

Dissertation

Apoptose im unstabilisierten und stabilisierten Knochen nach Frakturen im Rattenmodell

Eingereicht von:

Dr.med.univ. Silvia Zötsch

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor of Medical Science

(Dr. scient. med.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Zellbiologie, Histologie und Embryologie

Unter der Betreuung von

Ao.Univ.-Prof. Mag. Dr. Heinz Hutter

Univ.-Ass. Dipl.-Ing. Dr. Thomas Kroneis

Assoz. Prof. Dr. Annelie Weinberg

Graz, 20.9.2015

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, 20.9.2015

Dr. Silvia Zötsch

Danksagung

Ein herzlicher Dank gilt natürlich meinen Betreuern Univ.-Ass. Dipl.-Ing. Dr. Thomas Kroneis und Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Heinz Hutter, die mir während der ganzen Zeit des Studiums der Medizinischen Wissenschaft und der Dissertationserstellung mit Rat und Tat zur Seite stand und auch in Zeiten, wo ich aufgrund des Zeitmangels wegen meiner klinischen Ausbildung und im Rahmen mehrerer Motivationstiefs am Zweifeln war, im Hintergrund immer als Ansprechpartner dienten. DANKE!

Danke auch an Assoz. Prof. Dr. Annelie Weinberg, die mich bereits durch meine Diplomarbeit begleitet hat und der ich meinen bisherigen medizinischen Werdegang verdanke.

Meinen lieben Kolleginnen Nina Hauter und Katrina Evers, die mit mir unzählige Stunden im Labor verbracht habe, gilt natürlich auch Danke zu sagen. Es war eine tolle Zusammenarbeit und hat immer Spaß gemacht.

Ein besonderer Dank gilt Assoz.Prof. PD Dr. Georg Singer, der mir in der Schlussphase der Erstellung der Dissertation als Berater, Kritiker und Retter in der Not zur Seite gestanden ist. Ohne ihn hätte ich diese Dissertation wahrscheinlich niemals fertig gestellt.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG.....	5
ABSTRACT.....	7
ALLGEMEINER TEIL.....	9
1) Der Knochen.....	9
1.1) Histologische Grundlagen.....	9
1.1.1) Die Knochenzellen.....	10
1.1.1.1) Osteoblasten.....	10
1.1.1.2) Osteozyten.....	10
1.1.1.3) Osteoklasten.....	10
1.1.2) Die Matrix.....	11
1.1.3) Periost und Endost.....	11
1.1.4) Knochenarten.....	12
1.1.4.1) Der Geflechtknochen.....	12
1.1.4.2) Der Lamellenknochen.....	12
1.2.) Knochenentwicklung.....	13
1.2.1) Desmale (direkte) Ossifikation.....	13
1.2.2) Endchondrale (indirekte) Ossifikation.....	13
1.3) Der Knochenaufbau.....	14
1.4) Die Epiphysenfuge.....	15
1.4.1) Epiphysenfugenschluss.....	17
1.5) Knochenwachstum und –umbau.....	18
2) Frakturen im Wachstumsalter.....	19
2.1) Einteilung von Frakturen im Wachstumsalter.....	19
2.1.1) Schafffrakturen.....	19
2.1.1.1) Frakturen der Diaphyse.....	19
2.1.1.1) Frakturen der Metaphyse.....	21
2.1.2) Gelenksfrakturen.....	22
2.1.2.1) Frakturen bei offenen Fugen.....	22
2.1.2.2) Frakturen bei sich schließenden Fugen.....	23
2.1.3) Epiphysäre Bandausrisse.....	24
2.2) Frakturheilung.....	25

2.2.1) Die primäre Frakturheilung.....	25
2.2.2) Die sekundäre Frakturheilung.....	25
2.3) Remodelling.....	27
3) Knochenwachstum und Wachstumsstörungen.....	29
3.1) Stimulative Wachstumsstörungen.....	30
SPEZIELLER TEIL.....	32
1) Einleitung.....	32
2) Material und Methode.....	34
2.1) Studiendesign.....	34
2.2) Chirurgisches Verfahren.....	36
2.3) Euthanasie.....	37
2.4) Entkalkung, Immunhistochemie und Visualisierung.....	38
2.4) Statistische Analysen.....	43
3) Ergebnisse.....	44
3.1) Beobachtung der Ratten.....	44
3.1.1) Belastungsverhalten.....	44
3.1.2) Frakturstabilität.....	44
3.2) Etablierung des Auswertungsverfahrens.....	45
3.3) Auswertung der Schnitte.....	45
3.3.1) visuelle Auswertung.....	45
3.3.2) Auswertung der Apoptoseraten.....	48
4) Diskussion.....	50
4.1) Automatisierung der Auswertung.....	50
4.2) Auswertung der Apoptoseraten.....	51
4.2.1) Visuelle Auswertung.....	51
4.2.2) Statistische Analysen.....	52
ANHANG.....	54
1) EDTA-Entkalkung.....	54
2) HOPE®-Fixierung.....	54
3) Schnittpräparation / Entparaffinieren von HOPE-Schnitten.....	54
4) TUNEL-Färbung.....	55
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	56
TABELLENVERZEICHNIS.....	57
LITERATURVERZEICHNIS.....	58

ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung:

Wachstumsstörungen nach Frakturen sind ein bekanntes Problem und wurden bereits mehrfach beschrieben. Inwiefern sich eine Stabilisierung einer Schafffraktur auf die Aktivierung der Wachstumsfuge auswirkt, wurde bisher jedoch noch nicht belegt.

Ziel der Studie ist daher die Visualisierung der Aktivierung der Wachstumsfuge in stabilisierten und unstabilierten Frakturen.

Material und Methode:

Es handelt sich um eine experimentelle Studie am Rattenmodell (EK BMBWK-66.010-BrGT/2006). 75 Sprague Dawley Ratten wurde in 3 Gruppen unterteilt (Sham, Osteotomie und Osteosynthese) und einer operativen Versorgung zugeführt. Jeweils fünf Tiere wurden an den Tagen 1, 3, 7, 14 und 28 euthanasiert und die Wachstumsfugen immunhistochemisch mittels TUNEL-Methode gefärbt. Nach der Etablierung einer automatisierten Visualisierung und Auswertung erfolgte die statistische Auswertung des Apoptoseindex.

Ergebnisse:

Die automatisierte Auswertung mittels Cellenger zeigt Übereinstimmungen mit der manuellen Auswertung von 95,3%. Bei der Auswertung der Apoptoseraten zeigt sich eine Steigerung der Aktivität der Fuge am operierten Bein an Tag 1 in allen Tieren (Sham, Osteotomie und Osteosynthese) im Vergleich zum Gegenbein. Der Höhepunkt der Apoptoserate war in allen Tieren am 7. postoperativen Tag zu beobachten.

Diskussion:

Eine automatisierte Auswertung des Apoptoseindex zeigt sich als möglich und erlaubt eine gute und sichere Auswertung mit guter Reproduzierbarkeit.

Bezüglich der Apoptoserate zeigt sich, dass auch ein isoliertes initiales Weichteiltrauma zu einer kurzfristigen Aktivierung der Fuge führt. Dies entspricht der Entzündungstheorie, wonach die Fuge durch Entzündungsmediatoren eine Aktivitätssteigerung erfährt. Aufgrund der Steigerung bis zum 7. Tag ist dies jedoch nur ein kurzfristiger Effekt. Um eine genauere Aussage auf die Auswirkung der Entzündungstheorie und der Stabilisierung einer Fraktur zu erhalten, wäre ein längerer Beobachtungszeitraum nötig.

Weiters ist eine ergänzende Auswertung anderer Aktivitätsparameter der Wachstumsfuge (z. B. BrdU) nötig, um die Spezifität der Apoptoserate als Marker für die Fugenaktivierung zu errechnen.

ABSTRACT

Background:

Overgrowth after fractures in the growth period is a well known problem. The influence of a stabilization of diaphyseal fractures on the overgrowth has not been investigated until now. The aim of the study was therefore to visualize the stimulation of the growthplate in stabilized and unstabilized fractures.

Materials und Methods:

To reach the aim we used an experimental study on a rat model, where 75 Spraque Dawley rats were randomly divided into 3 groups (sham, osteotomy and osteosynthesis). These rats were brought to surgery and euthanized on day 1, 3, 7, 14 and 28 (n=5) and the growth plates were analyzed by using TUNEL staining. After establishing an automated analytic process the index of apoptosis was assessed.

Results:

The automated analytic process was adequate with a congruency with the visual counting of 95.3%. An increase of the index of apoptosis could be observed on day 1 in all groups compared to the untreated leg. A maximum of the index of apoptosis could be observed on day 7 in all animals.

Discussion:

The automated analytic process seems to be a good tool for valid cellcounting. According to the index of apoptosis also an isolated initial soft tissue injury may lead to an activation of the growthplate. This correlates with the theory of inflammation, describing that the inflammatory process leads to a temporary activation of the growth plate. Since the index of apoptosis reaches a maximum at the 7th postoperative day a short-time activation of the growthplate can be assumed. In order to confirm our result a longer study period is necessary. Additionally, other parameters for the activity of the growth plate (like BrdU) should be analyzed in order to evaluate the specificity of apoptosis as a parameter of activity of the growth plate.

ALLGEMEINER TEIL

1) Der Knochen

1.1) Histologische Grundlagen

Knochengewebe besteht hauptsächlich aus der Knochenmatrix, welche eine kalziumreiche extrazelluläre Substanz ist, dessen organische Komponente von Osteoblasten gebildet wird. Zu 45% besteht die Knochensubstanz aus Mineralien, zu 30% aus organischem Material und zu 25% aus Wasser (Lüllmann-Rauch, 2015).

Im Rahmen der Mineralisierung (=Verkalkung), werden Osteoblasten von Knochen eingeschlossen und schließlich als Osteozyten bezeichnet. Sie liegen in kleinen Hohlräumen (Lakunen) und sind mit feinen Fortsätzen, welche in den Kanalikuli liegen, miteinander verbunden.

Des Weiteren befinden sich auch Osteoklasten im Knochen (mehrkernige Riesenzellen), welche die Knochenmatrix abbauen können. Der Knochen ist von einem speziellen Bindegewebe umgeben, welches innen als Endost und außen als Periost bezeichnet wird. An der Grenze zum Knochen befinden sich darin „lining cells“, die Vorläuferzellen der Osteoblasten darstellen und für die Frakturheilung von großer Bedeutung sind (Junqueira und Carneiro, 2004).

1.1.1) Die Knochenzellen

1.1.1.1) Osteoblasten

Diese Zellen synthetisieren Kollagen I, Proteoglykane und Glykoproteine, welche die organischen Bestandteile der Knochenmatrix darstellen. Sie sind kubisch und zylinderförmig und sitzen vor allem an der Oberfläche des Geflechtknochens. Mit nachlassender Aktivität werden sie flacher und bilden Fortsätze.

Im Endoplasmatischem Retikulum (= ER) wird hauptsächlich Kollagen I synthetisiert und im Golgi-Apparat modifiziert und anschließend sezerniert. Die noch nicht verkalkte Knochenmatrix wird Osteoid genannt. Die Apposition erfolgt anschließend durch Einlagerung von Kalziumphosphat. Die Verkalkung wird durch Ablagerung von diesem auf den Kollagenfibrillen und durch verschiedene - von Osteoblasten gebildeten - Proteinen, Osteocalcin und Osteopontin unterstützt.

1.1.1.2) Osteozyten

Diese finden sich im verkalkten Knochen in Lakunen und haben Fortsätze, welche sich in die Kanalikuli erstrecken und über gap junctions miteinander verbunden sind. Sie reagieren auf mechanische Reize und halten die extrazelluläre Matrix aufrecht, weshalb nach ihrem Absterben diese resorbiert wird.

1.1.1.3) Osteoklasten

Osteoklasten sind multinukleäre Zellen, welche beweglich sind und zum monozytären Phagozytosesystem (MPS) gehören. Sie resorbieren mineralisierten Knochen. Die „clear zone“ - ein mikrofilamentreicher Saum um die faltige Oberfläche, die sich an die Knochenmatrix anlagert – verbindet die Osteoklasten mit dem Knochen und dichtet die Resorptionslakune ab, in dem der Knochenabbau stattfindet. Darin werden V-ATPase, Kollagenasen und Kathepsine sezerniert, was eine Auflösung der Hydroxyapatitkristalle bewirkt und somit zur Demineralisierung des

Knochens führt. Die dadurch freiliegenden Kollagenfibrillen werden von den Proteasen hydrolisiert (Junqueira und Carneiro, 2004; Lüllmann-Rausch, 2015).

1.1.2) Die Matrix

Anorganisches Material bildet den Hauptbestandteil, der hauptsächlich aus Hydroxyapatitkristallen besteht. Um diese Kristalle findet sich eine Hydratationshülle aus Wasser und Ionen, welche einen Ionenaustausch erleichtert.

95% des organischen Anteils ist Kollagen I (Junqueira und Carneiro, 2004).

1.1.3) Periost und Endost

Das **Periost** besteht hauptsächlich aus Kollagenfasern und Fibroblasten, die in Bündeln (Sharpey-Fasern) in die Matrix einstrahlt und somit die Bindegewebshülle mit dem Knochen verbindet. Die sogenannten „lining cells“ bilden eine Schicht aus Vorläuferzellen, welche für Knochenwachstum und –reparatur eine wichtige Rolle spielen.

Das **Endost** besteht ebenfalls aus abgeflachten Vorläuferzellen und wenig Bindegewebe und kleidet die Hohlräume im Inneren des Knochens aus.

Hauptaufgabe dieser Bindegewebsschichten ist die Versorgung des Knochens und der Bereitstellung von Osteoblasten (Junqueira und Carneiro, 2004; Lüllmann-Rausch, 2015).

1.1.4) Knochenarten

1.1.4.1) Der Geflechtknochen

Der Geflechtknochen wird auch Primärknochen genannt und entsteht durch Neubildung. Er wird im Laufe der Entwicklung durch Lamellenknochen ersetzt. Er weist einen geringeren Mineralisierungsgehalt und eine zufällige Anordnung der Kollagenfibrillen auf.

1.1.4.2) Der Lamellenknochen

Der Lamellenknochen besteht aus einer Substantia compacta außen und einer Substantia spongiosa. Die Enden des Knochens werden Epiphysen genannt und bestehen größtenteils aus Spongiosa, wohingegen der Schaft (Diaphyse) fast vollständig aus Compacta besteht. Die Lamellen werden aus Kollagenfasern und Matrix gebildet und in konzentrischen Schichten zu sogenannten Havers-Kanälen angeordnet. Diese bilden zusammen mit den Lamellen das Osteon, welches von mineralisierter Matrix (=Zement) umgeben wird. Zwischen den Osteonen befinden sich schräg verlaufende Volkmann-Kanäle (siehe Abb. 1).

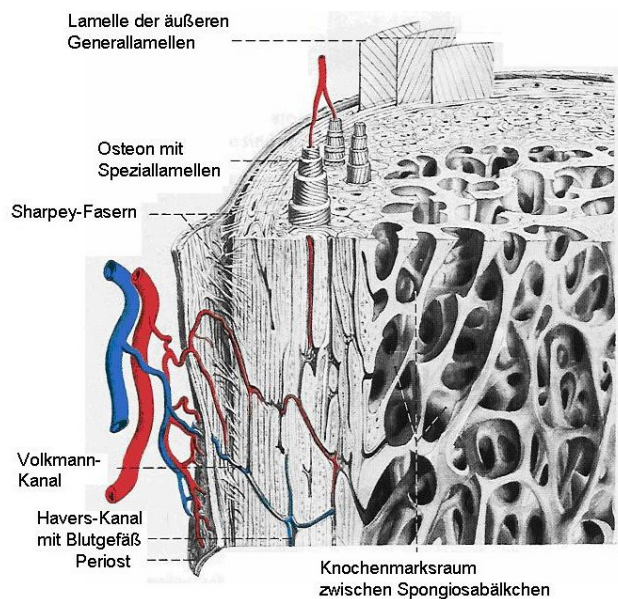


Abbildung 1: Aufbau des Lamellenknochens (Junqueira und Carneiro, 2004)

Das Knochenmark befindet sich in den Räumen (Trabekeln) innerhalb der Spongiosa und in den Markhöhlen. Es wird das rote und das gelbe Knochenmark unterschieden. Im roten Knochenmark werden Blutzellen gebildet, das gelbe Knochenmark besteht hauptsächlich aus Fett (Junqueira und Carneiro, 2004).

1.2.) Knochenentwicklung

Es gibt 2 Arten der Knochenentstehung:

1.2.1) Desmale (direkte) Ossifikation

Durch Mineralisierung der sezernierten Matrix tritt zunächst eine Verdickung des mesenchymalen Gewebes auf. Diese Stelle wird als primäres Ossifikationszentrum bezeichnet. Die Zellen darin wandeln sich in Osteoblasten um, die Knochenmatrix produzieren, welche dann verkalkt.

Diese Form der Ossifikation betrifft vor allem Knochenneubildung im Bereich der platten Schädelknochen bei Neugeborenen.

1.2.2) Endchondrale (indirekte) Ossifikation

Zunächst findet die Bildung von hyalinem Knorpel statt, welcher anschließend verknöchert.

Hierbei können **2 Phasen** unterschieden werden:

1. Chondrozyten hypertrophieren und gehen anschließend zu Grunde, wodurch Lakunen entstehen und die übrige Knorpelmatrix von Chondroklasten abgebaut wird oder verkalkt.

2. In dieser Phase wachsen Blutgefäße in die Lakunen ein und mesenchymale Stammzellen differenzieren zu Osteoblasten und ersetzen die Knorpelreste mit Knochenmatrix. Es entsteht ein Geflechtknochen und Reste des verkalkten Knorpels werden von Osteoklasten resorbiert. In späteren Stadien der Ossifikation entstehen in den langen Röhrenknochen über desmale Ossifikation sekundäre Ossifikationszentren im Zentrum der Epiphyse (Junqueira und Carneiro, 2004; Lüllmann-Rausch, 2015).

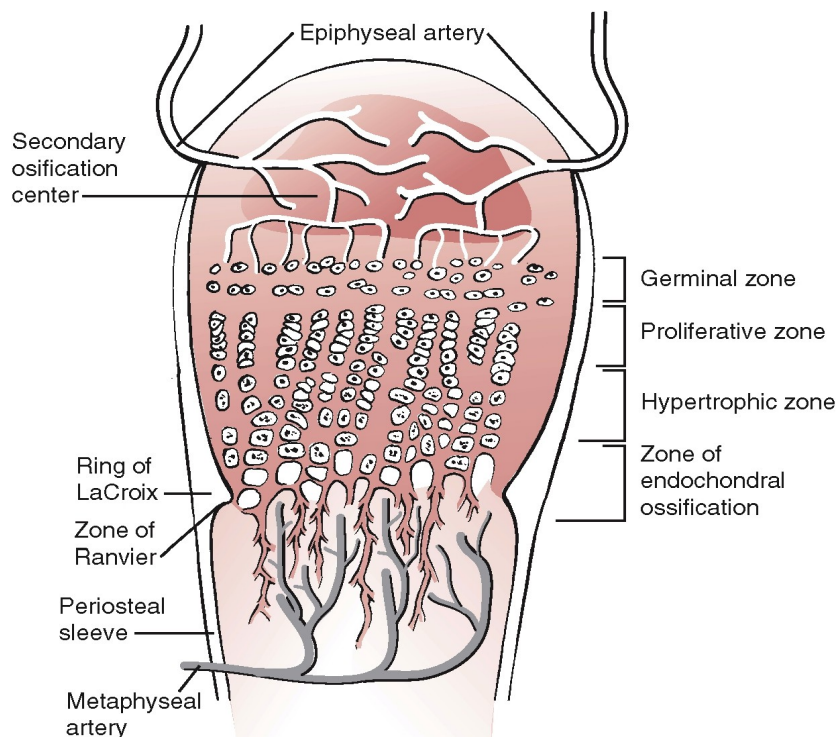


Abbildung 2: Enchondrale Ossifikation im Schema (Beaty und Kasser, 2009)

1.3) Der Knochenaufbau

Der Röhrenknochen besteht aus den Epiphysen (gelenknah) und Metaphysen (gelenkfern), welche im Wachstumsalter durch die Wachstumsfugen getrennt sind und aus Spongiosa bestehen. Die Diaphyse des Röhrenknochens ist hohl.

Der gesamte Knochen ist von dem Periost umgeben, welches durch Blutgefäße versorgt ist und durch Diffusion für die Versorgung der äußeren Knochenanteile verantwortlich ist.

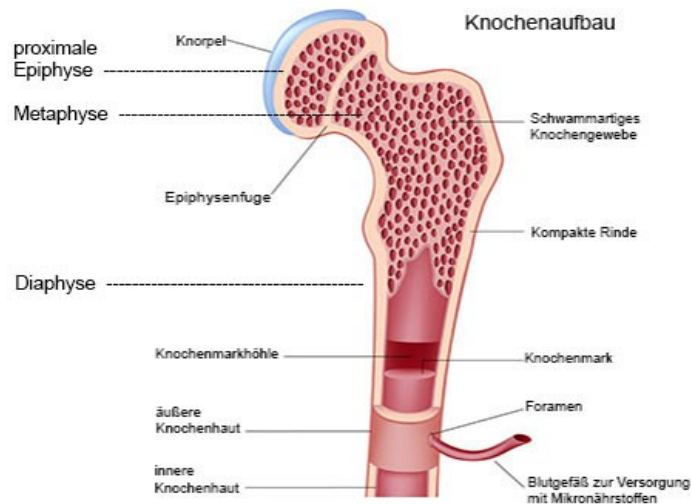


Abbildung 3: Aufbau des Knochens (http://www.der-querschnitt.de/wp-content/uploads/2013/07/shutterstock_75515083-Alila-Medical-Images-knochenaufbau-2-angepasst.jpg)

1.4) Die Epiphysenfuge

Die Epiphysenfuge besteht aus 4 verschiedenen Zonen, die nicht scharf voneinander abgegrenzt werden können und von der Epiphyse zur Diaphyse folgendermaßen verlaufen:

; . Zone:

Dies ist die Zone des ruhenden Knorpels, wo kein Wachstum erfolgt. Diese Zone dient vor allem dazu, den Knorpel mit dem Knochen der Epiphyse zu verankern. Dazwischen befinden sich sehr viele Blutgefäße, die zur Blutversorgung der gesamten Epiphysenfuge dienen.

Diese Zone wird auch **Reservezone** genannt.

< Zone:

Die **Proliferationszone** besteht aus proliferierenden Chondrozyten, welche die Knorpelzellen ersetzen, die aufgrund des Wachstums an der diaphysären Seite verloren gehen. Diese Chondrozyten ordnen sich in einer charakteristischen Säulenform an (=Säulenknorpel).

=. **Zone:**

Die nächste Zone (**Knorpelumbauzone**) besteht aus hypertrophen ausdifferenzierten Knorpelzellen, welche unter anderem raues endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Glycogen und Lipideinschlüsse enthalten. Dieser Zelltyp produziert viel alkalische Phosphatase, welche für die Verkalkung der Matrix zuständig ist. Das hier vorhandene Knorpelgewebe wird auch Blasenknorpel genannt.

>. **Zone:**

Die **Ossifikationszone** enthält zunächst noch intakte Knorpelzellen, welche jedoch unmittelbar zur Grenze der knöchernen Diaphyse zerstört werden. Dadurch bilden sich schlanke Septen (Lakunen) mit verkalkten Knorpel, in denen sich Osteoblasten ansiedeln (Schünke, 2000; Junqueira und Carneiro, 2005; Lüllmann-Rauch, 2006).

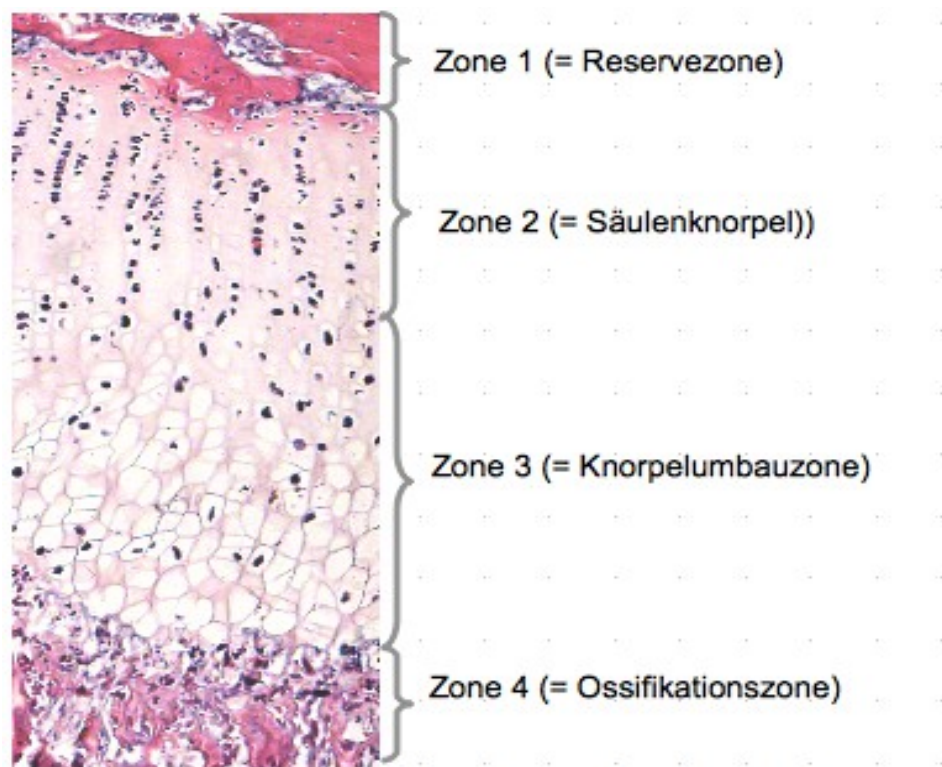


Abbildung 3: histologisches Bild der Wachstumsfuge mit den verschiedenen Zonen

Das Epiphysenwachstum erfolgt somit nur an der diaphysären Seite der Wachstumsfuge. Sie sorgt für das Längenwachstum langer Röhrenknochen durch Proliferation der Chondroblasten (Schünke, 2000; Junqueira und Carneiro, 2004; Welsch, 2005).

1.4.1) Epiphysenfugenschluss

Wenn der knorpelige Anteil der Epiphysenfuge aufgebraucht und durch die knöchernen Epiphysenlinie ersetzt ist, bedeutet dies auch den Abschluss des Längenwachstums. Der Zeitpunkt des Fugenschlusses ist geschlechtsspezifisch und weist außerdem individuelle Unterschiede auf (Schünke, 2000).

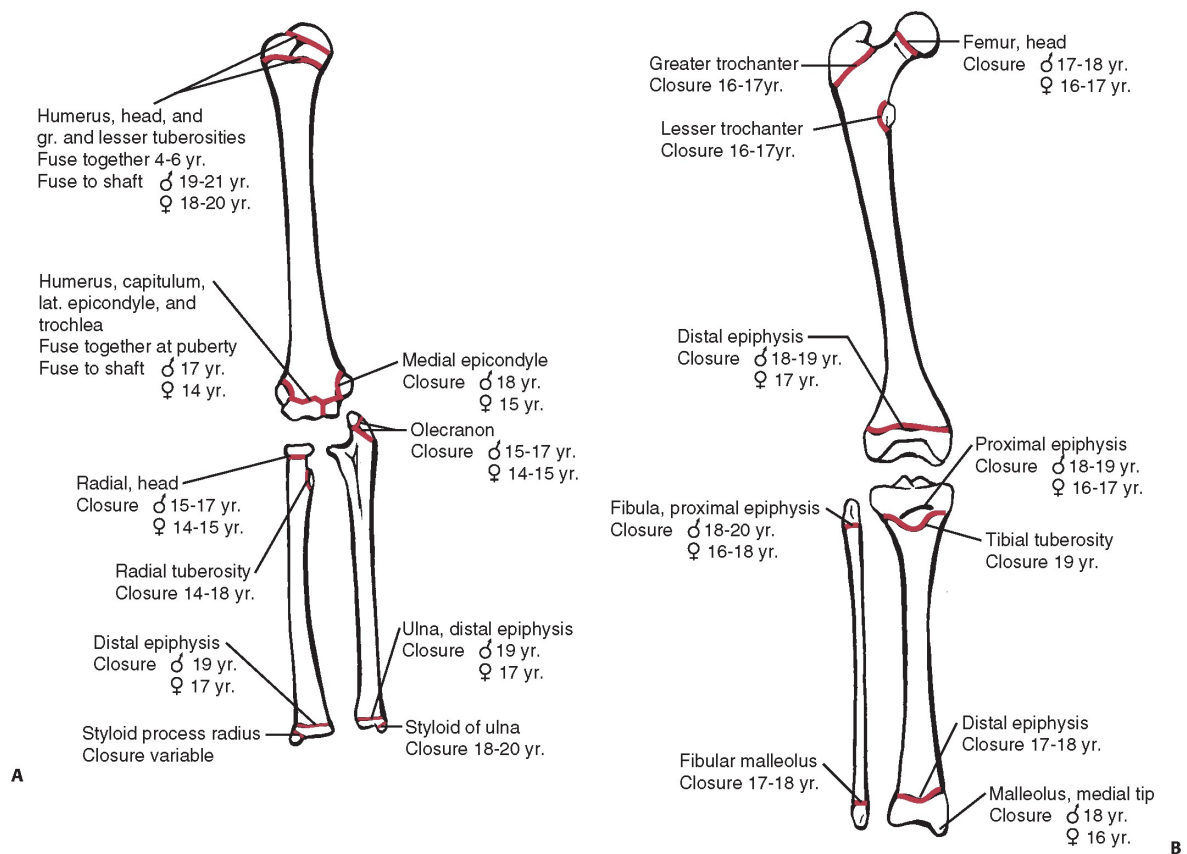


Abbildung 4: Zeitpunkt des Epiphysenfugenschlusses nach Lokalisation und Geschlecht (Welsch, 2005)

1.5) Knochenwachstum und –umbau

Der Knochenumbau ist bei Kindern 200-mal schneller als bei Erwachsenen und hängt von Druck und Spannung durch Muskelkontraktionen, Hormone, Wachstumsfaktoren und Körperbewegungen ab.

Das Längenwachstum von Röhrenknochen erfolgt in der Epiphysenfuge, das Dickenwachstum wird durch die Knochenbildung des Periosts erreicht. Nach dem Schluss der Epiphysenfugen ist somit kein Längenwachstum mehr möglich, jedoch ist eine Dickenzunahme immer möglich (Schünke, 2000).

2) Frakturen im Wachstumsalter

Bei offenen Fugen sind Frakturen meist stereotyp, wobei die Epiphysenfuge als „Sollbruchstelle“ das Gelenk im Wachstumsalter schützt. Daher stellen Gelenksfrakturen im Kindes- und Jugendalter eine Rarität dar. Diese treten erst ab dem beginnenden Wachstumsfugenschluss auf. Epiphysenlösungen und Metaphysenfrakturen sind hingegen häufige Verletzungen, wodurch sich ein Verhältnis von Gelenksfrakturen zu extraartikulären Frakturen von 1:50 ergibt (Marzi, 2006).

2.1) Einteilung von Frakturen im Wachstumsalter

Nach der Lokalisation unterscheidet man Schaft- und Gelenksfrakturen:

2.1.1) Schaftfrakturen

Hierbei erfolgt eine Einteilung in Verletzungen an der Dia- und Metaphyse:

2.1.1.1) Frakturen der Diaphyse

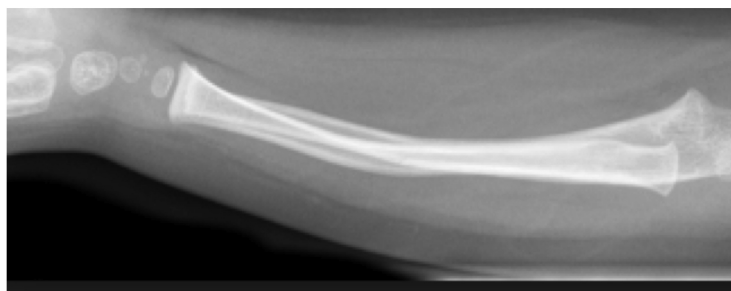
Bei diaphysären Frakturen unterscheidet man zwischen partiellen und kompletten Frakturen.

2.1.1.1.1) Partielle Frakturen

Diese Frakturen sind typische Frakturen im Kindesalter, da der Knochen noch „biegsam“ und die Corticalis sehr stark ist.

Partielle Frakturen der Diaphyse sind:

≙ *Plastische Frakturen*: Hierbei kommt es zur einer plastischen Verformung des Knochens. Die Corticalis zeigt sich intakt.



bbildung 5: plastische Unterarmfraktur - die Corticalis zeigt sich intakt, jedoch fällt eine vermehrte Biegung von Radius

≙ *Grünholzfrakturen*: Es handelt sich dabei um einen Biegungsbruch wobei eine Corticalis gebrochen und die Gegencorticalis intakt ist. Bei diesen Frakturen besteht aufgrund der fehlenden Frakturheilung an der Seite der stehenden Corticalis zu einer möglichen Achsabweichung und des Weiteren zu einer erhöhten Refrakturrate. Daher sollte eine Grünholzfraktur immer durchgebrochen werden.

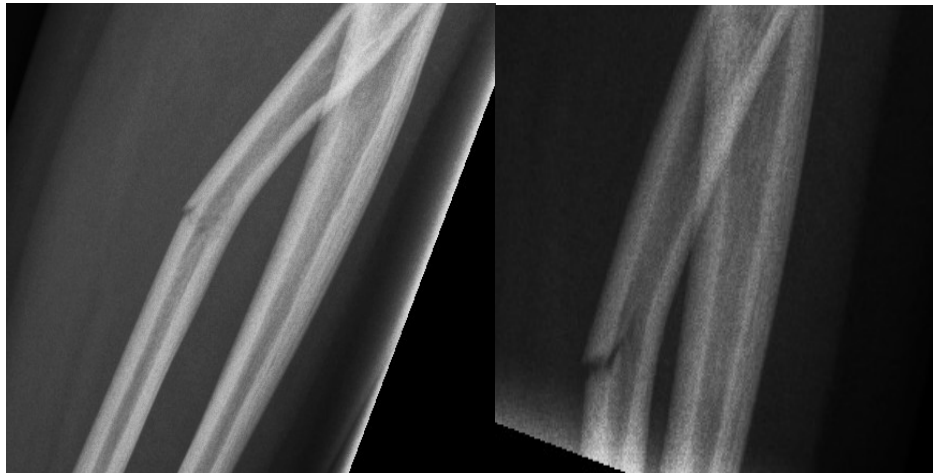


Abbildung 6: Radiusgrünholzfraktur – man sieht, dass eine Corticalisseite unverletzt bleibt.

2.1.1.1.2) *Komplette Frakturen*

Sie werden wie bei Erwachsenen in

- ≙ *Schrägfrakturen*
- ≙ *Querfrakturen*
- ≙ *Trümmerfrakturen* und
- ≙ *Spiralfrakturen*

unterteilt (Marzi, 2006; Weinberg, 2006; Von Laer, 2007)



Abbildung 7: Unterarmfraktur komplett mit Dislokation um Schaftbreite und Verkürzung bei einem 6-jährigen Buben. Es handelt sich hierbei um eine Querfraktur.

2.1.1.1) Frakturen der Metaphyse

2.1.1.1.1) Wulstfrakturen

Als Wulstfrakturen bezeichnet man unproblematische Einstauchungen der Spongiosa und der dünnen Corticalis im Bereich der Metaphyse. Es handelt sich dabei um stabile Frakturen.

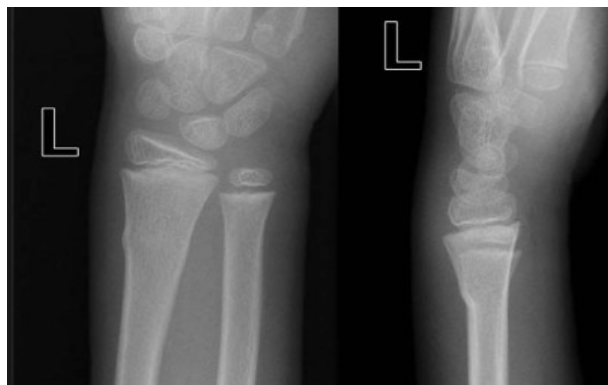


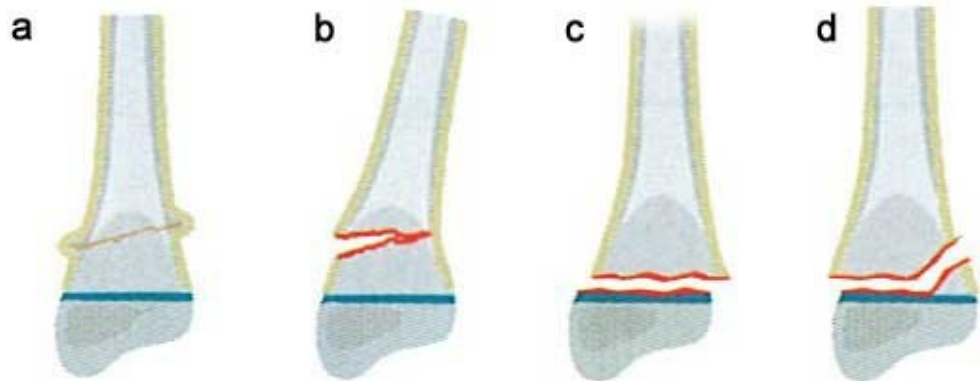
Abbildung 8: distale Radiuswulstfraktur *loco typico* bei einem 7-jährigen Mädchen

2.1.1.1.2) Epiphysenlösungen

Bei den Epiphysenlösungen erfolgt die Lösung im metaphysären Anteil der Fuge, in dem keine Zellproliferation erfolgt. Die Epiphysenfuge per se bleibt jedoch unversehrt. Eine Wachstumsstörung kann jedoch aufgrund des Traumas und der daraus resultierenden Krafteinwirkung auftreten. (Von Laer, 2007).

Epiphysenfugenlösungen werden nach Salter Harris eingeteilt.

- ≡ Salter Harris I: ohne metaphysärem Biegungskeil
- ≡ Salter Harris II: mit metaphysärem Biegungskeil



bbildung 9: metaphysäre Frakturen (Weinberg, 2006)

a) Wulstfraktur

b) Grünholzfraktur

2.1.2) Gelenksfrakturen

Sind Raritäten im Kindesalter. Hierbei wird je nach Zustand der Wachstumsfuge eine Unterscheidung zwischen Frakturen einer offenen Fuge und einer mit beginnendem Fugenschluss getroffen, sowie den epiphysären Bandausrissen.

2.1.2.1) Frakturen bei offenen Fugen

Bei Epiphysenfrakturen kann die Bruchlinie auch die noch offene Fuge kreuzen, was zur Entstehung eines metaphysären Biegungskeiles führen kann.

Im Rahmen der Heilung kann es zu sogenannten Ausheilungsbrücken kommen, die Teile der Wachstumsfuge verschließen und somit ein konsekutives Fehlwachstum nach sich ziehen.

Die Einteilung erfolgt auch hier nach Salter Harris:

- ≙ Salter Harris III: rein epiphysäre Frakturen
- ≙ Salter Harris IV: epi-metaphysäre Fraktur (Marzi, 2006; Weinberg, 2006; Von Laer, 2007)

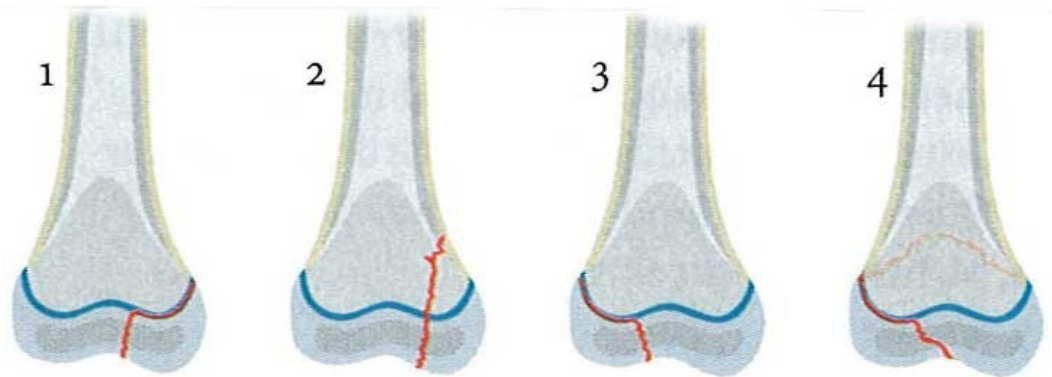
2.1.2.2) Frakturen bei sich schließenden Fugen

= Übergangsfrakturen

Dabei handelt es sich um Frakturen bei partiellem Wachstumsfugenschluss.

Die Einteilung erfolgt in:

- ≙ Two-plane-Fractures: ohne Mitbeteiligung der Metaphyse
- ≙ Tri-plane-Fractures: mit Mitbeteiligung der Metaphyse



bbildung 10: Gelenksfrakturen (Weinberg, 2006)

- a) epiphysäre Fraktur bei offener Fuge (Salter Harris III)
- b) epi-metaphysäre Fraktur bei offener Fuge (Salter Harris IV)
- c) epiphysäre Fraktur bei beginnendem Fugenschluss („two-plane“)

2.1.3) Epiphysäre Bandausrisse

Es handelt sich hierbei oftmals um chondrale, periostale oder ossäre Ausrisse, welche meist nicht zu Wachstumsstörungen führen. (Von Laer, 2007)

Bandausrisse kommen bis zum 10. Lebensjahr vor, wobei die Bänder hierbei noch stabiler als ihr Ansatz sind. Danach werden Bandrupturen häufiger. (Marzi, 2006)



Abbildung 11: Eminentiaausriss bei einem 12-jährigen Patienten als Beispiel für einen typischen epiphysären Bandausriss.

2.2) Frakturheilung

Die Frakturheilung beginnt bereits zum Zeitpunkt des Unfalles, da direkt dabei zahlreiche Prozesse gestartet werden, um den Knochen so rasch wie möglich wieder herzustellen.

Man unterscheidet **2 Arten** von Frakturheilung:

2.2.1) Die primäre Frakturheilung

Sie erfolgt ohne wesentliche Kallusbildung und bedarf einer möglichst stabilen Versorgung bei möglichst anatomischer Reposition.

2.2.2) Die sekundäre Frakturheilung

Am wachsenden Skelett erfolgt die Heilung sekundär immer über die Kallusbildung, wobei das Ausmaß von der primären Fehlstellung (in Frontal- und Sagittalebene und auch Seit-zu-Seit-Verschiebungen) sowie der Instabilität der Fraktur abhängt

Ebenso hängt die Dauer der Frakturheilung von den genannten Faktoren ab. So zB heilen Schrägfrakturen aufgrund der großen Frakturfläche schneller als Querfrakturen.

Die sekundäre Frakturheilung läuft in **4 Phasen** ab (siehe Abb. 9):

1. *Entzündungsphase* (Inflammation): Kapillaren sprossen vermehrt in das Frakturhämatom ein und innerhalb von zwei bis drei Tagen wandern nun Makrophagen, Mastzellen und Granulozyten in den Frakturbereich. Diese werden durch Zelluntergang angelockt. Durch die Minderperfusion der Frakturrenden kommt es zu einer Dilatation der Gefäße und u einer Erwärmung der Weichteile. (Hert et al, 1994)

Diese Phase dauert etwa 24-72h. Es kommt zur Freisetzung von vasoaktiven Mediatoren, Wachstumsfaktoren und von bone morphogenic protein (BMP).

2. In der *Granulationsphase* (Reparation) werden nun die nekrotischen Zellen durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen abgebaut. Mesenchymale Stammzellen und Fibroblasten kommen nun ins Frakturgebiet.
3. Der *weiche Kallus* entsteht aus Fibroblasten und Kollagenfasern und führen zu einer Überbrückung des Frakturspaltes. Osteoklasten bauen weiter nekrotische Areale ab und Osteoblasten gelangen in den Markraum und Formieren Knochen- und Knorpelmatrix im Kallus. BMPs sorgen für die Initiierung der Osteoinduktion, welche zur entsprechenden Differenzierung der Stammzellen führt. Im weiteren Verlauf führt die Osteokonduktion zu einem größeren Kallus und somit zur Überbrückung größerer Defektzonen. In der zweiten posttraumatischen Woche hat die Knorpelbildung den Höchststand erreicht. Aus den Chondrozyten entsteht nun durch enchondrale Ossifikation der Geflechtknochen.
4. Der *harte Kallus* fördert nun die Stabilität und wird durch Druck- und Zugbelastungen in Lamellenknochen umgebaut (Remodelling) (Junqueira und Carneiro, 2004; Winker, 2011).

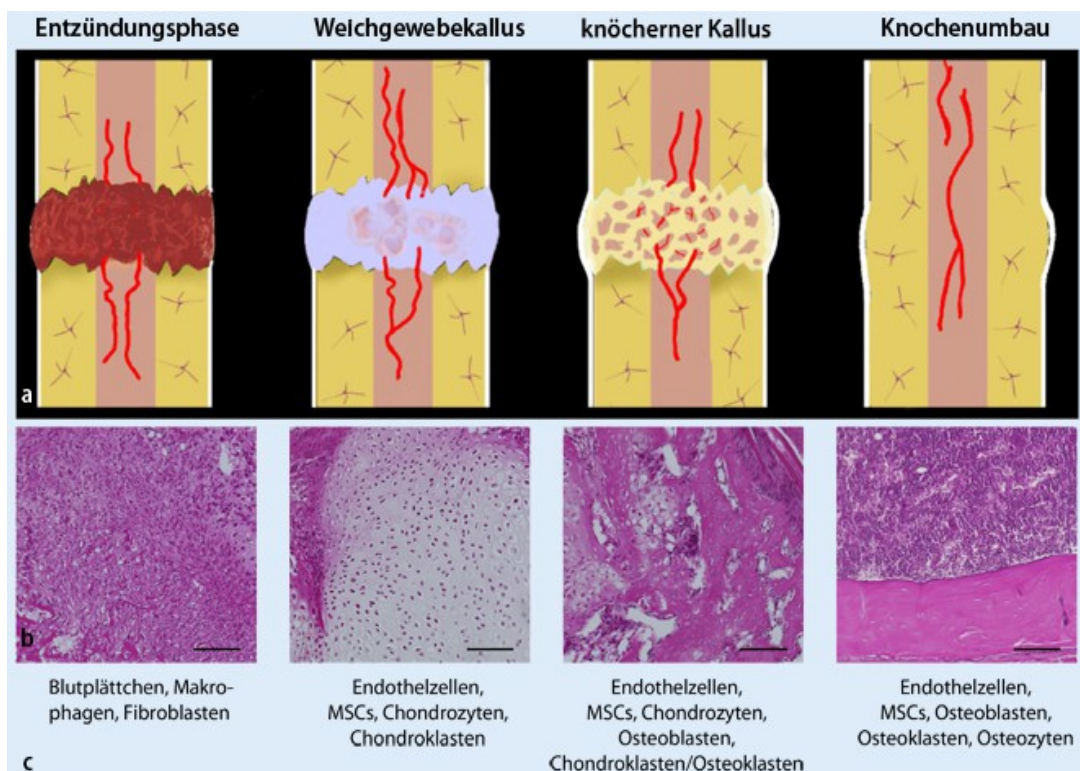


Abbildung 12: Sekundäre Frakturheilung (Beckmann et al, 2004)

Wichtigen Einfluss auf die Frakturheilung nehmen unter anderem das Alter des Patienten, die Art und Lokalisation der Fraktur, die Schwere der Gesamtverletzung, der Hormonstatus/Ernährungsstatus des Patienten und ggf. Zusatzerkrankungen (Diabetes, Anämie, Knochenerkrankungen, Bestrahlung bei malignen Prozessen...).

Bei einer fehlenden knöchernen Heilung spricht man von Pseudarthrosen wobei man folgende Formen unterscheidet:

- ≡ Elefantenfuß (kallusreich)
- ≡ Pferdehuftyp (minimaler Kallus)
- ≡ oligotrophische Form (kein Kallus)
- ≡ nekrotisches Fragment (Sequester)
- ≡ atrophische Pseudoarthrose
- ≡ Knochendefekt (Jerosch, Bader und Uhr, 2002)

2.3) Remodelling

Unter Remodelling versteht man den Knochenumbau zur Anpassung an veränderte mechanische Bedingungen aufgrund von geänderten Belastungen (Be- und Entlastung). Dies kann sowohl die Knochenstärke als auch die Form betreffen und betrifft den gesamten Knochen, wobei auch die Ausrichtung der Lamellen und die Dicke der Corticalis verändert wird.

Dass Be- und Entlastung nicht immer zur gegengesetzten Reaktion des Knochens führen, zeigt der Fall der Stressfrakturen, wobei es bei zu hoher Belastung zu einem Knochenabbau (Resorption) kommt und daher eine Fraktur wahrscheinlicher wird (Weinberg, 2006; Von Laer, 2007).

Dem Remodelling unterliegen folgende Aufgaben:

1. Die Erhaltung der Form und Proportion im Wachstum (hierbei beginnt Remodelling schon in der Fetalperiode).
2. Die Reaktion auf geänderte Belastungen
3. Die Aufrechterhaltung der Homöostase von Kalzium und Phosphat (als metabolische Funktion)
4. Die Knochenausrichtung (bei Fehlstellungen nach Frakturen) (Jerosch, Bader und Uhr, 2002)



Abbildung 13: Remodelling bei St.p. distaler Radiusfraktur einer 5-jährigen Patientin. links: 3 Wochen post Trauma; rechts: nach 5 Monaten

3) Knochenwachstum und Wachstumsstörungen

Das Wachstum des Knochens besteht aus Dicken- und Längenwachstum und geht sowohl vom periost-endostalen Regulationssystem, als auch von den Wachstumsfugen aus und funktionieren nach dem Roux'schen Gesetz (=Gesetz der Anpassung). Demnach bestimmt die Funktion die Form, was beim Knochen ein Maximum an Stabilität bei einem Minimum an Materialaufwand (=Gewicht) bedeutet.

Grundsätzlich muss man **zwei Arten** von Wachstumsstörungen unterscheiden:

- 1) stimulative Wachstumsstörungen
- 2) hemmende Wachstumsstörungen

wobei sowohl nur eine einzelne, aber auch mehrere Fugen gemeinsam betroffen sein können. Wachstumsstörungen können die gesamte Fuge oder nur Teile davon betreffen und kommen nur bei offenen Fugen vor. Dies zeigt auch, dass das Auftreten von Wachstumsstörungen vor allem vom Alter des Patienten abhängt, da prämatüre und geschlossene Fugen nicht zu Wachstumsstörungen führen.

Stimulative Wachstumsstörungen sind nach jeder Fraktur im Wachstumsalter anzutreffen, wohingegen **hemmende Störungen** fakultativ sind und umso häufiger auftreten, je näher die Läsion der Epiphysenfuge zu finden war.

Störungen des Dickenwachstums sind selten, wohingegen das Längenwachstum häufig gestört ist und nach jeder Fraktur im Wachstumsalter zu erwarten ist. Diese Wachstumsstörungen werden jedoch häufig im Laufe des Wachstums ausgeglichen, können jedoch z. B. zu einer Beinlängendifferenz und somit klinischen Problemen führen. Bei Wachstumsstörungen an den oberen Extremitäten kommen nur die Störungen bei paarigen Knochen zur Wirkung, diese findet man dann im Sinne einer Ulnaplus- bzw. -minusvariante, welche mehr oder weniger klinische Symptome verursachen kann (Marzi, 2006; Weinberg, 2006; Von Laer, 2007).

Die Auswirkung einer Fraktur auf die Fuge ist auch abhängig vom Zeitpunkt bzw. der Wachstumsperiode in der sich die Fuge bei der Fraktur befindet. (Von Laer, 2007)

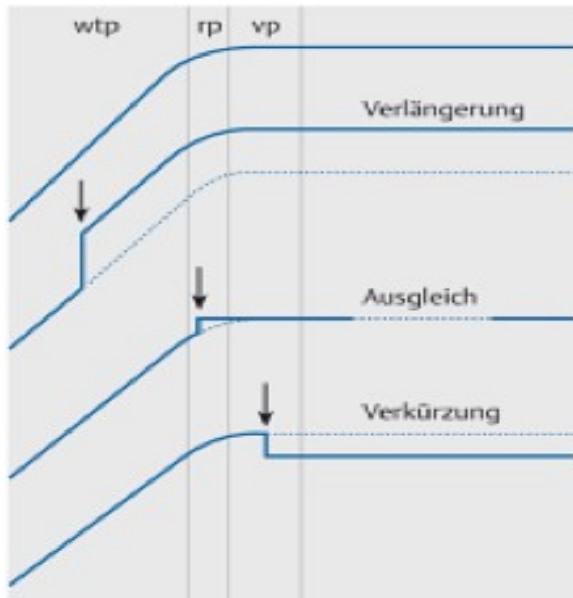


Abbildung 14: Reaktion der Fuge auf die Fraktur.

- in der Wachstumsphase (wtp): mehr oder weniger ausgeprägt persistierendeposttraumatische Verlängerung
- in der prämaturnen Ruhepause (rp): primäre Verlängerung wird durch vorzeitigen Verschluss ausgeglichen
- in der Verschlussphase (vp): vorzeitiger Fugenschluss führt zu einer Verkürzung (Von Laer, 2007)

3.1) Stimulative Wachstumsstörungen

= typische Reaktion des wachsenden Skeletts auf ein adäquates Trauma, wobei die Reparaturmechanismen zu einer Hyperämie führen. Jedoch ist diese Hyperämie – div. Studien zufolge – nicht die einzige Ursache, da es auch im Rahmen des Wachstums zu Beinlängendifferenzen führen kann. Zu beobachten ist jedoch auch, dass Repositionen und Operationen nach dem 5. Tag der Frakturheilung zu einem erhöhten stimulativen Effekt auf die Fuge führen. Ein Ziel ist daher, eine primär definitive Stabilisierung der Fraktur der unteren Extremität, zu erreichen (Marzi, 2006; Weinberg, 2006; Von Laer, 2007).

3.2) Hemmende Wachstumsstörungen

= vollständiger oder partieller vorzeitiger Fugenschluss

Diese Wachstumsstörungen sind selten und nur im Rahmen schwerer Weichteil- und Quetschverletzungen anzutreffen, wobei hier das epiphysäre Gefäßsystem geschädigt ist und somit ein Untergang des Fugenknorpels resultiert. Hier kommt es zur Verkürzung, wobei gilt, dass je jünger der Patient ist und je größer der Anteil der Fuge an das Gesamtwachstum ist, desto größer ist die resultierende Verkürzung.

Auch partielle Verschlüsse der Fugen sind möglich, wobei diese typisch an den unteren Extremitäten sind. Sie sind vor allem nach epiphysennahen metaphysären Frakturen/Epiphysenlösungen und Epiphysenfrakturen zu finden, wobei sich häufig eine Brückenbildung über die Fuge zeigt und somit ein Sistieren des Wachstums nach sich ziehen (Marzi, 2006; Weinberg, 2006; Von Laer, 2007).



bbildung 15: Beispiel eines partiellen frühzeitigen Wachstumsfugenschluss nach Salter Harris II Fraktur - der Innenknöchel zeigt sich dysplastisch

SPEZIELLER TEIL

1) Einleitung

Wachstumsstörungen nach Frakturen sind bereits seit langem bekannt und vielfach beschrieben. So kommen – wie bereits zuvor beschrieben – stimulative Wachstumsstörungen nach jeder Fraktur vor. Hemmende Störungen sind fakultativ und nehmen mit der Nähe zur Wachstumsfuge zu.

Bereits 1963 hat Trueta als Hauptursache für die Stimulation der Wachstumsfuge die Hyperämie der umgebenden Fuge betitelt (Trueta und Buhr, 1963).

Diese Theorie wurde jedoch aufgrund der Tatsache, dass Beinlängendifferenzen auch ohne Trauma auftreten können, bezweifelt. Vielmehr wurde eine Einwirkung von humoralen und hormonellen Faktoren, aber auch Entzündungsreaktionen als stimulierende Faktoren diskutiert (Von Laer, 2007).

Beobachtungen zeigten jedoch auch, dass eine Stimulation vor allem bei ausgeprägten Remodellingvorgängen und Manipulationen/Instabilitäten nach dem 5. Tag getriggert wird (Marzi, 2006; Weinberg, 2006; Von Laer, 2007).

Des Weiteren ist zu erwähnen, dass die Dauer der Stimulation begrenzt ist und vom Ausmaß und der Dauer der Reparationsvorgänge (Klapp, 1981) (Carsi, Abril und Epeldegui, 2003) (de Pablos, Franzreb und Borrios, 1994) und auch in der Ausprägung von der Wachstumsphase, in der sich die Fuge befindet, abhängt (siehe allgemeiner Teil). Vor dem 10. Lebensjahr kommt es daher vermehrt zu einer Verlängerung, danach eher zu einer Verkürzung (Von Laer, 2007). Außerdem hängt die Stimulation auch von der grundsätzlichen Wachstumspotenz der Fuge und der funktionellen Belastung ab (Weinberg, 2006). Von Laer empfiehlt daher eine primäre stabile Versorgung von Frakturen der unteren Extremität (Von Laer, 2007).

In Studien wurde bewiesen, dass Extensionsbehandlungen (damit verbunden: Instabilität und häufige Manipulationen) in 70% eine Beinlängendifferenz von mehr als 1cm bewirken, diese jedoch bei intramedullärer Schienung eher geringer bzw. gleich häufig wie bei der konservativen Therapie auftreten (Marzi, 2006; Weinberg, 2006). Dies spricht für eine primäre Stabilisierung der Frakturen. Widersprüchlich zeigen sich jedoch die Ergebnisse nach Plattenosteosynthesen, da diese im Vergleich zur konservativen Therapie zu einem signifikanten Längenzuwachs führen (Weinberg, 2006).

Eine histologische experimentelle Untersuchung des Einflusses der Stabilisierung einer Schaftfraktur auf die Wachstumsfuge wurde bisher noch nicht durchgeführt. Daher war das Ziel der vorliegenden Studie die Aktivierung der Wachstumsfuge nach Trauma zu visualisieren und auch einen Vergleich zwischen instabilen und stabilen Frakturen und deren mögliche unterschiedliche Auswirkungen auf die Wachstumsfuge zu ermitteln.

Daher ist das Ziel der Studie eine Evaluierung des Einflusses einer Stabilisierung einer Schaftfraktur auf die Wachstumsfuge durch die histologische Auswertung des Apoptoseindex als Marker für die Aktivität der Wachstumsfuge.

2) Material und Methode

2.1) Studiendesign

Zur Erhebung der Auswirkung eines Traumas auf die Wachstumsfuge wurde die Apoptose als einer der möglichen „Aktivitätsparameter“ verwendet, welche mittels TUNEL-Färbung visualisiert wurde.

Hierzu wurden drei Versuchsgruppen miteinander verglichen:

1. Sham-Gruppe: nur Hautschnitt
2. Versuchsgruppe I: Setzen einer instabilen Fraktur
3. Versuchsgruppe II: stabilisierte Fraktur

Als Modell wurde das Rattenmodell gewählt. Um eine Vergleichbarkeit trotz bekannter individueller Wachstumsphasen zu erhalten, wurden sowohl das Versuchsbein (= linkes Bein) als auch das Gegenbein (= rechtes Bein) analysiert.

Die Ratten wurden in genormten Käfigen in Gruppen von drei bis vier Tieren auf Standardeinstreu gehalten. Sie hatten Wasser und Nahrung *ad libitum* zur Verfügung.

Fünfundsiebzig vier Wochen alte männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von 115 Gramm (108 bis 122 Gramm, SD: 17 Gramm) wurden randomisiert in die oben genannten Gruppen eingeteilt. Des Weiteren fand eine Unterteilung in fünf Untergruppen (n = 5 Stück) statt. Die Tiere der jeweiligen Untergruppe wurden am postoperativen Tag 1, 3, 7, 14 und 28 der Euthanasie zugeführt (siehe Abb. 12).

Zwischenzeitlich erfolgte eine Beobachtung der Tiere bezüglich Belastungsverhalten und der klinischer Frakturstabilität.

Am Tag 0 wurde die Operation durchgeführt. Bei den Tieren der Versuchsgruppe I wurde eine Osteotomie der linken Tibia durchgeführt, bei der Versuchsgruppe II wurde diese mit einer Plattenosteosynthese stabilisiert. Bei den Sham Tieren wurde weder eine Osteotomie, noch eine Plattenosteosynthese durchgeführt. In dieser

Gruppe erfolgte die Präparation in Anlehnung an die anderen Gruppen unter Schonung des Knochens (siehe Chirurgisches Verfahren).

Nach Euthanasie – an den oben genannten Zeitpunkten – wurden die Tibiae entnommen und nach Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

Nach dem Entkalken und Färben wurden die immunhistochemischen Färbungen nach standardisierten Protokollen durchgeführt, welche an späterer Stelle angeführt werden.

Diese Studie wurde unter Einhaltung der Tierversuchsordnung durchgeführt und vom österreichischen Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung (Aktenzeichen: BMBWK-66.010/0054-BrGT/2006) zugelassen.

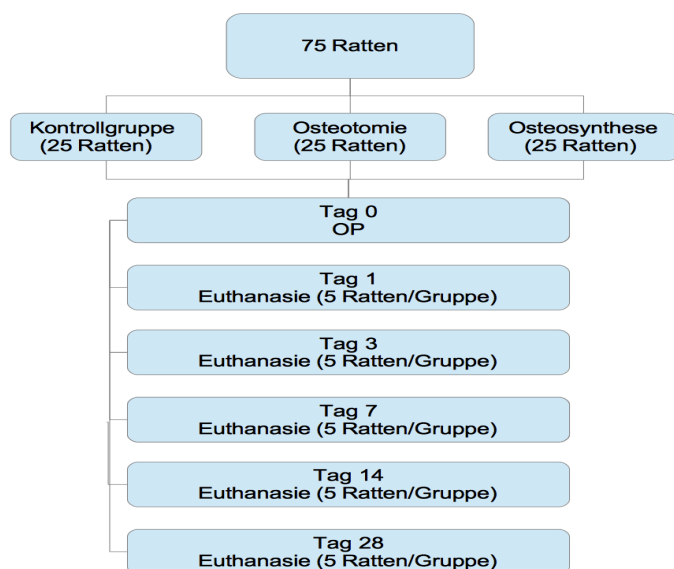


Abbildung 16: Organigramm der Studie

2.2) Chirurgisches Verfahren

Für die Anästhesie wurde Isofluran (Forane ®, Abt AG, Baar, Schweiz) zur Einleitung verwendet. Zur Narkoseerhaltung wurde eine FDD-Narkose verwendet (Fentanyl [20 µg / kg Fentanyl ®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland], Midazolam [gefolgt verwendet 400 µg / kg Midazolam Delta ®, DeltaSelect GmbH, Dreieich, Deutschland] und Medetomidin [200 µg / kg Domitor ®, Pfizer Corporation Österreich GmbH, Wien, Österreich]).

Bei allen Tieren der Sham-Gruppe wurde nur ein Hautschnitt im Sinne eines anterioren Zugangs zur Tibiakante durchgeführt, welche mit zwei bis drei Einzelknopfnähten mit einem nicht-resorbierbarem Polyamid-Faden verschlossen wurde (Seralon 5/0 ®, Serag Wiessner, Naila, Deutschland).

Bei allen Tieren der Versuchsgruppen I und II erfolgte zusätzlich eine quere Osteotomie in Schaftmitte mit Hilfe einer Gigli-Säge (0,2 mm). In der experimentellen Gruppe II wurde eine Plattenosteotomie mit einer 6-Lochplatte (RatFix Plate ® 6-Loch @ 18 mm, Tibia; RISystem, Davos Platz, Schweiz) und vier bikortikale Schrauben (RIS Ansatzschrauben ® 0,7 mm x 5,7 mm fixiert wurde; RISystem, Davos Platz, Schweiz) durchgeführt.



Abbildung 17: Präparat nach der Entnahme mit liegendem Osteosynthesematerial nach Exartikulation



Abbildung 18: intraoperativer Situs, mittels Osteosynthese versorgte Fraktur der Tibia

Zur Analgesie wurde Carprofen (Rimadyl ® [0,4 mg / kg], Pfizer, Wien, Österreich) subkutan für 3 Tage post operationem verabreicht, welche dann auf Metamizol oral (Novalgin ® [20 drops/400ml Wasser], Aventis Pharma, Wien, Österreich) für weitere 7 Tage umgestellt wurde.

2.3) Euthanasie

Die Tiere wurden an den Tagen 1, 3, 7, 14 und 28 euthanasiert. Nach Narkoseeinleitung mit Isofluran wurden 25mg Natrium-Thiopental (Thiopental ® Sandoz, Sandoz GmbH, Kundl, Österreich) intrakardial verabreicht, wodurch ein sofortiger Herzstillstand herbeigeführt wurde. Beide Tibiae wurden sorgfältig in toto durch Extraartikulation gewonnen. Das Bindegewebe wurde ohne Schädigung der proximalen Epiphysenfuge abpräpariert und die Fibula entfernt. Die proximale Tibiaepiphyse wurde etwa 4 mm unterhalb der Fuge abgetrennt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte bei -80°C.

2.4) Entkalkung, Immunhistochemie und Visualisierung

Die Präparate wurden mit 20% EDTA-Lösung (= Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat; pH7, Sigma-Aldrich Co., Wien, Österreich) für drei Tage bei einer Temperatur von 8°C und unter ständiger Bewegung und Erneuerung der Lösung (alle 24 h) entkalkt.

Es folgte das Waschen der Proben mit einer 1xPBS Lösung (kaliumgepufferte Kochsalzlösung; 7,3; Reagenzien: Natriumchlorid, Dinatriumhydrogenphosphat und Kaliumhydrogenphosphat, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) und anschließend durch eine koronare Schnittführung durch die Mitte in einen ventralen und dorsalen Anteil zertrennt. Anschließend wurden die Proben mit HOPE®-Lösung fixiert (Hepes-glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect; DCS, Hamburg, Deutschland). Jede Probe wurde in 5 ml HOPE I®-Lösung für 16 h bei 2°C inkubiert und anschließend zwei mal fünf Minuten lang in 5 ml HOPE II®-Lösung (verdünnt mit 1000 ml Aceton) gelagert. Nach Entwässerung mit 100% Aceton für zwei Stunden in drei Zyklen bei 2°C wurden die Knochen in Niedrigtemperaturparaffin für 8 h bei 55°C im Wärmeschrank inkubiert.

Die Paraffin-Blöcke wurden bei 4°C gelagert. Drei Längsschnitte (4 - 5 µm) wurden aus dem ventralen Probenanteil gewonnen und auf beschichtete Objektträger (Micro Slides x-tra Kleber, Surgipath Medical Industries, Richmond, Ill., USA) aufgebracht. Die Schnitte wurden 30 Minuten lang bei 50°C im Brutschrank fixiert. Es folgte das Entparaffinieren durch 2-Propanol (Isopropanol, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) für jeweils 10 Minuten bei 60°C im Brutschrank. Die Rehydratisierung wurde durch 70%iges Aceton für 10 Minuten bei 4°C erreicht. Danach wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser gespült und für eine Minute bei 50°C getrocknet. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Objektträger 3x mit 1xPBS-Lösung gewaschen.

Die Apoptose der Chondrozyten der proximalen Tibiaepiphyse wurde mit dem TUNEL Labelling mit dem In Situ Cell Death Detection Kit ® (Roche Diagnostics GmbH, Wien, Österreich) gemäß Protokoll (siehe Anhang) gefärbt. Die Färbung der

Zellkerne erfolgte mit DAPI. Anschließend wurden die gefärbten Proben mit dem Fluoreszenz-Mikroskop (Leica AF6500, Leica Microsystems, Barcelona, Spanien) max. eine Stunde nach Beendigung des letzten Färbeschrittes visualisiert. Die Bilder wurden gespeichert, die Wachstumsfuge (Region of interest) wurde mittels Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems Software Ireland Ltd, Irland) freigestellt und mit der Cellenger Developer Studio 4.0 Software (Definiens AG, München, Deutschland) automatisiert ausgewertet.

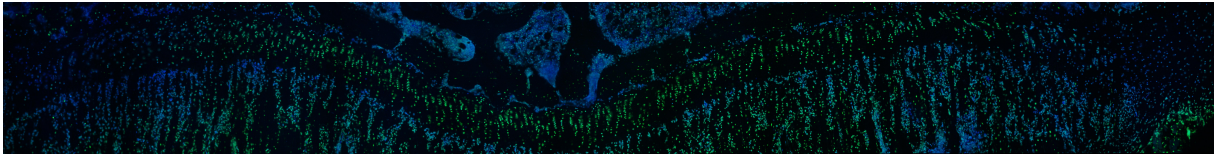


Abbildung 19: mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommene Wachstumsfuge nach TUNEL-Färbung (25-fache Vergrößerung)

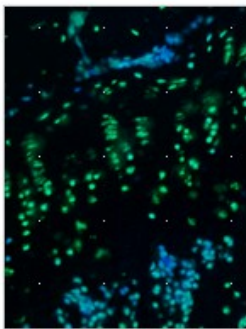
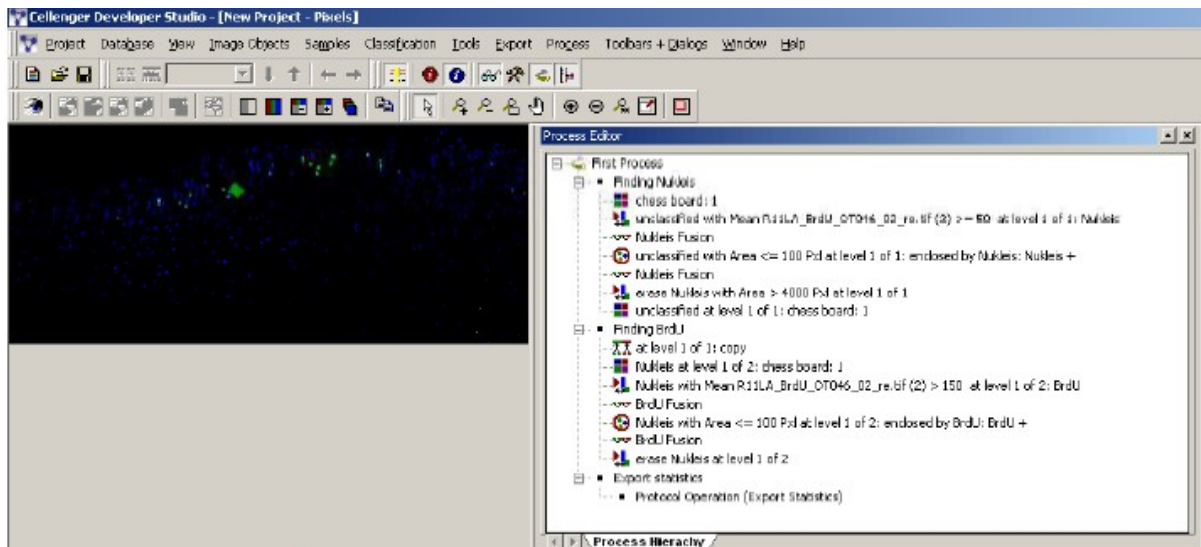


Abbildung 20: Fugenanteil in 75-facher Vergrößerung, grün: Säulenartig angelegte apoptotische Zellen, blau: Zellkerne



Abbildung 21: freigegebene Fuge = Region of interest

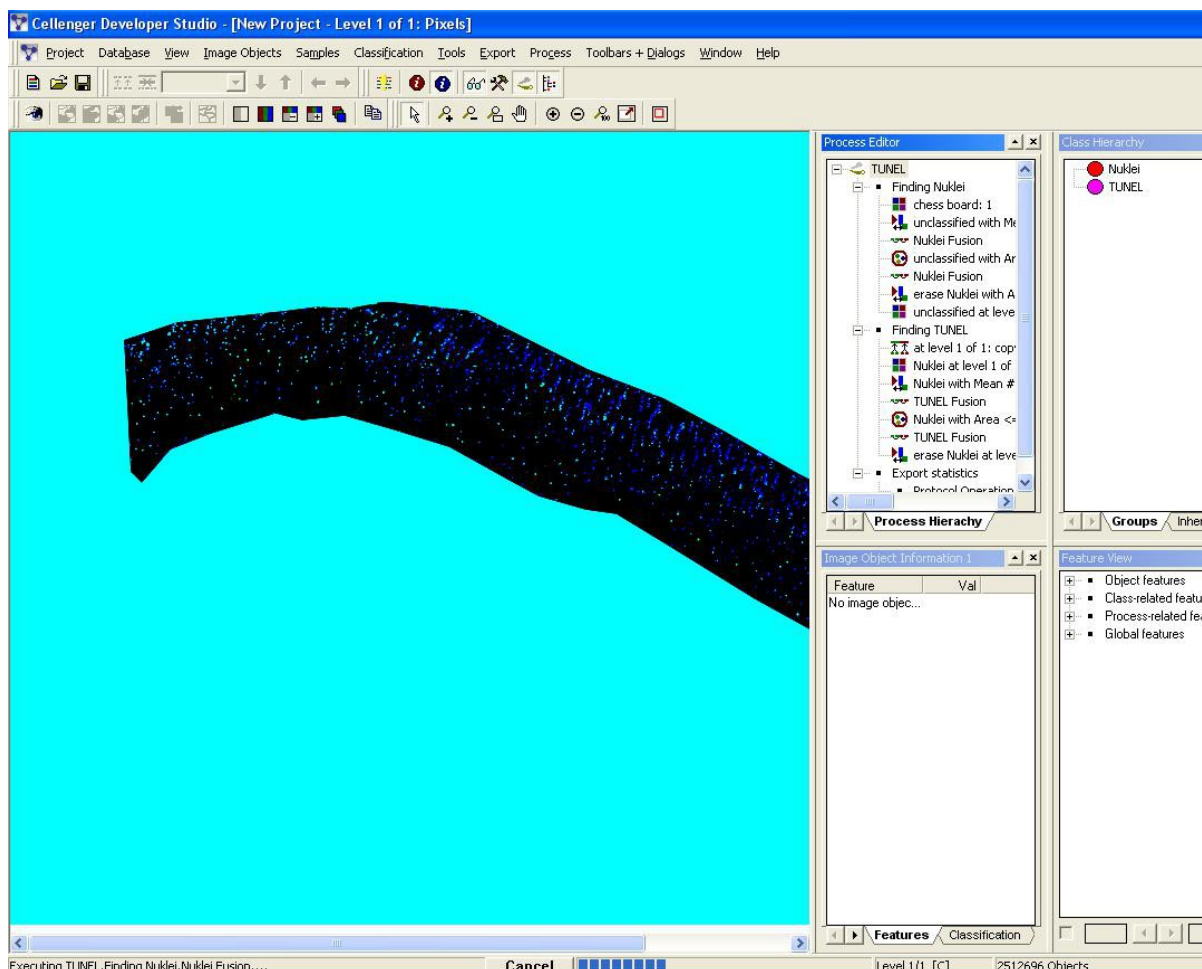
Bisher wurden bei der automatisierten Bildanalyse einzelne Objekte durch die Nutzung diverser pixelbasierter Filter eingesetzt. Diese nutzen den Vergleich benachbarter Pixel und beziehen sich auf Intensitätsgradienten bzw. -schwellen. Mit Hilfe des Cellengers wird das Originalbild Objekte durch Setzen von Grenzwerten extrahiert werden können.



bbildung 22: Benutzeroberfläche des Cellengers

Die Besonderheit in der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme des Bildes liegt hierbei aus dem Zusammenspiel der Signalstärke der gefärbten Kerne (= Pixelintensität; 0 – 255), der Aufnahmezeit (Integrationszeit) und der Aufnahme in zwei Kanälen (blau für DAPI-transformiert, dass die zu identifizierenden Kernfärbung und grün für TUNEL-Kernfärbung). Um den Arbeitspfad für den Cellenger zu erstellen, muss die Fuge zuerst durch eine Segmentation (“Chessboard segmentation”) in einzelne Pixel geteilt werden und die Pixel, die eine gewisse Intensität übersteigen, werden klassifiziert und später zu Objekten (= Zellkerne, “Nucleis Fusion”) zusammengesetzt. Wenn nun in diesen Objekten Pixel unter der Grenzintensität liegen, werden diese zum Objekt hinzugerechnet und – in unserem Fall – als Zellkern erkannt. Objekte unter oder über einer festgelegten Größe werden gelöscht (“erase nuclei”).

In einem zweiten Teilschritt wird nun – basierend auf den zuvor ermittelten Zellkernen - ein identer Ablauf für den grünen Kanal durchgeführt. Daher muss ein TUNEL-positiver Kern immer beide Signale aufweisen (blau = Zellkern, grün = Apoptose). Vereinfacht gesagt bedeutet dies, dass die Summe der Zellkerne allen blauen Pixelflächen entspricht und die Summe aller TUNEL-positiven Kerne allen blau/grünen Zellflächen entspricht. Der Quotient dieser beiden Zahlen ergibt somit den Apoptoseindex.



bbildung 23: Benutzeroberfläche des Cellengers

Um einen Referenzwert zu erhalten, wurden zwei benachbarte Schnitte der Fuge von insgesamt 15 Proben analysiert. Ein Teil wurde mit dem In Situ Cell Death Detection Kit (POD; Roche Diagnostics) gefärbt und mit Hilfe eines Aperio ScanScope Scanner (Aperio Technologies, Vista, Kalifornien, USA) visualisiert und digitalisiert (Graber et al, 2008).

Der zweite Teil wurde nach der oben beschriebenen Methode gefärbt. Apoptotische Zellen beider Abschnitte wurden initial visuell mit Hilfe des VIS Count Tools (Visiopharm Integrator System Version 3.6.2.0® im Modus newCAST) gezählt und die Ergebnisse daraus (Gesamtzellen zu apoptotische Zellen) verglichen.

Dabei konnte eine Übereinstimmung von 98,9% erreicht werden. In einem weiteren Schritt wurde eine automatisierte Auswertung mit unterschiedlichen Intensitätsgraden durchgeführt, wobei im weiteren Verlauf ein Grünwert von 70 (0 - 255) und mehr als Apoptose definiert wurde. Damit konnte eine Übereinstimmung von 95,3% erreicht werden. In identerweise wurde der Grenzwert für die Detektion der Zellkerne – welche mit DAPI gefärbt wurden - mit einem Blaufaktor von 30 und mehr festgelegt (Übereinstimmung: 93,7%).

Tag	Gruppe	OT-Nummer/Anteil	Fläche Zellkerne	Fläche TUNEL pos.	Verhältnis Zellfläche: TUNEL pos	Einstellung Cellenger
3	Sham	#11LA_OT146_li	21557	12984	60,23%	30/70
3	Sham	#11LA_OT146_re	22856	12108	52,98%	30/70
3	Sham	#11LA_OT148_li	37545	20102	53,54%	30/70
3	Sham	#11LA_OT148_re	29092	15215	52,30%	30/70
3	Sham	#11LA_OT157_li	15863	9146	57,66%	30/70
3	Sham	#11LA_OT157_re	20863	9711	46,55%	30/70

abelle 1: Auswertungstabelle vom Cellenger in ein Excel-Sheet importiert.

2.4) Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden mit SPSS Version 19.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL) durchgeführt. Apoptoseraten wurden als Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte beschrieben. Da die Daten der Apoptose keine Normalverteilung zeigen, wurde ein Kruskal Wallis Test mit post-hoc Bonferroni-Korrektur verwendet. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant definiert.

3) Ergebnisse

3.1) Beobachtung der Ratten

3.1.1) Belastungsverhalten

Alle Tiere der Sham-Gruppe belasteten bereits am dritten postoperativen Tag das operierte Bein vollständig.

Innerhalb der Osteotomiegruppe begannen die meisten Ratten (n = 8; 80%) erst nach dem 12. Tag mit der Belastung, wohingegen der Belastungsbeginn innerhalb der Osteosynthesegruppe zwischen Tag 7 und 10 lag (n = 9; 90%).

3.1.2) Frakturstabilität

Bereits am siebten Tag zeigte sich an den entnommenen Proben der Osteotomiegruppe ein sog. Gummikallus, was zu einer relativen Stabilität der Fraktur führte.

In der Osteotomiegruppe zeigte sich die Fraktur ab dem 10. postoperativen Tag klinisch stabil und bei den Proben des 14. Tages zeigte sich das Maximum der Kallusbildung.

3.2) Etablierung des Auswertungsverfahrens

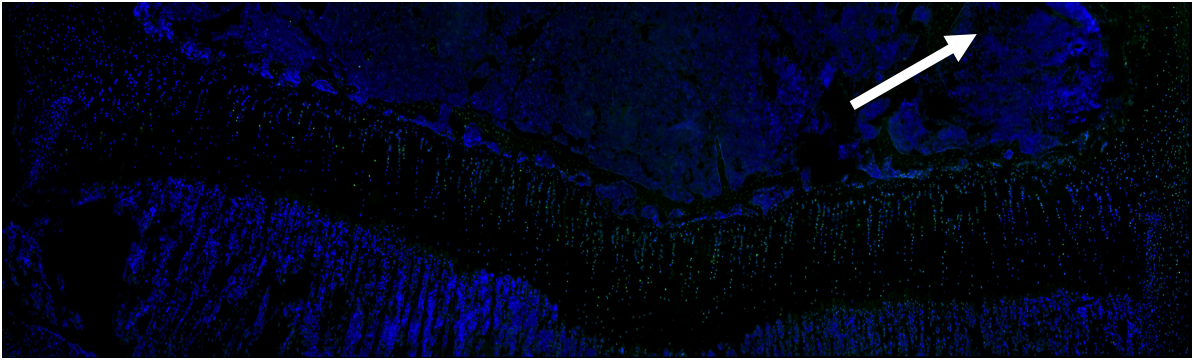
Wie bereits im Material- und Methodenteil erwähnt, erfolgte die Etablierung des Auswertungsverfahrens durch eine Analyse zweier benachbarter Schnitten von 15 Fugen. Eine der Fugen wurde – wie oben beschrieben - mittels Lyca Fluoreszenzmikroskop und eine in HE Färbung mittels Aperio ScanScope Scanner aufgenommen und gespeichert.

Bei der visuellen Auszählung beider Fugen konnte mit den festgelegten Grenzwerten für den Grünwert (>70) eine Übereinstimmung von 95,3% (SD: 8,4%; Range: 84,7-99,8%) erreicht werden. Für den Blauwert (>30) ergab sich eine Übereinstimmung von 93,7% (SD: 5,2%; Range: 89,5-98,9%).

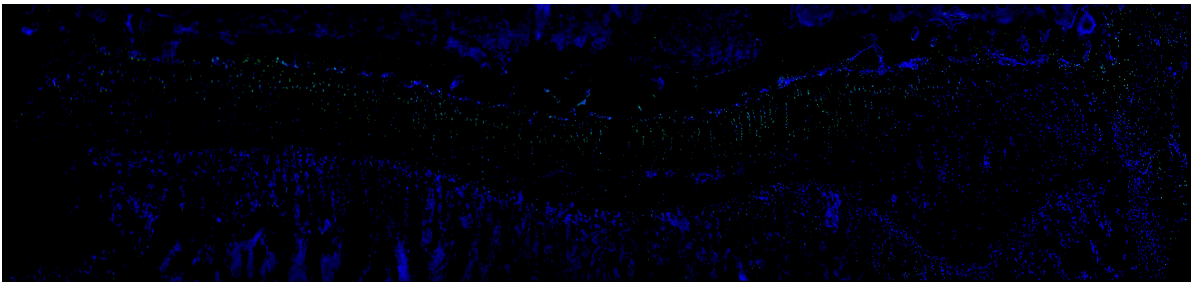
3.3) Auswertung der Schnitte

3.3.1) visuelle Auswertung

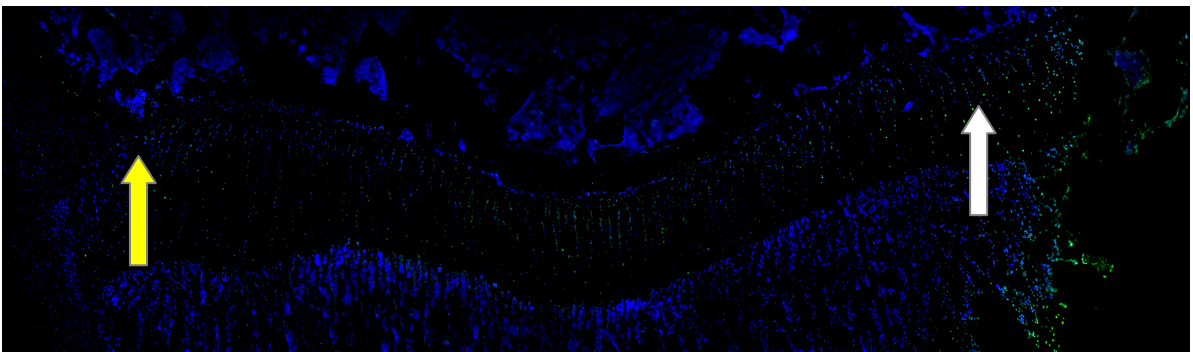
Bei der optischen Betrachtung der Fugen zeigten sich in den Fugen der Eingriffsseite immer wieder „nestartige“ Apoptoseareale, wobei hierbei kein genaues Muster gesehen werden konnte. Im Gegenbein konnte meist eine recht homogene Verteilung beobachtet werden, wobei auch hier an den ersten Tagen die Verteilung etwas inhomogener wirkt. Diese Beobachtungen wurden in allen Fugen gemacht.



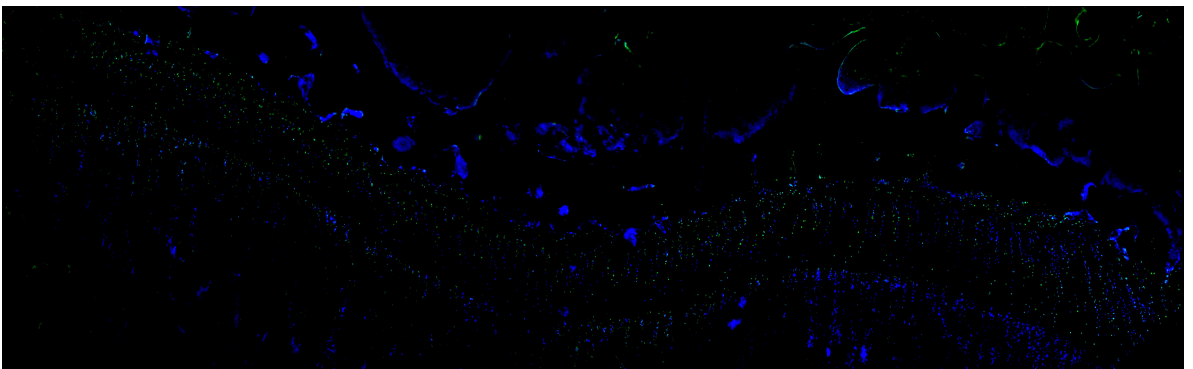
bbildung 24: R144LA_Tunel_OT742 – auffällig ist hier eine „nestartige“ Ansammlung von TUNEL-positiven Zellen in der Mitte der Fuge, welche zu beiden Seiten hin wieder abnimmt (weißer Pfeil)In



bbildung 25: R32RA_Tunel_OT237 - homogenere Verteilung der apoptotischen Zellen



bbildung 26: 72LA_Tunel_OT233 - auffällig die "nestartige" Anordnung der apoptotischen Zellen in der Mitte der Fuge und im Bereich der Ranvier'schen Zone auf der Bildseite rechts (weiße Pfeile).Auf der anderen Seite findet man auch hier eine Zone mit nur geringer Apoptoserate (gelber



bbildung 27: R144RA_Tunel_OT232 - auch hier findet sich eine homogene Verteilung der TUNEL-

3.3.2) Auswertung der Apoptoseraten

Auffällig bei der Auswertung der Apoptoseraten zeigt sich eine – nur in der Sham Gruppe signifikante - Erhöhung der Apoptoserate in jeder Fuge am ersten postoperativen Tag über alle drei Gruppen (Sham, Osteotomie und Osteosynthese) verteilt.

Ein Peak der Apoptoserate zeigt sich in allen ausgewerteten Fugen an Tag 7.

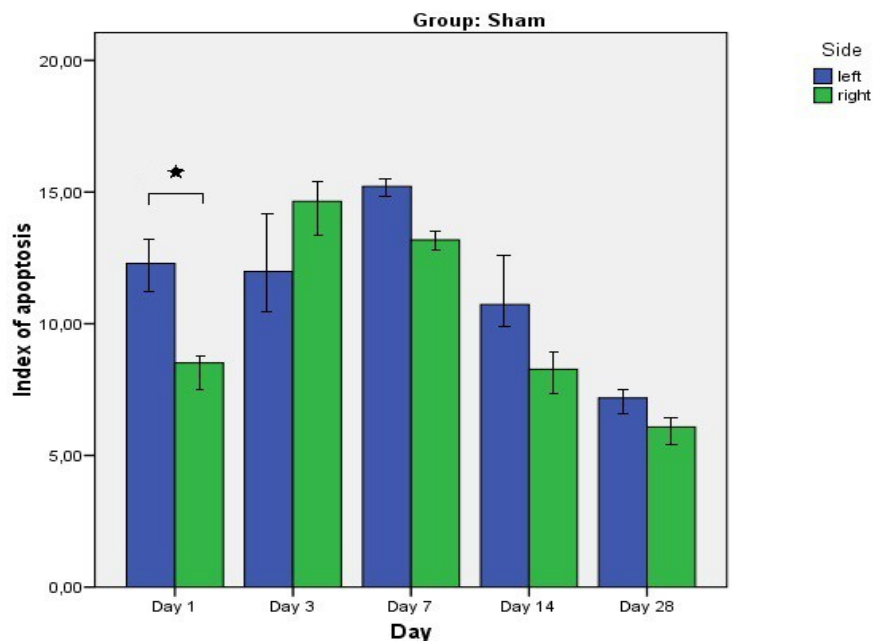


Abbildung 28: Mittelwerte des Apoptoseindex vom untersuchten Bein (= blau) und dem Gegenbein (= grün) in der Gruppe Sham im Zeitverlauf von Tag 1 bis 28. Ein signifikanter Unterschied zeigt sich hierbei nur an Tag 1. Ab Tag 7 sinkt der Apoptoseindex von beiden Beinen kontinuierlich wieder ab.

Ein identer Verlauf (jedoch ohne statistische Signifikanz zeigt sich auch bei der Osteotomie- und der Osteosynthesegruppe. Der Apoptoseindex des Versuchsbeines steigt bis zu Tag 7 in unterschiedlicher Ausprägung an und fällt dann recht rasch wieder ab.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Apoptoseraten zeigte sich nur zwischen der Osteotomiegruppe und den anderen Gruppen (Sham u/o Osteosynthese) an den Tagen 1 und 7.

Signifikant ist auch der Unterschied zwischen den Medianen der Osteotomiegruppe beim Vergleich zwischen Bein und Gegenbein an Tag 14 und 28. In dieser Gruppe wurden die größten Unterschiede zwischen den beiden Beinen über den gesamten Verlauf hinweg beobachtet.

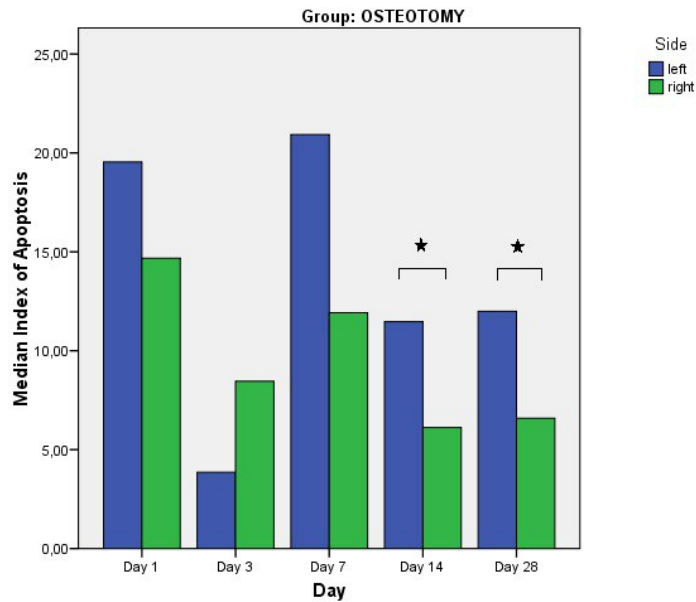


Abbildung 29: Median der Apoptoseraten der Osteotomiegruppe im Vergleich Bein und Gegenbein (blau: Osteotomie, grün: Gegenbein)

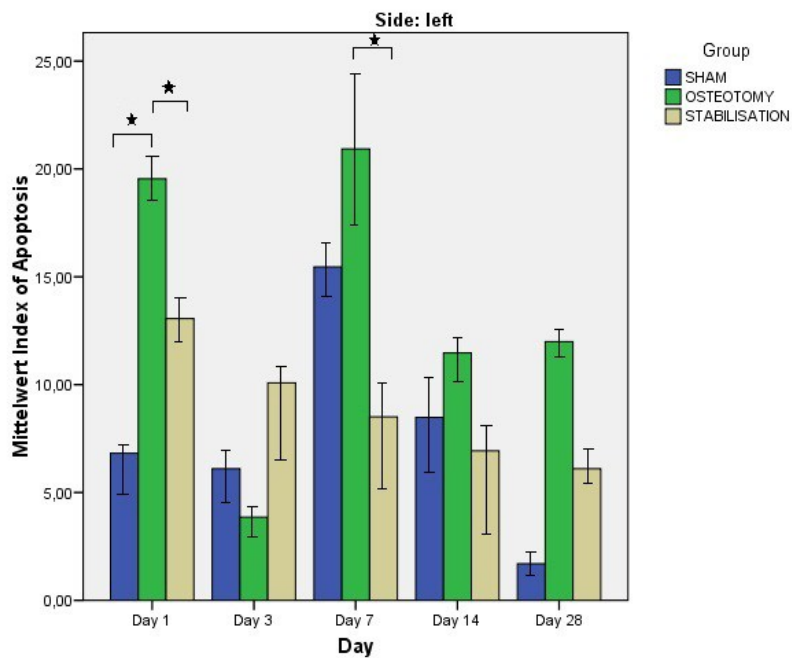


Abbildung 30: Mittelwert des Apoptoseindex im Zeitverlauf im Vergleich über die Gruppen.

4) Diskussion

4.1) Automatisierung der Auswertung

Aufgrund der guten Übereinstimmung, der deutlichen Arbeitersparnis und der Vermeidung eines systemischen Bias („Verzählen“) scheint die Automatisierung der Auswertung des Apoptoseindex mittels Cellenger eine gute Methode zu sein.

Ein systemischer Fehler aufgrund der ungleichmäßigen Verteilung der apoptotischen Zellen in der gesamten Fuge kann, im Vergleich zur Voruntersuchung von Gaber et al. verringert werden, da diese nur drei „Zonen“ der Fuge auswählten. (Gaber et al., 2009)

Ein Vorteil zur visuellen Auszählung besteht in der Reproduzierbarkeit, da diese bei einer „anwenderabhängigen“ Auszählung nicht immer gewährleistet ist. Die Qualität der visuellen Auszählung ist abhängig von der physischen Verfassung (Müdigkeit), Lernkurve und auch der Motivation des Mitarbeiters. Des Weiteren ist die anwenderabhängige Auswahl der Zonen nicht als repräsentativ zu sehen. Die automatisierte Auswertung schließt ebenso eine selection bias des Anwenders aus.

Ein wesentlicher Nachteil ist jedoch, dass nicht alle TUNEL-positiven Kerne als ein Kern gezählt werden, wie bei der visuellen Auszählung, sondern, dass Kernflächen berechnet werden. Hierbei kann es zu geringgradigen Diskrepanzen führe, da die TUNEL-positive Kernfläche kleiner als die DAPI-positive Kernfärbung dargestellt werden kann. Es handelt sich hierbei jedoch um einen geringen systemischen Bias, da durch die Bildung eines Quotienten eine Vergleichbarkeit über einen Zeitverlauf besteht.

4.2) Auswertung der Apoptoseraten

Ob die Auswahl der TUNEL-Färbung ein geeignetes Instrument zur Detektion einer Proliferation in einer Fuge darstellt, ist zu diskutieren (Hewitson und Darby, 2010; Loo, 2011; Marino, 2011). Emons et al. diskutieren eine Apoptose am Ende der Wachstumsperiode und weisen darauf hin, dass es sich in dieser Phase um keine klassische Apoptose handelt (Emons et al., 2009). Eine Apoptose kann nicht zu 100% nur auf das Zugrundegehen der Zellen im Verlauf des Wachstums und der Proliferation zurückgeführt werden (Saraste, 1999). Da jedoch andere Ursachen für eine Apoptose in der Fuge ausgeschlossen werden können (stärkere Traumatisierung der Fuge im Rahmen der Operation, Infektionen der Fuge, Fugenlösungen...), scheint die Apoptoserate gut mit der Proliferation zu korrelieren. Dies zeigen auch Chrysis et al in einer Rattenstudie (Chrysis et al., 2002). Eine weitere Studie mit BrdU als Proliferationsrate soll eine exaktere Aussage ermöglichen.

4.2.1) Visuelle Auswertung

Auffällig war bei der visuellen Auswertung eine sehr ungleichmäßige Verteilung der TUNEL-positiven Zellen über die Wachstumsfuge, weshalb die Einwirkung diverser Faktoren diskutiert werden muss. Einerseits kann dies aufgrund der Fehl-/Mehr- und Minderbelastung des operierten, aber auch des Gegenbeines zu Stande kommen. So zB kann es durch geänderte Druckgradienten zu einer möglichen Aktivierung bzw. Deaktivierung des Wachstums in bestimmten Anteilen der Fugen führen. Dies wäre auch beweisend für posttraumatische Achsabweichungen und auch für das Remodelling angulierter Frakturen.

Des Weiteren wäre auch ein nicht-lineares Wachstum als Erklärung zu sehen, wie es wahrscheinlich in der Entwicklung der Hüfte bei der Derotation und auch bei der Entwicklung des kindlichen Knies bei den physiologischen varischen und valgischen Beinachsen der Falls sein könnte.

4.2.2) Statistische Analysen

Wie bereits beschrieben, zeigte sich am ersten Tag die Apoptoserate aller drei Gruppen im Vergleich zur Gegenseite – teilweise signifikant – erhöht. Dies ist auf das initial gesetzte Trauma und damit die Reizung der Fuge zurückzuführen. Des Weiteren wurde bereits seit längerem ein Einfluss von Entzündungsreaktionen auf die Wachstumsfuge diskutiert. Dies zeigt auch eine deutliche Erhöhung der Apoptoseraten von Tag 1 bis 7 bei der Osteotomiegruppe (instabile Fraktur). Von der Frakturheilung bei Kindern wissen wir, dass die größte Instabilität am Tag 1 bis Tag 7 herrscht und die Kallusbildung um den 14. Tag seinen Höhepunkt erreicht. Leider gibt es bisher keine standardisierte Angabe über die Frakturheilung bei den Ratten.

Dies beweist auch die Tatsache, dass Nachrepositionen um den 5. Tag vermehrt zu Wachstumsstörungen im Sinne einer Aktivierung der Fuge führen. (Von Laer, 2007)

Eine weitere Auffälligkeit war ein signifikanter Unterschied zwischen dem Bein und Gegenbein der Osteosynthesegruppe an Tag 14 und 28. An Tag 14 zeigte das Gegenbein eine deutlich vermehrte Aktivierung der Fuge, was womöglich auf das beobachtete Belastungsverhalten der Ratten zurückzuführen ist. Die Mehrzahl der Ratten begann zwischen Tag 7 und 10 mit der erneuten Vollbelastung des operierten Beines (90 %). Daher zeigte sich davor eine Mehrbelastung des Gegenbeines. Diese erneute Minderbelastung des Gegenbeines könnte eine Erklärung für eine kurzzeitig vermehrte Stimulation der Fuge sein. Wohingegen die vermehrte Apoptoserate am Tag 28 mit dem bereits beginnenden Remodelling (primäre Frakturheilung) in Verbindung geführt werden kann. Dies erfolgt bei der Osteotomiegruppe bei sekundärer Frakturheilung später, weshalb ein längerer Beobachtungszeitraum für eine exakte Aussage nötig wäre.

Insgesamt zeigt sich statistisch gesehen jedoch kein linearer Verlauf und es gibt gerade in der Osteotomie- und Osteosynthesegruppe sehr viele Ausreißer, sodass höchstwahrscheinlich eine statistische Auswertung, auch bei einer vielfach erhöhten Probenmenge zu keinen signifikanten Ergebnissen führen wird.

Soweit durch diese Studie gezeigt wird, kann eine Aktivierung der Wachstumsfuge und somit ein Overgrowth durch eine Frakturstabilisierung nicht komplett vermieden werden, da durch die mögliche Einwirkung der Entzündungsmediatoren eine

Aktivierung der benachbarten Fugen erfolgt. Jedoch wird die Gefahr durch eine Frakturstabilisierung verringert, vor allem durch die Vermeidung von Manipulationen nach dem 5. Tag. Diese stellen das größte Risiko für ein Overgrowth dar (Weinberg, 2006; Von Laer, 2007).

Für eine exaktere Evaluierung wäre auch die Auswertung eines geeigneteren Proliferationsmarkers im Bereich der Epiphysenfuge anzudenken, wie zB BrdU (= Bromdesoxyuridin). Dieser Marker ist spezifischer für eine Proliferation und könnte zu einer Ergänzung bzw. Bestätigung der Ergebnisse aus dieser Studie führen.

Außerdem ist der Untersuchungszeitraum für eine Analyse der Auswirkung dieser kurzfristigen Aktivierung der Fuge im Rahmen der initialen Instabilität und der Entzündungsphase zu kurz. Eine Folgestudie mit längerem Beobachtungszeitraum wäre der nächste Schritt, um die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zu bestätigen.

ANHANG

1) EDTA-Entkalkung

- ≡ Inkubieren der Proben in 50 ml 20%iger EDTA-Lösung (pH 7) für drei Tage bei 8°C unter ständigem Schwenken. Die Lösung wird alle 24 Stunden getauscht.

2) HOPE[®]-Fixierung

- ≡ 16 h in 5 ml 2°C kalter HOPE I Lösung inkubieren (Eis-Wasser-Gemisch!)
- ≡ 2 h in 5 ml 2°C kalter HOPE II Lösung (1:1000 in Azeton verdünnt) inkubieren
- ≡ 3 x 2 h in 100%igem Azeton inkubieren (2°C)
- ≡ Die Gewebe in Niedrigtemperaturparaffin (54 – 55°C) übertragen und über Nacht
- ≡ inkubieren.
- ≡ Am nächsten Tag ausgießen.
- ≡ Die Blöcke im Kühlschrank lagern.

3) Schnittpräparation / Entparaffinieren von HOPE-Schnitten

- ≡ Schneiden am Microtom 6 µm
- ≡ Strecken in kaltem Aqua deionisata
- ≡ Aufziehen in Aqua deionisata, 37°C
- ≡ 30 min bei 50°C Wärmefixieren (Brutschrank)
- ≡ Entparaffinieren:
 - 2x 10 min bei 60°C in Isopropanol inkubieren (Brutschrank)
 - 10 min bei 4°C in 70%igem Aceton inkubieren
 - Schwemmen in Aqua dest.

4) TUNEL-Färbung

- ≡ 50µl TUNEL-Mix (1:10) bzw. 50µl Label-Soluten (Negativkontrolle) für 60 Minuten bei 37°C in feuchter Atmosphäre unterm Deckglas inkubieren
- ≡ 3 x in 1xPBS waschen
- ≡ Gegenfärben:
 - 100µl DAPI (1:2000) für 5 Minuten unterm Deckglas in Dunkelheit inkubieren
 - 3 x in PBS waschen
 - 1 Tropfen Antivektorshield/Prolonggold auftragen ü Deckglas

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Aufbau des Lamellenknochens (Junqueira und Carneiro, 2004).....	12
Abbildung 2: Enchondrale Ossifikation im Schema (Beaty und Kasser, 2009).....	14
Abbildung 3: histologisches Bild der Wachstumsfuge mit den verschiedenen Zonen	16
Abbildung 4: Zeitpunkt des Epiphysenfugenschlusses nach Lokalisation und Geschlecht (Welsch, 2005).....	17
Abbildung 5: plastische Unterarmfraktur - die Corticalis zeigt sich intakt, jedoch fällt eine vermehrte Biegung von Radius und Ulna in Schaftmitte auf.....	19
Abbildung 6: Radiusgrünholzfraktur – man sieht, dass eine Corticalisseite unverletzt bleibt.....	20
Abbildung 7: Unterarmfraktur komplett mit Dislokation	21
Abbildung 8: distale Radiuswulstfraktur loco typico bei einem 7-jährigen Mädchen	21
Abbildung 9: metaphysäre Frakturen (Weinberg, 2006)	22
Abbildung 10: Gelenksfrakturen (Weinberg, 2006)	23
Abbildung 11: Eminentiaausriss bei einem 12-jährigen Patienten als Beispiel für einen typischen epiphysären Bandausriss.....	24
Abbildung 12: Sekundäre Frakturheilung (Beckmann et al, 2004).....	26
Abbildung 13: Remodelling bei St.p. distaler Radiusfraktur einer 5-jährigen Patientin. links: 3 Wochen post Trauma; rechts: nach 5 Monaten.....	28
Abbildung 14: Reaktion der Fuge auf die Fraktur.	30
Abbildung 15: Beispiel eines partiellen frühzeitigen Wachstumsfugenschluss nach Salter Harris II Fraktur - der Innenknöchel zeigt sich dysplastisch verändert. (Weinberg, 2006).....	31
Abbildung 16: Organigramm der Studie.....	35
Abbildung 17: Präparat nach der Entnahme mit liegendem Osteosynthesematerial nach Exartikulation.....	36
Abbildung 18: intraoperativer Situs, mittels Osteosynthese versorgte Fraktur der Tibia.....	36
Abbildung 19: mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommene Wachstumsfuge nach TUNEL-Färbung (25-fache Vergrößerung).....	39
Abbildung 20: Fugenanteil in 75-facher Vergrößerung, grün: Säulenartig angelegte apoptotische Zellen, blau: Zellkerne.....	39

Abbildung 21: freigegebene Fuge = Region of interest.....	39
Abbildung 22: Benutzeroberfläche des Cellengers.....	40
Abbildung 23: Benutzeroberfläche des Cellengers.....	41
Abbildung 24: R144LA_Tunel_OT742 – auffällig ist hier eine „nestartige“ Ansammlung von TUNEL-positiven Zellen in der Mitte der Fuge, welche zu beiden Seiten hin wieder abnimmt (weißer Pfeil)In den Randgebieten finden sich Anteile mit wenig TUNEL-positiven Zellen (gelber Pfeil).....	46
Abbildung 25: R32RA_Tunel_OT237 - homogenere Verteilung der apoptotischen Zellen (=Gegenbein) als dies in der Gegenseite zu beobachten war.....	46
Abbildung 26: 72LA_Tunel_OT233 - auffällig die "nestartige" Anordnung der apoptotischen Zellen in der Mitte der Fuge und im Bereich der Ranvier'schen Zone auf der Bildseite rechts (weiße Pfeile).Auf der anderen Seite findet man auch hier eine Zone mit nur geringer Apoptoserate (gelber Pfeil).....	46
Abbildung 27: R144RA_Tunel_OT232 - auch hier findet sich eine homogene Verteilung der TUNEL-positiven Zellen im Vergleichsbein.....	46
Abbildung 28: Mittelwerte des Apoptoseindex vom untersuchten Bein (= blau) und dem Gegenbein (= grün) in der Gruppe Sham im Zeitverlauf von Tag 1 bis 28. Ein signifikanter Unterschied zeigt sich hierbei nur an Tag 1. Ab Tag 7 sinkt der Apoptoseindex von beiden Beinen kontinuierlich wieder ab.....	47
Abbildung 29: Median der Apoptoseraten der Osteotomiegruppe im Vergleich Bein und Gegenbein (blau: Osteotomie, grün: Gegenbein).....	48
Abbildung 30: Mittelwert des Apoptoseindex im Zeitverlauf im Vergleich über die Gruppen.....	48

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Auswertungstabelle vom Cellenger in ein Excel-Sheet importiert.....	42
---	----

LITERATURVERZEICHNIS

- Beaty, J.H., J.R. Kasser. *Rockwood and Wilkins' Fractures in Children*. Seventh Edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2009.
- Beckmann et al. „*Aus alt mach neu. Relevante Faktoren bei der Frakturheilung im Alter*“. *Der Orthopäde*, 2004: 43(4):298-305.
- Carsi, B., J.C. Abril, T. Epeldegui. „*Longitudinal growth after nonphyseal forearm fractures*.“ *J Pediatr Orthop*, 2003: 23(2):203-7.
- Chrysis, D., O. Nilsson, E.M. Ritzen , und L. Sävendahl. „*Apoptosis is developmentally regulated in rat growth plate*.“ *Endocrine*, Aug 2002: 18(3):271-8.
- de Pablos, J., M. Franzreb, C. Borrios. „*Longitudinal growth pattern of the radius after forearm fractures conservatively treated in children*.“ *J Pediatr Orthop*, Jul-Aug 1994: 14(4):492-5.
- Emons, J., et al. „*Epiphyseal fusion in the human growth plate does not involve classical apoptosis*.“ *Pediatr Res*, Dec 2009: 66(6):654-9.
- Gaber, S., E.E. Fischerauer , E. Fröhlich, G. Janezic, F. Amerstorfer, A.M. Weinberg. „*Chondrocyte apoptosis enhanced at the growth plate: a physeal response to a diaphysal fracture*.“ *Cell Tissue Res.*, Mar 2009: 335(3):539-49.
- Hert, J., et al. „*Osteon orientation of the diaphysis of the long bones in man*“. *Bone.*, May-Jun 1994: 15(3):269-77.
- Hewitson, T.D., I.A. Darby. „*In situ localization of apoptosis using TUNEL*.“ *Methods*
- Jerosch, J., A. Bader, G. Uhr. *Knochen: curasan Taschenatlas spezial*. 1. Auflage. Thieme, 2002.
- Junqueira, L.C.U, J. Carneiro. *Histologie*. 5. Auflage. Herausgeber: Junqueira. Berlin Heidelberg: Springer, 2004.
- Klapp, F. „*Diaphysis and metaphysis injuries in the growing years. An experimental study*.“ *Hefte Unfallheilkd.*, 1981: 152:1-76.
- Loo, D.T. „*In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques*.“ *Methods Mol Biol*, 2011: 682:3-13.
- Lüllmann-Rauch, R. *Taschenlehrbuch Histologie*. 5. Auflage. Thieme Verlag, 2015.
- Marino, R. „*Growth plate biology: new insights*.“ *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, Feb 2011: 18(1):9-13.

- Marzi, I. *Kindertraumatologie*. 1. Auflage. Springer, 2006.
- Saraste, A. „*Morphologic criteria and detection of apoptosis.*“ *Herz*, May 1999: 24(3):189-95.
- Schünke, M. *Funktionelle Anatomie: Topographie und Funktion des Bewegungssystems*. Thieme, 2000.
- Trueta, J., A.J. Buhr. „*The vascular contribution to osteogenesis. V. The vasculature supplying the epiphyseal cartilage in rachitic rats.*“ *J Bone Joint Surg Br.*, Aug 1963: 45:572-81.
- Von Laer, L. *Frakturen und Luxationen im Wachstumsalter*. 5. Auflage. Herausgeber: L. Von Laer. Thieme, 2007.
- Weinberg, A.M. *Tscherne Unfallchirurgie - Unfallchirurgie im Kindesalter*. Herausgeber: H. Tscherne. Bd. 1) Allgemeiner Teil. Kopf, Obere Extremität. 2 Bde. Springer, 2006.
- Welsch, U. *Sobotta Lehrbuch Histologie*. 2. Auflage. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2005.
- Winker, K.H. *Facharzt Orthopädie Unfallchirurgie*. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2011.