
**DER EFFEKT VON BMP-2 AUF
DIE OSTEOGENESE UND
ANGIOGENESE NACH
OSTEOTOMIE AN DER TIBIA**

**EINE EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNG
AM RATTENMODELL**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus- Liebig- Universität Gießen**

**vorgelegt von Petra Gölle
aus Laubach
Gießen 2015**

**Aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
und dem Labor für Experimentelle Unfallchirurgie
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. C. Heiß

Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. biol. hom. V. Alt

Gutachter: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Tag der Disputation: 04.11.2015

WIDMUNGEN

An meine Familie, die immer für mich da war.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1 Frakturheilung	1
1.1.1 Primäre Knochenheilung.....	1
1.1.2 Sekundäre Knochenheilung.....	2
1.1.3 Zeitlicher Ablauf der sekundären Frakturheilung bei der Ratte	6
1.1.4 Vaskularisationsvorgänge bei der Frakturheilung	7
1.2 Angiogenese	7
1.2.1 Vaskulogenese	8
1.2.2 Angiogenese.....	9
1.2.3 Arteriogenese	10
1.2.4 Angiogeneseregulatoren.....	10
1.2.5 Vascular endothelial growth factor (VEGF).....	13
1.3 Knochenwachstumsfaktoren	14
1.3.1 TGF- β -Superfamilie.....	15
1.3.2 Bone morphogenetic protein	16
1.3.3 Bone morphogenetic protein 7	18
1.3.4 Bone morphogenetic protein-2	19
1.4 Fragestellung der Arbeit	22
2. Material und Methoden	23
2.1 Studiendesign	23
2.2 Operative Eingriffe am Tier	24
2.2.1 Tierart	24
2.2.2 Tierhaltung.....	24
2.2.3 BMP-2 und absorbierbarer Kollagenschwamm.....	24
2.2.4 Vorbereitung und Narkose	25
2.2.5 OP-Technik.....	26
2.2.6 Postoperative Versorgung	28
2.3 Versuchsauswertung	28
2.3.1 Volumencomputertomografie (VCT).....	28
2.3.1.1 Behandlung der Tiere für die VCT.....	32
2.3.1.2 Radiologische Einteilungen der Frakturheilung	33

2.3.2 Tötung und Probenentnahme	38
2.3.3 Probenaufbereitung	38
2.3.3.1 Herstellung von 4 % Paraformaldehyd.....	38
2.3.3.2 Beschichtung der Objektträger mit APTEX	39
2.3.3.3 Paraffineinbettung	39
2.3.3.4 Paraffinschnitt	39
2.3.3.5 Färbungen	40
2.3.3.5.1 Hämalaun-Eosin-Färbung	40
2.3.3.5.2 Herstellung von Toluidinblau O	40
2.3.3.5.3 Toluidin-Färbung	40
2.3.4 Histomorphometrie	41
2.3.5 Übersichtshistologie	43
2.3.6 Blutgefäßneubildung	45
3. Auswertung	46
3.1 Nativ- und Volumenscans	46
3.1.1 Vergleich zum Zeitpunkt Tag 3, Tag 14 und Tag 42.....	46
3.1.2 Vergleich des zeitlichen Heilungsverlaufs	47
3.2 Perfusionsscans	49
3.3 Histomorphometrie der Gewebszusammensetzung	51
3.3.1 Prozentuale Gewebszusammensetzung	51
3.3.2 Kallusflächenbestimmung	55
3.4 Histologie der Frakturheilung	56
3.4.1 Frakturzone	56
3.4.2 Granulationszone	59
3.4.3 Proliferationszone	63
3.4.4 Kollagenvlies	67
3.5 Semiquantitative Bestimmung der Blutgefäßneubildung	70
3.5.1 Vergleich zum Zeitpunkt Tag 3, Tag 14 und Tag 42.....	70
3.5.2 Vergleich des zeitlichen Verlaufs.....	71
4. Diskussion	73
4.1 Verwendetes Tiermodell	73
4.2 Korrelation von Angiogenese und Frakturheilung	73

4.3 Der Effekt von BMP-2 auf die Frakturheilung und Angiogenese	77
4.4 Einsatz der VCT zur Bestimmung der Blutgefäßneubildung	82
5. Zusammenfassung	84
6. Abstract	85
7. Abkürzungsverzeichnis	86
8. Tabellenverzeichnis	88
9. Abbildungsverzeichnis	89
10. Literaturverzeichnis	91
11. Verwendete Materialien	101
12. Selbstständigkeitserklärung	103
13. Danksagung	104
14. Lebenslauf	105

1. Einleitung

1.1 Frakturheilung

Die Frakturheilung ist ein äußerst bemerkenswerter und komplexer Prozess, der von vielen unterschiedlichen Wachstumsfaktoren und Zellpopulationen bestimmt wird. Die Zellen befinden sich hauptsächlich an drei Lokalisationen: dem Periost, dem Endost und den Havers-Kanälen. Durch das Zusammenspiel von Zellen und bestimmten Faktoren ist der Knochen als einziges Gewebe befähigt, sich nach einer Strukturverletzung fast vollständig zu regenerieren (McKibbin, 1978). Diese Regeneration kann jedoch nur gelingen, wenn die Voraussetzungen für eine ungestörte Frakturheilung gegeben sind. Dazu gehören eine gute Perfusion, Stabilisation der Fraktur und der Knochenkontakt zueinander.

Kommt es zu einer Fraktur, werden die Gefäße im Frakturspalt zerstört, die periostale Blutversorgung erlischt und die Gefäße im Knocheninneren thrombosieren. Es folgen Nekrosen, entzündliche Prozesse durch den Untergang der Knochenzellen und Frakturhämatome (Barnes et al., 1999). Die Heilung erfolgt über das Peri- und Endost sowie die Havers-Kanäle. Von ihnen aus wachsen Blutgefäße ein, Fibroblasten siedeln sich an und osteogene Zellen beginnen zu proliferieren. Man unterscheidet eine primäre oder direkte Knochenheilung von einer sekundären oder indirekten Knochenheilung. In Abhängigkeit von der Fixation der Fraktur findet eine primäre oder sekundäre Knochenheilung statt. Direkt aneinander angenäherte Frakturrenden mit einer Frakturspaltbreite unter 1 mm, rigide Stabilisation der Fraktur und suffiziente Durchblutung sind die Voraussetzungen für eine direkte Frakturheilung. Ist dies nicht der Fall, entsteht eine sekundäre Frakturheilung, die weit häufiger zu beobachten ist als die direkte Frakturheilung (Chao et al., 1998).

1.1.1 Primäre Knochenheilung

Bei der primären Knochenheilung geht der Knochen direkt ohne Vorstufen aus dem Mesenchym hervor, daher wird sie auch als direkte Ossifikation bezeichnet. Sie ist gekennzeichnet durch eine Frakturheilung ohne Knorpel bzw. ohne Kallusbildung. Wie vorher beschrieben, so sind für die direkte Ossifikation eine gute Vaskularisierung, ein

enger Knochenkontakt und entsprechende biomechanische Bedingungen mit rigider Fixation nötig, Aufgrund der benötigten Faktoren ist diese Heilungsform äußerst selten und kommt nur bei unvollständigen Frakturen oder Fissuren sowie unter Verwendung einer rigiden Fixation der Fraktur mit Kompression der Bruchenden.

Weiterhin kann man die direkte Knochenheilung in die Spalt- und Kontaktheilung untergliedern (Einhorn, 1998). Bei der Kontaktheilung liegt ein Frakturspalt von unter 200 µm vor (Hulse et al., 1991). Dieser Spaltabstand ist zu eng für Gefäß- oder Matrixeinsprossung. Daher bilden mehrkernige Makrophagen im Knocheninneren Resorptionskanäle, in die die Gefäße einsprossen können, um den Spalt mit Wachstumsfaktoren und osteogenen Zellen zu versorgen. Diese Zellen synthetisieren Osteoid, das von laminar angeordneten Osteonen umgebaut wird. Es entsteht ein Lamellenknochen, der die Fraktur von innen heraus stabilisiert.

Liegt ein Abstand von etwa 0,2 - 1 mm vor, kommt es zur Spaltheilung und die Gefäße können direkt in den Spalt einsprossen. Im Unterschied zu der Kontaktheilung entsteht primär ein Geflechtknochen, der sekundär von Osteonen durchsetzt und in einen Lamellenknochen umgewandelt wird. Die vollständige Verknöcherung und Umwandlung einer primären Knochenheilung benötigt etwa 1,5–2 Jahre (Wildemann, 2005).

1.1.2 Sekundäre Knochenheilung

Zu der weitaus häufigeren Form der Knochenheilung kommt es, wenn ein Frakturabstand von über 1 mm besteht, die lokale Blutversorgung nicht ausreichend ist oder die biomechanischen Faktoren schlechte Bedingungen aufweisen. Hierbei entsteht der Knochen aus einer Vorstufe, dem hyalinen Knorpel. Demzufolge spricht man auch von einer indirekten Knochenheilung. Der Verknöcherungsprozess der sekundären Knochenheilung benötigt ca. 2–3 Jahre und überdauert die primäre Knochenheilung um etwa 1 Jahr.

Die indirekte Frakturheilung kann beim Menschen in fünf Phasen aufgeteilt werden (Abbildung 1):

1. Frakturphase
2. Entzündungsphase
3. Granulationsphase
4. Kallushärtung, Chondrogenese und Geflechtknochen
5. Remodeling

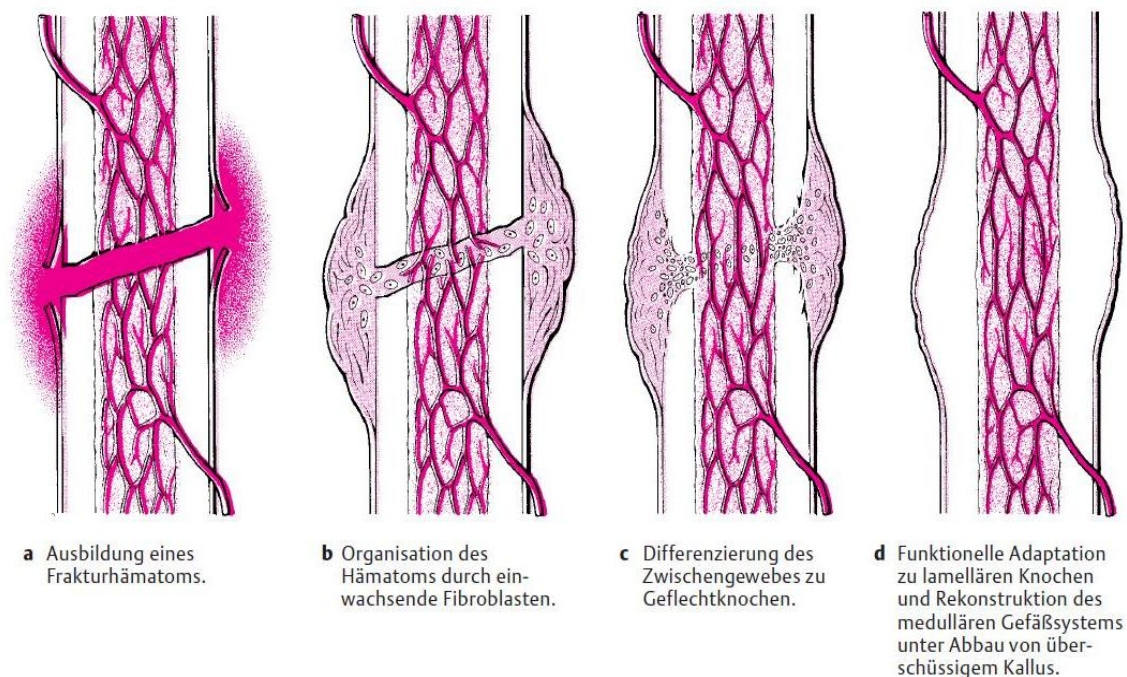


Abbildung 1: Stadien der Frakturheilung (Hennes-Bruns, 2003)

1. Frakturphase

Diese Phase beschreibt den Zeitraum vom Beginn der Gewalteinwirkung auf den Knochen mit der Zerstörung von Periost, Kortikalis, Knochenmark, Gefäßen und dem angrenzenden Weichteilgewebe bis zur Ausbildung eines Frakturhämatoms im Frakturbereich (Wildemann, 2005). Die Gewalteinwirkung führt zur Fraktur. Die Zellen der Fraktarenden werden aufgrund der Gefäßzerstörung nicht mehr ausreichend versorgt und sterben ab. Zahlreiche Zellen gelangen aus den zerstörten Gefäßen in das Frakturhämatom, dazu zählen pluripotente Stammzellen mesenchymaler Herkunft als Vorläufer der Osteoblasten, Fibroblasten und Chondroblasten sowie Granulozyten, Mastzellen und Monozyten. Die zur Phagozytose befähigten Zellen bauen das

nekrotisierte Gewebe ab und produzieren Heparin und Histamin, wodurch die Entzündungsphase eingeleitet wird (Hulse et al., 1991).

2. Entzündungsphase

Die Entzündungsphase setzt kurz nach der Knochenzerstörung ein und dauert ca. 3 Tage. Hierbei kommt es zu einer Hypervaskularisierung durch Aussprossung neuer Kapillaren und zur beginnenden Resorption des Frakturhämatoms. Die Durchblutung kann sich innerhalb von 2 Wochen bis auf das 6-fache erhöhen und sinkt im weiteren Verlauf der Frakturheilung wieder ab (Paradis et al., 1975). Die im Hämatom befindlichen Zellen sezernieren Wachstumsfaktoren und Zytokine, wodurch die Angiogenese sowie die Zell- und Gewebsdifferenzierung gefördert werden. Durch den Stimulus der Wachstumsfaktoren entwickeln sich aus den Stammzellen Gewebszellen, die mit der Produktion von Fibrin und Kollagen beginnen, bei denen es sich um wichtige Bestandteile für das Granulationsgewebe handelt.

3. Granulationsphase

2–3 Tage nach Abklingen der Entzündungsphase wird das Frakturhämatom entlang einer extrazellulären Matrix durch Granulationsgewebe ersetzt. Der Prozess dauert 4–6 Wochen und wird von den lokalen Wachstumsfaktoren BMP, TNF- β , FGF, β -Mikroglobuline, IGF und PDGF beeinflusst. Es folgt die Umwandlung in einen bindegewebigen, flexiblen Kallus (Lee et al., 1998).

Die Bildung des Kallus benötigt ebenfalls 4–6 Wochen und erfolgt von peripher nach zentral. Der Kallus stellt die erste Überbrückung der Frakturrenden dar. Die im Periost und Mesenchym befindlichen Osteoprogenitorzellen werden von den Wachstumsfaktoren und Matrixproteinen, wie Osteocalcin, veranlasst, sich in Chondrozyten oder Knochenzellen umzuwandeln (Einhorn, 1998). Mehrkernige Makrophagen fangen an, avitale Knochensubstanz abzubauen, während Osteoblasten am Periost und Endost frakturspaltfern mit der desmalen Ossifikation beginnen. Zentral im Frakturspalt zwischen den Cortices findet zunächst keine Ossifikation statt. Diese Verknöcherung findet über den enchondralen Weg statt und beginnt erst mit der Frakturstabilisierung über die desmale Ossifikation des End- und Periosts. Denn nur bei genügend Stabilität und

ausreichend Knorpelsubstanz kann eine enchondrale Ossifikation eingeleitet werden. Zu diesem Zeitpunkt liegt ein weicher Kallus durch eine desmale Ossifikation vor.

4. Kallushärtung, Chondrogenese und Geflechtknochen

Um den weichen Kallus zu stabilisieren beziehungsweise zu kalzifizieren, erfolgt die Kallushärtung. Dabei wird Hydroxylapatit von den Chondrozyten abgegeben und lagert sich zwischen den Kollagenfibrillen in die Grundsubstanz ein. Diese Chondrozyten produzieren Knorpel, der in Abhängigkeit von der Stabilität und Vaskularisierung des Gewebes in Geflechtknochen umgebaut wird. Die Knorpelzellen sind widerstandsfähiger gegenüber schlechter Vaskularisierung, Dehnungen und Bewegungen im Frakturspalt als Knochenzellen, daher führt ein Mangel an Stabilität und Durchblutung zu einer Steigerung an Knorpelgewebe im Frakturbereich und die knöcherne Frakturheilung verzögert sich (Schenk et al, 1977). Ist eine ausreichende Stabilität und Durchblutung vorhanden, kommt es zentral im Frakturspalt zu einer enchondralen, indirekten Ossifikation. Die eingesprossenen Gefäße bringen Progenitorzellen für Osteoblasten und Chondrozyten in das Gewebe. Diese Progenitorzellen bewirken eine Aktivierung und Proliferierung der Gewebszellen. Osteoblasten beginnen aus dem Knorpelgewebe den Geflechtknochen aufzubauen. Dafür benutzen sie Kapillaren als Leitstruktur und breiten sich von proximal nach distal aus (Cornell et al, 1992). Demzufolge richten sich die Trabekel des Geflechtknochens im Gegensatz zu dem Lamellenknochen unabhängig von der Hauptbelastungsrichtung aus. Diese Bauweise ist wesentlich instabiler und schwerer als die trajektorielle Bauweise des Lamellenknochens, folglich ist der Körper bestrebt, den Geflechtknochen in einen Lamellenknochen umzuwandeln.

5. Remodeling

Nach 4–5 Monaten ist ein Geflechtknochen entstanden und wird durch Remodeling in einen Lamellenknochen umgebaut. Dabei kann der physiologische Anteil des Osteoids von 2–3 % auf 50–60 % ansteigen (Schenk et al., 1977). Überschüssiges Gewebe wird abgebaut und die ursprüngliche Knochenstruktur mit einem trajektoriellem Aufbau und Markraum wird wiederhergestellt (Li et al., 2001). Dabei spielt vor allem die Tätigkeit der mehrkernigen Makrophagen und Osteoblasten sowie die biomechanische Belastung eine große Rolle. Aufgrund der unterschiedlichen Belastungen der Fraktur kommt es zu

Druckunterschieden in diesem Bereich, die zu Ladungsdifferenzen führen. An der konvexen, positiv geladenen Seite des Geflechtknochens lagern sich mehrkernige Makrophagen an und bauen Knochen ab, während sich an der konkaven, negativ geladenen Seite Osteoblasten positionieren und Knochen aufbauen. Die Frakturheilung ist abgeschlossen (Schenk et al., 1977).

1.1.3 Zeitlicher Ablauf der sekundären Frakturheilung bei der Ratte

Die zeitliche Abfolge kann folgendermaßen charakterisiert werden (Abb.2) (Hadjiarjyrou, 2002):

- Tag 0: Ein Frakturhämatom entsteht. Die Entzündungsphase wird eingeleitet.
- Tag 5: Abklingen der Entzündungsphase und Induktion der Chondrogenese sowie der desmalen Ossifikation.
- Tag 8: Beginn der enchondralen Ossifikation.
- Tag 10: Höhepunkt der Knorpelbildung.
- Tag 14: Maximum der enchondralen Ossifikation und den Beginn des Remodelings.
- Tag 84: Abschluss des Kallusremodelings mit dem Abbau des überschüssigen Kallus und dem kompletten Abbau von Knorpelmaterial innerhalb des Knochens.

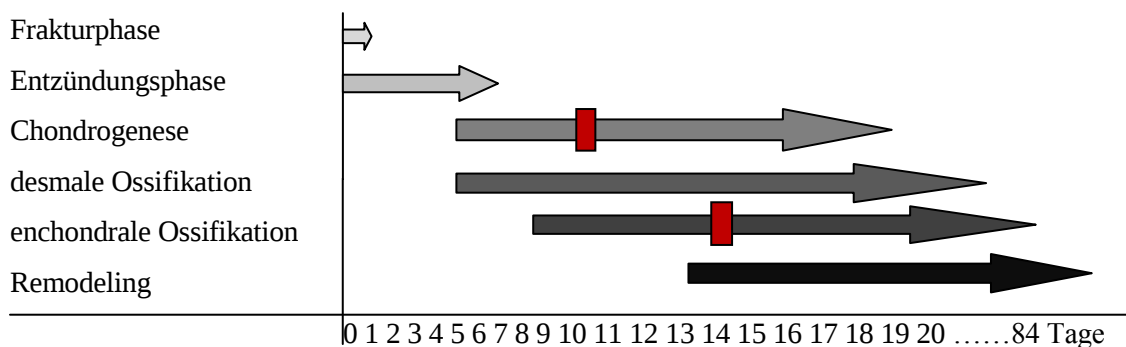


Abbildung 2: Zeitliche Abfolge der Frakturheilungsphasen bei der Ratte (Hadjiarjyrou, 2002)

1.1.4 Vaskularisationsvorgänge bei der Frakturheilung

Eine grundlegende Voraussetzung für eine ungestörte Frakturheilung ist eine gute Vaskularisierung. Kommt es zu einer Fraktur, zerreißen dabei die Gefäße (Hannouche et al., 2001). Dementsprechend verlagert sich die Kallusbildung in die Bereiche, in denen die Gefäße noch intakt sind oder sich schneller regenerieren können. Sind die endostalen und periostalen Gefäße zu stark zerstört, bleibt die Frakturheilung aus. Sklerosierungen beherrschen dann das Bild des Frakturendenumbaus (Reed et al., 2003). Kurze Zeit nach der Fraktur entwickelt sich in und um den Bruchspalt eine Entzündung. Dabei werden angiogene Substanzen ausgeschüttet (BMP, TGF- β , FGF, PDGF), welche die Angiogenese einleiten (Hannouche et al., 2001). Wichtige Faktoren für die Angiogenese sind die Scherkräfte, Spannungen und Stabilität im Frakturspalt. Bei einer instabilen Fraktur können neugebildete zarte oder auch noch bestehende Gefäße den dort herrschenden Kräften nicht standhalten und zerreißen. Für die Anzahl und Größe der Gefäße ist auch die Weite des Frakturspalts wichtig. Enge Frakturspalten besitzen größere und dichter angeordnete Gefäße (Claes et al., 2003).

1.2 Angiogenese

3 Prozesse sind für die Gefäßentwicklung verantwortlich: die Vaskulogenese, die Angiogenese und die Arteriogenese (Abbildung 3).

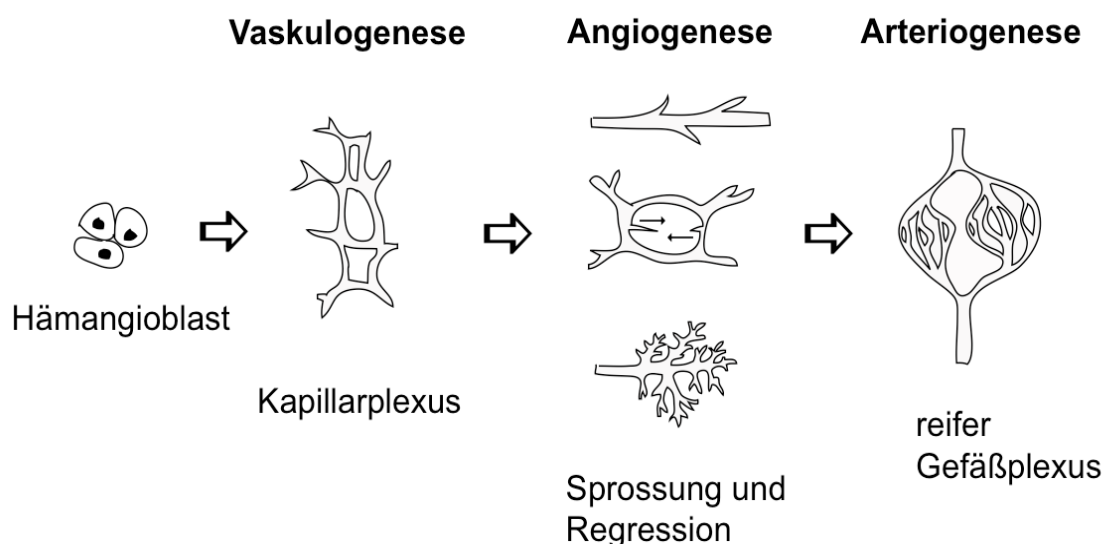


Abbildung 3: Stadien der Gefäßbildung (Risau, 1997)

1.2.1 Vaskulogenese

Die Vaskulogenese definiert die De-novo-Entstehung eines primären Gefäßkomplexes im avaskulären Bereich aus endothelialen Vorläuferzellen des Knochenmarks (Risau, 1995). Dazu zählen die Hämangioblasten aus denen sich einerseits hämatopoetische Stammzellen zur Blutbildung und andererseits Angioblasten differenzieren (Risau, 1997). Die Angioblasten sind zu Gefäßbildung befähigt. Sie werden von Zytokinen, wie zum Beispiel dem VEGF angelockt, das Knochenmark zu verlassen und über die Blutgefäße, zu dem Ausschüttungsort der Botenstoffe zu immigrieren. Dort entwickeln sie sich zu Endothelzellen, um die Vaskularisierung zu starten (Wahlberg, 2003). Während die Vaskulogenese in der Embryologie eine große Rolle spielt, kommt die Wirkung der Angiogenese eher bei der Wundheilung, Entzündung, Tumorgenese und Gelbkörperreifung zum Tragen.

1.2.2 Angiogenese

Die Angiogenese beschreibt den Begriff der Gefäßneubildung aus bestehenden Gefäßen. Dabei unterscheidet man die Gefäßneubildung durch Sprossung oder Teilung. Bei der Sprossung proliferieren die Endothelzellen und bilden kleine Auswüchse, die sich zu Röhren formen. Unter der Gefäßteilung bildet sich in dem Gefäßlumen eine 2. Wand und trennt die beiden Lumen voneinander (Cooke, 2003).

Der Mechanismus der Angiogenese wird in 2 Phasen aufgeteilt, die Aktivierungsphase und die Resolutionsphase (Abbildung 4). Ausgelöst wird die Aktivierungsphase beispielsweise durch Hypoxie oder Ischämie (Takahashi, 1999). Dies führt zur Ausschüttung von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Stickstoffmonoxyd (Cooke, 2003). Dadurch wird die Permeabilität der Zellen gesteigert, die extrazelluläre Matrix (EZM) durch Metalloproteasen (MMP) abgebaut und die Basalmembran (BM) aufgelöst. Dies ermöglicht es den Endothelzellen (EC) in das Gefäß einzuwandern. Die Zellen proliferieren und bilden an den Gefäßwänden Komplexe, aus denen sich später die neuen Gefäße entwickeln (Risau, 1995).

Die Resolutionsphase beginnt mit dem Ende der Endothelzellproliferation und der Migration. Die Endothelzellen schütten „platelet derived growth factor“ (PDGF) aus, um Perizyten zu aktivieren. Die Basalmembran wird wieder aufgebaut, Perizyten und glatte Muskelzellen (SMC) lagern sich an die Gefäße, um sie zu stabilisieren.

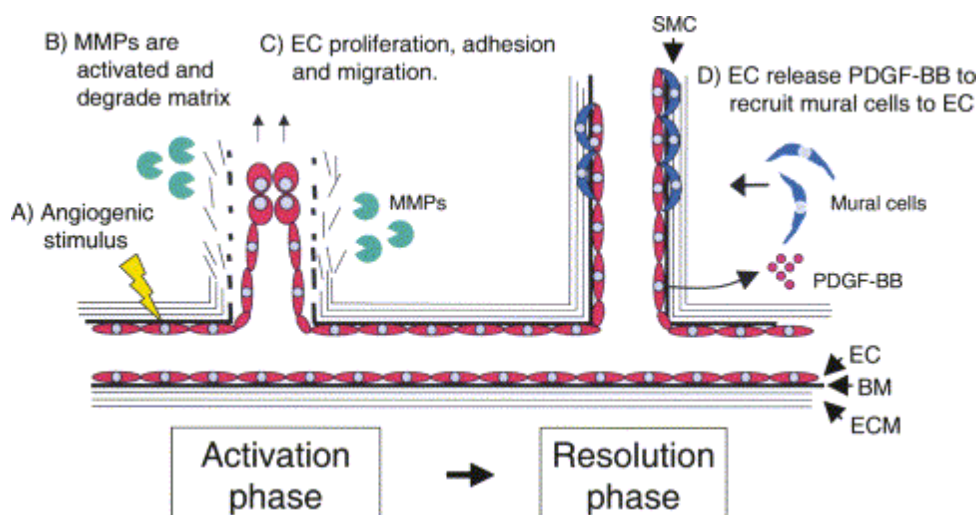


Abbildung 4: Aktivierungs- und Reifungsphase der Angiogenese (Gourmans et al., 2009)

1.2.3 Arteriogenese

Unter Arteriogenese versteht man die Proliferation von kleinen Gefäßen zu sehr viel größeren wandstarken Arterien. Dabei können sie ihren Gefäßdurchmesser auf das 20-fache steigern. Als Auslöser ist eine Veränderung der Stoffwechsellage, z.B. eine Stenose, zu nennen. Bei einer Stenose weicht das Blut auf andere Gefäßwege aus. Die Verstärkung des Blutflusses löst vermehrte Scherkräfte aus, die zur Aktivierung von Endothelzellen und zur Ausschüttung von Wachstumsfaktoren führen (MCP-1, GM-CSF, FGF und TNF) (Folkman, 1995).

Makrophagen werden angelockt und Endothelzellen proliferieren. Durch Matrix-Metalloproteasen wird die Tunica externa aufgelöst, sodass und Platz für die Gefäßverstärkung entsteht. Nach dem Remodeling lagern sich auch hier Perizyten und glatte Muskelzellen an, um das Gefäß zu verstärken. Dieser Prozess, den man auch als biologischen Bypass bezeichnet, ist vor allem bei Patienten mit einer chronischen Gefäßerkrankung stark ausgeprägt (Wahlberg, 2003).

1.2.4 Angiogeneseregulatoren

Die Angiogenese unterliegt einigen Regulationssubstanzen. Zum einen sind hier die proteolytisch wirkenden Enzyme zu nennen, z.B. die Matrix-Metalloproteasen und Serinproteasen. Sie sind für die Auflösung der Extrazellulärmatrix verantwortlich. Zum anderen spielt die Extrazellulärmatrix und deren pH-Wert eine wichtige Rolle. Mittels pH-Wert-Änderung ist die Matrix in der Lage die Angiogeneserate zu verändern, indem sie mit Angiogenesefaktoren und Endothelzellen agiert. Das Hauptaugenmerk der Angiogeneseregulation liegt aber bei den Angiogenesefaktoren. Sie werden in pro- und antiangiogen unterteilt. Zu den proangiogenen Faktoren zählen unter anderen die VEGF-Familie, der „transforming growth factor- β “ (TGF- β), der Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF), der „fibroblast growth factor“ (FGF), der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Angiopoetin und der „platelet-derived growth factor“ (PDGF). Bei den antiangiogenen Faktoren ist das Angiostatin, Endostatin, Vasostatin, Thrombospondin 1, aber auch der TGF- β zu erwähnen (Ferrara et al., 1996).

Aktivierende Wachstumsfaktoren Angiogene Faktoren	Abkürzung	Wirkung
VEGF und Homologe	VEGF, VEGF-C	• Stimulation der Angiogenese und Permeabilität. • Stimulation der Lymphangiogenese.
Placental growth factor	PlGF	• Stimulation der Angiogenese und Permeabilität. • Verstärkung des postnatalen Effekts von VEGF unter pathologischen Bedingungen. • Rekrutierung von Monozyten (Luttun, 2002).
Angiopoetin-1	Ang-1	• Stabilisierung der Blutgefäße vorm Aussprossen. • Minderung der Permeabilität (Carmeliet, 2003).
Angiopoetin-2	Ang-2	• Aktivierung oder Blockierung der Tie-2 Rezeptoren je nach Zelltyp. • Antagonist von Angiopoetin-1. • Lösung der endo-periendothelialen Kontakte. • Degradation der extrazellulären Matrix (Carmeliet, 2003). • Induktion in Abwesenheit der angiogenen Faktoren die Regression von Blutgefäßen (Maisonpierre, 1997).
Tie-2- Rezeptor		• Bindung von Angiopoetin-1 und -2. • Stabilisierung der Blutgefäße vor den Aussprossen. • Minderung der Permeabilität.
Transforming growth factor-β1	TGF-β1	• Stabilisierung der Blutgefäße durch Stimulation der Produktion von extrazellulärer Matrix. • Förderung der Kollateralbildung (Gourmans, 2009).
Basic Fibroblast growth factor	bFGF	• Stimulation der Angiogenese. • Produktion durch Melanomzellen (Srivastava, 2003).
Platelet derived growth factor	PDGF	• Rekrutierung von glatten Muskelzellen.
Hepatocyte growth factor	HGF	• Stimulierung von Angiogenese und Arteriogenese.
Integrin $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$		• Rezeptoren für Makromoleküle der Matrix und Proteinasen (MMP2), deren Antagonisten hemmend wirken. • Reduktion der VEGF-/ Flk-1- vermittelten Überlebenszeit der Endothelzellen (Carmeliet, 2003).
Vascular endothelial Cadherin	VE-cadherin	• Sicherung des Zellverbundes. • Förderung des Überlebens der Endothelzellen (Carmeliet, 2003).
Platelet endothelial adhesion molecule	PECAM (CD31)	• Sicherung des Zellverbundes. • Förderung des Überlebens der Endothelzellen (Carmeliet, 2003).
Ephrin	Eph	• Regulierung der Spezifikation zu arteriellen/ venösen Gefäßen. A1 und A2 sind angiogen; B1 und B2 induzieren die Gefäßsprossung; Die B2-Wirkung ist auf arterielle Gefäße beschränkt, während sein Rezeptor EphB4 im venösen Schenkeln zu finden ist (Carmeliet, 2003).
Matrix-Metalloproteinasen	MMP	• Beteiligung bei dem Matrix- Remodeling (Carmeliet, 2003).

Tabelle 1: Angiogene Wachstumsfaktoren nach Conway et al. (2001)

Hemmende Wachstumsfaktoren Antiangiogene Faktoren	Abkürzung	Wirkung
Neuropilin-1		• Bindung von VEGF und PlGF (Maisonpierre, 1997).
Angiopoetin-2	Ang-2	• Antagonist von Angiopoetin-1. • Induktion der Regression von Blutgefäßen (Maisonpierre, 1997). • Lösung endo-periendotelialer Kontakte. • Degradation der extrazellulären Matrix (Carmeliet, 2003).
Thrombospondin-1	TSP-1	• Bildung durch Primärtumoren, um das Wachstum von Metastasen zu hemmen. • Hemmung der Angiogenese, um die Bildung von Organmetastasen zu hemmen. (Rofstad, 2001).
Thrombospondin-2	TSP-2	• Expressierung im mesenchymalen Stroma. • Mangel beeinflusst den angiogenic switch in Richtung der Angiogenese (Hawighorst, 2002).
Angiostatin		• Freisetzung durch Desintegration von Plasminogen. • Produktion durch viele Melanomzelllinien. • Hemmung der Migration und des Überlebens der endothelialen Zellen (Rafii, 2003).
Endostatin		• Interaktion mit Tropomyosin und Hemmung der Zellmotilität. • Induktion der Apoptose (MacDonald, 2001).
Vasostatin, Calretikulin		• Hemmung des endothelialen Wachstums (Maisonpierre, 1997).
Platelet factor-4	PF-4	• Hemmung der Bindung von bFGF und VEGF (Maisonpierre, 1997).
Antikörper gegen VE-Cadherin/ Pecam-1		• Hemmung der Tumorangiogenese (Rafii, 2003).
Interferon α , β , γ	INF α, β, γ	• Hemmung der Endothelzellenmigration und Minderung von bFGF (Rafii, 2003).
Interleukin-10/-4/-12/-18	IL	• Minderung der Endothelzellenmigration (Hawighorst, 2002).

Tabelle 2: Antiangiogene Wachstumsfaktoren nach Conway et al. (2001)

1.2.5 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

VEGF gilt als einer der zentralen Faktoren bei der Angiogenese. Er wurde von Ferrara und Henzel (Ferrara et al. 1989) als ein Heparin-bindender, stark angiogener Wachstumsfaktor definiert. Unterteilt wird er anhand seiner Heparinaffinität in VEGF-A bis -E, PlGF (placenta growth factor) und EG-VEGF (endocrine gland-VEGF).

Insgesamt sind bis heute drei VEGF-Rezeptoren (VEGFR 1–3) nachgewiesen. VEGFR-1 und VEGFR-2 werden hauptsächlich auf vaskulären Endothelzellen exprimiert, wohingegen VEGFR-3 nur während der Embryonalzeit auf den Endothelzellen gebildet und von VEGF-C und -D besetzt werden. VEGFR-1 befindet sich auf den Mesangiumzellen, Monozyten und Trophoblasten, wohingegen VEGFR-2 von den hämatopoetischen Stammzellen, den Megakaryozyten und den Chondrozyten exprimiert wird. An VEGFR-1 bindet VEGF-A, -B sowie PlGF (Parks et al. , 1997).

Durch den Rezeptor-vermittelten Stimulus kommt es zur Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen und der Rekrutierung endothelialer Progenitorzellen, wodurch die Angiogenese induziert wird. Auch die Migration und Chemotaxis von mehrkernigen Makrophagen und Monozyten sind Folgen der VEGFR-1-Bindung (Hiratsuka et al., 2002), wodurch VEGF die Kallusmineralisierung unterstützt und den trabekulären Aufbau des Knochens fördert. Eine Störung der VEGF-Expression kann hingegen zu Pseudarthrosen und einer Verringerung der Blutgefäßinvasion führen, mit Folgen einer Infektion oder eines Knochenverlusts.

Während der Frakturheilung finden die Angiogenese und somit auch die VEGF-Expression hauptsächlich zu Beginn der Knochenheilung statt. Im Bruchkallus exprimieren Angioblasten, Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten besonders in den ersten sieben Tagen VEGF. Diese Expression führt zu einer Aktivierung von Knochenzellen, Chondroblasten und Endothelzellen, wodurch die Knochenheilung und Gefäßbildung gefördert werden (Kanczler et al., 2008).

1.3 Knochenwachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Polypeptide. Sie werden in niedrigen Konzentrationen von spezifischem Gewebe freigesetzt und wirken auto- sowie parakrin auf die Zellregulation (Blumenfeld et al., 2002). So können sie vor Ort von Chondrozyten, Osteoblasten und Makrophagen synthetisiert werden oder aus dem Blut zum Zielort gelangen (Linkhart et al., 1996). Zu ihren Aufgaben während der Frakturheilung zählen die Proliferation von Knorpel, Knochen und Endothelzellen sowie die Regulierung von Stoffwechselvorgängen der Matrix und Proteinsynthese (Jingushi et al., 1992). Sie vermitteln die Wirkungen von systemischen Hormonen, wie Vitamin D, Parathormon oder Wachstumshormonen an ihren Zielzellen und üben vielzählige Funktionen auf Fibroblasten, Mesenchymzellen, Chondrozyten und Osteoblasten aus (Canalis et al., 1988). Die Wachstumsfaktoren werden durch proteolytische Spaltung in ihre aktive Form überführt und docken durch extrazelluläre Bindungen an die transzellulären Rezeptoren der Zielzelle an. Dadurch setzen sie Signalkaskaden in Kraft, die über Transkriptionsfaktoren die Syntheseleistung der Zelle beeinflussen. Zu den wichtigsten und am besten untersuchten Wachstumsfaktoren zählen die Proteine der „transforming growth factor- β “ (TGF- β)-Familie, zu der auch die Bone Morphogenetic-Proteins (BMPs) gehören, „insulin-like growth factor“ (IGF), „fibroblast growth factor“ (FGF) und „platelet-derived growth factor“ (PDGF). Die Konzentration der Wachstumsfaktoren ist lokalisationsabhängig und nimmt im Alter ab (Nicolas et al., 1995).

Wachstumsfaktoren	Abkürzung	Quelle, Lokalisation und Wirkung
Transforming Growth Factor beta	TGF- β	• Produktion durch Thrombozyten und Entzündungszellen. • Freisetzung im Frakturhämatom. • Stimulierung der Proliferation von Mesenchymzellen des Periosts, mehrkernigen Riesenzellen, Osteoblasten und Chondrozyten. • Wirkung auf die Knochenbildung. Sie ist dosisabhängig und kann hemmend oder fördernd sein (Nielsen, 1994).
Insulin-like Growth Factor	IGF-I (Somatomedin C)	• Produktion durch Stimulation von Wachstumshormonen. • Stimulation von Osteoblasten, mehrkernigen Riesenzellen, Chondrozyten und Endothelzellen. • Förderung der Knochenheilung und Gefäßneubildung (Linkhart, 1996).
Platelet-derived Growth Factor	PDGF	• Freisetzung von Thrombozyten und Entzündungszellen. • Stimulierung der Proliferation von mesenchymaler Zellen des Periosts und der intramembranösen Ossifikation (Bourque, 1993).
Fibroblast Growth Factor	aFGF	• Synthetisierung von Chondrozyten und Makrophagen im Periost. • Stimulierung der Chondrozytenreifung und der Proliferation (Solheim, 1998).
Fibroblast Growth Factor	bFGF	• Produktion möglicherweise von Chondrozyten. • Wirkung auf die enchondrale Ossifikation (Bolander, 1992).

Tabelle 3: Übersicht über Wachstumsfaktoren nach Solheim et al. (1998).

1.3.1 TGF- β -Superfamilie

Die Familienmitglieder des transforming growth factor- β weisen eine 60–80%ige Aminosäurehomologie untereinander auf und werden von etwa 45 verschiedenen Genen kodiert, die verstreut auf den Chromosomen liegen (Ramoshebi et al., 2002). Die Struktur der TGF- β ist zwischen den verschiedenen Spezies sehr ähnlich und weist damit eine starke evolutionäre Konstanz auf. Die TGF- β -Superfamilie wird anhand der carboxy-terminalen Domäne in fünf Untergruppen unterteilt:

1. TGF- β -Subfamilie bestehend aus TGF- β 1, TGF- β 3 und TGF- β 5
2. Aktivin-Subfamilie bestehend aus Inhibin- β A und - β B
3. Dpp-Subfamilie bestehend aus Drosophila-Gen dpp, BMP-2 und BMP-4
4. 60A-Subfamilie bestehend aus Drosophila-Gen 60A und BMP-5 bis BMP-8
5. GDF-Subfamilie bestehend aus GDF-5 bis GDF-8 (Attisano et al., 1996).

Die Bildung von TGF- β übernehmen hauptsächlich die Thrombozyten, aber auch Makrophagen und andere Entzündungszellen sind zur Bildung befähigt (Bolander, 1992). Während der Frakturheilung sind TGF- β und PDGFs die ersten Wachstumsfaktoren vor Ort. Sie werden aus den im Frakturhämatom befindlichen Thrombozyten freigesetzt und induzieren die Proliferation der Knorpel- und Knochenzellen (Einhorn, 1998). Weiterhin stimuliert TGF- β die Osteoblasten VEGF zu produzieren und treibt damit die Gefäßneubildung und die Knochenversorgung voran (Bolander, 1992). Außer für die Knochenheilung und Angiogenese ist TGF- β für die Entwicklung der Gewebe und Organe zuständig und steuert über die FSH-Produktion die Geschlechtsreifung (Street et al., 2000). Ihre Wirkung wird durch Signalkaskaden vermittelt, welche die zelluläre Proliferation, Differenzierung und Produktion beeinflusst (Gosain et al., 2004).

1.3.2 Bone morphogenetic protein

1965 machte Urist eine bahnbrechende Entdeckung als er erkannte, dass demineralisierte Knochenstücke nach Implantation eine osteoinduktive Wirkung im ektopen Gewebe haben (Urist et al., 1967).

Erst 23 Jahre später konnten die dafür zuständigen Proteine von Wozney isoliert werden (Wozney et al., 1998). Es stellte sich heraus, dass diese Proteine zu der Gruppe der „bone morphogenetic proteins“ (BMP) gehören, einer Subfamilie des TGF- β . Mittlerweile wurden 30 verschiedene BMP entdeckt, die nach ihrer Struktur und Funktion in weitere Untergruppen unterteilt werden (Gourmans et al., 2009). Zum Beispiel besitzen BMP-2, BMP-4 bis -7 und BMP-9 eine starke osteoinduktive Wirkung, während BMP-12 und -13 die Bildung von Knorpel und Sehnengewebe initiieren und BMP-3 die Knochenbildung hemmt.

BMPs sind saure, wasserunlösliche Glykoproteine, die an den unterschiedlichsten Geweben im Körper gebildet werden (Takaoka, 1989). Sie gehören zu der Klasse der Morphogene und liegen im Knochen in einer Konzentration von etwa 1 $\mu\text{g/kg}$ vor (Urist, 1995). Morphogen bedeutet, dass sie in der Lage sind auf die Entwicklung und Zelldifferenzierung Einfluss zu nehmen und an der Steuerung der Strukturformationen beteiligt sind. Morphogene liegen in unterschiedlichen Konzentrationen vor und können in Abhängigkeit von den Konzentrationen gradierte Funktionen ausüben. So setzt BMP in niedriger Dosis die Differenzierung zu Knorpelgewebe in Gang, in hoher Dosis kommt

es ohne Knorpelstadium zur Knochendifferenzierung (Niederwanger et al., 1996). Auch die Geschwindigkeit der Knochenheilung lässt sich durch vermehrte BMP-Gabe beschleunigen (Cook et al., 1994). Neben der Konzentrationsabhängigkeit ist BMP auch von den Wachstumshormonen abhängig. So benötigt es für eine optimale *in vitro* Aktivität 15 % fetales Kalbsblut, das eine große Anzahl von Wachstumsfaktoren aufweist (Urist, 1995). Zu den Aufgaben der BMPs zählt die embryonale und postfetale Knorpel-Knocheninduktion, einschließlich der normalen Knochenmodellierung und Reparatur. Aber auch an der Entwicklung von Nieren, Leber, Darm, Zahn, Haar, Augen, Gliedmaßen und Gehirn ist BMP beteiligt (Hogan, 1996).

Die Funktion der BMPs wird extrazellulär durch spezielle Proteine reguliert. Diese Proteine führen zur Bildung von inaktiven Komplexen, wie dem Protein Noggin, das hemmend auf mehrkernige Makrophagen wirkt und somit dem Knochen-induktiven Charakter der BMPs entgegenwirkt. Weitere Proteine sind: Follistatin, Gremlin, Dan und Chordin (Garrison et al., 2006).

Intrazellulär entfalten BMPs ihre Wirkung auf ihre Zielgene über spezifische extrazelluläre BMP-Rezeptoren, die intrazellulär bestimmte Signalkaskaden auslösen (Abbildung 5) (Wrana et al., 1994). Die Zielgene werden in direkte und indirekte Gene aufgeteilt (Reddi, 2000). Direkt bedeutet, dass BMPs sofort ihre Wirkung bei Kontakt mit dem extrazellulären Rezeptor entwickeln, dazu gehört das Kollagen-1. Zu den indirekten Zielgenen zählen die alkalische Phosphatase, Osteocalcin, Osteopontin, „connective tissue growth factor“ (CTGF) und die Transkriptionsfaktoren Smad-6, Smad-7 und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (Heldin et al., 1997). Auf diese Gene wirken BMPs erst nach längerem Kontakt mit der Zielzelle. Die häufigsten Zielzellen der BMPs sind die pluripotenten Mesenchymzellen sowie Zellen der Osteoblastenreihe (Bessho et al., 2002). Sie werden chemotaktisch durch die Morphogene rekrutiert und über die Zielgene zur Proliferation und Differenzierung angeregt, um sich dann an der Organ-, Knochen- und Gefäßentwicklung zu beteiligen (Heldin et al., 1997).

Die spezifischen BMP-Rezeptoren findet man bei der embryonalen Knochenbildung, bei Knochentumoren und während der Knochenheilung. Aber auch bei der ektopen Knochenbildung, vermittelt durch BMP-Substitution, kommen BMP-Rezeptoren vor. Bisher sind zwei Rezeptoren bekannt (Wozney, 1998). Sie zählen zu den membranständigen Serin-/Threonin-Kinasen-Rezeptoren. Durch diese Rezeptoren wird

die Signalkaskade in Gang gesetzt. Diese leitet Signale nach intrazellulär weiter. Durch die Bindung von Liganden können die Rezeptoren über Phosphorylierung die Smad-1, -5- und -8- Proteine aktivieren. Smads sind Kinasen und fungieren als Mediatoren der TGF- β -Subfamilie. Sie übermitteln die intrazellulären Signale auf den Zellkern. Sind diese Kinasen aktiviert, gehen sie mittels Phosphorylierung eine Komplexbindung mit Smad-4 ein. Inhibiert wird dieser Komplex durch die Smad-Proteine -5 und -6. Somit unterliegen die Smad-Proteine einer internen Regulation. Liegt ein Komplex vor, so bewegt er sich in den Zellkern, um dort über die Regulierung der Transkription auf die Genexpression Einfluss zu nehmen. Folglich kann die Differenzierung von Zellen und die Gewebssynthese gesteuert werden (Reddi, 2000). Zu den am besten untersuchten Wachstumsfaktoren zählen BMP-2 und BMP-7. Beide haben eine starke osteoinduktive Wirkung und befinden sich bereits seit einigen Jahren im klinischen Einsatz (Caestecker, 2001).

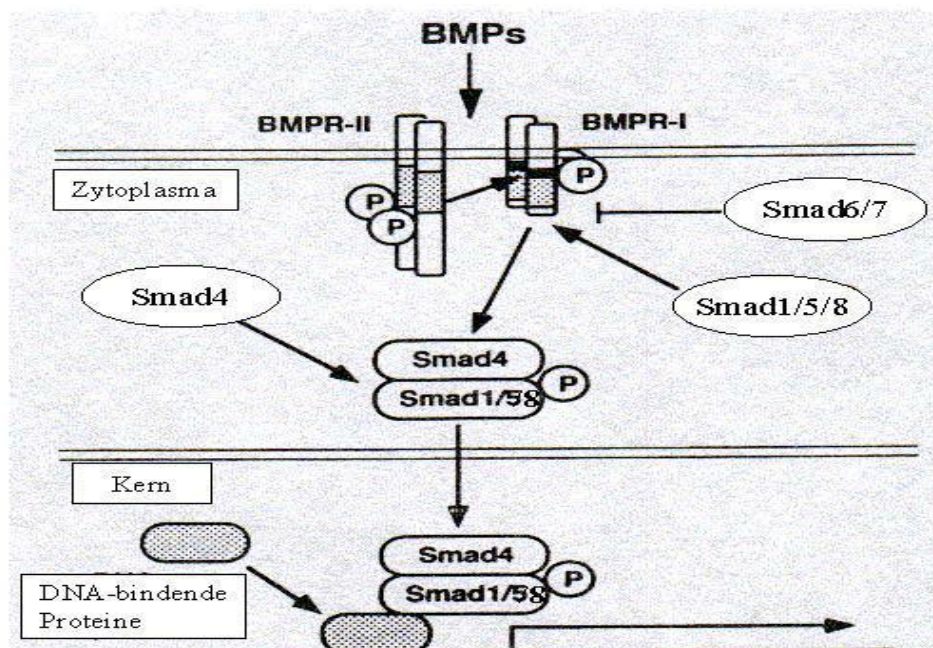


Abbildung 5: Signalkaskade der intrazellulären BMP-Wirkung (Harada, 1997).

1.3.3 Bone morphogenetic protein 7

BMP-7 (Eptotermin alpha) ist aus 139 Aminosäuren zusammengesetzt und liegt als Heterodimer vor. Als Dimere liegen alle funktionellen BMPs vor, wohingegen die Heterodimere viel wirkungsvoller sind. Zu diesen zählt außer BMP-7 auch BMP-2 (Israel

et al., 1996). Während der Embryogenese ist BMP-7 an der Entwicklung des Skeletts, des Darmes, des Herzens, der Nieren und der Augen beteiligt. Liegt bei der embryonalen Phase ein Mangel an BMP-7 vor, führt dies zu extremen Skelettdeformitäten und Organdifferenzierungsstörungen. In der adulten Phase des Wachstums ist BMP-7 am Knochen- und Knorpelaufbau sowie an der Regeneration des Nierengewebes beteiligt, aber auch in der Tumorgenese ist dieses Protein involviert. Die Effizienz von BMP-7 wurde unter anderen von Cook näher beleuchtet. Er untersuchte 1994 die biomechanischen Unterschiede zwischen einem ulnaren Knochendefekt bei Hunden im Vergleich zu einem gesunden Knochen. Dabei fand er heraus, dass ab der 12. postoperativen Woche die biomechanische Belastbarkeit des mit BMP-7 behandelten Knochens dem eines gesunden Knochens entspricht, wohingegen ulnare Frakturen ohne BMP-7 nicht belastbar waren. Des Weiteren postuliert er, dass die Wirkung von BMP-7 und somit auch die Belastbarkeit des Knochens dosisabhängig seien (Cook et al., 1994). Im Hinblick auf die Artenvielfalt ist BMP-7 nicht artspezifisch, jedoch ist die Wirkungsstärke zwischen den Arten variabel (Cook et al., 1994).

Die gefäßbildende Wirkung von BMP-7 wurde von Mandu-Hrit et al., (2008) untersucht. In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass fünf Wochen nach einer Frakturversorgung, am Maximum der Knochenbildung, kein Unterschied zwischen dem Blutfluss einer mit BMP-7 behandelten und einer ohne BMP-7 behandelten Fraktur besteht, trotz einer verstärkten VEGF-Produktion.

BMP-7 ist heute zur Behandlung von Tibiapseudarthrosen im klinischen Alltag zugelassen, nachdem Friedlaender et al. (2001) den gleichwertigen Erfolg von BMP-7 Vergleich zur autologen Spongiosaplastik bei Tibiapseudarthrosen zeigen konnten.

1.3.4 Bone morphogenetic protein-2

BMP-2 (Diboterminal alpha) ist eines der häufigsten untersuchten und potentesten osteoinduktiven Proteine. Dieses Glykoprotein besitzt eine atomare Masseneinheit von 32 kDa und besteht aus zwei Untereinheiten mit jeweils 114 Aminosäuren. Es zählt zu den Heterodimeren und somit zu den wirkungsvolleren Proteinen.

Zu den Hauptaufgaben von BMP-2 während der menschlichen Entwicklung gehört die Regulierung der Proliferation von Mesenchymzellen. Diese Zellen sind für die Bildung von unterschiedlichen Geweben verantwortlich, wozu die Knochen-, Knorpel- und

Organsysteme gehören. Auch bei der Entwicklung des Nervensystems und des Gefäßsystems ist BMP-2 eine treibende Kraft. Liegen während der Embryogenese fehlerhafte BMP-2-Produktionen vor, führt dies zu massiven Missbildungen des Embryos. In der adulten Phase ist BMP-2 für die Frakturheilung notwendig. Es wird am Frakturspalt ausgeschüttet und stimuliert zahlreiche Zellen, die für die Gewebeheilung wichtig sind (Garrison et al., 2006). Um die Frakturheilung zu beschleunigen oder um eine pathologische Fraktur zu therapieren, kann BMP-2 von extern appliziert werden. Dabei sollte BMP auf eine Trägersubstanz aufgetragen werden, um die prolongierte Freisetzungskinetik und Ortsständigkeit zu verbessern. Als Trägersubstanz wird meistens Kollagen Typ 1 gewählt, da es formbar und resorbierbar ist. Es bietet eine große Oberfläche, dient als Grundmaterial, das für den Knochenaufbau notwendig ist und ermöglicht eine gleichmäßige Freisetzung des Induktors. Durch die Applikation werden BMP und das BMP-Rezeptoraufkommen erhöht und der Knochenwachstumsfaktor kann mittels Trägermedium seine Wirkung entfalten (Govender et al., 2002).

Im Gegensatz zu dem enormen Rezeptoraufkommen bei einer Fraktur liegen im gesunden Knochen nur sehr wenig BMP-2- und auch sehr wenige andere BMP-Rezeptoren vor (Niikura et al., 2006).

Seit Ende der 80er Jahre wird BMP-2 rekombinant hergestellt. Diese Produktionsart ist günstiger als die aufwendige Isolierung von BMP aus der Knochenmatrix. Jedoch weist die rekombinante Form eine geringere Wirksamkeit auf als die isolierte Form (Bessho, 2002). Es ist eine vermehrte Expression von BMP-2 in Osteosarkomen, Prostata-, Plattenepithel-, Pankreas- und Ovarialkarzinomen zu finden (Langenfeld et al., 2004), wodurch sich einige Ansätze zur Therapiemöglichkeiten ermöglichen (Govender et al., 2002).

BMP-2 wird unter dem Handelsnamen InductOs® (Medtronic. Meerbusch) als 12 mg Implantationskit mit einer Trägersubstanz aus bovinem Rinderkollagen-Typ-I hergestellt. Nach einer Studie von Govender et al. (2002), in der die überlegene Behandlung von BMP-2 zusammen mit Weichteilmanagement und intramedullärer Verriegelungsnagelung gegenüber der reinen Weichteil- und Verriegelungsmarknagelung bei offenen Tibiafrakturen dargestellt wurde, erlangte BMP-2 seine Zulassung für die Behandlung von offenen Tibiafrakturen zusammen mit dem unaufgebohrten Verriegelungsmarknagelung.

Der zweite Bereich der offiziellen Zulassung von InductOs[®] betrifft degenerative Bandscheibenerkrankungen, die nach einer mindestens sechs monatigen konservativen Behandlungsdauer mit einer anterioren Wirbelkörperfusionen zwischen L4/L5 bzw. L5/S1 versorgt werden. In diesen Fällen ist InductOs[®] als Ersatz für die autologe Spongiosaplastik zugelassen.

Der Einfluss von BMP-2 auf die Angiogenese ist Thema zahlreicher Studien. So beschrieb Moser (2003), dass BMP-2 und BMP-4 für die De-novo-Synthese der Blutgefäße während der embryonalen Entwicklung verantwortlich sind. Bei Unterdrückung der Wachstumsfaktoren führt dies zur Störung der Dottersackdurchblutung und der Herzentwicklung (Moser et al., 2003). Postnatal führt BMP-2 zu einer Zunahme der Anzahl und Größe der Gefäße. Hemmt man die BMP-2-Wirkung in einem BMP-2-exprimierten Tumor mittels Noggin, sinkt die Durchblutungsrate im Tumor. Ebenso steigen die Anzahl der Gefäße und die Durchblutung unter Verwendung von BMP-2. Die Stimulation der Angiogenese durch BMP-2 erfolgt über eine Phosphorylierung von Erk-1/2, einem Enzym das die Osteoblasten und Endothelzellen aktiviert. Ähnlich wie BMP-2 sind auch andere Substanzen in der Lage die Endothelzellen Erk-1/2 zu stimulieren, dazu zählen VEGF, Fibroblasten- und epidermale Wachstumsfaktoren sowie Angiogenin (Langenfeld et al., 2004). Die blutgefäßbildende Wirkung des BMP-2 wird auch über die Stimulation von VEGF vermittelt. Ein weiterer wichtiger Faktor für die Angiogenese ist Id, ein negativer Regulator für die Transkriptionsfaktoren. Er reguliert und aktiviert die Migration von Endothelzellen. Es wurde nachgewiesen, dass BMP-6 die endotheliale Migration direkt über Id1/5 auslösen kann. Jedoch konnte keine BMP-2-vermittelte Migration nachgewiesen werden (Langenfeld, 2004). Schlussfolgernd hängt die endotheliale Migrationswirkung des BMP vom BMP-Typ ab. Folglich hat das BMP-2 Einfluss auf die Proliferation der Endothelzellen, kann diese aber nicht zur Migration anregen. Es liegen jedoch bislang noch keine Studien vor, die spezifisch die Blutgefäßneubildung nach Stimulation der Knochenheilung durch BMP-2 an der Rattentibia untersucht haben.

1.4 Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird ein Rattenmodell mit Osteotomie der Tibiadiaphyse verwendet, das entweder alleinig mit einem intramedullären Implantat stabilisiert (Kontrollgruppe) wird oder zusätzlich zur intramedullären Stabilisation mit BMP-2 (BMP-2-Gruppe) behandelt wird. Anhand dieses Modells sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie unterscheidet sich die Frakturheilung hinsichtlich der Geschwindigkeit der Konsolidierung der Fraktur und Knochenneubildung zwischen der Kontroll- und der BMP-2-Gruppe?
2. Welche Unterschiede ergeben sich zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich Ausdehnung, Verteilung und Dynamik der Angiogenese an der Tibia?

Für beide Fragestellungen werden drei Untersuchungszeiträume am 3., 14. und 42. postoperativen Tag herangezogen und somit die ersten 6 postoperativen Wochen der Knochenheilung analysiert. Für beide Fragestellungen wurden computertomographische und histologische Methoden, einschließlich der Histomorphometrie verwendet.

2. Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Der Versuch umfasste insgesamt 36 Tiere, wovon 18 Tiere für die Kontroll- und 18 Tiere für die BMP- Gruppe verwendet wurden (Tabelle 4). Innerhalb jeder Behandlungsgruppe wurden jeweils 6 Tiere pro Untersuchungszeit (Untersuchungszeitpunkte: 3., 14. und 42. postoperativer Tag) analysiert. Das gesamte Tierversuchsvorhaben wurde vor Beginn vom Bezirksregierungspräsidium Gießen mit der Antragsnummer GI 20/14-Nr.22/2007 genehmigt.

	3. Tag	14. Tag	42. Tag	Summe
Kontrollgruppe	n=6	n=6	n=6	n=18
BMP- Gruppe	n=6	n=6	n=6	n=18
				n=36

Tabelle 4: Studiendesigne

Die Tiere des ersten Untersuchungszeitpunkts mit Euthanasie am 3. postoperativen Tag wurden vor Euthanasie mittels VCT gescannt. VCT-Untersuchungen erfolgten am 3. und 14. postoperativen Tag für die Tiere mit Euthanasie am 14. Tag, und am 3., 14. und 42. Tag für die Tiere mit Euthanasie am 42. Tag. Nach Euthanasie erfolgten die Entnahme und die weitere Aufarbeitung der Tibia für die histologischen Untersuchungen.

2.2 Operative Eingriffe am Tier

2.2.1 Tierart

Im Rahmen der vorliegenden Studie werden männliche Charles River Ratten vom Stamm CD verwendet (Bezugsquelle: Charles River Deutschland GmbH, Sanhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld). Das Alter bei OP-Beginn beträgt 16 Wochen, das durchschnittliche Körpergewicht liegt bei 500 g.

2.2.2 Tierhaltung

Die Tiere werden bis zu dem OP-Tag zu viert in einem Makrolonkäfig Typ III mit Einstreu gehalten. Postoperativ erhält jedes Tier seinen eigenen mit Zellstoff ausgelegten Käfig, um die Verletzungsgefahr zu minimieren. 14 Tage postoperativ werden die Ratten wieder mit einem früheren Käfigpartner zusammengesetzt.

Die Ernährung erfolgt mit Altromin Haltungsdiät sowie Leitungswasser ad libitum. Vor der OP besteht keine Nahrungskarenz.

Die Haltungsmodalitäten Luftfeuchtigkeit, Umgebungstemperatur, Luftaustausch sowie Hell-Dunkel-Rhythmus werden auf konventionelle Art gewährleistet.

2.2.3 BMP-2 und absorbierbarer Kollagenschwamm

Das in der Studie verwendete rekombinante humane BMP-2 (Diboterminal- α) wurde zusammen mit dem Trägermaterial, das aus einem absorbierbaren bovinem Kollagen-Typ-I besteht, von der Firma Medtronic[®] (Memphis, USA) zur Verfügung gestellt. Diboterminal- α wird rekombinant in Hamster-Ovarialzellen hergestellt und als InductOs[®] in einer Gesamtdosis von 12 mg beim Menschen angewendet. Der Wachstumsfaktor wird mindestens 15 Minuten vor Anwendung auf den Kollagenschwamm aufgebracht und anschließend direkt auf die Frakturstelle lokal aufgebracht. Für die vorliegende Studie lag BMP-2 wie für InductOs[®] in der Transportflasche mit einer Gesamtmenge von 12 mg pulverisiert vor (Abbildung 6). In diese Flasche wird 6,5 ml steriles Wasser injiziert und vermischt, was einer Konzentration von 2 mg/ml entspricht.

Der Kollagenschwamm (bovines Kollagen-Typ I) wird quadratisch auf 1 x 1 cm zugeschnitten und misst eine Dicke von 0,35 cm. Dann werden vorsichtig mit Hilfe einer Spritze 0,1 ml der BMP-2-Lösung steril auf den Kollagenschwamm aufgespritzt, was einer Gesamtmenge von 0,2 mg rhBMP-2 pro Kollagenschwamm entspricht.

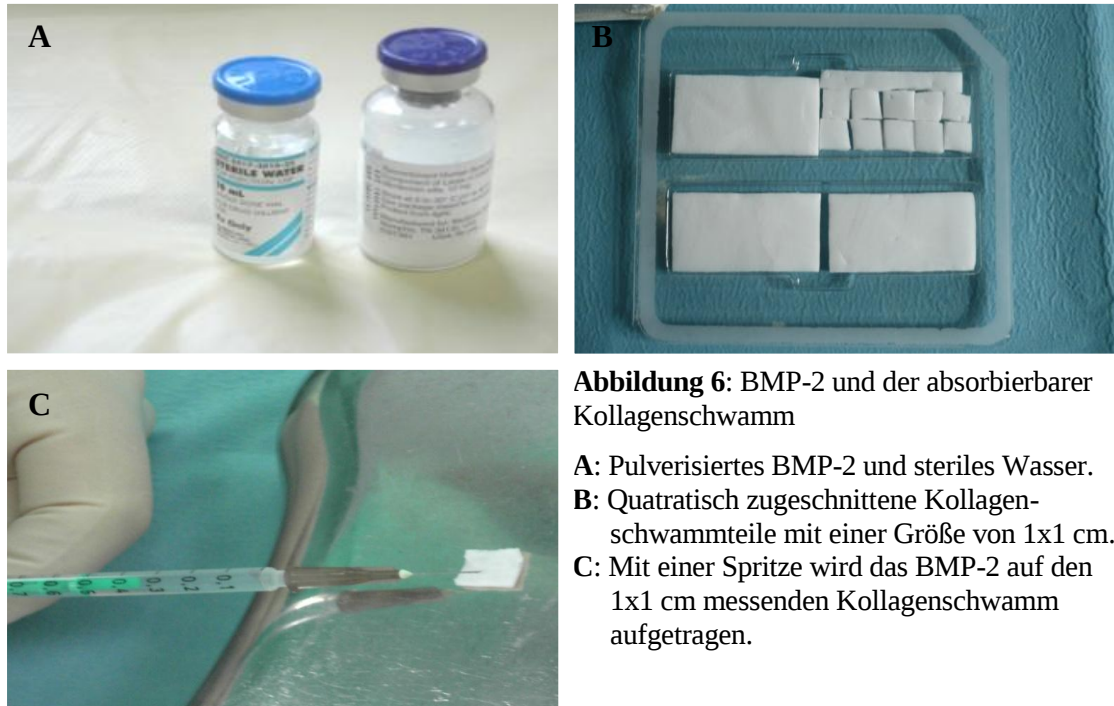


Abbildung 6: BMP-2 und der absorbierbarer Kollagenschwamm

- A:** Pulverisiertes BMP-2 und steriles Wasser.
B: Quadratisch zugeschnittene Kollagenschwammteile mit einer Größe von 1x1 cm.
C: Mit einer Spritze wird das BMP-2 auf den 1x1 cm messenden Kollagenschwamm aufgetragen.

2.2.4 Vorbereitung und Narkose

Zu Beginn erfolgt eine kurze Inhalationsnarkose in einem Exicatortopf mit 2 ml Isofluran (Isofluran Baxxter®). Daraufhin wird die Ratte gewogen und durch eine intraperitoneale Injektion mit einem Gemisch aus Ketamin (Ketamin Inresa® 100 mg/kg KG Injektionslösung 50 mg/ml) und Xylazin 2 % (Rompun® 4 mg/kg KG Injektionslösung 5 mg/ml auf ¼ mit 0,9 % NaCl verdünnt) wird die Narkose eingeleitet.

Der rechte Hinterlauf wird mit einem Langhaarschneider sowie einem Einmalrasierer vorbereitet und mit Braunol (Braunderm®) desinfiziert. Die Augen werden mit Liposic® Augensalbe versorgt. Für die Kennzeichnung der Ratte wird eine Ohrmarkierung mittels Lochzange vorgenommen.

Um den Narkosezustand der Ratte zu überprüfen, wird die Ansprechbarkeit des Zehenreflexes untersucht. Etwa 10 Minuten nach der Narkoseeinleitung kann operiert werden. Das Versuchstier wird mit gespreizten Hinterläufen in Rückenlage auf dem

beheizten OP-Tisch fixiert und steril abgedeckt. Für eine eventuelle Nachdosierung oder auftretende Komplikationen werden eine Spritze mit 1 ml Isofluran und eine Sauerstoffflasche bereitgestellt. Falls die Indikation zur Antagonisierung der Narkose besteht, wird Atipamezol (Antisedan® 5 mg/ml) mit $\frac{1}{10}$ der Xylazindosis verabreicht.

2.2.5 OP-Technik

Während der OP wird die Atmung der Ratte ständig kontrolliert. Es erfolgt eine 2 cm lange Hautinzision, beginnend ca. 0,5 cm proximal der Tuberositas tibiae bis zur mittleren Tibiadiaphyse ziehend sowie die Eröffnung des intramedullären Tibiakanals mittels eines 11er Skalpells (Abbildung 7). Über die eröffnete Tuberositas tibiae wurde zunächst als intramedulläres Implantat eine 21 G Kanüle (0,8 mm Außendurchmesser) in den proximalen Markkanal eingebracht. Die Tibiadiaphyse wurde anschließend präpariert und senkrecht zur Tibialängsachse mittels oszillierender Säge auf mittlerer Schafthöhe osteotomiert. Danach wurde die Kanüle unter achsgerechter Reposition der beiden Tibiafragmente in die distale Tibia eingebracht und dort stabil verklemmt. Dann wurde der Kollagenschwamm mit dem BMP-2, auf die Osteotomiestelle aufgelegt. Dabei kam es zu einer Überlappung des Schwammes an der Tibiavorderkante. Es wurde auf ein lockeres Anlegen des Schwammes geachtet, um ein ablösen des BMP vom Trägermaterial zu vermeiden.

Nach vorsichtiger Wundreinigung mit 0,9%iger Kochsalzlösung erfolgte ein dreischichtiger Wundverschluss mit vier subkutanen Einzelknopfnähten (Vicryl 2,0), vier kutanen Einzelknopfnähten (Prolene 4,0) und sechs Klammern.

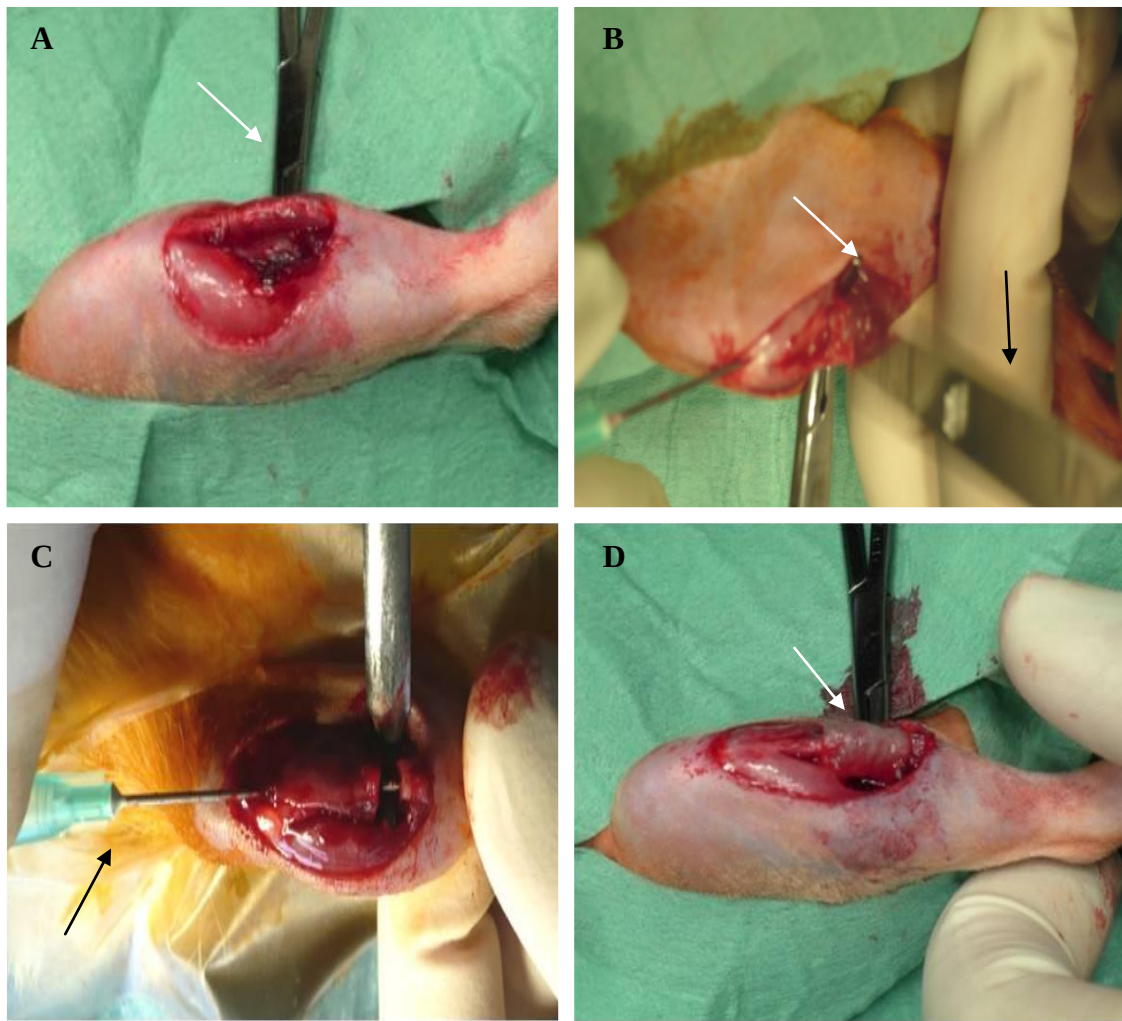


Abbildung 7: OP-Technik

A: Die proximale Tibia wird freipräpariert und eine Overholt- Klemme (weißer Pfeil) dorsal der Tibia eingeführt.

B: Die Tibia wird mit einer oszillierenden Säge (schwarzer Pfeil) auf mittlerer Schafthöhe durchtrennt. Die Overholt- Klemme (weißer Pfeil) dient als Widerlager für die Säge.

C: Der Bruchspalt wird mit einer Kanüle (schwarzer Pfeil), die als intramedulläres Implantat verwendet wird, stabilisiert.

D: Der mit BMP getränkte Kollagenschwamm (weißer Pfeil) wird locker um die Tibia gelegt.

2.2.6 Postoperative Versorgung

Postoperativ wird die Ratte mit einer subkutanen Injektion Metamizol (Metacam® 1 ml/kg KG Injektionslösung 5 mg/ml) und Augensalbe versorgt. Das Tier wird durch eine auf 39 °C temperierte Wärmflasche und eine Wärmelampe vor dem Auskühlen geschützt. Atmung, Temperatur und Bewusstsein werden zu den Zeitpunkten 0, 10, 20, 30, und 60 Minuten kontrolliert.

Nach Erlangen des Bewusstseins wird die Ratte alleine in einen mit Zellstoffbahnen ausgekleideten Käfig gesetzt. Auf eine Einstreuung mit Weichholzgranulat wird verzichtet, um ein Eindringen von Granulatsplittern zu vermeiden. Zur Schmerzstillung erhält die Ratte ein Trinkgemisch aus Wasser und Metamizol (Metacam® 5 ml auf 1 l Wasser) über 5 Tage sowie am 3. postoperativen Tag 0,1 ml Metamizol subkutan.

2.3 Versuchsauswertung

2.3.1 Volumencomputertomografie (VCT)

Für die Nativ- und Perfusionsscans wird der Flat-Panel-CT eXplore Locus Ultra von GE Healthcare, London, Ontario, Kanada verwendet. Das Besondere an diesem Kleinseriengerät ist die Verwendung eines Flatpanels zur Strahlendetektion. Es besteht aus einem photosensitiven amorphen Silizium-Panel auf den CsJ-Nadeln in einem speziellen Verfahren aufgebracht werden, die strahlenkollimative Eigenschaften besitzen. Das Panel hat eine Matrixgröße von 1024×1024 Elementen. Der maximal scanbare Bereich in xy-Richtung beträgt $15,8 \times 15,8 \text{ cm}^2$ und – je nach verwendetem Protokoll – 3,6 cm; 5,4 cm oder 10,2 cm in z-Richtung. Dieser Bereich wird als „field of view“ (FOV) bezeichnet.

Bei den durchgeführten Nativscans werden bei einer Untersuchung mit 140 kVp und 10 mA während einer Gantryrotation innerhalb von 8 Sekunden 1000 Einzelprojektionsbilder mit einer Matrixgröße von jeweils 480×1024 Pixeln aufgenommen. Das Auflösungsvermögen des Flat-Panels beträgt ca. 2,20 Linienpaaren/mm (0,045 mm) bei einer Modulationstransferfunktion von 10 %. In der xy-Richtung sowie auch in z-Richtung liegt somit eine Auflösung von etwa 0,2 mm vor. Damit ist die Auflösung im Vergleich zu einem in der Klinik eingesetzten Multislice-CT in der xy-Richtung vergleichbar und in der z-Richtung um ein 3-faches höher.

Bei den Kontrastmittelskans beträgt das FOV $15,8 \times 15,8 \text{ cm}^2 \times 3,6 \text{ cm}$. Vom Detektor wird eine Matrix von 1024×300 Elementen ausgelesen. Bei einer Gantryrotation von 1 Sekunden Dauer werden 416 Einzelprojektionsbilder aufgezeichnet. In dem verwendeten Protokoll werden die Daten über 30 Sekunde hin akquiriert, d.h. es werden Daten zu zeitlich 30 aufeinander folgenden Datenwürfeln aufgezeichnet, die dann nach der Bildrekonstruktion zur Auswertung von dynamischen Eigenschaften zur Verfügung stehen. Das angewendete Protokoll scannt mit 80 kVp und 60 mA.

Für die Rekonstruktion der Bilddaten wird ein modifizierter Kegelstrahl-Rückprojektionsalgorithmus verwendet. Die Voxelmatrix der rekonstruierten Bilder beträgt $512 \times 512 \times k$, wobei k von der Ausdehnung des Objekts in z-Richtung abhängt. Die resultierenden Daten bestehen aus isotropen Voxeln und werden mit einer 12-Bit Datentiefe als DICOM-Bilder ausgegeben. Dabei werden die Bilder häufig in einer über der physikalischen Auflösung hinausliegenden Vergrößerung mit einer Voxelgröße von bis zu $0,05 \text{ mm}^3$ rekonstruiert, denn hier ist visuell oft der beste Bildeindruck zu erzielen. Die Bildrekonstruktion erfolgt auf einem auf LINUX basierenden PC-Cluster, mit einem Master PC und 8 Nodes, die jeweils mit einem dualen 3,06-GHz-Xeonprozessor und 2-GB-RAM ausgestattet sind.

Für die Visualisierung und Auswertung der Bilder wird eine Advantage Workstation (AW), Version 4.1 von GE Medical Systems, Buc, France mit einem Linux Betriebssystem, einem dualen 2,2 GHz-Prozessor sowie 4-GB-RAM verwendet. Die verwendete Software ermöglicht die Analyse der Bilder in 2D-Schnittbildern und 3D-Volumenansichten. Bei den Nativscans werden die Funktionen Volume Viewer (Voxtool 3.0.58c), „maximum intensity projection“ (MIP) und „volume rendering“ (VR) angewendet. Zur Auswertung der Perfussionsscans wird die Software „CT-Perfusion-3“ des „Functoll Version 2.6.0“ der AW genutzt (Hargreaves et al., 1990). Diese Software ermöglicht die Auswertung der zeitlichen Änderung von Kontrastmittelkonzentrationen innerhalb eines untersuchten Organismus. Hieraus können funktionelle Bilder erstellt werden, die beispielsweise Auskunft über Blutvolumen und Blutfluss geben können (Obert et al., 2010).

Das Perfusions-CT gibt Aufschluss über das Verhalten von Blut im Körper. Um das Blut radiologisch sichtbar zu machen wird Kontrastmittel (Peritrac Infusio 31 %) benötigt, das in einem kurzen Zeitraum intravenös eingespritzt wird ($4 \text{ cm}^3/\text{sec}$). Diese Technik

ermöglicht die Erstellung von funktionellen Bildern, die Auskunft über das Blutvolumen, Blutfluss und Transitzeit geben. Die Transitzeit wird in Sekunden ausgedrückt und zeigt die durchschnittliche Zeit an, die das Blut benötigt, um vom arteriellen ins venöse System zu gelangen. Da die Wegstrecken unterschiedlich lang sind, wird ein Mittelwert berechnet. Der regionale Blutfluss (ml/100 g/min) repräsentiert die Blutmenge, die pro Zeiteinheit durch das Gefäßsystem fließt. Das regionale Blutvolumen (ml/100 g) stellt das vorhandene Blutvolumen im Gefäßsystem dar. Die Bildbearbeitung des Perfusionsscan erfolgte durch die Workstation. Für die Auswertung werden die Schwanzarterie und die punktierte Schwanzvene ermittelt und der Blutfluss pro Millisekunde errechnet (Abbildung 8). Regionen des Interesses (ROI) werden bestimmt, um in diesen Bereich die genaue Durchblutung zu errechnen (Abbildung 9). ROI 3 bezeichnet die Region der operierten Tibia, ROI 4 ist der korrespondierende Abschnitt auf der gesunden linken Seite. Um einen möglichst genauen Vergleich durchzuführen, haben alle Regionen einen Umfang von ca. 30 mm³ und werden in 3 verschiedenen Schnitthöhen bestimmt, auf Höhe des Frakturspalts sowie ca. 1 cm proximal und distal davon. Die in der Abbildung angegebenen Prozentzahlen geben Aufschluss über die Differenz der beiden Felder zueinander. Die Deviation (Dev) stellt die Abweichung der Werte dar.

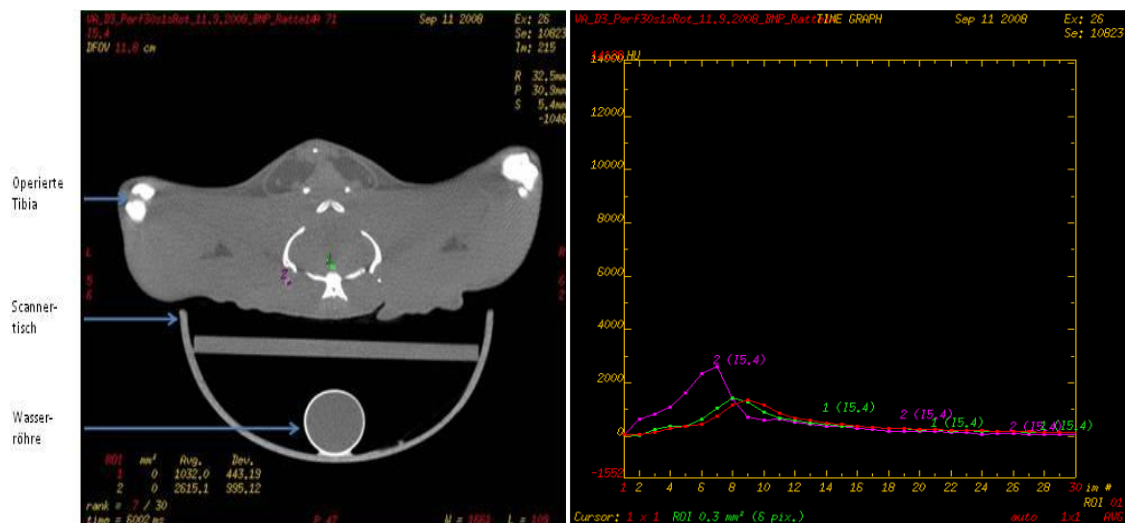


Abbildung 8: Perfusionsscan: Ermittlung des Blutvolumens.

Links: Operierte Tibia ganz links im Bild. Die Wasserröhre zum Abgleich des Scanners befindet sich unter dem Tier. Ermittlung der Schwanzarterie (1) und Schwanzvene (2).

Rechts: Abbildung des Blutvolumens x-Achse (Sekunden) ; y-Achse (Hounsfield Units) ; Arterie (1); Vene (2)

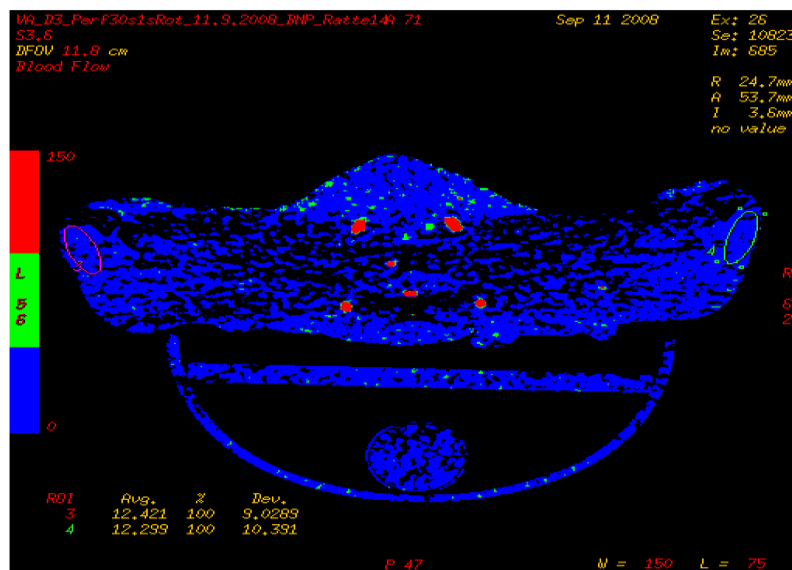


Abbildung 9: Perfusionsscan: Ermittlung der Durchblutung

ROI 3 bezeichnet die Region der operierten Tibia, ROI 4 ist der korrespondierende Abschnitt auf der gesunden Seite. Alle Regionen haben ein Volumen von ca. 30 mm³.

2.3.1.1 Behandlung der Tiere für die VCT

Die Ratte wird durch die Inhalation mit 2 ml Isofluran sediert. Daraufhin wird das Gewicht überprüft, um eine gewichtsadaptierte intraperitoneale Narkotisierung mit Medetomidin-hydrochlorid einzuleiten (Domitor® 0,4 mg/kg KG Injektionslösung 1 mg/ml). Die Wirkung des Narkotikums tritt etwa nach 4 Minuten ein. Um die beiden Schwanzvenen darzustellen erfolgt nun die Entschuppung des Schwanzes. Eine der Venen wird mit einer Heparin-ausgespülten Kanüle punktiert, zur Lagekontrolle wird Heparin injiziert. Das Wirkungsmaximum des Domitors ist nach ca. 20 Minuten erreicht. Die Ratte wird auf dem Scannertisch in Rückenlage fixiert und mit Augensalbe versorgt. Die Klammern werden entfernt und das Spritzenpumpensystem (0,5 ml Peritrat Infusio 31 % und 0,65 NaCl zum Nachspülen) wird angeschlossen. Der Perfusionsscan wird gestartet, etwa 5 Minuten später folgt der Nativscan. Während der beiden Scans wird die Ratte mittels einer Wärmelampe vor dem Auskühlen geschützt. Nach den Scans wird die Braunüle gezogen, die OP-Wunde mit Braunol desinfiziert und erneut geklammert. Entsprechend des Studienprotokolls wurden die Tiere zur Entnahme der Tibia euthanasiert oder zur Schmerzstillung 0,1 ml Metacam subkutan verabreicht und die Vitalzeichen postoperativ nach 10, 20, 30 und 60 Minuten kontrolliert.

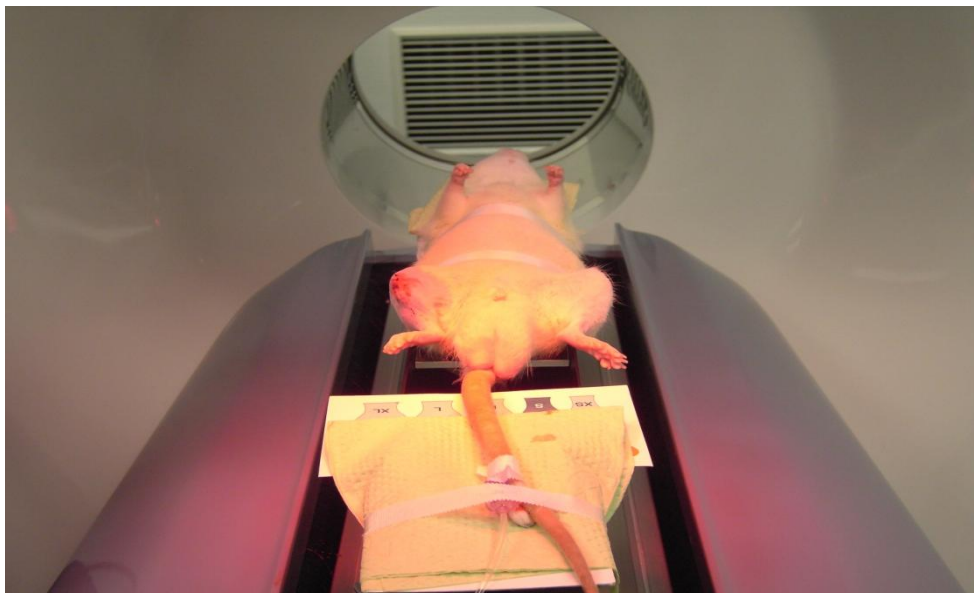


Abbildung 10: Lagerung der Ratte im VCT

Während des Scanvorgangs wird die Ratte auf dem Rücken liegend fixiert und an einem Infusionssystem zur Kontrastmittelperfusion über eine Schwanzvene angeschlossen.

2.3.1.2 Radiologische Einteilungen der Frakturheilung

Für die Auswertung der Scans wurde eine Einteilung mit vier Graden erstellt:

- **Grad 1:** keine Kallusbildung (Abbildung 11).
- **Grad 2:** Kallusbildung ohne vollständige Überbrückung der Kortikalis (Abbildung 12).
- **Grad 3:** Kallusbildung mit vollständiger Überbrückung der Kortikalis, aber ohne komplette Durchbauung des Kallusgewebes (Abbildung 13).
- **Grad 4:** komplette Frakturüberbrückung und Kallusdurchbauung, mindestens einseitige komplette Kallusdurchbauung oder beidseitig fast komplette Kallusdurchbauung (Abbildung 14).

Die Auswertung der Scans erfolgte nach der oben erwähnten Stadieneinteilung. Dabei wurde besonders auf folgende Parameter geachtet: Größe, Formation und Dichte des Kallusgewebes, die Durchbauung des Kallus sowie die Überbrückung der Frakturenenden.

Unter Verwendung des Statistikpaket PASW 20.0 (SPSS Inc., USA) erfolgte die histologisch deskriptive Analyse durch ein Ranglisten- Punkte- System im Bezug auf die kortikale Knochenbildung und Überbrückung. Als statistisches Testverfahren wurden der Pearson-Chi-Quadrat-Test und Fisher-Exact-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde bei beiden Tests mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von $p < 0,05$ definiert.

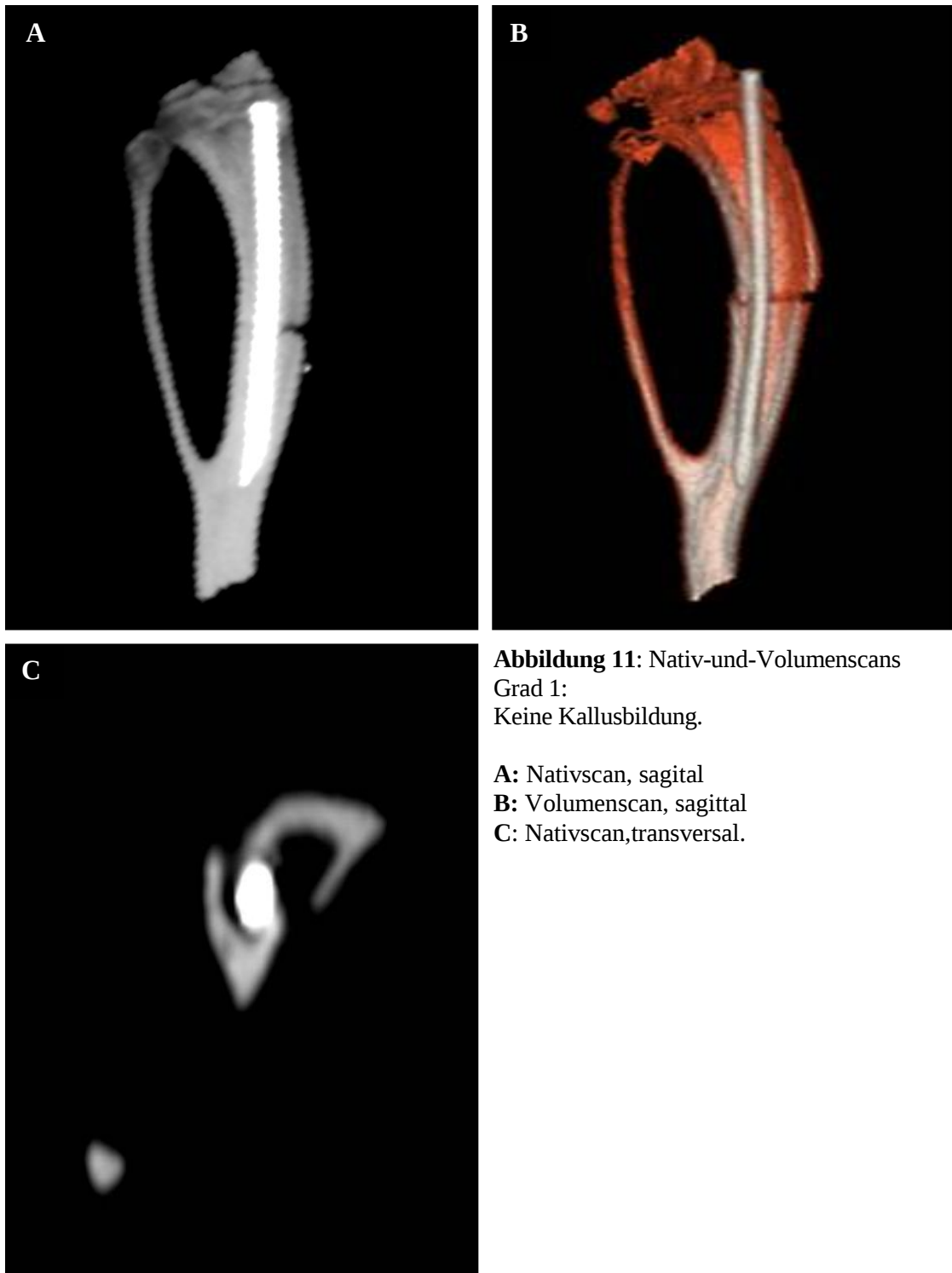


Abbildung 11: Nativ-und-Volumenscans
Grad 1:
Keine Kallusbildung.

A: Nativscan, sagital
B: Volumenscan, sagittal
C: Nativscan,transversal.

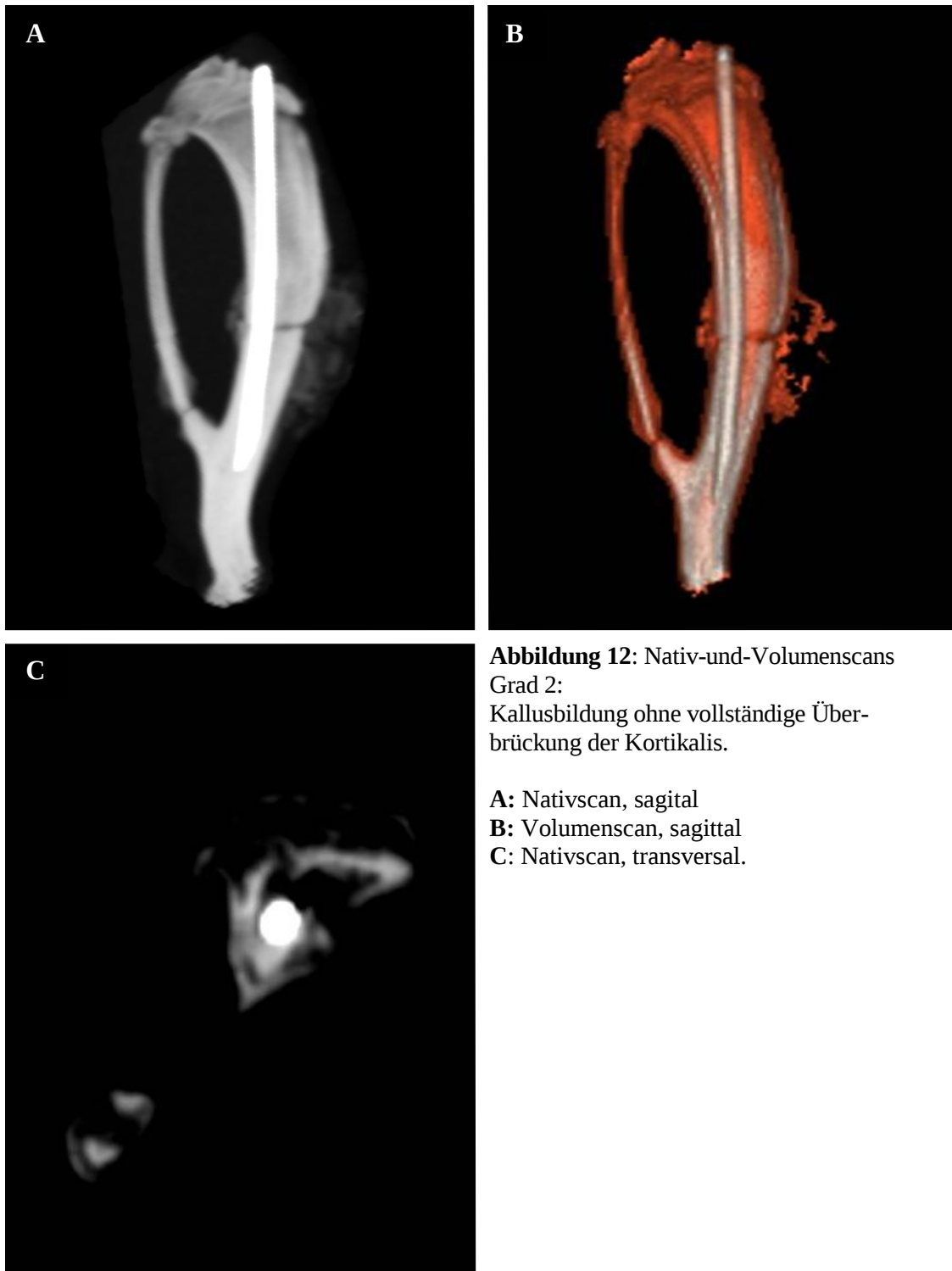


Abbildung 12: Nativ-und-Volumenscans
Grad 2:
Kallusbildung ohne vollständige Über-
brückung der Kortikalis.

A: Nativscan, sagittal
B: Volumenscan, sagittal
C: Nativscan, transversal.

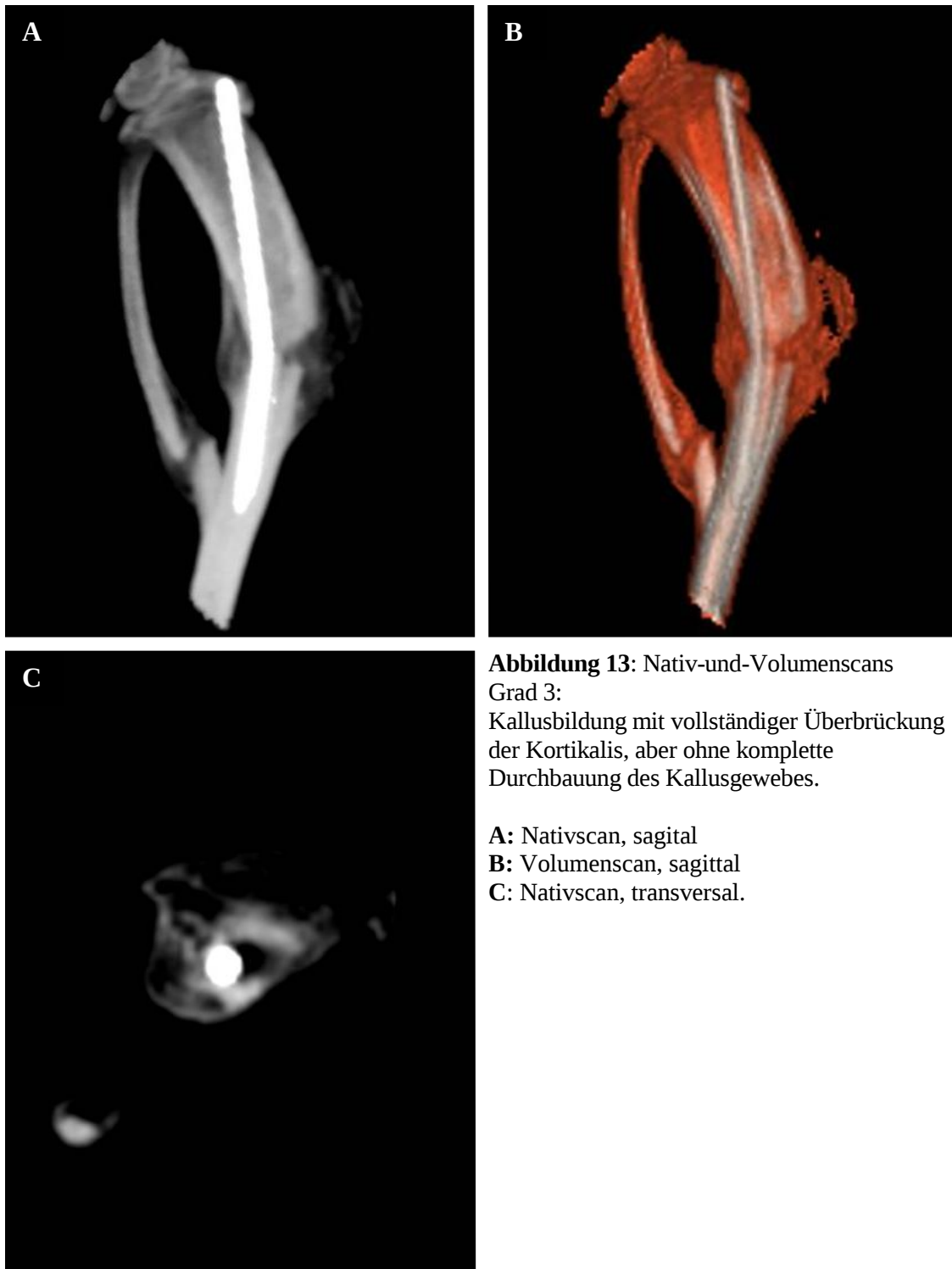


Abbildung 13: Nativ-und-Volumenscans
Grad 3:
Kallusbildung mit vollständiger Überbrückung
der Kortikalis, aber ohne komplette
Durchbauung des Kallusgewebes.

A: Nativscan, sagittal
B: Volumenscan, sagittal
C: Nativscan, transversal.



Abbildung 14: Nativ-und-Volumenscans
Grad 4:
Komplette Kallusdurchbauung mindestens
einsseitig oder beidseitig fast komplette
Kallusdurchbauung.

A: Nativscan, sagital
B: Volumenscan, sagittal
C: Nativscan, transversal.

2.3.2 Tötung und Probenentnahme

Nach dem Scannen werden die Ratten entsprechend des Studiendesigns getötet (siehe 2.1 Studiendesigne). Die Tötung erfolgt durch eine 10-minütige Inhalationsnarkose mit Isofluran und anschließendem Genickbruch.

Für die Entnahme der beiden Tibiae werden Haut und Muskeln von dem Knochen abpräpariert, die Gelenkpartner gelöst und die Tibiae entnommen. Die Knochen werden in ein 3 cm großes Stück geschnitten und in eine Fixierungslösung gelegt (4 % Paraformaldehyd). Diese muss 24 Stunden einwirken bis die Knochen weiter verarbeitet werden können.

2.3.3 Probenaufbereitung

2.3.3.1 Herstellung von 4 % Paraformaldehyd

0,2-molarer Natriumphosphatpuffer:

- saure Lösung 1:
27,6 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat werden mit Aqua Bidest auf 1000 ml aufgefüllt.
- alkalische Lösung 2:
35,6 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat werden mit Aqua Bidest auf 1000 ml aufgefüllt.

Um einen pH von 7,3 zu erreichen, werden 230 ml der Lösung 1 und 770 ml der Lösung 2 gemischt. Eine Reduktion auf 0,1-molaren Natriumphosphatpuffer wird durch die Zugabe von mengenäquivalenten Aqua Bidest erreicht.

8 % Paraformaldehyd:

Herstellung einer Lösung von 160 g Paraformaldehyd, 8%ige Stammlösung und 2000 ml Bidest durch Erhitzen. Zugabe von 1-molarer Natronlauge und Filtrierung der Lösung.

4 % Paraformaldehyd:

Vermischung mengenäquivalent 8 % Paraformaldehyd und 0,2-molaren Natriumphosphatpuffer.

2.3.3.2 Beschichtung der Objektträger mit APTEX

20 Objektträger (OT) werden in einen Kürvettenhalter einsortiert und ca. 1 Minute mit Bidest gespült. Danach werden sie ca. 1 Minute mit technischem Azeton abgespült. Nach einem 30-minütigen Trockenvorgang werden die OT 5 Minuten in eine 2%ige APTEX-Lösung gelegt, hergestellt aus 196 ml reinem Azeton und 4 ml 3-Aminopropyltriethoxysilan. Unter fließendem Wasser werden die OT abgespült und für 2 Minuten in Aqua Bidest gestellt. Zum Abschluss erfolgt die Trocknung der OT über 24 Stunden bei 37 °C.

2.3.3.3 Paraffineinbettung

Nachdem die Tibia aus der Ratte heraus präpariert wurde, wird der Knochen über 24 Stunden in einer 4%igen Paraformaldehydlösung eingelegt und im Anschluss mit einem 0,1 molaren Natriumphosphatpuffer 6-mal gespült. Es folgt eine 18-tägige Entkalkung des Knochens mit EDTA (3,4 % Tris-Base, 10 % Titriplex III, Aqua destillata, NaKCl) auf einem Rüttler. Wenn das Gewebe weich genug ist, kann die Entwässerung beginnen. Dazu wird der Knochen für jeweils 30 Minuten in eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96%, 100%) in Xylol I und Xylol II gegeben. Zum Abschluss wird die Tibia 2-mal à 30 Minuten in Paraffin eingelegt und bei -20 °C im Kühlschrank getrocknet.

2.3.3.4 Paraffinschnitt

Mit einem Rotationsmikrotom (Leica RM 2155) sowie einen Mikrotome Blade (Feather R35) wird in einem Schnittwinkel von 4° ein 4–6 µm dicker Schnitt angefertigt. Der Schnitt wird in ein 45 °C warmes Wasserbad gelegt und auf einen Objektträger gezogen. Danach muss der aufgezoogene Schnitt 24 Stunden bei 40 °C trocknen.

2.3.3.5 Färbungen

2.3.3.5.1 Hämalaun-Eosin-Färbung

Zu Beginn wird der Objektträger mit dem Paraffinschnitt entparaffiniert. Dabei wird der OT jeweils für 5 Minuten in zwei Behälter mit 98 % Xylol (Carl Roth®) gelegt und mittels einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 80% und 70%) sowie mit Aqua destillata abgespült. Im Anschluss folgt eine 5-minütige Kernfärbung mit filtriertem Hämalaun (Meyers Hämalaunlösung®) und eine abschließende Spülung mit Aqua destillata. Es folgt die Bindegewebsfärbung mit 1 % Eosin (Certistain®) für 30 Sekunden und eine abschließende Spülung mit Aqua destillata. Zur Entwässerung der Schnitte dient das Abspülen der Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 %) und Xylol. Abschließend wird DePex (Gurr®) auf den Schnitt getropft und ein Deckplättchen daraufgelegt.

Färbeergebnis: Kerne blau, Muskulatur rot, Zytoplasma hellrot, Erythrozyten leuchtend rot, Kollagene Fasern rot, elastische Fasern blassrosa.

2.3.3.5.2 Herstellung von Toluidinblau O

Lösung A: 300 ml Aqua destillata, 8 g Dinatriumtetraborat (Borat®) und 6 g Toluidinblau (Chroma®).

Lösung B: 200 ml Aqua destillata und 2 g Pyramin G (Pyramin G®).

Toluidinblau O: Lösung A und B.

Die Lösungen werden jeweils für 15 Minuten mit einem Magnetrührer vermischt.

2.3.3.5.3 Toluidin-Färbung

Der beschichtete OT wird ebenfalls zweimal für 5 Minuten in Xylol getränkt und im Anschluss mit einer absteigenden Alkoholreihe und Aqua destillata abgespült. Daraufhin folgt die Färbung mit filtriertem Toluidinblau O für 20 Sekunden und der Spülvorgang mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol. Zum Abschluss wird der Schnitt mit DePex und einem Deckplättchen abgedeckt.

Färbeergebnis: kollagenes Bindegewebe rot, Fett grün, Muskelfasern, Knorpel und Knochen dunkelblau, Zytoplasma schwach blau, Zellkerne deutlich blau lila.

2.3.4 Histomorphometrie

Die Histomorphometrie ist ein quantitatives Verfahren zur Analyse der Gewebszusammensetzung und Flächenbestimmung. Dieses Verfahren ist notwendig, um die histologischen Ergebnisse untereinander vergleichen und berechnen zu können.

Der Ablauf gliedert sich wie folgt:

1. Darstellung der histologischen Schnitte unter dem Mikroskop (Axiophot-2 Mikroskop) mit anschließender Digitalisierung durch eine Kamera (DC 500, Kalibrierung AxDC 500 4S IMP 1,2) und einem Bildbearbeitungsprogramm (IM1000).
2. Ausmessung der einzelnen Gewebearten am Computer mittels einer speziellen Software (Programm Image pro Plus) bei einer Kalibrierung von 1,25 x 1300 x 1030 4er shot. Dazu werden in dem zu berechnendem Bereich die jeweiligen Gewebearten mit einem Cursor umfahren, um den Anteil der Gewebe zu dem gesamten Gebiet prozentual zu berechnen. Folglich kann die Histomorphometrie den prozentualen Anteil der verschiedenen Gewebe in definierten Regionen wiedergeben und somit Aufschluss über die Lokalisation verschiedener Prozesse zeigen.

Bei unserer Studie wählten wir als definiertes Gebiet den Frakturspalt und die Kallusregion. Dieses Gebiet teilten wir in sechs gleichgroße Regionen ein. Damit modifizierten wir die Methode nach Augat (Krischak und Augat et al, 2007), bei der nur fünf Zonen verwendet wurden. Mit der Aufteilung in sechs gleichgroße Regionen können die Zonen in zwei äußere, zwei intermediäre und zwei innere Regionen separiert werden und somit direkte Vergleiche gezogen werden. Als zu untersuchende Gewebearten wählten wir alten und neuen Knochen sowie Binde- und Knorpelgewebe. Das Ausmessen der Muskelmasse und des Knochenmarks wurde unterlassen, da sich in dieser Studie die Fragestellung auf die Durchblutung im Bindegewebe und Knochen bezieht.

Des Weiteren wurde die ventrale und dorsale Kallusfläche berechnet. Anhand des Verhältnisses zwischen Gefäßanzahl und der Flächenbestimmung lässt sich eine genauere Aussage über das Gefäßvorkommen treffen. Für die Auswertung wurden die Präparate 3, 14 und 42 Tage postoperativ miteinander verglichen und die BMP-Gruppe der Kontrollgruppe gegenübergestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben.

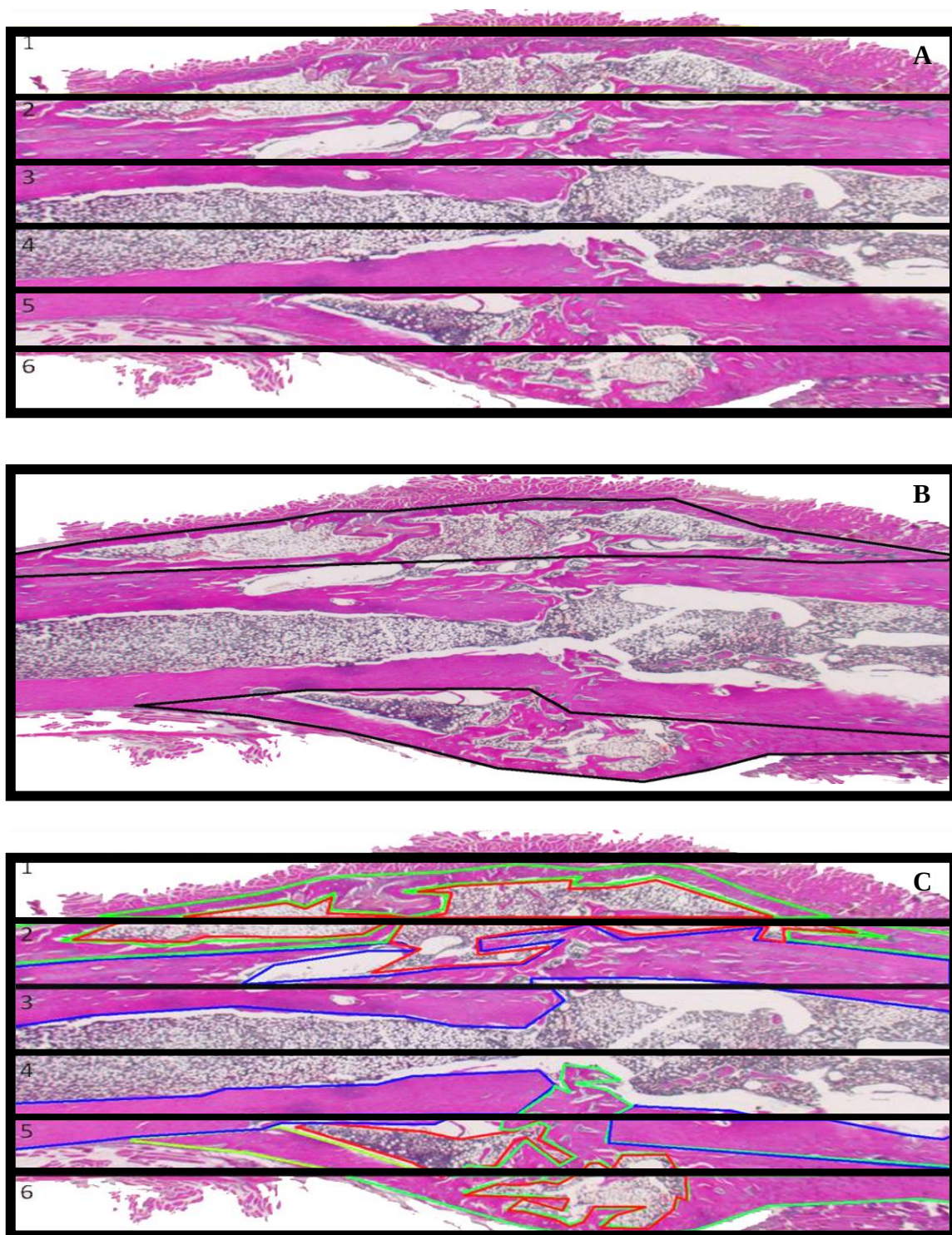


Abbildung 15: Darstellung der Histomorphometrie anhand eines 42-Tage-Tieres
A: Darstellung sechs gleichgroßer Zonen (Zone 1 konvexe Knochen Seite ventral, Zone 6 konkave Seite dorsal). 2,5-facher Vergrößerung, HE.
B: Darstellung des Kallusgewebes (schwarz) ohne Muskulatur. 2,5-facher Vergrößerung, HE.
C: Darstellung der einzelnen Gewebe innerhalb der Zonen 1–6 [neuer Knochen (grün), alter Knochen (blau), Knochenmark im Kallus (rot)]. 2,5-facher Vergrößerung, HE.

2.3.5 Übersichtshistologie

Für die Übersichtshistologie und für die Gefäßauszählung lagen pro Tier 30 Schnitte vor. Davon waren jeweils drei Schnitte mit Hämalaun-Eosin und Toluidin angefärbt. Insgesamt wurden 17 von 18 Tiere einbezogen, da ein 3-Tage-Tier postoperativ verstarb: Fünf 3-Tage-Tiere, sechs 14-Tage-Tiere und sechs 42-Tage-Tiere. Für die Auswertung wurden drei Schnitte pro Tier genauer untersucht.

Bevor die Präparate hinsichtlich der Gefäßdichte untersucht wurden, fand eine subjektive Beurteilung des histologischen Bildes unter Verwendung eines Axioskop 2 Mikroskops statt. Dabei wurde besonders auf die Zellen geachtet, die für eine Frakturheilung wichtig sind. Dazu zählen Erythrozyten im Frakturhämatom, Fibrozyten in der Fraktur und Kallusregion, Osteoblasten, Chondroblasten und Entzündungszellen. Des Weiteren wurde auf die Veränderung der Gewebszusammensetzung geachtet sowie die Lokalisation der verschiedenen Gewebe und der vorherrschenden Zellen in den jeweiligen Geweben. Hierzu wurden die zu untersuchenden Stellen in verschiedene Zonen eingeteilt (Tabelle 5, Abbildung 16).

Frakturzone	Sie umfasst den eigentlichen Frakturspalt, der sich zwischen den beiden Knochenhälften befindet. Außerhalb der Kortikalis geht die Frakturzone in die Granulationszone über.
Granulationszone	Sie grenzt nach medial an die Frakturzone und ist als laterale Verlängerung des Frakturspalts anzusehen. Seitlich wird sie von der Proliferationszone eingeschlossen.
Proliferationszone	Sie begrenzt nach proximal und distal die Fraktur- und Granulationszone. Als Breite der Zone wurde eine Zählrastergröße in der zwanziger Vergrößerung definiert. Dies entspricht circa eine Breite von 0,57 mm.

Tabelle 5: Einteilung der Zonen für die histologische Auswertung

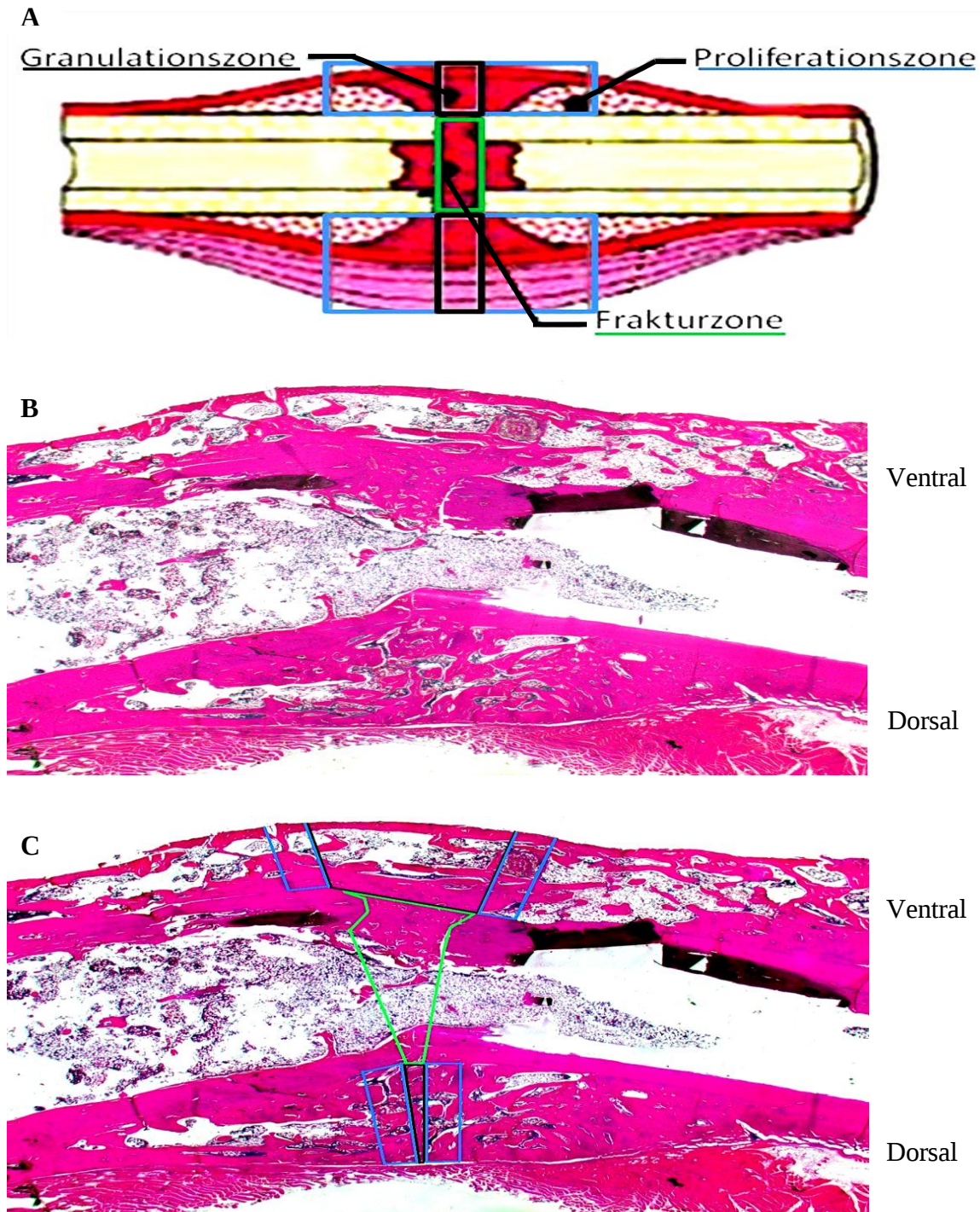


Abbildung 16: Darstellung der Analysezonen.

A: Schematische Darstellung der Auswertungszonen modifiziert nach Wildemann et al. (2005)

B: Frakturausschnitt am 42. Tag ohne eingezeichnete Zonen. 2,5-facher Vergrößerung, HE.

C: Frakturausschnitt am 42. Tag mit eingezeichneten Zonen [Frakturzone (grün), Granulationszone (schwarz), Proliferationszone (blau)]. 2,5-facher Vergrößerung, HE.

2.3.6 Blutgefäßneubildung

Die Auswertung erfolgte mithilfe des Photomikroskops von Zeiss Typ Axioskop 2. Wie in Abbildung 16 skizziert, wurden die Schnitte in die jeweiligen drei Zonen unterteilt. Innerhalb dieser Zonen wurden die Gefäße bei zwanzigfacher Vergrößerung mittels eines Zählrasters gezählt. Als Einschlusskriterien galten:

- Alle runden, ovalen oder längsgetroffenen leeren Strukturen, bei denen sich in der Umrandung eine Endothelzelle oder eine dickere Wandung zeigt.
- Gefäße, die mit mehr als 50 % ihrer Fläche in dem zu zählenden Bereich liegen.
- Alle Gefäße, die nicht im Knochenmark oder in der Muskulatur liegen.

Zur Bestimmung der Blutgefäßneubildung wurde eine Gefäßauszählung mit der Auswertung von drei Schnitten pro Tier ausgewertet. Für die Gefäßauszählung wurden pro Tier drei Schnitte ausgewertet. Dabei wurden die bei der Übersichtshistologie verwendeten Präparate benutzt. Die Anzahl der Gefäße der drei Schnitte wurde addiert und durch drei dividiert.

Unter Verwendung des Statistikprogramms SPSS 18 erfolgte die statistische Auswertung der gezählten Gefäße. Als statistisches Testverfahren wurden der Mann-Whitney-U-Test und der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Der Mann-Whitney-U-Test überprüft die Signifikanz zweier Merkmalen. Um mehrere Merkmale ordinal skaliert auf ihre Übereinstimmung zu untersuchen, wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde bei beiden Tests mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von $p < 0,05$ definiert.

3. Auswertung

3.1 Nativ- und Volumenscans

3.1.1 Vergleich zum Zeitpunkt Tag 3, Tag 14 und Tag 42

In Tabelle 6 und Abbildung 17 wird der Heilungsverlauf in der Kontroll- und BMP-Gruppe zum Zeitpunkt Tag 3, Tag 14 und Tag 42 dargestellt. In der Kontrollgruppe reduziert sich die Gesamtanzahl der Scans zu jedem der drei Zeitpunkte um ein Scan, da ein Tier der 42-Tages-Gruppe postoperativ verstorben ist. In der BMP-Gruppe ist ein Tier der 3-Tages-Gruppe postoperativ verstorben. Dadurch konnten in dieser Gruppe nur siebzehn von achtzehn geplanten Scans durchgeführt werden. In der 14-Tages-BMP-Gruppe konnten aufgrund von Bewegungsartefakten nur elf von zwölf Scans bewertet werden. Beim Vergleich der Kontroll- mit der BMP-Gruppe zu jedem einzelnen Untersuchungszeitpunkt lässt sich erkennen, dass sich an Tag 3 alle Tiere beider Gruppen im Stadium 1 befunden haben. Am Tag 14 haben sich in der Kontrollgruppe vier von elf Tieren im Stadium 2 und sieben Tiere im Stadium 3 befunden. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich zwei von elf Tieren der BMP-Gruppe im Stadium 2 und neun Tiere im Stadium 3 wiederfinden. Dieser Unterschied ist ohne statistische Signifikanz ($p=0,54$). Eine signifikant fortgeschrittene Heilung lässt sich am Tag 42 für die BMP-Gruppe (zwei von sechs Tieren im Stadium 3 und vier Tiere im Stadium 4) gegenüber der Kontrollgruppe (fünf von fünf Tieren im Stadium 3) zeigen ($p=0,045$).

	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4	Gesamtanzahl	Signifikanzwerte p=
3-Tage-Kontrollgruppe	17	0	0	0	17*	0,757
3-Tage-BMP-Gruppe	17	0	0	0	17**	
Total 3 Tage	34	0	0	0	34	
14-Tage-Kontrollgruppe	0	4	7	0	11*	0,540
14-Tage-BMP-Gruppe	0	2	9	0	11***	
Total 14 Tage	0	6	16	0	22	
42-Tage-Kontrollgruppe	0	0	5	0	5*	0,045
42-Tage-BMP-Gruppe	0	0	2	4	6	
Total 42 Tage	0	0	7	4	11	

Tabelle 6: Vergleich der Knochenheilung anhand der Nativ- und Volumenscans zwischen Kontroll- und BMP-Gruppe an Tag 3, 14 und 42

Ein signifikanter Unterschied besteht am 42. postoperativen Tag zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,045$).

*Ein 42-Tage-Tier der Kontrollgruppe ist verstorben, somit Reduktion aller Scans um ein Tier.

**Ein 3-Tage-Tier der BMP- Gruppe ist während der OP verstorben.

***Ein Tier konnte aufgrund starker Bewegungsartefakte nicht gewertet werden.

3.1.2 Vergleich des zeitlichen Heilungsverlaufs

Tabelle 7 und Abbildung 17 beschreiben den Heilungsverlauf vom 3. bis zum 42. postoperativen Tag in der Kontroll- und BMP-Gruppe (3.Tag vs. 14.Tag; 14. Tag vs. 42. Tag; 3. Tag vs. 42. Tag). Insgesamt sind fünfzehn Scans (fünf Tiere) der Kontrollgruppe und achtzehn Scans (sechs Tiere) der BMP-Gruppe untersucht worden. Um den zeitlichen Verlauf zu beurteilen, sind nur die Tiere einbezogen worden, die alle drei Scans (3., 14. und 42. Scan Tag) durchlaufen haben. Die Differenz von drei Scans in der Kontrollgruppe ist durch das postoperative Versterben eines Tieres der 42-Tages-Gruppe entstanden.

Es kann festgestellt werden, dass die knöcherne Heilung beider Gruppen zeitabhängig zunimmt. In der BMP-Gruppe haben vier von sechs Tieren eine vollständige knöcherne Heilung (Grad 4) erreicht. Dieser Grad ist von keinem Tier der Kontrollgruppe erreicht worden. Sowohl in der Kontroll- als auch in der BMP-Gruppe kann eine statistisch signifikante Heilungszunahme zwischen dem 3. vs. 14. Tag, dem 14. vs. 42. Tag und dem 3. vs. 42. Tag konstatiert werden ($p=0,00001$).

	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4	Gesamt- anzahl	Signifikanzwerte p= <		
3-Tage- Kontrollgruppe	5	0	0	0	5*	0.001		0.001
14-Tage- Kontrollgruppe	0	2	3	0	5*		0.001	
42-Tage- Kontrollgruppe	0	0	5	0	5*			
Kontrollgruppe total	5	2	8	0	15			
3-Tage-BMP- Gruppe	6	0	0	0	0	0.001		0.001
14-Tage-BMP- Gruppe	0	1	5	0	6		0.001	
42-Tage-BMP- Gruppe	0	0	2	4	6			
BMP-Gruppe total	6	1	7	4	18			

Tabelle 7: Vergleich des knöchernen Heilungsverlaufs anhand der Nativ- und Volumenscans zwischen Tag 3, 14 und 42 jeweils für die Kontroll- und BMP Gruppe

Signifikante Unterschiede liegen in beiden Gruppen zu allen Messpunkten vor.

*Ein 42-Tage-Tier der Kontrollgruppe ist verstorben, somit Reduktion aller Scans um ein Tier.

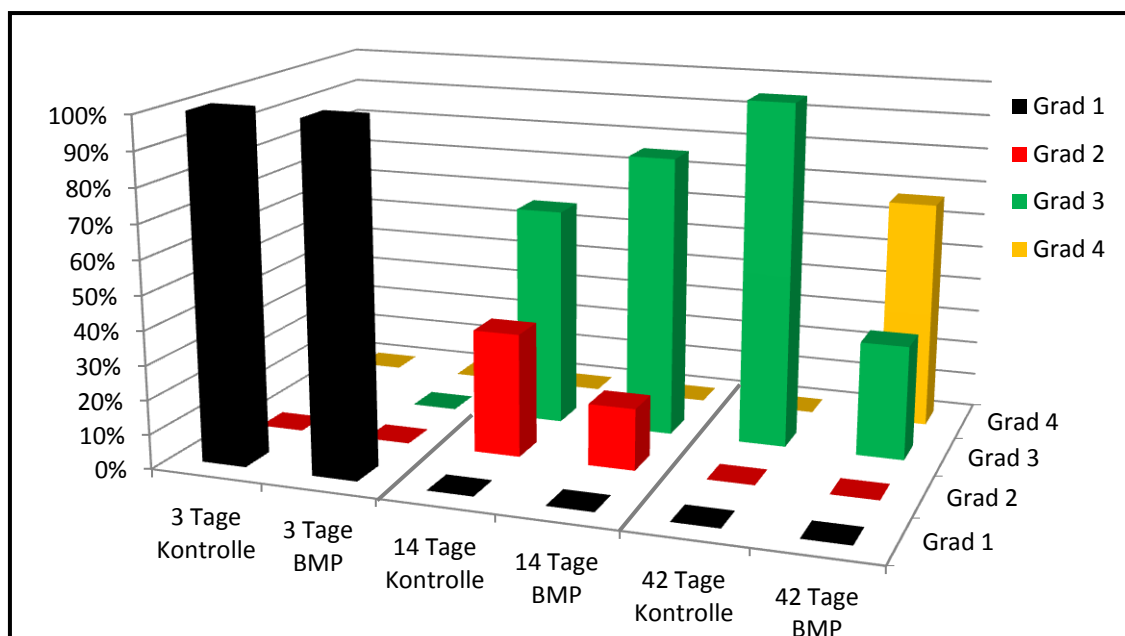


Abbildung 17: Vergleich des knöchernen Heilungsverlaufs zwischen Tag 3, 14, 42 jeweils für die Kontroll- und BMP-Gruppe

x-Achse: Scans am 3., 14. und 42. postoperativen Tag, Kontroll- und BMP-Gruppe

y-Achse: Gradeinteilung der Kallusbildung von 1-4

z-Achse: Anteil der Tiere in der jeweiligen Gradeinteilung

3.2 Perfusionsscans

Auszüge der Perfusionsscans werden in Abbildung 18 A-C wiedergegeben. Differenziert wird hinsichtlich der Scanzeiten (3., 14. und 42. Tag), des Frakturspalts (1 cm oberhalb, auf Höhe und 1 cm unterhalb des Frakturspalts) und der funktionellen Parameter (Blutfluss, Blutvolumen und Transitzeit).

Die korrespondierenden Abschnitte der operierten Seite (ROI 3) und der nichtoperierten Seite (ROI 4) werden anhand der Prozentzahlen, die Aufschluss über die Differenz zwischen den Feldern geben, und der Deviation der Werte (Dev) hinsichtlich der funktionellen Parameter Blutfluss, Blutvolumen und Transitzeit verglichen.

Beim Vergleich der Prozentzahlen und Deviationen der Parameter lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der operierten und der nichtoperierten Seite erkennen. Bei allen Tieren und zu allen Scanzeiten (3, 14 und 42 Tage) zeigen sich an den drei Messpunkten der Tibia an der operierten und nichtoperierten Seite stets ein vergleichbarer Blutfluss (Abbildung 18 A), ein vergleichbares Blutvolumen (Abbildung 18 B) und eine vergleichbare Transitzeit (Abbildung 18 C).

Wird davon ausgegangen, dass die nichtoperierte Seite zu allen Untersuchungszeitpunkten und in beiden Gruppen vergleichbar ist, lassen sich durch die Perfusionsscanmethode keine Unterschiede in der Vaskularisation visualisieren.

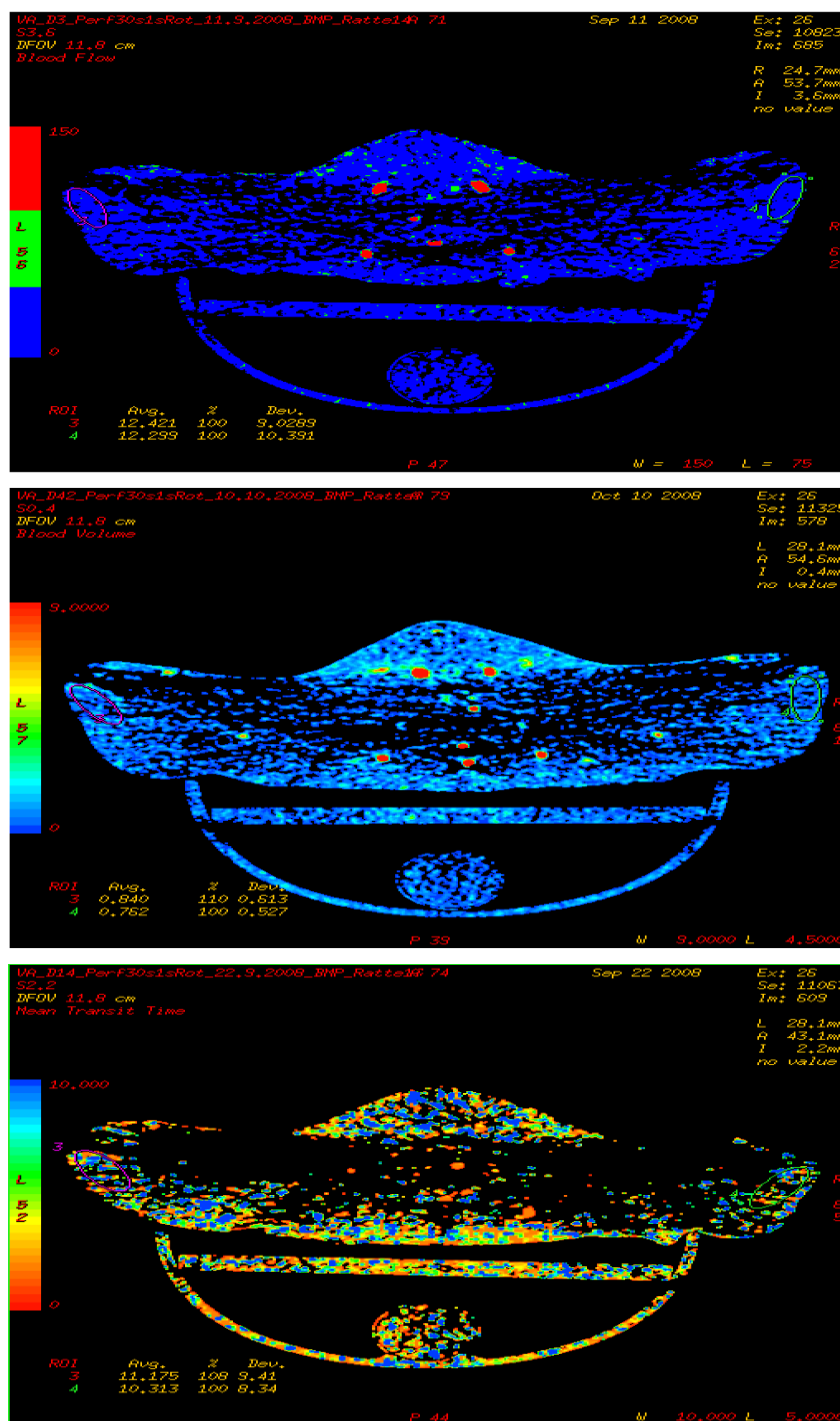


Abbildung 18: Perfusionsscans der BMP-Gruppe
 A: Blutfluss 3 Tage postoperativ 1 cm oberhalb des Frakturspalts
 B: Blutvolumen 42 Tage postoperativ Höhe des Frakturspalts
 C: Transitzeit 14 Tage postoperativ 1cm unterhalb des Frakturspalts
 Es lassen sich keine Vaskularisationsunterschiede zwischen den beiden Seiten erkennen.

3.3 Histomorphometrie der Gewebszusammensetzung

3.3.1 Prozentuale Gewebszusammensetzung

Die prozentuale Zusammensetzung von neugebildetem Knochen, altem Knochen, Knorpel, Bindegewebe und BMP-Kollagenvlies an der Gesamtfläche der Außenzone ventral (Zone 1), Intermediärzone ventral (Zone 2), Innenzone ventral (Zone 3), Innenzone dorsal (Zone 4), Intermediärzone dorsal (Zone 5), Außenzone dorsal (Zone 6) ist den Abbildungen 19-24 zu entnehmen.

Für eine übersichtliche Darstellung werden die beiden jeweils korrespondierenden Zonen, Zonen 1 und 6 als Außenzonen, Zonen 2 und 5 als Intermediärzonen und Zonen 3 und 4 als Innenzonen, zusammengefasst (Abbildung 25).

Insgesamt lässt sich in der BMP-Gruppe bereits von Tag 3 an eine weiter fortgeschrittene Frakturheilung als in der Kontrollgruppe beobachten. Hierfür sei angeführt, dass an Tag 3 in der BMP-Gruppe bereits Bindegewebsformationen zu erkennen sind, während in der Kontrollgruppe nur alte Knochenformationen zu verzeichnen sind. Signifikante Werte liegen für die Außen- und Intermediärzonen vor (Außenzonen: $p=0,004$, Intermediärzonen: $p=0,03$).

Am Tag 14 ist in der BMP-Gruppe der Anteil des neugebildeten Knochens in allen Zonen signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Außenzonen: $p=0,004$, Intermediärzonen: $p=0,025$, Innenzonen: $p=0,007$). Hingegen liegt in der Kontrollgruppe im Vergleich zur BMP-Gruppe ein signifikant erhöhter Knorpelanteil in den Intermediär- und Innenzonen vor (Intermediärzonen: $p=0,002$, Innenzonen: $p=0,026$). Am Tag 14 ist auch der Bindegewebsanteil in der Kontrollgruppe gegenüber den korrespondierenden Flächen der BMP-Gruppe deutlich erhöht. Signifikante Werte bestehen für die Außen- und Intermediärzonen (Außenzonen: $p=0,004$, Intermediärzonen: $p=0,002$).

Für den Tag 42 können im Vergleich zwischen der Kontroll- und der BMP-Gruppe hinsichtlich des neugebildeten Knochens und des Bindegewebes keine signifikanten Unterschiede verzeichnet werden. Jedoch zeigt sich ein signifikant erhöhtes Knorpelaufkommen in allen Zonen der Kontrollgruppe gegenüber der BMP-Gruppe (Außenzonen: $p=0,005$, Intermediärzonen: $p=0,009$, Innenzonen: $p=0,015$).

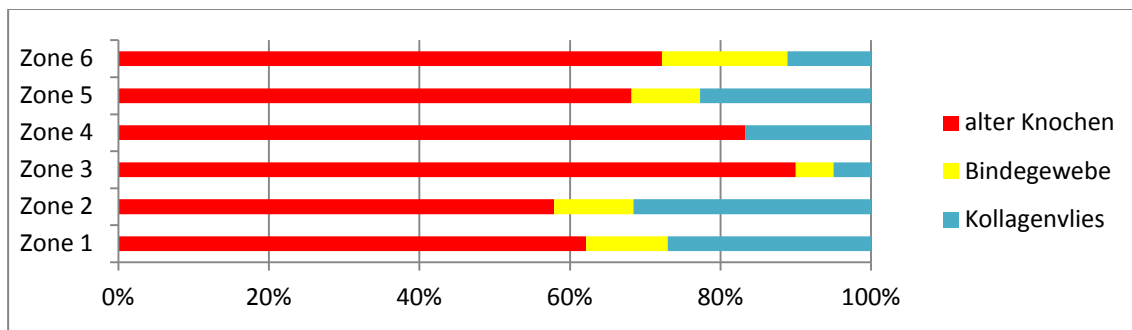


Abbildung 19: Gewebzusammensetzung Tag 3 in der BMP-Gruppe

Prozentuale Verteilung der Gewebearten (neuer Knochen, alter Knochen, Knorpel, Bindegewebe und Kollagenvlies) der Zonen 1-6 (Zone 1: Außenzone ventral, Zone 2: Intermediärzone ventral, Zone 3: Innenzone ventral, Zone 4: Innenzone dorsal, Zone 5: Intermediärzone dorsal, Zone 6: Außenzone dorsal) in der BMP-Gruppe am 3. postoperativen Tag

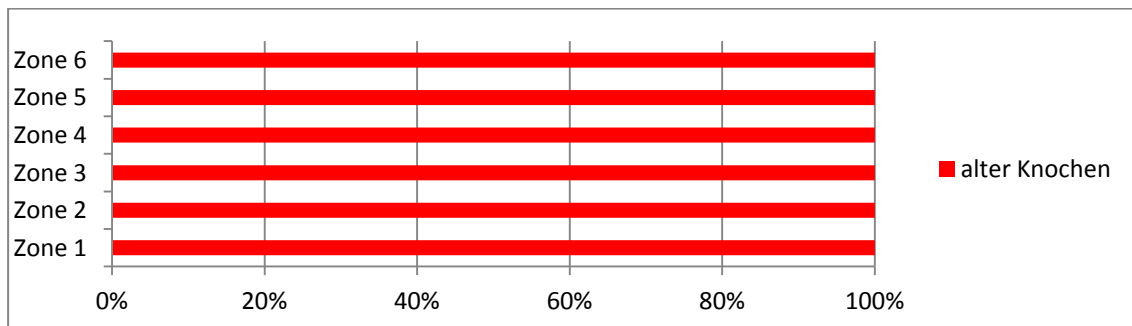


Abbildung 20: Gewebzusammensetzung Tag 3 in der Kontrollgruppe

Prozentuale Verteilung der Gewebearten (neuer Knochen, alter Knochen, Knorpel und Bindegewebe) der Zonen 1-6 (Zone 1: Außenzone ventral, Zone 2: Intermediärzone ventral, Zone 3: Innenzone ventral, Zone 4: Innenzone dorsal, Zone 5: Intermediärzone dorsal, Zone 6: Außenzone dorsal) in der Kontrollgruppe am 3. postoperativen Tag

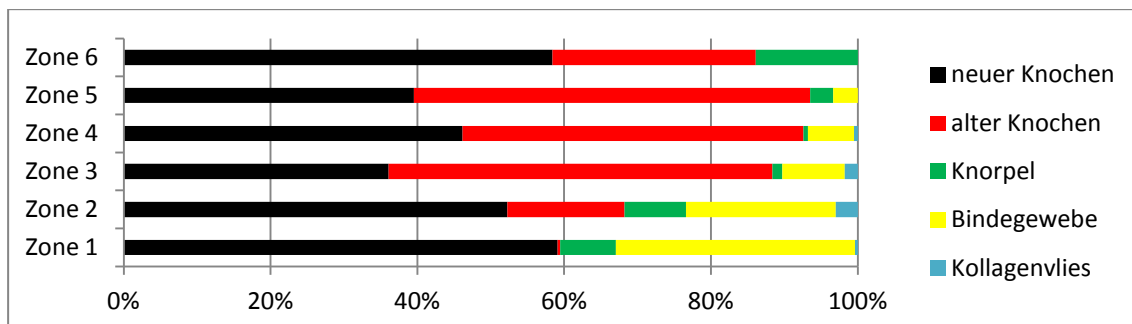


Abbildung 21: Gewebzusammensetzung Tag 14 in der BMP-Gruppe

Prozentuale Verteilung der Gewebearten (neuer Knochen, alter Knochen, Knorpel, Bindegewebe und Kollagenvlies) der Zonen 1-6 (Zone 1: Außenzone ventral, Zone 2: Intermediärzone ventral, Zone 3: Innenzone ventral, Zone 4: Innenzone dorsal, Zone 5: Intermediärzone dorsal, Zone 6: Außenzone dorsal) in der BMP-Gruppe am 14. postoperativen Tag

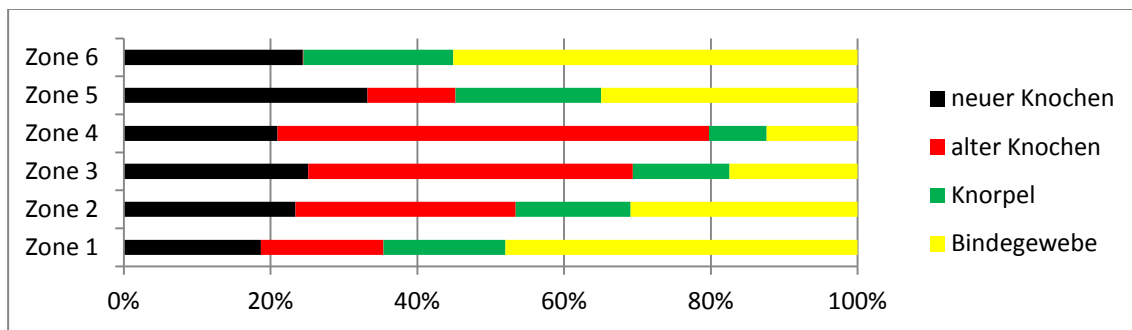


Abbildung 22: Gewebszusammensetzung Tag 14 in der Kontrollgruppe

Prozentuale Verteilung der Gewebearten (neuer Knochen, alter Knochen, Knorpel und Bindegewebe) der Zonen 1-6 (Zone 1: Außenzone ventral, Zone 2: Intermediärzone ventral, Zone 3: Innenzone ventral, Zone 4: Innenzone dorsal, Zone 5: Intermediärzone dorsal, Zone 6: Außenzone dorsal) in der Kontrollgruppe am 14. postoperativen Tag

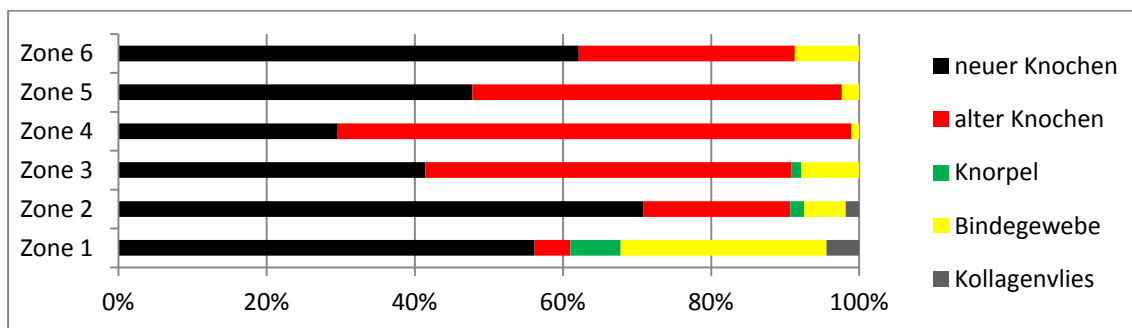


Abbildung 23: Gewebszusammensetzung Tag 42 in der BMP-Gruppe

Prozentuale Verteilung der Gewebearten (neuer Knochen, alter Knochen, Knorpel, Bindegewebe und Kollagenvlies) der Zonen 1-6 (Zone 1: Außenzone ventral, Zone 2: Intermediärzone ventral, Zone 3: Innenzone ventral, Zone 4: Innenzone dorsal, Zone 5: Intermediärzone dorsal, Zone 6: Außenzone dorsal) in der BMP-Gruppe am 42. postoperativen Tag

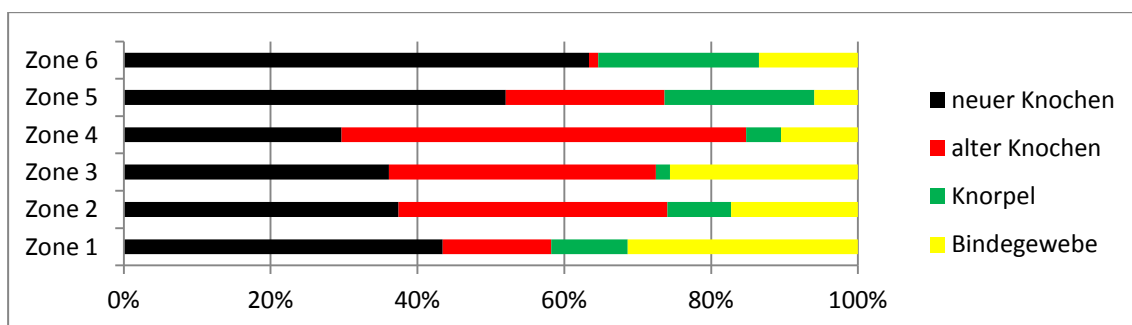


Abbildung 24: Gewebszusammensetzung Tag 42 in der Kontrollgruppe

Prozentuale Verteilung der Gewebearten (neuer Knochen, alter Knochen, Knorpel und Bindegewebe) der Zonen 1-6 (Zone 1: Außenzone ventral, Zone 2: Intermediärzone ventral, Zone 3: Innenzone ventral, Zone 4: Innenzone dorsal, Zone 5: Intermediärzone dorsal, Zone 6: Außenzone dorsal) in der Kontrollgruppe am 42. postoperativen Tag

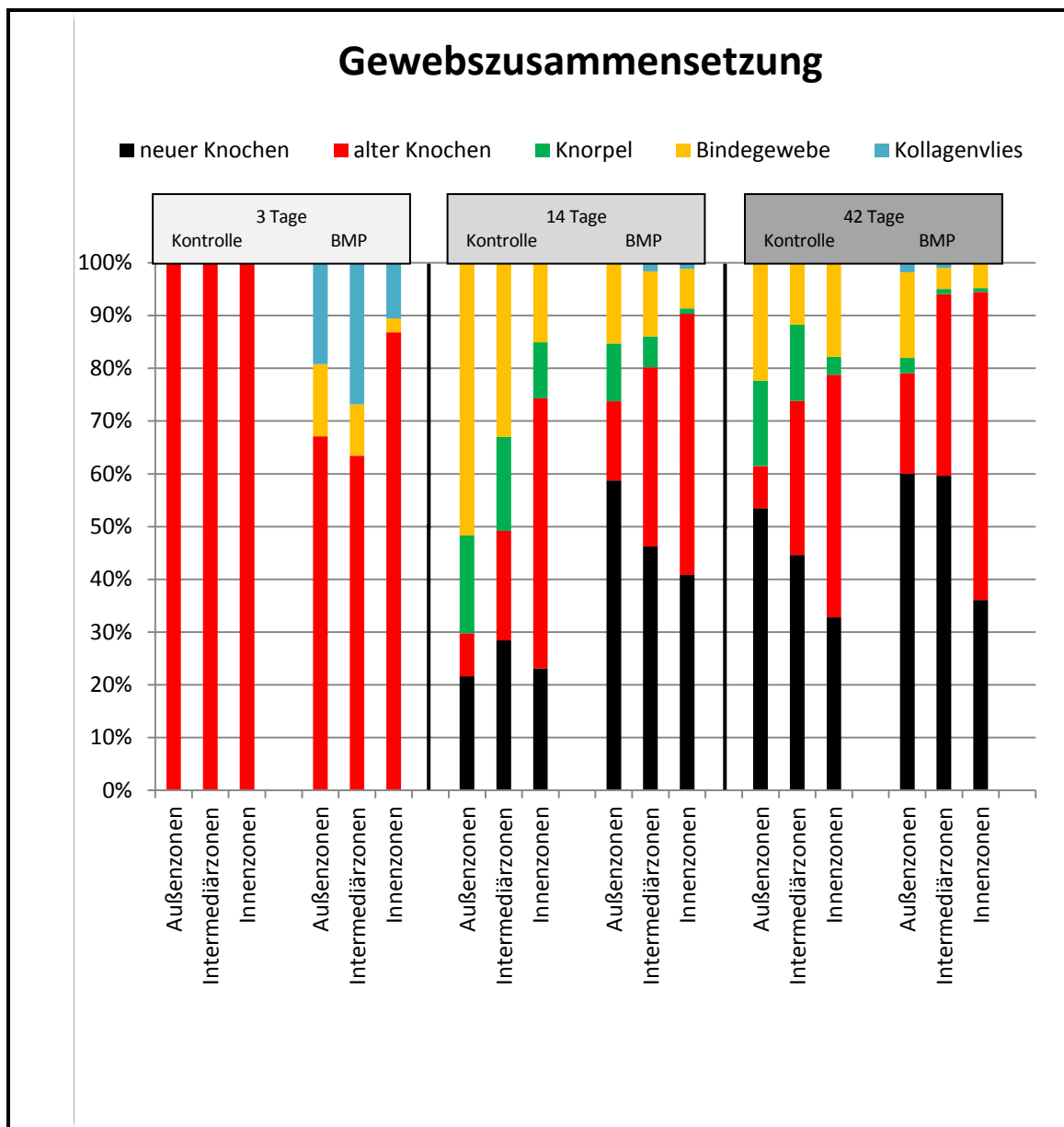


Abbildung 25: Gewebszusammensetzung

Prozentuale Verteilung der Gewebearten (neuer Knochen, alter Knochen, Knorpel, Bindegewebe, Kollagenvlies) am 3., 14. und 42. postoperativen Tag im Vergleich BMP-Gruppe versus Kontrollgruppe, Außenzonen (Zonen 1+6), Intermediärzonen (Zone 2+5), Innenzone (Zone 3+4)

3.3.2 Kallusflächenbestimmung

Die Abbildung 26 gibt den prozentualen Kallusanteil, bezogen auf die gesamte Analysefläche der histomorphometrischen Gewebszusammensetzung, wieder.

Der Vergleich innerhalb der BMP-Gruppe an den Tagen 14 und 42 zwischen dem ventralen und dorsalen Kallus ergibt an beiden Tagen eine signifikante Erhöhung des ventralen Kallusanteils (Tag 14: $p = 0,004$, Tag 42: $p = 0,041$). In der Kontrollgruppe hingegen erbringt der Vergleich zwischen dem ventralen und dorsalen Kallusanteil am 14. und 42. Tag eine signifikante Erhöhung des dorsalen Kallusanteils an beiden Tagen (Tag 14: $p = 0,041$, Tag 42: $p = 0,032$).

Durch die Gegenüberstellung der Kontroll- und BMP-Gruppe hinsichtlich der dorsalen und ventralen Kallusflächen am 14. und 42. Tag kann eine signifikant größere ventrale Kallusfläche in der BMP-Gruppe an beiden Tagen festgestellt werden (Tag 14: $p = 0,002$, Tag 42: $p = 0,004$). Die dorsale Kallusfläche weist bei diesem Vergleich keine Signifikanz auf.

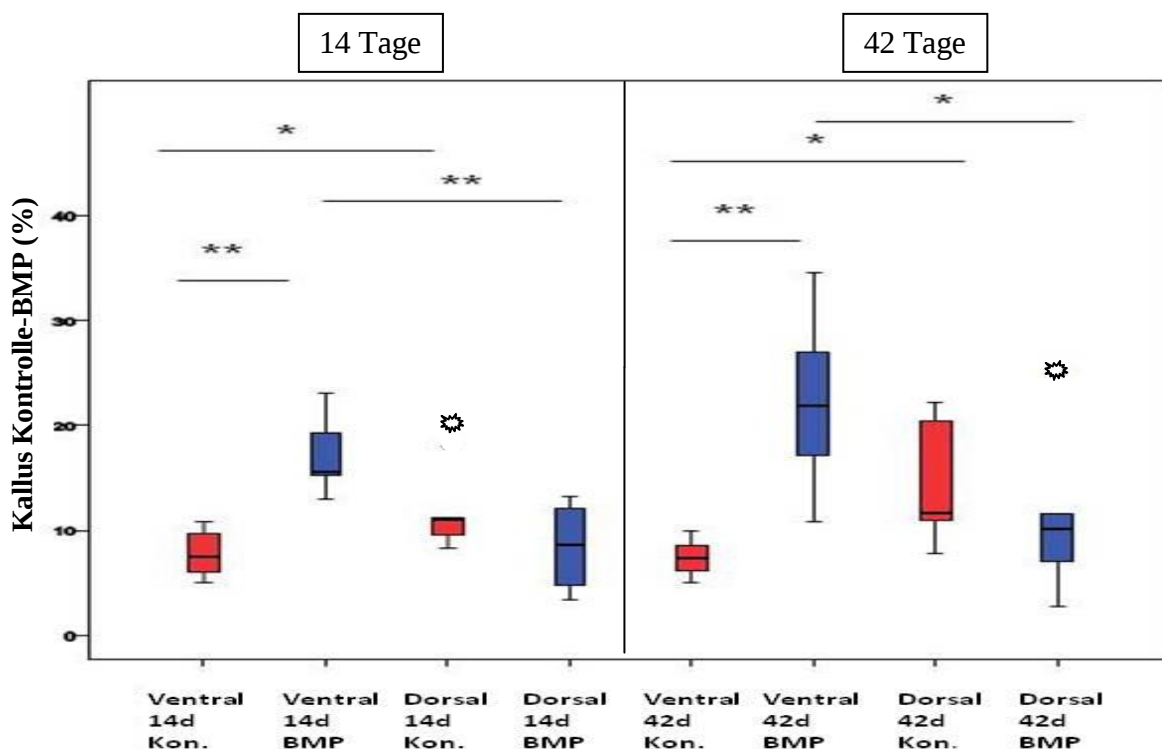


Abbildung 26: Prozentuale Kallusfläche von Kontroll- und BMP-Gruppe in Bezug auf die gesamte Analysefläche der Histomorphometrie

Vergleich Kontrollgruppe (roter Boxplot) und BMP-Gruppe (blauer Boxplot) am 14. und 42. postoperativen Tag sowie Vergleich zwischen dem ventralen und dorsalen Kallusanteil

* bezeichnet einen signifikanten Unterschied bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$

** bezeichnen einen hochsignifikanten Unterschied bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,01$

⚙️ stellen Ausreißer dar

3.4 Histologie der Frakturheilung

3.4.1 Frakturzone

Die Frakturzone der 3-Tage-Tiere kann schlecht beurteilt werden, da das Präparat aufgrund der mangelnden Durchbauung des Frakturspalts sehr instabil gewesen und beim Schneiden entlang des Spaltsgebrochen ist.

Zentral wird die Frakturzone von Knochen und Knochenmark begrenzt. Nach peripher geht sie in die Granulationszone über. Als vorherrschende Zellen sind die im Knochenmark vorkommenden Retikulum-, Fett- und Endothelzellen sowie die Zellen des Blutsystems (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) zu finden. Vereinzelt liegen Knochenspäne in der Frakturzone, die auf die Operationsmethode zurückzuführen sind. Des Weiteren kann ein Leerdefekt in den Präparaten beobachtet werden, der durch das Entfernen des Implantats verursacht worden ist. Ein Unterschied zwischen Kontroll- und BMP-Gruppe ist zu diesem Zeitpunkt nicht zu erkennen.

Bei den 14-Tage-Tieren der BMP-Gruppe (Abbildung 28) können zusätzlich zu den erwähnten Zellen und Geweben Osteozyten und neuer Knochen entdeckt werden. Zudem liegen vereinzelt Chondrozyten am äußeren Rand des nach lateral offenen trichterförmigen Frakturspalts vor. Besonders erhöht sich der Anteil an Chondrozyten bei den Tieren mit verbreitertem Frakturspalt (Abbildung 31/32), aber den größten Anteil von Zellen am peripheren Frakturspalt bilden die Fibroblasten. Der Gefäßdurchmesser ist gegenüber den Gefäßen in der Proliferationszone geringer.

In der Kontrollgruppe liegen mehr Knorpelzellen und Bindegewebszellen vor (Abbildung 27). Der Anteil von Knochenzellen ist geringer. Es liegen viele kleine Gefäße vor.

Bei den 42-Tage-Tieren der BMP-Gruppe schwindet der Bindegewebs- und Knorpelanteil und wird von neuem Knochen ersetzt (Abbildung 30). Die Anordnung der Gewebsanteile ist geordneter als bei den 14-Tage-Tieren und nähert sich stark einer normalen Knochenstruktur an. Die Gefäßmenge nimmt gegenüber dem 14. Tag ab und der Gefäßdurchmesser zu.

Die Kontrollgruppe weist einen höheren Bindegewebs- und Knorpelanteil auf (Abbildung 29).

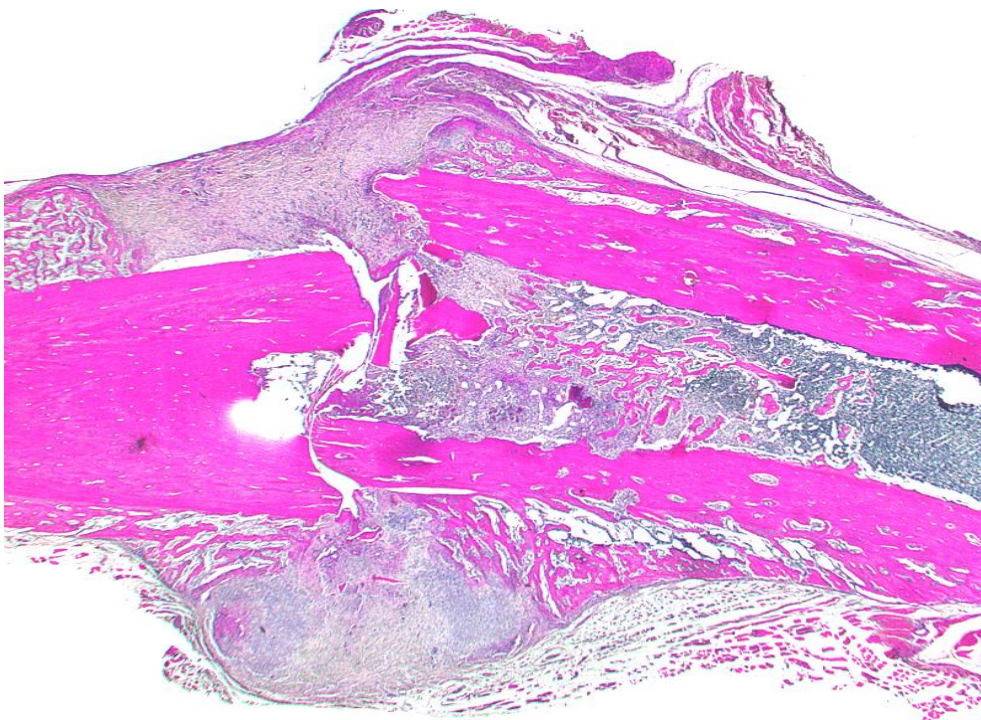


Abbildung 27: Übersichtshistologie Tag 14 Kontrollgruppe
Darstellung des Frakturbereichs am 14. Tag postoperativ in 2,5-facher Vergrößerung, HE

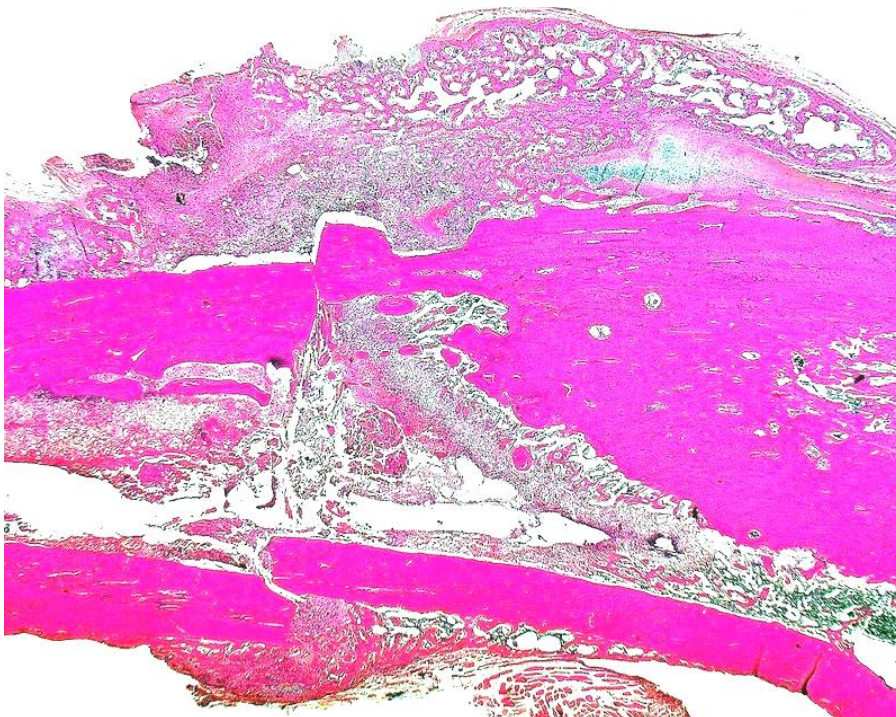


Abbildung 28: Übersichtshistologie Tag 14 BMP-Gruppe
Darstellung des Frakturbereichs am 14. Tag postoperativ in 2,5-facher Vergrößerung, HE

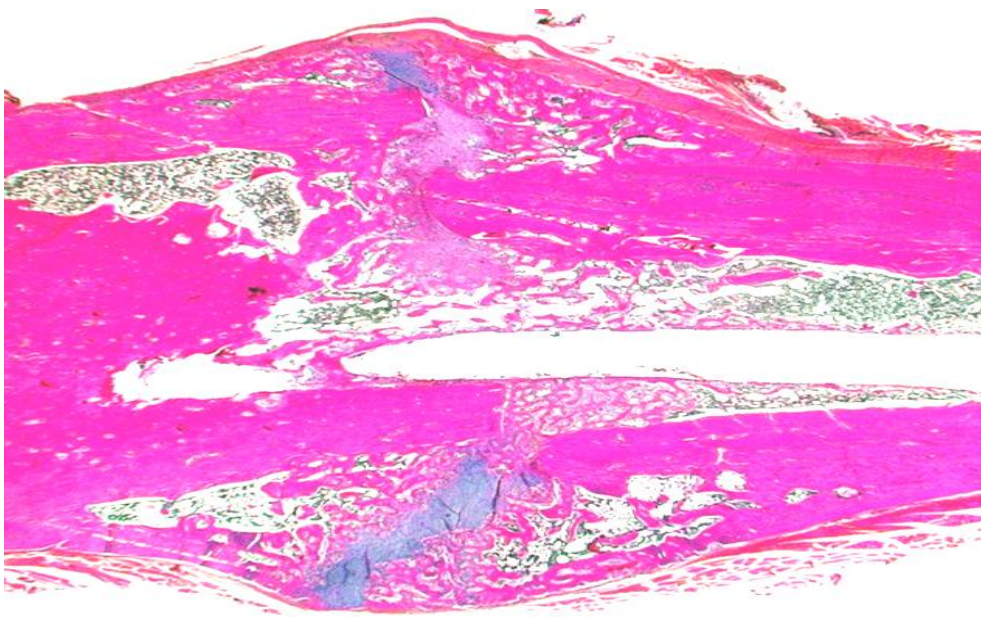


Abbildung 29: Übersichtshistologie Tag 42 Kontrollgruppe
Darstellung des Frakturbereichs am 42. Tag postoperativ in 2,5-facher Vergrößerung, HE

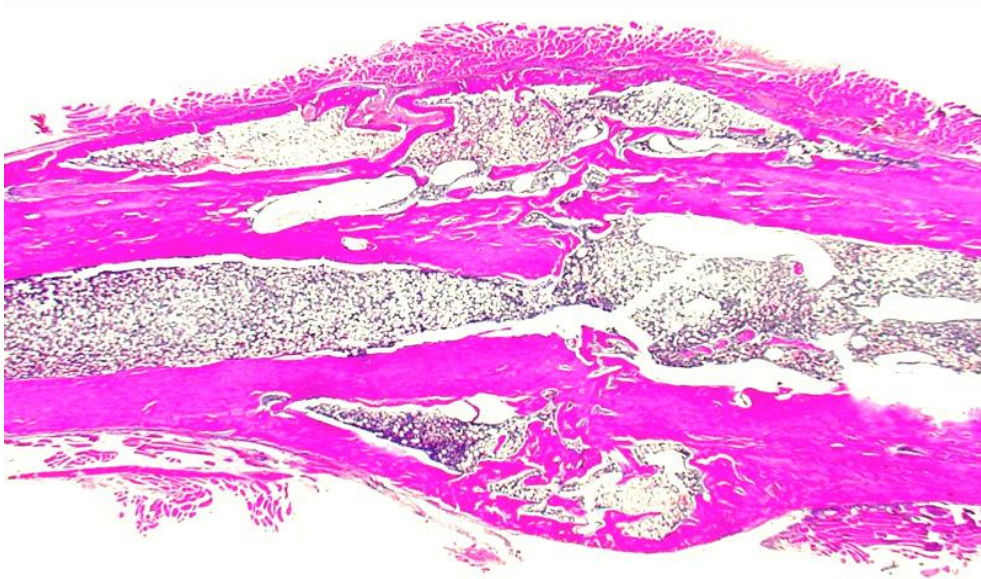


Abbildung 30: Übersichtshistologie Tag 42 BMP-Gruppe
Darstellung des Frakturbereichs am 42. Tag postoperativ in 2,5-facher Vergrößerung, HE

3.4.2 Granulationszone

Die Granulationszone, die die Fortsetzung des lateralen Frakturspaltrands darstellt, besteht am 3. postoperativen Tag der BMP-Gruppe hauptsächlich aus einem Frakturhämatom mit Erythrozyten und eingeströmten Entzündungszellen sowie Bindegewebe mit abgeschilferten Knochenspänen. Vereinzelt können auch Gefäße und Reste des Kollagenvlieses entdeckt werden. Eine Kallusbildung ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht erkennbar.

Die Kontrollgruppe weist mit Ausnahme des nicht vorhandenen Kollagenvlieses und weniger Bindegewebe ein vergleichbares Bild auf.

Die Präparate der BMP-Gruppe des 14. postoperativen Tages (Abbildung 27) zeigen eine große, nach peripher konvexe Zunahme der Granulationszone, die sich aus Binde-, Knorpel- und Knochengewebe zusammensetzt. Auch hier zeichnet sich ein positives Verhältnis zwischen dem zentral befindlichen Knorpelanteil und der Breite des Frakturspalts ab (Abbildung 31/32). Der Knochenanteil ist an den Grenzen zur Proliferationszone am größten und wird zentral in der Granulationszone vom Bindegewebe mit einem hohen Gefäßaufkommen abgelöst. Beim Vergleich zwischen der ventralen und dorsalen Granulationszone erweist sich die ventrale Zone gegenüber der dorsalen Zone größtmäßig überlegen. Demgegenüber kann nachgewiesen werden, dass der Gefäßanteil in der dorsalen Granulationszone höher ist als in der ventralen Zone (Tabelle 8). Das bei den 3-Tage-Tieren beobachtete Hämatom ist vollkommen abgebaut, und die Entzündungszellen haben sich drastisch reduziert. Als Hauptlokalisation der verbliebenen Entzündungszellen kann das zentral gelegene Bindegewebe der Granulationszone ausgemacht werden, sowie mehrkernige Makrophagen bis maximal drei Kernen. Der Kollagenvliesanteil ist im Vergleich zu den anderen Zonen größer. Die Hauptlokalisation des Kollagenvlieses befindet sich am lateralen Rand der ventralen Granulationszone.

In der Kontrollgruppe liegt ebenfalls eine starke Zunahme der Granulationszone vor (Abbildung 27). Die Zone endet in der Peripherie stark konvex. Zudem kann ein höherer Knorpelanteil bei breiteren Frakturspalten gefunden werden. Der Anteil von Chondrozyten und Fibrozyten ist höher, der Anteil an neuem Knochen geringer. Auch hier zeichnet sich das Maximum der Ossifikation innerhalb Granulationszone am Rande der Proliferationszone ab. Im Unterschied zur BMP-Gruppe ist die ventrale

Granulationszone kleiner als die dorsale. Das Gefäßaufkommen liegt deutlich unter dem der BMP-Gruppe (Tabelle 8).

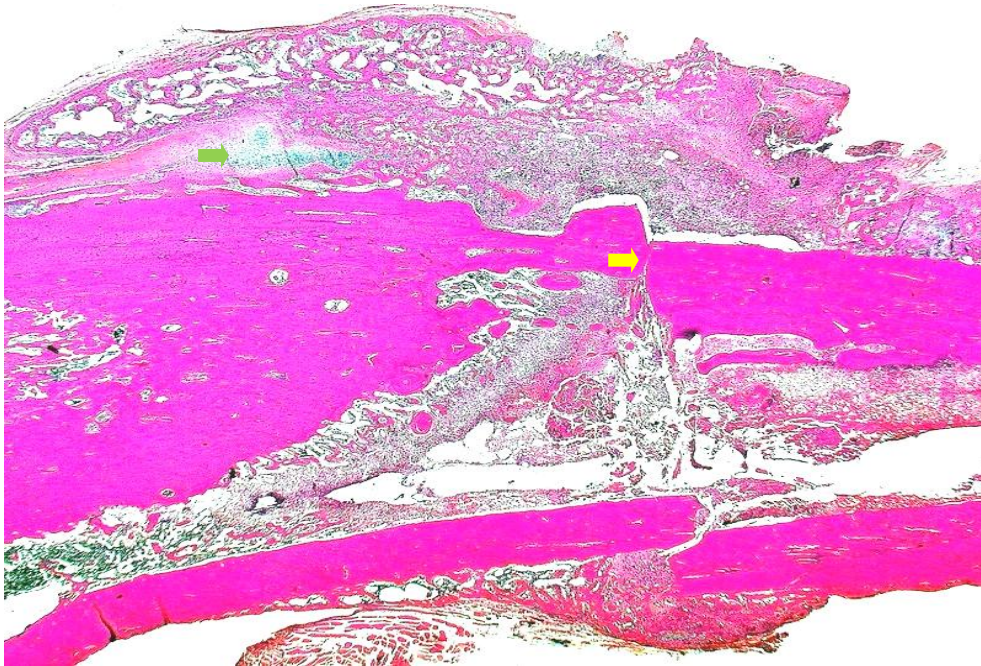


Abbildung 31: Schmalen Frakturspalt eines 14-Tage-Tieres
Der Frakturspalt (gelber Pfeil) stellt sich sehr schmal dar. Knorpelgewebe (grüner Pfeil) lässt sich am äußeren Kallusrand erkennen. Zentral liegt kaum Knorpelgewebe vor. BMP-Gruppe, 2,5-fache Vergrößerung, HE

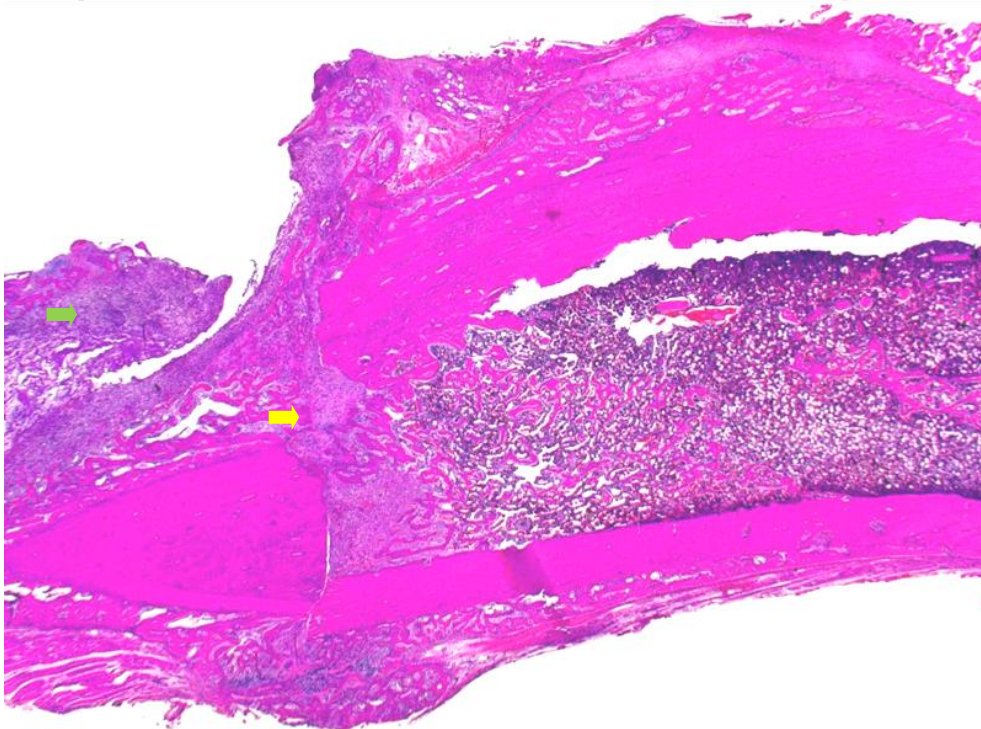


Abbildung 32: Breiter Frakturspalt eines 14-Tage-Tieres
Breiter Frakturspalt (gelber Pfeil), viel Knorpelbildung (grüner Pfeil); BMP-Gruppe, 2,5-fache Vergrößerung, HE

42 Tage nach der Operation hat sich in der BMP-Gruppe die Größe der Granulationszone wieder verringert. Die Peripherie hat sich abgeflacht. Auch der Bindegewebsanteil ist wieder gesunken. Hauptsächlich besteht die Zone aus neuem Knochen sowie vereinzelt Bindegewebs- oder Knochenmarkinseln mit vielen mehrkernigen Makrophagen. Diese Zellen weisen ca. vier bis sechs Kerne auf, wohingegen am 14. Tag nur Makrophagen mit maximal drei Kernen gefunden worden sind. Knorpelgewebe ist sehr selten zu sehen ebenso Anhäufungen von Entzündungszellen.

Das Kollagenvlies ist als solches nicht mehr zu erkennen, jedoch weisen die Präparate eine starke Ansammlung von mehrkernigen Makrophagen auf, die sich vorrangig im ventralen Granulationsgebiet befinden, also an dem Ort, an dem der Vliesanteil am höchsten gewesen ist (Abbildung 33).

Die Kontrollgruppe weist einen höheren Anteil an Knorpel- und Bindegewebszellen auf. Die Granulationszone ist im Verhältnis zur BMP-Gruppe größer. Mehrkernige Makrophagen sind vereinzelt an Knocheninseln zu sehen und besitzen meist zwei bis drei Kerne.

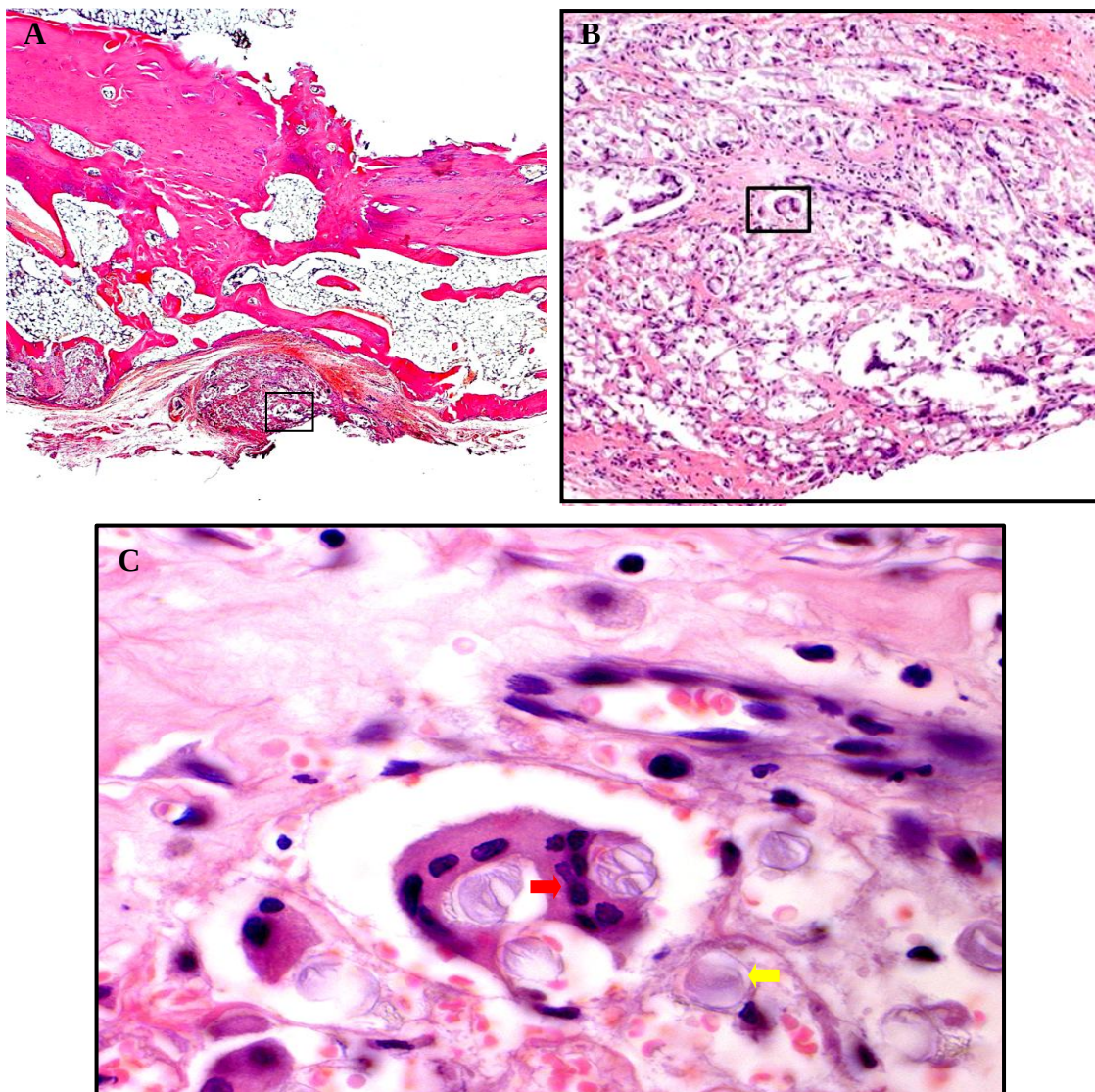


Abbildung 33: Frakturbereich in Nachbarschaft zum Kollagenvlies am 42. postoperativen Tag der BMP-Gruppe

A: Links und rechts oben alter Knochen, dazwischen verknöcherter Frakturspalt, nach unten angrenzender Kallus mit großen Knochenmarkinseln und neuem Knochen, am unteren Rand des Kallus Bindegewebsanhäufung; BMP-Gruppe, 2,5-fache Vergrößerung, HE

B: Ausschnitt aus der Granulationszone am 42. postoperativen Tag, Vergrößerung der Bindegewebsanhäufung am Kallusrand, auffällig sind große Zellansammlungen. BMP-Gruppe, 10-fache Vergrößerung, HE

C: Ausschnitt aus Granulationszone am 42. postoperativen Tag, mehrkerniger Makrophag (roter Pfeil) bei der Aufnahme von Resten des Kollagenvlieses (gelber Pfeil). Des Weiteren sind Bindegewebszellen, Gefäße und Erythrozyten abgebildet. BMP-Gruppe, 100-fache Vergrößerung, HE

3.4.3 Proliferationszone

Die Proliferationszone ist die seitliche Fortsetzung der Granulationszone und beinhaltet in der BMP-Gruppe am 3. postoperativen Tag normales Knochengewebe. Oberhalb des Periosts sind die Ausmaße des Frakturhämatoms und Entzündungsreaktionen wie der Einstrom von Leukozyten zu erkennen. Zusätzlich werden Fibroblasten und das Kollagenvlies nachgewiesen. Zudem liegen im Verhältnis zu den anderen Zonen in der Proliferationszone mehr Gefäße (Tabelle 8), und ein größeres Gefäßvolumen vor.

In der Kontrollgruppe ist ebenfalls ein Frakturhämatom mit umgebender Entzündungsreaktion nachgewiesen. Fibroblasten sind weniger vorhanden. Gefäße sind nicht zu erkennen.

14 Tage nach der Operation ist die ventrale Proliferationszone der BMP- Gruppe größer als die dorsale. Die periostale Verknöcherung geht vom lateralen Anteil der Proliferationszone aus und setzt sich nach zentral in Richtung der Granulationszone fort, während in der Granulationszone meist noch keine periostale Verbindung zwischen neuem und altem Knochen besteht (Abbildung 34). Zwischen den neugebildeten Knochen befinden sich wie in der Granulationszone Anteile von Knochenmark- und Bindegewebsinseln. Das vorherrschende Zellbild am 14. Tag wird von Osteoblasten, mehrkernigen Makrophagen, Fettzellen und Fibrozyten geprägt. Der Bindegewebsanteil ist besonders in der zentral gelegenen Proliferationszone groß, wohingegen der Knochenmarkanteil im neugebildeten Knochen in der Peripherie verstärkt auftritt.

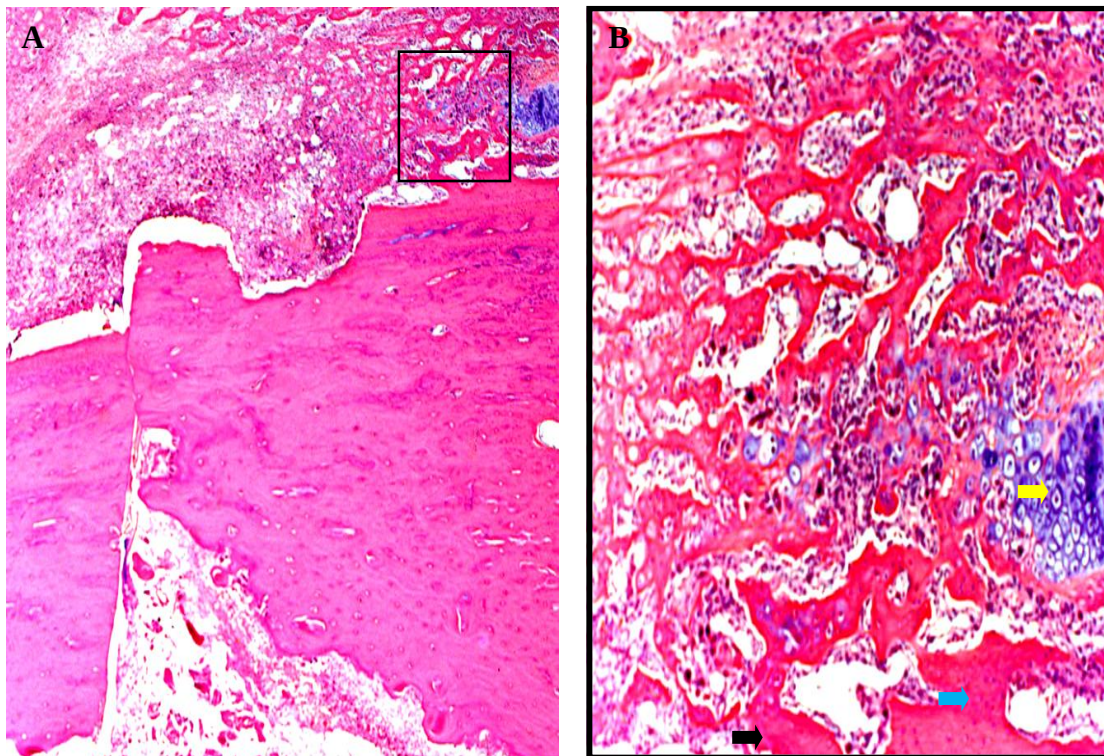


Abbildung 34: Ausschnitt aus der Proliferationszone eines 14- Tage-Tieres der BMP-Gruppe

A: Darstellung der Gewebsanteile des Kallus am 14. postoperativen Tag, zentral am Frakturspalt und in der Granulationszone großer Anteil an Bindegewebe, in der Peripherie und Proliferationszone großer Anteil von neuem Knochen und Knochenmark, Vorliegen von periostalen Verbindungen zwischen neuem und altem Knochen in der Proliferationszone. Keine knöcherne Verbindung zwischen altem Knochen und Bindegewebe in der Granulationszone; BMP-Gruppe, 2,5-fache Vergrößerung, HE

B: Ausschnitt der lateralen Proliferationszone eines 14-Tage-Tieres; alter Knochen (schwarzer Pfeil), periostale Knochenausläufer (gelber Pfeil), Knorpelzellen (gelb Pfeil), Bindegewebsinseln, von neuem Knochen umgeben (blauer Pfeil); BMP-Gruppe, 10-fache Vergrößerung, HE

Der Knorpelanteil in der Proliferationszone, bezogen auf den Durchschnitt der beurteilten Präparate, ist gering, lediglich am lateralen Kallusrand und somit meist außerhalb der Proliferationszone liegen Anteile von Knorpelgewebe vor.

Allgemein kann festgestellt werden, dass die Hauptlokalisation der Knorpelbildung zentral, frakturspaltnah liegt und eine positive Korrelation zwischen Frakturspaltbreite und Knorpelmenge besteht.

In der Kontrollgruppe befinden sich mehr Fibroblasten und Chondrozyten, hingegen gibt es weniger mehrkernige Makrophagen und Osteoblasten. Auch das Gefäßaufkommen ist geringer. Die Hauptlokalisationen für das Knorpelgewebe und der Beginn der Ossifikationen sind identisch.

Am 42. postoperativen Tag der BMP-Gruppe ist die Proliferationszone weiterhin ventral größer, aber im Vergleich zum 14. Tag etwas kleiner. Der Kallus ist besonders in der Peripherie weitestgehend verknöchert und gegenüber dem 14. postoperativen Tag stark abgeflacht und breitbasiger (Abbildung 35/36). Zentral im Kallus kann in den meisten Schnitten ein großer Anteil Knochenmark verifiziert werden. Bindegewebe, Knorpel und Gefäße sind im Vergleich zum 14. postoperativen Tag kaum vorhanden (Tabelle 8), jedoch ist das Volumen der Gefäße größer.

In der Kontrollgruppe kann auch eine Kallusabflachung verzeichnet werden (Abbildung 27). Fibroblasten und Chondroblasten sind im Vergleich zur BMP-Gruppe in höherer Anzahl vorhanden. Auch die Gefäßdichte ist in der Kontrollgruppe deutlich höher.

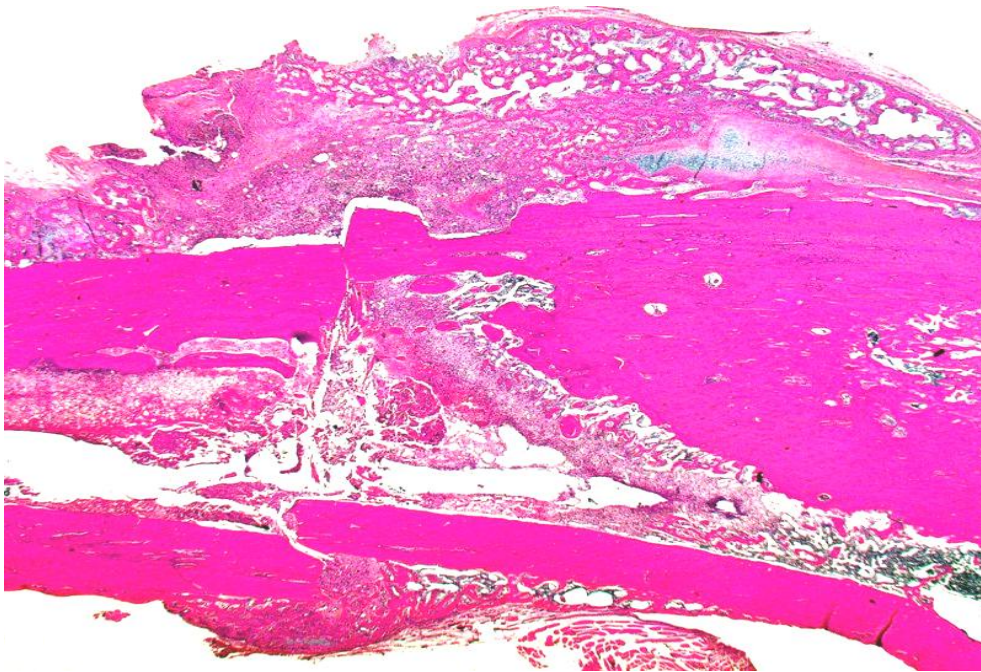


Abbildung 35: Kallus 14 Tage postoperativ

Darstellung der Gewebsanteile des Kallus 14 Tage postoperativ, Kallus mit hohem Bindegewebsanteil, Frakturspalt noch nicht knöchern durchbaut, auf der oberen Seite keine knöchernen Verbindung zwischen Granulationszone und Kallus; BMP-Gruppe, 2,5-fache Vergrößerung, HE

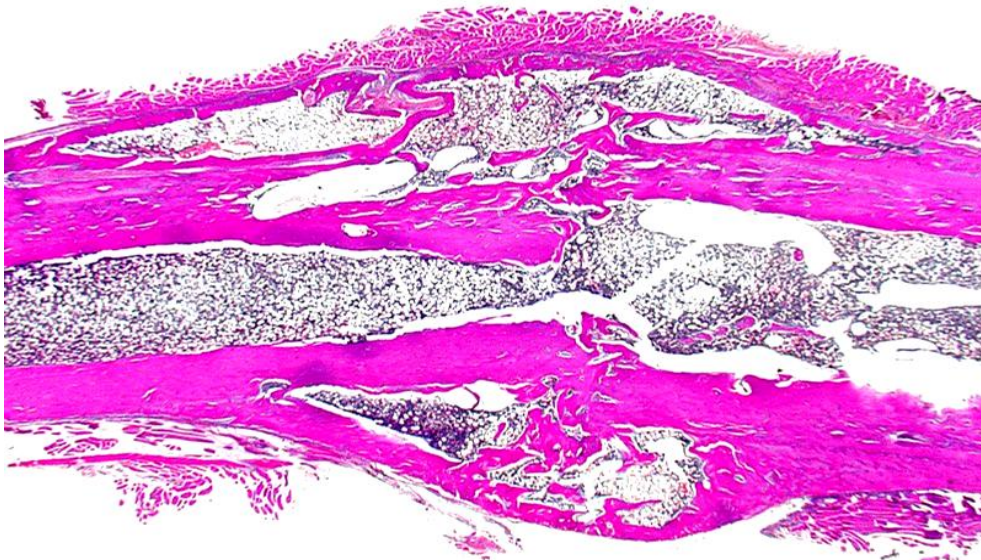


Abbildung 36: Kallus 42 Tage postoperativ

Darstellung der Gewebsanteile des Kallus 42 Tage postoperativ, Kallus überbrückt komplett den Frakturspalt, Frakturspalt knöchern durchbaut; BMP-Gruppe, 2,5-fache Vergrößerung, HE

3.4.4 Kollagenvlies

Besonderes Augenmerk wird dem Kollagenvlies gewidmet (Abbildung 37). Es stellt sich histologisch am 3. Tag als lockeres Kollagennetz dar, nur vereinzelt liegen Zellen zwischen dem Kollagen. Die Fasern des Vlieses sind dick und glatt begrenzt.

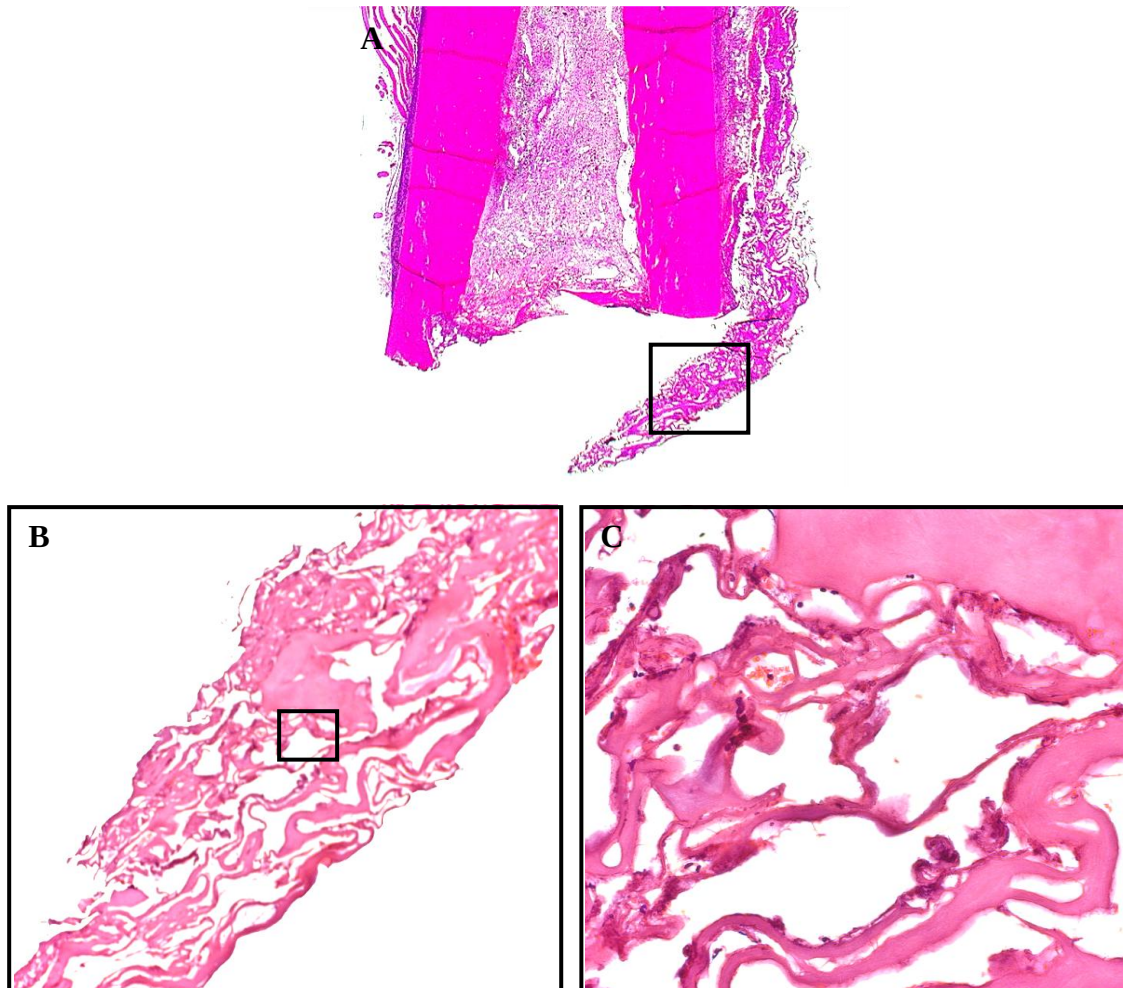


Abbildung 37: Kollagenvliesdarstellung 3 Tage postoperativ

A: Die Abbildung zeigt das Kollagenvlies 3 Tage nach der Implantation. BMP-Gruppe, 2,5-fache Vergrößerung, HE

B: Lockeres Kollagenvlies aus dicken, glatt begrenzten Fasern; BMP-Gruppe, 10-fache Vergrößerung, HE

C: Vereinzelt liegen Zellen um das Vlies. BMP-Gruppe, 40-fache Vergrößerung, HE

Werden diese Schnitte mit einem Präparat des 14. postoperativen Tages verglichen, so zeigt sich das Vlies im stark resorbierten Zustand, dünn und ausgefasert. Auch ein Einstrom von Zellen lässt sich am 14. postoperativen Tag erkennen (Abbildung 38). Bindegewebs- und Knocheninseln sind um das Vlies entstanden, Gefäße sind eingesprossen, und Fibrozyten haben sich, dicht gepackt, eingelagert. Um dieses Gebilde kann keine Gewebsreaktion erkannt werden wie eine vermehrte Ansammlung von Entzündungszellen oder eine Anhäufung von speziellem Gewebe, lediglich eine Zunahme von Kapillaren kann ermittelt werden (Tabelle 8) sowie eine Ansammlung von mehrkernigen Makrophagen und Osteoblasten.

Am 42. postoperativen Tag befinden sich in den Präparaten keine vliesartigen Strukturen mehr, jedoch zeigen sich in einigen Schnitten runde Gebilde, die hauptsächlich in der ventralseitigen Granulationszone lokalisiert sind. Diese runden Strukturen stellten Reste des Kollagenvlieses dar und sind von vielen mehrkernigen Makrophagen und Bindegewebszellen umgeben (Abbildung 33). Vermehrt können auch Gefäße um die Reste des Vlieses gefunden werden sowie neugebildetes Osteoid.

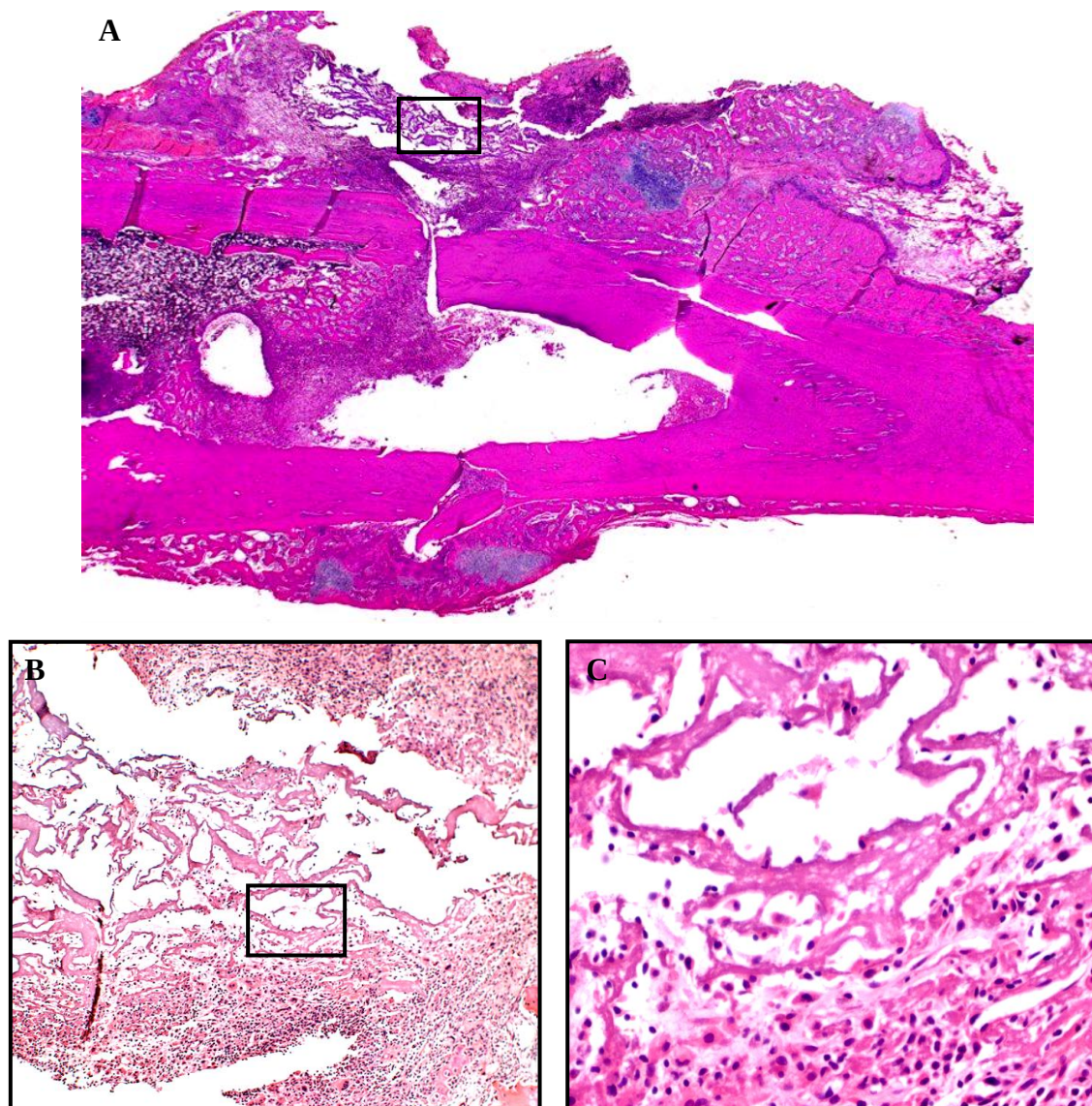


Abbildung 38: Kollagenvliesdarstellung 14 Tage postoperativ

A: Ansicht des teilresorbierten Kollagenvlieses in der Granulationszone am 14.postoperativen Tag; Zusätzlich sind zentral gelegene Knorpelzellen bei großem Frakturspalt sichtbar. BMP-Gruppe, 2,5-fache Vergrößerung, HE

B: Kollagenvlies 14 Tage postoperativ; BMP-Gruppe, 10-fache Vergrößerung, HE

C: Kollagenvlies 14 Tage postoperativ; BMP-Gruppe, 40-fache Vergrößerung, HE

3.5 Semiquantitative Bestimmung der Blutgefäßneubildung

Die hier aufgeführten Gefäßanzahlen zeigen Mittelwerte inklusive Standardabweichung dreier Auszählungen pro Versuchstier (Tabelle 8 und Abbildung 39). Die Gefäßzählungen sind für den 3., 14. und 42. postoperativen Tag für die Kontrollgruppe und BMP-Gruppe und für folgende Bereiche erhoben worden:

- Frakturzone (FZ), entspricht dem Frakturspalt
- Granulationszone ventral (GZ ventral) der Frakturzone
- Granulationszone dorsal (GZ dorsal) der Frakturzone
- Proliferationszone proximal (PZ proximal) der Frakturzone
- Proliferationszone distal (PZ distal) der Frakturzone
- Zusammenschluss von Frakturzone und Granulationszonen (FZ & GZ)

3.5.1 Vergleich zum Zeitpunkt Tag 3, Tag 14 und Tag 42

Beim Vergleich zwischen der Kontroll- und der BMP-Gruppe zeigt sich am 3. postoperativen Tag in der distalen Proliferationszone der BMP-Gruppe ein signifikant höheres Gefäßaufkommen als in der Kontrollgruppe ($p = 0,037$). Vergleiche der anderen Zonen am 3. postoperativen Tag können keine Signifikanz nachweisen, [proximale Proliferationszone ($p = 0,126$), Granulationszone ventral ($p = 0,125$), Granulationszone dorsal ($p = 0,816$), Frakturzone ($p = 0,126$), Frakturzone und Granulationszone ($p = 0,924$)].

Bei der statistischen Untersuchung der Präparate des 14. postoperativen Tages können hochsignifikante Unterschiede in den Bereichen der dorsalen Granulationszone ($p = 0,002$), im Zusammenschluss der Fraktur- und Granulationszonen ($p = 0,009$) sowie ein signifikanter Unterschied in der distalen Proliferationszone ($p = 0,041$) nachgewiesen werden. In diesen genannten Zonen liegt in der BMP-2-Gruppe, verglichen mit der Kontrollgruppe, eine erhöhte Blutgefäßneubildung vor. Keine signifikanten Unterschiede bestehen in der Frakturzone ($p = 0,589$), der ventralen Granulationszone ($p = 0,178$) und der proximalen Proliferationszone ($p = 0,337$).

Die Testverfahren können beim Gefäßvergleich zwischen dem 42. postoperativen Tag der BMP-Gruppe und der Kontrollgruppe in keiner Zone ein signifikantes Ergebnis verzeichnen.

Frakturzone ($p = 0,347$), proximale Proliferationszone ($p = 0,118$), distale Proliferationszone ($p = 0,117$), Granulationszone ventral ($p = 0,222$), Granulationszone dorsal ($p = 0,175$), Frakturzone und Granulationszone ($p = 0,602$).

3.5.2 Vergleich des zeitlichen Verlaufs

Zur Analyse der longitudinalen Entwicklung der Blutgefäßneubildung für die BMP-Gruppe lässt sich konstatieren, dass sich bereits nach drei Tagen erste Blutgefäße, vor allem in der Proliferationszone zeigen. Nach 14 Tagen ist eine signifikante Zunahme mit deutlicher Erhöhung des Gefäßaufkommens in allen sechs Zonen zu verzeichnen (3 Tage vs. 14 Tage: FZ: $p=0,008$; GZ ventral: $p=0,004$; GZ dorsal: $0,004$; PZ proximal: $0,004$; PZ distal: $0,004$; FZ & GZ: $0,004$)

Nach 42 Tagen verringert sich die Anzahl der Blutgefäße in signifikantem Ausmaß in allen Zonen bis auf die Frakturzone (14 Tage vs. 42 Tage: FZ: $p=0,081$; GZ ventral: $p=0,008$; GZ dorsal: $0,004$; PZ proximal: $0,004$; PZ distal: $0,004$; FZ & GZ: $0,004$).

Im Vergleich der 3-Tage- mit den 42-Tage-Ergebnissen lassen sich signifikante Zunahmen in der Blutgefäßneubildung für alle Zonen finden (FZ: $p=0,008$; GZ ventral: $p=0,009$; GZ dorsal: $0,016$; PZ proximal: $0,008$; PZ distal: $0,016$; FZ & GZ: $0,008$). Somit liegt die stärkste Blutgefäßformation an Tag 14 vor.

Zonen	Gruppen	3 Tage	p=	14 Tage	p=	42 Tage	p=
Frakturzone	Kontrolle	0 ± 0	0.126	219±51	0.589	50±44	0.347
	BMP	0,3± 0,8		225±208		19±9	
Granulationszone ventral	Kontrolle	0,2±0,4	0.125	63±29	0.178	33±24	0.222
	BMP	0,04±0,2		179±95		17±14	
Granulationszone dorsal	Kontrolle	0,2±0,5	0.816	44±19	**0.002	30±48	0.175
	BMP	0,8±2		314±200		29±16	
Proliferationszone distal	Kontrolle	0±0	*0.037	105±61	*0.041	132±72	0.117
	BMP	8±20		273±164		44±13	
Proliferationszone proximal	Kontrolle	0±0	0.126	155±100	0.337	103±55	0.118
	BMP	7±7		226±154		40±21	
Frakturzone & Granulationszone	Kontrolle	0,6±03	0.924	322±82	**0.009	113±78	0.602
	BMP	1±2		717±390		65±24	

Tabelle 8: Mittelwerte des Gefäßaufkommens

Mittelwerte und Standardabweichungen der Gefäßanzahlen bei der BMP- und Kontrollgruppe in den jeweiligen Zonen, Mittelwerte und Standardabweichungen aus sechs Ratten sowie drei Schnitten/Ratte

p=Signifikanzwerte

*signifikante Unterschiede

**hochsignifikante Unterschiede

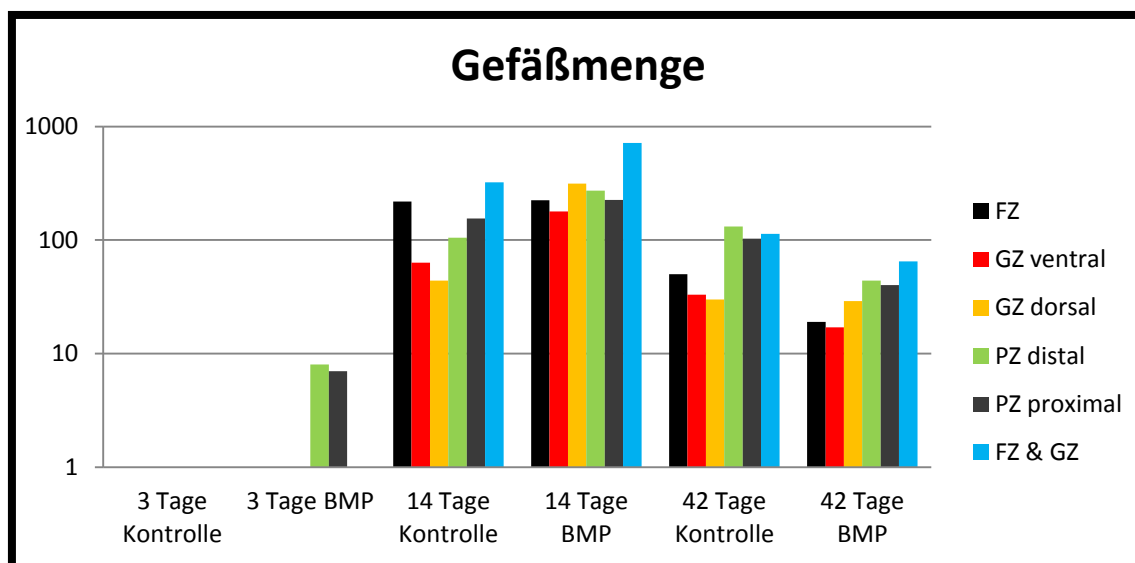


Abbildung 39: Gefäßmenge in logarithmischer Darstellung

Mittelwert der Gefäßanzahl in den jeweiligen Zonen

Abkürzungen: Frakturzone (FZ), Granulationszone (GZ), Proliferationszone (PZ), Frakturzone und Granulationszone (FZ & GZ). x-Achse: Gruppen, y-Achse: absolute Gefäßanzahl

4. Diskussion

4.1 Verwendetes Tiermodell

Als Tiermodelle sind bei der vorliegenden Studie männliche 16 Wochen alte Charles River-Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von 500 g verwendet worden. Ratten gehören zu einer anerkannten Spezies, um Knochenheilungsprozesse zu untersuchen, da sie im Unterschied zu höheren Säugetieren eine geringere Abhängigkeit von der Art und dem Ort der Applikation von Knochenersatzstoffen sowie von Immunsuppressiva und Antibiotika aufweisen (Thielemann, 1989). Somit sind Ratten unempfindlicher gegenüber der in der Studie angewendeten Methodik. Auch wenn höhere Säugetiere wie das Schwein dem menschlichen Gefäßsystem und der Frakturheilung ähnlicher sind, ist aufgrund der hohen Kosten, der schwierigeren Haltung und der höheren Abhängigkeit vom Applikationsverhalten auf deren Verwendung verzichtet worden.

Als Geschlecht ist die männliche Spezies gewählt worden. Männliche Ratten sind mit Beginn der Geschlechtsreife hormonell stabiler, daher ausgeglichener und strapazierfähiger als die Weibchen. Die männlichen Ratten sind im Vergleich zu den Weibchen etwa doppelt so groß und weisen größere Blutgefäße auf, wodurch sie für die Operation und für die Untersuchungen des Gefäßsystems geeigneter erscheinen.

Das Eintrittsalter der Ratten ist mit 16 Wochen angesetzt worden. Zu diesem Zeitpunkt sind die Ratten geschlechtsreif und haben die neonatalen osteoinduktiven Einwirkungen verloren. Schon Fleet hat in seiner Studie über den Einfluss des Rattenalters und der osteoinduktiven Wirkungen des rh-BMP den Beweis erbracht, dass bis zum 3. Lebensmonat ein starker Einfluss zwischen Applikationsort und Alter der Ratten besteht. Nach dem 3. Monat verringert sich dieser Einfluss stark. Als Ursache des sinkenden Einflusses wird eine Abnahme der BMP-abhängigen Zellen vermutet (Fleet, 1996).

4.2 Korrelation von Angiogenese und Frakturheilung

Für eine effiziente Frakturheilung ist die Osteo- und Angiogenese essenziell. Cooke definiert die Angiogenese als Gefäßneubildung aus bestehenden Gefäßen, die über Sprossung oder Teilung der Gefäße erfolgt (Cooke, 2003). Ohne sie ist eine physiologische Frakturheilung nicht möglich. Denn nur dort, wo genügend Nährstoffe, Sauerstoff, Hormone und spezifische Zellen vorhanden sind, kann eine effiziente Heilung

stattfinden. Ist bei einer Fraktur noch eine ausreichende Vaskularisierung vorhanden, so beginnen die Reparationsarbeiten mit einer Kallusbildung am Frakturort. Ist die Durchblutung nicht ausreichend, kann sich der Kallus nicht frühzeitig an den Frakturrenden aufbauen, und es entsteht eine Knochenbruchheilungsstörung. Von der Ferne einsprossende Gefäße werden durch die mangelnde Stabilisierung wieder zerrissen. Wachstumsfaktoren, Zellen und Nährstoffe können nicht in das Frakturgebiet vordringen, und Pseudarthrosen entstehen (Schenk et al., 1977).

Die Angiogenese ist nicht nur für die Geschwindigkeit und Effizienz der Frakturheilung verantwortlich, sondern auch für die Zusammensetzung der Gewebearten innerhalb des Kallus. So wird beispielsweise bei einer mangelnden Durchblutung eher Knorpel als Knochen gebildet, weil Knorpel resistenter gegen eine schlechte Vaskularisierung ist (Schenk et al., 1977). Auch der Aufbau des Geflechtknochens ist abhängig von der Vaskularisierung, da die Kapillaren als Leitstruktur der Knochenanbauten genutzt werden (Cornell et al., 1992). Reguliert wird die Angiogenese durch zahlreiche Wachstumsfaktoren, die pro- oder antiangiogen wirken, denn auch eine zu starke Vaskularisation kann zu Heilungsstörungen durch vermehrte Knochenresorption führen (Chen et al., 1994). Folglich ist die Balance aus fördernden und hemmenden Faktoren wie bei so vielen Prozessen von entscheidender Wichtigkeit. Viele der angiogenen Wachstumsfaktoren stimulieren nicht nur die Angiogenese, sondern haben auch einen großen Einfluss auf die Osteogenese (Kanczler et al., 2008). Zu ihnen gehört VEGF, einer der wichtigsten Gefäßwachstumsfaktoren. Er fördert die Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten, ist beteiligt am trabekulären Aufbau der Knochen und initiiert die Aussprossung der Gefäße. Aber auch in erster Linie osteogene Faktoren wie das knochenbildende Prostaglandin E₂ können das Gefäßwachstum stimulieren, da es zusätzlich die Produktion von VEGF fördert und somit die Angiogenese vorantreibt (Barleon et al., 1996). Auch die Osteoblasten sind in der Lage, die VEGF-Produktion zu erhöhen. Diese Aufzählung von einander stimulierenden Prozessen lässt erkennen, dass eine starke Interaktion zwischen Osteo- und Angiogenese herrscht, die besonders bei einer physiologischen Frakturheilung zum Tragen kommt.

Werden in dieser Studie die Stadien der Frakturheilung betrachtet, so findet die Angiogenese vor allem in der Entzündungs- und Granulationsphase statt und sinkt bei

vorangeschrittener Frakturheilung wieder. Zu Beginn der Heilung bilden die im Frakturhämatom befindlichen Zellen Wachstumsfaktoren und Zytokine und leiten somit die Zellproliferation ein, die insbesondere von Endothelzellen und Osteoblasten ermöglicht wird. Der Nährstoffbedarf ist durch die massiven Reparationsvorgänge erhöht. Eine gute Durchblutung wird benötigt, um die Gefäßbildung anzuregen. In der Spätphase der Frakturheilung, dem Remodeling, wird der Knochen vom Geflecht- in einen Lamellenknochen umgebaut. Die Blutversorgung gleicht sich dem alten Knochengewebe an, und die Gefäßneubildung geht zurück.

Eine Analyse der drei Frakturzonen (Proliferationszonen, Granulationszonen, Frakturzone) ergibt, dass das Gefäßwachstum den Ursprung in der Peripherie (Proliferationszone) hat und sich nach zentral in Richtung Granulationszone fortsetzt. In der Peripherie sind noch intakte Gefäße vorhanden, in denen Wachstumsfaktoren, Zellen und Zytokine durch das Blut zuerst ankommen. Dort können sie direkt ihre Wirkung entfalten. Gefäße werden wieder instand gesetzt und neue werden gebildet. Die Ausrichtung des Gefäßwachstums und der Angiogenese geht in Richtung des Frakturzentrums, an den Ort, an dem die Durchblutung am schlechtesten und der Zell- und Nährstoffbedarf am höchsten ist. Gegen Ende der Frakturheilung nehmen die Reparationsarbeiten und Proliferationen ab, der Zellumsatz reduziert sich, somit sinkt der Durchblutungsbedarf. Die Blutgefäßanzahl reduziert sich, im Gegenzug steigt der Blutgefäßezindurchmesser.

Das Gewebe des höchsten Gefäßaufkommens in den drei Zonen ist das Bindegewebe. Es wird im Verlauf der Frakturheilung vom kompakten Knochen langsam von peripher nach zentral verdrängt, und die Gefäßmenge im Bindegewebe sinkt zum Ende der Frakturheilung (42. postoperativer Tag). Das Bindegewebe ist der Ausgang für die frühe desmale Ossifikation, die vornehmlich bei der Frakturheilung in der Peripherie stattfindet (Einhorn, 1998). Dementsprechend ist eine gute Durchblutung des Bindegewebes besonders in der Frühphase der Frakturheilung notwendig. Im fortgeschrittenen Stadium der Frakturheilung findet zentral in der Frakturzone hauptsächlich eine enchondrale Ossifikation statt (Einhorn, 1998). Somit kann auch das erhöhte Aufkommen von Knorpelgewebe in der Frakturzone erklärt werden. Auch eine geringe Vaskularisierung führt zu einer verstärkten Knorpelbildung. Liegt eine Mangeldurchblutung vor, wird Knorpelgewebe anstelle von Knochengewebe gebildet, da es gegenüber einer

schlechteren Vaskularisation weniger anfällig ist. Folglich ist das Gewebe mit dem geringsten Gefäßaufkommen in allen drei Zonen das Knorpelgewebe. Auch eine mangelnde Stabilisierung der Fraktur kann zu einem Zerreißen von Blutgefäßen führen und somit zu einer mangelnden Durchblutung und einer erhöhten Knorpelbildung (Schenk et al., 1977). In der Frakturzone sind zwar durch die Fraktur die meisten Gefäße zerstört worden, was zu einer Minderdurchblutung führt, aber am 14. postoperativen Tag liegt bei der physiologischen Frakturheilung in dieser Zone die höchste Angiogeneserate vor. Ein Grund hierfür ist der Durchmesser der Gefäße. In der Frakturzone ist der Gefäßdurchmesser im Verhältnis kleiner als in der Proliferations- und Granulationszone, daher müssen mehr Gefäße in der Frakturzone gebildet werden, um das gleiche Blutvolumen zu fördern. Bestehende Gefäße in der Proliferationszone wachsen durch Einsprossung und Verzweigung in die Granulations- und Frakturzone ein. Somit nimmt das Kaliber der Gefäße von der Proliferations- zur Frakturzone ab. Wenn die Angiogenese vorangeschritten ist, nehmen die Gefäße an Durchmesser zu, überflüssige Gefäße werden abgebaut, und der Knochen benutzt die Gefäße als Leitstruktur für seinen Aufbau und breitet sich von peripher nach zentral aus (Cornell et al., 1992).

Histologisch und histomorphometrisch kann nachgewiesen werden, dass auch die Kallusneubildung ihren Ausgang in der Peripherie nimmt. In der Peripherie des Kallus können periostale Verbindungen am 14. Tag beschrieben werden, zentral sind diese Verbindungen nicht vorhanden. Diese Verbindungen setzen sich von der Proliferations- in die Granulationszone fort und verbinden den neuen mit dem alten Knochen. Durch diese Verbindungen erhält der Kallus mehr Stabilität. Auch Gefäße, die über diese periostalen Verbindungen in den neuen Knochen einschießen, sind weniger Scherkräften ausgesetzt und zerreißen seltener.

Auch radiologisch ist eine beginnende Überbrückung des Frakturspalts am 14. Tag zu sehen, die peripher breitbasig ausgelegt ist und zentral teilweise noch nicht existiert. In der Peripherie finden weniger Mikrobewegungen statt als am Frakturspalt, wodurch neu entstandenes Gewebe weniger verletzt wird und somit ein schnelleres Wachstum stattfinden kann. Weiterhin sind die Gefäße zentral am Frakturspalt zerstört. Nährstoffe, Zellen und Wachstumsfaktoren können schlechter in diesen Bereich gelangen,

wohingegen die Gefäße in der Peripherie weitestgehend intakt sind. Dort ist es den osteogenen Zellen am ehesten möglich, ihre Wirkung zu entfalten und einen stabilen Kallus zu erzeugen. Zudem findet die Angiogenese primär in der Peripherie statt. Folglich ist die Peripherie besser durchblutet, und Nährstoffe sowie Osteoprogenitorzellen gelangen zuerst in diesen Bereich, der essenziell für das rasche Knochenwachstum ist.

Das Frakturzentrum wird erst im fortgeschrittenen Stadium der Frakturheilung vermehrt durchblutet, wodurch die Reparationsprozesse wie die Knochenbildung erst später beginnen. Demzufolge ist der nutritive Effekt in der Peripherie größer und die Voraussetzung für ein schnelles Gewebswachstum eher gegeben als zentral.

4.3 Der Effekt von BMP-2 auf die Frakturheilung und Angiogenese

Der Wachstumsfaktor BMP-2 gehört zu der TGF- β -Familie und zählt zu den wichtigsten Knocheninduktionsfaktoren. Er entfaltet seine Wirkung über chemotaktische Anlockung der Zielzellen, Stimulierung der Proliferation und Differenzierung von Zellen. Zu den Zielzellen gehören Stammzellen sowie endotheliale und osteale Progenitorzellen. Durch die Stimulation werden die für eine Frakturheilung wichtigen Strukturen zum Wachstum angeregt wie Knochen oder Gefäße, wodurch eine verstärkte Heilung forciert wird. Der starke osteoinduktive Charakter des BMP-2 spiegelt sich auch in der Fähigkeit der ektopen Knochenbildung wider (Bessho et al. 2002). Dabei ist es durch die Applikation von BMP-2 möglich, auch an knochenfernen Stellen Knochen zu induzieren. Die Stärke der Wirkung ist wie auch bei der Frakturheilung von der Dosis des BMP abhängig (Wozney et al., 1998).

Weniger untersucht ist die Rolle der BMP-Familie bei der Gefäßentwicklung. In der vorliegenden Dissertation soll die angiogene BMP-2-Funktion detailliert anhand eines standardisierten Rattenmodells untersucht werden.

Eine wichtige Studie auf dem Gebiet der BMP-induzierten Angiogenese ist von Martine und Deckers durchgeführt worden (Deckers et al., 2002). Sie weisen nach, dass BMP die Transkription von VEGF-A in den primären Osteoblasten induziert und über die Aktivierung der Endothelzellen zu einer verstärkten Angiogenese führt. Dabei ist die VEGF-A-Produktion von der BMP-Dosis abhängig, während die Osteoblastendifferenzierung davon unbeeinflusst bleibt. Unterschiede zwischen BMP-2, -4 und -6 in Bezug auf die VEGF-Synthese konnten nicht nachgewiesen werden, jedoch

konnte durch Verabreichung eines VEGF-Antikörpers eine Hemmung der Angiogenese herbeigeführt werden, ohne Einfluss auf die Osteoblastensynthese zu nehmen.

Lagenfeld beschreibt, dass BMP-2 seine angio- und osteogene Wirkung durch die Aktivierung von Erk-1/2 (extracellular-related-protein-kinase 1/2), einem Enzym, das Osteoblasten und Endothelzellen zur Proliferation anregt, entfaltet (Langenfeld et al., 2004). Zusätzlich reguliert die Erk-1/2-Aktivierung die tubuläre Anordnung der entstehenden Gefäße und erhält somit einen wichtigen Einfluss auf die Angio- und Osteogenese. Auch andere Angiogenesefaktoren, z.B. VEGF oder FGF, entfalten über diese Kinase ihre Wirkung. Zusätzlich beschreibt die Studie eine Hemmung der Neovaskularisation in Lungentumoren bei Applikation von Noggin, das als BMP-2-Antagonist fungiert und somit ein weiteres Indiz für die angiogenetische Wirkung des BMP-2 ist.

Ein weiterer die Angiogenese stimulierender Faktor ist Id (DNA-binding protein inhibitor). Er entfaltet seine Wirkung durch die Herunterregulierung von Thrombospondin 1, einem Angiogenese-Inhibitor. Id erhöht das Zellwachstum, regt die Sprossung der Gefäße an, aktiviert VEGF und fördert die endotheliale Migration. Dem BMP ist es möglich, Id über die Phosphorylierung von Smad 1 und 5 zu aktivieren (Langenfeld, 2004). Goumans (Goumans et al. 2009) konnte zeigen, wie BMP-6 direkt die Migration von Endothelzellen durch Id auslösen kann. Jedoch konnte diese Fähigkeit nicht bei BMP-2 nachgewiesen werden. Demnach ist BMP-2 befähigt, die Proliferation von Endothelzellen, die Aussprossung von Gefäßen und die Aktivierung von VEGF zu regulieren, aber nicht die Migration zu beeinflussen (Valdimarsdottir, 2002).

Der von den oben genannten Autoren beschriebene osteo- und angiogene Effekt des BMP-2 spiegelte sich auch in der hier durchgeführten Studie durch ein positives Verhältnis zwischen BMP, Gefäßaufkommen und Knochenheilungsgeschwindigkeit wider. Mittels der mikroskopischen Gefäßauszählung kann am 3. und 14. postoperativen Tag ein erhöhtes Gefäßaufkommen bei den mit BMP behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Am 3. postoperativen Tag besteht jedoch nur ein signifikanter Unterschied ($p=0,037$) aus einem höheren Gefäßaufkommen in der distalen Proliferationszone der BMP-Gruppe. Das höhere Gefäßaufkommen am 3. postoperativen Tag könnte einerseits auf den angiogenen Effekt des BMP zurückzuführen sein, andererseits könnte eine präparationsbedingte Fehldeutung vorliegen. Dieser

Verdacht begründet sich darin, dass sich in der Kontrollgruppe das Gewebe sauber von der Tibia ablösen lässt, während bei der BMP-Gruppe darauf geachtet werden muss, das Kollagenvlies, das um die Fraktur angelegt ist, nicht zu beschädigen. Somit bleibt in der BMP-Gruppe präparationsbedingt ein größerer Gewebsanteil mit Gefäßen am Knochen zurück. Weiterhin ist die Aussagefähigkeit des Gefäßaufkommens im Frakturspalt am 3. Tag reduziert, weil die Frakturrenden noch keine stabile Verbindung eingegangen sind und somit beim Entfernen des Marknagels die Verbindung gebrochen ist. Der Frakturspalt mit den eventuell darin befindlichen Gefäßen ist zerstört worden.

Das Gefäßaufkommen am 14. Tag postoperativ ist in allen Frakturzonen der BMP-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe, wobei signifikante Unterschiede in der dorsalen Granulationszone ($p=0,002$), distalen Proliferationszone ($p=0,009$) und beim Zusammenschluss von Fraktur- und Granulationszone ($p=0,041$) vorliegt. Dies deutet auf eine fortgeschrittene Frakturheilung im Vergleich zur Kontrollgruppe hin. Eine verstärkte Durchblutung ist in diesem Stadium der Frakturheilung äußerst wichtig, da ein Mehrbedarf an Wachstumsfaktoren, Nährstoffen und proliferierenden Zellen besteht, die die Heilung vorantreiben. Somit ist eine gute Durchblutung Voraussetzung für eine optimale Frakturheilung und kann diese durch die rechtzeitige Bereitstellung von verschiedenen Faktoren sogar beschleunigen. In der Kontrollgruppe liegt am 14. Tag ebenfalls eine Steigerung des Gefäßaufkommens vor, aber insbesondere in der Proliferations- und Granulationszone ist die Gefäßmenge niedriger als in der BMP-Gruppe. In der BMP-Gruppe liegt in diesen Zonen das mit BMP getränkte Kollagenvlies direkt an, das dort zuerst seine Wirkung entfalten kann und das Gefäßwachstum vorantreibt. Anhand der Daten aus Tabelle 8 erweist sich die dorsale Granulationszone der BMP-Gruppe als am stärksten durchblutet. Da sich die hier verwendeten Mittelwerte auf die reine Gefäßanzahl der jeweiligen Zone beziehen und kein Verhältnis zwischen Flächengröße und Gefäßanzahl ermittelt worden ist, lassen sich die Ergebnisse aus der Tabelle, isoliert betrachtet, nur bedingt verwerten. Demzufolge ist eine Flächenermittlung nach der Augat-Methode durchgeführt worden (Krischak und Augat et al, 2007). Hierbei hat sich herausgestellt, dass die dorsale Kallusfläche und somit auch die dorsale Granulationszone kleiner sind als die korrespondierende ventrale Fläche, wodurch das Verhältnis zwischen Flächengröße und Gefäßanzahl auf eine größere Gefäßdichte der dorsalen Granulationszone in der BMP-Gruppe schließen lässt. Eine mögliche Erklärung

hierfür ist, dass an der dorsalen Fläche der Tibia eine höhere Muskelmasse vorliegt als auf der gewebssarmen ventralen Seite. Da Muskelgewebe stark durchblutet ist, besteht an der dorsalen Tibia ein besseres Durchblutungsverhältnis. Liegt eine bessere Vaskularisierung in der Peripherie der Fraktur vor, so können mehr Gefäße aus der Umgebung in den Frakturbereich einsprießen, und das Gefäßaufkommen steigt. Zusätzlich besteht durch die vermehrte Muskelmasse eine höhere Frakturstabilität dorsal. Junge fragile Gefäße sind dadurch weniger Scherkräften ausgesetzt und zerreißen seltener.

Das Gefäßaufkommen am 42. postoperativen Tag liegt im Durchschnitt bei beiden Gruppen deutlich niedriger als am 14. Tag, jedoch ist die Gefäßreduktion in der BMP-Gruppe um einiges stärker, sodass in der Kontrollgruppe die Gefäßanzahl höher ist. Demnach kommt es in der frühen Phase der Heilung zu einer Hypervaskularisation, die zum Heilungsende hin stark abnimmt. Dies ist dem geringeren Bedarf an Zellen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Sauerstoff, Nähr- und Mineralstoffen bei fortgeschrittener Heilung zuzuschreiben (Einhorn, 1998). Zu Beginn der Heilung ist eine gute Durchblutung und somit ein ausgeprägter nutritiver Effekt von entscheidender Wichtigkeit, denn nur durch die Zufuhr der genannten Faktoren ist eine effiziente Frakturheilung möglich. Ist dies nicht gegeben, kommt es zu Frakturheilungsstörungen und Pseudarthrosenbildung. Einhorn beschreibt bereits in seiner Publikation „Nutrition and bone“ die Wichtigkeit der ausreichenden Durchblutung im Frakturgebiet und die damit verbundene schnellere Osteogenese und Frakturheilung (Einhorn et al, 1990). Die Applikation von BMP-2 kann diesen Mechanismus durch die Stimulation von Endothel- und Knochenvorläuferzellen über die oben genannten Signalkaskaden, um nur einige zu nennen, verstärken. Neigen sich die Reparationsarbeiten des Knochens dem Ende zu, reduziert sich der benötigte Energieumsatz. Der Bedarf an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren sinkt, somit reduziert sich auch der Durchblutungsbedarf. Nicht mehr benötigte Gefäße werden abgebaut, und fortbestehende Gefäße nehmen an Volumen zu. Histomorphometrisch kann am 14. und 42. Tag in allen Zonen der BMP-Gruppe ein höherer Anteil von neuem Knochen nachgewiesen werden als in der Kontrollgruppe ($p=0,004$; $0,026$; $0,007$). Hingegen ist in der Kontrollgruppe der Bindegewebsanteil, von dem die desmale Ossifikation ausgeht, am 14. postoperativen Tag signifikant in der Außer- und Intermediärzone erhöht ($0,004$; $0,002$). Der höhere Bindegewebsanteil und die geringere Ossifikation lassen auf einen geringeren Fortschritt der Frakturheilung

schließen, da Bindegewebe im Rahmen der desmalen Ossifikation zu Knochen umgebaut wird.

Auch der Knorpelanteil in der Intermediär- und Innenzone war am 14. und 42. postoperativen Tag in der Kontrollgruppe signifikant höher ($p= 0,002$; $0,009$; $0,026$; $0,015$). Ein größerer Knorpelanteil, von dem die enchondrale Ossifikation in Frakturspaltnähe ausgeht, ist Zeichen eines geringeren Fortschritts der Frakturheilung. Es könnte aber auch Ausdruck einer mangelnden Durchblutung sein. Da Knorpel widerstandsfähiger gegenüber einer schlechten Durchblutung ist, wird er vornehmlich bei dieser Zustandsform aufgebaut (Schenk et al., 1977). Jedoch sollte nicht vergessen werden, dass Knorpel auch eher bei einer vermehrten Frakturinstabilität vorkommt und bei der Kontrollgruppe wegen der langsamen Frakturheilung im Vergleich zur BMP-Gruppe ein instabilerer Kallus und somit eine erhöhte Frakturinstabilität vorliegt. In der BMP-Gruppe liegt im Unterschied zu dem höheren Gefäßaufkommen im dorsalen Kallusbereich ventral ein erhöhtes Kallusaufkommen vor ($p= 0,041$).

Ursächlich hierfür könnte erstens eine erhöhte ventrale BMP-Applikation sein, da bei der Operation das BMP-getränkte Kollagenvlies um die Fraktur gelegt wird und ventral überlappt. Zweitens könnte die Kallusformation durch die Biomechanik beeinflusst worden sein. Wegen der physiologischen ventralen Konvexität der Tibia herrscht auf der ventralen Fläche eine erhöhte Biegungsspannung. Eine vermehrte Stabilisierung der Frakturrenden auf der konvexen ventralen Seite ist nötig, um dieser Spannung entgegenzuwirken. Auch ermöglicht die dorsal verstärkte Muskulatur eine größere Stabilisierung der Fraktur von hinten. Werden die Ergebnisse gegenübergestellt, so wird ersichtlich, dass im dorsalen Kallus trotz seiner geringeren Größe ein höheres Gefäßaufkommen (Tabelle 8) und somit eine höhere Gefäßdichte herrscht als im ventralen Kallus. Werden die Ergebnisse der Gefäßauszählung mit dem Fortschritt der Frakturheilung verglichen, lässt sich erkennen, dass ein enger Zusammenhang zwischen der Angio- und der Osteogenese besteht. Wird die Angiogenese beschleunigt, wie es das BMP-2 vermag, kommt es zu einer akzelerierten Osteogenese, und die Frakturheilung schreitet schneller voran. Besonders zu Beginn der Frakturheilung besteht aufgrund der erhöhten Reparationsprozesse ein großer Nährstoff-, Zell- und Wachstumsfaktorenbedarf. Kann dieser Bedarf durch ein verstärktes Gefäßwachstum und somit durch eine verbesserte Durchblutung schneller gedeckt werden, so können die anschließenden

Phasen der Frakturheilung beschleunigt ablaufen. Das Frakturhämatom kann schneller resorbiert und Abfallprodukte können eher abtransportiert werden. Durch die schneller an- und abtransportierten Stoffe kann das Granulationsgewebe früher ausgebildet werden, Wachstumsfaktoren und Zytokine können eher ihre Wirkungen entfalten, und die vorzeitige Ausbildung und Verknöcherung des Kallus führt zu einer schnelleren Frakturstabilität.

Schlussfolgernd kann die vorliegende Arbeit zeigen, dass BMP-2 in der Lage ist, die Angiogenese, Osteogenese und das Kallusremodeling zu beschleunigen und somit eine schnellere Frakturheilung zu ermöglichen.

4.4 Einsatz der VCT zur Bestimmung der Blutgefäßneubildung

Mit den Perfusionsscans sollte insbesondere die Angiogenese im Frakturbereich untersucht werden. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass keine vom Hintergrund unterscheidbaren Perfusionswerte in dieser Region anzutreffen sind. Bei einem in Narkose liegenden Tier lassen sich mit der CT-Perfusionsuntersuchungsmethode die Durchblutung von Hirn, Lunge, Leber, Nieren und Herz sehr gut darstellen. In diesen Organen herrscht auch unter Narkosebedingungen ein hoher Umsatz an Blutvolumen, mit dem ein Transport von für das Tier lebensnotwendigen Substanzen sichergestellt wird. So ist beispielsweise der Sauerstoff- und Glukosetransport für die Hirn- und Herzmuskelfunktion essenziell. Die Lungenperfusion ist wichtig, da hier der Sauerstoffaustausch zwischen Organismus und Umgebung stattfindet. Eine hohe Leber- und Nierenperfusion sind zur Durchführung von Stoffwechselvorgängen und Filtrationsprozessen notwendig. Die Peripherie- und Skelettmuskulatur haben unter Narkosebedingungen keinen erhöhten Blutbedarf, sie werden zu Gunsten der lebenswichtigen Organe sogar reduziert durchblutet.

Bei der Frakturheilung dient die Ausbildung von zahlreichen kleinen Gefäßen vornehmlich der räumlich umfassenden Versorgung des Frakturbereichs. Es scheint nicht so sehr auf eine zeitlich hohe Stoffzuführung von Metaboliten anzukommen, die mit dem Blut zugeführt werden und nur durch einen hohen Blutfluss zu erreichen wären, was bei einer Frakturheilungszeit, die sich über mehrere Wochen erstrecken kann, auch gut verständlich ist. Sie stehen weiterhin im Einklang mit Ergebnissen aus der Studie von Hargreaves (Hargreaves et al., 1990), der bereits im Jahr 1990 mit anderen

Untersuchungsmethoden zeigen konnte, dass die Perfusion der Beinmuskulatur der Ratte nur bei Muskelarbeit steigt, die unter Narkosebedingung nicht vorliegt. Auch Yasko will in seiner Studie „The healing of segmental bone defects“ einen durch BMP-2 verstärkten funktionellen Blutfluss nachweisen, indem er Ratten am 7. postoperativen Tag Radioisotope ins Herz injiziert und über eine Gammakamera die Geschwindigkeit und Menge der Anreicherung des Isotops am Frakturspalt gemessen hat. Das Isotop sollte als Angiogenesemarker dienen (Yasko et al., 1992). Ein signifikanter Unterschied konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Diskutiert wird, ob der Zeitpunkt der Injektion mit sieben Tagen nicht zu spät gewählt worden ist. Weiterhin wäre auch eine ähnliche Problematik, wie oben beschrieben, denkbar, da die Ratten aus Fixierungsgründen ebenfalls sediert worden sind und somit eine Zentralisierung des Blutes mit peripherer Minderperfusion vorgelegen hat.

Ein weiterer Grund für die mangelnde Darstellung der Blutgefäße im VCT ist das zu geringe Auflösungsvermögen des Flat-Panals. Dieses Problem wird bereits von Kiessling beschrieben (Kiessling et al., 2004). Er stellt fest, dass vergleichend zur histologischen Darstellung Gefäße von unter 50µm Durchmesser im MRT und VCT aufgrund mangelnden Auflösungsvermögens nicht abgebildet werden. Da besonders in der frühen Frakturheilung die Gefäße einen niedrigen Einzeldurchmesser von unter 30µm aufweisen, ist eine hohe Auflösung vonnöten, um das Fortschreiten der Vaskularisierung im Frakturbereich zu bewerten.

Obwohl in der vorliegenden Studie das Nachfolgemodell des von Kiessling verwendeten VCT benutzt worden ist, beträgt das optische Auflösungsvermögen bei beiden Tomographen 45µm, während in der Mikroskopie mit einem Auflösungsvermögen von 0,7µm gearbeitet wird. Somit besteht auch in dieser Studie eine Diskrepanz zwischen der radiologischen und der histologischen Auflösungskraft, und zwar zu Gunsten letzterer.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie ist die Untersuchung des Einflusses von BMP-2 auf die Frakturheilung und auf die Angiogenese in einem Ratten-Osteotomiemodell. Hierfür sind bei insgesamt 36 Ratten die Tibiadiaphyse osteotomiert und mittels eines intramedullären Implantats osteosynthetisch versorgt worden. Bei 18 Tieren ist eine zusätzliche Applikation eines rh-BMP-2-getränkten Kollagenschwamms auf die Osteotomie erfolgt, bei den restlichen 18 Kontrollgruppen-Tieren ist dieses Kompositimplantat nicht verwendet worden. Nach 3, 14 und 42 Tagen postoperativ sind mittels Volumencomputertomografie Nativ-, Volumen- und Perfusionsscans durchgeführt und zu diesen Tagen jeweils 12 Tiere euthanasiert worden. Die Tibiae sind entnommen und einer histomorphologischen, detailhistologischen bzw. immunhistologischen Untersuchung zugeführt worden. Die statistische Auswertung der Scans ergibt eine signifikant beschleunigte Knochenheilung der BMP-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Histologisch kann mittels Gefäßauszählung eine signifikante Steigerung der Kapillardichte vom 3. zum 14. Tag mit darauffolgender Senkung zum 42. Tag gemessen werden. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe wird eine signifikante Erhöhung des Gefäßaufkommens in der BMP-Gruppe am 3. und 14. postoperativen Tag gemessen. Der Vergleich der beiden Gruppen am 42. Tag weist keine signifikanten Unterschiede auf. Durch die Histomorphometrie kann in der BMP-Gruppe ein signifikant erhöhter Anteil von neuem Knochen mit Betonung des äußeren Osteotomiebereichs nachgewiesen werden. Demgegenüber werden signifikant erhöhte Bindegewebs- und Knorpelanteile in der Kontrollgruppe gemessen. Weiterhin kann eine verstärkte Kallusbildung an der ventralen Tibiaseite nachgewiesen werden sowie ein höheres Gefäßaufkommen dorsal. Wird die Gefäßmenge mit der Kallusfläche ins Verhältnis gesetzt, resultiert daraus eine erhöhte Gefäßdichte an der dorsalen Tibia. Die VCT-Methode ist aufgrund des limitierten Auflösungsvermögens von 45µm nicht in der Lage, die Blutgefäße am Osteotomiespalt darzustellen. Zusammenfassend kann in diesem Osteotomiemodell gezeigt werden, dass BMP-2 einen angiogenen und osteoinduktiven Effekt besitzt, der zu einer beschleunigten Frakturheilung führt.

Schlagwörter: Angiogenese, „bone morphogenetic protein“, Frakturheilung, Histomorphometrie, Volumencomputertomografie

6. Abstract

The aim of the present study was to investigate the influence of BMP-2 on fracture healing and angiogenesis in a rat osteotomy model. For this purpose, a tibial mid-diaphyseal osteotomy was performed in 36 rats and the tibia was fixed with an intramedullary device. 18 animals received an additional application of rh-BMP-2 with an absorbable collagen sponge onto the osteotomy (rh-BMP-2/ACS). The remaining 18 animals served as controls and received no rh-BMP-2/ACS. After 3, 14 and 42 days postoperatively, native-, volume- and perfusion scans were done using volumetric computed tomography followed by euthanasia of 12 animals per observation day. The tibiae were harvested and investigated by histomorphological, histological and immunohistological methods, respectively. Statistical analysis of the scans revealed a significant accelerated fracture healing of the BMP group compared with the control group. Histologically, a significant increase in vessel density could be measured from day 3 to day 14, with subsequent reduction on day 42. On day 3 and day 14, the BMP group showed a significant increase in blood vessel formation compared with the control group. The comparison of the two groups on day 42 showed no significant differences. However, in both groups a reduction of vessel formation compared to day 14 was detected. Histomorphometry showed a significantly increased new bone formation bone with emphasis on the outer osteotomy area in the BMP group. In contrast, significantly increased connective tissue and cartilage was found in the control group. Furthermore, an increased callus formation and a higher new blood vessel formation could be detected on the ventral and dorsal side of the tibia, respectively. By relating new blood vessel formation to the callus area an increased vessel density at the dorsal tibia could be detected. Due to a limited resolution of 45 μm , the VCT method could not show the vessels on the osteotomy gap.

In summary, BMP-2 exhibited an angiogenic and osteoinductive effect which led to accelerated fracture healing in this osteotomy model.

Key words: angiogenesis, „bone morphogenetic protein“, fracture healing, histomorphometry, volume computed tomography.

7. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ANG	Angiopoetin
BM	Basalmembran
BMP	bone morphogenetic protein
CTGF	connective tissue growth factor
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
EC	Endothelzellen
EGF	epidermal growth factor
EG	endocrine gland
EPH	Ephrine
EZM	extrazelluläre Matrix
FOV	field of view
FGF	fibroblast growth factor
HGF	hepatocyte growth factor
HIF	hypoxia-inducible factor
HRP	horseradish peroxidase
IHC	Immunhistochemie
IGF	insulin-like growth factor
INF	Interferon
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MIP	maximum intensity projection
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
NOS	Stickstoffmonoxidsynthetase
OT	Objektträger
OP	osteogenic protein
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PDGF	platelet-derived growth factor
PECAM	platelet endothelial adhesion molecule
PF	platelet factor

Abkürzungsverzeichnis

PIGF	placental growth factor
Rh-BMP	rekombinantes humanes BMP
Smad	Small body size Mother against decapentaplegic
SMC	glatte Muskelzellen
TGF	transforming growth factor
TSP	Thrombospondin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
VE	vascular endothelial
VR	volume rendering
WF	Wachstumsfaktor
WS	Workstation

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Angiogene Wachstumsfaktoren.....	11
Tabelle 2: Antiangiogene Wachstumsfaktoren.....	12
Tabelle 3: Übersicht über Wachstumsfaktoren.....	15
Tabelle 4: Studiendesigne	23
Tabelle 5: Einteilung der Zonen für die histologische Auswertung.....	43
Tabelle 6: Vergleich der Knochenheilung anhand der Nativ- und Volumenscans..... zwischen Kontroll- und BMP-Gruppe an Tag 3, 14 und 42	47
Tabelle 7: Vergleich des knöchernen Heilungsverlaufs anhand der Nativ-und Vo- lumenscans zwischen Tag 3, 14 und 42 für die Kontroll- und BMP-Gruppe	48
Tabelle 8: Mittelwerte des Gefäßaufkommens.	72

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stadien der Frakturheilung	3
Abbildung 2: Zeitliche Abfolge der Frakturheilungsphasen bei der Ratte.....	6
Abbildung 3: Stadien der Gefäßbildung.....	7
Abbildung 4: Aktivierungs- und Reifungsphase der Angiogenese	9
Abbildung 5: Signalkaskade der intrazellulären BMP-Wirkung.	18
Abbildung 6: BMP-2 und der absorbierbarer Kollagenschwamm.....	25
Abbildung 7: OP-Technik.....	27
Abbildung 8: Perfusionsscan: Ermittlung des Blutvolumens.	31
Abbildung 9: Perfusionsscan: Ermittlung der Durchblutung.....	31
Abbildung 10: Lagerung der Ratte im VCT.....	32
Abbildung 11: Nativ-und-Volumenscans Grad 1	34
Abbildung 12: Nativ-und-Volumenscans Grad 2.....	35
Abbildung 13: Nativ-und-Volumenscans Grad 3.....	36
Abbildung 14: Nativ-und-Volumenscans Grad 4.....	37
Abbildung 15: Darstellung der Histomorphometrie anhand eines 42-Tage-Tieres.....	42
Abbildung 16: Darstellung der Analysezonen.....	44
Abbildung 17: Vergleich des knöchernen Heilungsverlaufs zwischen Tag 3, 14, 42	48
Abbildung 18: Perfusionsscans der BMP-Gruppe.....	50
Abbildung 19: Gewebszusammensetzung Tag 3 in der BMP-Gruppe	52
Abbildung 20: Gewebszusammensetzung Tag 3 in der Kontrollgruppe	52
Abbildung 21: Gewebszusammensetzung Tag 14 in der BMP-Gruppe	52
Abbildung 22: Gewebszusammensetzung Tag 14 in der Kontrollgruppe	53
Abbildung 23: Gewebszusammensetzung Tag 42 in der BMP-Gruppe	53
Abbildung 24: Gewebszusammensetzung Tag 42 in der Kontrollgruppe	53
Abbildung 25: Gewebszusammensetzung Prozentuale Verteilung	54
Abbildung 26: Prozentuale Kallusfläche von Kontroll- und BMP-Gruppe	55
Abbildung 27: Übersichtshistologie Tag 14 Kontrollgruppe	57
Abbildung 28: Übersichtshistologie Tag 14 BMP-Gruppe	57
Abbildung 29: Übersichtshistologie Tag 42 Kontrollgruppe	58
Abbildung 30: Übersichtshistologie Tag 42 BMP-Gruppe	58

Abbildung 31: Schmäler Frakturspalt eines 14-Tage-Tieres	60
Abbildung 32: Breiter Frakturspalt eines 14-Tage-Tieres	60
Abbildung 33: Frakturbereich in Nachbarschaft zum Kollagenvlies.....	62
Abbildung 34: Ausschnitt aus der Proliferationszone eines 14- Tage-Tieres	64
Abbildung 35: Kallus 14 Tage postoperativ.....	66
Abbildung 36: Kallus 42 Tage postoperativ.....	66
Abbildung 37: Kollagenvliesdarstellung 3 Tage postoperativ.....	67
Abbildung 38: Kollagenvliesdarstellung 14 Tage postoperativ.....	69
Abbildung 39: Gefäßmenge in logarithmischer Darstellung	72

10. Literaturverzeichnis

Aro, HT., Govender, S., Patel, AD., Hernigou, P., Perera de Gregorio, A., Popescu, GI., Golden, JD., Christensen, J., Valentin, A. (2011). *Recombinant human bone morphogenetic protein-2: a randomized trial in open tibial fractures treated with reamed nail fixation*. J. Bone Joint Surg Am 93. (9):801-8.

Attisano, L., Wrana, JL. (1996). *Signal transduction by members of the transforming growth factor-beta superfamily*. Cytokine Growth Factor Rev. 7 (4): 324-39.

Barleon, B., Sozzani, S., Zhou, D., Weich, HA., Mantovani, A., Marme, D. (1996). *Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF)*. Blood. 87 (8): 3336-43.

Barnes, G., Kostenuik, PJ., Gerstenfeld, LC., Einhorn, TA. (1999). *Growth factor regulation of fracture repair*. J Bone Miner Res. 14 (11):1805-15.

Bessho, K., Carnes, DL., Calvin, R., Ong, JL. (2002). *Experimental studies on bone induction using low-molecular-weight- poly-glycolide as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-2*. J Biomed Mater Res. 61 (1): 61-5.

Blumenfeld, I., Srouji, S., Lanir, Y., Laufer, D., Livne, E. (2002). *Enhancement of bone defect in old rats by TGF-beta and IGF-1*. Exp Gerontol. 37 (4):553-65.

Bolander, M. (1992). *Regulation of fracture repair by growth factors*. Proc. Soc Exp Biol Med. 200 (2): 165-70.

Bourque, W., Gross, M., Hall, BK. (1993). *Expression of four growth factors during fracture repair*. Int J Dev Biol. 37 (4): 573-9.

Caestecker, MD. (2001). *Bone morphogenetic proteins, genetics and the pathophysiology of primary pulmonary hypertension*. Respir Res. 2 (4): 193-7.

Canalis, E., Lian, J. (1988). *Effects of bone associated growth factors on DNA, collagen and osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvariae*. Bone. 9 (4): 243-6.

Carmeliet, P. (2003). *Angiogenesis in health and disease*. Nat Med. 9 (6): 653-60.

Chao, E., Inoue, N., Elias, J., Aro, H. (1998). *Enhancement of fracture healing by mechanical and surgical intervention*. Clin Orthop Relat Res. (355 Suppl): S 163-78.

Chen, N., Glowacki, J., Bucky, L., Hong, H., Kim, W., & Yaremchuk, M. (1994). *The roles of revascularization and resorption on endurance of craniofacial onlay bone grafts in the rabbit*. Plast Reconstr Surg. 93 (4): 714-22.

Church, J., Fulton, D. (2006). *Differences in eNOS activity because of subcellular localization are dictated by phosphorylation state rather than the local calcium environment*. J Biol Chem. 281 (3): 1477-88.

Claes, L., Eckert-Hubner, K., Augat, P. (2003). *The fracture gap size influences the local vascularization and tissue differentiation in callus healing*. Langenbecks Arch Surg. 388(5): 316-22.

Conway, E., Collen, D., Carmeliet, P. (2001). *Molecular mechanisms of blood vessel growth*. Cardiovasc Res. 49 (3): 507-21.

Cook, S., Baffes, G., Wolfe, M., Sampath, T., Rueger, D. (1994). *Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long bone segmental defect model*. Clin Orthop Relat Res. (301): 302-12.

Cooke, J. (2003). *NO and angiogenesis*. Artheroscler Suppl. 4 (4): 53-60.

Cornell, C., Lane, JM. (1992). *Newest factors in fracture healing*. Clin Orthop Relat Res. (277): 297-311.

Deckers, M., van Bezooijen R., van der Horst, G., Hoogendam, J., van der Bent, c., Papapoulos, S. (2002). *Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A*. Endocrinology.143 (4): 1545-53.

Einhorn, T., Levine, B., Michel, P. (1990) *Nutrition and Bone*. Orthop Clin North Am. (1): 43-50.

Einhorn, T. (1998). *The cell and molecular biology of fracture healing*. Clin Orthop Relat Res.(355 Suppl): S 7-21.

Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. (1996). *Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene*. Nature. 380 (6573): 439-42.

Fleet, J. (1996). *The Effects of aging on on the bone inductive activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2*. Endocrinology 137(11):4605-4610.

Folkman, J. (1995). *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. Nat Med. 1 (1): 27-31.

Friedlaender, GE., Perry, CR., Cole, JD., Cook, SD., Cierny, G., Muschler, GF., Zych, GA., Calhoun, JH., LaForte, AJ., Yin, S. (2001). *Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions*. J Bone Joint Surg Am. 2001;83-A Suppl 1(Pt 2):S151-8.

Garcia, P.; Pieruschka, A.; Klein, M.; Tami, A.; Histing, T.; Holstein, JH.; Scheuer, C.: Pohlemann, T.; Menger, MD. (2012). *Temporal and spatial vascularization patterns of unions and nonunions: role of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic proteins*. J Bone Joint Surg Am. 94(1):49-58.

Garrison, K., Shemilt, I., Donell, S., Ryder, J., Mugford, M., Harvey I. (2006). *Bone morphogenetic protein for fracture healing in adults*. Cochrane Database Syst Rev. 6: CD006950.

Gosain, A., Recinos, R., Agresti, M., Khanna, A. (2004). *TGF-beta, FGF-2, and receptor mRNA expression in suture mesenchyme and dura versus underlying brain in fusion and nonfusion mouse cranial sutures*. Plast Reconstr Surg. 113 (6): 1675-84.

Gourmans, M., Liu, Z., ten Dijke, P. (2009). *TGF-beta signaling in vaskular biology and dysfunction*. Cell Res. 19 (1): 116-27.

Govender, S., Csimma, C., Genant, H., Valentin-Opran, A., Amit, Y., Arbel, R. (2002). *Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures*. J Bone Joint Surg Am.84-A (12):2123-34.

Hadjiargyrou, M., Lombardo, F., Ahrens, W., Joo, J., Ahn, H. (2002). *Transcriptional profiling of bone regeneration*. J Biol Chem. (33): 301777-82.

Hannouche, D., Petite, H., Sedel, L. (2001). *Current trends in the enhancement of fracture healing*. J Bone Joint Surg Br. 83 (2): 157-64.

Harada, S., Sampath, T., Aubin, J., Rodan, G. (1997). *Osteogenic protein-1 up-regulation of the collagen X promoter activity is mediated by a MEF-2 like sequence and requires an adjacent AP-1 sequence*. Mol Endocrinol.11 (12): 1832-45.

Hargreaves, D., Egginton, S., Hudlicka, O. (1990). *Changes in capillary perfusion induced by different patterns of activity in rat skeletal muscle*. Microvasc Res.40 (1):14-28.

Hawighorst, T., Oura, H., Streit, M., Janes, L., Nguyen, L., Brown, L. (2002). *Thrombospondin-1 selectively inhibits early-stage carcinogenesis and angiogenesis but not tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in transgenic mice*. Oncogene 21 (52): 7945-56.

Heinrich, U., Maurer, J., Gosepath, K., Mann, W. (1997). *Electron microscopic localization of nitric oxide I synthase in the organ of Corti of the guinea pig*. Eur Arch Otorhinolaryngol. 254 (8):396-400.

Heldin, C., Miyazono, K. (1997). *TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins*. Nature. 390 (6659): 465-71.

Hennes-Bruns. (2003). *Chirurgie*. Duale Reihe.

Hibbs, J., Taintor, R., Vavrin, Z., Rachlin, E. (1968). *Nitric oxide a cytotoxic activated macrophage effector molecule*. Biochem Biophys Res Commun. 157 (1): 87-94.

Hiratsuka, S., Nakamura, K., Iwai, S., Murakami, M., Itoh, T., Kijima, H. (2002). *MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung specific metastasis*. Cancer Cell. 2 (4): 289-300.

Hogan, B. (1996). *Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development*. Genes Dev. 10 (13): 1580-94.

Hulse, D., Hyman, B. (1991). *Biomechanics of fracture fixation failure*. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 21 (4): 647-67.

Ibelgauf. (2007). *Cytocines Online Pathfinder Encyclopadia*. Abgerufen am 14. Juli 2009

Israel, D., Nove, J., Kerns, K., Kaufman, R., Rosen, V., Cox, K. (1996). *Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo*. Growth Factors. 13 (3-4): 291-300.

Jingushi, S., Joyce, M., Bolander, M. (1992). *Genetic expression of extracellular matrix proteins correlates with histologic changes during fracture repair*. Bone Miner Res. 7 (9): 1045-55.

Kabrun, N., Buhring, H., Choi, K., Ullrich, A., Risau, W., Keller, G. (1997). *Flk-1 expression defines apopulation of early embryonic hematopoietic precursors*. Development. 124 (10): 2039-48.

Kanczler, J., Oreffo, R. (2008). *Osteogenesis and angiogenesis:the potential for engineering bone*. Eur Cell Mater. 15:100-14.

Kiessling, F., Greschus, S., Lichy, M., Bock, M., Fink, C., Vosseler, S., Moll, J., Mueller, M., Fusenig, M., Traupe H., Semmler, W. (2004). *Volumetric computed tomography (VCT): a new technology for noninvasive, high-resolution monitoring of tumor angiogenesis*. Nat Med. 10: 1133-1138.

Krischak, G., Augat, P., Sorg, T., Blakytyn, R., Kinzl, L., Claes, L. (2007). *Effects of diclofenac on periosteal callus maturation in osteotomy healing in an animal model*. Arch OrthopTrauma Surg. 127 (1): 3-9.

Langenfeld, E., Langenfeld, J. (2004). *Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors*. Mol Cancer Res. 2 (3): 141-9.

Lee, F., Choi, Y., Behrens, F., Defouw, D., Einhorn, T. (1998). *Programmed removal of chondrocytes during endochondral fracture healing*. J Orthop Res. 16 (1): 144-50.

Li, J., Ahmad, T., Spetea, T., Ahmed, M., Kreicbergs, A. (2001). *Bone reinnervation after fracture*. J Bone Miner Res. 16(8): 1505-10.

Linkhart, T., Mohan, S., Baylink, D. (1996). *Growth factors for bone growth and repair*. Bone. 19 (1 Suppl): S 1-12.

Loscalzo, J. (2001). *Inducible NO synthesis in the vasculature*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 21 (8): 1259-60.

Luttun, A., Carmeliet, G., Carmeliet, P. (2002). *Vascular progenitors from biology treatment*. Trends Cardiovasc Med. 12 (2): 88-96.

MacDonald, N., Shivers, W., Narum, D., Plum, S., Wingard, J., Fuhrmann, S. (2001). *Endostatin binds tropomyosin. A potential modulator of the antitumor activity of endostatin*. J Biol Chem. 276 (27):25190-6.

Maisonpierre, P., Suri, C., Jones, P., Bartunkova, S., Wiegand, S., Radziejewski, C. (1997). *Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis*. Science. 277 (5322): 55-60.

Mandu-Hrit, M., Seifert, E., Kotsiopriftis, M., Lauzier, D., Haque, T., Rohlicek, C. (2008). *OP-1 injection increases VEGF expression but not angiogenesis in a rabbit model of distraction osteogenesis*. Growth Factors. 26 (3): 143-51.

McKibbin, B. (1978). *The biology of fracture healing in long bones*. J Bone Joint Surg Br. 60-B(2):150-62.

Moser, M., Binder, O., Wu, Y., Aitsebaomo, J., Ren, R., Bode, C. (2003). *BMPER, a novel endothelial cell precursor-derived protein, antagonizes bone morphogenetic protein signaling and endothelial cell differentiation*. Mol Cell Biol. 23 (16): 5664-79.

Nicolas, V., Mohan, S., Honda Y., Prewett, A., Finkelman, R., Baylink, D. (1995). *An age related decrease in the concentration of insulin like growth factor binding protein 5 in human cortical bone*. Calcif Tissue Int. 57 (3):206-12.

Niederwanger, M., Urist, M. (1996). *Demineralized bone matrix supplied by bone banks for a carrier of recombinant human bone morphogenetic protein*. J Oral Implantol. 22 (2-3): 210-5.

Nielsen, H., Andreassen, T., Ledet, T., Oxlund, H. (1994). *Local injection of TGF-beta increase the strength of tibial fractures in the rat*. Acta Orthop Scand. 65 (1): 37-41.

Niikura, T., Hak, D., Reddi, A. (2006). *Global gene profiling reveals a downregulation of BMP gene expression in experimental atrophic nonunions compared to standard healing fractures*. J Orthop Res. 24 (7): 1463-71.

Obert, M., Schulte-Geers, C., Schilling, R., Harth, S., Klaver, M. Traupe, H. (2010). *High-resolution flat-panel volumetric CT images show no correlation between human age and sagittal suture obliteration-independent of sex*. Forensic Sci Int. 200 (1-3): 180e 1-12.

Paradis, G., Kelly, P. (1975). *Blood flow and mineral deposition in canine tibial fractures*. J Bone Joint Surg Am. 57 (2): 220-6.

Parks, D., Bolinger, R., Mann, K. (1997). *Redox state regulates binding of p53 to sequence-specific DNA, but not to non-specific or mismatched DNA*. Nucleic Acids Res. 25 (6): 1289-95.

Parums, D., Cordell, J., Micklem, K., Heryet, A., Gatter, K., Mason, D. (1990). *A new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections*. J Clin Pathol. 43 (9):752-7.

Rafii, S., Lyden, D. (2003). *Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration*. Nat Med. 9 (6): 702-12.

Ramoshebi, L., Matsaba, T., Teare, J., Renton, L., Patton, J., Ripamonti, U. (2002). *TGF-beta superfamily members and delivery systems in bone regeneration*. Expert Rev Mol Med. 4 (20): 1-11.

Raschke, M., Schmidmaier, G. (2004). *Biological coating of implants in trauma and orthopedic surgery*. Unfallchirurgie 107 (8): 653-63.

Reddi, A. (2000). *Morphogenetic messages are in the extracellular matrix*. Biochem Soc Trans. 28 (4): 345-9.

Reed, A., Joyner, C., Isefuku, S., Brownlow, H., Simpson, A. (2003). *Vascularity in a new model of atrophic nonunion*. J Bone Joint Surg Br.85 (4): 604-10.

Risau, W. (1997). *Mechanismus of angiogenesis*. Nature. 386 (6626): 671-4.

Risau, W., Flamme, I. (1995). *Vasculogenesis*. Annu Rev Cell Dev Biol. 11: 73-91.

Rofstad, E., Graff, B. (2001). *Thrombospondin-1 mediated metastasis suppression by the primary tumor in human melanoma xenografts*. J Invest Dermatol. 117 (5):1042-9.

Schenk, R., Willenegger, H. (1977). *Histology of primary bone healing*. Unfallheilkunde 80 (5): 155-60.

Solheim, E. (1998). *Growth factors in bone*. Int Orthop.22 (6): 410-6.

Srivastava, A., Ralhan, R., Kaur, J. (2003). *Angiogenesis in cutaneous melanoma*. Microsc Res Tech. 60 (2): 208-24.

Street, J., Winter, D., Wang, J., Wakai, A., McGuinness, A., Redmond, H. (2000). *Is human fracture hematoma inherently angiogenic*. Clin Orthop Relat Res. (378): 224-37.

Takahashi, T. (1999). *Ischemia and cytokine induced mobilization of bone marrow derived endothelial progenitor cells for neovascularization*. Nat Med. 5 (4): 434-8.

Takaoka, K., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M. (1989). *Establishment of a cell line producing bone morphogenetic protein from a human osteosarcoma*. Clin Orthop Relat Res. (244): 258-64.

Thielemann, F. (1989). *Evaluation of experimental osteoinduction in different animal models*. Bone transplantation. 218-219.

Urist, M., Silverman, B., Buring, K., Dubuc, F., Rosenberg, J. (1967). *The bone induction principle*. Clin Orthop Relat Res. 53: 243-83.

Urist, M. (1995). *The first three decades of bone morphogenetic protein*. Research 4: 207-23.

Valdimarsdottir, G. e. (2002). *Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells*. Circulation. 106:2263 – 70.

Wahlberg, E. (2003). *Angiogenesis and arteriogenesis in limb ischemia*. J Vasc Surg. 38 (1): 198-203.

Wang, X., Malghem, J., Parizel, P., Gielen, J., Vanhoenacker, F., Scheeper, A. (2003). *Myositis ossificans circumscripta*. JBR-BTR. 86 (5): 278-85.

Wildemann, B. (2005). *Differences in the fusion and resorbtion activity of human osteoclasts after stimulation with different growth factors released from a polyactide carrier*. Calcif Tissue Int. 1 (76): 50-5.

Wozney, J., Rosen, V. (1998). *Bone morphogenetic protein and bone protein gene family in bone formation and repair*. Clin Orthop Relat Res. (346): 26-37.

Wrana, J., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., Massague, J. (1994). *Mechanism of activation of the TGF-beta receptor*. Nature. 370 (6488): 341-7.

Yasko, A., Lane, J., Fellingner, E., Rosen, V., Wozney, J., Wang, E. (1992). *The healing of segmental bone defects*. J Bone Joint Surg Am. 74 (5): 659-70.

11. Verwendete Materialien

Materialien bei der OP:

- Exicatortopf
- Inhalationsnarkotikum: Isofluran: Isofluran Baxxter[®] *Baxter, Heidelberg*
- Narkotikum: Xylazin: Rompun[®] 2 % (5 mg/ml) *Bayer, Leverkusen*
- Narkotikum: Ketamin: Ketamin Inresa[®] 10 ml (50 mg/ml) *Bayer, Leverkusen*
- Antisedativum: Atipamezol: Antisedan[®] (5 mg/ml) *Pfizer, Wien*
- Metamizol: Metacam[®] (5 mg/ml) *Boehringer Ingelheim, Ingelheim*
- Desinfektionsmittel: Braunoderm[®] *Braun, Melsungen*
- Augensalbe: Liposic[®] *Bausch & Lomb, Berlin*
- Langhaarschneider: Typ 1574 *Moser, Hamburg*
- Skalpell: Skalpell 11 *Feather, Köln*
- oszillierende Säge *Synthes, Bochum*
- Knochenwachstumsfaktor: rh-BMP-2 vials US *Whitney Rhodes Medtronic, Memphis*
- Steriles Wasser *Whitney Rhodes Medtronic, Memphis*
- Kollagenschwamm: sterile ACS Sponge 4-pack *Whitney Rhodes Medtronic, Memphis*
- grüne Kanüle 21 G 0,8 x 40 mm *Braun, Melsungen*
- Nahtmaterial: 2.0 Prolene *Ethicon Johnson & Johnson, Düsseldorf*
- Nahtmaterial: 4.0 Vicryl *Ethicon Johnson & Johnson, Düsseldorf*

Materialien beim Scannen:

- VCT: GE Healthcare Flat-Panel, Software GE Healthcare *GE Healthcare, München*
- Workstation: Advantage Workstation, Version 4.1 GE Medical System *GE Healthcare, München*
- Betriebssystem: Linux Betriebssystem, dualer 2,2 GHz-Prozessor, 4-GB-RAM
- Narkotikum: Medetomidinhydrochlorid: Domitor[®] (1 ml/mg) *Pfizer, Wien*
- Lila Braunüle: BD 26GA 0,75IN 0,6 x 19 mm *Biosciences Pharmingen, Groningen*
- Kontrastmittel: Peritrac Infusio 31% retro *Dr. Köhler GmbH, Bensheim*
- Tacker: Autosuture Appose ulc 35W *Tyco Healthcare, Neustadt*

Materialien bei der Probeentnahme:

- Dremel: Model 395 F013039567 (10.000–33.000/min) *Power Tool spares, Boston*
- Fixierungsmittel: 4 % Paraformaldehyd

Verwendete Materialien

Histologie:

- Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat *Fa. Merck KGaA, Darmstadt*
- Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat *Fa. Merck KGaA, Darmstadt*
- Objektträger *Fa. R. Langenbrinck, Emmendingen*
- technisches Azeton *Fa. Merck KGaA, Darmstadt*
- reines Azeton *Fa. Merck KGaA, Darmstadt*
- Aminopropyltriethoxysilane *Fa. Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*
- Tris-Base (Trizma[®] base) *Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*
- Triplex (Titriplex[®] III) *Fr. Merck KGaA, Darmstadt*
- Alkohol *Fa. Stockmeier Chemie Dillenburg GmbH & Co. KG, Dillenburg*
- Xylol (Carl Roth[®]) *Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe*
- Paraffin (Roti[®]-Plast) *Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe*
- Rotationsmikrotom *Fa. Leica, Wetzlar*
- Microtome Blade *Fa. Feather, Köln*
- Bidest (Millipak Express 20[®]) *Fa. Millipore, Billerica*
- Hämalun (Meyers Hämalunlösung[®]) *Fa. Merck KGaA, Darmstadt*
- Eosin wässrig (Certistain[®]) *Fa. Merck KGaA, Darmstadt*
- Toluidinblau (Chroma[®]) *Fa. Merck KGaA, Darmstadt*
- Dinatriumtetraborat (Borat[®]) *Fa. Merck KGaA, Darmstadt*
- Depex (Gurr[®]) *Fa. VWR International, Darmstadt*
- Pyramin G (Pyramin G[®]) *Fa. Merck KGaA, Darmstadt*
- Verdünnungspuffer (Hintergrund-red. Verdünnungspuffer[®]) *Fa. Dako, Glostrup*
- Wasserstoffperoxid *Fa. Merck KGaA, Darmstadt*
- Waschpuffer: 0,15 mol/l NaCl, 0,05 mol/l Tris-buffered saline/HCl

Histomorphometrie:

- Axiophot-2 Mikroskop *Fa. Zeiss, Jena*
- DC 500 Kamera, Kalibrierung A x DC 500 4S IMP 1,2 *Fa. Leica, Wetzlar*
- Bildbearbeitungsprogramm IM1000 *Fa. Leica, Wetzlar*
- Ausmessungsprogramm Image pro Plus *Fa. Leica, Wetzlar*

12. Selbstständigkeitserklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus- Liebig- Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Bad Nauheim, 30.11.2014

Ort, Datum

Unterschrift

13. Danksagung

Ich danke den beiden Doktoratinnen Frau Tilp und Frau Kinkel, Frau Dr. Peters für die operative und tierpflegerische Unterstützung, den Tierpflegern, Herrn Dr. Obert für die Aufsicht bei der CT, dem kompletten Laborteam für Experimentelle Unfallchirurgie der Unfallchirurgie Gießen, insbesondere Frau PD. Dr. Lips für Ihre unzähligen Tipps und Hilfestellungen und natürlich ein großes Dankeschön an meine Dissertationsbetreuerin Frau Dr. Stiegler und meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dr. biol. hom. V. Alt.

14. Lebenslauf

Wurde aus der Version entfernt.