression verstanden werden könnte.

5.2.3 TIE2

Eine ähnliche Erklärung könnte für den Rezeptor TIE2 zutreffen. Dieser zeigte in der Gruppe der normalen Osteotomieheilung zum Zeitpunkt 7 Tage eine signifikant höhere Expression als in der Gruppe der verzögerten Frakturheilung. Eine weitere Erklärung für die erhöhte TIE2 Expression in Gruppe 2 könnte auch hier die Gewebehypoxie sein, denn diese ist ebenfalls ein potenter Stimulator der TIE2 Expression [21]. Zwei Faktoren, die an diesen Rezeptor binden und in der Frakturheilung eine wichtige Stellung einnehmen sind ANG1 und ANG2 [174].

5.2.4 ANG1, ANG2

Meyer et al. und Desai et al. konnten in Ihren Studien keine signifikanten Unterschiede für ANG1 und ANG2 zeigen. Der maximale Wert für ANG1 wurde an Tag 21 erreicht. Für ANG2 wurde eine signifikant geringere Expression an Tag 14 in Gruppe 2 gezeigt. Andere Arbeiten benennen mögliche Ursachen einer gesteigerten ANG1 und ANG2 Synthese. Danach führen Hypoxie, $TNF\alpha$ und VEGF zu einer gesteigerten ANG1, TIE2 und ANG2 Synthese [69, 70, 71]. Die vorliegende Studie unterstützt diese Aussage, da sowohl die ANG2 Synthese als auch die VEGF Synthese am Tag 21 in Gruppe 1 ansteigend waren. Weiterhin ist festzustellen, dass am 21.Tag vWF und FGF2 in Gruppe 2 signifikant geringer exprimiert werden als in Gruppe 1. Dies lässt darauf schließen, dass eine reduzierte Vaskularisierung im Frakturkallus vorherrscht und diese zu einer verzögerten oder insuffizienten enchondralen Ossifikation führte.

5.2.5 TNF α .

In der Literatur existieren wenige Studien, die sich mit der Genexpression von TNF α während der verzögerten Frakturheilung befassen. Bekannt ist jedoch, dass proinflammatorische Zytokine wie TNF α oder Interleukin-1 (IL1) bereits ab dem ersten Tag einer Verletzung exprimiert werden [175]. In dieser Arbeit zeigte sich für TNF α eine signifikant geringere Expression im kritischen System zum Zeitpunkt 14.Tag. Zu früheren Zeitpunkten wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen. Entgegen dem Hauptergebnis, das den 21.Tag als einen Schlüsselzeitpunkt der Frakturheilung darstellt, waren für TNF α keine signifikanten Unterschiede in der Expression zu verzeichnen. In einer anderen Arbeit, die das 4 Tage alte Frakturhämatom untersuchte, konnten für diesen Faktor ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen rigidem und kritischem System festgestellt werden [183]. Diese Beobachtung lässt die These zu, dass in dieser Phase der Frakturheilung TNF α keine entscheidende Rolle in der Entwicklung einer verzögerten Frakturheilung einnimmt. Jedoch sind dazu weitere Untersuchungen notwendig. Darüber hinaus koordiniert TNF α während der enchondralen Ossifikation die Expression von spezifischen Endothelzellmediatoren und Matrix-Metalloproteinasen [92]. So konnte die Arbeitsgruppe Lehmann et al. bei geblocktem TNF α Rezeptor eine verminderte Expression der Angiopoietine und Matrix-Metalloproteinasen feststellen, wohingegen die Expression von VEGF und VEGFR2 unverändert blieb [104]. In dieser Arbeit zeigte sich eine zeitliche Übereinstimmung in der Expression von TNF α und ANG2 am 14.Tag. Bei einer signifikant geringeren Expression von TNF α in Gruppe 2 war eine ebenso geringere Expression von ANG2 in Gruppe 2 zu verzeichnen. Wie stark dieser Zusammenhang ist, wurde im Rahmen dieser Studie nicht untersucht. Eine Erklärung für die verminderte Expression von TNF α im kritischen System bietet die Arbeit von Lehmann et al.. Danach führt eine verminderte TNF α Expression zu einer verzögerten Apoptose der Chondrozyten und diese wiederum zu einer verspäteten Resorption des Knorpels durch Osteoklasten [104]. Warum jedoch das TNF α Signal verringert war, bleibt ungeklärt. Es bedarf näherer Untersuchungen zum Verhalten von Zellen, die TNF α während der Frakturheilung exprimieren und zu den molekularen Regulationsmechanismen, denen sie unterliegen. Lehmann et al. beschrieben weitere Einflussfaktoren, die sich auf eine verzögerte Frakturheilung auswirken, so z.B. den Einfluss einer geringeren Synthese von MMP und TIMP auf die Art der Frakturheilung [104].

5.2.6 MMP-2, TIMP-1, TIMP-3

MMP und TIMP sind essentiell für den schnellen Umbau der extrazellulären Matrix und damit für die Knochenneubildung [174]. MMP2 ist von Bedeutung für die intramembranöse Ossifikation [114]. Ein spezifischer Inhibitor für MMP2 stellt TIMP3 dar [116]. Für TIMP3 konnte am Tag 21 eine signifikant gesteigerte Expression in Gruppe 1 im Vergleich zu Gruppe 2 festgestellt werden. Weiterhin zeigte sich für TIMP3 und MMP2 ein deutlicher Anstieg der Expression von Tag 14 zu 21 in Gruppe 1. Dies unterstreicht die Feststellung, den 21.Tag als einen Schlüsselzeitpunkt in der Frakturheilung zu betrachten. Während in Gruppe 1 die MMP2 Synthese von Tag 21 zu 42 stark abfällt, verbleibt die TIMP3 Synthese auf einem konstanten Niveau bestehen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die TIMP3 Synthese am 21.Tag zu einer verminderten Syntheserate von MMP2 am 42.Tag in Gruppe 1 führte und stützt die Aussage, dass ein Gleichgewicht zwischen Proteasen und deren Inhibitoren notwendig ist, um eine regelhafte Frakturkonsolidierung zu gewährleisten. Die Arbeitsgruppe von Niikura et al. zeigte, dass das optimale Verhältnis von osteogenen Faktoren und deren Antagonisten entscheidend ist für eine regelhafte Frakturkonsolidierung [176]. Sie stellten fest, dass bei einer verzögerten Frakturheilung das BMP herunter reguliert war und deren Antagonisten gleichzeitig nicht hoch reguliert waren [176]. Ferner konnten Qi et al. für TIMP3 einen Einfluss auf die Rezeptor-Liganden Verbindung VEGF/VEGFR1 und damit die Angiogenese zeigen [117]. Dieser Ansatz wurde in dieser Studie nicht berücksichtigt und könnte Gegenstand nächster Forschungsreihen sein. MMP9 ist ein weiterer Faktor in der enchondralen Ossifikation, der eine signifikante Rolle spielt [104]. In dieser Arbeit wurde TIMP1 als ein Antagonist von MMP9 betrachtet. Es zeigte sich eine signifikant höhere Expression in Gruppe 1 als in Gruppe 2 an den Tagen 14, 21, 42. Durch die Arbeit von Sobue et al. ist gezeigt worden, dass TIMP1 die Knochenresorption von Osteoklasten stimuliert [177]. Dies legt den Schluss nahe, dass im Zeitraum 14. bis 21.Tag eine verminderte TIMP1 Synthese mit einer insuffizienten enchondralen Ossifikation einhergeht und diese zur einer verzögerten Frakturheilung führt. Um für dieses Problem ein tieferes Verständnis zu entwickeln, wäre es von Vorteil gewesen, die zeitliche Expression von ADAMTS10 zu betrachten. Diese Protease ist ebenfalls an der Degradation und Synthese der EZM beteiligt und wird von TIMP1 inhibiert [116]. Eine Arbeit von Henle et al., befasste sich mit der Expression von MMP und TIMP im Serum von Menschen die entweder

eine verzögerte oder normale Frakturheilung aufwiesen [111]. Diese Arbeitsgruppe stellte für TIMP1 eine maximale Konzentration am 14.Tag in beiden Gruppen dar, sowie eine signifikant geringere TIMP1 Synthese in der Gruppe der verzögerten Frakturheilung am 7.Tag. Die maximalen Konzentrationen in der vorliegenden Studie wurden für beide Gruppen am 7.Tag detektiert und sind damit zu einem früheren Zeitpunkt vorhanden als in der Arbeit von Henle et al. Die Ursache könnte auch hier wieder im unterschiedlichen Studiendesign liegen, da in der vorliegenden Arbeit das Schafmodell verwendet wurde und dieses in der Frakturkonsolidierung zum Menschen zeitlich differierend ist.

5.2.7 FGF2

Dieser Faktor ist für den Umbau der EZM von Bedeutung. FGF2 kann sowohl die Expression von Matrix-Metalloproteinasen [164] als auch deren Inhibitoren wie TIMP1 und TIMP3 [178] erhöhen. Auch in diesem Expressionsmuster stellte sich der 21.Tag als ein Schlüsselzeitpunkt dar. In Gruppe 1 war ein stetiger Anstieg von Tag 11 bis 21 mit einem maximalen Wert an Tag 21 zu verzeichnen. Zu allen drei Zeitpunkten zeigte sich weiterhin eine signifikant höhere Expression in Gruppe 1 als in Gruppe 2. Es ließ sich beobachten, dass im Fall der verzögerten Frakturheilung FGF2 vermindert exprimiert wurde. In einer Studie von Miller et al. wurde bei FGF2 Knock out Mäusen eine verzögerte Wundheilung festgestellt [127]. Andere Studien zeigen, dass durch die gezielte Verabreichung von FGF2 die Frakturheilung unterstützt wird [128]. Insgesamt führen die Ergebnisse zu der Annahme, dass FGF2 die Frakturheilung durch ein Eingreifen in den Prozess der Angiogenese unterstützt. Welche Mechanismen hierbei von Bedeutung sind, ist nicht abschließend geklärt. Es bedarf genauerer Untersuchungen, in welchen Prozessen FGF2 während der Knochenheilung in die Angiogenese eingreift und welche Rolle die entsprechenden Rezeptoren und Liganden einnehmen.

5.2.8 PDGF, IGF1

Weitere Faktoren, die in dieser Arbeit betrachtet wurden, sind PDGF und IGF1. PDGF zeigte einen deutlichen Anstieg der Expression in beiden Gruppen vom 7. bis zum 11.Tag, jedoch ohne Signifikanz. Dies würde mit den Ergebnissen anderer Studien übereinstimmen, die im allgemeinen einen Anstieg der PDGF Expression während der Frakturheilung beobachteten [160]. Nachdem die Expression am Tag 14 herunterreguliert wurde, stieg sie bis zum 42.Tag wieder an. Von Bedeutung

erscheinen die Tage 14 und 21, da zu diesen Zeitpunkten die Synthese in Gruppe 2 signifikant geringer war als in Gruppe 1. Eine ähnliche Beobachtung konnte auch die Arbeitsgruppe von Zimmermann et al. machen, allerdings bei der Analyse humaner Serumproben. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass bis zu vier Wochen nach einer Fraktur die Konzentration von PDGF ansteigt und eine verminderte Expression mit einer verzögerten Frakturheilung einhergeht [162]. Diese Aussage konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, da am Tag 14 und Tag 21 eine signifikant geringere Expression für PDGF in Gruppe 2 gezeigt worden ist. Warum eine geringere PDGF Synthese zu einer verzögerten Frakturheilung führt, ist letztlich noch nicht endgültig erklärt. Ursächlich dafür könnten Probleme in der Reifung und Entwicklung von Chondrozyten, Fibroblasten oder Endothelzellen sein, die eine verminderte PDGF Synthese nach sich ziehen. Die parallele Betrachtung des Faktors TGF β wurde in der vorliegenden Arbeit nicht vorgenommen. Für PDGF und TGF β ist bekannt, dass beide Faktoren einer simultanen Regulation unterliegen [162]. IGF1 ist ein weiterer Faktor der mit PDGF während der Frakturheilung interagiert [27]. IGF1 ist während der Frakturheilung im Frakturspalt hochreguliert und kann Knochenwachstum induzieren [173]. Desai et al. untersuchte diesen Faktor. Im Unterschied zu dem Design dieser Studie verglichen sie junge mit alten Ratten hinsichtlich der Frakturheilung. Es zeigte sich eine maximale Konzentration von IGF1 in beiden Alterskategorien zwischen der 1. und 2. Woche [173]. Für IGF1 wurde eine signifikante Erhöhung 4 Wochen nach der Fraktur in der Gruppe der verzögerten Frakturheilung gemessen [173]. Weiss et al. konnten in einer Studie für IGF1 im Serum von Patienten keine signifikanten Unterschiede zwischen einer normalen und einer verzögerten Frakturheilung feststellen [179]. In dieser Studie zeigte sich für IGF1 eine höhere Genexpression zu den Zeitpunkten 9, 11, 14 und 21 Tage, wobei nur der 11. und 21. Tag signifikante Werte aufwies. Hier stellte sich in Gruppe 1 eine stärkere Genexpression als in Gruppe 2 dar. Auf Grund der unterschiedlichen Beobachtungen in den vorausgegangenen Studien sowie in dieser Studie, ist ein Vergleich der Expressionsmuster nicht eindeutig möglich. In Übereinstimmung mit der Feststellung, dass der 21. Tag ein Schlüsselzeitpunkt in der Frakturheilung darstellt, deutet sich auch für IGF1 eine Gewichtung an. Es ist anzunehmen, dass auf Grund der verminderten IGF1 Expression eine verzögerte Frakturheilung begünstigt wird. Die verminderte IGF1 Expression könnte sich auf eine Störung in der Reifung und Entwicklung von Chondrozyten und Osteoblasten zurückführen

lassen und damit eine verzögerte oder fehlerhafte enchondrale Ossifikation erklären. In wie weit eine kongruente Regulation mit PDGF erfolgte, ist aus den ermittelten Werten nicht abzuleiten. Es lässt sich feststellen, dass IGF1 und PDGF am Tag 21 signifikant höhere Werte für Gruppe 1 zeigten und dies mit einer verzögerten Frakturheilung einherging. Für die Interpretation der Ergebnisse ist es wichtig zu verstehen, dass IGF1 in seiner Konzentration exogenen und endogenen Einflüssen unterliegt und damit Messungen von IGF1 mit der nötigen Sorgfalt betrachtet werden müssen. Als Beispiel für derartige Einflüsse wären z.B. zu nennen, Ernährung, hyperkatabole Stoffwechsellage als Antwort auf ein gesetztes Trauma sowie eine extensive chirurgische Prozedur und Sepsis [179].

5.2.9 iNOS

Eines der essentiellen Enzyme in der Entzündungsphase ist iNOS. Dieses Enzym ist in der Lage, aus L-Arginin und Sauerstoff NO herzustellen, welches am Gefäßendothel eine Erschlaffung der Muskulatur bewirkt. Darüber hinaus induziert es die Synthese und Freisetzung von VEGF aus Endothelzellen [180]. Gleichzeitig ist auch VEGF in der Lage, die Synthese von NO zu induzieren, so dass ein positiver Feedbackmechanismus vorliegt und dieser als angiogener Stimulus wirken kann [180]. Die Bedeutung von iNOS für die Frakturheilung wurde in einigen Tiermodellen beschrieben [151, 152]. In dieser Studie wurde für iNOS ein Anstieg der Expression von Tag 7 bis 11 in beiden Gruppen beschrieben, jedoch ohne signifikante Unterschiede. In Übereinstimmung mit der Studie von Meyer et al., zeigt sich auch in dieser Arbeit die maximale Expression in der Gruppe der verzögerten Frakturheilung zwischen 1. und 2. Woche. Sowohl bei Meyer et al. als auch in dieser Arbeit waren keine signifikanten Unterschiede innerhalb der ersten 14 Tage zu verzeichnen. Der Anstieg der Expression innerhalb der ersten 14 Tage, deutet darauf hin, dass inflammatorische Zytokine die Expression von iNOS induzieren und eine Erschlaffung der Muskulatur am Endothel bewirken. Die iNOS Expression ist zu diesem Zeitpunkt erforderlich, da durch die Relaxation des Endothels ein Anstieg der Mikrozirkulation erfolgt [180]. Dies führt konsekutiv zu einer vermehrten Endothelzellproliferation [180]. Der einzige signifikante Unterschied in dieser Studie zeigte sich am 42. Tag. Dieser Beobachtungszeitpunkt fällt in die Phase des Remodelling. So stellte sich in Gruppe 2 eine signifikant geringere Expression als in Gruppe 1 dar. Als Erklärung dafür könnte eine verminderte Vaskularisierung des hypertrophen Knorpels dienen, welche zu einer gestörten Apoptose der

Chondrozyten mit konsekutiver Störung der Mineralisierung der Knochenmatrix führt. Welchen Anteil die verminderte Expression von iNOS an diesem Prozess und damit der verzögerten Frakturheilung hat, bleibt offen.

5.3 Kritische Bewertung der Ergebnisse

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten basieren auf der Quantifizierung der mRNA Expression angiogener Faktoren aus dem Frakturhämatom/Kallusgewebe. Die Expressionsmuster der einzelnen Faktoren wurden ohne die Messung des korrespondierenden Genproduktes verifiziert. Somit konnten keine Aussagen über Qualität und Quantität der im Frakturspalt wirkenden Proteine getroffen werden. Ein Nachteil dieser Studie ist, dass die gemessene mRNA Konzentration nicht mit der Produktion und Sekretion der entsprechenden Proteine korrelieren muss [181]. So ist es möglich, dass innerhalb des Syntheseweges Modifikationen vorgenommen werden und bereits synthetisierte mRNA durch RNasen abgebaut wird. Des Weiteren werden einige Proteine wie MMP2 als inaktive Vorstufen gebildet, die erst in der Folge aktiviert und damit biologisch wirksam werden. Aus diesem Grund sind die erzielten Ergebnisse mit der nötigen Sorgfalt zu betrachten und zu werten. Die unterschiedliche Expression der einzelnen Faktoren unterliegt weiteren Einflüssen als hier untersucht. Darüber hinaus üben die Faktoren selbst Wirkungen aus, die nicht nur in der Gefäßentwicklung eine Rolle spielen.

Verschiedene Studien versuchten den Anstieg von VEGF im peripheren Blut während einer verzögerten und einer regelhaften Frakturheilung zu dokumentieren [182]. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. In einer der nachfolgenden Arbeiten könnte also ein Schwerpunkt darin liegen, die in dieser Arbeit untersuchten Faktoren in denselben Zeiträumen im peripheren Blut zu evaluieren. Dadurch könnten sich Rückschlüsse hinsichtlich der Vergleichbarkeit von lokaler und systemischer Antwort ergeben. Aufbauend auf diesen Ergebnissen und dem aktuellen Stand der Forschung wäre es von großem Interesse die zeitlichen Expressionsmuster anderer Wachstumsfaktoren, wie z.B. BMP sowie deren Antagonisten, mit denen dieser Arbeit zu vergleichen. Hierdurch könnte sich ein genauerer Aufschluss über die Expressionsmuster ergeben und neue Hypothesen entwickelt werden, die eine Interaktion zwischen den einzelnen Faktoren beschreiben. Daraus könnte sich später ein klinischer Einsatz ableiten lassen, um problematische Heilungsverläufe durch eine gezielte Applikation von

Wachstumsfaktoren therapieren zu können. Weitgehend anerkannt ist, dass Komorbiditäten, die mit vermindertem Blutfluss einhergehen, die Frakturheilung negativ beeinflussen. Nach Auffassung des Autors sollten in den folgenden Arbeiten das Endothel und die durch die Volkskrankheiten entstehenden Schäden im Frakturmodell in den Mittelpunkt gestellt werden. So wäre ein Frakturmodell denkbar, dass die Expression von Wachstumsfaktoren unter Berücksichtigung verschiedenener Glucosespiegel oder Blutdruckzustände untersucht. Auf Grund des demographischen Wandels wird der multimorbide Patient im hohen Alter in den nächsten Jahren in den Mittelpunkt gesundheitlicher Betreuung rücken, so dass hier adäquate Behandlungsansätze zu verfolgen sein werden und diese sich in einer experimentellen Grundlagenforschung widerspiegeln.

Als wesentliches Ergebnis dieser Studie konnte gezeigt werden, dass zwischen einer Standarheilung und einer mechanisch induziert verzögerten Osteotomieheilung im Schafmodell eine unterschiedliche Regulation der Blutgefäßbildung vorherrscht. Somit scheint die Verzögerung der Frakturheilung maßgeblich durch die unterschiedliche Induktion der Gefäßausbildung beeinflusst zu sein. Folgerichtig bietet sich insbesondere die Überprüfung an, ob durch eine Supplementierung herabregulierter Faktoren der Blutgefäßbildung die Entstehung einer Pseudarthrose vermieden werden kann. Die vorliegende Arbeit bietet einen wesentlichen Wissensgewinn zur Identifizierung in Frage kommender Faktoren, auch wenn die Ergebnisse nur, wie oben erwähnt; in Zusammenhang mit der tatsächlichen Proteinexpression bewertet werden sollten.

6 Zusammenfassung

6.1 Zusammenfassung

Die Frakturheilung ist ein bedeutender physiologischer Prozess, der bis heute nicht in allen Einzelheiten verstanden ist. Verschiedene Krankheitsbilder ergeben sich aus der Störung dieses fein justierten Systems und bedingen die Notwendigkeit der genaueren Untersuchung. Einen entscheidenden Einfluss auf die Frakturheilung erzielen die mechanische Belastung im Frakturspalt sowie die Blutgefäßversorgung. Dabei wird die Formation neuer Blutgefäße während der Frakturheilung über verschiedene Proteine und Signalwege gesteuert. Die gemeinsame Betrachtung von unterschiedlichen mechanischen Rahmenbedingungen am Osteotomiespalt und die Auswirkungen auf die Genexpression angiogener Faktoren standen in dieser Studie im Vordergrund. Dazu wurde im Schafmodell eine standardisierte Osteotomie der rechten Tibia vorgenommen. Weiterhin erfolgte die Einteilung in zwei Gruppen, wobei die eine Gruppe zur Stabilisierung der Osteotomie einen rigiden Fixateur externe, die andere Gruppe einen kritischen Fixateur externe erhielt. Daraus ergaben sich unterschiedlich große interfragmentäre Bewegungen am Frakturspalt, die zu einer normalen Osteotomieheilung (rigide) oder zu einer verzögerten Osteotomieheilung (kritisch) führten. Zu verschiedenen Zeitpunkten postoperativ (Tag 7, 9, 11, 14, 21 und 42) wurde das Regeneratgewebe (Frakturhämatom, Kallus) entfernt und molekularbiologisch auf die Expression folgender Faktoren untersucht: VEGF, VEGFR2, ANG1, ANG2, TIE2, vWF, PDGF, MMP2, TIMP1, TIMP3, TNF α , HIF1 α , iNOS, IGF1 und FGF2. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen der verzögerten und normalen Osteotomieheilung. Für die Faktoren VEGF, CYR61, vWF, ANG1, ANG2, FGF2, MMP2, VEGFR2, TIMP1, TIMP3, HIF1 α , TNF α , PDGF, IGF1 und iNOS wurde eine deutlich geringere Expression in der verzögerten Osteotomieheilung im Vergleich zur normalen Heilung zu verschiedenen Zeitpunkten nachgewiesen. Weiterhin zeigte sich für die Faktoren VEGF und CYR61 ein verspäteter Anstieg der Expression während der verzögerten Osteotomieheilung. Basierend auf der Analyse der unterschiedlichen Expressionmuster einzelner Faktoren stellten sich die Zeitpunkte 7. und 21.Tag postoperativ offenbar als Schlüsselzeitpunkte in der Vaskularisierung des Frakturkallus dar. Der Einfluss biomechanischer Rahmenbedingungen auf die Genexpression zu den dargestellten Zeitpunkten wurde in dieser Studie sichtbar.

Damit konnte diese Arbeit zeigen, dass eine unterschiedliche Regulation in der Expression angiogener Faktoren während einer normalen und verzögerten Osteotomieheilung im Schafmodell vorherrscht.

Diese Studie stellt einen Beitrag zur Grundlagenforschung im Bereich der Frakturheilung dar. Ziel war es, die zeitliche Expression von Faktoren, die direkt oder indirekt die Blutgefäßbildung während der Knochenheilung regulieren, zu untersuchen und ihre Abhängigkeit von den mechanischen Gegebenheiten darzustellen. Hierzu wurde eine standardisierte Osteotomieheilung unter mechanisch rigiden Bedingungen mit einer verzögerten Osteotomieheilung unter mechanisch kritischen Bedingungen verglichen. Die mechanischen Gegebenheiten wurden durch die Wahl des Fixateur externe bestimmt. Das postoperativ entstandene Regeneratgewebe (Frakturhämatom, Kallus) wurde nach vorher definierten Zeitpunkten entnommen, molekularbiologisch aufgearbeitet und analysiert. Bei den Faktoren, die analysiert wurden, handelt es sich um Moleküle, die direkt und indirekt ihre Wirkung am Gefäßendothel entfalten oder am Umbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind. Des Weiteren wurde die Expression des endothelialen Markers vWF untersucht, um indirekt die Vaskularisierung im Gewebe darzustellen. Die eingangs der Arbeit formulierte Hypothese lautete, dass sich normale und verzögerte Osteotomieheilung in der Regulation der Blutgefäßbildung unterscheiden. Diese Hypothese konnte bestätigt werden. So zeigte sich in der verzögerten im Vergleich zur normalen Osteotomieheilung ein verzögerter Anstieg der Expression von VEGF und CYR61. Die zweite Hypothese lautete, dass die Expression angiogener Faktoren im biomechanisch kritischen Modell geringer ausgeprägt ist als in der rigiden Anordnung. Die Bestätigung dieser Hypothese erfolgte durch die Darstellung einer verminderten Expression von VEGF, CYR61, vWF, ANG1, ANG2, FGF2, MMP2, VEGFR2, TIMP1, TIMP3, HIF1 α , TNF α , PDGF, IGF1 und iNOS im biomechanisch kritischen Modell zu verschiedenen Zeitpunkten.

6.2 Abstract (english)

Blood vessel formation is a prerequisite for bone healing. In this study the hypotheses were tested that a delay in bone healing is associated with an altered regulation of blood vessel formation and the expression of angiogenic factors during critical bone healing is lower compared to a standard healing. A tibial osteotomy was performed in two groups of sheep and stabilized with either a rigid external fixator leading to standard healing or with a highly rotationally unstable one leading to delayed healing. At days 7, 9, 11, 14, 21, and 42 after surgery, total RNA was extracted from the callus. Gene expressions of vWF, an endothelial cell marker, and of several molecules related to blood vessel formation were studied by qPCR. mRNA expression levels of VEGF, CYR61, vWF, ANG1, ANG2, FGF2, MMP2, VEGFR2, TIMP1, TIMP3, HIF1 α , TNF α , PDGF, IGF1 and iNOS were distinctly lower in the delayed compared to the standard healing group at several time points. Furthermore a delayed increase of VEGF and CYR61 in the critical healing group was detected. Based on differential expression patterns, days 7 and 21 postoperatively were revealed to be essential time points for vascularization of the ovine fracture callus. This work demonstrates for the first time a differential regulation of blood vessel formation between standard and mechanically induced delayed healing in a sheep osteotomy model.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Statistisches Bundesamt. 2008. Gesund- Krankheitskosten 2002, 2004, 2006: Artikel-Nr. 5236301069004
- [2] Krettek C. 2009. Externe Stimulation der Knochenheilung. Unfallchirurg 112:5
- [3] Braun W, Ruter A. 1996. Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects. Unfallchirurg 99: 59-67
- [4] Henle P, Zimmermann G, Weiss S. 2005. Matrix metalloproteinases and failed fracture healing. Dec;37(6):791-8. Epub 2005 Sep 30
- [5] Kokubu T, Hak D.J, Hazelwood S.J. et al. Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur. J Orthop Res, 2003. 21(3): p. 503-10.
- [6] Utvag SE, Grundnes O, Reikeras O. 1998. Effects of lesion between bone, periosteum and muscle on fracture healing in rats. Acta Orthop Scand, 69(2): p. 177-80.
- [7] Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, et al. 1999. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during enchondral bone formation. Nat. Med 5: 623-628
- [8] Chang HN, Garetto LP, Potter RH, et al. 1997. Angiogenesis et ostogenesis in an orthopaedically expanded suture. Am J Orthod Dentofacial Orthop 111: 382-390
- [9] Weber BG, Cech O. 1973. Pseudarthrosen. Huber, Bern – Stuttgart – Wien. 1973
- [10] Rössler H, Rüter W. 2005. Orthopädie und Unfallchirurgie. Traumatologie. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München
- [11] Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, et al. 2003. Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. J Cell Biochem 88: 873-84
- [12] Remedios A. 1999. Bone and bone healing. Vet Clin North Am Small Anim Pract 29: 1029-44
- [13] Einhorn T. 1991. Mechanisms of fracture healing, Hosp.Pract.Off.Ed. 26 Suppl 1, :41-45

- [14] Brighton CT. 1984. The biology of fracture repair. Instr Course Lect 33: 60-82.
- [15] Carano RA, Filvaroff EH. 2003. Angiogenesis and bone repair. Drug Discov Today 8:980-9
- [16] Oestern HJ, Dürig M. 2003. Traumatologie. *Duale Reihe – Chirurgie*, 2.korrigierte Auflage ed, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- [17] Simmons DJ. 1985. Fracture healing perspectives. Clin Orthop 200: 100-13
- [18] Perren SM. 1979. Physical and biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation. Clin Orthop: 175-96
- [19] Probst A, Spiegel HU. 1997. Cellular mechanisms of bone repair. J. Invest. Surg. 10, 77-86
- [20] Wong HL., Wahl SM. 1991. Inflammation and repair. Sporn M.B. Roberts A.B. (Eds.): Peptide Growth Factors and Their Receptors I. Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, 509-548
- [21] Knighton DR, Hunt TK, Scheuenstuhl H. et al. 1983. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. Science 221, 1 3-1258
- [22] Lüllmann-Rauch R. 2003. Histologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- [23] Debrunner MA. 2005. Orthopädie und Orthopädische Chirurgie. 4.Auflage Verlag Hans Huber, Hogrefe AG, Bern
- [24] Einhorn TA. 1995. Current concepts review: enhancement of fracture healing. J Bone Joint Surg Am 77A: 940-956
- [25] Siska P, Gruen GS, Menzel C, Pape HC. 2009. Externe Supportiva zur Förderung der Frakturheilung. Unfallchirurg. 112:6-14
- [26] Hirner A, Weise K. 2004. Chirurgie Schnitt für Schnitt 1.Auflage Georg Thieme Verlag Stuttgart
- [27] Glowacki J. 1998. Angiogenesis in fracture repair. Clin Orthop 355(Suppl): S82-9. (Review)
- [28] Schell H, Epari DR, Kassi JP, Bragulla, Bail HJ, Duda GN. 2005 The course of bone healing is influenced by the initial shear fixation stability. J Orthop Res. 23 1022-1028

- [29] Streeten EA, Brandi ML. 1990. Biology of bone endothelial cells. *Bone Miner* 10: 85-94.
- [30] Meyer RA, Jr, Meyer MH, Tenholder M, et al. 2003. Gene expression in older rats with delayed union of femoral fractures. *J Bone Joint Surg Am* 85-A: 1243-54
- [31] Papetti M, Herman IM. 2002. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J. Physiol Cell Physiol* 282: C947-70
- [32] Gard S, Ertel W, Keel m, et al. 1998. Strongly enhanced serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) after polytrauma and burn. *Clin Chem Lab Med* 36: 379-383
- [33] Geiger F, Bertram H, Berger I, Lorenz H, Wall O, Eckhardt C, Simank HG, Richter W. 2005. Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J Bone Miner Res* 20:2028-2035
- [34] Tarkka T, Sipola A, Jämsä T, Soini Y, Ylä-Herttuala S, Tuukkanen J, Hautala T. 2003 Adenoviral VEGF-A gene transfer induces angiogenesis and promotes bone formation in healing osseous tissues. *J Gene Med* 5:560-566
- [35] Carmeliet P. 2000. Mechanism of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 6 (4), 389-395
- [36] Dor Y, Djonov V, Keshet E. 2003. Making vascular networks in the adult: branching morphogenesis without a roadmap. *Trends Cell Biol.* 13 (3), 131-136
- [37] Liekens S, De Clerq E, Neyts J. 2001. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 61: 253-70
- [38] Mark H, Penington A, Nanmark U, et al. 2004. Microvascular invasion during enchondral ossification in experimental rats. *Bone* 35: 535-542.
- [39] Hausmann MR, Schaffler MB, Majeska RJ. 2001. Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone* 29: 560-564.
- [40] Trueta J. 1963. The role of vessels in osteogenesis. *J Bone Joint Surg* 45B: 402-418
- [41] Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. 2007. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury*;38 (Suppl 1):S11-25

- [42] Bielby R, Jones E, McGonagle D. 2007. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury*; 38(Suppl 1):S26-32
- [44] Street JT, Wang JH, Wu QD, et al. 2001. The angiogenic response to skeletal injury is preserved in the elderly. *J Orthop Res* 19: 1057-66
- [44] Uchida S, Sakai A, Kudo H, et al. 2003. Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats. *Bone* 32: 491-501
- [45] Harry LE, Paleolog EM. 2003. From the cradle to the clinic: VEGF in developmental, physiological, and pathological angiogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69: 363-74
- [46] Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, and Dvorak AM. 1995. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 146: 1029-1039
- [47] Robinson CJ, Stringer SE. 2001. The splice variants of vascular endothelial growth factor(VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 114: 853-865
- [48] Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*;219:983-5
- [49] Ferrara N, Nenzel WJ. 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*;161: 851-8
- [50] De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck k, Ferrara N, and Williams LT. 1992. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255: 989-991
- [51] Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P. 1992. Identification of the KDR tyrosine kinase as receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 1579-1589
- [52] Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. 1997. Angiopoietin-2 a natural antagonist for Tie-2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277: 55-60

- [53] Jakeman LB, Winer J, Bennet GL, Altar CA, and Ferrara N. 1992. Binding sites for vascular endothelial growth factor are rare localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 89: 244-253
- [54] Quinn TP, Peters KG, de Vries C, Ferrara N, and Williams LT. 1993. Fetal liver kinase is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7533-7537
- [55] Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen, et al. 1995. Expression of the fms-like tyrosine-kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3566-3570
- [56] Kireeva ML, Mo FE, Yang GP, et al. 1996. Cyr61, a product of growth factor-inducible immediate early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. *Mol Cell Biol* 16:1326-1334
- [57] Matsumoto T, Mugishima H. 2006. Signal transduction via vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and their roles in atherogenesis. *J Atheroscler Thromb* 13: 130-5
- [58] Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajano I, et al. 2007. Vascular endothelial growth factor: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll cardiol* 49: 1015-26
- [59] Ferguson C, Alpern E, Miclau T, et al. 1999. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* 87: 57-66
- [60] Street J, Winter D, Wang JH, et al. 2000. Is human fracture hematoma inherently angiogenic? *Clin Orthop*: 224-37
- [61] Dimitriou R, Tsiridis E, Carr I, et al. 2006. The role of inhibitory molecules in fracture healing. *Injury*; 37 (Suppl 1): S20-9
- [62] Wang YQ, Luk JM, Chu AC, et al. 2006. TNP-470 blockage of synthesis is dependent on MAPK/Cox-2 Signaling pathway in PDGF-BB-activated hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 341: 239-44
- [63] Street J, Bao M, deGuzman L, et al. 2002. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9656-61

- [64] Yeh LC, Lee JC, 1999. Osteogenic protein-1 increases gene expression of vascular endothelial growth factor in primary cultures of fetal rat calvaria cell. *Mol Cell Endocrinol* 153: 113-124
- [65] Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, et al. 2002. Bone Morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 143: 1545-1553
- [66] Suri C, Jones PF, Patan S., et al. 1996. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE-2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87: 1171-1180
- [67] Davis S, Aldrich TH, Jones PF, et al. 1996. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE-2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87: 1161-1169
- [68] Thurston G, Suri C, Smith K, et al. 1999. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 286: 2511-2514
- [69] Park YS, KIM NH, Jo I. 2003. Hypoxia and vascular endothelial growth factor acutely up-regulate angiopoietin-1 and Tie-2 mRNA in bovine retinal pericytes. *Microvasc. Res*; 65: 125-31
- [70] Scott BB, Zaratin PF, Colombo A, Hansbury MJ, Winkler JD, Jackson JR. 2002. Constitutive expression of angiopoietin-1 and -2 and modulation of their expression by inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Rheumatol.*; 29: 230-9
- [71] Hangai M, Murata T, Miyawaki N, Spee C, Lim JI, He S, Hinton DR, Ryan SJ. 2001. Angiopoietin-1 upregulation by vascular endothelial growth factor in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*; 42: 1617-25
- [72] Schnurch H, Risau W. 1993. Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. *Development*. 119: 957-68
- [73] Runtig AS, Stacker SA, Wilks AF. 1993. tie2, a putative protein tyrosine kinase from a new class of cell surface receptor. *Growth Factors*. 9: 99-105
- [74] Anghelina M, Moldovan L, Moldovan NI. 2005. Preferential activity of Tie2 promoter in arteriolar endothelium. *J Cell Mol Med*. 9: 113-21
- [75] Nakayama T, Hatachi G, Wen CY, Yoshizaki A, Yamazumi K, Niino D, Sekine I. 2005. Expression and significance of Tie-1 and Tie-2 receptors, and angiopoietins-1,

2 and 4 in colorectal adenocarcinoma: Immunohistochemical analysis and correlation with clinicopathological factors. *World J Gastroenterol.* 11: 964–9

[76] Voskas D, Jones N, Van Slyke P, Sturk C, Chang W, Haninec A, Babichev YO, Tran J, Master Z, Chen S, Ward N, Cruz M, Jones J, Kerbel RS, Jothy S, Dagnino L, Arbiser J, Klement G, Dumont DJ. 2005. A cyclosporine-sensitive psoriasis-like disease produced in Tie2 transgenic mice. *Am J Pathol.* 166: 843–55

[77] Uchida T, Nakashima M, Hirota Y, Miyazaki Y, Tsukazaki T, Shindo H. 2000. Immunohistochemical localisation of protein tyrosine kinase receptors Tie-1 and Tie-2 in synovial tissue of rheumatoid arthritis: correlation with angiogenesis and synovial proliferation. *Ann Rheum Dis.* 59: 607–14

[78] Metheny-Barlow LJ, Tian S, Hayes AJ, Li LY. 2004. Direct chemotactic action of angiopoietin-1 on mesenchymal cells in the presence of VEGF. *Microvasc Res.* 68: 221–30

[79] Kosacka J, Figiel M, Engele J, Hilbig H, Majewski M, Spanel-Borowski K. 2005. Angiopoietin-1 promotes neurite outgrowth from dorsal root ganglion cells positive for Tie-2 receptor. *Cell Tissue Res.* 320: 11–9

[80] Iurlaro M, Scatena M, Zhu WH, Fogel E, Wieting SL, Nicosia RF. 2003. Rat aorta-derived mural precursor cells express the Tie2 receptor and respond directly to stimulation by angiopoietins. *J Cell Sci.* 116: 3635–43

[81] Brkovic A, Pelletier M, Girard D, Sirois MG. 2007. Angiopoietin chemotactic activities on neutrophils are regulated by PI-3K activation. *J Leukoc Biol.* 81: 1093–101

[82] Feistritzer C, Mosheimer BA, Sturn DH, Bijuklic K, Patsch JR, Wiedermann CJ. 2004. Expression and function of the angiopoietin receptor Tie-2 in human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 114: 1077–84

[83] Brigstock DR. 2003. The CCN family: a new stimulus package. *J. Endocrinol* 178: 169-175

[84] O'Brien TP, Yang GP, Sanders, et al. 1990. Expression of *cyr61*, a growth factor-inducible immediate-early gene. *Mol Cell Biol* 10: 3569-3577

[85] Perbal B. 2004. CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet* 363: 62-64

- [86] Yang GP, Lau LF. 1991. Cyr61, a product of growth factor- inducible immediate early gene, is associated with the extracellular matrix and the cell surface. *Cell Growth Differ* 2: 351-357
- [87] Babic AM, Kireeva ML, Koleshnikova, TV, et al. 1996. Cyr61, a product of growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl. Acad Sci USA* 95: 6355-6360
- [88] Fataccioli V, Abergel V, Wingertsman L, et al. 2002. Stimulation of angiogenesis by Cyr61 gene: a new therapeutic candidate. *Hum Gene Ther* 13: 1461-70
- [89] Kireeva ML, Latinkic BV, Koleshnikova TV, et al. 1997. Cyr61 and Fisp12 are both ECM-associated signaling molecules: activities, metabolism, and localization during development. *Exp Cell Res* 233: 63-77
- [90] O'Brien TP, Lau LF, 1992. Expression of the growth factor inducible immediate early gene *cyr61* correlates with chondrogenesis during mouse embryonic development. *Cell Growth Differ* 3: 645-654
- [91] Mo FE, Muntean AG, Chen CC, et al. 2002. CYR61 (CCN1) is essential for placental development and vascular integrity. *Mol Cell Biol* 22: 8709-20
- [92] Hadjiargyrou M, Ahrens W, Rubin CT. 2000. Temporal expression of the chondrogenic and angiogenic growth factor CYR61 during fracture repair. *J Bone Miner Res* 15: 1014- 23
- [93] Lienau J, Schell H, Epari DR, et al. 2006. CYR61 (CCN1) protein expression during fracture healing in an ovine tibial model and its relation to the mechanical fixation stability. *J Orthop Res* 24: 254-62
- [94] Schütze N, Kunzi-Rapp K, Wagemanns R, et al. 2005. Expression purification, and functional testing of recombinant CYR61/CCN1. *Protein Expr Purif* 42: 219-25
- [95] Schütze N, Noth U, Schneidereit J, et al. 2005. Differential expression of CCN-family members in primary human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation. *Cell Commun Signal* 3:5

- [96] Chen CC, Mo FE, Lau LF. 2001. The angiogenic factor Cyr61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 276: 47329-37
- [97] Beutler B and Cerami A. Cachectin and tumour necrosis factor as two si584 – 588, 1986. (cadherin-5/VE-cadherin). *J Clin Invest* 98: 886 – 893, 1996
- [98] Frater-Schroder M, Risau W, Hallmann R, Gautschi P, Bohlen P. 1987. Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth *in vitro*, is angiogenic *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* Aug; 84: 5277– 5281
- [99] Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N. 1987. Macrophage induced angiogenesis mediated by tumor necrosis factor. *Nature* 329: 630–632
- [100] Klagsbrun M, D'Amore P. 1991. Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 53: 217–239, 1991
- [101] Nanes MS. 2003. Tumor necrosis factor-alpha: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene*. Dec 4; 321: 1-15. Review
- [102] Schultz DR, Harrington WJ Jr. 2003 Apoptosis programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum*. Jun; 32(6): 345-69. Review
- [103] Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. 1999. Tumor necrosis factor receptor and fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol*. 17: 331-67. Review
- [104] Lehmann W, Edgar CM, Wang K, Cho TJ, Barnes GL, Kakar S, Graves DT, Rueger JM, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. 2005. Tumor necrosis factor-alpha coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases and angiogenic factors during fracture healing. 2005 Feb; 36(2): 300-10
- [105] Visse R, Nagase H. 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structur, function and biochemistry. *Circ Res*. May 2; 92(8): 827-39. Review
- [106] Stamenkovic I. 2003. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol*. 200(4): 448-64

- [107] Itoh, T. et al. 1998. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 58. 1048–1051 m/n
- [108] Onodera S, Nishihira J, Yamazaki M, et al. 2004. Increased expression of macrophage migration inhibitory factor during fracture healing in rats. *Histochem Cell Biol* 121: 209-17.
- [109] Uusitalo H, Hiltunen A, Soderstrom M, et al. 2000. Expression of cathepsins B, H, K, L, and S and matrix metalloproteinases 9 and 13 during chondrocyte hypertrophy and endochondral ossification in mouse fracture callus. *Calcif Tissue Int.* 67: 382-90
- [110] Yamagiwa H, Tokunaga K, Hayami T, et al. 1999. Expression of metalloproteinase-13 (Collagenase-3) is induced during fracture healing in mice. *Bone.* 25: 197-203
- [111] Henle P, Zimmermann G, Weiss S. 2005. Matrix metalloproteinases and failed fracture healing. *Dec; 37(6): 791-8.* Epub 2005 Sep 30
- [112] Johnson MD, Kim H-RC, Chesler L, Tsao-Wu G, Bouck N, Polverini PJ. 1994. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J. Cell. Physiol.* 160: 194-202
- [113] Unemori EN, Bouhana KS, Werb Z. 1990. Vectorial secretion of extracellular matrix proteins, matrix-degrading proteinases. and tissue inhibitor of metalloproteinases by endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 265: 445-451
- [114] Collins JM, Ramamoorthy K, Da Silveira A, et al. 2005. Expression of matrix metalloproteinase genes in the rat intramembranous bone during postnatal growth and upon mechanical stresses. *J. Biomech* 38: 485-92
- [115] Baker AH, Edwards DR, Murphy G. 2002. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 115: 3719-27
- [116] Baker HA, Dylan RE, Murphy G. 2002. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities *J. of Cell Science* 115: 3719-3727
- [117] Qi JH, Ebrahim Q, Moore N, Murphy G, Claesson-Welsh L, Bond M, Baker A, Anand-Apte B. 2003. A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med.* Apr; 9(4): 407-15.

- [118] Nagase H. 1998. Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration. *Cell Res.* 8(3): 179-86
- [119] Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, Wadzinski M, Ingber D, Vlodavsky I. 1998. A heparin-binding angiogenic protein—basic fibroblast growth factor—is stored within basement membrane. *Am J Pathol.* 130: 393–400
- [120] Healy AM, Herman IM. 1992. Density-dependent accumulation of basic fibroblast growth factor in the subendothelial matrix. *Eur J Cell Biol* 59: 56 – 67
- [121] Lind M. 1998. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Orthop Scand Suppl.* 283: 2-37
- [122] Wang JS. 1996. Basic fibroblast growth factor for stimulation of bone formation in osteoinductive or conductive implants. *Acta Orthop Scand Suppl* 269: 1-33.
- [123] Friesel RE, Maciag T. 1995. Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. *FASEB J.* 9: 919-25
- [124] Gospodarowicz D, Abraham JA, and Schilling J. 1989. Isolation and characterization of a vascular cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7311–7315
- [125] Terranova VP, DiFlorio R, Lyall RM, Hic S, Friesel R, Maciag T. 1985. Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *J Cell Biol* 101: 2330 – 2334
- [126] Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A. 1993. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72: 835 – 846
- [127] Miller DL, Ortega S, Bashayan O, Basch R, Basilico C. 2000. Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol Cell Biol* 20: 2260 – 2268
- [128] Radomsky ML, Thompson AY, Spiro RC, Poser JW. 1998. Potential role of fibroblast growth factor in enhancement of fracture healing. *Clin Orthop.* 355 Suppl: 283-93
- [129] Kato T, Kawaguchi H, Hanada K, Aoyama L, Hiyama Y, Nakamura T, Kuzutani K, Tamura M, Kurokawa T, Nakamura K. 1998. Single local injection of recombinant

fibroblast growth factor-2 stimulates healing of segmental bone defects in rabbits. *J Orthop Res.* 16: 654-9

[130] Nakamura T, Hara Y, Tagawa M, Tamura M, Yuge T, Fukuda H, Nigi H. 1998 Recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates fracture healing by enhancing callus remodeling in experimental dog tibial fracture. *J Bone Miner Res.* 13: 942-9

[131] DiCesare PE, Nimni ME, Peng L, Yazdi M, Cheung DT. 1991. Effects of indomethacin on demineralized bone-induced heterotopic ossification in the rat *J Orthop Res.* Nov; 9(6): 855-61.

[132] Eden S, Isaksson OG, Madsen K, Friberg U. 1983. Specific binding of growth hormone to isolated chondrocytes from rabbit ear and epiphyseal plate. *Endocrinology.* Mar; 112(3): 1127–1129

[133] Canalis E. 1997. Insulin-like growth factors and osteoporosis. *Bone*21: 215-216

[134] Ernst M, Froesch ER. 1988. Growth hormone dependent stimulation of osteoblast-like cells in serum-free cultures via local synthesis of insulin-like growth factor I. *Biochem Biophys Res Commun.* Feb 29; 151(1): 142-7

[135] Heemskerk VH, Daemen MA, Buurman WA. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and growth hormone (GH) in immunity and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* Mar; 10(1): 5-14

[136] Fournier T, Riches DW, Winston BW, Rose DM, Young SK, Noble PW, Lake FR, Henson PM. 1995. Divergence in macrophage insulin-like growth factor-I (IGF-I) synthesis induced by TNF-alpha and prostaglandin E2. *J Immunol.* 1995 Aug 15; 155(4): 2123-33

[137] Tsukahara H, Gordienko DV, Tonshoff B, Gelato MC, Goligorsky MS. 1994. Direct demonstration of insulin-like growth factor-I-induced nitric oxide production by endothelial cells. *Kidney Int.* Feb; 45(2): 598-604

[138] Trippel SB. 1998. Potential Role of Insulinlike Growth Factors in Fracture Healing *Clin Orthop Relat Res.* Oct; (355 Suppl): S301-13. Review

[139] Rechler MM, Nissley SP. The nature and regulation of the receptors for insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol.* 47: 425-42. Review

- [140] Andrew JG, Hoyland J, Freemont AJ, Marsh D. 1993. Insulinlike growth factor gene expression in human fracture callus. *Calcif Tissue Int.* 53: 97-102
- [141] Bak B, Jorgensen PH, Andreassen TT. 1990. Dose response of growth hormone on fracture healing in the rat. *Acta Orthop Scand.* 61: 54-7
- [142] Boonen S, Mohan S, Dequeker J, Aerssens J, Vanderschueren D, Verbeke G, Broos P, Bouillon R, Baylink DJ. 1999. Down-regulation of the serum stimulatory components of the insulin-like growth factor (IGF) system (IGF-I, IGF-II, IGF binding protein [BP]-3, and IGFBP-5) in age-related (type II) femoral neck osteoporosis. *J Bone Miner Res.* Dec;14(12): 2150-8
- [143] Wüster C, Abs R, Bengtsson BA, Bennmarker H, Feldt-Rasmussen U, Hernberg-Ståhl E, Monson JP, Westberg B, Wilton P. 2001. The influence of growth hormone deficiency, growth hormone replacement therapy, and other aspects of hypopituitarism on fracture rate and bone mineral density. KIMS Study Group and the KIMS International Board. Pharmacia & Upjohn International Metabolic Database. *J Bone Miner Res.* Feb; 16(2): 398-405
- [144] Furchgott RF, Jothianandan D. 1991. Endothelium-dependent and independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels.* 28(1-3): 52-61
- [145] Baldik Y, Diwan AD, Appleyard RC, Fang ZM, Wang Y, Murrell GA. 2005. Deletion of iNOS gene impairs mouse fracture healing *Bone.* Jul; 37(1): 32-6
- [146] Clancy RM, Amin AR, Abramson SB. 1998. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum.* Jul; 41(7): 1141-51
- [147] Nathan C. 1997. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest.* Nov 15; 100(10): 2417-23 Review
- [148] Reichner JS, Meszaros AJ, Louis CA, Henry WL Jr, Mastrofrancesco B, Martin BA, Albina JE. 1999. Molecular and metabolic evidence for the restricted expression of inducible nitric oxide synthase in healing wounds. *Am J Pathol.* Apr; 154(4): 1097-104
- [149] Shi HP, Most D, Efron DT, Tantry U, Fischel MH, Barbul A. 2001. The role of iNOS in wound healing. *Surgery.* Aug; 130(2): 225-9. Erratum in: *Surgery* Nov; 130(5): 808

- [150] Hornton FJ, Schäffer MR, Witte MB, Moldawer LL, MacKay SL, Abouhamze A, Tannahill CL, Barbul A. 1998. Enhanced collagen accumulation following direct transfection of the inducible nitric oxide synthase gene in cutaneous wounds. *Biochem Biophys Res Commun.* May 29; 246(3): 654-9
- [151] Yamasaki K, Edington HD, McClosky C, Tzeng E, Lizonova A, Kovesdi I, Steed DL, Billiar TR. 1998. Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J Clin Invest.* Mar 1; 101(5): 967-71
- [152] Diwan AD, Wang MX, Jang D, Zhu W, Murrell GA. 2000. Nitric oxide modulates fracture healing. *J Bone Miner Res.* Feb; 15(2): 342-51
- [153] Reigstad LJ, Varhaug JE, Lillehaug JR. 2005. Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family. *Febs J* 272: 5723-41
- [154] Tzeng DY, Deuel TF, Huang JS, Senior RM, Boxer LA, Baehner RL. 1984. Platelet-derived growth factor promotes polymorphonuclear leukocyte activation. *Blood.* Nov; 64(5): 1123-8
- [155] Horner A, Bord S, Kemp P, Grainger D, Compston JE. 1996. Distribution of platelet-derived growth factor (PDGF) A chain mRNA, protein, and PDGF-alpha receptor in rapidly forming human bone. *Bone.* Oct; 19(4): 353-62
- [156] Grotendorst GR. 1984. Alteration of the chemotactic response of NIH/3T3 cells to PDGF by growth factors, transformation, and tumor promoters. *Cell.* 1984 Feb; 36(2): 279-85
- [157] Narayanan AS, Engel LD, Page RC. 1983. The effect of chronic inflammation on the composition of collagen types in human connective tissue. *Coll Relat Res.* Jul; 3(4): 323-34.
- [158] Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. 1991. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 15; 88(20): 9267-71
- [159] Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, et al. 2002. Factors in the fracture microenvironment induce primary osteoblast angiogenic cytokine production. *Plast Reconstr Surg* 110: 139-48

- [160] Andrew JG, Hoyland JA, Freemont AJ, March DR. 1995 Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures. *Bone* 16(4): 455-460
- [161] Nash TJ, Howlett CR, Martin C, Steele J, Johnson KA, Hicklin DJ. 1994. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbit. *Bone* 15(2): 203-208
- [162] Zimmermann G, Henle P, Kuesswetter M, Moghaddam A, Wentzensen A, Weiss S. 2005 TGF- beta 1 as a marker of delayed fracture healing. *Bone* 36(5): 779-785
- [163] Löffler G., Petrides PE. 2003. *Biochemie und Pathobiochemie 7.Auflage* Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- [164] Komatsu DE, Hadjiargyrou M. 2003. Activation of the transcription factor HIF-1 and its target genes VEGF, HO-1, iNOS, during fracture repair. *Bone* 34(4): 680-688
- [165] Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* 9, 677-684 2003
- [166] Ruggeri ZM. 2003. Von Willebrandt factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost.* 1: 1335-1342
- [167] Gerritsen HE, Robles R, Lammle B, Furlan M. 2001. Partial amino acid sequence of purified von Willebrandt factor-cleaving protease. *Blood.* 98: 1654-1661
- [168] Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B, Chung D. 2001. Purification of human von Willbrandt factor-cleaving protease and its identification as a new member of metalloproteinase family. *Blood.* 98: 1662-1666
- [169] Klein P, Schell H, Streitparth F, et al. 2003. The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions. *J Orthop Res* 21: 662-669
- [170] Lienau J, Schell H, Duda GN, et al. 2004. Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability. *J Orthop Res* 23: 639-645
- [171] Claes L, Wolf S, Augat P. 2000. [Mechanical modification of callus healing]. *Chirurg* 71: 989-994
- [172] Pfaffl MW. 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 10: 92-95

- [173] Desai BJ, Meyer MH, Porter S, et al. 2003. The effect of age on gene expression in adult and juvenile rats following femoral fracture. *J Orthop Trauma* 17: 689-98
- [174] Pacicca DM, Patel N, Lee C, Salisbury K, Lehmann W, Carvalho R, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. 2003. Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis. *Bone*. Dec; 33(6): 889-98
- [175] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. 1999. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J* 18: 3964-72
- [176] Niikura T, Hak DJ, Reddi AH. 2006. Global gene profiling reveals a downregulation of BMP gene expression in experimental atrophic nonunions compared to standard healing fractures
- [177] Sobue T, Hakeda Y, Kobayashi Y, Hayakawa H, Yamashita K, Aoki T, Kumegawa M, Noguchi T, Hayakawa T. 2001. Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 directly stimulate the bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* 16, 2205-2214
- [178] Varghese S, Ramsby ML, Jeffrey JJ, Canalis E. 1995. Basic fibroblast growth factor stimulates expression of interstitial collagenase and inhibitors of metalloproteinases in rat bone cells *Endocrinology*. May; 136(5): 2156-62
- [179] Weiss S, Henle P, Bidlingmaier M, et al. 2007. Systemic response of the GH/IGF-1 axis in timely versus delayed fracture healing. *Growth Horm IGF Res.* Jun; 18(3): 205-12.
- [180] Cooke JP. 2003. NO and angiogenesis. *Atheroscler Suppl.* Dec; 4(4): 53-60. Review.
- [181] Grote K, Salguero G, Ballmaier M, et al. 2007. The angiogenic factor CCN1 promotes adhesion and migration of circulation CD34+ progenitor cells: potential role in angiogenesis and endothelial regeneration. *Blood* 100: 877-85
- [182] Sarahudi K, Thomas A, Braunsteiner T, et al. 2009. VEGF Serum Concentration in Patients with Long Bone Fractures: A Comparison between Impaired and Normal Fracture Healing. *Journal of Orthopaedic Research.* 20906

[183] Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Haschke F, Duda GN, Perka C, Bail HJ, Schütze N, Jakob F, Schell H. 2009. Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. *Journal of Orthopaedic Research*. Sep;27(9):1133-40

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADAMTS	A Disintegrin and Metalloproteinase Domain with Thrombospondin Motifs
ALS	Acid Lable Subunit
ANG	Angiopoietin
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
CYR61	Cysteine-rich Protein 61
CCN	CYR61/CTGF/NOV
CTGF	Connectiv Tissue Growth-Factor
C _t	Threshold Cycle
ΔC_t	Delta Threshold Cycle
d.h.	das heißt
EGF	Epidermal Growth Factor
ELF1	E74-like factor-1
EG-VEGF	Endocrine-Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor
EPO	Erythropoietin
EZM	extrazelluläre Matrix
FGF2	Fibroblast Growth Factor-2
Fik1	Fetal Liver Kinase-1
Flt4	Fms-Related Tyrosine Kinase 4
for	forwar
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
HIF1 α	Hypoxia-inducible Factor-1 alpha
IGF1	Insulin-Like Growth Factor
IGFBP	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
kDa	Kilodalton
KDR	Kinase Insert Domain-Containing Receptor/ receptors
kg	Kilogramm
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
mg	Milligramm
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
min	Minute
ml	Milliliter

mm	Millimeter
μl	Mikroliter
MMP	Matrix Metalloproteinase
Mrd.	Milliarden
mRNA	Messenger-RNA
MT-MMP	Membran Type Matrix Metalloproteinase
n	Anzahl
NERF2	New-Ets relatet factor-2
NO	Nitric Oxide
NOS	Nitric Oxide Synthetase
NOV	Nephroblastoma Overexpressed Protein
O ₂	Sauerstoff
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	potentia hydrogenii
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PIGF	PhosphatidyliNOSitol Glycan Anchor Biosynthesis, Class F
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
qRT-PCR	quantitative reverse transcription PCR
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
sog.	sogenannte
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta
TIE	Tunica Interna Endothelial Kinase
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases
TNF	Tumor Necrosis Factor
U	Units
u.U.	unter Umständen
v.a.	vor allem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor
vWF	von Willebrandt Factor
x g	Beschleunigung
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
%	Prozent
Ø	Durchmesser
°C	Grad Celsius
°	Grad

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Darstellung von Angiogenese, Arteriogenese und Vaskulogenese Witzenbichler B. 2008. Application of Angiogenic Growth Factors for the Treatment of Cardiovascular Diseasea	17
Abb. 2: Schafmodell mit Fixateur	31
Abb. 3: Schematische Darstellung des rigiden und kritischen Fixateur externe	32
Abb. 4: Relative mRNA-Expression von vWF im Frakturhämatom	39
Abb. 5: Relative mRNA-Expression von VEGF im Frakturhämatom	40
Abb. 6: Relative mRNA-Expression von VEGFR2 im Frakturhämatom	41
Abb. 7: Relative mRNA-Expression von CYR61 im Frakturhämatom	42
Abb. 8: Relative mRNA-Expression von ANG1 im Frakturhämatom	43
Abb. 9: Relative mRNA-Expression von ANG2 im Frakturhämatom	44
Abb.10: Relative mRNA-Expression von TIE2 im Frakturhämatom	45
Abb.11: Relative mRNA-Expression von FGF2 im Frakturhämatom	46
Abb.12: Relative mRNA-Expression von MMP2 im Frakturhämatom	47
Abb.13: Relative mRNA-Expression von TIMP1 im Frakturhämatom	48
Abb.14: Relative mRNA-Expression von TIMP3 im Frakturhämatom	49
Abb.15: Relative mRNA-Expression von HIF1 α im Frakturhämatom	50
Abb.16: Relative mRNA-Expression von TNF α im Frakturhämatom	51
Abb.17: Relative mRNA-Expression von PDGF im Frakturhämatom	52
Abb.18: Relative mRNA-Expression von IGF1 im Frakturhämatom	53
Abb.19: Relative mRNA-Expression von INOS im Frakturhämatom	54

Danksagung

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

Herrn Professor Dr.-Ing. Georg Duda danke ich für die Möglichkeit, mein Thema in seiner Forschungseinrichtung in die Praxis umsetzen zu können. Besonders anregend und hilfreich waren seine Kommentare zu meinen Vorträgen während der Doktorandenkolloquia.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Jasmin Lienau und Dr. Katharina Schmidt-Bleek für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Sie standen mir jederzeit mit hervorragender fachlicher Kompetenz und unendlicher Geduld bei der Beantwortung meiner Fragen sowie bei der Überwindung jedes noch so kleinen Problems zur Verfügung. Sie haben meine ersten Entwürfe, und alles was darauf folgte, Korrektur gelesen.

Danken möchte ich auch Norma Schulz für Ihren unermüdlichen Eifer und manch aufmunternden Satz während der vielen Stunden im Labor. Vielen Dank für Deine Hilfe.

Ein großer Dank gilt meiner Mutter, die mit Ihrem scharfen und genauen wissenschaftlichen Verstand die Arbeit Korrektur gelesen hat und mir in schwierigen Phasen Mut zugesprochen hat.

Zum Schluss noch einen ganz großen Dank an meine Freundin, die zu jedem Zeitpunkt hinter mir stand und mir trotz Ihrer eigenen Belastung immer Rückhalt gegeben hat. Danke Dir!

Erklärung an Eides Statt

„Ich, Franek Haschke, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Vergleichende Analyse des zeitlichen Genexpressionsmusters angiogener Faktoren während einer normalen und einer verzögerten Osteotomieheilung selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Publikation

Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Haschke F, Duda GN, Perka C, Bail HJ, Schütze N, Jakob F, Schell H. 2009. Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. *Journal of Orthopaedic Research*. Sep;27(9):1133-40