Aus dem Julius Wolff Institut der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

# DISSERTATION

# Expressionsanalytischer Vergleich der chondrogenen und osteogenen Wachstumsfaktoren im ovinen Frakturheilungsverlauf zwischen rigidem und kritischem Fixateur externe

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Arvid Roeger aus Berlin Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. H. J. Bail2. Prof. Dr. med. C. Heiß3. Priv.-Doz. Dr. med. A.C. Disch

Datum der Promotion: 30.11.2012

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1	-
2.	Grundlagen	3	-
	2.1. Knochenaufbau	3	-
	2.2. Frakturheilung	4	-
	2.2.1. Primäre Frakturheilung	4	-
	2.2.2. Sekundäre Frakturheilung	4	_
	2.2.3. Phasen der Frakturheilung	6	_
	2.3. Biomechanische Einflüsse auf die Frakturheilung	- 10	_
	2.3.1 Der Fixateur externe	- 11	_
	2.4 Verzögerte und ausbleibende Frakturheilung und Pseudarthrosenbildung	- 12	_
	2.4.1 Beeinflussung der Frakturheilung durch die Fixationssysteme	- 13	_
	2.4.2 Finfluss der mechanischen Bedingungen auf osteogene	15	
	Wachstumsfaktorennroduktion	- 15	_
	2.5 Wachstumsfaktoren / Extrazellularmatrixkomponenten	- 16	_
	2.5.1 Signaltransduktion der Wachstumsfaktoren an Zellmembranen	- 16	
	2.5.2. Transforming Growth Easter 8 (TCE 8)	- 10	
	2.5.2. Transforming Orowull Pactor D (TOP-D)	- 10	-
	2.5.5. Done Worphogenetic Protein (DWP) und der Antagonist Noggin	- 10	-
	2.5.4. Osteoprotegerin (OPG) / Makrophage-colony-sumulationg factor (M-CSF)	- 19	-
	2.5.5. Extrazellularmatrixkomponenten	- 21	-
	2.5.6. Kollagen-1a1, -11, -Xa1	- 21	-
	2.5.7. Osteopontin (OPN).	- 24	-
	2.5.8. Matrix-metalloproteinase 9/13 (MMP 9/13)	- 25	-
	2.6. Problemstellung	- 26	-
_	2.6.1. Zielsetzung / Arbeitshypothese	- 26	-
3.	Material/ Methoden	- 28	-
	3.1. Versuchsanordnung	- 28	-
	3.2. Versuchstiere	- 28	-
	3.2.1. Erstuntersuchung der Tiere	- 29	-
	3.3. Operationsvorbereitung und Narkose	- 29	-
	3.4. Operation	- 30	-
	3.5. Aufarbeitung der Gewebe	- 34	-
	3.6. Analysemethoden	- 37	-
	3.7. Statistische Auswertung	- 40	-
4.	Ergebnisse	- 41	-
	4.1. Quantitative Real-time PCR der Wachstumsfaktoren	- 41	-
	4.1.1. BMP-2	- 41	-
	4.1.2. BMP-4	- 42	-
	4.1.3. BMP-7	- 44	-
	4.1.4. Noggin	- 46	-
	4.1.5. TGF-β1	- 47	-
	4.1.6. M-CSF	- 49	-
	4.1.7. OPG	- 50	-
	4.2. Quantitative RT - PCR der Extrazellulärmatrixsubstanz	- 52	-
	4.2.1. Kollagen Ia1	- 52	-
	4.2.2. Kollagen IIa1	- 53	-
	4.2.3. Kollagen Xa1	- 55	-
	4.2.4. OPN	- 56	-
	4.2.5. MMP-9	- 58	-
	4.2.6. MMP-13	- 59	-
5.	Diskussion	- 61	-

5.1. Diskussion von Material und Methode	62 -
5.1.1. Modell	62 -
5.1.2. Osteosynthesemodelle	63 -
5.1.3. postoperativer Beobachtungszeitaum	64 -
5.1.4. Probengewinnung und Aussagekraft der Analysemethode	65 -
5.2. Diskussion der Ergebnisse	66 -
5.2.1. Verzögerte Frakturheilungsmodelle	67 -
5.2.2. Expression der osteogenen Wachstumsfaktoren in Abhängigkeit von der	
Frakturstabilität	70 -
5.2.3. Expression der Extrazellulärmatrix und matrixdegradierender Enzyme in	
Abhängigkeit von der Frakturstabilität	77 -
5.3. Ausblick	84 -
6. Zusammenfassung	86 -
6.1. Summary	88 -
7. Literaturverzeichnis	89 -
8. Anhang	105 -
8.1. Danksagung	105 -
8.2. Erklärung über die eigenständig verfasste Arbeit	106 -
8.3. Lebenslauf	107 -

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	=	Abbildung
ADP	=	Adenosin-diphosphat
BMP	=	Bone morphogenetic protein
BMP-R	=	Bone morphogenetic protein-receptor
bzw.	=	beziehungsweise
ca.	=	circa
cDNA	=	complementary Desoxyribonuclein acid
d	=	Tag
d.h.	=	das heißt
DNA	=	Desoxyribonuclein acid
FH	=	Frakturhämatom
FGF	=	Fibroblast growth factor
GDF	=	Growth differentiation factor
GH	=	Growth hormone
GHRH	=	Growth hormone-releasing hormone
h	=	Stunde
IFM	=	Interfragmentary Motion
IGF	=	Insuline-like growth factor
IL	=	Interleukin
LPS	=	Lipopolysaccharide
M-CSF	=	Macrophagen-colony stimulation factor
MMP	=	Matrix-metalloproteinase
m-RNA	=	messenger Ribonuclein acid
NSAR	=	Nicht steroidale Antirheumatika
oGAPDH	=	ovine Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
OPG	=	Osteoprotegerin
OPN	=	Osteopontin
PAF	=	platelet activating-factor
PDGF	=	Platelet derived growth factor
PDLLA	=	Poly-(D,L)-Laktid
RANKL	=	receptor activator of NF-KB Ligand
RNA	=	Ribonuclein acid
RT-PCR	=	Reverse Transkription-Polymerase Chain Reaction

V

SMAD	=	(small body size)-(mother against decapentaplegic)
TGF-ß	=	Transforming growth factor-ß
TOI	=	Toy of Interest
u.a.	=	unter anderem
v.a.	=	vor allem
VEGF	=	Vascular endothelial growth factor
VEGF-R	=	Vascular endothelial growth factor - receptor

## 1. Einleitung

Die Frakturheilung ist ein in der Natur nahezu einzigartiger Prozess, bei dem es nach der Gewebezerstörung des Knochens nicht nur zu einer Reparation, sondern zu einer Restitutio ad integrum kommt. Sie kann dabei als ein modifiziertes postnatales Geschehen der embryonalen Knochenentwicklung angesehen werden (Gerstenfeld et al., 2003).

Die Frakturheilung ist ein komplexes biologisches Ereignis, das nur durch das exakte Zusammenspiel von mechanischen, zellulären, biochemischen und nutritiven Faktoren zur komplikationslosen Heilung führt. Dafür ist die Aktivität von zahlreichen Zelltypen, v.a. der mesenchymalen Zelllinien und deren Proliferation, Migration, Differenzierung und Zytokinproduktion eine unabdingbare Voraussetzung. Im Verlauf des Heilungsprozesses setzen diese Zellen, zeitlich genau aufeinander abgestimmt, weitere Wachstumsfaktoren frei, so dass der Prozess mit sich überlappenden Frakturheilungsphasen aufrechterhalten und vorangetrieben wird. Trotz der aktuellen medizinischen Möglichkeiten und des ständigen Fortschritts kommt es im Bereich der Tibia in 10-15 % der Fälle zu einer verzögerten bzw. ausbleibenden Frakturheilung mit Pseudarthrosenbildung, die wiederum Schmerzen, Deformationen, Bewegungseinschränkung und Behinderung nach sich ziehen (Carano and Filvaroff, 2003). In zahlreichen Studien sind die Einflüsse, die sich negativ auf die Frakturheilung auswirken, demonstriert worden. Hierzu gehören neben einer insuffizienten Blutversorgung die inadäquate Stabilisierung der Knochenfragmente, die mangelhafte Erkrankungen, Medikamentengabe Knochenapposition, systemische Infektionen. (Kortikosteroide, NSAR), Mangelernährung, Nikotin, Stoffwechselstörungen als auch fortgeschrittenes Lebensalter (Glowacki, 1998, Hollinger et al., 1999).

Neben einer Verbesserung der unfallchirurgischen Operationstechniken liegt ein Schwerpunkt der Forschung in der Entwicklung neuer Implantatmaterialien. Ferner wird versucht, die Knochenheilung durch lokale oder systemische Applikation von Wachstumsfaktoren zu stimulieren und damit zu verbessern. Um diese Applikation den zeitlichen und räumlichen Notwendigkeiten anzupassen, ist das Verständnis des biologischen Heilungsverlaufs im normalen, als auch im Defektheilungsmodell eine unabdingbare Voraussetzung.

Hierfür wurde im vorliegenden Projekt der Vergleich zwischen einem standardisierten Frakturheilungsmodell mit Defektzone und einem instabilem Frakturheilungsmodell untersucht, bei dem es durch mechanische Instabilität nicht nur zu einer verzögerten bzw. ausbleibenden Frakturkonsolodierung kommt, sondern sich auch der Verlauf der Knochenheilung über unterschiedliche Wege und Gewichtung bezüglich der intramembranösen und der enchondralen Ossifikation verändert darstellt (Lienau et al., 2005, Epari et al., 2006).

Inwieweit diese verzögerte Frakturheilung durch mechanische Instabilität in ein molekularbiologisches Signal transformiert wird und sich als Veränderung der Wachstumsfaktorenexpression manifestiert, ist ungeklärt und soll Gegenstand dieses Forschungsvorhabens sein.

## 2. Grundlagen

### 2.1. Knochenaufbau

Das Knochenskelett bildet die Formgebung für unseren Körperbau. Der Knochen an sich gehört zu den stabilsten Geweben, die die Natur hervorgebracht hat. Der Knochen ist jedoch kein starres unveränderliches Gewebe, sondern befindet sich in ständigem Umbau, um seine Stabilität an sich ändernde Druck-, Zug-, Dreh- und Biegungskräfte anzupassen (Cruess and Dumont, 1975, McKibbin, 1978). Die Tibia wird als sogenannter Röhrenknochen bezeichnet und besitzt den typischen Aufbau aus Diaphyse (Knochenschaft), Metaphyse (Übergangszone) und Epiphyse (Gelenkflächenanteil). Makroskopisch gesehen kann man im diaphysären Bereich einen kortikalen (Substantia compacta) und einen spongiösen Anteil (substantia spongiosa) unterscheiden. Die Substantia compacta verschafft dem langen Röhrenknochen die Rigidität, um den mechanischen Anforderungen zu widerstehen (Radasch, 1999). Histologisch gesehen besteht der Knochen aus den knochenspezifischen Zellen und der Interzellulärsubstanz, welche sich aus der organischen Matrix und den anorganischen Salzen zusammensetzt. Im Bereich der Kortikalis ist die Interzellulärsubstanz in Form von Lammellen angeordet. Diese sind konzentrisch um den Zentralkanal angeordnet und bilden mit ihm das sogenannte Osteon bzw. Havers-System. Untereinander kommunizieren die Havers-Kanäle durch senkrecht zu ihnen verlaufende Volkmannsche-Gefäßkanäle. Über diese Kanäle besteht auch eine Verbindung zur Knochenoberfläche und in die Spongiosa hinein. Die Spongiosa ist ein netzförmig angeordnetes System aus Knochenbälkchen, in deren Zwischenraum das Knochen- bzw. Fettmark liegt (Ritzel et al., 1996). Sie besteht aus trabekulär angeordnetem Lamellenknochen, jedoch ohne Zentralkanal im Sinne eines Osteons (McKibbin, 1978).

Der organischen Matrix aufsitzend sind ferner die zellulären Knochenbestandteile. Diese sind für die fortwährend ablaufenden Umbauprozesse im Knochen verantwortlich. Hierzu gehören Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten, welche die sogenannten gewebsspezifischen Knochenzellen darstellen (Radasch, 1999).

Osteoblasten gehen aus pluripotenten mesenchymalen Stammzellen hervor, welche sich zunächst in Vorläuferzellen und später zu Osteoblasten differenzieren (Yoo and Johnstone, 1998). Sie sitzen der Knochenoberfläche auf und sind für die Neusynthese der Knochengrundsubstanz im Extrazellulärraum verantwortlich. Sie bilden das sogenannte Osteoid, von welchem sie schließlich eingemauert werden. Im Rahmen des ablaufenden Mineralisationprozesses formen sich die Osteoblasten zu Osteozyten um. Diese liegen von Osteoid umschlossen vor und sind nicht mehr zur Neusynthese von Knochengrundsubstanz

fähig (Raggatt and Partridge, 2010). Über interzelluläre Signale können Osteozyten den Stabilitätszustand detektieren und üben somit durch Aktivierung von Osteoblasten und Osteoklasten einen Einfluss auf das Remodeling aus (Galli et al., 2010).

Osteoklasten sind mehrkernige Zellen, welche für den Knochenabbau verantwortlich sind. Sie liegen in den Resorptionskanälen, den sogenannten Howship-Lakunen vor. Diese Lakunen werden durch die Abbautätigkeit der Osteoklasten geformt (Amling and Delling, 1996). Sie degradieren mit Hilfe von spezifischen Enzymen kollagenöse und nichtkollagenöse Proteine und führen so zur Auflösung der vorhandenen Knorpel- und Knochenstruktur. Durch diese ständige Ab- und Umbautätigkeit der knochenspezifischen Zellen kommt es zum permanenten Remodeling des Knochens und damit zur biomechanischen Anpassung an sich verändernde Belastungsbedingungen.

### 2.2. Frakturheilung

Die Frakturheilung kann in zwei verschiedene Kategorien,

- 1. die primäre und
- 2. die sekundäre Frakturheilung,

eingeteilt werden.

### 2.2.1. Primäre Frakturheilung

Zur primären Frakturheilung kommt es, wenn die Knochenfragmente direkten Kontakt haben, eine ausreichende vaskuläre Versorgung sichergestellt ist und die Fraktur suffizient stabilisiert wurde. Der Konsolidierungsprozess verläuft dabei ohne knöcherne oder knorpelige Kallusbildung ab. Bei der auch als Kontakt- oder Spaltheilung bezeichneten Frakturheilung werden zwischen den Fragmenten durch Osteoklasten Resorptionskanäle geschaffen. Diese neu geformten Havers`schen Kanäle werden anschließend vaskularisiert und mit Osteoblasten besiedelt. Diese synthetisieren anschließend neues Osteoid um die Kanäle herum. Somit wird die kortikale Kontinuität durch den neuen Lamellenknochen mit Havers´ System wieder hergestellt (McKibbin, 1978).

Dieser Vorgang wurde erstmals nach Kompressionsplattenosteosynthese histomorphometrisch beschrieben (Muller and Perren, 1972).

### 2.2.2. Sekundäre Frakturheilung

Im Gegensatz dazu vollzieht sich die sekundäre oder spontane Frakturheilung über die Zwischenstufe der Kallusbildung. In dieser Weise verläuft die Frakturheilung, wenn keine chirurgische Behandlung durchgeführt wird, bei einer nicht absolut rigiden Fixation der Frakturfragmente oder wenn die Knochenfragmente keinen direkten Kontakt haben. Die Dauer des Heilungsprozesses wird dabei u.a. von der Größe des Frakturspaltes und der relativen Bewegung der Fragmente zueinander determiniert (Willenegger et al., 1971). Eine Defektgröße von 140 % des Querdurchmessers des betroffenen Knochens gilt als limitierende Grenze für eine spontan ablaufende Heilung (Frayssinet et al., 1998). Dabei finden in den vier unterschiedlichen Bereichen der Frakturzone, nämlich Periost, Kortex, Markraum und umgebendem Weichteilgewebe differenzierte Prozesse statt. Abhängig von dem Frakturtyp, deren Lokalisation und der Art der Frakturversorgung laufen diese Prozesse dabei nacheinander oder simultan ab (Einhorn, 1998). Nach vorherrschender Lehrmeinung kann man die Frakturheilung dabei in vier aufeinander aufbauende und sich überschneidende Phasen einteilen, nämlich

- 1. die inflammatorische Phase,
- 2. die Phase der weichen Kallusbildung,
- 3. die Phase der harten Kallusbildung und

4. die Remodelingphase (Brighton, 1984, Cruess and Dumont, 1975, Einhorn, 1998, Probst and Spiegel, 1997). Das Periost scheint hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen (Ozaki et al., 2000, Utvag et al., 1996, Utvag et al., 1998). Periost, Kortex, Markraum und das initial durch Ruptur der nutritiven Gefäße entstandene Frakturhämatom beeinflussen und unterstützen sich dabei gegenseitig, so dass beim Ausbleiben einer Komponente die komplette Kaskade verzögert abläuft (Grundnes and Reikeras, 1993a, Grundnes and Reikeras, 1993b, Ozaki et al., 2000). Im Periost- und Markraumbereich durchlaufen die mesenchymalen Vorläuferzellen einen Differenzierungs- und Proliferationsprozess, der die Voraussetzung für die enchondrale Ossifikation darstellt. Dieser Prozess läuft direkt im Frakturspalt ab. Vor allem durch axiale Kompressionsbeanspruchung und weniger durch Scher- und Biegebelastung wird die Knochenbildung bei limitierter Fragmentbewegung (nur wenige Mikrometer) beschleunigt (Park et al., 1998, Larsson et al., 2001). In der Frakturumgebung kommt es innerhalb von wenigen Stunden zu einem Verlust der vorhandenen Knochenarchitektur, der mit dem Verschwinden von Blutgefäßen und der Reorganisation der zellulären Elemente einhergeht. Innerhalb der ersten 24 h werden osteoblastenähnliche Zellen vorgefunden, die mit der Knochenformierung beginnen, wobei diese Aktivität weitgehend unabhängig von mechanischen Einflüssen vollzogen wird (McKibbin, 1978).

Das umliegende Weichteilgewebe der Fraktur unterstützt die Heilung durch die Versorgung der Region mit Progenitorzellen und durch eine verbesserte Revaskularisierung zur Formierung eines frühen Brückenkallus, der die Frakturfragmente stabilisiert. Nicht vollständig geklärt erscheint jedoch die Frage, inwiefern die für die Knochenheilung eingewanderten mesenchymalen Vorläuferzellen auch gleichzeitig für die Wiederherstellung des Weichteilschadens verwendet werden (Cruess and Dumont, 1975). Obwohl der umliegende Weichteilschaden maßgeblich die Zeitdauer der Frakturheilung durch auftretende Komplikationen beeinflusst, konnte auch gezeigt werden, dass lediglich die Frühphase der Frakturheilung bei zusätzlichem Weichteiltrauma verzögert abläuft. Der zeitlich gesehene Abschluss der Frakturheilung wird davon aber nicht tangiert oder verzögert (Claes et al., 2006, Landry et al., 2000).

#### 2.2.3. Phasen der Frakturheilung

Die Frakturheilung erfolgt in 4 Phasen. In den ersten Stunden und Tagen nach dem Trauma setzt die inflammatorische Antwort des Körpers ein. Dieser Phase folgt die Bildung des weichen bindegewebigen Kallus. Anschließend vollziehen sich die teilweise nebeneinander ablaufenden Prozessen der intramembranösen und der enchondralen Knochenbildung und dem abschließenden Knochenremodeling. Diese Prozesse beeinflussen sich dabei gegenseitig, wodurch deutlich wird, dass bei einer Störung eines einzigen Prozesses die gesamte Frakturheilung verzögert ablaufen oder in einer ausbleibenden Frakturheilung kumulieren kann.

#### Inflammatorische Phase

Die biochemischen Vorgänge der inflammatorischen Phase der Knochenheilung sind vergleichbar mit den inflammatorischen Prozessen der Wundheilung (Kon et al., 2001, Hadjiargyrou et al., 2002, Barnes et al., 1999, Rundle et al., 2006), wobei neben Fibroblasten osteogen differenzierte Zellen notwendig sind (Yoo and Johnstone, 1998). Kommt es zu einer Frakturierung des Knochens, rupturieren mit ihm die versorgenden Blutgefäße und es erfolgt eine Schädigung des Weichteilmantels. Das Trauma führt durch die fehlende kontinuierliche Blutversorgung zu einem hypoxischen Zustand des geschädigten und devitalisierten Gewebes in und um den Frakturspalt. Dieser Zustand führt zu einer Entzündungsreaktion, deren Kaskade von biochemischen und zytokinvermittelten zellulären Prozessen die Migration, Proliferation, Adhäsion und Differenzierung von Zellen fördert und damit für die strukturelle und funktionelle Wiederherstellung des Gewebes verantwortlich ist (Probst and Spiegel, 1997, Braun and Ruter, 1996).

Den Ausgangspunkt der Entzündungsreaktion bilden die Thrombozyten, die über Aggregation und Aktivierung multiple Chemokine wie Serotonin, platelet derived growth factor (PDGF), transforming growth factor (TGF-B), platelet-activating factor (PAF), Thromboxan A2 und Adenosindiphosphat (ADP) freisetzen (Weksler, 1988). Diese Faktorenfreisetzung und die Plättchenaggregation führt dazu, dass sich ein lokales Blutgerinnsel bildet, welches die weitere Einblutung mindert und die für den stabilisierenden Grundlage Frakturheilungsprozess bildet (Remedios, 1999). Durch die chemotaktische Wirkung dieser Mediatoren werden Leukozyten und mesenchymale Zellen für die Gewebsreparatur (z.B. Fibroblasten, Osteoblasten und Endothelzellen) in das Entzündungsgebiet geleitet. Es werden auch hier die fünf klassischen Entzündungszeichen (rubor, calor, tumor, dolor, functio laesa) hervorrufen (Cohen and Diegelmann, 2002, Bettinger et al., 1994).

Die primär eintreffenden neutrophilen Granulozyten spielen, anders als bei der infektiösen Sanierung, bei der Granulationsgewebsbildung oder dem Wunddébridement eine untergeordnete Rolle (Simpson and Ross, 1972). Die anschließend im Wundgebiet erscheinenden monozytären Phagozyten differenzieren sich in der Frakturheilungszone zu Gewebsmakrophagen. Als zentrale Figur organisieren sie den Wundheilungsprozess, indem sie eine Vielzahl biochemisch aktiver Substanzen wie die Wachstumsfaktoren PDGF, TGF-ß, FGF, IGF, extrazelluläre Matrixproteine, chemotaktische Faktoren und proteolytische Enzyme freisetzen (Gerstenfeld et al., 2003). Dies wird unterstrichen durch die Tatsache, dass nach einem Gewebstrauma die monozytäre Zellreifung im Knochenmark gesteigert wird, wovon über 70% als Makrophagen in das Wundgebiet einwandern. Bereits wenige Stunden nach dem Frakturereignis kommt es zu einer erhöhten Zellteilungsrate im Periost und im angrenzenden Markraum, so dass durch aktivierte Osteoklasten das avitale Gewebe abgebaut und durch sich proliferierende und differenzierende Osteoprogenitorzellen die Regeneration initiiert wird (McKibbin, 1978, Yoo and Johnstone, 1998, Bielby et al., 2007, Brighton and Hunt, 1991). Die Quelle für diese Zellen liegt nach heutigen Erkenntnissen vor allem im Markraum und der Kambiumschicht des Periosts (Yoo and Johnstone, 1998, Minguell et al., 2001, Einhorn, 1998).

Neben den bereits genannten Vorgängen spielt das sich bildende Frakturhämatom, als eine den Frakturspalt überbrückende Leitstruktur, für einsprossende Kapillaren und damit für die essentielle Revaskularisation eine entscheidende Rolle (Probst and Spiegel, 1997, Einhorn, 1998). Die Notwendigkeit der initialen inflammatorischen Phase konnte zum einen daran gezeigt werden, dass eine Entfernung des frühen Frakturhämatoms, mit seinen inhärenten osteogenen und vaskulären Wachstumsfaktoren, zur verzögerten oder ausbleibenden Frakturheilung führt (Grundnes and Reikeras, 1993a, Park et al., 2002). Zum anderen konnte bei einer ausbleibenden inflammatorischen Phase, durch eine Hydrokortison vermittelte

Monozytopenie, gezeigt werden, dass es zu einer verzögerten Fibroblastenproliferation und einer verlangsamten Wundheilung kommt (Wahl et al., 1989, Leibovich and Ross, 1975).

### Proliferationphase (Bildung von weichem und harten Kallus)

Der weitere Verlauf der Frakturheilung ist vor allem durch mikroskopische Untersuchungen sehr detailliert beschrieben (Brighton and Hunt, 1991, Brighton and Hunt, 1997). Die Beobachtungen und deren zeitliche Zuordnung variieren jedoch bei den verschiedenen untersuchten Tieren, wobei vor allem bei Kleintieren wie Mäusen und Ratten im Vergleich zum Menschen ein Zeitraffereffekt auftritt. Somit sind die hier aufgeführten Zeitpunkte nur exemplarische Richtwerte bei der Beschreibung der Heilungsprozesse.

Die Revaskularisierung ist das primäre Ziel im Rahmen des Heilungsverlaufes, da sie zugleich Initiator und Regulator der Frakturheilung ist. Die Revaskularisierung wird über Gefäße der Markhöhle, des Periosts und später des Havers'schen Systems eingeleitet. Mit dem Einsprossen der ersten Kapillaren gelangen Makrophagen in den Frakturspalt, die das Frakturhämatom abbauen, wodurch es gleichzeitig zu einer Alkalisierung des initial sauren Milieus im Frakturbereich kommt. Der alkalische pH-Wert bildet die optimale Grundlage für die Enzymwirkung zur Mineralisation und Kollagensynthese (Brighton, 1984, Cruess and Dumont, 1975). Während der Heilung kommt es stets parallel zur intramembranösen und enchondralen Ossifikation, wobei bei der Untersuchung der Frakturheilung vor allem Modelle zur Analyse der enchondralen Ossifikation benutzt werden (Einhorn, 2005).

In den ersten fünf bis zehn Tagen findet, abhängig vom Ausmaß der Blutversorgung und dem damit verbundenen determinierten Sauerstoffpartialdruck, unter dem Periost bei guter Vaskularisation die Bindegewebsneubildung mit begleitender Mineralisation statt (Brighton and Krebs, 1972). Im Frakturspalt, wo eher ein reduzierter Sauerstoffpartialdruck herrscht, kommt es zur Chondrogenese als Grundlage für die enchondrale Ossifikation (Willenegger et al., 1971, Bassett and Herrmann, 1961).

Nach Abklingen der initialen Entzündungsreaktion kommt es in einem fließenden Übergang zur Etablierung der sogenannten Granulationsphase. Diese ist durch das Auftreten von bindegewebigen mesenchymalen Zellen charakterisiert, welche für die anschließende fibröse Überbrückung des Frakturspaltes und der weichen Kallusbildung verantwortlich sind (Willenegger et al., 1971)

Als zelluläre Basis für die Frakturkallusbildung werden die Osteoprogenitorzellen in Betracht gezogen. Die Quelle dieser Zellen für die unterschiedlichen Kallusformationen muss jedoch differenziert betrachtet werden. Für den periostalen Kallus ist die Kambiumschicht des Periosts verantwortlich, wohingegen der endostale Kallus vor allem durch Zellen aus dem

Markraum gebildet wird, was durch <sup>3</sup>H-markierte Thymidin Untersuchungen nachgewiesen wurde (Kernek and Wray, 1973, Tonna and Cronkite, 1968). Somit kann der Kallus in dieser Phase in zwei Komponenten unterteilt werden: Zum einen in den frühknöchernen periostalen Kallus, in dem die intramembranöse Ossifikation, d.h. die direkte Bildung von Geflechtknochen durch frühe Kalzifizierung von Bindegewebe, stattfindet. Zum anderen die "weiche" Kallusbildung, in dem die enchondrale Ossifikation, d.h. die Knochenbildung über den Weg der Knorpelherstellung und deren sukzessive Mineralisation, direkt im Frakturspalt abläuft (Einhorn, 1998, McKibbin, 1978). Mark *et al.* konnten zeigen, dass die intramembranöse Ossifikation weitgehend unabhängig von Stabilität und Frakturumgebung ist. Beide Ossifikationsprozesse werden jedoch nie unabhängig von einander beobachtet, so dass die These erhoben wurde, dass die intramembranöse Ossifikation eine Voraussetzung für die eher stabilitätsabhängige enchondrale Ossifikation darstellt (Mark et al., 2004). Es konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass durch eine rigidere Frakturfixation der Anteil der Knochenüberbrückung durch intramemranöse Ossifikation verhältnismäßig gegenüber der enchondralen Ossifikation ansteigt (Carter et al., 1998, Claes et al., 1998).

Vergleichbar mit den Vorgängen an der Wachstumsfuge proliferieren die Chondrozyten im weichen Kallus. Sobald die Proliferation abnimmt, sind die hypertrophen Chondrozyten die vorherrschenden Zellen im Knorpelkallus. Die dabei einsetzende Kalzifizierung des chondrogenen Kallus bildet die Voraussetzung für die anschließende Degradation der Extrazellulärmatrix durch Matrix-Metalloproteasen und Phosphatasen (Einhorn et al., 1989, Buckwalter et al., 1996a). Schließlich wird das kalzifizierte Gewebe von Chondroklasten abgebaut und durch Geflechtknochen ersetzt (Einhorn, 1998). Diese Kombination aus Geflechtknochen und kalzifiziertem Knorpel dient als Leitstruktur zur Ausbildung des Lamellenknochens über sekundäre Osteonbildung (Buckwalter et al., 1996b, Brighton, 1984). Dies geschieht durch einen koordinierten Prozess aus Matrixresorption durch Osteoklasten und Knochenanbau durch Osteoblasten, welcher mit den Vorgängen in der Wachstumsfuge vergleichbar ist (Braun and Ruter, 1996, McKibbin, 1978).

### Umbauphase (Remodeling)

Ist der gesamte Kallus knöchern durchbaut und der Frakturspalt damit belastungsstabil überbrückt, wird in der folgenden Zeit das "Remodeling" zu kortikalem Lamellenknochen und Marktrabekelwerk vollzogen. Der im Kallus ehemals vorhandene Knorpel ist hier zu diesem Zeitpunkt komplett knöchern ersetzt und der Kallusumfang wird dem ursprünglichen diaphysären Knochen angepasst. Dabei wird der unreife Geflechtknochen durch die Bildung neuer Osteone, aufbauend aus dem Zusammenspiel von Osteoklasten und Osteoblasten, zum Lamellenknochen umgebaut. Der Knochen adaptiert sich an seine entsprechenden Belastungsanforderungen in den Gewicht tragenden Hauptkraftlinien, damit der Knochen wieder seine ursprüngliche mechanische Festigkeit erhält (Buckwalter et al., 1996b). Dieser Vorgang kann sich jedoch über Monate bis Jahre hinziehen, wobei der Übergang in den sich ständig vollziehenden Umbau entsprechend den mechanischen Anforderungen fließend ist (Chao et al., 1989). Das noch längere Zeit bestehende erhöhte Frakturrisiko könnte auf die zuerst orthogonal angeordneten Ersatzlamellen zurück zu führen sein, so dass die Zahl der definitiv den Frakturspalt überbrückenden Osteone die Qualität der Frakturheilung widerspiegelt (Shapiro, 1988).

### 2.3. Biomechanische Einflüsse auf die Frakturheilung

Durch das Frakturgeschehen kommt es ohne Fixation zur Instabilität des Knochens, die sich in einer Lageveränderung der Frakturfragmente äußert. Zudem führt diese Instabilität zu einer veränderten mechanischen Belastungsachse mit unterbrochenem Kraftfluss. Die Frakturenden unterliegen dabei weiter dem Einfluss durch Muskel-, Sehnen- und Gelenkkräfte, was im Rahmen der Instabilität zu veränderten Scher-, Biegungs- und Torsionsbelastungen auf den Knochen führt, die den Heilungsverlauf unterschiedlich beeinflussen (Claes et al., 1997). Durch ein externes oder internes Fixationssystem soll die Fraktur reponiert und fixiert werden, damit die zur Knochenheilung notwendigen Stabilitätsbedingungen vorherrschen. Bei der Frakturstabilisierung werden zwei grundsätzlich verschiedene Prinzipien unterschieden. Zum einen das nicht-lasttragende, eher schienende System, bei dem die Knochen weiterhin Kontakt haben müssen und die Hauptbelastung durch den Knochen geht. Zum anderen das lasttragende Sytem, bei dem der Knochen als Lastträger weitgehend entlastet wird und die Übertragung über das Osteosynthesesystem erfolgt. Die komplette Lastübertragung wird dabei über den frakturfernen Schrauben-Knochen-Kontakt gewährleistet (Huiskes and Chao, 1986, Probst et al., 1999, Duda et al., 2003a, Klein et al., 2004). Die Wahl der Osteosynthese hängt unter anderem von der Art der Fraktur, deren Lage, dem Weichteilteilschaden und der Patientenkonstitution ab.

In der vorliegenden Untersuchung wurde ein Fixateur externe verwendet, der ein exzentrisches lasttragendes Osteosynthesesystem darstellt. Durch die aus der zentralen Lastachse heraus verlagerte Kraftübertragung ist dieses System besonders großen Biege- und Torsionskräften ausgesetzt. Da die gesamte Last über den Fixateur übertragen wird, kommt es

erst nach Entfernung des Osteosynthesesystems durch die dann beginnende Beanspruchung des Knochens zu einer Belastung des Frakturbereichs (Duda et al., 2001).

### 2.3.1. Der Fixateur externe

Externe Fixationssysteme werden häufig zur temporären Stabilisierung bei komplizierten Mehrfragment- oder Trümmerfrakturen oder offenen Frakturen mit Infektionsgefahr eingesetzt, bis eine persistierende Frakturfixation erfolgen kann (Russel, 1992). Obwohl es ein in der klinischen Patientenversorgung häufig eingesetztes System ist, spielt es vor allem in der biomechanischen Forschung als Osteosynthesemodell mit variablen biomechanischen Einstellmöglichkeiten eine bedeutende Rolle.

Beim externen Fixateur existieren diverse Variationsmöglichkeiten, durch die man die mechanische Stabilität sowohl intra- als auch postoperativ beeinflussen und verändern kann. Über eine Stichinzision durch die Haut im Bereich mit möglichst geringer Weichteildeckung gelangt man bis in die Tiefe zur Knochenoberfläche. Durch diesen Kanal werden die Schanzschrauben (Pins) vorzugweise bikortikal eingebracht. Diese Schanzschrauben werden dann über Klemmbacken mit Metallstangen quer miteinander verbunden. Hier besteht, abhängig von der Lage der Fraktur und der anatomischen Situation des Patienten, die Möglichkeit, das Fixationssystem individuell anzupassen. Die Rigidität des Fixateurs kann dabei über multiple Einflussmöglichkeiten modifiziert werden. Über die nur monolaterale oder zusätzlich auch bilaterale Fixation kann die Rigidität deutlich gesteigert werden und zusätzlich die Richtung des Bewegungsausmaßes weiter definiert werden (Krischak et al., 2002). Durch das Anbringen eines Ringfixateurs kann dieses Prinzip noch weitere Optimierungen erfahren. Zudem spielen Faktoren wie die Dicke und Anzahl der Schrauben, die Distanz zwischen Knochenoberfläche und Querstange, die Anzahl der verbindenden Querstangen, als auch die Wahl des Fixationsmaterials (Metall/ Karbon) eine Rolle für die Rigidität der Osteosynthese (Claes et al., 1998, Chao et al., 1989). Das Anbringen einer zweiten Verbindungsstange beispielsweise kann die Stabilität um 20%, das Anbringen des Fixateurs in einer zweiten Ebene um 50% erhöhen (Claes et al., 1997, Mark et al., 2003). Mit dem Einfluss der Distanz zwischen Verbindungsstange und Knochenoberfläche auf die Osteosynthesestabilität wird aber auch schon die Beschränkung dieses Systems deutlich: der Einsatz auf Gebieten mit großer Weichteildeckung ist begrenzt, da mit größerem Abstand auch die Stabilität des Fixateurs signifikant abnimmt (Claes, 1990).

Ein weiteres Problem vor allem im klinischen Umgang mit einem Fixateur externe ist das Risiko einer Pinkanalinfektion, welche schwerwiegende Osteomyelitiden nach sich ziehen kann (Inan et al., 2007, Henley et al., 1998). Dies kann zum einen langwierige antibiotische Therapien nach sich ziehen. Zum anderen führt es zu einer Lockerung der Schanzschrauben mit unzureichender Frakturstabilisierung durch das Fixationssystem bis hin zum notwendigen vorzeitigen Revisionseingriff mit Verfahrenswechsel. Dies bedeutet stets eine enorme Belastung für den Patienten. Diese Risiken machen eine sorgfältige tägliche Reinigung und Pflege des Pinkanals notwendig und bedingen operativ das tiefe Versenken der Schanzschrauben, um Infektionen durch die die Hautoberfläche überragenden Gewindeanteile zu minimieren (Mayr, 2002). Durch diese möglichen Komplikationen, die ästhetischen Nachteile und die mit einem Fixateur assoziierte Einschränkung der Lebensqualität wird im Patienteneinsatz zur primären Marknagelung oder zum schnellen Verfahrenswechsel des Osteosynthesesystems auf intramedulläre Kraftträger bei Tibiaschaftfrakturen geraten, wenn dies von Seiten der Weichteilverhältnisse möglich ist (Mayr et al., 1994, Nowotarski et al., 2000).

Trotzdem stellt der Fixateur externe in der Forschung ein hervorragendes System zur Evaluierung der mechanischen Einflüsse auf die Frakturheilung dar.

# 2.4. Verzögerte und ausbleibende Frakturheilung und Pseudarthrosenbildung

Die Frakturheilung ist in den allermeisten Fällen ein sehr gut und effektiv funktionierender Prozess, der eine vollständige Überbrückung des Frakturspalts gewährleistet und bei dem es schließlich zu einer kompletten Heilung kommt. Allerdings gibt es, abhängig von der Lokalisation und der Art der Fraktur, eine nicht zu unterschätzende Zahl an verzögerten bzw. ausbleibenden Frakturheilungen. In großen Querschnittsstudien schätzt man die verzögerte bzw. ausbleibende Frakturheilung in toto auf etwa sieben Prozent, wobei diese Zahlen bei offenen Tibiafrakturen (Gustillo II°-III°) auf über 40% ansteigen können (Bhandari et al., 2001, Bhandari et al., 2000, Henley et al., 1998). Die verzögerte Frakturheilung oder Pseudarthrosenbildung führt durch Reoperationen, eine erhöhte Infektionsrate, eine verlängerte Hospitalisierungsdauer, einer progredienten Behinderung bis hin zur Amputation der Extremität als ultima ratio, zu enormen medizinischen Belastungen des Patienten und zu schweren sozioökonomischen Folgen (Phieffer and Goulet, 2006, Littenberg et al., 1998, Dervin, 1996). Von einer verzögerten Frakturheilung spricht man, wenn die Fraktur nach einem Zeitraum von sechs Monaten nicht konsolidiert ist, wohingegen eine Pseudarthrosenbildung als radiologisches Ausbleiben des Heilungsfortschritts in drei aufeinander folgenden Monaten, neun Monate nach initialem Frakturereignis, definiert ist (LaVelle, 1998). Anzumerken ist hierbei allerdings, dass trotz fehlender radiologischer Kallusformierung eine komplizierte Fraktur durch späte endostale Heilungsvorgänge zur kompletten Heilung gebracht werden kann (Marsh, 1998).

Die Unterscheidung der Pseudarthrosen in hypertrophe, oligotrophe und atrophe Erscheinungsformen ist eine radiologische und makroskopische Betrachtungsweise. Sie ist in sofern zu modifizieren, als dass eine Einteilung hinsichtlich der therapeutischen Handlungskonsequenz sinnvoll erscheint. Daher ist auch eine Einteilung in biomechanisch gestörte, aber biologisch-reaktionsfähige und in biologisch-reaktionsunfähige Pseudarthrosen vorteilhafter (DG Weber, 1973, Schweiberer et al., 1999). Welche Form sich ausbildet, ist sowohl abhängig von den biologischen Einflüssen, als auch von Faktoren der Frakturstabilisierung. So entsteht die hypertrophe Pseudarthrose, die durch überschießende Kallusbildung charakterisiert ist, bei adäquater Blutversorgung, jedoch mangelnder mechanischer Stabilisierung der Frakturenden. Daher benötigt die hypertrophe Pseudarthrose der langen Röhrenknochen vor allem eine ausreichende mechanische Stabilisierung mit intraoder extramedullären Kraftträgern für einen Heilungserfolg (Babhulkar et al., 2005, Jurgens et al., 1994, Wang and Weng, 2003).

Der atrophen Pseudarthrose hingegen liegt ein Mangel an nutritiven Faktoren einerseits und eine unzureichende mechanische Stabilität andererseits zu Grunde (LaVelle, 1998). Die Unterbrechung der periostalen bzw. der endostalen Blutversorgung führt zu avitalisiertem Gewebe, welches zwar noch vaskularisiert ist (Reed et al., 2003), jedoch nicht in ausreichendem Maße, um den Frakturheilungsprozess komplikationslos ablaufen zu lassen (Schweiberer et al., 1999). Um diese Art der Pseudarthrose zur Heilung zu bringen, ist ein Behandlungskonzept mit teils multiplen Eingriffen notwendig. Das Gesamtkonzept setzt sich aus adäquater Frakturstabilisierung, Débridement des avitalen Gewebes, Anfrischen des vitalen Gewebes und Augmentation des Pseudarthrosespaltes mit autologer Spongiosa oder Knochenersatzstoffen zusammen (Ruter and Mayr, 1999).

### 2.4.1. Beeinflussung der Frakturheilung durch die Fixationssysteme

Für eine erfolgreich ablaufende Frakturheilung ist eine mechanisch optimale Frakturstabilisierung, die die biologischen Aspekte der Frakturheilung berücksichtigt, essentiell. Abhängig von der Art und Rigidität der Stabilisierung kommt es zur primären oder sekundären Frakturheilung. Von diesen lokalen mechanischen Bedingungen ist auch der Differenzierungsablauf des mesenchymalen Gewebes im und um den Frakturspalt herum abhängig. Dementsprechend wird bei eher geringen Fragmentbewegungen vorrangig der Weg der intramembranösen Ossifikation eingeschlagen, wohingegen bei größerer Scherbeanspruchung die enchondrale Ossifikation mit gesteigerter Knorpelbildung anteilig stärker zur Heilung beiträgt (Carter et al., 1998, Claes and Heigele, 1999, Claes et al., 1998).

Bei der Art der Stabilisierung haben sich weder das früher präferierte Konzept der absoluten Rigidität mit möglichst "primärer Frakturheilung", noch die Fixation mit zu viel Scherbewegung als heilungsfördernd herausgestellt (Schweiberer et al., 1999).

Obwohl optimale interfragmentäre Stabilität bzw. maximale notwendige Stabilitätskriterien in den verschiedenen Heilungsstadien noch nicht festgelegt wurden, konnten für einen definierten Frakturspalt förderliche Bewegungsausmaße herausgefunden werden (Goodship et al., 1998, Goodship et al., 1993, Kenwright and Goodship, 1989). Bei einem Frakturspalt von 3 mm stellte sich ein interfragmentäres Bewegungsausmaß von etwa 0,5 mm in axialer Richtung und weniger als 0,8 mm in transversaler Richtung als ein die Heilung beschleunigender Faktor heraus (Wolf et al., 1998, Claes et al., 1997, Augat et al., 2003, Klein et al., 2003). Der Einfluss muss dabei als multidirektional angesehen werden, wobei vor allem zu große transversale Biege- und Scherkräfte den Heilungsverlauf verzögern (Augat et al., 2003). Hingegen konnte gezeigt werden, dass limitierte axiale Bewegungen oder Dynamisierungsprozesse einen positiven Einfluss auf die Frakturheilung haben (Kenwright et al., 1986, Larsson et al., 2001). Dabei war zu beobachten, dass durch axiale Dynamisierungseinflüsse die periostale Kallusbildung früher etabliert wird und deren enchondraler Umbau sich früher manifestiert, was zu einer akzelerierten mechanischen Stabilisierung führt.

Insgesamt haben sich besonders die mechanischen Bedingungen und die Bewegungsebene in der frühen Phase der Frakturheilung als sensibel zur Beeinflussung der gesamten weiteren Heilungskaskade herausgestellt (Klein et al.. 2003). Unterschiedliche Stabilisationsbedingungen führen jedoch nicht nur zu abweichenden Heilungsresultaten, sondern verändern auch den biologischen Ablauf der Heilungskaskade bezüglich Bindegewebs-, Knorpel- und Knochenbildung zu definierten Zeitpunkten (Schell et al., 2005). Die rigideren Fixationsbedingungen führen über die Bildung eines kleineren Kallus zu einem rapideren Heilungsverlauf, da dieser Kallus früher mineralisiert. Dieser Kallus zeichnet sich außerdem durch geringere Bindegewebsbildung im späteren Heilungsverlauf und durch eine verkürzte Knorpelbildungsphase aus (Lienau et al., 2005, Epari et al., 2006).

# 2.4.2. Einfluss der mechanischen Bedingungen auf osteogene Wachstumsfaktorenproduktion

Wie Heilungsverlauf im durch unterschiedliche mechanische Einflüsse die Wachstumsfaktorenfreisetzung oder die Zelldifferenzierung modifiziert wird. ist weitestgehend unklar. an Die Auswahl Arbeiten, die sich bisher mit der Wachstumsfaktorenexpression als Antwort auf verschiedene mechanische Bedingungen beschäftigt haben, ist begrenzt. Die Gruppe um Niikura et al. betrachtete an einem Rattenmodell mit mechanisch induzierter atropher Pseudarthrose ohne periostalen Wachstumseinfluss die unterschiedliche Expression der Bone morphogenetic protein (BMP)-Familie. Dabei zeigte sich die Herunterregulierung der BMPs im Heilungsverlauf bei atrophen Pseudarthrosen (Niikura et al., 2006). Allerdings konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es keine lineare Beziehung zwischen Pseudarthrose und herunterregulierten Wachstumsfaktoren gibt, sondern das Verhältnis zu den Antagonisten (Noggin/BMP-4) den biologischen Einfluss auf die Kallusbildung besser wiedergibt (Kloen et al., 2002). Nur das zeitlich und räumlich gut auf einander abgestimmte Auftreten von Agonist/ Antagonist und ihren Rezeptoren führt zur beschleunigten Frakturheilung (Yoshimura et al., 2001a).

Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass der Zusatz von rh-BMP-7 der Ausbildung einer Pseudarthrose vorbeugen kann (Hak et al., 2006, Makino et al., 2005).

Die Arbeitsgruppe um Le *et al.* zeigte, dass es in instabilen Frakturheilungsmodellen, d.h. ohne Frakturfixation, zu einer vermehrten Chondrogenese kommt, die durch eine gesteigerte Expression an Kollagen-II und Kollagen-X geprägt ist. Zudem zeigte sich in nicht stabilisierten Frakturen eine Hochregulation des Regulatorgens für die chondrale Heilung IHH (Indian Hedgehog) (Le et al., 2001). Im Gegensatz dazu konnte jedoch auch gezeigt werden, dass es trotz adäquter Expression der Wachstumsfaktoren (BMP-2/-4, PDGF, FGF, TGF-B) zu einem frühen Zeitpunkt der Frakturheilung zur Pseudarthrosenbildung im weiteren Verauf kommen kann (Brownlow et al., 2001). Bei humanen Pseudarthroseuntersuchungen war keine signifikante Downregulation an Wachstumsfaktoren der BMP-Familie zu erkennen (Kloen et al., 2002).

Ziel dieser Studie war es deshalb, diesen bisher weitgehend unbetretenen Pfad, der Wachstumsfaktorenanalyse unter unterschiedlichen mechanischen Bedingungen ohne biologische Suppression wie Periostentfernung, zu ergründen, um die Biologie der Frakturheilung besser verstehen zu können.

### 2.5. Wachstumsfaktoren / Extrazellularmatrixkomponenten

Wachstumsfaktoren sind Polypeptide, die in lebenden Organismen als Signalüberträger für Zellen dienen. Wie in experimentellen Studien gezeigt werden konnte, sind sie dabei Teil eines riesigen Kommunikationsnetzwerkes, das für Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Extrazellulärmatrixsynthese verantwortlich ist. Sie üben somit einen wichtigen Einfluss auf die Frakturheilung, das Knochen- und Knorpelwachstum und die Wiederherstellung von geschädigtem muskuloskeletalem Gewebe aus (Lieberman et al., 2002).

# 2.5.1. Signaltransduktion der Wachstumsfaktoren an Zellmembranen

Damit die Wachstumsfaktoren ihre spezifische Wirkung auf die Zielzelle ausüben können, müssen sie an Zellmembran-gebundene Rezeptoren binden. Dies sind Tyrosin-Kinase-Transmembran-Rezeptoren für PDGF; Serine-Threonin-Kinase-Transmembran-Rezeptoren für TGF-ß und BMPs, sowie Zytokin-Rezeptoren für Interleukine. Über second messenger-Kaskaden werden schließlich gewebsspezifische Transkriptionsfaktoren aktiviert, die dann für die Zellproliferation und Zelldifferenzierung verantwortlich sind (Abb 2.5.-1).



Abb. 2.5.-1: schematisch vereinfachte Darstellung der Signaltransduktion, d.h. der Bindung eines Liganden (eines spezifischen Wachstumsfaktors) an den Rezeptor und die anschließende Aktivierung der mRNA-Produktion im Zellkern zur Proteinsynthese (Lieberman et al., 2002)

### 2.5.2. Transforming Growth Factor-ß (TGF-ß)

TGF-ß gehört zu einer Familie von verwandten Proteinen der TGF-ß-Superfamilie. Dazu gehören neben fünf Isoformen von TGF-ß (TGF-ß1 bis TGF-ß5), die bone morphogenetic

proteins (BMPs), growth differentiation factors (GDFs), Aktivine und Inhibine (Chin et al., 2004, Rosier et al., 1998). Über den TGF-ß-Rezeptor Typ I und Typ II wird TGF-ß an der Zelloberfläche gebunden. Nach Bindung des Liganden an den Typ II-Rezeptor bildet dieser mit dem Typ I-Rezeptor einen Komplex. Dieser setzt durch seine Serin-Threonin-Kinaseaktivität über den SMAD-pathway die Signaltransduktion ins Zellinnere fort (Massague et al., 1994, Derynck et al., 1998).

TGF-ß kommt in multiplen Geweben im Körper vor, besonders häufig jedoch in Knochen, Knorpel und Thrombozyten. Während der Frakturheilung kann man TGF-ß in dem neu gebildeten Hämatom finden, nachdem er aus Blutplättchen freigesetzt wurde (Robey et al., 1987, Seyedin et al., 1986). TGF-ß ist als Wachstumsfaktor für die Proliferation und Differenzierung von Zellen verantwortlich.

Es konnte immunhistologisch gezeigt werden, dass die Freisetzung von TGF-ß1 mit der Proliferation von periostalem Gewebe in der frühen Phase der Frakturheilung einhergeht. Die stärkste Anreicherung von TGF-ß konnte jedoch bei der Knorpelzellproliferation und der enchondralen Ossifikation während der fortgeschrittenen Frakturheilung nachgewiesen werden (Joyce et al., 1990, Bourque et al., 1993).

Bei Zugabe von TGF-ß zu Osteoblasten in eine Zellkultur konnte eine verstärkte Proliferation und Differenzierung dieser Zellen nachgewiesen werden (Kessler et al., 2000, Schmidmaier et al., 2003b).

Bei mRNA-Expressionsanalysen der TGF-ß-Superfamilie in den ersten 28 Tagen nach Frakturereignis an Mäusetibiae konnte gezeigt werden, dass TGF-ß1 während der gesamten Frakturheilungsphase exprimiert wird, es jedoch in der Frühphase vom 1. bis 3. Tag zu einem Expressionsmaximum kommt (Cho et al., 2002).

TGF-ß entfaltet seine Wirkung jedoch nicht isoliert, sondern es besteht eine gegenseitige Beeinflussung mit anderen, die Frakturheilung beeinflussenden, Wachstumsfaktoren. Die kombinierte Applikation und Freisetzung von TGF-ß und IGF-1 aus PDLLA-beschichteten K-Drähten an frakturierten Rattentibiae konnte einen synergistischen Effekt auf die Knochenheilung zeigen. Es konnte, anders als bei Applikation eines einzelnen Wachstumsfaktors. eine erhöhte Biegesteifigkeit Belastbarkeit. und sowie histomorphometrisch eine verstärkte Mineralisation nachgewiesen werden (Schmidmaier et al., 2003a). Während der Frakturheilung können auch erhöhte TGF-B-Werte systemisch nachgewiesen werden. Für diese Werte konnte zudem gezeigt werden, dass sie bei verzögerter Frakturheilung vorzeitig wieder abfallen und damit die Frakturheilung negativ beeinflussen (Zimmermann et al., 2007).

### 2.5.3. Bone Morphogenetic Protein (BMP) und der Antagonist Noggin

Die BMPs gehören bis auf BMP-1 zur TGF-β-Superfamilie der Polypeptide. Sie konnten in vielen unterschiedlichen Gewebetypen nachgewiesen werden z.B. Knochenmatrix (BMP-2, - 3, -4, -7), Gehirn (BMP-6) und Niere (BMP-3, -4, -7) (Sakou, 1998).

Die BMPs sind 30-38 kDa große Homodimere mit einer Länge von 100-140 Aminosäuren. Die Signaltransduktion an Zellmembranen erfolgt über verschiedene Serine-Threonin-Kinase Rezeptoren (BMPR-II, BMPR-Ia, BMPR-Ib) und über Activin-Rezeptoren (ActR-II, ActR-IIb, ActR-I). Der BMP-Ligand bindet zuerst an einen Typ-II-Rezeptor. Dies ist die Voraussetzung für die darauf folgende Bindung des Komplexes an den Typ-I-Rezeptor, was die Bildung des aktiven Rezeptor-Liganden Komplexes darstellt, der die biochemische Wirkung des Liganden entfaltet (Heldin et al., 1997). Durch die Antagonisten Noggin and Chordin kann die Interaktion am Rezeptor blockiert werden, was eine Selbstlimitierung der Signaltransduktion darstellt, da diese Antagonistenfreisetzung durch die Hochregulation von BMPs hervorgerufen werden kann (Gazzerro et al., 1998).

Verglichen mit anderen Wachstumsfaktoren (TGF-ß, PDGF) haben BMPs einen selektiveren Effekt auf die Knochenheilung und es konnten viel versprechende Ergebnisse im Tiermodell zur Beschleunigung der Heilung nach Applikation demonstriert werden (Barnes et al., 1999). Im Knochen sind BMP-2, -4, -7 vor allem in Bereichen der extrazellulären Matrixsubstanz, Osteoprogenitorzellen und unreifen und hypertrophierten Chondrozyten lokalisiert. Sie werden von Vorläuferzellen produziert und beeinflussen zudem die Aktivierung von kortikalen Osteoblasten und die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen in Osteoblasten und mesenchymalen Vorläuferzellen in Chondrozyten (Bostrom, 1998). Im intakten Knochen exprimieren reife Chondrozyten und Osteoblasten beinahe keine BMPs. Es kommt jedoch zu einem starken Expressionsanstieg während der verschiedenen Phasen der Frakturheilung (Bostrom, 1998). Zu Beginn des Heilungsprozesses wird BMP-2/ -4/ -7 um das Frakturhämatom herum nur minimal exprimiert. Die Expression nimmt jedoch zu, wenn sich das Hämatom formiert und mesenchymale Vorläuferzellen im Frakturspalt erscheinen und proliferieren (Onishi et al., 1998). Immunhistochemisch konnte bei der Frakturheilung am Rattenmodell gezeigt werden, dass BMP-2/ -4/ -7 in der Kambiumschicht des Periosts nahe den Frakturenden schon in einem frühen Stadium der Frakturheilung verstärkt exprimiert werden (Nakase et al., 1994a). Im Rahmen der intramembranösen Ossifikation sind es vor allem die osteoblastären Vorläuferzellen, welche für die BMP-Expression verantwortlich sind. Hingegen sind es vor allem die chondralen Vorläuferzellen und hypertrophen Chondrozyten, die die stärkste BMP-Expression bei enchondraler Ossifikation zeigen (Bostrom, 1998). Zeitlich gesehen geschieht dies im Rattenmodell vom 6. bis zum 14. Tag der Frakturheilung während der Chondrogenese. Auch während der Kalzifizierung und Geflechtknochenbildung bleibt die Expression hochreguliert, so dass es, identisch zur intramembranösen Ossifikation, erst während der Lamellenknochenbildung nach dem 21. Tag der Knochenheilung zu einer Downregulation der BMP-Expression kommt (Bostrom, 1998). In diesen Untersuchungen scheint BMP-2/ -4 in der Remodelingphase keine essentielle Rolle mehr zu spielen. Besonders für BMP-7, aber auch für BMP-4 nimmt die Nachweisbarkeit jedoch am Tag 14 in proliferierenden und reifen Chondrozyten zu, wohingegen BMP-2 im Anfangsstadium der Frakturheilung einen Peak hat und erst im späteren Stadium der Frakturheilung wieder vermehrt exprimiert wird (Cho et al., 2002, Ishidou et al., 1995). Doch nicht nur die Expression der BMPs, sondern auch die räumlich und zeitlich abgestimmte Expression ihrer Rezeptoren in den Zielzellen ist nötig, um die Signaltransduktion zu ermöglichen. Während der Frakturheilung werden lokal auch die Rezeptoren BMP-R-IA und BMP-R-IB in mesenchymalen Progenitorzellen des Periosts und in chondralen Progenitorzellen im Frakturspalt hochreguliert (Ishidou et al., 1995). Noggin wird als Antagonist des BMP-Rezeptors in osteoblastären Zellen durch den Einfluss von BMP verstärkt exprimiert. Durch die gesteigerte Synthese von Noggin wird die BMP Produktion in Osteoblasten herunterreguliert, was einen selbst limitierenden Einfluss von Noggin auf die BMP-Expression darstellt (Gazzerro et al., 1998). Es könnte somit ein spezifisches induzierbares Bindungsprotein darstellen, das die Überstimulation der osteoblastären Zellen mit BMP verhindern soll, da es in unstimulierten Zellen nicht exprimiert wird (Gazzerro et al., 1998). Der bedeutende Einfluss von Noggin auf die Knochenentwicklung wird auch dadurch bestätigt, dass Mutationen des Noggingens zu skeletalen Fehlentwicklungen führen und Noggin-knock-out Mäuse nicht lebensfähig sind (Brunet et al., 1998).

# **2.5.4.** Osteoprotegerin (OPG) / Makrophage-colony-stimulationg factor (M-CSF)

Lange blieb die Interaktion zwischen Osteoklasten und Osteoblasten unverstanden. Ein Schritt nach vorn konnte erzielt werden, als Osteoprotegerin als ein Rezeptor der TNF-Rezeptor-Familie von mehreren unabhängigen Forschergruppen entdeckt wurde (Simonet et al., 1997, Yasuda et al., 1998a). Es handelt sich dabei um einen inhibierenden Liganden der Zell-zu-Zell-Interaktion zwischen Osteoblasten und osteoklastären Vorläuferzellen. Dieser Kontakt wird in physiologischer Funktion von der Bindung des Rezeptors Receptor activator of NF-κB (RANK) an den spezifischen Liganden-Rezeptor-Aktivator des NF-κB-Liganden

führt (RANKL) vermittelt und über die RANKL/ RANK-Bindung zur Osteoklastendifferenzierung und -proliferation (Rogers and Eastell, 2005). Als Kofaktor bei dieser Aktivierung dient der makrophage-colony-stimulating-factor (M-CSF), der am Rezeptor der osteoklastären Progenitorzellen ansetzt und die Reifungsvorgänge unterstützt (Abb. 2.5.-2). Dieser Komplex scheint damit ein Schlüsselregulator für die Kontrolle der Knochenmasse zu sein und Einfluss auf die Osteoklastogenese zu haben (Kon et al., 2001). Studien an knock-out Mäusen haben zudem gezeigt, dass das Fehlen von OPG zu einer fortschreitenden Osteoporose führt, wohingegen die Überexpression von OPG eine Osteopetrose nach sich zieht (Yasuda et al., 1998b, Hofbauer et al., 2000).



Abb. 2.5.-2: (A) Veränderung des RANKL/OPG Expressionsmusters während der Osteoblastenreifung; (B) Einfluss von RANKL und M-CSF auf die Osteoklastenreifung; (C) Inhibitoin der Osteoklastenreifung durch OPG (Rogers and Eastell, 2005)

*In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Expression sowohl von OPG als auch von M-CSF durch verschiedene Zytokine und andere Faktoren beeinflusst werden kann. Entsprechend den bisherigen Erkenntnissen zur Beeinflussung von Knochenresorption und Knochenanbau konnte gezeigt werden, dass OPG unter Einfluss von TGF-ß und 17ß-Estradiol hochreguliert wird (Hofbauer et al., 1999a). Dies widerspiegelt die OPG-vermittelte Hemmung der Osteoklastogenese und der verminderten Knochenresorption. Durch Parathormon (PTH) und

Glukokortikoide hingegen konnte die induzierte Downregulation von OPG gezeigt werden (Hofbauer et al., 2000). Für M-CSF konnte die induktive Hochregulation während inflammatorischer Ereignisse und die Co-expression mit inflammatorischen Zytokinen aufgezeigt werden (Hofbauer et al., 1999b). Neben der schwerpunktmäßigen Analyse der OPG-Expressionslevel in Assoziation zur Entwicklung von Osteoporose (Rogers and Eastell, 2005) wurde auch der Verlauf während der Frakturheilung im Mausmodell untersucht (Kon et al., 2001). Hier zeigte sich, dass es zwei Peaks während des Heilungsverlaufs gab. Der erste zeigte sich 24h post operationem in der inflammatorischen Phase mit einem deutlichen Abfall am dritten Tag. Der zweite Anstieg war während der Phase der beginnenden enchondralen Ossifikation am siebten Tag ersichtlich. Im Verhältnis gesetzt zu den Ossifikationszeitpunkten, zeigte sich, dass OPG eher bei der Knorpelbildung, hingegen M-CSF vorwiegend bei der Resorption der entstandenen Matrix hochreguliert wird. Dies entspricht dem jeweiligen fördernden oder hemmenden Einfluss auf die Osteoklastogenese.

### 2.5.5. Extrazellulärmatrixkomponenten

Der Knochen ist zu etwa 70 % aus anorganischer Substanz zusammengesetzt, in der vor allem Kalzium, Phosphat und deren gemeinsames Produkt als Hydroxyapatitkristall den Hauptanteil bilden. Die anderen 30 % der Extrazellulärmatrix sind aus organischen Substanzen aufgebaut. Hier spielt neben diversen anderen Strukturproteinen, wie Osteopontin, Osteonectin und Osteocalzin, vor allem Kollagen-I die entscheidende Rolle, da es über 90 % der organischen Matrix ausmacht (Viguet-Carrin et al., 2006). Neben diesen Strukturproteinen leisten die Proteoglykane und Glykosaminoglykane als organische Anteile der Matrix einen wichtigen Beitrag für den strukturellen Aufbau der Interzellularsubstanz.

### 2.5.6. Kollagen-Ia1, -II, -Xa1

Es existieren in den Bindegewebsorganen nach heutigen Erkenntnissen mindestens 14 verschiedene Typen der Kollagen-Familie, die aus wenigstens 25 verschiedenen Genprodukten zusammengesetzt sind (Shen, 2005). Diese Vielzahl von unterschiedlichen Kollagenen determiniert in ihrer Kombination die typische Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix.

Gemeinsam ist den Kollagenen-I und –II, dass sie als Polypeptid eine Tripelhelix aus verschiedenen Einzelkollagenketten bilden (van der Rest and Garrone, 1991). Kollagen-I ist ein heterodimeres Polypeptid, das sich aus zwei  $\alpha$ 1- und einer  $\alpha$ 2-Kette zusammensetzt. Kollagen-II hingegen ist ein homotrimeres Polypeptid, das die Tripelhelix aus drei  $\alpha$ 1-Ketten

bildet (Yamauchi et al., 1989). Die Heterogenität und die Unübersichtlichkeiten der Kollagen-Terminologie wird auch dadurch noch verstärkt, dass die verschiedenen Kollagene im selben Gewebe auch gemischte heterotypische Fibrillen bilden können (van der Rest and Garrone, 1991). Die beiden Kollagene Typ-I und -II formen als Makromoleküle langkettige, um jeweils ein Viertel ihrer Länge versetzte Fibrillen (Yamauchi et al., 1989). Als fibrilläre Struktur der Extrazellulärmatrix ist Kollagen-I v.a. Hauptmatrixprotein des Knochens. Kollagen-II hingegen ist vorrangig im Knorpel vorhanden und trägt dort zur strukturellen Integrität und zur mechanischen Stabilität bei (Bornstein and Sage, 2002). Die früher angenommene einfache Assoziation zwischen mehreren Kollagenen in den verschiedenen Geweben wurde durch eine komplexere Ansicht verdrängt. So nahm man an, dass Kollagen-II im Knorpel hauptsächlich mit Kollagen-XI assoziiert ist. Durch Aufklärung der multivariaten Tripelhelixketten einzelner Kollagentypen und die posttranslationale Modifikation ist dieses Bild jedoch überarbeitet worden (van der Rest and Garrone, 1991).

Man weiß, dass sowohl während der Frakturheilung, als auch in der Wachstumsfuge während der Embryonalentwicklung Kollagen-II von Chondrozyten in der Proliferations- und Maturationszone produziert wird, wohingegen Kollagen-I von osteogenen Zellen an der chondroossären Übergangszone abgelagert wird (Sandberg et al., 1993). Dies geschieht durch die dort regelhaft vorkommenden Zellen. Die periostalen Osteoprogenitorzellen können, abhängig vom mechanischen Einfluss, zu Chondrozyten oder zu Osteoblasten differenzieren und produzieren dann ihre typischen Matrixproteine. Bereits in der sehr frühen Phase der Frakturheilung wird Kollagen-I in der frakturfernen, subperiostalen Region von osteoblastären und osteozytären Zellen produziert. Kollagen-II wird später während der Frakturheilung größtenteils von sich differenzierenden Chondrozyten in der Phase der chondralen Kallusbildung vor allem im Frakturspalt zwischen den Kortizes produziert. Hingegen wird Kollagen-I nur von osteoblastären Zellen hergestellt (Bland et al., 1999). Jedoch sind auch Mischzellen nachgewiesen worden, die sowohl Kollagen-I und -II synthetisieren. Diese Zellen der frühen Differenzierungsstadien verlieren ihre Funktion nach 48h, wenn sie zu hypertrophen Chondrozyten gereift sind (Sandberg et al., 1989, Bland et al., 1999, Hughes et al., 1995).

Auch bei Studien zur Distraktionsosteogenese konnte gezeigt werden, dass es durch den Einfluss von Dehnungsstress zu einer Transdifferenzierung der Chondrozyten kommen kann, bei dem so genannte ovale Übergangszellen zwischen Chondrozyten und Fibroblasten entstehen (Scammell and Roach, 1996). Diese haben einen veränderten Phänotyp, so dass sie neben der Kollagen-II Produktion auch zur Produktion von Kollagen-I fähig sind und somit Mischformen aus Chondrozyten und osteogenen Zellen darstellen (Hirakawa et al., 1994, Yasui et al., 1997, Sato et al., 1998). Durchlaufen die Chondrozyten ihre Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten, verlieren sie die Fähigkeit zur Kollagenproduktion. Aus diesen terminal differenzierten Zellen können auch keine Osteoblasten mehr mit der Fähigkeit zur Synthese von Kollagen-I entstehen. In einem Osteosklerosemodell (oc-/oc-) an Mäusen konnte gezeigt werden, dass durch diese genetische Mutation auch die Fähigkeit der spezifischen Expression von Matrixkollagenen modifiziert werden kann. So zeigen auch proliferierende unausgereifte Chondrozyten die Fähigkeit Kollagen-I zu produzieren. Hingegen konnten auch reife Osteoblasten in metaphysären Knochentrabekeln Kollagen-II und -X synthetisieren, obwohl sie nachweislich keine chondrogene Differenzierung durchlaufen haben.

*In vitro* konnten zudem auch eine beschleunigte Osteoblastendifferenzierung und eine gesteigerte Matrixproteinexpression von Kollagen-I und OPN durch die Applikation von BMPs verifiziert werden. Dieser Einfluss konnte sowohl an bovinen als auch an humanen Osteoblastenzelllinien demonstriert werden (Hu et al., 2005, Lecanda et al., 1997).

Kollagen-X ist ebenfalls ein homotrimeres Polypeptid aus drei al-Ketten mit kurzen, nichthelikalen N-terminalen Enden, die untereinander in vitro hexagonale Strukturen ausbilden. Kollagen-X wird ausschließlich beim Knochenwachstum von hypertrophen Chondrozyten und bei der Bildung des knorpeligen Kallus während der Frakturheilung gebildet (Shen, 2005). Es ist somit ein äußerst interessantes Markermolekül während der chondralen Kallusformierung (Linsenmayer et al., 1988). Die biologische Funktion scheint darin zu liegen, dass es die Kalzifizierung durch Veränderungen der chondrogenen Matrix erleichtert (Kwan et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, dass die Kollagen-X mRNA-Expression in hypertrophierten Chondrozyten hochreguliert wird, nachdem vorausgehend die mRNA-Produktion von Kollagen-II und -IX herunterreguliert wird (LuValle et al., 1989). Das Expressionsmaximum von Kollagen-X wurde dabei unmittelbar vor der Ossifikation des gebildeten Knorpels beobachtet. Dies scheint über einen Vorgang abzulaufen, bei dem Matrixvesikel (bestehend aus Kalzium und alkalischer Phosphatase) sich an Kollagen-X und -II der Knorpelmatrix binden. In diesen Vesikeln wird über die Bindung von Kollagen-X an Annexin-V, einem Protein der Matrixvesikelmembran, der Kalziumeinstrom in die Vesikel und damit ihre Aktivierung induziert (Wu et al., 1991, Anderson, 1995). Zudem bewirkt Kollagen-X eine Aufteilung der chondrogenen Matrix, die für die lokal beschränkte Deposition der Matrixproteine verantwortlich ist. Beim Fehlen von Kollagen-X kommt es zu einer unspezifischeren Mineralisation, die zu einer instabileren und somit verformbareren Wachstumsfuge führt (Kwan et al., 1997).

#### 2.5.7. Osteopontin (OPN)

Osteopontin ist ein stark phosphoriliertes und glykosiliertes 44 kD großes Protein, das sowohl in Körperflüssigkeiten als auch in der Knochenmatrixsubstanz vorkommt (Sodek et al., 1995). Neben dem Beitrag zur Zellregulation durch Beeinflussung der intrazellulären Signalkaskaden (Beeinflussung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup> - und IP<sub>3</sub>-Level, Tyrosinrezeptor-Phosphorilierung) in verschiedenen gesunden oder tumorösen Geweben spielt es vor allem bei inflammatorischen Abläufen und bei der Regulation der Funktion von Osteoklasten und Osteoblasten eine wichtige Rolle (Rittling and Denhardt, 1999). Diese Wirkung wird über die Fähigkeit zur Bindung als Ligand an Integrine und an CD 44 vermittelt, wodurch es die Zellmigration und Zelladhäsion unterstützt (Denhardt and Noda, 1998). Das Expressionslevel von OPN unterliegt dabei dem Einfluss von Zytokinen (Interleukin-1 [IL-1]), Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, PDGF) und Vitamin-D<sub>3</sub> und wird durch diese hochoder herunterreguliert (Denhardt and Noda, 1998).

Im Knochen ist es ein häufig vorkommendes nicht-kollagenöses Protein, das bei Zell-Matrix und Matrix-Matrix-Kontakten als Bindeglied fungiert. Es ist besonders in der Zementlinie, d.h. an der Außengrenze von Osteonen, anzutreffen, wo es von Osteoblasten abgelagert wird. Es scheint dabei als Bindeglied zu anderen Matrixmolekülen wie Kollagen-I zu fungieren und damit die physikalische Stabilität der Extrazellulärmatrix zu verstärken (McKee and Nanci, 1996). OPN wird aber nicht nur von Osteoblasten, sondern auch von Osteoklasten gebildet und bindet an Hydroxyapatitkristalle. Vermutet wird eine Mitwirkung bei der Regulaton der Mineralisation von Knochen (Sodek et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die OPN-, als auch die Kollagen-I-Expression im Knochen durch mechanische Beanspruchung hochreguliert wird und OPN für das Remodeling im Knochen eine tragende Rolle spielt (Miles et al., 1998). Die OPN-Expression ist für die Knochenbildung und das Remodeling jedoch nicht essentiell, was aus Versuchen mit knock-out Tieren gezeigt werden konnte. Jedoch ließ sich bei OPN-Mangel in ovariektomierten Mäusen eine reduzierte Osteoklastentätigkeit mit fehlender Fähigkeit zur Knochenresorption zeigen (Yoshitake et al., 1999, Rittling et al., 1998). Beschrieben ist außerdem, dass die sonst beschleunigte Knochenresorption unter mechanischer Entlastung in Abwesenheit von Osteopontin ausbleibt. Dies vollzieht sich trotz gesteigerter Proliferation und Differenzierung von Osteoklasten aus Progenitorzellen (Ishijima et al., 2001). Die osteoblastenabhängige Knochenformation wird in OPN defizienten Tieren ebenfalls unterdrückt (Ishijima et al., 2001). OPN scheint jedoch durch mechanische Belastung stärker exprimiert zu werden (Morinobu et al., 2003). Die Schwierigkeit die Rolle von Osteopontin zu begreifen, liegt auch darin, dass durch die Variationsmöglichkeiten der posttranslationalen Modifikation und Phosphorilierung die biologische Wirkung und die Fähigkeit zur Ligandeninteraktion verändert wird (Sodek et al., 2000). Ungeklärt bleibt daher die Frage, ob und inwiefern der Einfluss von OPN im Knochen nur als statisches Verbindungsglied oder auch als dynamischer Einflussfaktor zu sehen ist.

### 2.5.8. Matrix-metalloproteinase 9/13 (MMP 9/13)

Für eine normal ablaufende Frakturheilung ist nicht nur eine zeitlich und räumlich abgestimmte Neubildung von Extrazellulärmatrixsubstanz notwendig, sondern auch ein koordinierter Abbau der Matrix. Dies ist eine notwendige Voraussetzung für die Angiogenese und den sukzessiven Gewebeumbau.

Die MMP-Familie besteht aus vier größeren Gruppen: den Kollagenasen, Stromelysin, Gelatinasen und so genannten Membrane-type-MMPs. Hierbei konnten eine Vielzahl spezifischer Metall-abhängiger Peptidasen enkodiert werden. Diese Zink-abhängigen Enzyme verbindet viele strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten.

MMP 13 (Kollagenase-3) ist ein degradierendes Enzym, das vor allem Kollagen-II (sechsfach stärker), aber auch Kollagen-I und -III abbaut (Johansson et al., 1997). Welche Faktoren Einfluss auf die MMP-13-Expression und deren Regulation haben, ist noch nicht vollständig geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass auch Parathormon (PTH), ein Hormon, was zur Dekalzifizierung von Knochen führt, die MMP-13-Expression *in vivo* im Knochen hochreguliert (Uchida et al., 2001). Diese Hochregulation im Knochen konnte auch durch TGF-ß und BMP-2 nachgewiesen werden (Johansson et al., 1997).

Verstärkt exprimiert wird MMP-13 von hypertrophen Chondrozyten und Osteoblast-like-cells (Gack et al., 1995, Stahle-Backdahl et al., 1997). Dies vollzieht sich während der Frakturheilung zu Zeitpunkten, wenn die Kallusbildung ihr Maximum erreicht und die Ossifikation durch Umstellung der Matrixproduktion von Kollagen-II auf Kollagen-I vollzogen wird. Dies wiederspiegelt den Zeitpunkt, wenn während der enchondralen Ossifikation im Kallus die hypertrophen Chondrozyten abgebaut werden und die Knochenbildung angeregt wird (Yamagiwa et al., 1999). MMP-13 wird hier jedoch nur von osteoblastischen Zellen in der Umgebung von Osteoklasten, nicht aber von Osteoklasten (TRAP<sup>+</sup>-Zellen) selbst gebildet (Hayami et al., 2000). Zudem wurde gezeigt, dass MMP-13 in den terminal hypertrophierten Chondrozyten exprimiert wird, die auch gleichzeitig Osteopontin exprimieren. Zusammen mit Osteopontin, das als Adhäsionssubstanz für Osteoklasten fungiert, scheinen diese Chondrozyten somit ihren eigen Abbau zu initiieren

(Yamagiwa et al., 1999). Die Fähigkeit von Osteoblast-like cells, MMP-13 zu exprimieren, scheint aber mit der Differenzierung zu reifen Osteoblasten verloren zu gehen (Yamagiwa et al., 1999).

MMP-9 (gelatinase B) hingegen gehört in die Gruppe der Gelatinasen. Es wird von Osteoklasten produziert und spielt eine bedeutende Rolle bei der Resorption von Knochen und beim Abbau von degradierter Kollagen-II reicher Matrix (Rice et al., 1997). Zudem ist es am Abbau von Gelatin, Kollagen-IV und –V und Elastin beteiligt. Durch die Fähigkeit zur Degradierung der Basalmembran wird ihnen eine Beteiligung am invasiven Tumorwachstum zugeschrieben (Birkedal-Hansen et al., 1993). Zudem existiert ein synergistischer Effekt im Zusammenspiel von MMP-9 und MMP-13 beim Abbau des Kollagens und somit der ECM (Engsig et al., 2000).

## 2.6. Problemstellung

### 2.6.1. Zielsetzung / Arbeitshypothese

Zielsetzung dieser Arbeit war es, den bisher noch unzureichend beschriebenen Vergleich der Expression von chondrogenen und osteogenen Wachstumsfaktoren im Frakturheilungsverlauf unter unterschiedlichen mechanischen Bedingungen zu beschreiben. Es sollte der Versuch unternommen werden die Signaltransduktion und Expression in festgelegten biomechanischen Settings zu untersuchen. Hierfür erfolgte am Schafmodell die Anlage von zwei unterschiedlich steifen externen Fixateuren bei gleichen **Operations**und Verlaufsbedingungen. Es wurde zum einen ein rigider Fixateur externe montiert, der eine stabile Überbrückung des Osteotomiespaltes gewährleistete und zum anderen ein kritischer Fixateur externe, der ein erhöhtes Ausmaß an Scherbewegung zuließ. Die axiale Bewegungskomponente war dabei jedoch identisch (Epari et al., 2006).

In Voruntersuchungen des eigenen Instituts mit den etablierten Tiermodellen und identischer Versuchsanordnung wurde festgestellt, dass es zu einem modifizierten Heilungsverlauf über den untersuchten Zeitraum kommt. Die chondrale Phase dauerte unter instabiler Fixation länger an und die Mineralisierung trat verzögert und prolongiert auf (Epari et al., 2006, Schell et al., 2005, Schell et al., 2008). Es erfolgte jedoch keine Einflussnahme auf die Frakturbiologie durch z.B. Periostkauterung, so dass die verzögerte Heilung lediglich auf die mechanische Instabilität zurückzuführen ist.

Im Rahmen von mehreren Forschungsprojekten wurde versucht, den Einfluss der mechanischen Bedingungen auf die ablaufenden Prozesse während der Frakturheilung zu beschreiben (Le et al., 2001, Niikura et al., 2006). Inwiefern jedoch die unterschiedlichen

mechanischen Bedingungen die molekularen Prozesse der Frakturheilung beeinflussen, blieb bisher weitgehend ungeklärt. Ziel dieser Arbeit war es, an einem etablierten Tiermodell mit bereits beschriebenem unterschiedlichem Heilungsverlauf molekulare Wachstumsfaktoren zu detektieren, die den unterschiedlichen Verlauf reflektieren.

Die Hypothesen des Projektes lauten:

- 1. Es gibt einen erkennbaren Einfluss der mechanischen Stabilität der Osteosynthese auf die unterschiedliche Wachstumsfaktorenexpression und es kommt entsprechend des verzögert verlaufenden Heilungsprozesses zu einem quantitativ veränderten Expressionsmuster an osteogenen Wachstumsfaktoren.
- Es zeigt sich im Rahmen der unterschiedlichen Expressionsmuster eine signifikante Downregulation an osteogenen Wachstumsfaktoren bzw. eine protrahierte und prolongierte Expression an chondrogenen Faktoren bei instabiler Fixation im verzögerten Frakturheilungsverlauf.

# 3. Material/ Methoden

### 3.1. Versuchsanordnung

Die Analyse der Wachstumsfaktoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Frakturheilung ist Teil eines umfangreich angelegten Forschungsprojektes, bei dem die mRNA-Expression untersucht werden soll. Dabei sind zwei Teilprojekte entstanden. Zum einen die vom Autor untersuchte Analyse der osteogenen Wachstumsfaktoren und deren Beeinflussung durch unterschiedliche mechanische Frakturstabilisierung. Parallel zu der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der angiogenen Wachstumsfaktoren analysiert.

Die 48 untersuchten Tiere wurden aus einem vorgegebenen Pool zufällig ausgewählt und dann entweder der Gruppe mit dem rigiden Fixateur externe oder der Gruppe mit dem kritischen Fixateur externe zugeordnet.

Den Schafen wurde im diaphysären Bereich an der rechten medialen Tibiakante entweder ein rigider oder kritischer Fixateur angelegt und anschließend eine Osteotomie durchgeführt. Die Tiere konnten nach der Operation voll belasten und wurden nach Standzeiten von 7, 14, 21 und 42 Tagen erneut operiert. In dieser Zweitoperation wurde das sich mittlerweile gebildete Frakturhämatom bzw. das entstandene Kallusgewebe im Frakturspalt entnommen und die Tiere getötet. Jede der untersuchten Gruppen bestand aus sechs Tieren, wobei jeweils 24 Tiere entweder mit einem rigiden oder einem kritischen Fixateur externe behandelt wurden.

Die erhaltenen Materialien wurden mittels quantitativer RT-PCR Analyse auf die angegeben chondrogenen und osteogenen Wachstumsfaktoren untersucht.

### **3.2. Versuchstiere**

Die am Versuch beteiligten Tiere wurden vor der Versuchsreihe in der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow-Klinikum gehalten und versorgt. Die Genehmigung des Tierversuchsvorhabens wurde durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit/ Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, erteilt (G 0172/04, G 0127/07).

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 48 gesunde, weibliche Merinomix Schafe. Bei einem Alter von mindestens 2 Jahren wogen die Tiere durchschnittlich 77 kg (+/- 10kg).

### 3.2.1. Erstuntersuchung der Tiere

Nach Anlieferung wurde der Gesundheitszustand der Versuchstiere bei einer Erstuntersuchung sichergestellt. Dies erfolgte durch Überprüfung des Gewichts, der Körpertemperatur, des Zahnstatus, der Herzfequenz und der Atemfrequenz. Die antparasitären Behandlung der Tiere erfolgte mit Ivermectin (Ivomec<sup>®</sup>, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

## 3.3. Operationsvorbereitung und Narkose

Die Narkose und Operation erfolgte nach einem in der Forschungsgruppe etablierten und standardisierten Modell.

Die Tiere wurden 12 Stunden vor der Operation nüchtern gehalten, lediglich Wasser wurde ad libitum dargeboten. Den Tieren wurde zur Vorbereitung ein venöser Zugang in die Vena cephalica antebrachii gelegt. Über diesen Zugang wurden 0,5g Thiopental-Natrium (Trapanal®, Fa. Lomberg, Chemische Fabrik GmbH, Konstanz, Deutschland) pro 50 kg Körpergewicht zur Sedierung verabreicht. Im Anschluss wurden die Tiere unter Laryngoskopkontrolle mit einem Trachealtubus der Größe 9,0 intubiert und an die Beatmungsmaschine angeschlossen. Hier wurde das Tier mit einem Isofluran-Lachgas-Sauerstoffgemisch beatmet. Zum Schutz vor Aspiration wurde der Cuff des Tubus hinter dem Kehlkopf geblockt. Während der Narkose wurden die Vitalparameter der Tiere durch Messung der Herzfrequenz, der O<sub>2</sub>-Konzentration (durch Pulsoxymeter am Ohr) und der CO<sub>2</sub>-Exspirationskonzentration überwacht. Die Atemfrequenz wurde bei einem vorgegebenen exspiratorischen CO<sub>2</sub>-Partialdruck von 35-40mmHg auf 10-12 Atemzüge/ min eingestellt. Unmittelbar vor Operationsbeginn wurde den Tieren zur Analgesie ein Bolus von 5ml Fentanyl 0,5mg (Fentanyl-Janssen<sup>®</sup>, Firma, Neuss, Deutschland) verabreicht. Ferner erhielten die Tiere vor Operationsbeginn 100ml Augmentan/ Clavulansäure (Augmentan<sup>®</sup> i.v. 2,2g, GlaxosmithKline GmbH& Co. KG, München, Deutschland) als Antibiotikaprophylaxe und wurden während des Eingriffs mit Elektrolytlösung versorgt.

Den Tieren wurde die rechte Tibia enthaart und gründlich gereinigt. Die Haut über der medialen Tibiakante wurde mit Povidon-Iod (Braunol<sup>®</sup>, B. Braun Melsungen AG,Melsungen, Deutschland) gründlich desinfiziert und anschließend der gesamte Körper unter Aussparung der zu operierenden Stelle steril abgedeckt.

### **3.4. Operation**

### Fixateur externe

Während der Operation wurde den Tieren ein rigider oder ein kritischer Fixateur externe angelegt. Der rigide Fixateur bestand aus sechs Schanzschrauben (Ø5mm, Synthes, Bochum, Deutschland), die jeweils über zwei Klemmbacken mit zwei Stahlrohren (10mm, Synthes, Deutschland) verbunden waren (Abb: 3.1.-1 links). Durch eine vorgegebene Schablone wurde der Abstand zwischen den Schanzschrauben auf 2,1 cm- 3,4 cm- 3 cm- 3,4 cm- 2,1 cm (Nummerierung der Schrauben von proximal nach distal von eins bis sechs) festgelegt und die innere Karbonstange wurde mit einer Distanz von 15 mm zur Haut angebracht.

Der kritische Fixateur stellte einen Rotationsfixateur dar. Er wurde dahingehend ausgerichtet, bei hoher axialer Steifigkeit lediglich Scherbewegungen im Frakturspalt zuzulassen. Dieser Fixateur wurde ebenfalls mit sechs Schanzschrauben mit identischen Abständen im Knochen fixiert. Dem unteren Klemmbackensystem sitzt das Gehäuse auf. Dieses beinhaltet zwei übereinander liegende Kegelrollenlager, welche die axialen Kräfte aufnehmen und eine leichtgängige Rotation und damit die Scherbewegung im Frakturspalt ermöglichen (Abb: 3.1.-1 rechts). Die Querverbindungsstange hatte einen Abstand von 20mm zur Haut (Schell,Lienau 2008).





Abb.: 3.1-1

Schematisch dargestellt ist links der unilaterale rigide Fixateur externe und rechts der kritische Fixateur externe, bei dem die gelb dargestellten Gleitzylinder eine erhöhte Rotation und damit Scherbewegungen im Frakturspalt zulassen
#### Vorgehen

Zum Anbringen des Fixteur externe wurden auf das Planum cutaneum cruris der Tibia eine Schablone aufgelegt, ausgerichtet und fixiert. Durch die Schablone wurden vor dem Einbringen der Schanzschrauben kleine Hautinzisionen gesetzt. In diese Hautinzisionen wurde, durch die Löcher der Schablone, eine Bohrhülse direkt auf das Periost aufgesetzt, die als Richtungsweiser und Gewebeschutz diente. Mit einem druckluftbetriebenen 3,5 mm Spiralbohrer wurden die sechs Vorbohrungen in die Tibia gesetzt. Danach wurden die sechs Schanzschrauben mit einem Handbohrfutter bikortikal eingedreht (Abb. 3.1.-2).

Über einen Distanzhalter wurde die erste Karbonstange mit einer Distanz von 15mm zur Hautoberfläche angebracht (Abb. 3.1.-3). Darüber wurde direkt die zweite Stange angelegt und die beiden Karbonstangen wurden über zwölf Klemmbacken als Verbindungselement des rigiden Fixateur externe mit den Schanzschrauben verbunden. Über einen Sägeschablone wurde an einer standardisierten Stelle in der Mitte der Schrauben (drei Schrauben proximal und drei Schrauben distal des Osteotomiespaltes) die Osteotomieebene festgelegt und markiert. Nach dem Hautschnitt wurde der Knochen vom umliegenden Muskel- und Weichteilgewebes stumpf abpräpariert.



Abb. 3.1.-2: Bikortikales Eindrehen der Schanzschrauben über eine Lochschablone.

Abb. 3.1.-3: Anbringen der Klemmbacken mit einem Distanzhalter mit einem Abstand 15 mm zur Hautoberfläche.





Abb.3.1.-4:DistraktiondesFrakturspaltesaufauf3mmmiteinemSpacernachOtseotomieundFixateuranlage.

Abb. 3.1-5: Vollständig montierter rigider Fixateur externe vor dem Wundverschluss.



Mit dem Einsetzen von zwei Homann-Haken unter die Tibia wurde das umliegende Muskelund Weichteilgewebes geschützt. Die Osteotomie wurde mit einem oszillierenden, druckluftbetriebenen Sägeblatt (Schnittdicke = 1 mm) unter kontinuierlicher Spülung mit steriler 0,9% NaCl-Lösung durchgeführt. Nach der vollständigen Durchtrennung der Tibia wurden die Klemmbacken des Fixateur externe distal der Osteotomie gelöst und über einen Spacer wurde ein definierter Frakturspalt von 3 mm eingestellt (Abb. 3.1.-4). Der Fixateur externe wurde in dieser Position festgestellt und man ließ es in diesen Spalt einbluten (Abb. 3.1.-5). Schließlich wurde die Haut über der Osteotomie vernäht und die Wunde mit einer sterilen Binde abgedeckt und umwickelt.

Das Anlegen des kritischen Fixateur externe erfolgte in identischer Reihenfolge. Der Abstand der Verbindungsstange zur Haut betrug, bedingt durch den anderen Fixateuraufbau, 20mm. Es wurde auch hier zum Festlegen eines definierten Frakturspaltes von 3 mm ein Spacer nach Osteotomie eingesetzt und anschließend der Fixateur in dieser Position stabilisiert (Abb. 3.1.-6).



Abb. 3.1.-6 Fertig montierter kritischer Fixateur externe mit distrahiertem 3mm Osteotomiespalt.

Im Anschluss an die Operation wurde bei den Tieren eine Röntgenkontrolle bei 73 kV und 2,5mAs im antero-posterioren Strahlengang durchgeführt und die Tiere erhielten 1,1ml Flunixin-Meglumin (Finadyne<sup>®</sup> RP, Essex Pharma GmbH & Co. KG, München, Deutschland) /50kg KGW als Analgetikum subkutan.

### Postoperative Wundkontrolle

Bei den Tieren erfolgte täglich eine Wundkontrolle, bei der die Eintrittspforten der Schanzschrauben zuerst mit einer sterilen Pinzette trocken von Krusten gereinigt wurden und anschließend die Eintrittspforten lokal mit Ethacridinlactat (Rivanol<sup>®</sup>, Riedel-de Häen AG, Seelze, Deutschland) gespült wurden. Das Wundgebiet wurde mit sterilen Kompressen trocken getupft und wiederum mit einer sterilen Binde abgedeckt. Die Schafe erhielten bis zum siebten postoperativen Tag Flunixin-Meglumin subkutan als Schmerzprophylaxe.

# Frakturhämatomentnahme

An den Tieren mit kurzer Standzeit wurde eine Hämatomentnahme durchgeführt, bei den Tieren mit längerer Standzeit (über zwei Wochen) erfolgte die Entnahme des Kallusgewebes. Diese Gewebeentnahme wurde in einer zweiten Operation unter Allgemeinanästhesie durchgeführt. Entsprechend der Wundheilung zu den jeweiligen Standzeiten wurden bei den 7d Tieren lediglich die Fäden gezogen, bei den Tieren mit längeren Standzeiten musste die gut verheilte Wunde erneut eröffnet werden. Nach der Wunderöffnung wurde das entstandene Gewebe unter sterilen Bedingungen mit Hilfe einer Pinzette und einer Präparierschere entnommen. Das entnommene Gewebe wurde zur Stabilisierung der RNA in RNAlater (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufbewahrt und anschließend bei -80°C gelagert.

#### Tötung der Tiere

Die Tötung der Tiere erfolgte intraoperativ unmittelbar im Anschluss an die Gewebsentnahme. Lediglich bei den 7d Tieren erfolgte die Tötung erst nach einer Standzeit von 14 Tagen post Osteotomie, da bei diesen Tieren noch histologische Untersuchungen im Rahmen eines weiteren Projektes angeschlossen wurden.

Über einen venösen Zugang in der Vena cephalica antebrachii erhielten die Tiere anfangs Thiopental-Natrium (Trapanal<sup>®</sup> 2,5g; Altana Pharma Deutschland GmbH, Konstanz, Deutschland) zur Sedierung. Anschließend wurde den Tieren hochkonzentriertes Trapanal<sup>®</sup> i.v. injiziert und in tiefer Narkose 100ml 1M Kaliumchlorid-Lösung (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) als kardioplege Lösung verabreicht.

Der Tod wurde durch Sicherstellung des Fehlens von biologischen Lebenszeichen, Reflexen und auskultatorisch festgestellt.

#### 3.5. Aufarbeitung der Gewebe

#### RNA-Isolierung

Alle Arbeiten wurden stets unter sterilen Bedingungen mit RNase-freien Pipettenspitzen und Einmalhandschuhen durchgeführt. Die entnommenen Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff überführt und dann bis zur Probenbearbeitung bei -80° aufbewahrt.

Die Isolierung dient dazu, die aktivierte Erbinformation (von den Zellen durch Transkription produzierte mRNA) von der Erbinformation die als DNA vorliegt zu trennen. Dabei wurde 1g des entsprechenden Gewebes (Frakturhämatom bzw. Kallusgewebe) in 15ml RLT-Puffer + ß-Mercaptoethanol (ß-ME) (Mischungsverhältnis 1:100) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland) gebracht, wobei der RLT-Puffer zur Zerstörung von Zellenmembranen eingesetzt wurde. ß-ME hingegen sollte die Bildung von Disulfidbrücken zwischen freigesetzten Proteinen (nach Zelllyse) verhindern. Das Frakturhämatom wurde dann für 60 sec mit einem Stabmixer Ultra Turrax<sup>®</sup> T25 Basic (IKA Werke GmbH& CoKG, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Anschließend wurde, nach Zentrifugation der Proben (Jouan GR 412 Zentrifuge, Jouan GmbH, Hessen, Deutschland) für 10min bei 4.500U/min, der klare Überstand in ein neues 50ml Sammelröhrchen überführt. Hierzu wurden 15ml Ethanol 70% (Verhältnis 1:2), zur Unterstützung der Membranbindungseigenschaften zugegeben, durchpipettiert und auf eine Silica-Gel-Membran in einer Filtersäule aufgetragen.

Das entnommene Kallusgewebe nach 42d Standzeit konnte auf Grund der fortgeschrittenen Mineralisation nicht auf diese Art aufbereitet werden. Hierfür wurde zum Zermahlen des Gewebes eine Kugelmühle MM301 (Retsch GmBH<sup>®</sup>, Baan, Deutschland) mit den entsprechenden sterilen Gefäßen und Kugeln verwendet. Hierbei wurde 1g des gefrorenen Gewebes in einen vorgekühlten Mahlbecher gegeben und bei 30 Hz für 3 min gemahlen. Das enthaltene Gewebemehl wurde in 10 ml QIAzol<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden, Deutschland) gegeben und unter intermittierendem Vortexen 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Chloroform (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) hinzu gegeben und durch vorsichtiges Schwenken vermischt. Dieses Gemisch wurde dann für 15 min bei 14.000 U/ min abzentrifugiert und der klare bis trübliche Überstand wurde in ein neues Tube überführt. Dem Überstand wurde dann im Verhältnis 1:2 Ethanol 70 % zu gefügt und gut vermischt. Nach diesen unterschiedlichen Arbeitsschritten für die entsprechenden Gewebearten, wurde nun mit einem gemeinsamen Protokoll fortgefahren.

Hierzu wurden 15 ml des Gewebe-Ethanol-Gemisches auf ein 50 ml Tube mit Säule (RNA) gegeben und für 5 min bei 3000-5000 U/ min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde für die restlichen 15 ml des Gemisches noch einmal wiederholt. Die RNA wurde von der Membran gebunden und Proteine, Nukleasen, DNA und Salze durch Zugabe der im Kit enthaltenen Spüllösungen heraus gewaschen. Zuerst wurden 15 ml RW1-Puffer (Qiagen<sup>®</sup>, Hilden, Deutschland) auf die Säule gegeben und abzentrifugiert, dann 10 ml des RPE-Puffers (Qiagen<sup>®</sup>, Hilden, Deutschland). Durch nochmalige Zugabe von RPE-Puffer und zehnminütige Zentrifugation wurden die restlichen Spuren von Ethanol zusammen mit anderen Verunreinigungen entfernt. Das gewonnene Filtrat wurde jeweils verworfen und die Säule in ein neues Sammelröhrchen gestellt. Durch Zugabe von 800 µl RNAse freiem Wasser auf die Säule und 3 min Zentrifugation bei >10.000 U/ min wurde die RNA dann aus der Membran eluiert. Um einen möglichst großen RNA Ertrag zu gewinnen, wurde dieser Schritt ein zweites Mal durchgeführt.

Die so erhaltene reine RNA wurde dann bei -80°C aufbewahrt.

#### Photometrische RNA-Konzentrationsmessung

Nach der RNA-Isolierung erfolgte die photometrische RNA-Konzentrationsmessung, um von jeder Probe eine identische Menge an mRNA in der RT-PCR einzusetzen. Die RNA kann hierbei bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm photometrisch quantifiziert werden. Als Küvette wurde die (50-2000µl) UVette<sup>®</sup> (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verwendet und die Proben im Eppendorf BioPhotometer V 1.35<sup>®</sup> (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

analysiert. Die Proben wurden gegen Aqua dest (Aqua ad iniectabilia Braun, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) gemessen. Zudem wurde das Verhältnis der Absorptionswerte von 260 nm und 280 nm (absortion ratio) betrachtet, welche eine Aussage über die Reinheit der RNA-Lösung erlaubt.

## Reverse Transkription

Nach der Konzentrationsmessung erfolgte das Umschreiben (Reverse Transkription) der mRNA in complementärDNA (cDNA). Die mRNA wird mit Randomprimern inkubiert, so dass diese dann die Bindungsstelle für die Reverse Transkriptase bilden. Somit lässt sich entsprechend der komplementären Basenpaarung (nach Watson & Crick) über Randomprimer das ,transcript of interest' (TOI) amplifizieren.

Für das Umschreiben wurden 80 ng RNA in den Versuchsansatz eingebracht. Dazu wurde 1 µl dNTP (10mM) (BIORON GmbH, Ludwigshafen, Deutschland), 1µl Randomprimer (BIORON GmbH, Ludwigshafen, Deutschland) und ein Restvolumen Aqua dest (Aqua ad iniectabilia Braun, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) hinzu gegeben, um ein Gesamtvolumen von 10 µl zu erreichen. Dieses wurde kurz abzentrifugiert (Spectrafuge Mini Centrifuge, Labnet International, Inc., Woodbridge, USA) und im Thermocycler (Mastercycler ®, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) fünf Minuten bei 65° inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf Eis gekühlt. Diesem Ansatz wurden 4µl M-MLV 5x Reaktionspuffer (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland), 1µl RNAse-Inhibitor (40U/µl) (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland), 4,5 µl Aqua dest zugegben und für 2 min bei 42°C inkubiert. Zu diesem Reaktionsgemisch wird dann 1µl MMLV-RT-H (200 U/ µl, reverseTranskriptase) (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland), auf ein Gesamtvolumen von 20,5 µl, hinzugesetzt. Nach Zentrifugation wurde dieser Reaktionsansatz für 50 min bei 42°C im Mastercycler inkubiert. Hierbei erfolgte die Reverse Transkription der RNA-Einzelstränge in cDNA-Einzelstränge. Um die Inaktivierung der Enzyme zu erreichen, wurde der Reaktionsansatz dann für 15 min 70 °C inkubiert. Abschließend, nach wiederholter Kühlung auf Eis und Zugabe von 1 µl RNase-H (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland), erfolgte eine Verdauung der restlichen RNA für 20 min bei 37°C.

Die Umgeschriebene cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

# 3.6. Analysemethoden

#### Quantitative (Real-time) PCR-Analyse

Um genaue quantitative Aussagen über das Expressionsniveau von Genen zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung treffen zu können, muss man eine so genannte Real-time-PCR durchführen. Auch diese PCR-Reaktion läuft die in sich wiederholenden Zyklen ab. In jedem Zyklus werden zuerst die DNA-Stränge aufgetrennt, indem die Wasserstoffbrückenbindungen der Basenpaare gelöst werden (Denaturierung). Anschließend lagern sich kurze spezifische Oligonukleotidsequenzen (Primer) an die komplementären DNA-Abschnitte des Gens an (Annealing). An diese Primer lagert sich das Enzym Taq-Polymerase an und verlängert die entsprechende komplementäre DNA-Sequenz (Elongation), so dass eine exakte Kopie der Template-cDNA hergestellt wird. Somit wird durch die Wahl des Primers ein ganz spezifisches Transcript of interest (TOI) vervielfältigt und analysiert. Bei der Real-time-PCR wird dem üblichen Reaktionsansatz noch ein floureszierender Farbstoff zugegeben, dessen Einlagerung in die amplifizierten Gene vom iCycler (Bio-Rad Laboratories GmbH & Co KG, München, Deutschland) detektiert werden kann. Im vorliegenden Projekt wurde die so genannte SybrGreen® (Abgene, Hamburg, Deutschland) -Methode angewendet. SybrGreen® stellt dabei einen Floureszenzfarbstoff dar, der in jedem durchlaufenen Zyklus in die entstehende Doppelstrang-DNA des spezifischen Transcript of interest (TOI) eingebaut wird. Dies kann als Absorbtionsanstieg des Fluoreszenzsignals im iCycler gemessen werden. Man erhält eine Signalkurve, die dem Fluoreszenzanstieg in Relation zur Zyklenzahl entspricht. Aus dieser Kurve kann man den treshold-cycle (Ct-Wert) ermitteln, der die Phase des exponentiellen Kurvenanstiegs widerspiegelt (einziger Zeitpunkt der dem Zeitpunkt der theoretischen DNA-Verdopplung entspricht). Über diesen Ct-Wert kann man vergleichende statistische Analysen durchführen. Durch den Einbau in die entstandenen DNA-Produkte erhält man zusätzlich noch die Möglichkeit, im Anschluss an die Real-time-PCR durch stetige Temperaturerhöhung von 55°C bis 95°C eine Schmelzpunktanalyse durchzuführen. Dies diente der Überprüfung, dass nur ein DNA-Produkt amplifiziert wurde.

Für die Real-time PCR wurde zuerst eine Primerselektionierung durchgeführt, bei der in einem Temperaturgradienten die optimalen Annealingtemperaturen für jedes TOI herausgefunden wurden.

Für die Analyse mit einem Endvolumen von 25μl erwiesen sich folgende Volumenzugaben als optimal: 12,5μl des iQ<sup>TM</sup> Supermix (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland), bestehend aus iTaq DNA Polymerase (50 U/μl), 100mM KCl, 6mM MgCl<sub>2</sub>, 1,6mM dNTPs, 40mM Tris-HCl und Stabilisatoren; je 0,5 μl Primer sense und antisense (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland); 1 µl Absolute <sup>™</sup> MAX QRT-PCR SybrGreen<sup>®</sup> Flourescein-Mix (100x50µl; Abgene, Hamburg, Deutschland); 8,5µl H<sub>2</sub>O und 1µl cDNA (1:10 verdünnt). Dieser Reaktionsansatz wurde in jeweils eine Kammer einer 96-Well-Platte (Abgene, Hamburg, Deutschland) pipettiert, mit Ultra-Clear CAP-Strips (Abgene, Hamburg, Deutschland) verschlossen und für 30sec bei 2000 U/min zentrifugiert (Universal32 R, Hettich Zentrifugen GmbH, München, Deutschland). Durchgeführt und überwacht wurde die Realtime PCR auf dem iCycler System (Bio Rad, München, Deutschland) mit einem Zyklenmuster von initialer Denaturierung von vier Minuten bei 94°C, gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus 30 sec Denaturierung bei 94°C, 30 sec Primerannealing bei 62°C und 30 sec Kettenelongation bei 72°C. Am Ende der Amplifikation erfolgte eine finale Denaturierung für 1 min bei 95°C. Für die darauf folgende Schmelzkurvenanalyse wurden die Proben erst auf 55°C abgekühlt, um dann kontinuierlich auf 95°C erhitzt zu werden, wobei alle 10 sec die Temperatur um 0,5°C erhöht wurde.

Als zu untersuchende TOIs wurden die in Tabelle 3.1. aufgeführten Primerpaare benutzt (oTGF-ß1, oBMP-2, oBMP-4, oBMP-7, oNoggin, oOPN, oOPG-2, oColl -Ia1, oColl -II, oColl-Xa1, oMMP-9, oMMP-13, oM-CSF (Tib Molbiol, Berlin, Deutschland)). Als Referenzgen wurde ovines GAPDH (oGAPDH) eingesetzt.

Name der Primer	Sense/ antisense	Länge des Amplicons n bp	Sequenz $5^{\circ} \rightarrow 3^{\circ}$
oGAPDH se	sense	130	CAA ggT CAT CCA TgA CCA CTT T
oGAPDH ase	antisense		Cgg AAg ggC CAT CCA CA
oTGF- <sup>β1</sup> for	sense	90	CAA ggg CTA CCA CgC CAA T
oTGF- <sup>β</sup> 1 rev	antisense		gTT gTA CAg ggC CAg gAC CT
oBMP-2 se	sense	198	CTT TgC ACC AAg ATg AgC
oBMP-2 ase	antisense		CgC AAC gAT CCA gTC ATT
oBMP-4 for	sense	134	TTC CAC CAC gAA gAA CAT CT
oBMP-4 ase	antisense		gTC gAA gCT Cgg CAg AC
oBMP-7 se	sense	122	CCA ACg TCg CAg AAA ACA
oBMP-7 rev	antisense		gAT gAT CCA gTC CTg CCA
oNOG se	sense	94	ggC TgT ggT CgC AgA CCT T
oNOG ase	antisense		ggA Cgg CTT gCA CAC CAT
oM-CSF se	sense	228	CTg AgC CCT gAC CTT CTG CT
oM-CSF ase	antisense		gCA ggC CCT CAA TTT CAA Ag
oCOLL-1a1 se	sense	136	CTg CAA CCT ggA TgC CAT TA
oCOLL-1a1 ase	antisense		TTg TCC TTg ggg TTC TTg CT
oCOLL-2 se	sense	228	AgT ggg gCg AgA CTg TgA TT
oCOLL-2 ase	antisense		CTT Tgg gTT TgC CAT ggA TT
oCOLL-Xa1 se	sense	95	ggC CgT TTG TTA gTg CCA AT
oCOLL-Xa1 ase	antisense		TTg ggT CgT AAT gCT gTT gC
oOPN se	sense	163	gCT CTg Agg AAA AgC AgC TTA A
oOPN ase	antisense		gAA TTC Tgg ggT TCT Agg AAA gT
oOPG-2 se	sense	133	AgC AgC gAA TCA TCg ACT CA
oOPG-2 ase	antisense		ACT gAg CCA gTT Cgg ggT AA
oMMP-9 se	sense	95	gTg ATT gAC gAC gCC TTT g
oMMP-9 ase	antisense		CCA TCT CCg TgC TCT CTA ACA C
oMMP 13 se	sense	228	gAg CAC CCT TCC CAT gAC C
oMMP-13 ase	antisense		AAg ggC TgC ACT gAT CTT TTT AA

Tabelle 3.1 Verwedete Primersequenz und Länge der Genprodukte "Transcripts of interest" (TOI)

Bei jedem Versuchsansatz wurden für alle Primer Negativkontrollen, d.h. ohne Zugabe von DNA, durchgeführt, um Kontaminationen ausschließen zu können. Jeder Versuchsansatz wurde dreifach durchgeführt und damit die Versuchsreihe auf Reproduzierbarkeit gesichert.

Zur Auswertung wurde die Methode der relativen Quantifizierung von Genexpression ausgewählt. Für jedes zu untersuchende TOI des Untersuchungsgewebes wurde der entsprechende C<sub>t</sub>-Wert erhoben. Von diesem wurde der C<sub>t</sub> -Wert des Referenzgens (oGAPDH) abgezogen, so dass man den  $\Delta$  C<sub>t</sub>-Wert erhielt ( $\Delta$  C<sub>t</sub> <sub>TOI</sub> = C<sub>t</sub> <sub>TOI</sub> - C<sub>t</sub> <sub>Referenz</sub>). Zusätzlich wurde entsprechend für jedes TOI ein Standard  $\Delta$  C<sub>t</sub>-Wert ermittelt  $(\Delta C_{t \text{ Standard}})$ . Aus laborintern ermittelten Werten eines separaten Projektes mit Schafen, die eine Standzeit von 4d post Osteotomie hatten, wurde für jedes TOI ein  $\Delta$  CT wert ermittelt ( $\Delta C_{t \text{ Standard}} = C_{t \text{ TOI 4d}} - C_{t \text{ Referenz}}$ ). Es wurden dabei ebenfalls 6 Tiere untersucht, so dass aus dem Mittelwert der Tiere der Standard-Wert ermittelt werden konnte. Anschließend wurde die Differenz aus  $\Delta C_t$  des Untersuchungsgewebes und  $\Delta C_t$  des Standards errechnet ( $\Delta C_{t \text{ TOI}} - \Delta C_t \text{ Standard}$ ). Diese Differenz bildet negativiert den Exponent zur Basis zwei, so dass man aus der Formel 2 <sup>-( $\Delta\Delta C_t$ )</sup> die quantitativen Unterschiede der Kopienzahl zwischen den Untersuchungsgeweben darstellen kann.

# 3.7. Statistische Auswertung

Die experimentellen Ergebnisse der Realtime-PCR wurden mit dem Statistikprogramm SPSS (13.0, SPSS Inc, Chicago, USA) ausgewertet. Der Vergleich der beiden Fixateursysteme hinsichtlich der Genexpression der untersuchten Faktoren wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Ergebnisse wurden graphisch durch Boxplots mit Median und Quartile dargestellt. Hierbei sind signifikante Ergebnisse beim Vergleich kritischer und rigider Fixateur mit \* und Vergleiche im Zeitverlauf von kritischem oder rigidem Fixateur mit \*\* gekennzeichnet. Extremwerte sind im Rahmen der graphischen Darstellung als  $^{\circ}$ , Ausreißer als  $\nabla$  gekennzeichnet. Zudem wurden Median und Standardabweichung betrachtet. Statische Signifikanz wurde ab einem p  $\leq$  0,05 festgelegt. Beim der Analyse des Zeitverlaufs von kritischem und rigidem Fixateur wurde zusätzlich der Bonferoni-Holm-Test angewandt, wobei p1< 0,167; p2 < 0,025 und p3 <0,05 für einen signifikanten Unterschied festgelegt wurde.

# 4. Ergebnisse

Bei der Auswertung der untersuchten Wachtumsfaktoren wurde zum einen untersucht, ob es einen Unterschied der mRNA-Expression zwischen kritischem und rigidem Fixateur zu den jeweils untersuchten Zeitpunkten gibt. Zum anderen wurde untersucht, wie sich die Expressionswerte unter Fixierung mit einem kritischen oder einem rigiden Fixateur im Zeitverlauf während der Frakturheilung verändern.

In die Auswertung der Wachstumsfaktoren gingen für die einzelne Gruppe jeweils sechs Tiere ein. Ein Tier in der Gruppe der rigiden Fixation mit 21 Tagen Standzeit erlitt während der Standzeit jedoch eine Fraktur im Fixateurbereich. Dieses Tier musste vorzeitig getötet werden und somit aus der Untersuchungsgruppe ausgeschlossen werden, da es nicht mehr die Einschlusskriterien zur Analyse erfüllte.

# 4.1. Quantitative Real-time PCR der Wachstumsfaktoren 4.1.1. BMP-2

Die Auswertung der BMP-2 Expression lässt erkennen, dass die BMP-2-Expression nach Stabilisierung der Osteotomie mit einem rigiden Fixateur während der untersuchten Zeitpunkte kontinuierlich ansteigt. Ein statistisch messbarer Unterschied besteht aber nur zum Zeitpunkt zwischen den Tag 21 und Tag 42 (p \*\*<sup>1</sup> =0,004). In der Gruppe der Tiere die mit einem kritischen Fixateur versorgt wurden, hat sich gezeigt, dass es hier ebenfalls einen Anstieg des Expressionslevels von BMP-2 gab, allerdings ohne signifikante Unterschiede während der gemessenen Zeitpunkte. Insgesamt war der Anstieg bei kritischer Fixation geringer ausgeprägt als bei rigider Fixation. Vergleicht man die beiden Gruppen gegeneinander, zeigt sich, dass die rigide Fixation mit einer vermehrten Expression von BMP-2 einhergeht. Jedoch lässt sich während der ersten beiden Zeitpunkte nach 7d und 14d kein signifikanter Unterschied in der RNA-Expression aufzeigen. Einen signifikanten Unterschied lässt sich am 21. Tag (p \*<sup>1</sup> =0,009) erkennen. Am Tag 42 (p=0,065) wird tendenziell bei rigider Fixation BMP-2 höher exprimiert, man kann aber keinen signifikanten Unterschied zwischen den Fixationsgruppen sehen.



Abb: 4.1. Zeitlicher Verlauf der BMP-2 mRNA-Expression beim Vergleich kritischer und rigider Fixateur externe und Signifikanzdarstellung im Zeitverlauf \*\* und zwischen kritischem/ rigidem Fixateur \*

<u>BMP-2</u>				
<u>Rigider Fixateur</u>	Hämatom 7d	Hämatom 14d	Hämatom 21d	Hämatom 42d
Median	1,78	2,19	3,01	7,18
1. /3. Quartil	0,78/ 2,30	2,09/ 2,31	2,00/ 3,54	6,69/ 7,28
<u>Kritischer Fixateur</u>				
Median	0,96	1,71	1,41	2,71
1./ 3. Quartil	0,64/ 1,21	1,29/2,20	1,29/ 1,57	2,32/ 4,60

Tab: 4.1. statistische Auswertung der BMP-2 mRNA-Expression mit Darstellung von Median und 1./3. Quartile

## 4.1.2. BMP-4

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der BMP-4 Expression bei den rigide fixierten Osteotomien, so zeigt sich ein kontinuierlich ansteigender Expressionslevel von BMP-4 (p  $**^2$ 

= 0,002; p \*\*<sup>3</sup> = 0,004). Im Heilungsverlauf mit einem kritischen Fixateur zeigt sich, dass es am 14. Tag einen signifikanten Expressionsanstieg gibt (p \*\*<sup>4</sup> = 0,015), die BMP-4-Expression im weiteren Heilungsverlauf bis zum 42.Tag jedoch keinen Expressionsanstieg aufweist. Bei der BMP-4-Analyse zeigt sich zudem, dass es einen Expressionsunterschied zwischen der rigiden und der kritischen Fixation gibt. Am 7. Tag ist die Expression von BMP-4 in der Gruppe, die mit einem kritischen Fixateur stabilisiert wurde, tendenziell höher (p=0,093). Dieses Ergebnis verschiebt sich jedoch im Verlauf der Heilung, so dass es im Heilungsverlauf am 42.Tag zu einer signifikant höheren Expression von BMP-4 bei rigider Fixation kommt (p \*<sup>2</sup> = 0,001).



Abb: 4.2. Zeitlicher Verlauf der BMP-4 mRNA-Expression beim Vergleich kritischer und rigider Fixateur externe und Signifikanzdarstellung im Zeitverlauf \*\* und zwischen kritischem/ rigidem Fixateur \*

<u>Rigider Fixateur</u>	Hämatom 7d	Hämatom 14d	Hämatom 21d	Hämatom 42d
Median	1,43	6,02	7,70	24,65
1. /3. Quartil	1,11/ 1,68	4,75/ 6,50	5,87/ 8,22	18,94/ 32,88
Kritischer Fixateur				
Median	2,03	5,67	4,99	6,73
1./ 3. Quartil	1,58/ 2,47	4,51/ 6,49	3,91/ 6,05	4,61/ 9,89

Tab: 4.2. statistische Auswertung der BMP-4 mRNA-Expression mit Darstellung von Median und 1./3. Quartile im Zeitverlauf

# 4.1.3. BMP-7

**BMP-4** 

Bei der Betrachtung der rigiden Fixation im Verlauf lässt sich feststellen, dass es zu einem stetigen Expressionsanstieg kommt, aber nur am 42. Tag ein signifikanter Expressions-Unterschied vorliegt (p \*\*<sup>5</sup> =0,004). Bei kritischer Fixation kommt es im Verlauf zu einem geringen, nicht signifikanten Expressionsanstieg. Beim Vergleich der BMP-7-Expression erkennt man zu allen Zeitpunkten eine vermehrte Expression nach rigider Fixation. So ist ein deutlich signifikanter Unterschied am 14., 21. und 42. Tag (p \*<sup>3</sup> =0,002 ; p \*<sup>4</sup> =0,026; p \*<sup>5</sup> =0,03) nach Operation im Gegensatz zur kritischen Fixation zu erkennen.



Abb: 4.3. Zeitlicher Verlauf der BMP-7 mRNA-Expression beim Vergleich kritischer und rigider Fixateur externe und Signifikanzdarstellung im Zeitverlauf \*\* und zwischen kritischem/ rigidem Fixateur \*

# <u>BMP-7</u>

<u>Rigider Fixateur</u>	Hämatom 7d	Hämatom 14d	Hämatom 21d	Hämatom 42d
Median	0,43	0,91	1,42	9,54
1. /3. Quartil	0,28/ 0,87	0,70/ 1,12	0,73/ 2,03	5,57/ 11,43
<u>Kritischer Fixateur</u>				
Median	0,45	0,27	0,42	0,79
1./ 3. Quartil	0,35/0,63	0,12/ 0,58	0,41/ 0,68	0,63/ 1,35

Tab: 4.3. statistische Auswertung der BMP-7 mRNA-Expression mit Darstellung von Median und 1./3. Quartile

#### **4.1.4.** Noggin

Betrachtet man die Noggin mRNA Expression über den Heilungsverlauf des rigiden Fixateurs isoliert, zeigt sich ein signifikanter Expressionsanstieg bereits am 14. Tag (p  $**^6 = 0,002$ ) und einen zweiten deutlichen Anstieg am 42. Tag (p  $**^7 = 0,004$ ). Beim Heilungsverlauf mit kritischer Fixation kommt es auch zu einem Anstieg der Noggin-Expressionam 14. Tag (p  $**^8 = 0,009$ ), jedoch ohne signifikanten Anstieg zu den anderen Untersuchungszeitpunkten. Beim Vergleich der RNA-Expression zwischen kritischem und rigidem Fixateur externe zeigt sich in den frühen Untersuchungszeitpunkten kein Unterschied. Erst am 42. Tag post-OP zeigt sich eine signifikant erhöhte Expression von Noggin bei Stabilisierung mit rigidem Fixateur externe zeigt sich eine signifikant erhöhte Expression von Noggin bei Stabilisierung mit rigidem Fixateur externe (p  $*^6 = 0,004$ ).



Abb: 4.4. Zeitlicher Verlauf der Noggin mRNA-Expression beim Vergleich kritischer und rigider Fixateur externe und Signifikanzdarstellung im Zeitverlauf \*\* und zwischen kritischem/ rigidem Fixateur \*

<u>Rigider Fixateur</u>	Hämatom 7d	Hämatom 14d	Hämatom 21d	Hämatom 42d	
Median	0,86	4,83	3,12	30,26	
1. /3. Quartil	0,72 / 0,97	3,99 / 7,10	2,43 / 4,70	23,51 / 34,51	
Kritischer Fixateur					
Median	0,88	2,82	4,20	5,70	
1./ 3. Quartil	0,82 / 0,90	2,17 / 4,22	2,64 / 5,62	2,46 / 7,42	

Tab: 4.4. statistische Auswertung der Noggin mRNA-Expression mit Darstellung von Median und 1./3. Quartile

# 4.1.5. TGF-ß1

Nogain

Bei der Analyse der TGF- $\beta$ 1-Expression nach rigider Fixation kommt es zu einem signifikanten Expressionsanstieg am 14. Tag (p \*\*<sup>9</sup> = 0,002) und am 21. Tag (p \*\*<sup>10</sup> = 0,017) mit einem tendenziellen Abfall am 42.Tag. Bei der kritischen Fixation gab es nur am 14. Tag (p \*\*<sup>11</sup> = 0,002) einen signifikanten Expressionsanstieg. Vergleicht man die beiden Fixateursysteme im Verlauf erkannt man, dass es bei rigider Fixation am 7. (p \*<sup>7</sup> = 0,041) und 42. Tag (p \*<sup>8</sup> = 0,009) zu einer signifikanten Expression im Gegensatz zum kritischen Fixateur kommt.



Abb: 4.5. Zeitlicher Verlauf der TGF-ß1 mRNA-Expression beim Vergleich kritischer und rigider Fixateur externe und Signifikanzdarstellung im Zeitverlauf \*\* und zwischen kritischem/ rigidem Fixateur \*

<u>TGF-1ß</u>				
<u>Rigider Fixateur</u>	Hämatom 7d	Hämatom 14d	Hämatom 21d	Hämatom 42d
Median	1,16	2,23	5,17	3,38
1. /3. Quartil	0,98 / 1,30	1,74 / 2,51	4,49 / 5,77	3,09 / 3,65
<u>Kritischer Fixateur</u>				
Median	0,75	1,99	1,99	2,45
1./ 3. Quartil	0,61 / 0,92	1,81 / 2,02	1,88 / 2,15	1,69 / 2,81

*Tab: 4.5. statistische Auswertung der TGF-β1 mRNA-Expression mit Darstellung von Median und 1./3. Quartile* 

## 4.1.6. M-CSF

Vergleicht man die Expression von M-CSF zeigt sich in der Gruppe der Tiere mit rigider Fixateuranlage ein signifikanter Anstieg der Expression am 14. (p  $**^{12} = 0,009$ ) und am 21. (p  $**^{13} = 0,004$ ) Tag. In der Gruppe mit kritischer Fixation kommt es im Heilungsverlauf am 14. Tag (p  $**^{14} = 0,002$ ) zu einem signifikanten Expressionsabfall, am 21. Tag (p  $**^{15} = 0,026$ ) wieder zu einem Expressionsanstieg. Bei der Analyse zwischen rigider und kritischer Fixation, zeigt sich, dass es am 14. (p  $*^9 = 0,002$ ); 21. (p  $*^{10} = 0,004$ ) und 42. Tag (p  $*^{11} = 0,004$ ) zu einer signifikant höheren Expression bei rigider Fixation kommt.



Abb: 4.6. Zeitlicher Verlauf der M-CSF mRNA-Expression beim Vergleich kritischer und rigider Fixateur externe und Signifikanzdarstellung im Zeitverlauf \*\* und zwischen kritischem/ rigidem Fixateur \*

<u>Rigider Fixateur</u>	Hämatom 7d	Hämatom 14d	Hämatom 21d	Hämatom 42d
Median	1,09	2,27	3,63	4,35
1. /3. Quartil	0,69 /1,30	1,95 / 2,49	3,34 / 4,22	3,53 / 4,87
<u>Kritischer Fixateur</u>				
Median	1,21	0,76	1,41	2,20
1./ 3. Quartil	1,11 / 1,36	0,62 / 0,86	1,11 / 1,48	1,76 / 2,28

Tab: 4.6. statistische Auswertung der M-CSF mRNA-Expression mit Darstellung von Median und 1./3. Quartile

# 4.1.7. OPG

M-CSF

Analysiert man den Zeitverlauf der OPG mRNA-Expression nach rigider Fixation, sieht man, dass nur am 14. Tag (p \*\*<sup>16</sup> = 0,002) ein signifikanter Anstieg vorhanden ist. Dagegen ist nach kritischer Fixation nur am 42. Tag (p \*\*<sup>17</sup> = 0,004) ein signifikanter Expressionsanstieg erkennbar. Beim Vergleich der OPG-Expression zwischen rigider und kritischer Stabilisierung, erkennt man nur am 21. Tag (p \*<sup>12</sup> = 0,004) eine signifikant höhere Expression nach rigider Fixation.



Abb: 4.7. Zeitlicher Verlauf der OPG mRNA-Expression beim Vergleich kritischer und rigider Fixateur externe und Signifikanzdarstellung im Zeitverlauf \*\* und zwischen kritischem/ rigidem Fixateur \*

0	Ρ	G

<u>Rigider Fixateur</u>	Hämatom 7d	Hämatom 14d	Hämatom 21d	Hämatom 42d
Median	1,43	31,52	38,28	83,84
1. /3. Quartil	1,15 / 1,89	20,65 / 38,15	29,89 / 46,80	56,41 / 89,55
<u>Kritischer Fixateur</u>				
Median	3,81	17,67	12,68	61,47
1./ 3. Quartil	2,42 / 4,77	5,70 / 23,60	7,13 / 14,85	29,35 / 69,95

Tab: 4.7. statistische Auswertung der OPG mRNA-Expression mit Darstellung von Median und 1./3. Quartile

# 4.2. Quantitative RT - PCR der Extrazellulärmatrixsubstanz

#### 4.2.1. Kollagen Ia1

Im Heilungsverlauf nach Anlage eines rigiden Fixateur externe erkennt man, dass die Koll-Ia1 mRNA-Expression nach 14. Tagen (p \*\*<sup>18</sup> = 0,002) und am 42. Tag (p \*\*<sup>19</sup> = 0,017) signifikant höher exprimiert wird. Nach kritischer Fixation kommt es am 14. Tag (p \*\*<sup>20</sup> = 0,004) zu einem Expressionsanstieg. Dieser ist jedoch deutlich geringer ausgeprägt und es zeigt sich kein weiterer Anstieg im Heilungsverlauf. Beim Vergleich zwischen rigider und kritischer Fixation zeigt sich, dass es nach rigider Fixation am 14. (p \*<sup>13</sup> = 0,041) und 42. Tag (p \*<sup>14</sup> = 0,002) zu einer signifikant höheren mRNA-Expression als bei kritischer Fixation kommt.



Abb: 4.8. Zeitlicher Verlauf der Koll-Ia1 mRNA-Expression beim Vergleich kritischer und rigider Fixateur externe und Signifikanzdarstellung im Zeitverlauf \*\* und zwischen kritischem/ rigidem Fixateur \*

<u>Rigider Fixateur</u>	Hämatom 7d	Hämatom 14d	Hämatom 21d	Hämatom 42d
Median	6,55	39,56	37,36	61,20
1. /3. Quartil	5,64 / 8,81	33,64 / 42,67	34,30 / 43,41	57,40 / 70,98
Kritischer Fixateur				
Median	8,37	20,44	29,38	30,72
1./ 3. Quartil	7,36 / 9,05	15,25 / 22,75	26,45 / 31,97	22,05 / 39,95

Tab: 4.8. statistische Auswertung der Koll-Ia1 mRNA-Expression mit Darstellung von Median und 1./3. Quartile

# 4.2.2. Kollagen IIa1

Koll-Ia1

Untersucht man die Expression von Kollagen-IIa1 während der Frakturheilung, lässt sich zeigen, dass es bei Stabilisierung der Fraktur mit einem rigidem Fixateur externe zu einem Expressionsanstieg am 14. Tag (p  $**^{21} = 0,002$ ) kommt. Bei der Stabilisierung mittels kritischem Fixateur zeigt sich ebenfals eine Anstieg am 14. Tag (p  $**^{22} = 0,002$ ). Vergleicht man die Expression zwischen rigidem und kritischen Fixateur externe zeigt sich zwar eine stärkere Expression am 14. und 21. Tag nach kritischer Fixation, es lassen sich aber keine statistisch signifikanten Unterschiede erkennen.



Abb: 4.9. Zeitlicher Verlauf der Koll-IIa1 mRNA-Expression beim Vergleich kritischer und rigider Fixateur externe und Signifikanzdarstellung im Zeitverlauf \*\* und zwischen kritischem/ rigidem Fixateur \*

# Koll-IIa1

<u>Rigider Fixateur</u>	Hämatom 7d	Hämatom 14d	Hämatom 21d	Hämatom 42d
Median	0,45	50,13	117,92	3169,35
1. /3. Quartil	0,35 / 0,80	12,67 / 215,98	106,28 / 967,64	1585,87 / 5474,41
Kritischer Fixateur				
Median	0,54	993,74	1542,59	2683,20
1./ 3. Quartil	0,51 / 0,77	135,1 / 2056,88	400,38 / 5291,81	48,55 / 7520,21

Tab: 4.9. statistische Auswertung der Koll-IIa1 mRNA-Expression mit Darstellung von Median und 1./3. Quartile

## 4.2.3. Kollagen Xa1

Betrachtet man die Expression von Kollagen-Xa1 während der Frakturheilung im Zeitverlauf, so kommt es bei rigider Fixation erst am 42. Tag (p  $**^{23} = 0,009$ ) zu einem Expressionsanstieg. Im Verlauf bei kritischer Fixation kommt es im Verlauf zu keinem signifikanten Expressionsanstieg. Vergleicht man die Expression zwischen rigider und kritischer Fixation, so ist am 14. und 21. Tag zwar eine höhere Expression des Medians nach kritischer Fixation zu erkennen, eine statistisch signifikanten Expressionsunterschied ist aber nicht vorhanden.



Abb: 4.10. Zeitlicher Verlauf der Koll-Xa1 mRNA-Expression beim Vergleich kritischer und rigider Fixateur externe und Signifikanzdarstellung im Zeitverlauf \*\* und zwischen kritischem/ rigidem Fixateur \*

<u>Rigider Fixateur</u>	Hämatom 7d	Hämatom 14d	Hämatom 21d	Hämatom 42d
Median	0,30	0,60	4,76	477,67
1. /3. Quartil	0,20 / 0,41	0,20 / 3,13	1,27 / 16,28	427,61 / 627,55
Kritischer Fixateur				
Median	0,30	15,20	43,21	390,42
1./ 3. Quartil	0,21 / 0,45	0,99 / 109,85	12,53 / 56,02	21,05 / 1099,64

<u>Koll-Xa1</u>

Tab: 4.10. statistische Auswertung der Koll-Xa1 mRNA-Expression mit Darstellung von Median und 1./3. Quartile

# 4.2.4. OPN

Bei der Betrachtung der OPN-Expression im Zeitverlauf, zeigt sich nach rigider Frakturfixation, dass es im Frakturheilungsverlauf zu jedem Untersuchungszeitpunkt einen signifikanten Expressionsanstieg gibt  $\rightarrow$  14. Tag (p \*\*<sup>24</sup> = 0,002); 21.Tag (p \*\*<sup>25</sup> = 0,030); 42. Tag (p \*\*<sup>26</sup> = 0,004). Nach kritischer Fixation kommt es hingegen erst am 42. Tag (p \*\*<sup>27</sup> = 0,041) zu einem signifikanten Expressionsanstieg der OPN-Expression. Beim Vergleich zwischen rigider und kritischer Fixation kommt es zu allen Untersuchungszeitpunkten zu einer signifikant höheren Expression nach rigider Fixation  $\rightarrow$  7. Tag (p \*<sup>15</sup> = 0,041); 14. Tag (p \*<sup>16</sup> = 0,002); 21. Tag (p \*<sup>17</sup> = 0,004) und 42. Tag (p \*<sup>18</sup> = 0,002).



Abb: 4.11. Zeitlicher Verlauf der OPN mRNA-Expression beim Vergleich kritischer und rigider Fixateur externe und Signifikanzdarstellung im Zeitverlauf \*\* und zwischen kritischem/ rigidem Fixateur \*

<u>Rigider Fixateur</u>	Hämatom 7d	Hämatom 14d	Hämatom 21d	Hämatom 42d
Median	0,42	1,14	1,93	11,97
1. /3. Quartil	0,36 / 0,64	1,05 / 1,49	1,83 / 3,17	9,77 / 13,25
<u>Kritischer Fixateur</u>				
Median	0,88	0,39	0,42	1,96
1./ 3. Quartil	0,63 / 2,36	0,29 / 0,47	0,38 / 0,46	1,12 / 3,55

Tab: 4.11. statistische Auswertung der OPN mRNA-Expression mit Darstellung von Median und 1./3. Quartile

#### 4.2.5. MMP-9

Bei der Stabilisierung der Frakturzone mit einem rigiden Fixateur externe kommt es am 14. Tag (p  $**^{28} = 0,002$ ) und am 42. Tag (p  $**^{29} = 0,004$ ) zu einem signifikanten Expressionsanstieg von MMP-9. Nach Anlage eines kritschen Fixateur externe kommt es erst am 42. Tag (p  $**^{30} = 0,041$ ) zu einem signifikanten Anstieg des Expressionslevels. Bei der Betrachtung der Expression von MMP-9 bei differierender Rigidität lässt sich erkennen, dass es nur am 42. Tag (p  $*^{19} = 0,002$ ) zu einer signifikant höheren Expression von MMP-9 nach rigider Fixation kommt.



Abb: 4.12. Zeitlicher Verlauf der MMP-9 mRNA-Expression beim Vergleich kritischer und rigider Fixateur externe und Signifikanzdarstellung im Zeitverlauf \*\* und zwischen kritischem/ rigidem Fixateur \*

<u>Rigider Fixateur</u>	Hämatom 7d	Hämatom 14d	Hämatom 21d	Hämatom 42d
Median	1,00	8,52	13,52	173,33
1. /3. Quartil	0,81 / 1,04	8,13 / 10,47	9,94 / 14,59	144,77 / 209,25
<u>Kritischer Fixateur</u>				
Median	0,97	5,74	8,60	40,38
1./ 3. Quartil	0,77 / 1,06	3,25 / 7,16	5,22 / 10,15	14,27 / 91,81

Tab: 4.12. statistische Auswertung der MMP-9 mRNA-Expression mit Darstellung von Median und 1./3. Quartile

# 4.2.6. MMP-13

MMP-9

Betrachtet man die Untersuchunggruppe nach rigider Fixationstechnik, so lässt sich ein Expressionsanstieg am 14. Tag (p  $**^{31} = 0,002$ ) und am 42. Tag (p  $**^{32} = 0,004$ ) erkennen. Vergleichbar verhält es sich nach kritischer Fixation, so dass hier sowohl am 14. Tag (p  $**^{33} = 0,002$ ), als auch am 42. Tag (p  $**^{34} = 0,004$ ) ein signifikanter Expressionsanstieg erkennbar ist. Bei der Auswertung des Frakturheilungsverlaufs nach unterschiedlicher Stabilisierung zeigt sich, dass MMP-13 nach rigider Fixation am 42. Tag (p  $*^{20} = 0,004$ ) signifikant höher exprimiert wird.



Abb: 4.13. Zeitlicher Verlauf der MMP-13 mRNA-Expression beim Vergleich kritischer und rigider Fixateur externe und Signifikanzdarstellung im Zeitverlauf \*\* und zwischen kritischem/ rigidem Fixateur \*

<u>MMP-13</u>				
<u>Rigider Fixateur</u>	Hämatom 7d	Hämatom 14d	Hämatom 21d	Hämatom 42d
Median	3,89	62,66	61,22	784,85
1. /3. Quartil	2,11 / 7,12	57,55 / 74,55	59,20 / 64,33	761,84 / 805,28
Kritischer Fixateur				
Median	5,47	51,92	67,24	236,62
1./ 3. Quartil	3,74 / 6,20	25,27 / 62,41	50,31 / 82,86	166,90 / 316,44

Tab: 4.13. statistische Auswertung der MMP-13 mRNA-Expression mit Darstellung von Median und 1./3. Quartile

# 5. Diskussion

Trotz intensiver unfallchirurgischer Forschung zur Verbesserung der Frakturheilung und trotz der Weiterentwicklung der eingesetzten Materialien bleibt die Tibiaschaftfraktur weiterhin Gegenstand intensiver Forschung, da es noch immer in 10-15% zu Problemen während des Heilungsverlaufs kommt (Schandelmaier et al., 1995, Choudry et al., 2008).

Die Gründe hierfür sind jedoch sehr vielgestaltig. Zum einen spielt der Unfallmechanismus eine entscheidende Rolle. Damit es zur Fraktur kommt, ist eine große äußere Krafteinwirkung notwendig, und nicht selten entstehen diese bei Verkehrsunfällen (Hochrasanztrauma) oder es sind Verletzungen im Rahmen eines Polytraumas. Zudem hat die Tibia nur eine sehr geringe Weichteildeckung ventromedial, so dass es frakturbegleitend häufig zu offenen Frakturen mit ausgeprägten Weichteilschädigungen kommt. Die Komplikationen mit Infektion, Kompartmentsyndrom und Weichteilnekrosen führen dabei zu einer verzögerten oder ausbleibenden Knochenbruchheilung. Durch Fortschritt entsteht aber auch eine stetig wachsende Anspruchshaltung der Patienten nach vollständiger Rehabilitation ohne Funktionseinbußen. Um bei dem häufig jungen Patientenkollektiv diese Ansprüche erfüllen zu können und die Invalidität zu verhindern, rechtfertigt sich der hohe Aufwand für die unfallchirurgische Forschung.

Betrachtet man die Frakturheilung im Verlauf, so stellt man fest, dass die herrschenden mechanischen Vorbedingungen entscheidenden Einfluss auf die Art und den zeitlichen Ablauf des Heilungsprozesses haben (Aro and Chao, 1993). Dahingehend wurden Untersuchungen durchgeführt, die den Ablauf der Frakturheilung deskriptiv unter unterschiedlichen Stabilitätskriterien dargestellt und ausgewertet haben (Schell et al., 2005). Es ist jedoch nicht das Ausmaß der Fragmentbewegung im Ganzen, sondern die genau zeitlich und räumlich abgestimmte Bewegung in unterschiedlichen Ebenen, die für die Heilung förderlich oder abträglich ist. So benötigt jede Fraktur zu einem bestimmten Zeitpunkt ein optimales Umfeld, um sich an den Heilungsprozess anzupassen. Es kommt damit zur Verknüpfung zwischen mechanischen Faktoren und dezidiert abgestimmten biologischen Abläufen. Es existieren für mehrere Tiermodelle validierte Expressionsuntersuchungen von Wachstumsfaktoren, die eine genaue Beschreibung der zeitlichen Expressionsmuster liefern konnte. Bisher konnte jedoch nicht hinreichend beantwortet werden, wie unter unterschiedlichen Stabilitätsbedingungen der zeitliche Verlauf der Expression von chorndrogenen und osteogenen Wachstumsfaktoren beeinflusst wird.

Ziel der Arbeit war es daher, die unterschiedlichen Expressionsmuster von osteogenen und chondrogenen Wachstumsfaktoren unter besonderer Betrachtung differierender

Stabilitätskriterien zu analysieren. Die spezifischen Stabilitätsgrade der Fixateure und deren biomechanische Spezifitäten konnten dabei in Voruntersuchungen gezeigt werden (Epari et al., 2006, Schell et al., 2008).

Die in unserer Untersuchung initial aufgestellte Hypothese, dass es im Heilungsverlauf einer verzögerten Frakturheilung zu einer unterschiedlichen Expression an osteogenen Wachstumsfaktoren kommt, konnte bei vielen Faktoren bestätigt werden. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es zu einer über den Zeitraum differenzierten Hochregulation an osteogenen Faktoren nach rigider Fixation, bzw. zu einer prolongierten Hochregulation an chondrogenen Wachstumsfaktoren nach kritscher Frakturstabilisierung kommt.

# 5.1. Diskussion von Material und Methode

#### 5.1.1. Modell

In der vorliegenden Studie zur Analyse der Frakturheilung wurde das Schafsmodell ausgewählt. Das Modell ist standardisiert und es existieren biomechanische und histologische Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten der Frakturheilung (Klein et al., 2004, Schell et al., 2008, Lienau et al., 2009, Lienau et al.).

Bei der Auswahl des Modells wurde versucht, eine klinisch relevante Situation exemplarisch und reproduzierbar nachzustellen. Dabei sei aber auf die beschränkte Aussagekraft eines jeden Modells im Hinblick auf die Übertragbarkeit auf den Menschen und auf allgemeine wissenschaftliche Statute hingewiesen (Roach et al., 1989). Der Tibiaknochen des Schafs ähnelt mit seiner Physiognomie und mit seinem spezifischen Heilungsverlauf dem des Menschen und kommt als Modell der menschlichen Frakturheilung der Tibia recht nahe, so dass er für vergleichende Aussagen besser geeignet zu sein scheint, als der Knochen von Ratten, Mäusen oder Hunden (Eitel et al., 1981, Nunamaker, 1998, Goodship et al., 1993).

Die in der Studie eingeschlossenen Schafe mit einem mittleren Gewicht von 77kg ähneln dem Gewicht des durchschnittlichen adulten Menschen. Die mechanischen Eigenschaften eines Knochens hängen unmittelbarer sowohl mit ihrer Funktion und Grösse, als auch mit ihrer Knochenstruktur zusammen (Roach et al., 1989). Der Tibiaknochen des Schafes ist kürzer und eher queroval im Gegensatz zum längsovalen Tibiaknochen des Menschen. Der Knochen ähnelt jedoch in seinem Verhältnis von Lumen zu Kortikalisdicke am ehesten dem des Menschen und steht wie dieser direkt in der Tragachse des Beins (Nunamaker, 1998, Hara et al., 2003). Trotz struktureller Ähnlichkeit zeigt sich mikroskopisch eine unterschiedliche Feinarchitektur, wobei die ovine Tibia deutlich weniger Osteone im Vergleich zur humanen Tibia besitzt. Durch die veränderte Belastungsverteilung bei Quadropoden kann man nur

bedingt auf eine vergleichbare Belastungssituation geschlossen werden. Das Schafmodell weist jedoch mit einer Frakturheilungszeit von 6-8 Wochen eine vergleichbar lange Heilungszeit wie der Mensch auf. Es ist daher als Modell für den Frakturheilungsverlauf besser geeignet als Kleintiere wie Ratten oder Kaninchen.

Trotz der Fähigkeit zur effektiven Entlastung einer Gliedmaße sind Schafe als Fluchttiere nicht dauerhaft in der Lage, eine Extremität adäquat zu schonen, weshalb sie als Modell der klinischen Vorstellung der postoperativen Vollbelastung entsprechen (Klein et al., 2003).

Die Tiere stammen aus einem homogenen Pool von Merinomix-Schafen und die Tiere, die für beide Gruppen randomisiert ausgewählt wurden, unterschieden sich nicht in Grösse, Gewicht, Alter und Geschlecht. So wurde versucht, bei vorhandener Individualität die externen Einflussfaktoren möglichst gering zu halten.

# 5.1.2. Osteosynthesemodelle

Die verwendeten Fixateure (rigide/ kritisch) sind in der Forschungsgruppe bereits bei biomechanischen Analysen verwendete Versuchskonstrukte (Epari et al., 2006, Schell et al., 2005, Schell et al., 2008). Die kritische Fixation repräsentiert einen rotationsinstabilen Fixateur, bei dem die Querstange in einem Kugellager fixiert ist und Scherbewegungen in größerem Ausmaß zugelassen werden. Bei kritschem Fixateur zeigt sich auch nach sechs Monaten Beobachtungszeitraum nach Osteosynthese nicht immer eine mechanisch stabile Frakturüberbrückung. Es kommt bei 38% der untersuchten Tiere zur Ausbildung einer deutlich prolongierten Frakturheilung und somit dann zu einer hypertrophen Pseudarthrose (Schell et al., 2008). Es zeigte sich zudem im Heilungsverlauf nach kritischer Fixation eine histologisch deutlich prolongierte chondrale Heilungsphase (Schell et al., 2008). Im Gegensatz dazu zeigte sich nach rigider Frakturfixation bereits nach sechs bzw. nach neun Wochen bei den untersuchten Tieren eine radiologische und biomechanisch stabile Frakturüberbrückung (Epari et al., 2006).

In unserem Tiermodell wurde eine Querfraktur mit einem Osteotomiespalt von 3mm geschaffen. Es sind daher bei dieser Art von Fraktur ohne direkten Kortikaliskontakt der Knochenenden besonders hohe Ansprüche an die Steifigkeit des Fixateurs zu stellen (Hente et al., 1999). Im Vergleich zum klinischen Einsatz wurde in unserer Studie die Grundform der Pins und der Querverstrebungen beim rigiden Fixateur sehr großzügig und stabil dimensioniert, so dass es zu einer stabilen Ausheilung kommen kann (Duda et al., 2003b, Augat et al., 1996, Augat et al., 2003, Larsson et al., 2001, Behrens, 1989).

Im klinischen Einsatz kann der Fixateur häufig bei schwieriger Montageebene oder der Notwendigkeit der Gelenküberbrückung nicht so stabil dimensioniert werden. Betrachtet man die gesamte Frakturheilungsdauer, so kommt es bei der Therapie mit einem Fixateur häufig zu Komplikationen, welche einen Verfahrenswechsel notwendig machen. Ein Fixateur externe wird in den seltensten klinischen Fällen zur vollständigen Ausheilung der Fraktur ohne Verfahrenswechsel eingesetzt (Dougherty et al., 2006). Ein wichtiger Grund hierfür ist die Pinkanalinfektion. Diese ist in dieser Studie während der Untersuchungszeiträume zu keinen Zeitpunkt relevant aufgetreten. Dies kann man teilweise auf die gute tägliche Pinkanalpflege zurückführen, welche eine vernachlässigbare Quote an geringgradigen Pinkanalinfektionen hervorbrachte. In klinischen und experimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die biomechnischen Einflüsse durch Pindesign, Fixateurmontage und Gesamtrigidität des Fixateurs die Komplikationsrate stark beeinflussen (Cosco et al., 2001, Anderson and St Jean, 1996, Hyldahl et al., 1991). In Anbetracht des Verhaltens der Tiere als Fluchttiere mit unkontrollierter Vollbelastung sprechen die Untersuchungen mit den guten Heilungsergebnissen für eine gut gewählte Dimensionierung des rigiden Fixateurs externe.

Der kritische Fixateur führt gehäuft zu einer verzögerten Frakturheilung, welche schließlich in einer hypertrophen Pseudarthrose endet (Schell et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde auf das Kauterisieren des Periosts verzichtet, wodurch ein biomechanisch instabiles Fixationssystem gewählt wurde, welches initial jedoch die gleiche biologische Potenz, wie der stabilen Fixation inhärent ist. Somit kann der kritische Fixateur externe als Heilungsmodell für eine verzögerte Frakturheilung betrachtet werde.

#### 5.1.3. Postoperativer Beobachtungszeitaum

Eine endgültig schwierig zu klärende Frage ist, ab wann eine Fraktur als geheilt, bzw. ausreichend durchbaut gilt. Hier müssen sowohl funktionelle als auch strukturelle Komponenten beachtet werden. Die Determinierung eines adäquaten Beobachtungszeitpunktes ist somit vorab nicht sicher festzulegen. Als ein möglicher Endpunkt der Frakturheilung kann der Zeitraum angesehen werden, wenn der frakturierte Knochen die nötige Steifigkeit wiedererlangt hat, um ohne externe Unterstützung einer Vollbelastung standzuhalten (Marsh and Li, 1999). Diese Konsolidierung ist im klinischen Setting individuell nur schwer vorherzusagen und zu messen. Als Indikator für eine abgeschlossene Frakturheilung können deshalb nur indirekte Parameter, wie z.B. die vollständige radiologische knöcherne Durchbauung des Frakturspaltes oder des Kallusgewebes, das Fehlen der Frakturlinie, das Fehlen von IFM oder die schmerzfreie Belastungssteigerung der Extremität herangezogen werden (Markel and Chao, 1993, Gardner et al., 1996). Dass sowohl die radiologische Begutachtung der Fraktur, als auch die Fragmentbewegung äußerst subjektive Bewertungskriterien sind, konnten mehrere Studien eindrucksvoll belegen (Hammer et al., 1985, Edholm et al., 1984, Webb et al., 1996). Für die individuelle Frakturbeurteilung gibt es somit keinen sicheren prädiktiven Indikator zur abgeschlossenen knöchernen Konsolidierung.

In unseren Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass es in der Gruppe der Tiere, die mit einem rigiden Fixteur stabilisiert wurden, nach einem Zeitraum von 6 bzw. 9 Wochen zu einer vollständigen knöchernen Konsolidierung gekommen ist (Epari et al., 2006). Mit dem stabilen Fixateur wird zu diesem Zeitpunkt eine geeignete Steifigkeit des Knochens erreicht, so dass hier schon Prozesse des knöchernen Umbaus am Kallus vollzogen sind (Schell et al., 2005). Nach einem Beobachtungszeitraum von 9 Wochen ist die Fraktur adäquat konsolidiert, so dass das operierte Bein bereits zur Vollbelastung fähig ist und die Biegesteifigkeit der der Gegenseite entspricht (Schell et al., 2008).

Im Versuchsaufbau mit einem kritischen Fixateur externe konnte gezeigt werden, dass auch zum Zeitpunkt 6 Monate nach Osteotomie die Tiere nicht zur Vollbelastung zurückgekehrt sind. Nach 6 Wochen postoperativ liegt nach kritischer Fixation noch eine hoch instabile Fraktursituation vor. Die biomechanische Steifigkeit nach 6 Monaten ist auch hier noch geringer als bei der Frakturheilung nach rigider Fixation 9 Wochen postoperativ (Schell et al., 2008). Es kam zur Ausbildung einer verzögerten Frakturheilung, welche dann in einer hypertrophen Pseudarthrose mündete, wodurch die These gestützt werden kann, dass die initialen biomechanischen Stabilitätsbedingungen entscheidend für das langfristige Frakturheilungsergebnis sind.

Es wurde auf die Untersuchung der Wachstumsfaktoren zum Zeitpunkt nach 9 Wochen verzichtet, da vor allem die frühen Abläufe der Frakturheilung analysiert werden sollten. Perspektivisch könnte dann bei Frakturen, bei denen ein insuffizientes Heilungsergebnis zu erwarten wäre, eine frühe Intervention mit ggf. Wachstumsfaktorensubstitution erfolgen.

# 5.1.4. Probengewinnung und Aussagekraft der Analysemethode

Die Methode der quantitativen RT-PCR (qRT-PCR)-Analyse erlaubt die genaue Betrachtung der mRNA-Expression zu einem bestimmten Zeitpunkt. Anders als bei der RT-PCR, bei der man die Expression qualitativ nach Gelelektrophorese analysiert, sind bei der qRT-PCR genaue Aussagen zum Expressionslevel möglich.

Während desVorgangs der RNA-Extraktion über eine Filtermembran wird die ebenfalls in der Zelle vorhandene DNA verworfen. Es konnte somit auf einen DNAse-Verdau verzichtet werden. In einem Negativversuch konnte zudem gezeigt werden, dass aus dem reinen RNA-Extrakt ohne vorherige Reverse Transkription keine Genproduktvervielfältigung mittels PCR möglich gewesen ist, und dass nach der Filterung die erhaltenen Produkte ausschließlich aus mRNA gewonnen wurden.

Bei der Untersuchung des extrahierten Gewebes aus dem Osteotomiespalt muss man sich die Grenzen der Aussagekraft bewußt machen. Das Frakturhämatom bzw. das spätere Kallusgewebe ist ein sehr heterogenes Gebilde, bei dem sich in unterschiedlichen Kallusregionen im gleichen Zeitraum verschiedene Arten von Zellen finden lassen. So konnte gezeigt werden, dass etwa parallel im periostalen Kallus die chondrogene Ossifikation über Knorpelzellproliferation stimuliert wird und es im interkortikalen Bereich über intramembranöse Ossifikation bereits zur direkten Knochenbildung durch Osteoblasten kommt. Eine lokoregionäre Zuordnung ist somit an Hand der RNA-Analyse nicht möglich, so dass man lediglich Vermutungen über die Region der vermehrten mRNA-Expression anstellen kann. Weitere Untersuchungen, welche eine örtliche Zuordnung zu einer bestimmten Zellregion erlauben, wären hier zur Einordnung der Ergebnisse notwendig. Ferner ist es auch nicht möglich zu entscheiden, wie das Expressionsniveau einer Einzelzelle aussieht. Vergleichbar erhöhte Expressionslevel könnten so durch überproportionale Expression von wenigen Zellen entstehen oder durch leicht gesteigerte Expression in einer sehr großen Zellpopulation (Cho et al., 2002).

Trotz dieser Einschränkungen bleibt die qRT-PCR eine sehr gute Methode, um das Expressionsmuster von Zellen in seinem zeitlichen Verlauf darzustellen.

# 5.2. Diskussion der Ergebnisse

Eine suffiziente Frakturheilung benötigt eine ausreichende biomechanische Stabilität auf der einen Seite und eine adäquate Blutzufuhr auf der anderen Seite. Nur unter diesen Voraussetzungen kommt es zur frühen Vaskularisation und zur Invasion von osteoklastären und osteoblastären Vorläuferzellen, welche die Grundlage für die zeitlich genau abgestimmte Induktion an osteogenen und chondrogenen Wachstumsfaktoren sichert (Lieberman et al., 2002, Lienau et al., 2006). Es liegen bisher keine Daten vor, die bei definierten biomechanischen Bedingungen bzw. mechanisch verzögerter Heilung die Expression von osteogenen Wachstumsfaktoren analysiert haben. Der zeitliche Ablauf dieser biomachanischen Transduktion ist eine Voraussetzung zum Verständnis der verzögerten oder
ausbleibenden Frakturheilung bei instabilen Frakturen, um perspektivisch im Rahmen der klinischen Patientenversorgung Einfluss nehmen zu können.

Die ausgewählten Wachstumsfaktoren und Proteine der Extrazellulärmatrix sollten ein breites Spektrum an Referenzmarkern für die Proliferations- und Remodelingphase während der Frakturheilung widerspiegeln und charakterisieren.

#### 5.2.1. Verzögerte Frakturheilungsmodelle

Was den Unterschied zwischen einer hypertrophen und einer atrophen Pseudarthrose angeht, besteht hinsichtlich der molekularbiologischen Regulation weiterhin Uneinigkeit.

Die Unterscheidung zwischen den beiden Erscheinungsformen ist ursprünglich eine phänotypisch deskriptive radiologische Klassifizierungsmöglichkeit gewesen (LaVelle, 1998). Bis zu welchem Zeitpunkt man bei einem nicht suffizient heilenden Knochen von einer `verzögerten Frakturheilung´ spricht und wann der Übergang zu einer Pseudarthrose stattfindet, ist festgelegt. Hiernach liegt eine Pseudarthrose vor, wenn man nach einem initialen Heilungszeitraum von 6 Monaten in den anschließenden 3 Monaten keinen radiologisch erkennbaren Fortschritt der Frakturheilung erkennen kann. In der vorliegenden wissenschaftlichen Untersuchung ist der späteste Untersuchungszeitpunkt sechs Wochen nach Osteosynthese festgelegt. Per Definition handelt es sich dabei im Rahmen der Instabilitätsuntersuchung, bis dato um eine verzögerte Frakturheilung. Aus Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich im Rahmen der Instabilität jedoch gehäuft eine hypertrophe Pseudarthrose entwickelt (Schell et al., 2008).

Dem vorliegenden Modell wohnt, ohne die sonst bei Pseudarthrosen durchgeführte Periostkauterung, die volle biologische Potenz zur Frakturheilung inne, so dass das Modell hier trotz des frühen Untersuchungszeitpunktes als Modell für eine verzögerte Frakturheilung bzw. Pseudarthrosemodell betrachtet werden kann.

Man hat lange Zeit angenommen, dass sowohl bei der atrophen als auch bei der hypertrophen Erscheinungsform die Instabilität der Frakturüberbrückung eine entscheidende Voraussetzung zur Entstehung der Pseudarthrose ist, die unterschiedliche biologische Zellaktivität dann aber die jeweilige Ausprägungsform hervorruft (Buckwalter et al., 1996b). Die Annahme, dass die Ausbildung einer atrophen Pseudarthrose durch eine unzureichende Gefäßversorgung des Kallus hervorgerufen wird, konnte jedoch teilweise entkräftet werden. Es zeigte sich bei histologischen Untersuchungen des Kallusgewebes bei atrophen Pseudarthrosen am Menschen, dass es nicht zu einer verminderten Dichte an Blutgefässen kommt (Reed et al., 2002). An einem atrophen Pseudarthrosemodell bei Ratten konnte gezeigt werden, dass es zwar in der frühen Heilungsphase nach 1 Woche zu einer verminderten Gefäßbildung kommt, diese bei Untersuchungen am fortgeschrittenen Kallus nach 8 Wochen nicht mehr nachweisbar ist (Reed et al., 2003). Auch Volpon *et al.* konnten zeigen, dass es interessanterweise bei der Ausbildung einer atrophen Pseudarthrose lediglich zu einer bindegewebigen Frakturüberbrückung kommt, eine herabgesetzte Vaskularisation aber nicht nachweisbar war. Der entstehende Bindegewebskallus wird dabei aber nicht durch das Periost, sondern wahrscheinlich durch das umliegende Gewebe getriggert (Volpon, 1994).

Insgesamt kommt es zu einer verzögerten oder ausbleibenden Wachstumsfaktorenexpression bei der experimentellen Erstellung einer atrophen Pseudarthrose. Aus Arbeiten von Le *et al.* ist ersichtlich, dass sich die Expression von Wachstumsfaktoren, in Abhängigkeit von der Stabilität der Frakturüberbrückung, verändert (Le et al., 2001). Entsprechend diesen Ergebnissen entwickelte die eigene Arbeitsgruppe die These, dass die unterschiedliche Stabilität eine adaptierte Art der Angiogenese und Vaskularisierung nach sich zieht, mit verminderter Expression von Angiogenesefaktoren wie VEGF nach unzureichender Frakturfixation. Abhängig vom Ausmaß der Revaskularisation kommt es nicht nur zu einer zeitlich veränderten Knochenformierung, sondern zu einer Knochenbildung, die vor allem durch eine verlängerte und verstärkte Knorpelbildung gekennzeichnet ist (Lienau et al., 2009). Die mechanische Stabilität und damit verbunden die veränderten Zytokinmuster beeinflussen somit die Differenzierung der mesenchymalen Zellen in chondrogene oder osteogene Vorläuferzellen (Lienau et al., 2005).

Das zumeist verwendete wissenschaftliche Modell der atrophen Pseudarthrose ist jedoch durch andere Prämissen gekennzeichnet. Die atrophe Pseudarthrose wird zumeist über eine Kauterisierung des umliegenden Periosts am Frakturspalt hergestellt, so dass das Periost als Quelle für die Wachstumsfaktorensynthese nicht mehr im adäquaten Ausmaß zur Verfügung steht. Die Vaskularisierung und somit die Knochenregeneration findet damit nicht vorrangig periostalen Kallusbereich statt, sondern im interfragmentären Bereich im der Knochenkortikalis (Brueton et al., 1990). Jedoch führt auch die späte gute Vaskularisierung im Pseudarthrosemodell nicht zu einer suffizienten Frakturheilung (Reed et al., 2003). Die Gruppe um Brownlow et al. konnte dabei zeigen, dass es in einem atrophen Pseudarthrosemodell an Kaninchen zu keiner adäquaten Wachstumsfaktorenexpression zum Untersuchungszeitpunkt nach 8 Wochen gekommen ist (Brownlow et al., 2001). Ein deutliche Herunterregulation im atrophen Pseudarthrosemodell konnte auch in der Arbeitsgruppe um Niikura et al. nachgewiesen werden. Hier kam es über den betrachteten Untersuchungszeitraum hinweg zu einer signifikanten Minderexpression von BMP-2, -4, -7 und Noggin ab dem 7. postoperativen Tag (Niikura et al., 2006). Während der sehr frühen Untersuchungszeiträume nach 3 Tagen ist hingegen noch kein Expressionsunterschied zu erkennen gewesen.

Dass die Periostkauterung nicht zwangsläufig zu einer atrophen Pseudarthrose führt, sondern zu 54% auch eine hypertrophe Pseudarthrose zur Folge haben kann, konnte bei Versuchen von Volpon *et al.* gezeigt werden (Volpon, 1994).

Eine Untersuchung von Kwong *et al.* zeigte, dass man bereits zu einem frühen Untersuchungszeitpunkt erkennen kann, dass es im Rahmen der Ausbildung einer Pseudarthrose zu einer reduzierten Expression vom BMP immunhistologisch kommt (Kwong et al., 2009). Die Detektion der Pseudarthrose und das Verständnis der Biologie ist die notwendige Voraussetzung zur Etablierung therapeutischer Interventionsmöglichkeiten.

Um entstandene Pseudarthrosen durch Wachstumsfaktorenapplikation zur Ausheilung zu bringen, wurden zahlreiche experimentelle Untersuchungen durchgeführt. BMPs werden hierbei als geeignete applikationsfähige Wachstumsfaktoren angesehen, welche die Frakturheilung beschleunigen, wenn sie in die Frakturregion eingebracht werden (Gerhart et al., 1993). Andere Versuche hingegen zeigen, dass die Applikation zeitlich abgestimmt auf den Frakturheilungsprozess erfolgen sollte. Die Studienlage ist hier jedoch sehr heterogen. Die Gruppe um Betz *et al.* konnte hier zeigen, dass am Mausmodell die verzögerte Applikation von BMP-2 am Tag 5 oder 10 nach Osteotomie eine verbesserte mechanische Stabilität und eine gesteigerte Mineralisierung verursacht (Betz et al., 2007). Im Vergleich hierzu war die intraoperative Applikation am Tag 0 oder Tag 1 deutlich weniger wirksam.

An Schafen konnte die frühe Applikation von BMP-2 cDNA als adenoviraler Vektor ebenfalls nicht zu einer verbesserten Frakturheilung führen (Egermann et al., 2006).

Durch die verzögerte Applikation von Wachstumsfaktoren im Sinne von Platelets rich Plasma (PRP) bei atropher Pseudarthrose konnte bei allen Untersuchten der Defekt zu einer Ausheilung innerhalb von etwa 4,9 Monaten (2-8 Monaten) gebracht werden (Sanchez et al., 2009). Dies wäre auch mit unseren Beobachtungen über den Anstieg an BMP-2 mRNA-Expression zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Frakturheilung und somit einem verzögerten Applikationsbedarf an BMP-2 vereinbar. Unsere Ergebnisse zeigen, dass es bei stabiler Fixation der Fraktur zu einem Expressionsanstieg von BMP-2 am 21. Tag kommt. Dieser Anstieg ist bei mechanischer Instabilität nicht zu beobachten, so dass hier ein Parameter für eine frühe Detektion einer Pseudarthrose zur Verfügung stünde. Auf einem niedrigen Level werden auch zu den frühen Untersuchungszeitpunkten nach 7 und 14 Tagen schon BMP-2 und BMP-4 exprimiert, was den mangelnden Einfluss der frühen Applikation unterstreichen könnte. Es gibt jedoch auch Studien, die zeigen, dass sich auch durch die frühe Applikation von BMP-2 eine verbesserte Frakturheilung erzielen lässt (Einhorn et al., 2003).

Dies unterstreicht auch die ubiquitäre Potenz von BMP-2 als Wachstumsfaktor für die Frakturheilung.

Hingegen zeigt BMP-7 in unseren Untersuchungen schon am 14. postoperativen Tag eine gesteigerte mRNA-Expression bei stabiler Fixation. Eine frühere Applikation zur notwendigen Progredienz der Frakturheilung wäre hier denkbar. So zeigt auch die initiale Applikation von rhBMP-7 im Frakturspalt, dass hierdurch die Ausbildung einer atrophen Pseudarthrose verhindert werden kann (Makino et al., 2005, den Boer et al., 2002). BMP-7 wird bei unseren Untersuchungen bei stabiler Fixation und fortschreitender Frakturheilung stets stärker exprimiert als bei instabiler Stabilisierung. Gemäß unseren Untersuchungen mit dem entsprechenden Expressionsanstieg von BMP-2-und 4 kann man annehmen, dass die verzögerte Applikation die Frakturheilung entscheidender beeinflusst, wohingegen bei BMP-7 kontinuierliche Applikation über den gesamten Frakturheilungsverlauf wünschenswert.

# 5.2.2. Expression der osteogenen Wachstumsfaktoren in Abhängigkeit von der Frakturstabilität

Während der Frakturheilung läuft eine koordinierte Heilungskaskade ab, die mit der regulären embryonalen Knochenentwicklung vergleichbar ist (Gerstenfeld et al., 2003). Hierfür ist eine komplexe Interaktion aus mesenchymalen und vaskulären Vorläuferzellen, Wachstumsfaktoren und der Extrazellulärmatrix notwendig. Die notwendigen Zellen stammen aus dem Blut, dem Periost, der Knochenkortikalis, der Knochenmarksregion und dem umgebenden Gewebe. Man kann zum besseren Verständnis des Ablaufs der Frakturheilung diese in drei sich überlappende Phasen aufteilen [Inflammation, Proliferationsphase mit Knorpelformation und Knorpelresorption mit primärer Knochenformation, sowie sekundäre Knochenformierung/ Remodeling] (Ai-Aql et al., 2008). Damit der gesamte biologische Prozess ablaufen kann, sind Signalmoleküle notwendig, die ebenfalls in 3 Gruppen eingeteilt werden können: 1.) inflammatorische Zytokine; 2.) Faktoren der TGF-B-Superfamilie und 3.) angiogenetische Faktoren. In diese TGF-B-Superfamilie gehören die verschiedenen BMPs, TGF-ß und GDFs. BMP-2, -4, und -7 scheinen eine entscheidende Rolle bei der Initialisierung der Frakturheilung zu spielen (Schmitt et al., 1999).

Aus unseren histologischen Untersuchungen ist ersichtlich, dass bei rigider Fixation das Frakturhämatom zum Zeitpunkt 7 Tage nach Operation noch vorhanden ist, sich aber bereits zurückbildet. Es wird ersetzt von Bindegewebe. Am Tag 14 postoperationem ist das Hämatom nur noch in Resten vorhanden und es beginnt die Knorpelformation. Nach 21 Tagen findet bei rigider Fixation die Knochenbildung vor allem durch enchondrale Ossifikation statt (Schell et al., 2005). Diese vollzieht sich im Kallusinneren und der Interkortikalregion. Am lateralen Kallusrand zeigt sich zur Überbrückung eine zunehmende Geflechtknochenbildung im Bereich des periostalen Kallus. An den Fronten der Ossifikationszentren kommt es noch nicht zu einer vollständigen knöchernen Überbrückung. Es ist noch eine Knorpelzwischenschicht vorhanden, in der sich hypertrophierte Chondrozyten befinden. Die Kallusformation erreicht hier ihr größtes Ausmaß und fällt bei rigider Fixation anschließend wieder ab. Am Tag 42 kommt es zu einer fortschreitenden Mineralisierung des Kallusgewebes. Der periostale Kallus ist nun vollständig von Knochensubstanz durchbaut. An den kallösen Aussengrenzen zeigen sich nun große Mengen an Osteoklasten, welche nun die dortige Knochenresorption einleiten. Zudem ist die Interkortikalregion schon knöchern überbückt (Epari et al., 2006).

Im Gegensatz dazu zeigt sich bei kritischer Fixation noch ein deutliches Hämatom am Tag 7, welches aufgrund der Instabilität durch rezidivierende Blutgefässruptur persistiert. Am Tag 14 konnte noch keine Knorpelformation detektiert werden. Diese erscheint in kleinen Gruppierungen erst am Tag 21 und zeigt am Tag 42 eine erhebliche Variationsbreite, welche auf die sehr heterogene Heilung zurückzuführen ist (Lienau et al., 2009). Auch am Tag 42 konnten nur angedeutete periostale Knochenformationen entdeckt werden, ohne dass es zu einer knöchernen Frakturspaltüberbrückung gekommen ist.

In der vorliegenden Arbeit stieg die Konzentration an BMP-2, -4 und -7 bei rigider Fixation kontinuierlich an, so dass die maximale Expression zum Zeitpunkt 6 Wochen nach Osteotomie vorhanden ist. Eine signifikant höhere mRNA-Expression konnte für BMP-2 bei rigider Fixation am 21. Tag nach Operation nachgewiesen werden. Dies korreliert mit histologischen Beobachtungen, dass es zu diesem Zeitpunkt zu einer vermehrten Knochenbildung durch enchondrale Ossifikation kommt. Diese Ossifikation kann bei suffizienter Frakturüberbrückung durch einen rigiden Fixateur externe weiter fortgesetzt werden, so dass es am Tag 42 post operationem weiter zu einem Anstieg der BMP-2 mRNA-Expression kommt. Somit scheint BMP-2 progredient bei zunehmender Mineralisierung exprimiert zu werden. Die große Streuungsbreite, die bei kritischer Fixation zum Zeitpunkt nach 6 Wochen bei der BMP-2 Expression aufgetreten ist, scheint mit der großen Variabilität des Heilungsergebnisses zu korrelieren, da es in der instabilen Gruppe in etwa 37% der Tiere zu einer Pseudarthrosenbildung ohne knöcherne Frakturüberbrückung kommt (Schell et al., 2008).

Einen signifikanten Expressionsanstieg bei rigider Fixation wurde bei BMP-4 erst am Tag 42 nach Osteotomie beobachtet. An den gemessenen Zeitpunkten am 7., 14. und 21. Tag nach

Osteotomie war die mRNA-Produktion trotz unterschiedlicher Stabilität der beiden Fixateure auf einem beinahe identischen Expressionslevel. Es lässt sich daher vermuten, dass die mRNA-Expression von BMP-4 an die fortschreitende knöcherne Kallusbildung bzw. die zunehmende Mineralisierung gebunden ist. Die frühe Phase der intramembranösen Ossifikation scheint keine Überexpression von BMP-4 zu bewirken. Nach Anlage eines kritischen Fixateurs konnte auch zu einem späten Untersuchungszeitpunkt keine gesteigerte BMP-4 mRNA-Expression nachgewiesen werden. Die späte Expression ist somit an mechanische Stabilität und knöcherne Umbauvorgänge gebunden. Bei BMP-7 kam es jedoch schon in der früheren Phase am 14. Tag nach Operation zu einer gesteigerten Expression. Im Gegensatz wurde es bei instabilen Frakturverhältnissen auch am 42. Tag nur insuffizient exprimiert. Es könnte somit um einen Marker handeln der für die Ossifikation unter stabilen Frakturbedingungen charakteristisch ist. Weitere Untersuchungen wäre jedoch hierfür notwendig.

Die Analysen der BMP-Expression in der Literatur sind insgesamt sehr inhomogen und lassen auch auf Grund der diversen Tiermodelle kein einheitliches Expressionsbild erkennen. Zu Beginn des Heilungsprozesses scheint BMP-2/ -4/ -7 um das Frakturhämatom herum nur minimal exprimiert zu werden. Das Expressionslevel nimmt jedoch zu, wenn sich das Hämatom beginnt zu formieren und mesenchymale Vorläuferzellen im Frakturspalt erscheinen und proliferieren (Onishi et al., 1998). Immunhistochemisch zeigte sich bei der Frakturheilung am Rattenmodell, dass BMP-2/-4/-7 auch schon in einem frühen Stadium der Frakturheilung in der Kambiumschicht des Periosts nahe den Frakturenden exprimiert wird (Nakase et al., 1994a). Gemäß wissenschaftlichen Erkenntnissen, kann man den ablaufenden Prozess der Knochenheilung in intramembranöse und enchondrale Ossifikation unterteilen. Es zeigte sich, dass bei der intramembranösen Heilung mit zunehmender periostaler Reaktion und Knochenanlagerung die dortigen osteoblastären Zellen vermehrt BMP-2/-4 exprimieren. Die Zahl der BMP-2 exprimierenden osteoblastären Zellen nimmt solange zu, bis der Geflechtknochen zu Lamellenknochen umgebaut wird. Im weiteren Verlauf dieses Prozesses, ca. 3 Wochen post operationem, nimmt sowohl die osteoblastäre Zellzahl, als auch die Expressionsstärke in dieser Frakturregion ab (Bostrom, 1998). Obwohl BMP-2 als extrazellulärer Transmitter fungiert, kommt es in dieser Frakturregion nicht zur höhergradigen extrazellulären Expression von BMP. Die Arbeit von Bostrom et al. zeigt hingegen, dass im enchondralen Heilungsprozess die chondralen Vorläuferzellen und unreifen Chondrozyten die stärkste Expression von BMP-2 und -4 aufweisen. Zeitlich gesehen, geschieht dies im Rattenmodell um den 6. bis zum 14. Tag der Frakturheilung während der späten inflammatorischen Phase und der frühen Chondrogenese. Bei den reifen und hypertrophen Chondrozyten nimmt sowohl die Zahl der produzierenden Zellen als auch deren Intensität der Expression deutlich ab. Mit der beginnenden Kalzifikation und Geflechtknochenbildung steigt die Expression von BMP-2 und -4 wieder exponentiell an. Erst während des knöchernen Umbaus und der fortschreitenden Lamellenknochenbildung nach dem 21. Tag der Knochenheilung kommt es zu einer Downregulation der BMP-Expression (Bostrom, 1998). Betrachtet man die verlängerte Heilungszeit bei Schafen im Verhältnis zum Rattenmodell, so würde der genannte Expressionsanstieg von BMP-2/ -4 in der Phase der chondralen Knochenheilung und dem beginnenden knöchernen Umbau entsprechen und mit unseren Zeiten und Beobachtungen korrelieren. Jedoch ist es fraglich, inwiefern man die Expression von Proteinen in Zellen mit der mRNA-Expression zeitlich vergleichen kann. Zudem wurde die sehr frühe inflammatorische Phase bei unseren Untersuchungen nicht dargestellt.

In der Arbeit von Cho *et al.* zeigte sich, dass besonders BMP-7 aber auch BMP-4 ab dem 14. Tag der Heilung in proliferierenden und reifen Chondrozyten verstärkt exprimiert wird. Hingegen zeigt sich, dass BMP-2 im Anfangsstadium der Frakturheilung einen Peak hat und dann erst in späteren Stadien der Frakturheilung wieder vermehrt exprimiert wird (Cho et al., 2002, Ishidou et al., 1995). Die frühe Expression findet vor allem am 1.-3. Tag der Frakturheilung statt, wenn sich die mesenchymalen Vorläuferzellen beginnen zu proliferieren und zu differenzieren. Dies legt die These nahe, dass besonders BMP-2 als Regulator und Trigger für die Frakturheilungskaskade fungiert. Eine eingeschränkte Rolle scheint BMP-2 jedoch in der Phase des Knochenremodelings während der Frakturheilung zu spielen (Bostrom, 1998).

Verglichen mit der Expressionsanalyse von Niikura *et al.* an Pseudarthrosemodellen konnte auch bei unserer Analyse festgestellt werden, dass es bei BMP-4 und -7 zu einer starken Downregulation nach mechanischer Instabilität kommt (Niikura et al., 2006). Bei in vitro Studien an Osteoblasten zeigte sich, dass BMP-2 bei der Knochenbildung früher exprimiert wird als BMP-4 und die Expression von anderen BMPs stimuliert (Chen et al., 1997). Diese frühere Hochregulation konnte auch in der vorliegenden Untersuchung beobachtet werden. Sie ist jedoch an die mechanische Stabilität gebunden.

Die BMP-Expression darf aber nicht isoliert betrachtet werden. Die Balance zwischen BMPs und deren Antagonisten ist essentiell für die regelrecht ablaufende Frakturheilung. Die Expression von Noggin korreliert mit der Expression von BMP-4. Es kommt sowohl bei rigider, als auch bei kritischer Fixation am Tag 14 zu einem Expressionsanstieg. Am Tag 42 hingegen kommt es nur bei rigider Fixation zu einem deutlichen Expressionsanstieg gegenüber der kritischen Fixation. Dies könnte dem in der Literatur beschriebenen Abfall der BMP-Expression wärend der anschließenden Remodelingphase voraus gehen (Bostrom,

1998). Noggin und BMP-4 scheinen sich, wie in der Literatur bereits beschrieben, gegenseitig zu bedingen und somit die Knochenheilung zu beeinflussen (Yoshimura et al., 2001b). Die Hochregulation von BMPs zieht eine vermehrte Expression von Noggin nach sich. Der biologische Sinn ist vermutlich darin zu sehen, als protektiver Mechanismus der Osteoblasten zu fungieren und eine BMP-Überexpression zu unterbinden (Gazzerro et al., 1998). Noggin als Antagonist von BMP wird aber auch schon zu einem frühen Zeitpunkt hochreguliert, so dass man annehmen kann, dass die sehr frühe BMP-Expression durch Antagonisierung zeitlich limitiert wird (Niikura et al., 2006). Diese frühe Hochregulation von Noggin mRNA konnte auch in unseren Versuchen nachgewiesen werden. Um exakt darzulegen, in welchem zeitlichen Zusammenhang Noggin zur BMP-Expression in den Osteoblasten synthetisiert wird, wären jedoch frühere Untersuchungszeitpunkte und kürzere Abstände notwendig. Die verminderte Expression von BMP bei kritischer Fixation zieht somit auch eine deutlich geringere Expression der Noggin-mRNA nach sich. Kommt es zu einer verminderten Hochregulation von Noggin bei fortschreitender Frakturheilung, so kommt es auch zu einem unverminderten Ansprechen der Osteoprogenitorzellen auf BMP und somit zu einer möglichen vermehrten Knorpelbildung und zu einer ungehinderten Überproduktion an Knochensubstanz (Wan et al., 2007). Die Unterdrückung der Noggin-Expression zeigte bei in Versuchen hyperplastische Knorpelbildung vitro eine und eine progrediente Knochenneubildung. Dies konnte auch bei in vivo Untersuchungen aufgezeigt werden, so dass es hier ebenfalls zu einer verstärkten und beschleunigten Knochenbildung kam (Wan et al., 2007, Brunet et al., 1998). Inwiefern dieser schneller gebildete Knochen die gleichen biomechanischen Eigenschaften aufweist und somit eine schnellere Belastung erlaubt, bleibt derzeit noch Gegenstand intensiver Forschung.

In unserer Untersuchung bleibt Noggin bei kritischer Fixation auch im fortschreitenden Heilungsverlauf auf einem niedrigen Expressionslevel. Es ist anzunehmen, dass die Expression von Noggin durch BMPs und mechanosensibel beeinflußt wird und die fehlende Expression zu einer verlängerten chondralen Phase und anschließend zur überschießenden Knochenapposition führt, die perspektivisch an der Ausbildung einer hypertrophen Pseudarthrose beteiligt ist.

TGF-ß wird in der voliegenden Studie unabhängig von der Art der Fixation in der frühen Frakturheilungsphase am Tag 14 vermehrt exprimiert. Es wird angenommen, dass TGF-ß1 als Promotor für die initiale Chondrogenese während des Frakturheilungsverlaufs verantwortlich ist (Bostrom, 1998). An Mäuseuntersuchungen zeigte sich, dass es bis zum Tag 7 der Frakturheilung zu einem Anstieg von TGF-ß2 und –ß3 kam, hingegen TGF-ß1 eher konstitutiv exprimiert wurde (Cho et al., 2002). In Korrelation zu den histologischen Untersuchungen war dies der Zeitpunkt, bei dem es vor allem zu einer verstärkten Knorpelbildung durch enchondrale Ossifikation kommt. Bei unseren Untersuchungen kam es bei rigider Fixation zu einem Peak von TGF-ß1 während der beginnenden Chondrogenese am 21. Tag nach Osteotomie, mit einer anschliessenden signifikanten Downregulation 6 Wochen nach Osteotomie. Auch dies deutet daraufhin, dass TGF-ß1 einen Beitrag zur Frakturheilung während der chondralen Umbauphase leiset. Die Downregulation könnte mit der fortschreitenden Mineralisierung und Knochenbildung zu diesem Zeitpunkt nach 6 Wochen erklärt werden. Hier scheint TGF-ß1 keinen essentiellen Beitrag mehr zu leisten. Bei kritischer Fixation zeigte sich hingegen, dass es nicht zu einer Herunterregulation der TGF-ß1-Expression gekommen ist. Die TGF-ß1-Expression wird weiter auf einem vergleichbar hohen Niveau konstant gehalten und somit die Knorpelbildung ohne knöchernen Umbau unterhalten. Weitere Untersuchungen vorausgesetzt könnte sich TGF-ß1 eventuell als ein Parameter für die verlängerte chondrale Phase der Frakturheilung erweisen.

In der Literatur ist bisher keine Expressionsanalyse zu einem so späten Zeitpunkt der Frakturheilung beschrieben. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass TGF-ß einen inhibitorischen Effekt auf ausgereifte Zelllinien hat, so dass die weitere Proliferation der Chondrozyten und Osteoblasten zum Zeitpunkt der fortgeschrittenen Frakturheilung supprimiert wird (Bostrom and Asnis, 1998). Der Speicherort von TGF-ß ist jedoch vor allem die Knochenregion. Inwiefern das aktivierte Protein trotz erniedrigter Expression weiter im Knochen vorliegt, lässt sich mit der vorliegenden Studie nicht abschließend klären. Die Faktoraktivierung und deren Funktion als Protein entfaltet erst durch die sehr komplexe posttranskriptorische Regulation seine biologische Wirkung (Cho et al., 2002). TGF-ß wird zudem nicht nur lokal in der Frakturungebung hochreguliert, sondern es kommt während der Frakturheilung auch zu systemisch erhöhten TGF-ß-Leveln. Bei einer verzögerten Heilung fallen diese erhöhten systemischen Level jedoch vorzeitig wieder ab, wodurch bereits propagiert wurde, dass TGF-ß als früher Marker für eine ausbleibende Frakturheilung dienen könnte (Zimmermann et al., 2007).

M-CSF scheint im wachsenden Knochen nicht konstitutiv exprimiert zu werden. Ebenso wurde am Rattenmodell gezeigt, dass es im Kallusgewebe keine vermehrte Expression gibt (Einhorn et al., 1995). Dies konnte teilweise in unseren Untersuchungen am Schafsmodell bestätigt werden. In der frühen Frakturheilungsphase nach sieben Tagen gab es keinen Expressionsunterschied zwischen stabiler und instabiler Fixation. Zu den weiteren Frakturheilungszeitpunkten wird M-CSF jedoch bei stabiler Fixation stets höher exprimiert als bei instabiler Fixation. Es scheint somit unter stabilen Frakturbedingungen einen stimulierenden Einfluss auf die Zellproliferation der Osteoklasten im Frakturbereich und somit auf die Matrixdegradation zu haben. In der Gruppe mit rigidem Fixateur kann somit unter Einfluss der M-CSF-Expression die durch Osteoklasten getriggerte Degradation der mineralisierten Knorpelmatrix im Rahmen der enchondralen Ossifikation vollzogen werden. Bei insuffizienter Fixation hingegen wird die Expression von M-CSF am 14. Tag nach Osteotomie herunterreguliert. In den darauf folgenden Untersuchungszeitpunkten steigt das Expressionslevel in der Gruppe mit instabilem Fixateur nicht weiter an. Die Aktivierung der Osteoklasten und der Abbau von hypertrophierter Knorpel- und Knochensubstanz scheint an die Stabilität gekoppelt zu sein. Im Rahmen der Instabilität ist dieser Abbau nicht möglich, was die fehlende Aktivierung der Osteoklasten und verminderte mRNA-Expression von M-CSF erklären könnte. Ohne die entsprechende Degradation der Knorpelmatrix und deren Umbau etabliert sich gemäß Beobachtungen eine prolongierte chondrale Frakturheilungsphase (Schell et al., 2008). Bei Versuchen an Ratten zeigte sich, dass es zwei Peaks hinsichtlich der M-CSF-Expression gibt. Zum einen innerhalb der frühen inflammatorischen Phase und zum anderen während der Zeit der enchondralen Ossifikation, wenn es bei fortschreitender Ossifikation auch zu einer zunehmenden Osteoklastenaktivität kommt (Kon et al., 2001).

Ähnliches konnte auch bei der Expression von OPG beobachtet werden. Beim Mausmodell können zwei Expressionspeaks zu unterschiedlichen Zeiten während des Heilungsverlaufs beobachtet werden. Zuerst während der frühen inflammatorischen Phase und anschliessend am 7. Tag der Frakturheilung zum Zeitpunkt der Chondrogenese (Kon et al., 2001). Es bleibt aber die Einschränkung hinsichtlich der Betrachtung von unterschiedlichen Tiermodellen. In Anbetracht der längeren Frakturheilungszeiten beim Schaf würden diese Daten jedoch mit unseren Ergebnissen korrelieren. Auch bei unseren Versuchen konnte eine Hochregulation von OPG nach stabiler Fixation zum Zeitpunkt der Chondrogenese gezeigt werden, so dass es hier zu einer Hemmung der Osteoklastogenese kommt. Tendenziell steigt bei unseren Versuchen nach stabiler Fixation die OPG-Expression bis zum 42. Tag der Frakturheilung weiter an. OPG wird von aktivierten Osteoblasten exprimiert. Bei stabiler Frakturfixation ist zu diesem Zeitpunkt der Matrixumbau bereits fortgeschritten, so dass die Osteoblasten eine fortschreitende Osteoklastenaktivierung limitieren. In der Gruppe mit instabiler Frakturfixation kommt es erst im fortgeschrittenen Heilungsverlauf am 42. postoperativen Tag zu einem signifikanten OPG mRNA-Expressionsanstieg. Dies korreliert wiederum mit den histologischen Beobachtungen der verzögerten und prolongierten Knorpelbildung (Schell et al., 2008). Das Verhältnis von M-CSF zu OPG verlagert sich bei instabiler Fixation im fortschreitenden Heilungsverlauf zu Gunsten von OPG und somit auf die Seite der zunehmenden Hemmung Osteoklastogenese. Da dies verminderte der eine

Osteoklastenaktivierung nach sich zieht, könnte man annehmen, dass das initiale Frakturhämatom bzw. der frühe fibröse und chondrale Kallus nicht adäquat umgebaut werden kann. Bei der Analyse der verzögerten Frakturheilung konnte in der Arbeitsgruppe von Volpon et al. an einem atrophen Pseudarthrosemodell beim Hund gezeigt werden, dass es schon nach 3 Wochen nach Operation zu einer frühen Osteoklasteninvasion und -aktivität kommt. Dies könnte die frühe Hochregulation von M-CSF bei kritischer Fixation in unseren Beobachtunen erklären (Volpon, 1994). Die Aktivierung der Osteoklasten ist auch immer im Zusammenspiel mit der Rezeptorexpression und deren Liganden (RANK und RANKL) zu deuten. So scheint das relative Level zwischen OPG und RANK einen Einfluss auf den knöchernen Umbau und die gebildete Knochenmasse zu haben (Coetzee and Kruger, 2004). Es konnte jedoch auch demonstriert werden, dass das vollständige Fehlen von RANK in knock-out Tieren zu einem Ausbleiben der knöchernen Frakturheilung führt (Flick et al., 2003). Inwiefern einerseits das lokale bzw. auch das systemische Vorkommen von Osteoprotegerin die Etablierung einer Pseudarthrose fördert und welchen Einfluss die Expression von RANKL bei der Ausbildung der hypertrophen Pseudarthrose ausübt, bleibt weiterhin Gegenstand der unfallchirurgischen Forschung.

# 5.2.3. Expression der Extrazellulärmatrix und matrixdegradierender Enzyme in Abhängigkeit von der Frakturstabilität

Während der Frakturheilung werden zur Überbrückung des entstandenen Frakturspaltes eine Vielzahl von Extrazellulärmatrixproteinen produziert. Die jeweilige Zusammensetzung der verschiedenen Proteine verändert sich über den Zeitraum der Frakturheilung und ist somit an die Frakturheilungsphasen adaptiert. Es ergibt sich eine spezifische Sequenz aus Bindegewebs-, Knorpel- und Knochenmatrixproteinen. Diese unterscheiden sich im skeletalen Gewebe in Bezug auf die Matrixproteinzusammensetzung (Sandberg et al., 1989). Die Matrixproduktion ist von der vorherrschenden Zellpopulation abhängig und für diese charakteristisch. So besitzen die Osteoprogenitorzellen im Periost die Fähigkeit, sich sowohl in Osteoblasten als auch in Chondrozyten zu differenzieren. Durch diese Variabilität besitzen sie auch die Fähigkeit, die unterschiedlichen Typen der Kollagenmatrix zu synthetisieren, so dass es zu einer grossen Heterogenität an Matrixkollagenen kommt (Ashhurst, 1986). Im Rahmen der stabilen osteosynthetischen Versorgung von Frakturen zeigen dabei bestimmte Zellarten eine spezifische sequenzielle Kollagenexpression. So wird dabei von reifen Chondrozyten vor allem Kollagen-II, von hypertrophierten Chondrozyten vor allem Kollagen-X und von Osteoblasten verstärkt Kollagen-I synthetisiert (Page and Ashhurst, 1987).

An Kaninchentibia konnte die Arbeitsgruppe um Bland et al. zeigen, dass es unter stabilen mechanischen Frakturheilungsbedingungen, d.h. ohne Frakturspaltausbildung, zu einer Heilung ohne enchondrale Ossifikation und somit ohne Produktion von Kollagen-II kommt. Im periostalen Bereich kam es vom 3. bis 10. Tag zur Expression von Kollagen-I. Unter instabilen Bedingungen hingegen beginnt die Kallusformierung um den 7. Tag post operationem und dabei zeigt sich eine erhöhte Expression von Kollagen-I und -II. Die sich differenzierenden Chondrozyten in der Interkortikalregion waren für die Kollagen-II Synthese verantwortlich, wohingegen die sich neu differenzierenden Osteoblasten in der periostalen Kallusregion für die Expression von Kollagen-I verantwortlich waren. Sowohl reife Osteozyten als auch hypertrophierte Chondrozyten waren nicht zur mRNA-Produktion von Kollagen-II fähig. Kollagen-I wird weiterhin von den Osteoblasten im Kallusgewebe exprimiert. Zum Zeitpunkt der weit fortgeschrittenen Frakturheilung nach 21 Tagen konnte nur noch in wenigen Osteoblasten eine Kollagen-I Produktion nachgewiesen werden (Bland et al., 1999). Übereinstimmend mit unseren Versuchen konnte auch hier die frühe Hochregulation der Kollagen-I und -II-Expression nachgewiesen werden. Nach rigider Fixation zeigte sich am 14. und 42. Tag ein signifikanter mRNA-Expressionsanstieg bei Kollagen-Ia1 und eine signifikant erhöhte Expression gegenüber der kritischen Fixation. Bei kritischer Fixation kommt es nach dem Expressionsanstieg am 14. Tag nicht zu einem weiteren Anstieg der mRNA-Produktion von Kollagen-Ia1. Wie schon erwähnt, sind für die frühe Kollagenexpression vor allem periostale Osteoblasten und fibroblasten-ähnliche Zellen verantwortlich, so dass es sowohl bei rigider als auch bei kritischer Fixation zur frühen Kollagen-Ia1 mRNA-Expression kommt. Im Rahmen der prolongierten Knorpelphase bei kritischer Fixation und fehlendem knöchernen Umbau kommt es dann bei fortschreitender Frakturheilung auch zu einer Stagnation der Kollagen-Ia1 Produktion (Lienau et al., Schell et al., 2008). Die Kollagen-IIa1-Expression wird unabhängig von der mechanischen Stabilität am 14. Tag signifikant hochreguliert. Tendenziell wird Kollagen-IIa1 bei kritischer Fixation am 14. und 21. Tag stärker exprimiert, wobei sich hier jedoch keine Signifikanz nachweisen lässt. Dies würde ebenfalls mit den histologischen Beobachtungen korrelieren, wonach es unter mechanisch instabilen Bedingungen zu einer vermehrten und verlängerten Phase der Knorpelproduktion kommt (Epari et al., 2006).

Ahnliches konnte die Gruppe um *Sandberg et al.* zeigen. Hier kam es bereits nach 5 Tagen zu einer mRNA Produktion von Kollagen-I und –II im periostalen Bereich. Die Matrixproduktion wird dabei vor allem durch Chondrozyten aus sich differenzierenden mesenchymalen Zellen im Periostbereich hervorgerufen. Die Produktion von Kollagen-II wird in diesem Bereich des Periosts am 10. bis 14. Tag fortgesetzt. Anschließend ist durch die

Bildung von Geflechtknochen nur noch die Kollagen-I-Synthese nachweisbar (Sandberg et al., 1989). Ebenso konnte an Rattentibiae die Produktion von Kollagen-II mRNA durch Chondrozyten nachgewiesen werden. Die Anzahl der synthetisierenden Zellen nahm am 21.Tag der Frakturheilung deutlich ab (Hughes et al., 1995). Die Syntheseeigenschaften der differenzierten Osteozyten sind an einen spezifischen Funktionszustand gebunden. Im Rahmen der intramembranösen Knochenbildung sind Osteozyten fähig, Kollagen-I mRNA zu produzieren. Im Gegensatz dazu verlieren Osteozyten diese Eigenschaft, wenn sie in die Matrix integriert werden (Critchlow et al., 1995). Die Produktion der extrazellulären Matrix differiert somit im Rahmen der Frakturheilung von der der regulären Knochenbildung.

Einschränkend muss man sagen, dass der Vergleich von unterschiedlichen Modellen insbesondere im Hinblick auf den zeitlichen Ablauf der Frakturheilung sehr schwierig ist. Die Frakturheilung scheint sich an Kaninchen- und Rattentibiae schneller zu vollziehen, wodurch die insgesamt etwas frühere Expression der Matrixkollagene bei diesen Modellen erklärt werden könnte. Es ist jedoch nicht klar, inwiefern man die zeitlichen Expressionsabläufe von mRNA-Expression und in situ Hybridisierung zwischen den beiden Versuchsanordnungen vergleichen kann. Die Kollagen-II-Synthese ist zudem an die Bildung von Knorpel und somit an die enchondrale Ossifikation gebunden. Voraussetzung hierfür ist eine biomechanisch nicht vollkommen rigide Frakturfixation oder das Vorhandensein eines ausreichend großen Frakturspaltes, welcher nicht in allen Versuchsanordnungen identisch gegeben ist (Ashhurst, 1990).

Die Expression von Kollagen-X findet vor allem während der Frakturheilung im Zusammenhang mit der enchondrale Ossifikation statt (Grant et al., 1987). Die Expression stieg bei immunhistologischen Analysen vor allen zum Zeitpunkt der Chondrozytenhypertrophie mit Kalzifizierung der Knorpelmatrix. Sie ist somit an das Vorhandensein von neu gebildetem mineralisiertem Knochen gebunden, da es sonst weder im regulären Knochen, Skelettmuskel oder in Bindegewebskomponenten des Kallus synthetisiert wird (Ashhurst, 1990). Dies korreliert mit unseren Ergebnissen, dass Kollagen-X nur im fortgeschrittenen Kallus unter mechanisch stabilen Bedingungen signifikant erhöht exprimiert wird. In unseren Versuchen zeigte sich aber auch eine Korrelation der mRNA-Expression zwischen Kollagen-II und -X bei instabiler Fixation. Es kam hier zu einer tendenziell deutlich erhöhten Expression von Kollagen-II und-X am 14. und 21. Tag nach Operation. Dies spiegelt die auch histologisch ersichtliche vermehrte Knorpelbildung nach instabiler Frakturstabilisierung wider (Schell et al., 2008). Nach Grant et al. handelt es sich bei Kollagen-X um einen Marker für die fortgeschrittene enchondrale Ossifikation während der Knorpelhypertrophie (Grant et al., 1987).

Osteopontin ist ein Matrixprotein, welches sowohl bei den regelhaft stattfindenden Knochenumbauvorgängen, als auch während der Frakturheilung eine tragende Rolle spielt (Nakase et al., 1994b). OPN scheint dabei ein Regulator für Minaeralisierungsprozesse, sowohl im Knochen als auch bei pathologischen Prozessen, z.B. bei der Genese von Brustkrebs oder Arteriosklerose, zu sein (Hirota et al., 1995, Giachelli et al., 1993).

OPN wird während der Frakturheilung von räumlich begrenzt auftretenden Zellen exprimiert. Daneben ist die Expression zeitlich limitiert, so dass die Expression an spezifische Phasen der Frakturheilung gekoppelt ist.

Bei unseren Untersuchungen wurde OPN am 7. Tag nach kritischer Fixation stärker exprimiert als nach Anlage eines rigiden Fixateurs. Im Laufe der Frakturheilung zeigte sich, dass die mRNA-Expression von OPN ab dem 14. Tag bei rigider Fixation signifikant höher war. Der Peak wurde jedoch erst am 42. Tag nach Osteotomie erreicht. Hier ist OPN nach rigider Fixation deutlich stärker exprimiert als nach kritischer Fixation.

An osteotomierten Ratten konnte gezeigt werden, dass bereits am 3. Tag post operationem OPN im subperiostalen Kallusbereich von Osteoprogenitorzellen exprimiert wird (Yamazaki et al., 1999). Dieser entsteht durch frühe intramembranöse Ossifikation primär unabhängig von der Frakturstabilität. Dies könnte ein Grund sein, warum es in der frühen Frakturheilungsphase keine erkennbaren Expressionsunterschiede zwischen rigiden und kritisch stabilisierten Frakturen gibt. Hinzu kommt, dass es sich um eine selektive Extraktion des Analysematerials aus der Interkortikalregion handelt, in der es erst verzögert zur Frakturüberbrückung durch enchondrale Ossifikation kommt. Der in unseren Untersuchungen ersichtliche Expressionsanstieg von OPN am 14. postoperativen Tag nach rigider Fixation scheint mit der beginnenden enchondralen Ossifikation in Zusammenhang zu stehen (Schell et al., 2008).

In der Gruppe um Yamazaki *et al.* konnte gezeigt werden, dass es ebenfalls eine OPN mRNA-Expression von Chondrozyten gibt. Die stärkste Expression war in deren Untersuchungen an hypertrophierten Chondrozyten ersichtlich. Allerdings sind auch die in der Umgebung befindlichen aktiven Osteoklasten zur mRNA-Expression von OPN fähig. Dies würde mit unseren Ergebnissen korrelieren, bei denen es am 42. Tag, also zum Zeitpunkt mit verstärkter Osteoklastenaktivität und fortschreitender Knochensynthese, zur stärksten OPN-Expression gekommen ist. Die Tatsache, dass OPN sowohl von Osteozyten, als auch von Osteoklasten exprimiert wird, unterstützt die Idee, dass OPN eine Regulatorfunktion beim Knochenumbau einnimmt (Aarden et al., 1994). Die OPN vermittelte Interaktion zwischen Osteozyten und Osteoklasten scheint sowohl durch Integrine, als auch durch CD44 getriggert zu werden (Yamazaki et al., 1999). In OPN defizienten Zellen fehlt diese

Interaktion, wodurch die Osteoklastenaktivität reduziert ist und die regulären knöchernen Umbauvorgänge nicht adäquat vollzogen werden (Chellaiah et al., 2003). Es kommt dabei zu einer verminderten Motilität und Adhäsion der Osteoklasten und letztlich auch zu einer reduzierten Resorption von Knochensubstanz (Ishijima et al., 2001). Die verminderte Expression von OPN bei kritischer Fixation könnte somit ebenfalls zu einer reduzierten Osteoklastenaktivität in der späten Heilungsphase führen. Dies könnte eine Erklärung für den verzögerten Abbau des Knorpelgewebes und den ausbleibenden knöchernen Umbau im Rahmen der enchondralen Ossifikation sein. Es zeigt sich dabei die schon beschriebene prolongierte chondrale Frakturheilungsphase nach kritischer Fixation (Schell et al., 2008).

Die Gruppe um Miles et al. konnte an Ratten nachweisen, dass OPN in Abhängigkeit von der mechanischen Belastung exprimiert wird. Nach forcierter Biegebeanspruchung konnte gezeigt werden, dass es zu einem bis zu 4-fachen Expressionsanstieg unmittelbar nach Belastung gekommen ist (Miles et al., 1998). Auch in vitro konnte gezeigt werden, dass bei einer intermittierenden Belastung von Osteoblasten-ähnlichen Zellen, es zu einer gesteigerten mRNA-Expression von OPN gekommen ist (Harter et al., 1995). Diese mechanischen Belastungen scheinen einen Einfluss auf die interzellulären Kontaktstellen zu haben, an denen sich auch OPN befindet. So wird der mechanische Stress, vermittelt über Integrin und CD44-Kontakte, in eine modifizierte Genexpression transformiert (Denhardt and Noda, 1998). An OPN-defizienten Mäusen konnte ein stadienabhängiger Einfluss durch das Fehlen von OPN nachgewiesen werden. So kam es zu einer verminderten Neovaskularisation in der frühen Phase am 7.Tag der Frakturheilung. Es resultierte eine initial verringerte Kallusbildung am 7. und 14. Tag mit geringerer mechanischer Belastbarkeit. Trotz normaler Osteoklastendifferenzierung zeigte sich eine reduzierte Funktionalität mit vermindertem Knochenremodeling. Es resultierte ein Frakturkallus mit grösserem Volumen, jedoch reduzierter mechanischer Stabilität (Duvall et al., 2007). Dies spiegelt den Einfluss von OPN in der späten Phase der Frakturheilung wider, um während des Knochenremodelings einen mechanisch stabilen Knochen zu erhalten.

Es kam bei unseren Versuchen zu einer Überexpression an OPN in der Gruppe mit kritischem Fixateur. In den frühen Phasen der Frakturheilung ist die Defektüberbrückung durch intramembranöse Ossifikation weitgehend unabhängig von der mechanischen Rigidität der Frakturüberbrückung, so dass angenommen werden kann, dass die stärkere OPN-Expression als Kompensationsmechanismus des instabilen Zustandes fungieren könnte. Bei knock-out Versuchensanordnungen und dadurch fehlender Integration von OPN in den Frakturkallus zeigt sich nach 4 und 8 Wochen der Frakturheilung ein Kallus mit reduzierten biomechanischen Eigenschaften. Im Hinblick auf das Kallusvolumen zeigen sich hingegen keine Unterschiede (Duvall et al., 2007). Es kommt zu einer unterschiedlichen Kalluszusammensetzung in Abwesenheit von OPN, welche durch eine abweichende kompensatorische Kollagenorganisation erklärbar scheint (Boskey et al., 2002, Liaw et al., 1998). Dies unterstützt die Ansicht von Hansma *et al.*, dass die mechanischen Knocheneigenschaften durch nicht fibrilläre Matrixproteine stark beeinflusst wird (Hansma et al., 2005). Ebenso konnte durch Morinobu *et al.* an einem Distraktionsosteogenesemodell an Mäusen gezeigt werden, dass OPN bei mechanischer Belastung verstärkt exprimiert wird und es in deren Abwesenheit zu einer verminderten Knochenneubildung kommt (Morinobu et al., 2003).

Während der Frakturheilung kommt es zu einem stetigen Umbau der extrazellulären Matrix. An diesem Umbau sind multiple Proteine beteiligt. Die Matrix-Metalloproteasen (MMP) sind dabei an der Matrixdegradation essentiell beteiligt. Von besonderer Bedeutung während der Frakturheilung sind dabei MMP-9 und -13 (Vu et al., 1998, Carvalho et al., 2004). Sowohl bei der Analyse von MMP-9 und -13 zeigte sich, dass es bei rigider Fixation zu einem deutlichen Expressionanstieg am 14. Tag postoperativ gekommen ist. Ein zweiter Peak mit signifikantem Expressionsanstieg ist im zeitlichen Verlauf erst am Tag 42 nach Fixateuranlage zu konstatieren. Hier kommt es auch nach kritischer Fixation zu einem Expressionsanstieg. Die mRNA-Expression von MMP nach rigider Fixateuranlage ist insgesamt durch einen signifikant erhöhten Expressionsanstieg gekennzeichnet. Wie oben ausgeführt, ist MMP-13 vor allem für den Abbau von Kollagen-II verantwortlich (Johansson et al., 1997). Es konnte daher nachgewiesen werden, dass es während der Frakturheilung vor allem von hypertrophierten Chondrozyten exprimiert wird (Lehmann et al., 2005). Diese Phase repräsentiert den Zeitpunkt des Umbaus der chondroiden Matrix zu knöchernem Kallusgewebe im Rahmen der enchondralen Ossifikation. In unseren Untersuchungen konnte auch hier eine Korrelation zwischen Kollagen-II, -X und MMP-13 aufgezeigt werden. Sowohl bei rigider als auch bei instabiler Frakturfixation kommt es schon zu einem frühen Zeitpunkt nach 14 Tagen post operationem zu einer vermehrten mRNA-Expression von Kollagen-II und MMP-13. Kollagen-II wird anschließend in beiden Gruppen exprimiert mit einer statistisch nicht nachweisbaren Mehrexpression bei instabiler Fixation. Im Rahmen der Degradation kommt es am 42. Tag vor allem bei MMP-13 zu einem Expressionsanstieg und einer signifikant erhöhten Expression gegenüber der instabilen Stabilisierung. In Korrelation mit der Kollagen-X Expression verstärken diese Ergebnisse die These der vorzeitigen Matrixdegradation bei stabiler Frakturfixation. Die Beoachtungen von Johansson et al. des MMP-13 gekoppelten Kollagen-II-Abbaus konnten somit in unseren Untersuchungen bestätigt werden.

Eine Voraussetzung für diesen Umbauprozess ist auch die fortschreitende Vaskularisation, die zur weiteren Mineralisierung führt. Die Gruppe um Lehmann *et al.* konnte hier ebenfalls zeigen, dass MMP-9 in dieser Phase verstärkt exprimiert wird und damit den Knochenumbau unterstützt (Lehmann et al., 2005). Ein Defizit an MMP-9 führt am Tiermodell zu einer verringerten Vaskularisation, gesteigerter Knorpelkallusbildung und einen verzögerten Knorpelumbau, welcher teilweise in einer Pseudarthrose endet (Vu et al., 1998). Auch in unseren Versuchen zeigte sich, dass es bei kritischer Fixation zu einer verminderten MMP-9-Expression zu einem fortgeschrittenen Frakturheilungszeitpunkt kommt. Hierbei zeigt sich ebenfalls die Korrelation zur verminderten Kollagen-X und vermehrten Kollagen-II Expression am 42. Tag nach OP, wodurch die Beobachtungen von Vu *et al.* auch in unseren Untersuchungen aufgezeigt werden konnten.

Die Gruppen von Stickens *et al.* konnten zeigen, dass das Fehlen von MMP-13 auch eine verminderte Expression von OPN zur Folge hat, es aber zu einer verstärkten Expression von Kollagen-II, -X und VEGF kommt (Stickens et al., 2004). Bei der Auswertung unserer Daten konnten auch wir bei instabiler Fixation eine Korrelation zwischen der verminderten MMP-13 Expression und der verminderten Expression von OPN beobachten und somit die Ergebnisse von Stickens *et al.* bestätigen.

Von Ortega et al. konnte an MMP-9 defizienten Mäusen ebenfalls eine verminderte Coexpression von MMP-13, Osteopontin, Kollagen-II und Kollagen-X im Rahmen der enchondralen Ossifikation nachgewiesen werden (Ortega et al., 2005). Die These, dass es bei MMP-9 mechanisch instabilen Frakturen ohne Expression zur prolongierten Knorpelkallusformierung mit ausbleibender Frakturheilung kommt, konnte auch von Colnot et al. dargelegt werden. Die ausbleibende Frakturheilung bei verminderter oder ausbleibender Expression von MMP-9, kann dabei aber durch die Zugabe von VEGF wieder weitgehend kompensiert werden (Colnot et al., 2003). Eine Kompensation tritt ebenfalls zu einem späteren Frakturheilungszeitpunkt mit Beginn der Remodelingphase ein. Diese Beobachtungen haben zu der These geführt, dass die molekularen Prozesse der Angiogenese mit denen des Extrazellularmatrixumbaus direkt verknüpft sind. Im Pseudarthrosemodell bei mechanischer Instabilität ist die VEGF mRNA-Expression ebenfalls reduziert und somit die Kompensationsfähigkeit eingeschränkt (Lienau et al., 2009). Die Arbeitsgruppe um Zijlstra et al. konnte daneben zeigen, dass eine vermehrte Expression von MMP-13 bei der enchondralen Knochenbildung zu einer gesteigerten Vaskularisation in der späten Frakturheilungsphase und damit zu einer beschleunigten Knochenheilung führt (Zijlstra et al., 2004). Zudem wurde ein synergistischer Effekt von MMP-9 und MMP-13 beobachtet. Fehlen beide Proteinasen bei Knockout-Mäusen potenzieren sich die Effekte des verminderten

enchondralen Knochenwachstums. Es kommt schliesslich zur verzögerten Matrixdegradation, die eine verminderte Angiogenese und defizitäre Geflechtknochenbildung nach sich zieht (Stickens et al., 2004). Zudem scheinen regulatorische Gene einen umfassenden Einfluss auf die Expression vom Wachstumsfaktoren und ECM-Proteinen zu spielen. So zeigt sich bei der Expressionsanalyse von CITED2, dass es bei einer Hochregulation dieses Regulatorgens zu einer verminderten Expression an MMP-2,-3, -9 und -13 kommt. So besteht dieser inverse Zusammenhang auch bei verminderter CITED2-Expression, welche zu einer Überexpression an MMP-9 und -13, VEGF, M-CSF und OPG führt (Lee et al., 2009).

#### 5.3. Ausblick

Insgesamt betrachtet kann man feststellen, dass trotz umfangreicher medizinischer Forschung die Transduktionswege von der mechanischen Frakturstabilisierung über die biologische Zellantwort bis hin zur molekularbiologischen Signalkaskade noch weitgehend unbeantwortet sind. Die mechanischen Rahmenbedingungungen für eine bestmögliche Frakturheilung sind dabei bisher nicht detailliert definiert. Es wurden jedoch zahlreiche mechanische Faktoren aufgezeigt, die den Frakturheilungsprozess positiv beeinflussen. Auf Grund der großen Heterogenität der Frakturen wird es kaum möglich sein, ein ideales biomechanisches Umfeld für alle Frakturtypen zu finden. Ziel unfallchirurgischer Frakturversorgun sollte es daher sein, optimale biomechanische Rahmenbedingungen für eine individuelle Frakturbehandlung zu gewährleisten. Berücksichtigung müssen dabei auch Faktoren finden, die das lokale Trauma limitierend mitbeeinflussen.

In der vorgelegten Studie konnte quantitativ gezeigt werden, dass es durch eine veränderte Stabilität zu einer veränderten mRNA-Wachstumsfaktorenexpression kommt. Die signifikanten Unterschiede in der Steifigkeit beeinflussen dabei die Kallusbildung und – differenzierung (Schell et al., 2008). Eine genügend hohe Steifigkeit ist dabei vor allem in der fortgeschrittenen Phase der Frakturheilung notwendig, um die Expression von osteogenen Wachstumsfaktoren zu stimulieren und somit für eine adäquate und schnelle Frakturheilung zu sorgen. Ferner ist ersichtlich, dass es auch schon in der frühen Phase der Frakturheilung bei rigider Frakturstabilisierung zu gesteigerten kallösen An- und Umbauprozessen kommt (erhöhte Expression von OPN, M-CSF). Damit scheint die Voraussetzung geschaffen zu sein, dass der initial gebildete weiche Kallus frühzeitig in einen harten Kallus umgebaut wird. Ist dies durch ungenügende mechanische Stabilität nicht der Fall, kommt es schon in der frühen Phase der Frakturheilung zu einer vermehrten Stimulation der Knorpelkallusbildung (erhöhte Kollagen-IIa und –Xa Produktion) und damit zu einer nur ungenügend rigiden Frakturspaltüberbrückung.

Bisher steht dem klinisch tätigen Unfallchirurgen noch kein Marker zur Verfügung, der es ihm ermöglichen, eine verzögerte oder ausbleibende Frakturheilung frühzeitig zu erkennen. Radiologische Kriterien setzen hierbei erst zu einem sehr fortgeschrittenen Zeitpunkt an. Hier könnten lokale oder systemische Wachstumsfaktoren als Marker für eine sich entwickelnde Pseudarthrose etabliert werden. Nur das bessere Verständnis der Biologie der Frakturheilung und deren Beeinflussbarkeit durch äußere Faktoren ermöglichen es eine ausbleibende Frakturheilung im klinischen Alltag frühzeitig zu erkennen. Dieses Verständnis bildet wiederum die Voraussetzung für eine zeitlich angepasste und somit stadiengerechte Intervention.

### 6. Zusammenfassung

Die Frakturheilung, die nicht nur eine Gewebsreparatur, sondern eine Restitutio ad integrum darstellt, ist somit ein in der Natur einzigartiges Ereignis mit vollständiger Heilung zum Ursprungszustand. Es kommt jedoch trotz modernster Therapieverfahren im klinischen Alltag in etwa 10-15% der Fälle zu einer Heilungsstörung. Im Rahmen der Tibiaschaftfraktur ist dies durch den häufig höhergradigen Weichteilschaden im Rahmen eines Hochrasanztraumas zu erklären. Es kommt somit im Rahmen des Heilungsverlaufs gehäuft zu einer verzögerten oder ausbleibenden Fraktuheilung mit Pseudarthrosenbildung. Neben der insuffizienten Frakturstabilität spielt vor allem die mangelhafte nutritive Versorgung der Frakturregion bei der Entwicklung einer Pseudarthrose eine entscheidende Rolle. Trotz intensiver unfallchirurgischer Forschung bleibt es jedoch weiterhin unklar, in welchem Ausmaß eine instabile Fraktursituation auch eine veränderte Biologie der Frakturheilung nach sich zieht.

Ziel dieser Studie war es daher, den Einfluss von unterschiedlicher Frakturstabilität durch externe Fixationssysteme auf die Biologie der Frakturheilung zu bestimmen. Hierfür wurde eine Tibiaschaftquerfraktur am Schafsmodell ausgewählt, die in der einen Versuchsreihe rigide und in der anderen Anordnung mit einem instabilen Fixateur stabilisiert wurde. Aus Voruntersuchungen ist bekannt, dass es nach instabiler (kritischer) Fixation zur Ausbildung einer verzögerten Frakturheilung kommt. Es wurde daher zu differenzierten Zeitpunkten der Frakturheilung das Kallusgewebe der Tiere entnommen und analysiert.

Untersucht wurde die unterschiedliche mRNA-Expression von osteogenen und chondrogenen Wachstumsfaktoren nach 7, 14, 21 und 42 Tagen, sowie die mRNA- Expression der Extrazellulärmatrix. Es wurde angenommen, dass es einerseits zu einer verminderten und verzögerten mRNA-Expression an osteogenen Wachstumsfaktoren nach kritischer Fixation kommt und andererseits eine prolongierte Expression an chondrogenen Faktoren ersichtlich ist.

Der Vergleich der beiden Fixateure zeigte, dass es zu einer deutlich verminderten mRNA-Expression an osteogenen Wachstumsfaktoren bei instabiler Frakturfixation im Frakturheilungsverlauf kam. Abhängig von ihrem spezifischen Einfluss auf die Frakturheilung waren diese Expressionsunterschiede zu verschiedenen Zeitpunkten ersichtlich. Die signifikantesten Unterschiede gab es bei fortgeschrittener Frakturheilung am 42. Tag der Frakturheilung. Hier kam es zu einer reduzierten mRNA-Expression von BMP-2, -4 und -7, Noggin, TGF-ß1, Kollagen-Ia1, MMP-9 und -13. Bei Kollagen-IIa1 und –Xa1, als Marker für die Knorpelbildung kam es tendenziell zu einer erhöhten Expression nach kritischer Fixation, so dass sich dabei die gesteigerte Knorpelkallusbildung bei Instabilität widerspiegelt. Bei der Analyse von OPN, Kollagen-Ia1, OPG und M-CSF zeigte sich schon in der frühen Frakturheilungsphase, dass heißt zu Beginn der enchondralen Ossifikation (14.-21. Tag), eine signifikant reduzierte Expression nach instabiler Frakturstabilisierung. Diese können daher als besonders sensible Marker einer verzögerten Frakturheilung angesehen werden.

Die in der Studie ermittelten Ergebnisse geben erste Hinweise, inwiefern die mechanische Stabilität die Heilungskaskaden und damit die gesamte Frakturheilung beeinflußt. Das zunehmende Verständnis der Biologie der Frakturheilung bildet somit die Basis dafür, eine ausbleibende Frakturheilung früher erkennen zu können und somit eine stadiengerechte Intervention und Wachstumsfaktorenapplikation zu ermöglichen.

#### 6.1. Summary

Fracture healing in general is an extraordinary event because it is not only a repair of destroyed tissue but a complete healing. Although modern fracture treatment there is a rate of 10-15 % of prolonged or non-union of fractures in clinical routine. Regarding tibial shaft fractures there is a high rate of complications due to massive soft tissue trauma caused by high energy accidents which causes prolonged fracture healing or non-unions. Beside insufficient fracture stability, an important key role for the establishment of non-unions is the nutritive situation of the fracture region. Although intensive orthopaedic research it is still unclear in which amount an unstable fracture region is responsible for a different biology of fracture healing.

The aim of this study was to determine the influence of external fixation systems with different stability on the biology of fracture healing. We used a tibial shaft fracture of sheeps which was stabilised by either a rigid or a critical external fixator. Due to former analysis it was known that the critical external fixator leads to a high rate of non-unions. Therefor we extracted callus tissue of the tibia at different time points to examine osteochondral growing factors. We analysed the mRNA-Expression of osteogenic or chondrogenic growing factores as well as etracellular matrix molecules at 7,14,21 and 42 days after fracture. We expected a down regulated expression of osteogenic growing factors on the one hand and a prolonged expression of chondrogenic factors when stabilised with a critical external fixator on the other hand. Comparing both fixation systems we saw differences of mRNA expression at specific time points due to there specific influence on fracture healing. The most significant differences where obvious at days 42 of fracture healing. There was a clear downregulation of mRNA Expression of BMP-2, -4 and -7, Noggin, TGF-B1, Kollagen-Ia1, MMP-9 and -13 after critical stabilisation. Beside that it was also obvious that Kollagen-IIa1 and -Xa1 which are marker for the chondral formation showed a prolonged expression when stabilized with a critical fixator. This reflected a stronger chondral callus formation. It was also evident that OPN, Kollagen-Ia1, OPG and M-CSF showed a reduced expression after critical stabilisation in the early fracture healing period. These factors could be regarded as sensible markers to detect prolonged fracture healing at early time points.

The results in this study demonstrate the sensitive influence of mechanical stability on the biological outcome of the whole fracture healing cascade. The more profund understanding of the biology of fracture healing is a basic principle to detect prolonged fracture healing or nonunions and to intervene with the application of growing factors at a specific period adapted time point.

## 7. Literaturverzeichnis

- AARDEN, E. M., BURGER, E. H. & NIJWEIDE, P. J. (1994) Function of osteocytes in bone. J Cell Biochem, 55, 287-99.
- AI-AQL, Z. S., ALAGL, A. S., GRAVES, D. T., GERSTENFELD, L. C. & EINHORN, T. A. (2008) Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. J Dent Res, 87, 107-18.
- AMLING, M. & DELLING, G. (1996) [Cell biology of osteoclasts and molecular mechanisms of bone resorption]. Pathologe, 17, 358-67.
- ANDERSON, D. E. & ST JEAN, G. (1996) External skeletal fixation in ruminants. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 12, 117-52.
- ANDERSON, H. C. (1995) Molecular biology of matrix vesicles. Clin Orthop Relat Res, 266-80.
- ARO, H. T. & CHAO, E. Y. (1993) Biomechanics and biology of fracture repair under external fixation. Hand Clin, 9, 531-42.
- ASHHURST, D. E. (1986) The influence of mechanical conditions on the healing of experimental fractures in the rabbit: a microscopical study. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 313, 271-302.
- ASHHURST, D. E. (1990) Collagens synthesized by healing fractures. Clin Orthop Relat Res, 273-83.
- AUGAT, P., BURGER, J., SCHORLEMMER, S., HENKE, T., PERAUS, M. & CLAES, L. (2003) Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model. J Orthop Res, 21, 1011-7.
- AUGAT, P., MERK, J., IGNATIUS, A., MARGEVICIUS, K., BAUER, G., ROSENBAUM, D. & CLAES, L. (1996) Early, full weightbearing with flexible fixation delays fracture healing. Clin Orthop Relat Res, 194-202.
- BABHULKAR, S., PANDE, K. & BABHULKAR, S. (2005) Nonunion of the diaphysis of long bones. Clin Orthop Relat Res, 50-6.
- BARNES, G. L., KOSTENUIK, P. J., GERSTENFELD, L. C. & EINHORN, T. A. (1999) Growth factor regulation of fracture repair. J Bone Miner Res, 14, 1805-15.
- BASSETT, C. A. & HERRMANN, I. (1961) Influence of oxygen concentration and mechanical factors on differentiation of connective tissues in vitro. Nature, 190, 460-1.
- BEHRENS, F. (1989) General theory and principles of external fixation. Clin Orthop Relat Res, 15-23.
- BETTINGER, D. A., PELLICANE, J. V., TARRY, W. C., YAGER, D. R., DIEGELMANN, R. F., LEE, R., COHEN, I. K. & DEMARIA, E. J. (1994) The role of inflammatory cytokines in wound healing: accelerated healing in endotoxin-resistant mice. J Trauma, 36, 810-3; discussion 813-4.
- BETZ, O. B., BETZ, V. M., NAZARIAN, A., EGERMANN, M., GERSTENFELD, L. C., EINHORN, T. A., VRAHAS, M. S., BOUXSEIN, M. L. & EVANS, C. H. (2007) Delayed administration of adenoviral BMP-2 vector improves the formation of bone in osseous defects. Gene Ther, 14, 1039-44.
- BHANDARI, M., GUYATT, G. H., SWIONTKOWSKI, M. F. & SCHEMITSCH, E. H. (2001) Treatment of open fractures of the shaft of the tibia. J Bone Joint Surg Br, 83, 62-8.
- BHANDARI, M., GUYATT, G. H., TONG, D., ADILI, A. & SHAUGHNESSY, S. G. (2000)

Reamed versus nonreamed intramedullary nailing of lower extremity long bone fractures: a systematic overview and meta-analysis. J Orthop Trauma, 14, 2-9.

- 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.
- BIRKEDAL-HANSEN, H., MOORE, W. G., BODDEN, M. K., WINDSOR, L. J., BIRKEDAL-HANSEN, B., DECARLO, A. & ENGLER, J. A. (1993) Matrix metalloproteinases: a review. Crit Rev Oral Biol Med, 4, 197-250.
- BLAND, Y. S., CRITCHLOW, M. A. & ASHHURST, D. E. (1999) The expression of the fibrillar collagen genes during fracture healing: heterogeneity of the matrices and differentiation of the osteoprogenitor cells. Histochem J, 31, 797-809.
- BORNSTEIN, P. & SAGE, E. H. (2002) Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. Curr Opin Cell Biol, 14, 608-16.
- BOSKEY, A. L., SPEVAK, L., PASCHALIS, E., DOTY, S. B. & MCKEE, M. D. (2002) Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. Calcif Tissue Int, 71, 145-54.
- BOSTROM, M. P. (1998) Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. Clin Orthop Relat Res, S116-23.
- BOSTROM, M. P. & ASNIS, P. (1998) Transforming growth factor beta in fracture repair. Clin Orthop Relat Res, S124-31.
- BOURQUE, W. T., GROSS, M. & HALL, B. K. (1993) Expression of four growth factors during fracture repair. Int J Dev Biol, 37, 573-9.
- BRAUN, W. & RUTER, A. (1996) [Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects]. Unfallchirurg, 99, 59-67.
- BRIGHTON, C. T. (1984) The biology of fracture repair. Instr Course Lect, 33, 60-82.
- BRIGHTON, C. T. & HUNT, R. M. (1991) Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. J Bone Joint Surg Am, 73, 832-47. Order.
- BRIGHTON, C. T. & HUNT, R. M. (1997) Early histologic and ultrastructural changes in microvessels of periosteal callus. J Orthop Trauma, 11, 244-53.
- BRIGHTON, C. T. & KREBS, A. G. (1972) Oxygen tension of healing fractures in the rabbit. J Bone Joint Surg Am, 54, 323-32.
- BROWNLOW, H. C., REED, A. & SIMPSON, A. H. (2001) Growth factor expression during the development of atrophic non-union. Injury, 32, 519-24.
- BRUETON, R. N., BROOKES, M. & HEATLEY, F. W. (1990) The vascular repair of an experimental osteotomy held in an external fixator. Clin Orthop Relat Res, 286-304.
- BRUNET, L. J., MCMAHON, J. A., MCMAHON, A. P. & HARLAND, R. M. (1998) Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. Science, 280, 1455-7.
- BUCKWALTER, J. A., GLIMCHER, M. J., COOPER, R. R. & RECKER, R. (1996a) Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. Instr Course Lect, 45, 371-86.
- BUCKWALTER, J. A., GLIMCHER, M. J., COOPER, R. R. & RECKER, R. (1996b) Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. Instr Course Lect, 45, 387-99.
- CARANO, R. A. & FILVAROFF, E. H. (2003) Angiogenesis and bone repair. Drug Discov - 90 -

Today, 8, 980-9.

- CARTER, D. R., BEAUPRE, G. S., GIORI, N. J. & HELMS, J. A. (1998) Mechanobiology of skeletal regeneration. Clin Orthop Relat Res, S41-55.
- CARVALHO, R. S., EINHORN, T. A., LEHMANN, W., EDGAR, C., AL-YAMANI, A., APAZIDIS, A., PACICCA, D., CLEMENS, T. L. & GERSTENFELD, L. C. (2004) The role of angiogenesis in a murine tibial model of distraction osteogenesis. Bone, 34, 849-61.
- CHAO, E. Y., ARO, H. T., LEWALLEN, D. G. & KELLY, P. J. (1989) The effect of rigidity on fracture healing in external fixation. Clin Orthop Relat Res, 24-35.
- CHELLAIAH, M. A., KIZER, N., BISWAS, R., ALVAREZ, U., STRAUSS-SCHOENBERGER, J., RIFAS, L., RITTLING, S. R., DENHARDT, D. T. & HRUSKA, K. A. (2003) Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression. Mol Biol Cell, 14, 173-89.
- CHEN, D., HARRIS, M. A., ROSSINI, G., DUNSTAN, C. R., DALLAS, S. L., FENG, J. Q., MUNDY, G. R. & HARRIS, S. E. (1997) Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. Calcif Tissue Int, 60, 283-90.
- CHIN, D., BOYLE, G. M., PARSONS, P. G. & COMAN, W. B. (2004) What is transforming growth factor-beta (TGF-beta)? Br J Plast Surg, 57, 215-21.
- CHO, T. J., GERSTENFELD, L. C. & EINHORN, T. A. (2002) Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. J Bone Miner Res, 17, 513-20. Order.
- CHOUDRY, U., MORAN, S. & KARACOR, Z. (2008) Soft-Tissue Coverage and Outcome of Gustilo Grade IIIB Midshaft Tibia Fractures: A 15-Year Experience. Plast Reconstr Surg, 122, 479-85.
- CLAES, L. (1990) [The biomechanics of osteosynthesis]. Aktuelle Probl Chir Orthop, 34, 32-8.
- CLAES, L., AUGAT, P., SUGER, G. & WILKE, H. J. (1997) Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. J Orthop Res, 15, 577-84.
- CLAES, L., MAURER-KLEIN, N., HENKE, T., GERNGROSS, H., MELNYK, M. & AUGAT, P. (2006) Moderate soft tissue trauma delays new bone formation only in the early phase of fracture healing. J Orthop Res, 24, 1178-85.
- CLAES, L. E. & HEIGELE, C. A. (1999) Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing. J Biomech, 32, 255-66.
- CLAES, L. E., HEIGELE, C. A., NEIDLINGER-WILKE, C., KASPAR, D., SEIDL, W., MARGEVICIUS, K. J. & AUGAT, P. (1998) Effects of mechanical factors on the fracture healing process. Clin Orthop Relat Res, S132-47.
- COETZEE, M. & KRUGER, M. C. (2004) Osteoprotegerin-receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand ratio: a new approach to osteoporosis treatment? South Med J, 97, 506-11.
- COHEN, I. K. & DIEGELMANN, R. F. (2002) How the Wound Healing Society began. Wound Repair Regen, 10, 195-7.
- COLNOT, C., THOMPSON, Z., MICLAU, T., WERB, Z. & HELMS, J. A. (2003) Altered fracture repair in the absence of MMP9. Development, 130, 4123-33.

- COSCO, F., RISI, M., POMPILI, M. & BORIANI, S. (2001) External fixation and sequential nailing in the treatment of open diaphyseal fractures of the tibia. Chir Organi Mov, 86, 191-7.
- CRITCHLOW, M. A., BLAND, Y. S. & ASHHURST, D. E. (1995) The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit. Bone, 16, 521-7.
- CRUESS, R. L. & DUMONT, J. (1975) Fracture healing. Can J Surg, 18, 403-13.
- DEN BOER, F. C., BRAMER, J. A., BLOKHUIS, T. J., VAN SOEST, E. J., JENNER, J. M., PATKA, P., BAKKER, F. C., BURGER, E. H. & HAARMAN, H. J. (2002) Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on the healing of a freshly closed diaphyseal fracture. Bone, 31, 158-64.
- DENHARDT, D. T. & NODA, M. (1998) Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. J Cell Biochem Suppl, 30-31, 92-102.
- DERVIN, G. F. (1996) Skeletal fixation of grade IIIB tibial fractures. The potential of metaanalysis. Clin Orthop Relat Res, 10-5.
- DERYNCK, R., ZHANG, Y. & FENG, X. H. (1998) Smads: transcriptional activators of TGFbeta responses. Cell, 95, 737-40.
- DG WEBER, O. C. (1973) Pseudarthosen, Bern, Stuttgart, Wien, Huber.
- DOUGHERTY, P. J., SILVERTON, C., YENI, Y., TASHMAN, S. & WEIR, R. (2006) Conversion from temporary external fixation to definitive fixation: shaft fractures. J Am Acad Orthop Surg, 14, S124-7.
- DUDA, G. N., BARTMEYER, B., SPORRER, S., TAYLOR, W. R., RASCHKE, M. & HAAS, N. P. (2003a) Does partial weight bearing unload a healing bone in external ring fixation? Langenbecks Arch Surg, 388, 298-304.
- DUDA, G. N., MANDRUZZATO, F., HELLER, M., GOLDHAHN, J., MOSER, R., HEHLI, M., CLAES, L. & HAAS, N. P. (2001) Mechanical boundary conditions of fracture healing: borderline indications in the treatment of unreamed tibial nailing. J Biomech, 34, 639-50.
- DUDA, G. N., SPORRER, S., SOLLMANN, M., HOFFMANN, J. E., KASSI, J. P., KHODADADYAN, C. & RASCHKE, M. (2003b) Interfragmentary movements in the early phase of healing in distraction and correction osteotomies stabilized with ring fixators. Langenbecks Arch Surg, 387, 433-40. Epub 2003 Jan 30.
- DUVALL, C. L., TAYLOR, W. R., WEISS, D., WOJTOWICZ, A. M. & GULDBERG, R. E. (2007) Impaired angiogenesis, early callus formation, and late stage remodeling in fracture healing of osteopontin-deficient mice. J Bone Miner Res, 22, 286-97.
- EDHOLM, P., HAMMER, R., HAMMERBY, S. & LINDHOLM, B. (1984) The stability of union in tibial shaft fractures: its measurement by a non-invasive method. Arch Orthop Trauma Surg, 102, 242-7.
- EGERMANN, M., LILL, C. A., GRIESBECK, K., EVANS, C. H., ROBBINS, P. D., SCHNEIDER, E. & BALTZER, A. W. (2006) Effect of BMP-2 gene transfer on bone healing in sheep. Gene Ther, 13, 1290-9.
- EINHORN, T. A. (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop, S7-21. Order.
- EINHORN, T. A. (2005) The science of fracture healing. J Orthop Trauma, 19, S4-6.

EINHORN, T. A., HIRSCHMAN, A., KAPLAN, C., NASHED, R., DEVLIN, V. J. & WARMAN,

J. (1989) Neutral protein-degrading enzymes in experimental fracture callus: a preliminary report. J Orthop Res, 7, 792-805.

- EINHORN, T. A., MAJESKA, R. J., MOHAIDEEN, A., KAGEL, E. M., BOUXSEIN, M. L., TUREK, T. J. & WOZNEY, J. M. (2003) A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. J Bone Joint Surg Am, 85-A, 1425-35.
- EINHORN, T. A., MAJESKA, R. J., RUSH, E. B., LEVINE, P. M. & HOROWITZ, M. C. (1995) The expression of cytokine activity by fracture callus. J Bone Miner Res, 10, 1272-81.
- EITEL, F., KLAPP, F., JACOBSON, W. & SCHWEIBERER, L. (1981) Bone regeneration in animals and in man. A contribution to understanding the relative value of animal experiments to human pathophysiology. Arch Orthop Trauma Surg, 99, 59-64.
- ENGSIG, M. T., CHEN, Q. J., VU, T. H., PEDERSEN, A. C., THERKIDSEN, B., LUND, L. R., HENRIKSEN, K., LENHARD, T., FOGED, N. T., WERB, Z. & DELAISSE, J. M. (2000) Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. J Cell Biol, 151, 879-89.
- EPARI, D. R., SCHELL, H., BAIL, H. J. & DUDA, G. N. (2006) Instability prolongs the chondral phase during bone healing in sheep. Bone, 38, 864-70.
- FLICK, L. M., WEAVER, J. M., ULRICH-VINTHER, M., ABUZZAHAB, F., ZHANG, X., DOUGALL, W. C., ANDERSON, D., O'KEEFE, R. J. & SCHWARZ, E. M. (2003) Effects of receptor activator of NFkappaB (RANK) signaling blockade on fracture healing. J Orthop Res, 21, 676-84.
- FRAYSSINET, P., ROUQUET, N., MATHON, D., AUTEFAGE, A. & FAGES, J. (1998) Histological integration of allogeneic cancellous bone tissue treated by supercritical CO2 implanted in sheep bones. Biomaterials, 19, 2247-53.
- GACK, S., VALLON, R., SCHMIDT, J., GRIGORIADIS, A., TUCKERMANN, J., SCHENKEL, J., WEIHER, H., WAGNER, E. F. & ANGEL, P. (1995) Expression of interstitial collagenase during skeletal development of the mouse is restricted to osteoblast-like cells and hypertrophic chondrocytes. Cell Growth Differ, 6, 759-67.
- GALLI, C., PASSERI, G. & MACALUSO, G. M. Osteocytes and WNT: the mechanical control of bone formation. J Dent Res, 89, 331-43.
- GARDNER, T. N., HARDY, J. R., EVANS, M., RICHARDSON, J. B. & KENWRIGHT, J. (1996) The static and dynamic behaviour of tibial fractures due to unlocking external fixators. Clin Biomech (Bristol, Avon), 11, 425-430.
- GAZZERRO, E., GANGJI, V. & CANALIS, E. (1998) Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. J Clin Invest, 102, 2106-14.
- GERHART, T. N., KIRKER-HEAD, C. A., KRIZ, M. J., HOLTROP, M. E., HENNIG, G. E., HIPP, J., SCHELLING, S. H. & WANG, E. (1993) Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. Clin Orthop Relat Res, 317-26.
- GERSTENFELD, L. C., CULLINANE, D. M., BARNES, G. L., GRAVES, D. T. & EINHORN, T. A. (2003) Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. J Cell Biochem, 88, 873-84.
- GIACHELLI, C. M., BAE, N., ALMEIDA, M., DENHARDT, D. T., ALPERS, C. E. &

SCHWARTZ, S. M. (1993) Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. J Clin Invest, 92, 1686-96.

- GLOWACKI, J. (1998) Angiogenesis in fracture repair. Clin Orthop, S82-9.
- GOODSHIP, A. E., CUNNINGHAM, J. L. & KENWRIGHT, J. (1998) Strain rate and timing of stimulation in mechanical modulation of fracture healing. Clin Orthop Relat Res, S105-15.
- GOODSHIP, A. E., WATKINS, P. E., RIGBY, H. S. & KENWRIGHT, J. (1993) The role of fixator frame stiffness in the control of fracture healing. An experimental study. J Biomech, 26, 1027-35.
- GRANT, W. T., WANG, G. J. & BALIAN, G. (1987) Type X collagen synthesis during endochondral ossification in fracture repair. J Biol Chem, 262, 9844-9.
- GRUNDNES, O. & REIKERAS, O. (1993a) The importance of the hematoma for fracture healing in rats. Acta Orthop Scand, 64, 340-2.
- GRUNDNES, O. & REIKERAS, O. (1993b) The role of hematoma and periosteal sealing for fracture healing in rats. Acta Orthop Scand, 64, 47-9.
- HADJIARGYROU, M., LOMBARDO, F., ZHAO, S., AHRENS, W., JOO, J., AHN, H., JURMAN, M., WHITE, D. W. & RUBIN, C. T. (2002) Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. J Biol Chem, 277, 30177-82.
- HAK, D. J., MAKINO, T., NIIKURA, T., HAZELWOOD, S. J., CURTISS, S. & REDDI, A. H. (2006) Recombinant human BMP-7 effectively prevents non-union in both young and old rats. J Orthop Res, 24, 11-20.
- HAMMER, R. R., HAMMERBY, S. & LINDHOLM, B. (1985) Accuracy of radiologic assessment of tibial shaft fracture union in humans. Clin Orthop Relat Res, 233-8.
- HANSMA, P. K., FANTNER, G. E., KINDT, J. H., THURNER, P. J., SCHITTER, G., TURNER, P. J., UDWIN, S. F. & FINCH, M. M. (2005) Sacrificial bonds in the interfibrillar matrix of bone. J Musculoskelet Neuronal Interact, 5, 313-5.
- HARA, Y., NAKAMURA, T., FUKUDA, H., HARADA, Y., NEZU, Y. & TAGAWA, M. (2003) Changes of biomechanical characteristics of the bone in experimental tibial osteotomy model in the dog. J Vet Med Sci, 65, 103-7.
- HARTER, L. V., HRUSKA, K. A. & DUNCAN, R. L. (1995) Human osteoblast-like cells respond to mechanical strain with increased bone matrix protein production independent of hormonal regulation. Endocrinology, 136, 528-35.
- HAYAMI, T., ENDO, N., TOKUNAGA, K., YAMAGIWA, H., HATANO, H., UCHIDA, M. & TAKAHASHI, H. E. (2000) Spatiotemporal change of rat collagenase (MMP-13) mRNA expression in the development of the rat femoral neck. J Bone Miner Metab, 18, 185-93.
- HELDIN, C. H., MIYAZONO, K. & TEN DIJKE, P. (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. Nature, 390, 465-71.
- HENLEY, M. B., CHAPMAN, J. R., AGEL, J., HARVEY, E. J., WHORTON, A. M. & SWIONTKOWSKI, M. F. (1998) Treatment of type II, IIIA, and IIIB open fractures of the tibial shaft: a prospective comparison of unreamed interlocking intramedullary nails and half-pin external fixators. J Orthop Trauma, 12, 1-7.
- HENTE, R., CORDEY, J., RAHN, B. A., MAGHSUDI, M., VON GUMPPENBERG, S. &

PERREN, S. M. (1999) Fracture healing of the sheep tibia treated using a unilateral external fixator. Comparison of static and dynamic fixation. Injury, 30 Suppl 1, A44-51.

- HIRAKAWA, K., HIROTA, S., IKEDA, T., YAMAGUCHI, A., TAKEMURA, T., NAGOSHI, J., YOSHIKI, S., SUDA, T., KITAMURA, Y. & NOMURA, S. (1994) Localization of the mRNA for bone matrix proteins during fracture healing as determined by in situ hybridization. J Bone Miner Res, 9, 1551-7.
- HIROTA, S., ITO, A., NAGOSHI, J., TAKEDA, M., KURATA, A., TAKATSUKA, Y., KOHRI, K., NOMURA, S. & KITAMURA, Y. (1995) Expression of bone matrix protein messenger ribonucleic acids in human breast cancers. Possible involvement of osteopontin in development of calcifying foci. Lab Invest, 72, 64-9.
- HOFBAUER, L. C., KHOSLA, S., DUNSTAN, C. R., LACEY, D. L., BOYLE, W. J. & RIGGS, B. L. (2000) The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. J Bone Miner Res, 15, 2-12.
- HOFBAUER, L. C., KHOSLA, S., DUNSTAN, C. R., LACEY, D. L., SPELSBERG, T. C. & RIGGS, B. L. (1999a) Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. Endocrinology, 140, 4367-70.
- HOFBAUER, L. C., LACEY, D. L., DUNSTAN, C. R., SPELSBERG, T. C., RIGGS, B. L. & KHOSLA, S. (1999b) Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. Bone, 25, 255-9.
- HOLLINGER, J. O., SCHMITT, J. M., HWANG, K., SOLEYMANI, P. & BUCK, D. (1999) Impact of nicotine on bone healing. J Biomed Mater Res, 45, 294-301.
- HU, Z., PEEL, S. A., HO, S. K., SANDOR, G. K. & CLOKIE, C. M. (2005) Role of bovine bone morphogenetic proteins in bone matrix protein and osteoblast-related gene expression during rat bone marrow stromal cell differentiation. J Craniofac Surg, 16, 1006-14.
- HUGHES, S. S., HICKS, D. G., O'KEEFE, R. J., HURWITZ, S. R., CRABB, I. D., KRASINSKAS, A. M., LOVEYS, L., PUZAS, J. E. & ROSIER, R. N. (1995) Shared phenotypic expression of osteoblasts and chondrocytes in fracture callus. J Bone Miner Res, 10, 533-44.
- HUISKES, R. & CHAO, E. Y. (1986) Guidelines for external fixation frame rigidity and stresses. J Orthop Res, 4, 68-75.
- HYLDAHL, C., PEARSON, S., TEPIC, S. & PERREN, S. M. (1991) Induction and prevention of pin loosening in external fixation: an in vivo study on sheep tibiae. J Orthop Trauma, 5, 485-92.
- INAN, M., HALICI, M., AYAN, I., TUNCEL, M. & KARAOGLU, S. (2007) Treatment of type IIIA open fractures of tibial shaft with Ilizarov external fixator versus unreamed tibial nailing. Arch Orthop Trauma Surg.
- ISHIDOU, Y., KITAJIMA, I., OBAMA, H., MARUYAMA, I., MURATA, F., IMAMURA, T., YAMADA, N., TEN DIJKE, P., MIYAZONO, K. & SAKOU, T. (1995) Enhanced expression of type I receptors for bone morphogenetic proteins during bone formation. J Bone Miner Res, 10, 1651-9.
- ISHIJIMA, M., RITTLING, S. R., YAMASHITA, T., TSUJI, K., KUROSAWA, H., NIFUJI, A., DENHARDT, D. T. & NODA, M. (2001) Enhancement of osteoclastic bone resorption and suppression of osteoblastic bone formation in response to reduced mechanical

stress do not occur in the absence of osteopontin. J Exp Med, 193, 399-404.

- JOHANSSON, N., SAARIALHO-KERE, U., AIROLA, K., HERVA, R., NISSINEN, L., WESTERMARCK, J., VUORIO, E., HEINO, J. & KAHARI, V. M. (1997) Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. Dev Dyn, 208, 387-97.
- JOYCE, M. E., JINGUSHI, S. & BOLANDER, M. E. (1990) Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair. Orthop Clin North Am, 21, 199-209.
- JURGENS, C., WOLTER, D., QUEITSCH, C. & SCHULTZ, J. H. (1994) [Treatment concepts and results in non-infected post-traumatic pseudarthroses of the femur and tibia]. Zentralbl Chir, 119, 706-13.
- KENWRIGHT, J. & GOODSHIP, A. E. (1989) Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures. Clin Orthop Relat Res, 36-47.
- KENWRIGHT, J., RICHARDSON, J. B., GOODSHIP, A. E., EVANS, M., KELLY, D. J., SPRIGGINS, A. J., NEWMAN, J. H., BURROUGH, S. J., HARRIS, J. D. & ROWLEY, D. I. (1986) Effect of controlled axial micromovement on healing of tibial fractures. Lancet, 2, 1185-7.
- KERNEK, C. B. & WRAY, J. B. (1973) Cellular proliferation in the formation of fracture callus in the rat tibia. Clin Orthop Relat Res, 197-209.
- KESSLER, S., KASTLER, S., MAYR-WOHLFART, U., PUHL, W. & GUNTHER, K. P. (2000) [Stimulation of primary osteoblast cultures with rh-TGF-beta, rh-bFGF, rh-BMP 2 and rx-BMP 4 in an in vitro model]. Orthopade, 29, 107-11.
- KLEIN, P., OPITZ, M., SCHELL, H., TAYLOR, W. R., HELLER, M. O., KASSI, J. P., KANDZIORA, F. & DUDA, G. N. (2004) Comparison of unreamed nailing and external fixation of tibial diastases--mechanical conditions during healing and biological outcome. J Orthop Res, 22, 1072-8.
- KLEIN, P., SCHELL, H., STREITPARTH, F., HELLER, M., KASSI, J. P., KANDZIORA, F., BRAGULLA, H., HAAS, N. P. & DUDA, G. N. (2003) The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions. J Orthop Res, 21, 662-9.
- KLOEN, P., DOTY, S. B., GORDON, E., RUBEL, I. F., GOUMANS, M. J. & HELFET, D. L. (2002) Expression and activation of the BMP-signaling components in human fracture nonunions. J Bone Joint Surg Am, 84-A, 1909-18.
- KON, T., CHO, T. J., AIZAWA, T., YAMAZAKI, M., NOOH, N., GRAVES, D., GERSTENFELD, L. C. & EINHORN, T. A. (2001) Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. J Bone Miner Res, 16, 1004-14.
- KRISCHAK, G. D., JANOUSEK, A., WOLF, S., AUGAT, P., KINZL, L. & CLAES, L. E. (2002) Effects of one-plane and two-plane external fixation on sheep osteotomy healing and complications. Clin Biomech (Bristol, Avon), 17, 470-6.
- KWAN, A. P., CUMMINGS, C. E., CHAPMAN, J. A. & GRANT, M. E. (1991) Macromolecular organization of chicken type X collagen in vitro. J Cell Biol, 114, 597-604.
- KWAN, K. M., PANG, M. K., ZHOU, S., COWAN, S. K., KONG, R. Y., PFORDTE, T., OLSEN, B. R., SILLENCE, D. O., TAM, P. P. & CHEAH, K. S. (1997) Abnormal compartmentalization of cartilage matrix components in mice lacking collagen X: implications for function. J Cell Biol, 136, 459-71.

- KWONG, F. N., HOYLAND, J. A., FREEMONT, A. J. & EVANS, C. H. (2009) Altered relative expression of BMPs and BMP inhibitors in cartilaginous areas of human fractures progressing towards nonunion. J Orthop Res, 27, 752-7.
- LANDRY, P. S., MARINO, A. A., SADASIVAN, K. K. & ALBRIGHT, J. A. (2000) Effect of soft-tissue trauma on the early periosteal response of bone to injury. J Trauma, 48, 479-83.
- LARSSON, S., KIM, W., CAJA, V. L., EGGER, E. L., INOUE, N. & CHAO, E. Y. (2001) Effect of early axial dynamization on tibial bone healing: a study in dogs. Clin Orthop Relat Res, 240-51.
- LAVELLE, D. (1998) Delayed union and nonunion of fractures. Campbell's operative orthopaedics. St. Louis, Mosby.
- LE, A. X., MICLAU, T., HU, D. & HELMS, J. A. (2001) Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures. J Orthop Res, 19, 78-84.
- LECANDA, F., AVIOLI, L. V. & CHENG, S. L. (1997) Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2. J Cell Biochem, 67, 386-96.
- LEE, J. Y., TAUB, P. J., WANG, L., CLARK, A., ZHU, L. L., MAHARAM, E. R., LEONG, D. J., RAMCHARAN, M., LI, Z., LIU, Z., MA, Y. Z., SUN, L., ZAIDI, M., MAJESKA, R. J. & SUN, H. B. (2009) Identification of CITED2 as a negative regulator of fracture healing. Biochem Biophys Res Commun, 387, 641-5.
- LEHMANN, W., EDGAR, C. M., WANG, K., CHO, T. J., BARNES, G. L., KAKAR, S., GRAVES, D. T., RUEGER, J. M., GERSTENFELD, L. C. & EINHORN, T. A. (2005) Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing. Bone, 36, 300-10.
- LEIBOVICH, S. J. & ROSS, R. (1975) The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. Am J Pathol, 78, 71-100.
- LIAW, L., BIRK, D. E., BALLAS, C. B., WHITSITT, J. S., DAVIDSON, J. M. & HOGAN, B. L. (1998) Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). J Clin Invest, 101, 1468-78.
- LIEBERMAN, J. R., DALUISKI, A. & EINHORN, T. A. (2002) The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. J Bone Joint Surg Am, 84-A, 1032-44.
- LIENAU, J., SCHELL, H., DUDA, G. N., SEEBECK, P., MUCHOW, S. & BAIL, H. J. (2005) Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability. J Orthop Res, 23, 639-45.
- LIENAU, J., SCHELL, H., EPARI, D. R., SCHUTZE, N., JAKOB, F., DUDA, G. N. & BAIL, H. J. (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.
- LIENAU, J., SCHMIDT-BLEEK, K., PETERS, A., HASCHKE, F., DUDA, G. N., PERKA, C., BAIL, H. J., SCHUTZE, N., JAKOB, F. & SCHELL, H. (2009) Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. J Orthop Res.
- LIENAU, J., SCHMIDT-BLEEK, K., PETERS, A., WEBER, H., BAIL, H. J., DUDA, G. N., PERKA, C. & SCHELL, H. Insight into the molecular pathophysiology of delayed bone healing in a sheep model. Tissue Eng Part A, 16, 191-9.

- LINSENMAYER, T. F., EAVEY, R. D. & SCHMID, T. M. (1988) Type X collagen: a hypertrophic cartilage-specific molecule. Pathol Immunopathol Res, 7, 14-9.
- LITTENBERG, B., WEINSTEIN, L. P., MCCARREN, M., MEAD, T., SWIONTKOWSKI, M. F., RUDICEL, S. A. & HECK, D. (1998) Closed fractures of the tibial shaft. A metaanalysis of three methods of treatment. J Bone Joint Surg Am, 80, 174-83.
- LUVALLE, P., HAYASHI, M. & OLSEN, B. R. (1989) Transcriptional regulation of type X collagen during chondrocyte maturation. Dev Biol, 133, 613-6.
- MAKINO, T., HAK, D. J., HAZELWOOD, S. J., CURTISS, S. & REDDI, A. H. (2005) Prevention of atrophic nonunion development by recombinant human bone morphogenetic protein-7. J Orthop Res, 23, 632-8.
- MARK, H., BERGHOLM, J., NILSSON, A., RYDEVIK, B. & STROMBERG, L. (2003) An external fixation method and device to study fracture healing in rats. Acta Orthop Scand, 74, 476-82.
- MARK, H., NILSSON, A., NANNMARK, U. & RYDEVIK, B. (2004) Effects of fracture fixation stability on ossification in healing fractures. Clin Orthop Relat Res, 245-50.
- MARKEL, M. D. & CHAO, E. Y. (1993) Noninvasive monitoring techniques for quantitative description of callus mineral content and mechanical properties. Clin Orthop Relat Res, 37-45.
- MARSH, D. (1998) Concepts of fracture union, delayed union, and nonunion. Clin Orthop Relat Res, S22-30.
- MARSH, D. R. & LI, G. (1999) The biology of fracture healing: optimising outcome. Br Med Bull, 55, 856-69.
- MASSAGUE, J., ATTISANO, L. & WRANA, J. L. (1994) The TGF-beta family and its composite receptors. Trends Cell Biol, 4, 172-8.
- MAYR, E. (2002) [Tibial fractures]. Chirurg, 73, 642-61; quiz 662-3.
- MAYR, E., BRAUN, W. & RUTER, A. (1994) [Can unreamed tibial nailing replace external fixators in management of open tibial fractures?]. Chirurg, 65, 983-7.
- MCKEE, M. D. & NANCI, A. (1996) Secretion of Osteopontin by macrophages and its accumulation at tissue surfaces during wound healing in mineralized tissues: a potential requirement for macrophage adhesion and phagocytosis. Anat Rec, 245, 394-409.
- MCKIBBIN, B. (1978) The biology of fracture healing in long bones. J Bone Joint Surg Br, 60-B, 150-62.
- MILES, R. R., TURNER, C. H., SANTERRE, R., TU, Y., MCCLELLAND, P., ARGOT, J., DEHOFF, B. S., MUNDY, C. W., ROSTECK, P. R., JR., BIDWELL, J., SLUKA, J. P., HOCK, J. & ONYIA, J. E. (1998) Analysis of differential gene expression in rat tibia after an osteogenic stimulus in vivo: mechanical loading regulates osteopontin and myeloperoxidase. J Cell Biochem, 68, 355-65.
- MINGUELL, J. J., ERICES, A. & CONGET, P. (2001) Mesenchymal stem cells. Exp Biol Med (Maywood), 226, 507-20. Order.
- MORINOBU, M., ISHIJIMA, M., RITTLING, S. R., TSUJI, K., YAMAMOTO, H., NIFUJI, A., DENHARDT, D. T. & NODA, M. (2003) Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in the calvarial suture in vivo. J Bone Miner Res, 18, 1706-15.

- MULLER, M. E. & PERREN, S. M. (1972) [Callus and primary bone healing]. Monatsschr Unfallheilkd Versicher Versorg Verkehrsmed, 75, 442-54.
- NAKASE, T., NOMURA, S., YOSHIKAWA, H., HASHIMOTO, J., HIROTA, S., KITAMURA, Y., OIKAWA, S., ONO, K. & TAKAOKA, K. (1994a) Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. J Bone Miner Res, 9, 651-9.
- NAKASE, T., TAKAOKA, K., HIRAKAWA, K., HIROTA, S., TAKEMURA, T., ONOUE, H., TAKEBAYASHI, K., KITAMURA, Y. & NOMURA, S. (1994b) Alterations in the expression of osteonectin, osteopontin and osteocalcin mRNAs during the development of skeletal tissues in vivo. Bone Miner, 26, 109-22.
- NIIKURA, T., HAK, D. J. & REDDI, A. H. (2006) Global gene profiling reveals a downregulation of BMP gene expression in experimental atrophic nonunions compared to standard healing fractures. J Orthop Res, 24, 1463-71.
- NOWOTARSKI, P. J., TUREN, C. H., BRUMBACK, R. J. & SCARBORO, J. M. (2000) Conversion of external fixation to intramedullary nailing for fractures of the shaft of the femur in multiply injured patients. J Bone Joint Surg Am, 82, 781-8.
- NUNAMAKER, D. M. (1998) Experimental models of fracture repair. Clin Orthop Relat Res, S56-65.
- ONISHI, T., ISHIDOU, Y., NAGAMINE, T., YONE, K., IMAMURA, T., KATO, M., SAMPATH, T. K., TEN DIJKE, P. & SAKOU, T. (1998) Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenetic protein (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats. Bone, 22, 605-12.
- ORTEGA, N., BEHONICK, D. J., COLNOT, C., COOPER, D. N. & WERB, Z. (2005) Galectin-3 is a downstream regulator of matrix metalloproteinase-9 function during endochondral bone formation. Mol Biol Cell, 16, 3028-39.
- OZAKI, A., TSUNODA, M., KINOSHITA, S. & SAURA, R. (2000) Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. J Orthop Sci, 5, 64-70.
- PAGE, M. & ASHHURST, D. E. (1987) The effects of mechanical stability on the macromolecules of the connective tissue matrices produced during fracture healing. II. The glycosaminoglycans. Histochem J, 19, 39-61.
- PARK, S. H., O'CONNOR, K., MCKELLOP, H. & SARMIENTO, A. (1998) The influence of active shear or compressive motion on fracture-healing. J Bone Joint Surg Am, 80, 868-78.
- PARK, S. H., SILVA, M., BAHK, W. J., MCKELLOP, H. & LIEBERMAN, J. R. (2002) Effect of repeated irrigation and debridement on fracture healing in an animal model. J Orthop Res, 20, 1197-204. Order.
- PHIEFFER, L. S. & GOULET, J. A. (2006) Delayed unions of the tibia. Instr Course Lect, 55, 389-401.
- PROBST, A., JANSEN, H., LADAS, A. & SPIEGEL, H. U. (1999) Callus formation and fixation rigidity: a fracture model in rats. J Orthop Res, 17, 256-60.
- PROBST, A. & SPIEGEL, H. U. (1997) Cellular mechanisms of bone repair. J Invest Surg, 10, 77-86.
- RADASCH, R. M. (1999) Biomechanics of bone and fractures. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 29, 1045-82, v-vi.

- RAGGATT, L. J. & PARTRIDGE, N. C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. J Biol Chem, 285, 25103-8.
- REED, A. A., JOYNER, C. J., BROWNLOW, H. C. & SIMPSON, A. H. (2002) Human atrophic fracture non-unions are not avascular. J Orthop Res, 20, 593-9.
- REED, A. A., JOYNER, C. J., ISEFUKU, S., BROWNLOW, H. C. & SIMPSON, A. H. (2003) Vascularity in a new model of atrophic nonunion. J Bone Joint Surg Br, 85, 604-10.
- REMEDIOS, A. (1999) Bone and bone healing. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 29, 1029-44, v.
- RICE, D. P., KIM, H. J. & THESLEFF, I. (1997) Detection of gelatinase B expression reveals osteoclastic bone resorption as a feature of early calvarial bone development. Bone, 21, 479-86.
- RITTLING, S. R. & DENHARDT, D. T. (1999) Osteopontin function in pathology: lessons from osteopontin-deficient mice. Exp Nephrol, 7, 103-13.
- RITTLING, S. R., MATSUMOTO, H. N., MCKEE, M. D., NANCI, A., AN, X. R., NOVICK, K. E., KOWALSKI, A. J., NODA, M. & DENHARDT, D. T. (1998) Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. J Bone Miner Res, 13, 1101-11.
- RITZEL, H., AMLING, M., VOGEL, M., POSL, M., HAHN, M., WERNER, M. & DELLING, G. (1996) [Spongiosa structure and polyostotic heterogeneity in osteoporosis. Mechanism of bone transformation, morphology, clinical significance]. Pathologe, 17, 68-77.
- ROACH, H. I., SHEARER, J. R. & ARCHER, C. (1989) The choice of an experimental model. A guide for research workers. J Bone Joint Surg Br, 71, 549-53.
- ROBEY, P. G., YOUNG, M. F., FLANDERS, K. C., ROCHE, N. S., KONDAIAH, P., REDDI, A. H., TERMINE, J. D., SPORN, M. B. & ROBERTS, A. B. (1987) Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type beta (TGF-beta) in vitro. J Cell Biol, 105, 457-63.
- ROGERS, A. & EASTELL, R. (2005) Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kappaB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. J Clin Endocrinol Metab, 90, 6323-31.
- ROSIER, R. N., O'KEEFE, R. J. & HICKS, D. G. (1998) The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. Clin Orthop, S294-300.
- RUNDLE, C. H., WANG, H., YU, H., CHADWICK, R. B., DAVIS, E. I., WERGEDAL, J. E., LAU, K. H., MOHAN, S., RYABY, J. T. & BAYLINK, D. J. (2006) Microarray analysis of gene expression during the inflammation and endochondral bone formation stages of rat femur fracture repair. Bone, 38, 521-9.
- RUSSEL, T. (1992) General Principles of fracture treatment. IN CRENSHAW, A. (Ed.) Campbell's Operative Orthopaedics. 8th ed. St. Louis, Mosby.
- RUTER, A. & MAYR, E. (1999) [Pseudarthrosis]. Chirurg, 70, 1239-45.
- SAKOU, T. (1998) Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. Bone, 22, 591-603.
- SANCHEZ, M., ANITUA, E., CUGAT, R., AZOFRA, J., GUADILLA, J., SEIJAS, R. & ANDIA, I. (2009) Nonunions treated with autologous preparation rich in growth factors. J Orthop Trauma, 23, 52-9.

- SANDBERG, M., ARO, H., MULTIMAKI, P., AHO, H. & VUORIO, E. (1989) In situ localization of collagen production by chondrocytes and osteoblasts in fracture callus. J Bone Joint Surg Am, 71, 69-77.
- SANDBERG, M. M., ARO, H. T. & VUORIO, E. I. (1993) Gene expression during bone repair. Clin Orthop Relat Res, 292-312.
- SATO, M., YASUI, N., NAKASE, T., KAWAHATA, H., SUGIMOTO, M., HIROTA, S., KITAMURA, Y., NOMURA, S. & OCHI, T. (1998) Expression of bone matrix proteins mRNA during distraction osteogenesis. J Bone Miner Res, 13, 1221-31.
- SCAMMELL, B. E. & ROACH, H. I. (1996) A new role for the chondrocyte in fracture repair: endochondral ossification includes direct bone formation by former chondrocytes. J Bone Miner Res, 11, 737-45.
- SCHANDELMAIER, P., KRETTEK, C., RUDOLF, J. & TSCHERNE, H. (1995) Outcome of tibial shaft fractures with severe soft tissue injury treated by unreamed nailing versus external fixation. J Trauma, 39, 707-11.
- SCHELL, H., EPARI, D. R., KASSI, J. P., BRAGULLA, H., BAIL, H. J. & DUDA, G. N. (2005) The course of bone healing is influenced by the initial shear fixation stability. J Orthop Res, 23, 1022-8.
- SCHELL, H., THOMPSON, M. S., BAIL, H. J., HOFFMANN, J. E., SCHILL, A., DUDA, G. N. & LIENAU, J. (2008) Mechanical induction of critically delayed bone healing in sheep: radiological and biomechanical results. J Biomech, 41, 3066-72.
- SCHMIDMAIER, G., WILDEMANN, B., GABELEIN, T., HEEGER, J., KANDZIORA, F., HAAS, N. P. & RASCHKE, M. (2003a) Synergistic effect of IGF-I and TGF-beta1 on fracture healing in rats: single versus combined application of IGF-I and TGF-beta1. Acta Orthop Scand, 74, 604-10.
- SCHMIDMAIER, G., WILDEMANN, B., LUBBERSTEDT, M., HAAS, N. P. & RASCHKE, M. (2003b) IGF-I and TGF-beta 1 incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating stimulates osteoblast differentiation and collagen-1 production but reduces osteoblast proliferation in cell culture. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 65, 157-62.
- SCHMITT, J. M., HWANG, K., WINN, S. R. & HOLLINGER, J. O. (1999) Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. J Orthop Res, 17, 269-78.
- SCHWEIBERER, L., BAUMGART, R. & DEILER, S. (1999) [The biological reaction in atrophic and hypertrophic pseudarthrosis of diaphysis of long bone. Causes and forms of appearance]. Chirurg, 70, 1193-201.
- SEYEDIN, S. M., THOMPSON, A. Y., BENTZ, H., ROSEN, D. M., MCPHERSON, J. M., CONTI, A., SIEGEL, N. R., GALLUPPI, G. R. & PIEZ, K. A. (1986) Cartilageinducing factor-A. Apparent identity to transforming growth factor-beta. J Biol Chem, 261, 5693-5.
- SHAPIRO, F. (1988) Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. J Bone Joint Surg Am, 70, 1067-81.
- SHEN, G. (2005) The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. Orthod Craniofac Res, 8, 11-7.
- SIMONET, W. S., LACEY, D. L., DUNSTAN, C. R., KELLEY, M., CHANG, M. S., LUTHY, R., NGUYEN, H. Q., WOODEN, S., BENNETT, L., BOONE, T., SHIMAMOTO, G., DEROSE, M., ELLIOTT, R., COLOMBERO, A., TAN, H. L., TRAIL, G., SULLIVAN,

J., DAVY, E., BUCAY, N., RENSHAW-GEGG, L., HUGHES, T. M., HILL, D., PATTISON, W., CAMPBELL, P., SANDER, S., VAN, G., TARPLEY, J., DERBY, P., LEE, R. & BOYLE, W. J. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell, 89, 309-19.

- SIMPSON, D. M. & ROSS, R. (1972) The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum. J Clin Invest, 51, 2009-23.
- SODEK, J., CHEN, J., NAGATA, T., KASUGAI, S., TODESCAN, R., JR., LI, I. W. & KIM, R. H. (1995) Regulation of osteopontin expression in osteoblasts. Ann N Y Acad Sci, 760, 223-41.
- SODEK, J., GANSS, B. & MCKEE, M. D. (2000) Osteopontin. Crit Rev Oral Biol Med, 11, 279-303.
- STAHLE-BACKDAHL, M., SANDSTEDT, B., BRUCE, K., LINDAHL, A., JIMENEZ, M. G., VEGA, J. A. & LOPEZ-OTIN, C. (1997) Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. Lab Invest, 76, 717-28.
- STICKENS, D., BEHONICK, D. J., ORTEGA, N., HEYER, B., HARTENSTEIN, B., YU, Y., FOSANG, A. J., SCHORPP-KISTNER, M., ANGEL, P. & WERB, Z. (2004) Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. Development, 131, 5883-95.
- TONNA, E. A. & CRONKITE, E. P. (1968) Skeletal cell labeling following continuous infusion with tritiated thymidine. Lab Invest, 19, 510-5.
- UCHIDA, M., YAMATO, H., NAGAI, Y., YAMAGIWA, H., HAYAMI, T., TOKUNAGA, K., ENDO, N., SUZUKI, H., OBARA, K., FUJIEDA, A., MURAYAMA, H. & FUKUMOTO, S. (2001) Parathyroid hormone increases the expression level of matrix metalloproteinase-13 in vivo. J Bone Miner Metab, 19, 207-12.
- UTVAG, S. E., GRUNDNES, O. & REIKERAOS, O. (1996) Effects of periosteal stripping on healing of segmental fractures in rats. J Orthop Trauma, 10, 279-84.
- UTVAG, S. E., GRUNDNES, O. & REIKERAS, O. (1998) Effects of lesion between bone, periosteum and muscle on fracture healing in rats. Acta Orthop Scand, 69, 177-80.
- VAN DER REST, M. & GARRONE, R. (1991) Collagen family of proteins. Faseb J, 5, 2814-23.
- VIGUET-CARRIN, S., GARNERO, P. & DELMAS, P. D. (2006) The role of collagen in bone strength. Osteoporos Int, 17, 319-36.
- *VOLPON, J. B. (1994) Nonunion using a canine model. Arch Orthop Trauma Surg, 113, 312-7.*
- VU, T. H., SHIPLEY, J. M., BERGERS, G., BERGER, J. E., HELMS, J. A., HANAHAN, D., SHAPIRO, S. D., SENIOR, R. M. & WERB, Z. (1998) MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. Cell, 93, 411-22.
- WAHL, S. M., WONG, H. & MCCARTNEY-FRANCIS, N. (1989) Role of growth factors in inflammation and repair. J Cell Biochem, 40, 193-9.
- WAN, D. C., POMERANTZ, J. H., BRUNET, L. J., KIM, J. B., CHOU, Y. F., WU, B. M., HARLAND, R., BLAU, H. M. & LONGAKER, M. T. (2007) Noggin suppression enhances in vitro osteogenesis and accelerates in vivo bone formation. J Biol Chem, 282, 26450-9.
- WANG, J. W. & WENG, L. H. (2003) Treatment of distal femoral nonunion with internal fixation, cortical allograft struts, and autogenous bone-grafting. J Bone Joint Surg Am, 85-A, 436-40.
- WEBB, J., HERLING, G., GARDNER, T., KENWRIGHT, J. & SIMPSON, A. H. (1996) Manual assessment of fracture stiffness. Injury, 27, 319-20.
- WEKSLER, B. B. (1988) Roles for human platelets in inflammation. Prog Clin Biol Res, 283, 611-38.
- WILLENEGGER, H., PERREN, S. M. & SCHENK, R. (1971) [Primary and secondary healing of bone fractures]. Chirurg, 42, 241-52.
- WOLF, S., JANOUSEK, A., PFEIL, J., VEITH, W., HAAS, F., DUDA, G. & CLAES, L. (1998) The effects of external mechanical stimulation on the healing of diaphyseal osteotomies fixed by flexible external fixation. Clin Biomech (Bristol, Avon), 13, 359-364.
- WU, J. J., LARK, M. W., CHUN, L. E. & EYRE, D. R. (1991) Sites of stromelysin cleavage in collagen types II, IX, X, and XI of cartilage. J Biol Chem, 266, 5625-8.
- YAMAGIWA, H., TOKUNAGA, K., HAYAMI, T., HATANO, H., UCHIDA, M., ENDO, N. & TAKAHASHI, H. E. (1999) Expression of metalloproteinase-13 (Collagenase-3) is induced during fracture healing in mice. Bone, 25, 197-203.
- YAMAUCHI, M., KATZ, E. P., OTSUBO, K., TERAOKA, K. & MECHANIC, G. L. (1989) Cross-linking and stereospecific structure of collagen in mineralized and nonmineralized skeletal tissues. Connect Tissue Res, 21, 159-67; discussion 168-9.
- YAMAZAKI, M., NAKAJIMA, F., OGASAWARA, A., MORIYA, H., MAJESKA, R. J. & EINHORN, T. A. (1999) Spatial and temporal distribution of CD44 and osteopontin in fracture callus. J Bone Joint Surg Br, 81, 508-15.
- YASUDA, H., SHIMA, N., NAKAGAWA, N., MOCHIZUKI, S. I., YANO, K., FUJISE, N., SATO, Y., GOTO, M., YAMAGUCHI, K., KURIYAMA, M., KANNO, T., MURAKAMI, A., TSUDA, E., MORINAGA, T. & HIGASHIO, K. (1998a) Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. Endocrinology, 139, 1329-37.
- YASUDA, H., SHIMA, N., NAKAGAWA, N., YAMAGUCHI, K., KINOSAKI, M., MOCHIZUKI, S., TOMOYASU, A., YANO, K., GOTO, M., MURAKAMI, A., TSUDA, E., MORINAGA, T., HIGASHIO, K., UDAGAWA, N., TAKAHASHI, N. & SUDA, T. (1998b) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 3597-602.
- YASUI, N., SATO, M., OCHI, T., KIMURA, T., KAWAHATA, H., KITAMURA, Y. & NOMURA, S. (1997) Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. J Bone Joint Surg Br, 79, 824-30.
- YOO, J. U. & JOHNSTONE, B. (1998) The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair. Clin Orthop, S73-81. Order.
- YOSHIMURA, Y., NOMURA, S., KAWASAKI, S., TSUTSUMIMOTO, T., SHIMIZU, T. & TAKAOKA, K. (2001a) Colocalization of noggin and bone morphogenetic protein-4 during fracture healing. J Bone Miner Res, 16, 876-84.
- YOSHIMURA, Y., NOMURA, S., KAWASAKI, S., TSUTSUMIMOTO, T., SHIMIZU, T. & TAKAOKA, K. (2001b) Colocalization of noggin and bone morphogenetic protein-4

during fracture healing. J Bone Miner Res, 16, 876-84.

- YOSHITAKE, H., RITTLING, S. R., DENHARDT, D. T. & NODA, M. (1999) Osteopontindeficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 8156-60.
- ZIJLSTRA, A., AIMES, R. T., ZHU, D., REGAZZONI, K., KUPRIYANOVA, T., SEANDEL, M., DERYUGINA, E. I. & QUIGLEY, J. P. (2004) Collagenolysis-dependent angiogenesis mediated by matrix metalloproteinase-13 (collagenase-3). J Biol Chem, 279, 27633-45.
- ZIMMERMANN, G., MOGHADDAM, A., REUMANN, M., WANGLER, B., BREIER, L., WENTZENSEN, A., HENLE, P. & WEISS, S. (2007) [TGF-beta1 as a pathophysiological factor in fracture healing.]. Unfallchirurg, 110, 130-136.

# 8. Anhang

### 8.1. Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich insbesondere bedanken bei

#### PD Dr. med. Hermann Josef Bail

für die Überlassung des Themas für die vorliegende Promotionsarbeit

#### Prof. Dr.-Ing. Georg Duda

für die Organisation und Leitung des gesamten wissenschaftlichen Projektes im Forschungsbereich

#### Dr. rer. nat. Katharina Schmidt-Bleek und Dr. med. vet. Hanna Schell

für die Unterstützung bei der operativen Durchführung der Versuche sowie der konstruktiven Kritik und Anregungen beim Verfassen der Dissertation

Den Mitarbeitern des Julius-Wollf-Instituts für die Unterstützung bei der Planung und Auswertung der Versuchsanordnungen.

Zum Schluss möchte ich mich besonders bei meiner Frau Bettina und meinen Eltern bedanken, die mich stets in meiner Arbeit bestärkt haben.

### 8.2. Erklärung über die eigenständig verfasste Arbeit

"Ich, Arvid Roeger, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Expressionsanalytischer Vergleich der chondrogenen und osteogenen Wachstumsfaktoren im ovinen Frakturheilungsverlauf zwischen rigidem und kritischem Fixateur externe" 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.

Berlin, den 07.02.2012

Arvid Roeger

# 8.3. Lebenslauf

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