

Reaktionen der Wachstumsfuge auf physikalische Verletzungen mit Fokussierung auf Knochenbrückenbildungen

-

Eine Evaluierung im Rattenmodell mittels qRT-PCR und vergleichender MRT

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae universae

Universitätsklinik für Kinderchirurgie an der Medizinischen
Universität Graz

Peter Hausbrandt

Jänner 2009

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit, selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine anderen als die angegebenen Quellen verwendet habe und die aus den Quellen wörtlich oder inhaltlich zitierten Stellen auch als solche gekennzeichnet habe.

Graz, 8. Jänner 2009

Peter Hausbrandt

Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich recht herzlich bei Frau PD Dr. Annelie-Martina Weinberg bedanken, die mich in ihre Forschungsgruppe aufgenommen hat und somit der Kopf des ganzen Projekts ist.

Gleich anschließend möchte ich mich ganz besonders bei Frau Ass. Dr. Eva Fischerauer und Ass. Dr. Christoph Castellani bedanken, die mit mir die letzten anstrengenden und stressigen Tage und Wochen durchgestanden haben, und mir ebenfalls mit Rat und Tat beiseite gestanden sind.

Selbstverständlich wäre es viel schwieriger so eine Arbeit durchzuführen, ohne einem guten Team in der Forschungsgruppe, welches immer durch konstruktive Kritik und tatkräftige Mithilfe bei den Operationen einen wichtigen Beitrag geleistet hat. So möchte ich mich im speziellen noch bei cand.med. Richard Lindtner und Mag. Peter Blümel bedanken.

Einen großen Dank auch an Mag. Alexander Deutsch und Mag. Dr. Christan Gölly, welche mir bei der Aufbereitung und Ausarbeitung der qRT-PCR Daten halfen, sowie Dipl.-Ing. Bernhard Neumayer für die Zusammenarbeit bei den MRT-Untersuchungen.

Mein letzter Dank gilt meiner Familie, meiner Freundin und meinen Freunden, welche mich all die Jahre des Studiums hindurch unterstützt haben und in stressigen Zeiten viel Verständnis aufbrachten!

Danke!

Zusammenfassung:

Einleitung: Knochenwachstumsstörungen sind eine sehr häufige Komplikation bei Frakturen im Kindesalter. Es existieren sowohl stimulierende als auch hemmende Wachstumsstörungen, welche je nach Lokalisation mit Folgeschäden verbunden sein können. Die in dieser Studie untersuchte Knochenbrückenbildung sind als Auslöser für hemmende Wachstumsstörungen bekannt, wobei die genaueren Abläufe, wie es zum Entstehen der Knochenbrücken kommt, noch nicht hinreichend bekannt sind. Ziel der Arbeit war es, die Knochenbrückenbildung in Fugenläsionen als Auslöser für hemmende Wachstumsstörungen zu untersuchen, sowie die Zusammenhänge mit den Angiogenese regulierenden Faktoren HIF-1 α und VEGF.

Material und Methode: 70 männliche Sprague-Dawley-Ratten (5 Wochen alt, 100-120g) wurden randomisiert in Kontroll- und Experimentalgruppe aufgeteilt. In den Experimentalgruppen wurde durch eine Bohrlochläsion in der Epiphysenfuge der linken Tibia eine Epiphysenfugenfraktur stimuliert. Je nach Gruppe wurden die Ratten zu den postoperativen Tagen 1, 3, 7, 14, 28 und 84 getötet, die Kontrolltiergruppe wurde ohne Läsionen zu setzen am Tag 0 euthanasiert. Mittels qRT-PCR wurde dann die Expression von von CD-31, HIF-1 α , BMP-2, VEGF, VEGFR1 und 2 zu allen oben genannten Zeitpunkten gemessen.

5 weitere männliche Sprague-Dawley-Ratten wurden ebenfalls als Kontrolltiergruppe zu MRT Untersuchungen an den Tagen 1, 3, 7, 14, 28 und 82 hergenommen, um in vivo eine morphologische Kontrolle der Knochenbrückenbildung zu haben, sowie mittels dynamischer MRT Untersuchung (DCE-MRT) Aussagen über die Durchblutung treffen zu können.

Ergebnisse: Die qRT-PCR zeigte im Läsionsbein einen Aufwärtstrend für die Expression von HIF-1 α von Tag 1 bis 3, mit Höhepunkt am Tag 3. Für VEGF, VEGFR1 und 2 fanden wird die höchste Expression an Tag 7. Im Vergleich Läsionsbein und zu Kontrollbein, konnte bei den Expressionswerten nur am Tag 28 für CD-31, HIF-1 α , VEGF und VEGFR1 ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den beiden Beinen festgestellt werden. In der MRT konnte man an den Tagen 1 und 3 die Läsion noch eindeutig sehen, ab Tag war die Wachstumsfuge bereits mit knorpelartigem Gewebe aufgefüllt. Ab Tag 42 konnten erste Knochenstrukturen in der Läsion nachgewiesen werden, welche die Fuge wieder rupturierten. Mittels DCE-MRT konnte ein stetig steigender Transfer-Koeffizient (K^{trans}) nachgewiesen werden, welcher auf eine erhöhte Perfusion der Fuge rückschließen lässt..

Diskussion: Vergleicht man nun qRT-PCR Ergebnisse und MRT-Daten, weisen sie doch einen Zusammenhang und eine gewisse gegenseitige Bestätigung auf. So sind anfänglich die Angiogenese fördernden Faktoren HIF-1 α (max. Tag 3) und VEGF (max. Tag 7) erhöht, und im MRT konnte eine anschließende erhöhte Durchblutung (max. Tag 42) mit Knochenbrückenbildung gezeigt werden. So kann man feststellen, dass Hypervaskularität einen Einfluss auf die Knochenbrückenbildung bei Wachstumsfugenläsionen zu haben scheint.

Abstract

Introduction: Bone growth disturbance is a very common complication during fracture repair in childhood. Two types are existing, stimulating and inhibiting growth disturbance, which occur depending on the fracture location. In this study we want to examine bone bridge formations as initial part of inhibiting growth disturbance and their interaction with the healing regulating factors HIF-1 α and VEGF, which are thought to stimulate angiogenesis in the ephiphyseal lesion.

Material and Methods: 70 male sprague-dawley rats (5 weeks of age, 100-120 g) were randomly distributed in experimental- and control group. Animals in the experimental group sustained a transepiphyseal drill-hole injury to the left tibia, simulating a transepiphyseal fracture. Euthanasia was performed 1, 3, 7, 14, 28 und 82 days after fracture. In the control group euthanasia was performed on day 0 without setting a lesion. For investigation of the expression of CD-31, HIF-1 α , BMP-2, VEGF, VEGFR1 und 2 a qrt-PCR was performed on every date.

5 other sprague-dawley rats (5 weeks of age, 100-120 g) served as a second control group, for a morphological in vivo control of bone bridge formation on days 1, 3, 7, 14, 28 und 82. With a dynamic contrast enhanced MRI we also performed a blood-flow measurement in the lesion.

Results: in the traumatized growth plate mRNA expression of HIF-1 α showed a slightly upward trend from day 1 on with maximum levels on day 3 while VEGF, VEGFR1 and 2 showed highest expression levels on day 7. Comparing expression levels of CD-31, HIF-1 α , VEGF and VEGFR1 between the lesioned and the contra-lateral physis significant change is just given on day 28. A clear lesion was seen in the MRT on day 1 and 3. Evaluation. On day 28 first indications of cartilaginous tissue are detected in

the drill-hole. From day 42 on bone bridges can be observed as the growth plate gets separated again. The continuously increased transfer coefficient (K^{trans}) in the DCE-MRI proves a well-perfused physis.

Discussion: qRT-PCR data and MRT measurements verify each other. Initially the angiogenesis stimulating factors HIF-1 α (max. day 3) and VEGF (max. day 7) are increased and the MRI shows a higher perfusion starting at day 42 which goes along with bone bridge building. In conclusion it can be stated that hypervascularity is associated with the formation of bone bridges after transphyseal lesions.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Ziel der Studie	5
2. Die Grundlagen	6
2.1. Der Knochen.....	6
2.1.1. Aus anatomischer Sicht.....	6
2.1.2. Aus histologischer Sicht	10
2.1.2.1. Die Zellen des Knochengewebes	11
2.1.2.2. Fasern und Knochengrundsubstanz	14
2.1.2.3. Histologische Knochentypen.....	15
2.1.2.4. Das Periost.....	16
2.1.2.5. Die Epiphysenfuge (Wachstumsfuge).....	16
2.1.3. Gefäßversorgung des Knochens	21
2.1.4. Innervation des Knochens.....	21
2.2. Knochenentwicklung und Knochenwachstum eines langen Knochens	22
2.2.1. Knorpelzellen und Knorpelmatrix	23
2.2.2. Arten der Knochenentwicklung	24
2.2.3. Regulation des Knochenwachstums	26
2.3 Knochenheilung bei Frakturen	29
2.3.1 Der Knochenheilungsprozess	30
2.3.2. Regulatoren der Knochenheilung.....	33
2.3.3. Reparaturvorgänge von Epiphysenfugenläsionen	39
2.4. Quantitative Real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)	42
2.5. Magnetresonanztomographie (MRT)	45
3. Material und Methode	47
3.1. Material.....	47
3.1.1. Versuchstiere	47
3.1.2. Medikamente	48
3.1.3. Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR).....	48
3.1.4. Magnetresonanztomograph (MRT) [68].....	50
3.1.5. Laborbedarf und Infrastruktur.....	50
3.2. Methode.....	51
3.2.1. Operative Versorgung der Ratte bei der Fugenläsion	51
3.2.1.1. Narkose.....	51
3.2.1.2. Setzen der Läsion	51
3.2.1.3. postoperative Versorgung.....	54
3.2.2. Euthanasie und Probengewinnung	54
3.2.3. Durchführung der qRT-PCR.....	55
3.2.4. Durchführung der MRT-Untersuchung.....	55
3.2.5. Statistische Auswertung	56
4. Ergebnisse	57
4.1. qRT-PCR.....	57
4.1.1. CD31	57
4.1.2. HIF-1 α	58
4.1.3. BMP-2	59
4.1.4. VEGFa.....	60
4.1.5. VEGF-Rezeptor 1	61
4.1.6. VEGF-Rezeptor 2.....	62
4.2. MRT.....	62

5. Diskussion.....	66
Literaturverzeichnis.....	72
Abbildungsverzeichnis:	77
Tabellenverzeichnis:	78

1. Einleitung

Knochengewebe ist das Gewebe mit dem größten Heilungspotenzial im menschlichen Körper. Es schafft eine nahezu 100-prozentige Wiederherstellung der ursprünglichen Struktur nach Traumata und hat gleichzeitig auch eine weitere äußerst positive Eigenschaft, das Remodelling. Hierunter versteht man die Eigenschaft des Knochens, gewisse Fehlstellungen eines zusammengewachsenen Knochen auch noch nach dem Abschluss des eigentlichen Heilungsprozesses zu korrigieren. Dies trifft jedoch nur auf das wachsende Skelett bis zum Schluss der Epiphysenfuge zu, beziehungsweise im ausgereiften Skelett findet es nur mehr in sehr geringem Maße statt. So ist es im Kindesalter möglich, bei Frakturen eine gewisse Achsabweichung, bei Rotationsfehlern jedoch nur sehr eingeschränkt, zu tolerieren und eine konservative Therapie mittels Gipsruhigstellung zu verordnen, ohne dass man Spätfolgen zu befürchten hat.[1,2] Das Ausmaß der möglichen Korrektur ist vom Alter und der Art der Fehlstellung abhängig, sowie der der Fraktur am nächsten liegenden Epiphysenfuge, da diese verschiedenen Anteil am Wachstum haben, und somit verschiedenes Korrekturpotenzial. So erfolgt an den oberen Gliedmaßen das größte Längenwachstum an der proximalen Humerusepiphyse und der distalen Radiusepiphyse mit jeweils 80%, und nur 20% werden von der distalen Humerusepiphyse und der proximalen Radius- und Ulnaepiphyse dazu beigetragen. An der unteren Extremität werden 70% von der distalen und 30% von der proximalen Femurepiphyse des Längenwachstums übernommen, wohingegen das Längenwachstum des Unterschenkels mit 55% an den proximalen und 45% an der distalen Tibiaepiphyse relativ ausgeglichen abläuft. [3]

Frakturen haben einen sehr großen Anteil am Patientengut, so waren 42 % aller 166 900 stationär behandelten Freizeitunfälle in Österreich im Jahre 2006 Frakturen [4], die Zahl der ambulant versorgten ist sicherlich noch um vieles höher. Bei diesen Zahlen wird klar, dass es trotz der bestmöglichen Versorgung aus verschiedensten Gründen zu Heilungskomplikationen kommt.

Eine Heilungskomplikation, die aufgrund der noch nicht geschlossenen Epiphysenfugen nur im kindlichen Skelett mit seinen Epiphysenfugen auftreten kann, ist der vorzeitige Verschluss der Epiphysenfugen, hervorgerufen durch Traumata, iatrogen oder auch durch entzündliche Prozesse. Hierbei kommt es aufgrund von Knochenbrückenbildungen zu einem partiellen oder einem vollständigen Wachstumsfugenverschluss, was dann zu

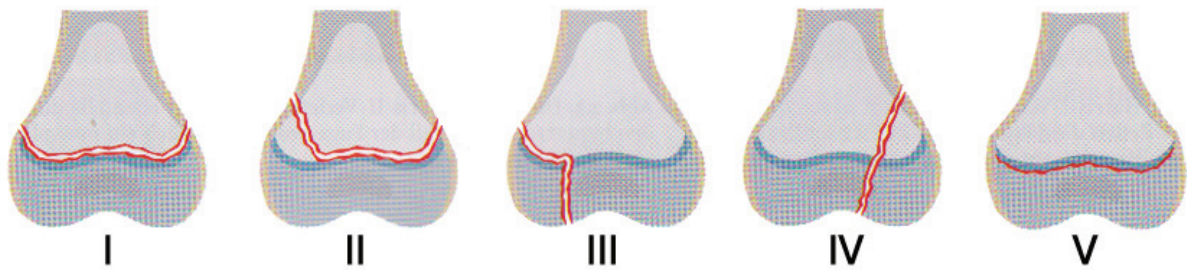
Verkürzung und/oder achsabweichendem Wachstum des betreffenden Knochens führt. Dies wird dann unter dem Begriff „hemmende Wachstumsstörung“ zusammengefasst. Weinberg et al. [5] geben ein Risiko von 15 bis 35% bei dislozierten Epiphysenfugenläsionen an. Hasler und v. Laer [2] beziffern das Risiko einer hemmenden Wachstumsstörung am distalen Femur bei Epiphysenfugenlösungen und Epiphysenfrakturen mit circa 35%, an der proximalen Tibia mit 30 % und an der distalen Tibia mit 20 %. Epiphysenfugenverletzungen im Rahmen von Traumata lassen sich nach Salter-Harris klassifizieren, bei welcher Epiphysenfugenlösungen Salter-Harris-Typ I und Typ II entsprechen, und Epiphysenfrakturen im eigentlichen Sinn Salter-Harris-Typ III und Typ IV (siehe Abbildung). Die Häufigkeit einer hemmenden Wachstumsstörung an der oberen Extremität beschreibt Laer et al. [1] als ein eher seltenes Ereignis, welches nur in ca. 5% aller Fälle auftritt, wohingegen es an der gesamten unteren Extremität in 25 bis 30% der Fälle mit Epiphysenfugenverletzungen häufiger auftreten kann. An dieser Stelle ist auch festzuhalten, dass Längendifferenzen an der oberen Extremität einen weitaus geringeren Stellenwert haben als an der unteren Extremität, da es bei zweiterem aufgrund der resultierenden Beinlängendifferenz zu Folgeschäden, wie zum Beispiel Beckenschiefstand mit Skoliose, kommen kann.

Der Vollständigkeit halber muss erwähnt werden, dass auch stimulierende Wachstumsstörungen existieren, die ebenfalls sowohl partiell, als auch vollständig sein können.[6,7] Diese treten jedoch nur bei langen Röhrenknochen mit diaphysären oder metaphysären Frakturen auf, und wie bei den hemmenden Wachstumsstörungen, sind sie auch nur bei Knochen mit noch offenen Wachstumsfugen möglich. Eine gewisse Stimulierung des Wachstums tritt bei jeder Schafffraktur auf, wird jedoch im Laufe des weiteren physiologischen Wachstums in fast allen Fällen kompensiert. Allerdings kann diese auch ein pathologisches Maß erreichen und nicht mehr korrigiert werden, was dann wiederum Spätfolgen nach sich ziehen kann.

Hasler und v. Laer [2] postulierten, dass eine maximale Stimulation des Wachstums bei Patienten unter zehn Jahren anzunehmen ist, wohingegen bei Patienten über zehn Jahren eher Knochenverkürzungen auftreten, die auf einen vorzeitigen Schluss der Fuge zurückzuführen sind.

Abbildung A: Klassifikation von Epiphysenfugenverletzungen nach Salter-Harris I-V

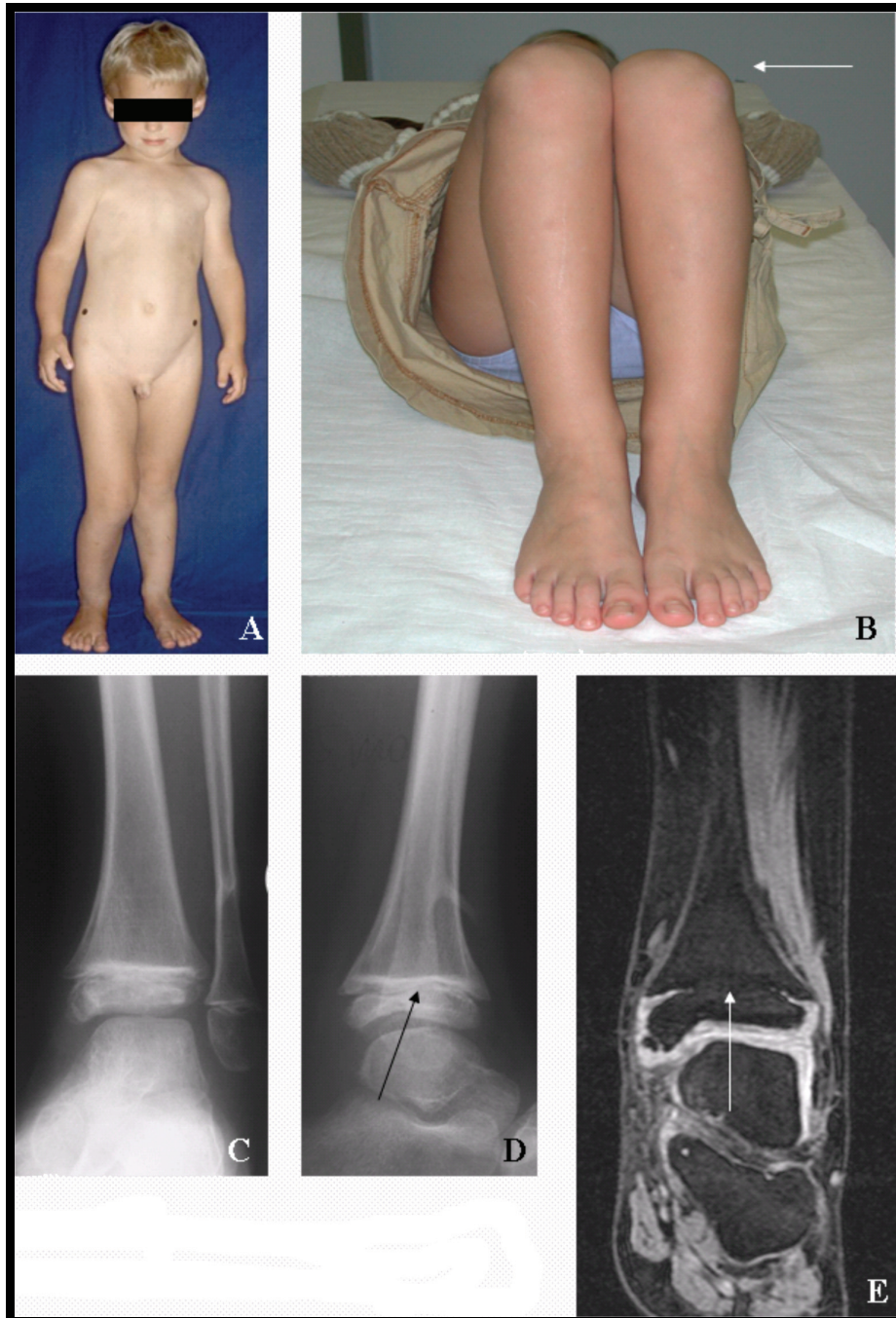
(aus Weinberg, Tscherne, 2006, Unfallchirurgie im Kindesalter Band I, S.18, Abb.2.6.)



Nichtsdestotrotz, sind die Mechanismen, die zu all diesen Wachstumsstörungen führen, bis jetzt nur unlänglich bekannt. Zwar weiß man, dass lokale und systemische Signalgeber für Wachstum, Differenzierung von Zellen und Einsprossung von Gefäßen verantwortlich sind, aber die genaueren Interaktionen sind noch nicht alle erforscht.

Abbildung B: Wachstumsstörungen bei Kindern

A - Kind mit offensichtlicher Beinlängendifferenz als Resultat einer stimulierenden Wachstumsstörung nach diaphysärer Femurfraktur. **B** - Kind mit offensichtlicher Beinlängendifferenz als Resultat einer hemmenden Wachstumsstörung nach einer Epiphysenfraktur (Salter-Harris II) der distalen Tibia. **C, D u. E** - Röntgenaufnahmen bzw. eine MRT-Aufnahme des Kindes von Bild B nach Konsolidierung der Fraktur: Pfeil zeigt vorzeitigen partiellen Epiphysenfugenschluss
(Herzlichen Dank an die Universitätsklinik für Kinderchirurgie Graz für das Bildmaterial)



1.1. Ziel der Studie

Die Reparaturvorgänge bei Epiphysenfugenläsionen stellen eine Art Sonderform von Knochenreparaturvorgängen dar, wobei beide von vielen gleichen Mediatoren und Wachstumsfaktoren beeinflusst werden, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß.

Ziel dieser Studie ist die weitere Aufklärung der Reparaturmechanismen bei Wachstumsfugenläsionen, mit besonderem Augenmerk auf die Bildung von Knochenbrücken in der Epiphysenfuge, welche zu hemmenden Wachstumsstörungen führen können. Durch die Fokussierung auf die regulierenden Faktoren, welche für die Angiogenese, die damit beginnende Ossifikation und somit womöglich für die Bildung der Knochenbrücken entscheidend sind, wollen wir nähere Aufschlüsse über deren Entstehung erhalten. Aus diesem Grund haben wir die Hypothese aufgestellt, dass ein erhöhter Gradient von VEGF (vascular endothelial growth factor), bedingt durch das Frakturhämatom, Einblutungen und Hypoxie am Läsionsort, mit der vorübergehenden Knochenbrückenbildung in der Epiphysenfuge, als Teil des Reparaturmechanismus in der Fuge, korreliert. Dies geschieht direkt durch VEGF über eine erhöhte Angiogenese, eine Stimulierung von Osteoblasten und eine Aktivierung von Osteoklasten, sowie indirekt über Endothelzellen, welche BMP-2 (bone morphogenetic protein-2), einen der wichtigsten Faktoren der Osteogenese, synthetisieren.

Folgende vier Ziele wurden definiert:

- 1.) Die Untersuchung von Epiphysenfugenreaktionen auf traumatische transepiphysäre Läsionen.
- 2.) Die Expression von BMP-2, HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α), VEGF, VEGFR1 und 2 (vascular endothelial growth factor receptor 1 und 2), als Signalmoleküle in der Epiphysenfuge darzustellen, und deren Rolle bei der Knochenbrückenbildung in Reparaturvorgängen zu hinterfragen.
- 3.) Nachweis einer stimulierten Angiogenese während der Heilungsprozesse einer Epiphysenfugenfraktur, mittels Nachweis von CD31-Expression als Oberflächenmarker von Endothelzellen.
- 4.) Morphologischen Nachweis von Knochenbrückenbildungen mittels hochauflösender Magnetresonanz-Tomographie (MRT)

2. Die Grundlagen

2.1. Der Knochen

Der Knochen gehört zusammen mit den Gelenken, dem Muskelgewebe und den Bändern zum Bewegungs- und Stützapparat des Körpers, und hat hier in erster Linie eine tragende und formgebende Funktion für den menschlichen Körper. Das menschliche Skelett setzt sich individuell verschieden zwischen 206 und 214 Knochen verschiedenster Form und Funktion zusammen.[8]

Auch wenn der Knochen sehr gerne als ruhendes stabiles Gewebe angesehen wird, so ist dies nicht ganz richtig. Knochen unterliegt selbst im Erwachsenenalter noch einem enormen Wachstumspotenzial, allerdings nur mehr im Sinne von Remodelling und Frakturheilung. 2-5% Knochen-turn-over im langen Knochen und bis zu 30 % im Geflechtknochen machen dieses Gewebe zu einem äußerst aktiven dynamischen Teil unseres Körpers.[9] Damit dies auch möglich ist, muss das Knochengewebe auch gut mit Nährstoffen versorgt, also gut durchblutet, werden. So wird der Gesamtblutfluss im ganzen Knochengewebe von Boron et al.[10] mit 200 bis 400 ml/min angegeben.

2.1.1. Aus anatomischer Sicht

Generell kann man Knochen in vier große Gruppen unterteilen [8] :

- 1 – *kurze Knochen* (ossa brevis)
- 2 – *lange Knochen* (ossa longa) oder *Röhrenknochen*
- 3 – *flache Knochen* (ossa plana)
- 4 – *irreguläre Knochen* (ossa irregulare).

Makroskopisch kann man noch zwischen zwei verschiedenen Arten von Knochensubstanz unterscheiden: *Substantia compacta* - eine sehr kompakte, mit wenig Zwischenräumen ausgestattete und feste Schicht, die sich an der Oberfläche eines Knochens befindet. Ihre Aufgabe ist es, die Festigkeit und Steifigkeit des Knochens zu gewährleisten, was für die Belastung des Knochens unabdinglich ist; *Substantia spongiosa* – eine Struktur mit trabekulärem Aufbau, also aus einem aus einzelnen Knochentrabekeln gewebten Netz mit

sehr vielen Zwischenräumen. Sie ist vor allem in die metabolischen Vorgänge, wie zum Beispiel den Kalzium-Phosphat-Haushalt, des Knochens involviert. [8]

Kurze Knochen:

Kurze Knochen besitzen an ihrer Oberfläche eine relativ dünne Substantia compacta und im Inneren eine mit Knochenmark oder embryonalen gefüllten Substantia spongiosa. Zu ihnen zählen zum Beispiel die Handwurzel- beziehungsweise die Fußwurzelknochen.

Lange Knochen oder Röhrenknochen:

Bei dieser Art von Knochen unterscheidet man noch weiter definierte Abschnitte:

Erstens die *Epiphyse*. Sie befindet sich jeweils an den gelenksnahen Enden und ist innen aus Substantia spongiosa und außen aus einer dünnen Schicht Substantia compacta aufgebaut. Im Rahmen von Gelenksbeteiligung kann die Epiphyse auch zum Teil mit hyalinem Knorpelgewebe überzogen sein, und als Gelenksfacette dienen.

Zweitens die *Diaphyse*. Sie beschreibt den so genannten Knochenschaft des Röhrenknochens und beinhaltet auch den Markraum, welcher gelbes oder rotes Knochenmark enthalten kann. Dieser Teil besteht fast ausschließlich aus Substantia compacta.

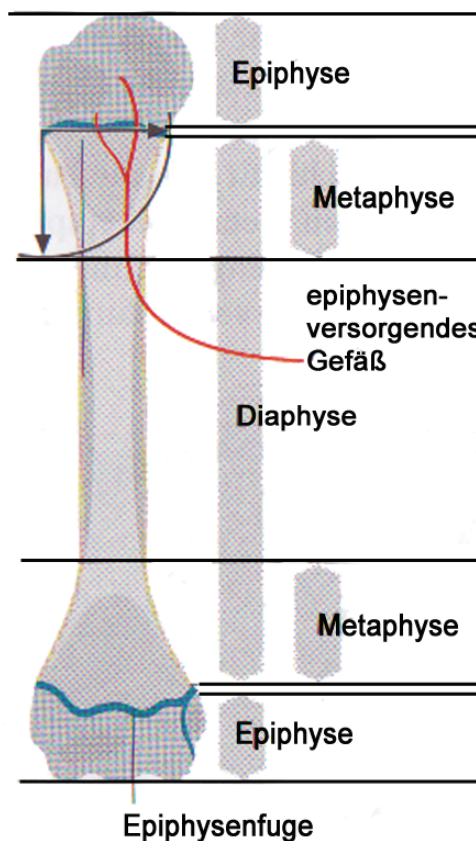
Und drittens die *Metaphyse*. Dieser Teil beschreibt eine Übergangszone zwischen den beiden zuvor genannten. Sie besteht ebenfalls aus Substantia compacta und spongiosa.

Und zu guter letzt die *Physe*, auch Epiphysenfuge oder Wachstumsfuge genannt, welche zwischen Epiphyse und Metaphyse liegt. Sie ist jedoch nur bei einem noch wachsenden Knochen (kindlicher Knochen) zu finden und kann noch in weitere Zonen unterteilt werden (siehe hierzu 2.1.2.5. Die Epiphysenfuge (Wachstumsfuge)). Zur Gruppe der langen Knochen oder Röhrenknochen zählen unter anderem der Oberschenkelknochen (Femur) oder der Oberarmknochen (Humerus; siehe

Abbildung C).

Abbildung C: Abschnitte des Humerus als Beispiel eines langen Knochens

(aus Weinberg, Tscherne, 2006, Unfallchirurgie im Kindesalter Band I, S.4, Abb.1.2.)



Platte Knochen:

Im makroskopischen Bild eines platten Knochens kann man eine Lamina externa von einer Lamina interna unterscheiden, wobei beide aus Substantia compacta bestehen. Dazwischen befindet sich eine Schicht aus Substantia spongiosa. Als Beispiel eines Knochens aus dieser Gruppe sei das Schläfenbein (os temporale) genannt.

Unregelmäßige Knochen:

In diese Gruppe fallen alle Knochen, die den drei oben genannten nicht eindeutig zugeordnet werden können, zum Beispiel der Wirbelkörper (os vertebrale).

Darüber hinaus existieren dann auch noch Sonderformen von Knochen. Hierzu zählen *Sesambeine*, *pneumatische Knochen* und *akzessorische Knochen*. Sesambeine, oder auch sesamoide Knochen genannt, sind direkt in Bänder eingelagert. Solche findet man zum Beispiel beim Großzehen Grundgelenk plantar (zwei Stück, ein mediales und ein

laterles) , jedoch zählt auch die Patella des Kniegelenks in diese Gruppe, auch wenn sich auf Grund ihrer Größe nicht ganz ins Schema eines Sesambeins passt. Unter pneumatischen Knochen versteht man Knochen, welche einen luftgefüllten Hohlraum in ihrem Inneren beherbergen. Solche finden wir vor allem im Gesichtsbereich bei den paranasalen Sinus. Zu den akzessorische Knochen zählt man abnormale überzählige Knochen, welche durch Entwicklungsstörungen oder durch fehlenden Knochenkernverschmelzungen entstehen, und oft zu Fehldiagnosen führen können. Hierzu zählen zum Beispiel Lendenrippen am ersten Lendenwirbel oder das os tibiale externum, ein akzessorischer Knochen medial dem os naviculare am Fuss. [11]

Allen Knochen gemein ist jedoch eine gut sichtbare Bindegewebsschicht, welche sie außen umgibt – das *Periost*. Lediglich an den Stellen, wo der Knochen von Knorpelgewebe überzogen ist, wie an den Gelenksflächen, fehlt diese für den Knochen existentiell wichtige, mit freiem Auge erkennbare, Schicht. Über den genauen Aufbau und dessen Funktionen wird im nächsten Kapitel gesprochen.

Bei Röhrenknochen legt sich an der inneren Oberfläche des trabekulären Knochens, als Grenze zur Markhöhle, noch eine dünne Membran an, das sogenannte Endosteum. Dieses besteht aus Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteoklasten und retikuläre Kollagen Typ III Fibrillen, und scheint sowohl bei der Kalziumhomöostase, als auch als Zell-Reservoir bei Knochenheilung und Reparaturen mitzuwirken. [12]

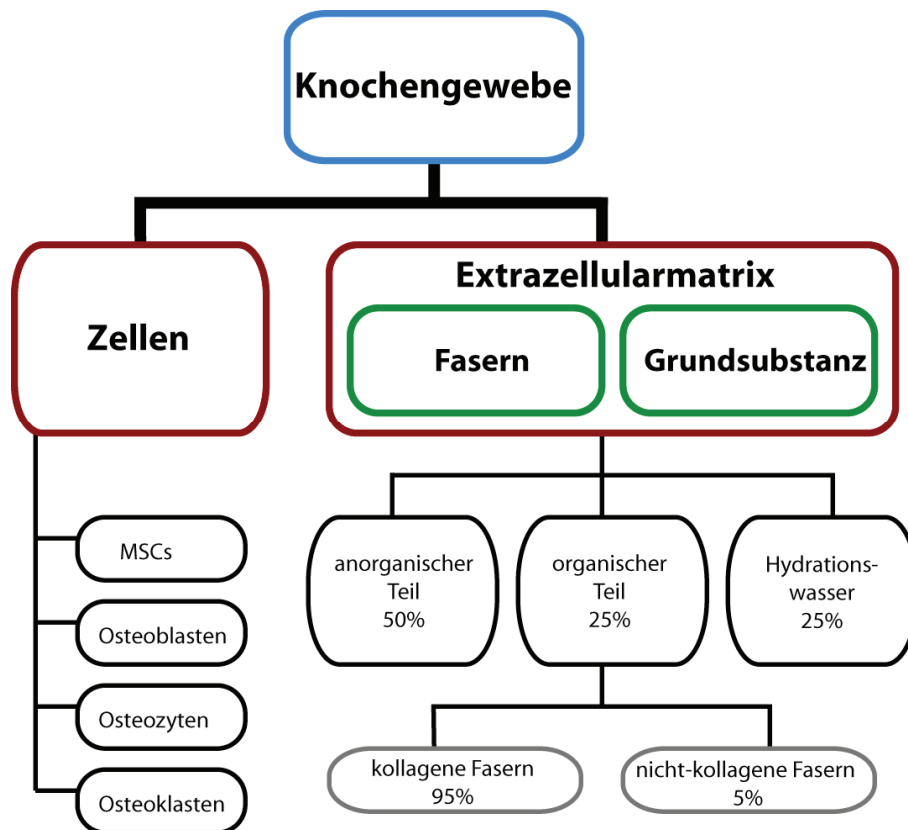
2.1.2. Aus histologischer Sicht

Bei der histologischen Ansicht eines Knochens sieht man, dass er nicht nur aus Knochengewebe besteht, sondern in verschiedenem Ausmaß auch aus Knorpelgewebe. Speziell in der Wachstumsphase, aber auch bei Heilungsprozessen von Knochenläsionen, hat das Knorpelgewebe eine entscheidende Rolle. Selbstverständlich findet man es auch an den Gelenksflächen, an denen ein hyaliner Knorpelüberzug mit seiner dämpfenden Eigenschaft nicht wegzudenken ist.

Knochengewebe hat einen grundsätzlichen Aufbau wie jedes Bindegewebe des Körpers aus Zellen, Fasern und Grundsubstanz. Auf den Knochen nun bezogen setzt er sich aus

Knochenzellen (Vorläuferzellen, Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten), Fasern und Knochengrundsubstanz (Interzellulärsubstanz = Osteoid) zusammen.

Abbildung D: Schematische Darstellung der Zusammensetzung von Knochengewebe [13-15]



2.1.2.1. Die Zellen des Knochengewebes

Vier wesentliche Zelltypen bilden das Grundgerüst des knöchernen Gewebes. Hierzu zählen: *mesenchymale Stammzellen (MSCs)*, *Osteoblasten*, *Osteozyten* und *Osteoklasten*. *Osteoblasten* und *Osteozyten* entstehen in der Embryogenese gemeinsam mit Muskel-, Knorpel-, Fett- und Knochenmarksstromazellen aus dem Mesoderm, dem mittleren Keimblatt. Ihre gemeinsame Stammzelle wird als *mesenchymale Stammzelle*, oder „*mesenchymal stem cell*“ (*MSC*), bezeichnet.[16] Die *Osteoklasten* hingegen entstehen aus einer anderen Stammzelle, nämlich der hämatopoetischen Stammzelle.[17] Selbstverständlich findet man auch Fibroblasten, Endothelzellen und die verschiedensten

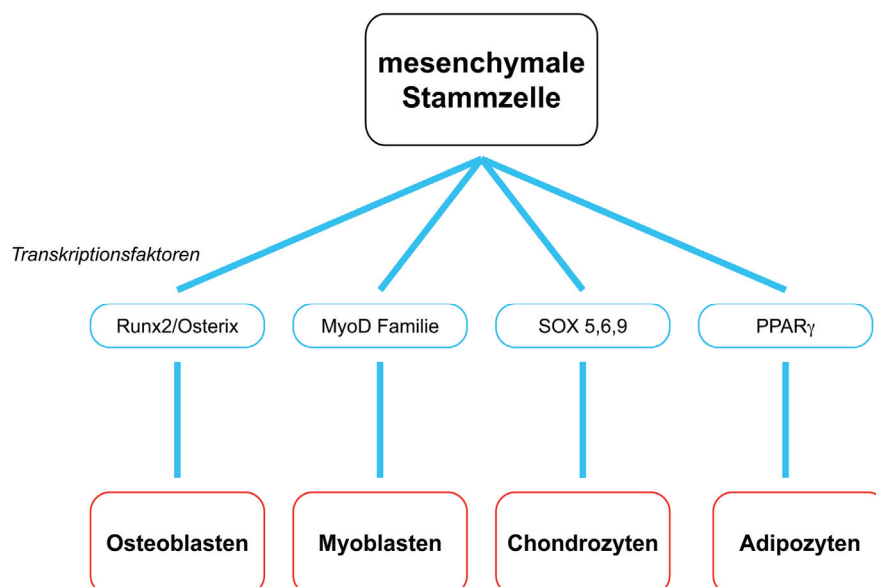
Knochenmarkszellen in den Strukturen des Knochens, sie zählen aber nicht zu den Zellen des Knochengewebes im eigentlichen Sinn.

Mesenchymale Stammzellen:

Diese pluripotenten Vorläuferzellen finden sich im Knochenmark und dienen als Zellreservoir für Reparatur- und Wachstumsvorgänge. Aus ihnen können sich sowohl Knochenzellen, als auch Muskel-, Sehnen- und Knorpelzellen entwickeln. Ihre Entwicklung zu Knochenzellen, über die sogenannten Osteoprogenitorzellen als Vorläuferzelle der eigentlichen Knochenzellen, wird als osteogenetische Differenzierung bezeichnet, und genau dieses Potential macht diese Zellart im Rahmen von Frakturheilung zu einer wichtigen Schlüsselzelle.[16,18] Diese Vorgänge finden natürlich nur unter dem Vorherrschen verschiedenster regulatorischer Faktoren statt. So werden BMPs (bone morphogenetic proteins) durch ihre Wirkung auf Differenzierung, Proliferation und Apoptose als wichtigster Faktor angesehen, der sowohl in Knochenentwicklung, aber auch Knochenheilung, wirkt.[19] Runx2/Cbfa1 und Osterix sind zwei weitere wichtige Faktoren, die für die Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten unentbehrlich sind. [20]

Abbildung E: Stammzellendifferenzierung

(modifiziert nach Weinberg, Tscherne, 2006, Unfallchirurgie im Kindesalter Band I, S.9, Abb.1.6.)



Osteoblasten:

Osteoblasten entwickeln sich aus der mesenchymalen Stammzelle und sind die Vorläuferzellen der Osteozyten. Sie haben drei wichtige Aufgaben zu erfüllen: 1.) Neusynthese der meisten Proteine der Knochengrundsubstanz 2.) Expression von Genen für die Kalzifikation des Knochens 3.) Regulierung der Osteoklastenaktivität. Für diesen Zweck sind sie für die Synthese von RANKL (receptor activator of nuklear factor kappa B Ligand) verantwortlich, welches RANK (receptor activator of nuklear factor kappa B) an Osteoklasten aktiviert und somit zu Knochenabbau führt. Allerdings synthetisieren die Osteoblasten auch OPG (osteoprotegin), welches ein kompetitiver Hemmer von RANKL ist. [13]

Osteozyten:

Osteozyten stellen die größte Gruppe an Zellen im Knochengewebe dar und entwickeln sich aus Osteoblasten. Das Bild der ruhenden stabilen Zellen hat sich in den letzten Jahren zu einer sehr aktiven und mobilen Art von Zellen gewandelt. Sie sind im Gegensatz zu Osteoblasten und Osteoklasten nicht durch ihre Funktion, sondern vielmehr durch ihre Lokalisation im Knochen gekennzeichnet. Sie liegen nämlich in Osteoid (Knochensubstanz) eingebettet, wo die elliptisch geformten Zellen in Lakunen lagern. [21] Selbstverständlich erfüllen sie auch gewisse Aufgaben, wie zum Beispiel das Umwandeln von mechanischen Reizen, die auf den Knochen einwirken, in biochemische Signale, wie Prostaglandine, umzuwandeln und somit für Knochen-Remodelling zu sorgen. Über die Synthese von Osteopontin sind sie im Stande, einerseits für die Neubildung von Knochenmatrix („osteoblastische“ Osteozyten) zu sorgen, andererseits aber auch Knochenhartsubstanz abzubauen („osteolytische“ Osteozyten).[15,22] Weiters wird über sie die Kalzium- und Phosphathomöostase und dadurch die Mineralisation des Knochens, gesteuert. Dies wird auch durch die Tatsache ersichtlich, dass apoptotische Osteozyten Osteoklasten stimulieren.[23] Außerdem ist es ihnen möglich, sich über dendritische Fortsätze an ihrer Oberfläche innerhalb der Lakunen zu bewegen.[9,21]

Osteoklasten:

Sie entstehen im Gegensatz zu den zwei anderen Zelltypen aus einer pluripotenten Vorläuferzelllinie aus dem Bereich der hämatopoetischen Stammzelle, und zwar der Monozyten-Makrophagen-Linie.[13] Sie sind große Riesenzellen, die im Schnitt 10-20 (maximal bis zu 100) Zellkerne enthalten und bis zu 100µm groß werden.[17] Zu ihren Hauptaufgaben zählt die Resorption, sprich der Abbau von Knochensubstanz. Dies

geschieht über ein saures Mikro-Milieu (pH ungefähr bei 4,0) zwischen Osteoklast und Knochen, wobei sich der Osteoklast mittels transmembraner Integriert und dem Vitronectin-Rezeptor an den Knochen andockt. [17] Die mit der Knochenoberfläche in Kontakt stehende Seite eines Osteoklasten weist ein welliges Relief auf („ruffled border“) und wird von einem Ring aus Integrinen und Rezeptoren („clear zone“ oder „seal“), die Knochen und Osteoklast fest beieinanderhalten und abdichten, umgeben. So wird eine Art Lakune zwischen Knochen und Osteoklast gebildet, welche über die in das „ruffeld border“ eingelassen Protonenpumpen, hier V-ATPasen, azidifiziert wird.[24]

Durch eine Vielzahl von Faktoren werden Osteoklasten stimulierend und hemmend beeinflusst. So werden sie zum Beispiel durch IL-1 (Interleukin 1; aus Osteoklasten, Monozyten-Makrophagen), M-CSF (macrophage colony-stimulating-factor; aus Parathormon stimulierten Osteoblasten), TNF- α (Tumornekrose-Faktor- α ; bei Entzündungsvorgängen) und Bindung von RANKL an RANK aktiviert und ihre Proliferation gefördert. Gehemmt werden sie hingegen durch TGF- β (transforming-growth-factor- β ; aus Osteoklasten und Osteoblasten), INF- γ (Interferon- γ ; blockiert IL-1 und TNF- α), NO (Stickoxid; aus Osteoblasten) und Östrogene (Hauptinhibitoren). [17]

2.1.2.2. Fasern und Knochengrundsubstanz

Fasern und Knochengrundsubstanz werden in ihrer Gesamtheit als extrazelluläre Matrix bezeichnet. Bei genauerer Betrachtung der extrazellulären Matrix besteht diese aus einem anorganischen Teil, wozu Mineralien zählen, einem organischen Teil, der aus Kollagenfasern (ca 90%, wobei hauptsächlich Typ I Kollagen) und anderen organischen Proteinen besteht, und Hydrationswasser, welches Grundvoraussetzung für den wichtigen Ionenaustausch im Knochen ist.[15] Der Mineralienanteil besteht hauptsächlich aus Phosphatverbindungen (anorganisches Phosphat (50%), Kalziumphosphat (35%), Magnesiumphosphat) und ist vor allem für die Knochenhärte und die Knochenfestigkeit verantwortlich. Der organische Teil besteht, neben dem oben bereits genannten Hauptprotein Kollagen, noch aus Proteoglykanen (Glykoproteinen und Gla-Proteinen (gamma-carboxy glutamic acid-containing proteins)) [14] und ist entscheidend für die elastische Eigenschaft des Knochengewebes. Das Verhältnis von organischem zu anorganischem Anteil verändert sich im Laufe eines Lebens. So beträgt beim

Neugeborenen der anorganische Anteil 50%, beim alten Menschen jedoch 70%, womit der Knochen an Elastizität verliert und leichter bricht.[25]

2.1.2.3. Histologische Knochentypen

Anhand des histologischen Knochenaufbaus kann man zwei Arten von Knochengewebe unterscheiden:

- 1.) *Geflechtknochen (Primärer Knochen)*
- 2.) *Lamellenknochen (Sekundärer Knochen)*

Der Typ des *Geflechtknochens* kommt hauptsächlich in der Knochenentwicklung vor und entspricht verknöchertem Bindegewebe. Er ist trabekulär aufgebaut, wobei ein Trabekel eine Dicke zwischen 200 und 300 μm aufweist. Dies ist auch die maximale Wegstrecke, über die Diffusion möglich ist, und somit wird garantiert, dass solche Knochen, welche im Inneren keine Blutgefäße aufweisen, sich über Diffusion aus dem sich in den Zwischenräumen befindlichem Knochenmark ernähren können. Permanente Zug- und Druckbelastungen, welchen er hervorragend standhält, fördern die Umwandlung der Mesenchymzellen in Osteoblasten, welche Osteoid produzieren. Somit wird die wichtige Rolle dieses Knochentyps im Knochenwachstum und in der Knochenheilung deutlich. Beim adulten Skelett findet man den Geflechtknochen nur mehr in der Labyrinthkapsel im Innenohr, in der pars petrosa des Schläfenbeins (os temporale) und in den Schädelstturen. [8,15,25]

Der *Lamellenknochen* ist der viel häufiger vertretene Knochentyp im menschlichen Körper. Die Grundeinheit wird als Osteon (=Havers'sches System) bezeichnet, welches eine Länge von bis zu einem Zentimeter und eine Dicke von 250 bis 350 μm aufweist. Jedes Osteon wird außen noch von einer Schicht mineralisierter Matrix mit nur wenigen Fasern umgeben, welche als Zement bezeichnet wird. Um einen zentralen Kanal (canalis centralis = Havers Kanal), welcher ein Blutgefäß enthält, lagert sich Extrazellulärmatrix, mit dessen parallel ausgerichteten Fibrillen, lamellenartig aneinander, wobei fünf bis 20 solcher sogenannter Speziallamellen immer gegenläufig zueinander angeordnet sind. Osteozyten befinden sich in Lakunen in diesen Speziallamellen und stellen die Hauptzellgruppe im

Lamellenknochen dar. Zwischen den einzelnen Havers'schen Kanälen, dem Periost und der Markhöhle verlaufen zusätzlich noch tangentielle Kanäle, die sogenannten Volkmann-Kanäle, in welchen sich ebenfalls Blutgefäße befinden. An der Oberfläche des Lamellenknochens gibt es eine äußere Grundlamelle, die den ganzen Knochen umgibt und die Grenze zum Periost darstellt. Im Inneren gibt es ebenfalls eine auskleidende innere Grundlamelle, welche die Abgrenzung gegenüber dem Markraum darstellt. Im Vergleich zum Geflechtknochen findet man beim Lamellenknochen eine geringere Osteozytenanzahl, jedoch ist der Mineralgehalt wesentlich höher und die Kollagenfasern sind strukturiert angeordnet.[8,15]

2.1.2.4. Das Periost

Das Periost stellt die multifunktionale äußere Haut des Knochens dar. Dieses auch als Beinhaut bezeichnete Bindegewebe enthält neben stützenden Bindegewebszellen auch zahlreiche Nervenfasern, sowie Lymphgefäße und Blutgefäße, womit die Funktion dieser Schicht klar wird. Sie dient einerseits zum Schutz des Knochens, andererseits ist sie für den Knochenstoffwechsel unerlässlich und gewährleistet hierüber auch die Innervation des Knochens. Eine wichtige Funktion übernimmt das Periost auch in der Knochenheilung, bei der es von selbigem aus zu Knochenbildung (intramembranöse Ossifikation) kommt.

Prinzipiell setzt sich das Periost aus zwei Schichten zusammen. Einem äußeren faserreichen bindegewebigem *Stratum fibrosum* und einem inneren *Stratum organicum*, auch Kambium genannt, welches bei der Osteoblastendifferenzierung, in der Knochenentwicklung und in der Knochenheilung eine wichtige Rolle einnimmt.

2.1.2.5. Die Epiphysenfuge (Wachstumsfuge)

Die Epiphysenfuge ist der entscheidende Abschnitt eines Knochens für dessen Wachstum, welches dadurch ermöglicht wird, dass Knorpelzellen proliferieren und zu Knochenzellen differenzieren. Auf einer Röntgenaufnahme wird dieser Teil des Knochens als Aufhellung sichtbar. Störungen oder Verletzungen ihrer Struktur, zum Beispiel durch transphysische Frakturen, können Wachstumsstörungen nach sich ziehen. Je nach Autor

kann man die Epiphysenfuge histologisch in vier beziehungsweise in fünf Zonen einteilen, wobei jedoch Funktion, Ablauf und Endergebnis bei allen Autoren gleich sind. [15,24,26,27]

Ich entschied mich für folgende Einteilung, in welcher die Zonen von epiphysär nach metaphysär wie folgt in vier Zonen angeordnet sind:

- 1.) *Reservezone* (syn. „*ruhende Zone*“)
- 2.) *Proliferationszone* (syn. „*Säulenknorpelzone*“)
- 3.) *Resorptionszone* (syn. „*hypertrophe Zone*“)
- 4.) *Eröffnungszone* (syn. „*metaphysäre Zone*“)

Die Einteilung beruht hauptsächlich auf den verschiedenen Stadien der Chondrozytendifferenzierung. Selbstverständlich ist klar, dass die angeführten Zonen nicht scharfkantig abgegrenzt werden können, sondern mit fließenden Übergängen als gut funktionierendes zusammenspielendes System zu sehen sind.

In der *Reservezone* bildet die extrazelluläre Matrix den Hauptbestandteil und nur einen kleinen Teil stellen undifferenzierte ruhende Zellen dar.

In der folgenden *Proliferationszone* entstehen durch Differenzierung und Proliferation Chondrozyten und es kommt zu einer erhöhten Synthese von intrazellulärer Matrix. Dadurch flachen die Chondrozyten ab und ordnen sich säulenartig in der Längsachse an (daher auch als Säulenknorpel-Zone bezeichnet). Die Säulen werden durch eine Art Wände von Intrazellulärmatrix, welche sich hauptsächlich aus Kollagen Typ I, aber auch Kollagen Typ IX und XI zusammensetzen, voneinander getrennt. Jede Säule wird aus zehn bis 20 Zellen gebildet, wobei eine höhere Anzahl für stärkeres Wachstum steht. Da es nur in dieser Zone zu Zellteilungen kommt, speichern die Zellen hier sehr viel Glykogen, womit eine erhöhte ATP-Produktion in den Mitochondrien möglich ist. Wie folgt, kann hier ein erhöhter Sauerstoffgehalt nachgewiesen werden.[26,27]

Die dritte Zone, die *Resorptionszone*, ist jene, in der die Zellteilung schon beendet ist und die zuvor neugebildeten Chondrozyten ihre terminale Differenzierung vollziehen. Dabei hypertrophieren diese und werden zu blasigen Zellen (deswegen auch manchmal als Blasenknorpelzone bezeichnet [15,24]). Durch das Hypertrophieren, welches zu einem fünf- bis zehnfachen Zellvolumen führt, steuern die Chondrozyten zum eigentlichen Längenwachstum des Knochens bei. Synthese von Kollagen X und Abspaltung von Matrixvesikeln aus der chondrozytären Plasmamembran initialisieren die Mineralisation der Intrazellulärmatrix. VEGF, das ebenfalls von den hypertrophierten Chondrozyten

gebildet wird, führt zum Einsprossen von kleinen Blutgefäßen in den metaphysären Teil der Epiphysenfuge, und mit ihnen kommt es ebenfalls zur Invasion von Chondroklasten, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten und auch Osteoklasten.[26,27]

Womit wir bereits bei der *Eröffnungszone* angelangt sind. Hier kommt es dann schlussendlich zur primären Knochenbildung. Chondrozyten gehen durch Apoptose zu Grunde und Chondroklasten schaffen für Osteoblasten Platz, um Knochenmatrix zu bilden. Auf diese Weise entsteht primärer Knochen, der dann sehr rasch in den definitiven sekundären Knochen umgebaut wird.[26,27]

Die Entwicklung des Chondrozyten von der Reservezone bis zur hypertrophen Zone und die folgende Mineralisierung der Matrix dauert zirka 24 Stunden. [27]

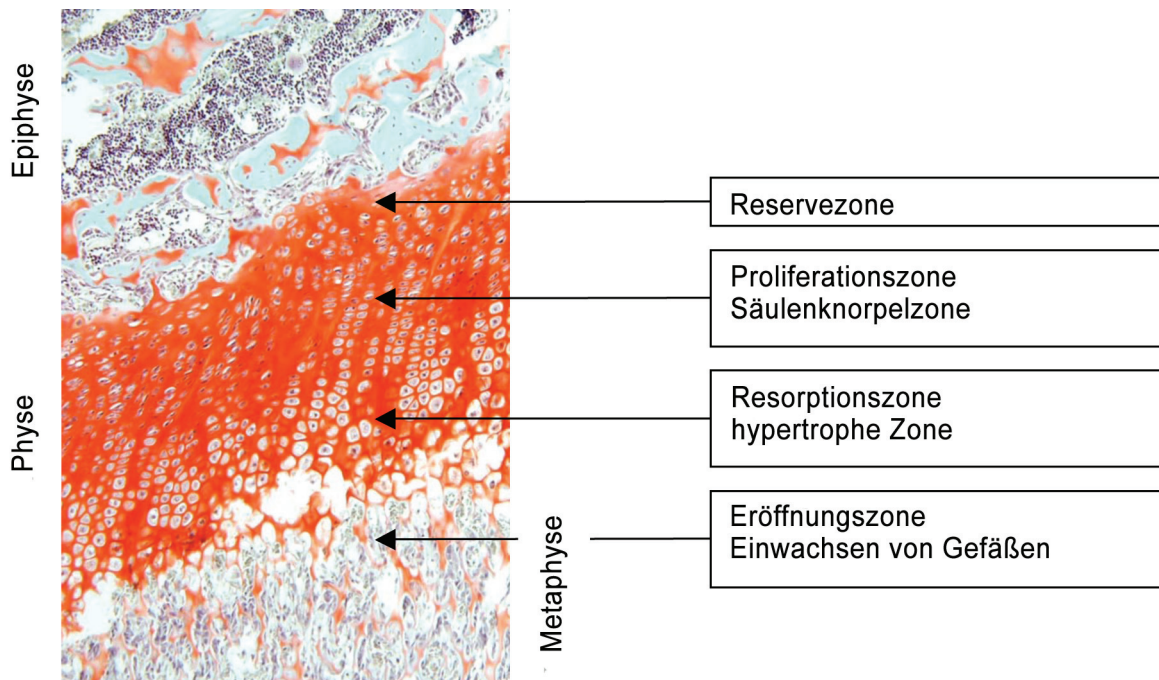
Abbildung F: histologische Übersicht über Epiphyse, Wachstumsfuge (growth plate) und Metaphyse

(Safranin-O Färbung; Vergrößerung: 40x)



Abbildung G: Detailansicht der Fuge mit Zoneneneinteilung

(Safranin-O Färbung; Vergrößerung: 100x)



Die an sich avaskuläre Epiphysenfuge wird durch metaphysäre und epiphysäre Blutgefäße mit den nötigen Nährstoffen versorgt, wobei die Reservezone, die Proliferationszone und der größte Teil der hypertrophen Zone über Diffusion aus den epiphysären Gefäßen versorgt werden. Der Rest der hypertrophen Zone, sowie die Eröffnungszone, in welche bereits Gefäße einsprossen, werden über metaphysäre Gefäße mit Blut versorgt. Unter physiologischen Bedingungen kommt es nur im Rahmen des Epiphysenverschlusses mit Ende des Wachstums zu transphysärer Blutgefäßbildung, da deren Vorhandensein essentiell für die primäre Knochenbildung ist. Wenn es im Rahmen eines Traumas zur Störung der Gefäßversorgung kommt, gibt es je nach Lokalisation der Störung verschiedenen Folgen. Wenn die epiphysären Gefäße betroffen sind, kann es eine avaskuläre Nekrose des sekundären Ossifikationszentrums zu Folge haben, oder bei sehr starker Zerstörung kann es zu einem vorzeitigen Schluss der Epiphysenfuge kommen. Bei lokalem peripher liegendem Schaden kommt es über Gefäßeinsprossung zu Knochenbrückenbildung mit Wachstumsstörungen. Bei Verletzung der metaphysären Gefäße findet in der Epiphysenfuge keine Kalzifizierung mehr statt, womit Chondrozyten nicht mehr in Apoptose gehen und mit den proliferierenden Chondrozyten aus der Proliferationszone akkumulieren. Dieser Prozess führt zu einer Höhenzunahme der Epiphysenfuge, was mit Wachstumsstörungen und Instabilität der Wachstumsfuge einhergeht.

Terminal, also am äußeren Rand, wird die gesamte Epiphysenfuge von einem faserknorpeligen Ring umgeben, dem sogenannten „groove of Ranvier“ oder frei übersetzt „Ranvier’scher Schnürring“. Dieser wurde erstmals 1873 von Ranvier beschrieben, wobei er Zellen, Fasern und eine darunterliegende dünne Knochenlamina beschrieb, welche die gesamte Zirkumferenz der Epiphysenfuge umgeben. Die Knochenlamelle wurde dann später von Lacroix genauer untersucht und erforscht und als „Knochenring nach Lacroix“ beschrieben. [26-28] Als Aufgabe des „groove of Ranvier“ wird der Schutz der Epiphysenfuge vor Druck-, Zug- und Scherkräften beschrieben.

Das „Leben“ der Fuge wird in drei Abschnitte unterteilt:[15]

1.) *Stadium des eigentlichen Wachstums:*

Hier besteht ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Proliferations- und Mineralisationsvorgängen und die Fuge ist noch weit offen.

2.) *Stadium der Ruhephase:*

Diese Phase befindet sich kurz vor dem eigentlichen Wachstumsabschluss und dauert meist mehrere Monate. Die Proliferationsvorgänge ruhen, die Mineralisation greift jedoch noch nicht auf den metaphysären Teil des Knochens über. Das Potential zur Proliferation ist aber noch gegeben.

3.) *Stadium der Verschlussphase:*

Die Mineralisation greift auf die Metaphyse und die angrenzende Epiphyse über. Die Fuge verschwindet.[15] Diese Phase tritt bei Mädchen um eineinhalb bis zwei Jahre früher ein als bei Burschen.[27]

Das Leben jeder Fuge ist genauso individuell wie sein Wachstumspotential. So sind die knienahen Epiphysenfugen (distaler Femur, proximale Tibia) mehr am Längenwachstum der unteren Extremität beteiligt als die kniefernen. Bei der oberen Extremität ist das Phänomen genau umgekehrt. Hier sind es die ellbogenferneren Fugen, die mehr Wachstumsarbeit leisten. [27] Es muss auch klar sein, dass bei jedem Menschen die Verschlusszeitpunkte der Epiphysenfugen individuell sind.

2.1.3. Gefäßversorgung des Knochens

Wie bereits im Kapitel 2.1. beschrieben, unterliegt der Knochen einem hohen Blutdurchfluss. Dies kann klarerweise nur über ein gut ausgebildetes Gefäßsystem erfolgen, welches sich aus vier Hauptteilen zusammensetzt:

- 1) *nutritive Arterie*
- 2) *periostaler Plexus*
- 3) *epiphysäre Gefäße*
- 4) *metaphysäre Gefäße*

Die *nutritive Arterie*, welche ein Abgang von einer großen Systemarterie ist, gelangt diaphysär durch das „Ernährungsloch“ (lat.: foramen nutritivum) in den Knochen, wo sie sich in einen ascendierenden und einen descendierenden Ast aufteilt. Diese wiederum teilen sich weiter in kortikale Äste und Knochenmarksgefäße. Erstere versorgen dann Endost und Diaphyse, zweitere bilden ein Gefäßnetz im Knochenmark und versorgen dieses. Ein *periostaler Plexus*, welcher aus Gefäßen der umgebenden Muskulatur gespeist wird, versorgt die äußeren Abschnitte der Kortikalis. *Epiphysäre Gefäße*, welche aus Systemarterien stammen, und *metaphysäre Gefäße*, welche aus dem periarteriellen Gefäßgeflecht stammen, versorgen den Rest des Knochens von terminal bis diaphysär. Der venöse Abfluss der Spongiosa wird über oberflächliche und tiefe Venen bewerkstelligt. Der periostale Plexus enthält neben Arterien auch Venen, welche dann das Blut an die umgebenden Muskelvenen abgeben. [8,12]

2.1.4. Innervation des Knochens

Knochen und Periost werden sowohl von sympathischen als auch von sensorischen Nervenfasern innerviert, über die der Blutfluss und das Schmerzempfinden im Knochen gesteuert werden. Eine erhöhte sympathische Reizung führt zu einem verringerten Blutfluss, wohingegen ein verstärkte Hemmung der sympathischen Innervation diesen steigert. Die Nervenfasern ziehen mit den Gefäßen, oberflächlich in der Tunica Adventitia und als Plexus in der Tunica Media, in den Knochen und verlaufen auch im Inneren der Knochen mit den Gefäßen mit. [27]

2.2. Knochenentwicklung und Knochenwachstum eines langen Knochens

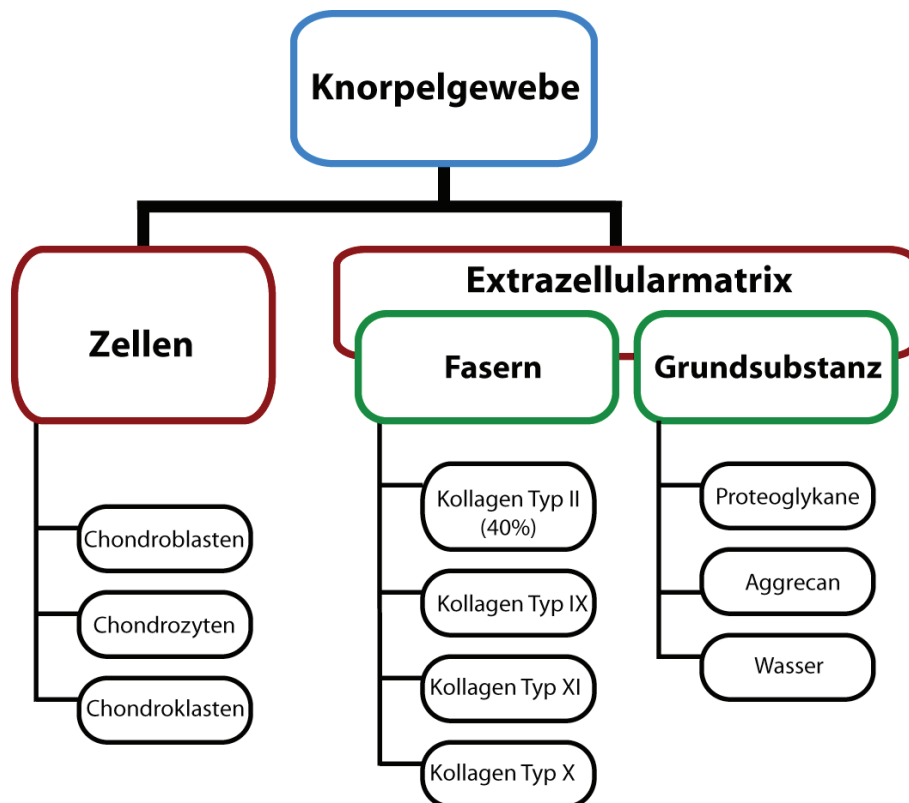
Die Knochenentwicklung ist ein sehr komplexer Ablauf von epithelialen und mesenchymalen Interaktionen, sowie Proliferation und Differenzierung der MSCs in der embryonalen Phase der menschlichen Entwicklung.[13] Am Anfang der Entwicklung der langen Knochen stehen zwei obere und zwei untere Extremitätenknospen, welche ab der fünften Embryonalwoche sichtbar werden. Diese bestehen aus einem mesenchymalen Kern, der vom parietalen Mesoderm, einem Teil des mittleren Keimblatts, abstammt und wird außen vom Ektoderm, dem äußeren Keimblatt, bedeckt. Bereits in der sechsten Embryonalwoche kann man die ersten Modelle von langen Knochen der Extremitäten erkennen. Diese bestehen noch aus hyalinem Knorpel, welcher sich durch Verdichtung, Proliferation und Differenzierung des mesenchymalen Kerns entwickelt. Somit entsteht das primäre Ossifikationszentrum eines Knochens. [24,29]

Auf die weitere Entwicklung, sowie auf das Wachstums wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.

2.2.1. Knorpelzellen und Knorpelmatrix

Da wie bereits erwähnt, auch Knorpelzellen und deren Matrix bei der Knochenentwicklung miteingebunden und wichtig sind, möchte ich nun kurz darauf eingehen.

Abbildung H: Aufbau eines hyalinen Knorpels [24,30,31]



Chondrozyten stellen die Hauptzellgruppe unter den Knorpelzellen dar. Ihre Vorläuferzellen, die wiederum von der MSC abstammen, werden als Chondroblasten bezeichnet und sind für die Synthese von Knorpelmatrix Proteinen, wie Kollagen Typ I, Fibronectin und Hyaluronsäure, zuständig und sorgen durch ihre Proliferation für Zellnachschub im Knorpel. Sobald sie sich zu Chondrozyten differenzieren verlieren sie ihre proliferative Funktion und synthetisieren Knorpelmatrix-Proteine wie Kollagen Typ II, Typ IX und Typ XI, sowie Gla-Protein und link-Protein. Wichtige Steuerfaktoren für die Chondrogenese, die Knorpelzellentwicklung, sowie für die Synthese der Knorpelmatrixproteine, sind der Transkriptionsfaktor SOX9 und Runx2/Cbfa1. SOX9 wird von mesenchymalen Vorläuferzellen und proliferierenden Chondrozyten gebildet,

allerdings nicht mehr von hypertrophen Chondrozyten, und ist wichtig in allen Entwicklungsschritten von Knorpelzellen, sowie der Synthese der Knorpelmatrixproteine. Runx2/Cbfa1 ist vor allem in der Endphase der Knorpelzellentwicklung von Wichtigkeit, ganz besonders in der Wachstumsfuge, wo Runx2/Cbfa1 das Differenzieren der Chondrozyten in hypertrophe Chondrozyten stimuliert. Jedoch sind noch viele andere Mitglieder der SOX-Familie, sowie der Runx-Familie, in die Chondrogenese involviert. [31] Ein weiterer wichtiger Faktor ist HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α), welcher unter hypoxischen Bedingungen, wie sie es in einem Frakturkallus oder in Epiphysenfugenläsionen vorherrschen, über Aktivierung von SOX9 in die Chondrogenese eingreifen. [30]

Die hyaline Knorpelmatrix enthält hauptsächlich Kollagen Typ II, was zirka 40% des Trockengewichts des Knorpels ausmacht. Kollagen Typ IX und Typ XI sind ebenfalls vorhanden, jedoch nur in relativ geringem Ausmaß. Wenn Chondrozyten zu hypertrophieren anfangen und zu hypertrophen Chondrozyten werden, beginnen sie, nur Kollagen Typ X zu synthetisieren. Die zweite Hauptgruppe der Knorpelmatrixproteine stellen die Proteoglykane dar, wobei in der Knorpelmatrix mengenmäßig hauptsächlich Chondroitinsulfat und Keratansulfat eingebettet sind. [24] Das von der Funktion her bedeutendste Proteoglykan ist Aggrecan, welches das entscheidende Protein für das osmotische Gleichgewicht im Knorpel ist, und den Knorpel somit bei kompressorischem Stress schützt.[26] Weitere , die allerdings nur in kleinen Mengen vorkommen, sind Fibronectin, Vitronectin und zahlreiche andere.

2.2.2. Arten der Knochenentwicklung

Prinzipiell kann man zwei große Arten von Knochenentwicklung, der sogenannten Osteogenese, unterscheiden:

- 1- *Direkte / desmale / intramembranöse Ossifikation*
- 2- *Indirekte / enchondrale Ossifikation.*

Direkte / desmale / intramembranöse Ossifikation:

Auf diesem Weg entsteht Knochen aus mesenchymalen Blasten, welche direkt zu Osteoblasten und weiter zu Osteozyten differenzieren. Der ursprüngliche Knochen, welcher sich durch diesen Prozess bildet, wird als *Geflechtknochen* bezeichnet und wird

erst in weiterer Folge zu *Lamellenknochen* umgebaut. So entstehen zum Beispiel die Knochen des Schädeldachs oder die Alveolen der Zähne, aber auch bei der Knochenheilung spielt diese Art der Knochenentstehung eine entscheidende Rolle.[24]

Indirekte oder chondrale Ossifikation:

Hierbei kommt es indirekt zu Knochenbildung über eine knorpelige Vorstufe.

Die Chondrozyten des knorpeligen Knochenmodells im Zuge der Knochenentwicklung beginnen zu hypertrophieren und verursachen über die Abgabe von Matrixvesikeln, welche mit Kalzium gefüllt sind, die Kalzifizierung der Matrix. Weiters geben sie Phosphatasen ab, welche Phosphat in der extrazellulären Matrix für die Präzipitation mit dem Kalzium bereitstellen und Proteasen, welche die Kalzifikation inhibierenden Proteoglykane abbauen. Die hypertrophen Osteozyten beginnen daraufhin VEGF (vascular endothelial growth factor) zu produzieren und stimulieren nebenbei auch noch Chondroklasten, die durch Abbau von Knorpelzellen für die Osteoblasten Raum schaffen, um dort einsprossen zu können. VEGF führt zum Einsprossen von Gefäßen, mit welchen MSCs mit einwandern und die dann im weiteren Verlauf zu Osteoblasten differenzieren. Die Osteoblasten beginnen dann mit der Verknöcherung und differenzieren dann weiter zu Osteozyten.[8,24,27] Dieser Ablauf gleicht dem einer Frakturheilung und dem in der Epiphysenfuge. Darüber hinaus wird klar, dass das Längenwachstum eines langen Knochens nur so lange möglich ist, solange eine Epiphysenfuge mit enthaltenden Knorpelzellen vorhanden ist (mit Schluss der Epiphysenfuge endet das Wachstum).

Weiters kann man die indirekte oder chondrale Ossifikation in zwei Untergruppen teilen:

1. *Die enchondrale Ossifikation*
2. *Die perichondrale Ossifikation*

Unter *enchondraler Ossifikation* versteht man das Beginnen der Verknöcherung im Zentrum eines Knorpels, wie es in den Epiphysen, den proximalen und distalen Enden langer Knochen, geschieht. Die so entstehenden Knochenkerne treten erst nach der Geburt auf, außer am distalen Femur und an der proximalen Tibia, womit diese zwei Kerne als Reifezeichen bei Neugeborenen dienen.[25] Später findet die enchondrale Knochenbildung auch in der Physe (Wachstumsfuge) statt und ist für das Längenwachstum verantwortlich. Der Beginn der Verknöcherung wird hier dann als *sekundäres Ossifikationszentrum* bezeichnet.

Den *perichondralen Typus* findet man ab dem 3. Embryonalmonat an der Diaphyse, und findet seinen Ausgangspunkt im Perichondrium, der bindegewebigen Hülle um Knorpel, welches vergleichbar mit dem Periost des Knochens ist.[15] Auf diese Weise kommt es zu einer Knochenmanschetten-Bildung und später auch zum Dickenwachstum des Knochens.

2.2.3. Regulation des Knochenwachstums

Die Regulation des Wachstums muss man auf zwei Aspekte aufteilen: die Regulatoren des Dickenwachstums und die Regulatoren das Längenwachstums.

Die Regulation des Dickenwachstums ist noch reaktiv ungeklärt. Einerseits ist es klar, dass es genetisch bedingt sein muss, denn eine Maus hat dünnere und kleinere Knochen als ein Elefant. Allerdings ist es noch nicht gelungen, spezifische Gene zu deklarieren, die hierfür verantwortlich sind. Ein Aspekt der offensichtlich eine Rolle spielt, ist mechanischer Stress. So zeigten Goodship et al. 1979 [32] im Schweinemodell, dass bei Entfernen der Ulna der Radius über periostale Knochenbildung rasch an Dicke zunimmt und die Funktion der Ulna mit übernimmt. Dieser Vorgang, der Knochen bildet, wo es aufgrund mechanischer und statischer Eigenschaften nötig wird, wurde als „Mechanostat“ bezeichnet. Die enge Beziehung zwischen Knochenwachstum und Muskelwachstum stellte die Vermutung auf, dass gemeinsame Gene die Größe und Stärke von Muskeln und Knochen prädeterminieren. Diese Hypothese wurde als „Sizostat“ bezeichnet. [33]

Die Faktoren, die für Längenwachstum und damit eigentlich jene, welche für die Steuerung der Epiphysenfugen verantwortlich sind, kann man in drei Gruppen einteilen, welche selbstverständlich interagieren müssen (siehe Abbildung I): [27,33]

- 1.) *systemische Regulatoren*
- 2.) *lokale Regulatoren*
- 3.) *mechanische Kräfte*

Zu den *systemischen Regulatoren* gehören das growth-hormon (GH), Schilddrüsenhormone, Sexualhormone (Östrogene und Androgene), insulin-like growth factor (IGF), Glukokortikoide sowie Vitamin D. Pränatal sieht man IGF-I und IGF-II als die

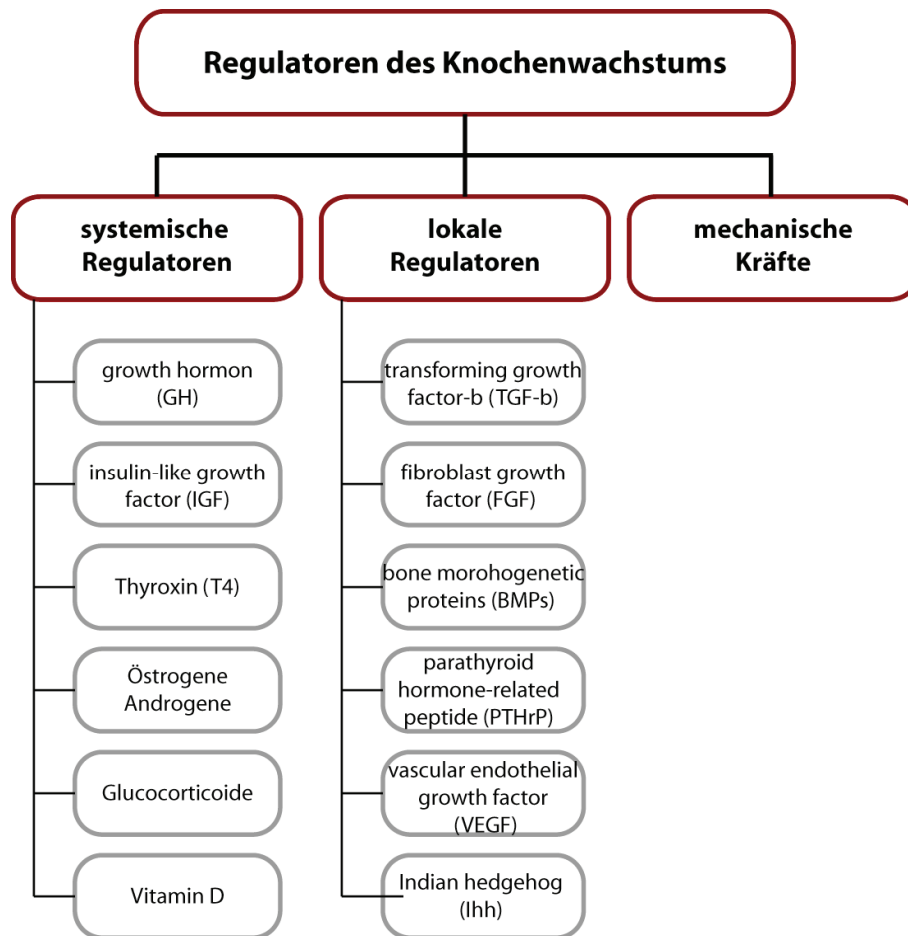
wichtigsten zwei Faktoren an, postnatal GH in Kombination mit IGF-I. GH an sich regt direkt die Zellen der Reservezone zu Proliferation und Differenzierung an. Bei Kindern, die unter einer Hypothyreose leiden, kommt es zu defekter Knochenbildung, wohingegen es bei Hyperthyreose zu exzessivem Knochenwachstum kommt. Weiters führt Thyroxin (T_4) mittels BMP2-Induktion auch zur Expression von Kollagen Typ X, was wiederum zur Mineralisierung der Knorpelmatrix führt. Östrogene sind vor allem gegen Ende des Wachstums für den Schluss der Epiphysenfuge entscheidend. Über zwei chondrozytär gebundene Rezeptoren, Östrogenrezeptor α und β , kommt es primär zum Sistieren der Chondrozytenproliferation und sekundär zu verstärktem Einsprossen von Gefäßen. Androgene scheinen nur indirekt, durch ihr partielles Umwandeln in Östrogene, Knorpelgewebe zu beeinflussen. Vitamin D ist essentiell für die Mineralisierung neugebildeten Osteoids, beeinflusst nebenbei aber auch direkt Chondrozyten. Glukokortikoide haben sowohl im ausgewachsenen als auch im sich entwickelnden Knochen negativen Einfluss auf Wachstumsrate, Knochendichte und erhöhen die Apoptoserate der Chondrozyten in der Epiphysenfuge. Weiters kommt es zu Osteoklastenstimulation, Osteoblastensuppression, Reduzierung des Muskeltonus sowie Störung der Gefäßinvasion in die Wachstumsfuge.[27]

Es gibt zahlreiche *lokale Faktoren*, die regulierend in das Längenwachstum eingreifen. Hierzu zählen Proteine, die den Zellzyklus beeinflussen wie Zyklone, Zyklon-abhängige Kinasen und Zyklon-abhängige Kinase Inhibitoren; Wachstumsfaktoren wie transforming growth factor- β (TGF- β), fibroblast growth factor (FGF) und bone morphogenetic proteins (BMPs); parathyroid hormone-related peptide (PTHrP); vertebrate hedgehog Familie Mitglieder wie Indian hedgehog (Ihh); angiogenetische Faktoren wie VEGF; antiangiogenetische Faktoren; matrix metalloproteinases (MMPs); Integrine, und viele weitere. Integrine sind in der ganzen Wachstumsfuge vertreten und spielen vor allem bei der Zell-Matrix-Beziehung eine wichtige Rolle. MMPs, besonders MMP-9, sind für die Degradierung der Extrazellulärmatrix zuständig, und werden in hohen Konzentrationen in der hypertrophen Zone gefunden. Die Chondrozytenregulation wird hauptsächlich durch BMP, Ihh, FGF und PTHrP gesteuert. BMPs, welche in der Epiphysenfuge von hypertrophen und prähypertrophen Chondrozyten produziert werden, induzieren in prähypertrophen Chondrozyten die Synthese von Ihh, was zu vermehrter Differenzierung von Chondrozyten zu hypertrophen Chondrozyten führt, und dadurch zur Längenzunahme der Knorpelsäule. Somit sind BMPs direkte Antagonisten von FGF, welcher die Chondrozytenproliferation und die Ihh-Synthese hemmt. PTHrP, welches in den periartikulären Zellen gebildet wird, verzögert einerseits die Differenzierung der

Chondrozyten und sorgt andererseits auch für deren Proliferation. Somit sorgt es immer für einen vollen Proliferationspool in der Proliferationszone. PTHrP und Ihh bilden zusammen ein sich rückkoppelndes Regelwerk, die sogenannte „PTHrP-Ihh-Loop“, welche ein entscheidender Regler des Wachstums in der Fuge ist. Dieses rückkoppelnde System wird jedoch von außen durch BMPs und FGF beeinflusst. Sollte PTHrP unter ein gewisses Level fallen, hören die Chondrozyten auf sich zu proliferieren und beginnen zu hypertrophieren. Ihh wiederum wird nur von hypertrophen Chondrozyten gebildet und führt neben der Förderung der Proliferation der Chondrozyten auch zu einer Erhöhung der Synthese von PTHrP. TGF- β wird als inaktives Molekül von Chondrozyten synthetisiert, erhöht wiederum die PTHrP-Synthese und ist somit auch für die Hemmung der Chondrozytendifferenzierung verantwortlich. VEGF ist, wie bereits erwähnt, für das Einwachsen von Blutgefäßen und der damit beginnenden Verknöcherung verantwortlich, und wirkt über VEGF-Rezeptoren. [26,27,31]

Der letzte Faktor dieses komplexen Systems sind die *mechanischen Kräfte*, die auf den sich entwickelnden Knochen einwirken. Bereits 1860 wurde mit dem Hüter-Volkman-Gesetz die Einwirkung von physischen Spannungen auf die Epiphysenfuge postuliert. Es wurde ein indirektes Verhältnis von axialen Kräften auf den epiphysären Knorpel zu Wachstumsrate in der Epiphysenfuge festgestellt. Anders ausgedrückt: Eine Kraft, die über das physiologische Maß hinausgeht führt zu Wachstumshemmung, eine Kraft im physischen Bereich führt zu normalem Wachstum und axialer Zug führt zu einem überschießenden Wachstum. [27,33] Duncan und Turner [34] untersuchten den Einfluss der mechanischen Kräfte auf die Zellen an sich und stellten fest, dass durch Zug beziehungsweise Druck Zellen gestreckt beziehungsweise komprimiert werden und es dabei zu Flüssigkeitsverschiebungen im Knochen kommt. Sie postulierten weiters, dass in physiologischen Kräfteverhältnissen eine Balance zwischen Knochenresorption und Knochenbildung vorhanden ist. Verminderte Spannungen würden die Resorption bevorzugen, physiologisch erhöhte Spannung die Bildung. Unphysiologisch erhöhte Spannung jedoch würde zu verminderter Knochenqualität führen. Henderson und Carter [35] bezogen auch das umgebende Gewebe, wie Muskeln und deren Bänder, und deren Interaktion mit den Zellen in ihre Untersuchungen mit ein. So führen die Zellen an sich und die Spannungen, welche durch das ebenfalls wachsende umgebenden Gewebe verursacht werden, zu Knochendeformierungen, welche wiederum durch Anpassung der Wachstumsrate in der Epiphysenfuge, und dem damit verbundenen Remodelling, zu Knochenwachstum führen. [26,27,31]

Abbildung I: Zusammenfassung der Regulatoren für das Knochenwachstum
[26,27,31,33,34]



2.3 Knochenheilung bei Frakturen

Der Knochenheilung stellt eine komplex ablaufende Interaktion von mesenchymalen Stammzellen mit Immunsystem, hämatopoetischem System und Blutgefäßsystem voraus. Das Bemerkenswerte an diesem Prozess ist, dass es im Gegensatz zu den meisten anderen Heilungs- und Reparaturprozessen im Körper zu keiner Narbenbildung und somit zu keiner Bildung von minderwertigem Gewebe, sondern es zu einer wirklichen Restitutio ad integrum mit ursprünglicher Knochengometrie und ursprünglichen biomechanischen Eigenschaften kommt. Diese Tatsache wird dadurch erklärbar, dass der Heilungsprozess eine Nachahmung der embryonalen Knochenentwicklung darstellt. Es ist jedoch zu erwähnen, dass eine 100-prozentige Wiederherstellung der Strukturen nur im Kindesalter, sprich in der Wachstumsphase des Knochens, möglich ist. Bemerkenswert ist die

Tatsache, dass Knochenheilung in einem großen Teil der Vorgänge die Knochenentwicklung widerspiegelt.

2.3.1 Der Knochenheilungsprozess

Vorweg muss man feststellen, dass die meisten der folgenden Erkenntnisse aus Rattenmodellen gewonnen wurden, zu welchem Zwecke man eigens Frakturmodelle bei Ratten entwickelte. Jedoch wird davon ausgegangen, dass die dort ablaufenden Prozesse auf den menschlichen Körper umzusetzen sind. Einhorn et al. [36,37] erarbeiteten zum Beispiel das Modell einer standardisierten geschlossenen transversalen Femurfraktur bei Ratten.

Entscheidend für den Beginn von Knochenheilung sind vier Signalgeber, welche abhängig von Frakturlokalisierung, Frakturtyp und Behandlungsmethode in unterschiedlichem Ausmaß und Intensität interagieren und stimulieren. Diese sind: das Knochenmark, die Kortikalis, das Periost und das umgebende Bindegewebe [36,38]

Generell kann man zwischen zwei Arten von Knochenheilung differenzieren:

Die *direkte/primäre kortikale Knochenheilung*, die dann stattfindet, wenn die beiden Frakturrenden erstens anatomisch korrekt, Kortikalis an Kortikalis, zweitens aneinander gepresst und drittens starr über eine Osteosynthese verbunden werden. Nur unter diesen drei Voraussetzungen kommt es durch Osteoklasten zur Bildung neuer Haver'scher Kanäle zwischen den beiden Bruchenden, wodurch es Blutgefäßen ermöglicht wird einzuwachsen, und mit ihnen kommen dann mesenchymale Stammzellen, die weiter zu Osteoblasten differenzieren, welche neuen Knochen bilden. Dieser Mechanismus findet jedoch nur sehr selten statt, da nur in den seltensten Fällen alle drei Voraussetzungen erfüllt werden.[36]

Die *indirekte/sekundäre Knochenheilung* ist der sehr viel häufiger ablaufende Heilungstyp des Knochens und wird deswegen auch genauer besprochen. Hier geschieht die Knochenwiederherstellung über mehrere Pfade. Der wohl Wichtigste geht über das Periost, dessen Prozesse über Mikrobewegungen stimuliert und durch starre Fixierung gehemmt werden.[36] Weiters wird über intramembranöse Ossifikation, entspricht einer

direkten Ossifikation ohne knorpeliger Vorstufe, Knochen gebildet. Für die Kallusbildung stellt das umgebende Bindegewebe einen wichtigen Faktor dar, welche durch Steigerung der zellulären Aktivität dessen Entwicklung fördert. Der Kallus stellt eine anfangs knorpelig-bindegewebige, später knöcherne Hülle um den Frakturspalt dar. Ein weiterer wichtiger Faktor ist das anfängliche Frakturhämatom, welches Entzündungszellen samt dazugehörigen Entzündungsfaktoren enthält.[36,37]

Der genaue Ablauf der indirekten Knochenheilung wird je nach Autor in verschiedene Phasen eingeteilt. So spricht Landry[39] von drei Phasen – *Entzündung, Reparatur, Remodelling* – Gerstenfeld [40] geht von vier Phasen – *Initiale Verletzung, enchondrale Formation, primäre Knochenbildung, sekundäre Knochenbildung* – wohingegen Einhorn [36] am penibelste ist und von fünf akuten Phasen und einer chronischen Phase ausgeht – *Initiale Phase, Angiogenese/Knorpel-Phase, Verkalkungsphase des Knorpels, Resorptionsphase des Knorpels, Knochenbildung* und die chronische Phase des *Knochenremodellings*.

Wie auch immer man die einzelnen Prozesse einteilt, die Ereignisse, welche stattfinden, sind bei allen Autoren ident.

So kommt es initial unmittelbar posttraumatisch zu einem Frakturhämatom mit begleitender inflammatorischer Reaktion, welche mittels der von den Entzündungszellen aus dem Frakturhämatom sezernierten proinflammatorischen Zytokinen getriggert wird. Makrophagen und Osteoklasten beginnen sofort mit dem Abbau des zerstörten Gewebes, denn Heilung ist nur dann möglich, wenn alles nekrotische Gewebe entfernt worden ist. [39] Wenige Stunden nach dem Trauma beginnt sich die Struktur des an die Fraktur angrenzenden Knochenmarks zu verändern. Es entsteht eine Region niedriger und eine Region hoher Zelldichte, wobei aus letzterer innerhalb von 24 Stunden Zellen mit osteoblastärem Phänotyp hervorgehen und diese wiederum mit Knochenbildung beginnen. [36] Auch das Periost an den beiden Fraktarenden beginnt sofort zu reagieren (periostale Reaktion). Es kommt zur Aktivierung von Osteoprogenitorzellen (Vorläuferzellen die aus der MSC stammen und unter dem Endost oder dem Periost ruhen) und in Folge zu Osteoblastenproliferation mit Osteoidproduktion (intramembranöse Knochenbildung). Weiters verdickt sich das Periost und das durch das Trauma abgehobene Periost beginnt bereits wieder, sich an den kortikalen Knochen außen anzulegen. Gleichzeitig mit der Entwicklung des Knochens unter dem Periost beginnen

auch schon Blutgefäße aus den Regionen der periostalen Reaktion in den sich entwickelnden Kallus einzuwachsen. Somit ist der erste Schritte zur Kallusbildung erfolgt. Im weiteren Verlauf der ersten sieben bis zehn Tage kommt es zu einem Einwandern von mesenchymalen Stammzellen in den Frakturspalt mit anschließender Differenzierung zu Chondroblasten, wobei der Ursprung der MSC noch nicht ganz geklärt ist. Man vermutet, dass sie einerseits aus dem Markraum kommen, jedoch auch das umgebende Bindegewebe und die schon langsam einsprossenden Gefäße sollen als Reservoir dienen.[40] Somit kommt es zur Verknorpelung des Frakturspalts und der Kallus lässt sich nun in zwei Komponenten unterteilen: den harten Kallus, mit der intramembranösen Ossifikation am Periost und den weichen Kallus, in welchem die enchondrale Ossifikation durch Chondroblastendifferenzierung begonnen hat.

Nach 14 Tagen beginnt nun der weiche Kallus langsam zu verknöchern. Die Chondrozyten beginnen wie bei der Knochenentwicklung zu hypertrophieren, geben Matrixvesikel, welche gefüllt mit Kalzium sind, an das extrazelluläre Gewebe ab und regulieren so die Kalzifizierung. Weiters geben sie Phosphatasen ab, welche Phosphat in der extrazellulären Matrix für die Präzipitation mit dem Kalzium bereitstellen und Proteasen, welche die Kalzifikation inhibierenden Proteoglykane abbauen. Das Maximum der Proteasenaktivität liegt um den 14. Tag post Trauma. Sobald der knorpelige Kallusanteil kalzifiziert ist (beim Menschen nach ca vier bis fünf Wochen), kommt es zum weiteren Einwachsen von Blutgefäßen und mit ihnen kommen perivaskulär wieder Osteoprogenitorzellen, die weiter zu Osteoblasten differenzieren und für die Bildung von primärem Knochen sorgen (primäre Knochenbildung). Zeitgleich treten Chondroblasten in Aktion, um für die Osteoblasten Platz zu schaffen. Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass die intramembranöse Ossifikation unter dem Periost mit dem Zeitpunkt aufhört, an dem es zur Knorpelbildung für die enchondrale Ossifikation kommt. Bis dahin wurde jedoch schon eine nicht zu verachtende Menge an primärem Knochen am Rande des Kallus gebildet. Sobald primäre Knochenbrücken die beide Fraktarenden verbinden und der Kallus vollkommen aus primärem Knochen besteht, beginnen Osteoklasten einzuwandern. Diese sind dann dafür verantwortlich, dass es zu einem Remodelling (sekundäre Knochenbildung) des primären Knochens kommt und somit das „Endprodukt“ vollbelastbarer lamellärer Knochen entsteht. [36,37]

2.3.2. Regulatoren der Knochenheilung

Da die Knochenheilung und die Knochenentwicklung, wie schon mehrfach erwähnt, sehr vieles gemein haben, spielen auch ähnliche, teils gleiche Regulatoren eine Rolle. So könnte man es sich ersparen erneut darauf einzugehen, allerdings ist es für das Verständnis besser, auf die regulierenden Faktoren der Knochenheilung noch einmal explizit einzugehen.

So kann man zwei große Ebenen unterscheiden:

1. *die mechanische Ebene*
2. *die molekulare Ebene*

Ein bedeutender Trigger für die Knochenheilung sind mechanische Einflüsse, sprich Mikrobewegungen die auf die Fraktur und die Kallus- beziehungsweise Knochenbildung einwirken. Selbst für den nicht verletzten Knochen ist mechanische Belastung von großer Bedeutung, da er sonst an Stabilität verliert. Experimentelle und klinische Studien in den 1980er Jahren [41,42] zeigten, dass schon kurze Perioden von mechanischer Stimulation einen signifikanten Einfluss auf die Frakturheilung haben. Goodship et al.[43] zeigten, dass zyklische Mikrobewegungen die Bildung von Kallus, und somit auch die Heilung des Knochens, beschleunigen können. Anhand eines Schafmodells mit frakturierter Tibia zeigte er, dass eine zyklische Belastung von 40mm/sek (über 1mm mit 0,5Hz mit 200N für 500 Zyklen täglich) eine Woche postoperativ, eine besserer Konsolidierung, höhere Knochendichte und größere postmortale Steifigkeit aufwies als die Vergleichsgruppen aus dem Projekt mit 2mm/sek und 400mm/sek. Weiters konnte er einen signifikanten Unterschied zwischen einer Gruppe mit der Belastung eine Woche postoperativ und eine Gruppe sechs Wochen postoperativ zeigen. Jedoch kann eine zu große Bewegungsbelastung oder auch eine zu hohe Kraft die Heilung verzögern, oder gar soweit stören, dass es zu einer hypertrophen Non-Union kommt.[44] Es konnte jedoch bis jetzt noch kein idealer Zeitpunkt für mechanische Stimulation festgelegt werden.[42] Aus diesen Erkenntnissen heraus wird heutzutage in der Unfallchirurgie und Orthopädie eine frühfunktionelle Teilbelastung als heilungsförderlich angesehen, und hat somit auch Einzug in den klinischen Alltag gehalten.

Als zweites stellt die *molekulare Ebene* eine wichtige Steuereinheit dar, wobei diese von Tsiridis et al.[45], auch von anderen Autoren sehr ähnlich[38,40], in drei Hauptgruppen eingeteilt wird:

- 1.) *proinflammatorische Zytokine*
- 2.) *Wachstums- und Differenzierungsfaktoren*
- 3.) *Metalloproteinasen (MMPs) und Angiogenesefaktoren*

Die Gruppe der *proinflammatorischen Zytokine* ist nicht, wie es der Name es vermuten ließe, nur in der initialen Entzündungsphase von entscheidender Bedeutung, wo sie quasi als Starter für die Entzündungskaskade dienen [45], sondern auch im Zuge des Remodelling des Knochens in den Resorptionsphasen. Resorptionsphasen finden wir, wie im Rahmen der Knochenheilung bereits erwähnt, zwei: Die erste tritt im Rahmen der enchondralen Ossifikation auf, wenn der kalzifizierte Knorpel für den primären Knochen Platz machen muss. In dieser Phase sind M-CSF, RANKL und OPG erhöht, jedoch klassische Entzündungsmediatoren wie IL-1 α , IL-1 β und IL-6 kaum. Diese drei findet man direkt posttraumatisch in der anfänglichen Entzündungsphase erhöht. Ein weiterer klassischer inflammatorischer Faktor, das TNF- α , beginnt am Ende dieser ersten resorptiven Phase zu steigen, ist allerdings, wie von Zhou et al. [46] bewiesen, einer der wichtigsten initialen Faktoren bei Wachstumsfugenverletzungen. TNF- α führt nicht nur zu vermehrter Knochenresorption über Osteoklastenstimulation und zur Rekrutierung von MSC, sondern potenziert auch die inflammatorische Wirkung des IL-1.[17,45] Die zweite Resorptionsphase findet man im Rahmen der sekundären Knochenbildung und zeigt ein umgedrehtes Bild der regulierenden Faktoren im Vergleich zur ersten resorptiven Phase. Hier sind IL-1 α , IL-1 β und IL-6 hochreguliert, M-CSF, RANKL und OPG jedoch herunter reguliert. Dabei wird ersichtlich, dass verschiedene Prozesse zur enchondralen Ossifikation und zur sekundären Knochenbildung führen.[38,40]

Die zur Gruppe der *Wachstums- und Differenzierungsfaktoren* zählenden Faktoren greifen als Steuerelemente in eine Vielzahl von Prozessen in der Knochenentwicklung und Knochenheilung ein, wobei sicherlich noch nicht alle Vorgänge bekannt sind. Man unterteilt sie in folgende vier Untergruppen:

- *TGF- β Superfamilie (transforming growth factor- β Superfamilie)*

- *PDGF (platelet-derived growth factor)*
- *FGFs (fibroblast growth factors)*
- *IGFs (insulin-like growth factors)*

Die TGF- β Superfamilie wird wiederum in TGF- β 's selbst, GDF's (growth and differentiation factors) und in die BMPs (bone morphogenetic proteins) unterteilt. Von TGF- β existieren fünf Isoformen, welche durch Thrombozyten, Osteoblasten und Chondrozyten gebildet werden. Zu den Aufgaben der Isoformen zählen unter anderem die Initialisierung der Kallusbildung, Stimulierungs- und Differenzierungsförderung von MSCs, sowie die fördernde Wirkung auf die Sekretion von Extrazellulär-Proteinen. Als Hauptaufgabe wird jedoch ihre Rolle während der Chondrogenese und der enchondralen Knochenbildung angesehen.[47] Es wird auch den verschiedenen Isoformen unterschiedliche Bedeutsamkeit während der Knochenheilung nachgesagt. So scheinen TGF- β 2 und TGF- β 3 viel wichtiger zu sein als TGF- β 1, welchem schon ein hohes basales Level in unebrochenen diaphysären Knochen, und kein Anstieg bei Frakturen, nachgewiesen werden konnte.

GDF stellt eine Gruppe von weniger gut untersuchten Faktoren, mit einer Vielzahl von Isoformen, dar. Bekannt ist, dass GDF8 am ersten post-traumatischen Tag als „early response“ hochreguliert ist. GDF5 gilt einerseits als Trigger für die Kollagen-II-Bildung während der Knorpelbildungsphase von Frakturen[48], andererseits gilt er aber auch als Initiator der Angiogenese und der damit beginnenden Degradierung von Matrixproteinen.[45] Auch die weiteren Formen wie GDF1 und GDF10 werden mit der intramembranösen und der enchondralen Knochenentwicklung assoziiert, deren Aufgaben wurden jedoch noch nicht genauer beschrieben.[40]

Von den BMPs, der letzten Gruppe aus der TGF- β -Superfamilie, existieren ebenfalls etlichen Isoformen, welche allesamt von Osteoprogenitorzellen, MSCs, Osteoblasten und Chondrozyten gebildet werden. Anhand der Amino-Azid-Gruppe der BMP-Moleküle, kann man sie in vier Subklassen unterteilen, welche jedoch hier nicht von großer Relevanz sind. BMPs setzen eine ganze Kaskade von Einzelaktionen, wie Chemotaxie, MSC Proliferation und Differenzierung, Osteoprogenitorzellproliferation und Differenzierung, Angiogenese und kontrollierte Synthese von Extrazellulärmatrix, in Gang, welche für die Chondro- und Osteogenese von entscheidender Bedeutung sind. So kontrollieren BMP-2, -4 und -6 speziell die Proliferationsrate und Differenzierung der Chondrozyten und sie stimulieren ebenfalls die Synthese von Kollagen. BMP-2 ist zusätzlich mit BMP-7 in die Osteoblastendifferenzierung aus MSCs eingebunden und beide stimulieren ebenfalls die

Mineralisation der Knochen Matrix.[40,45,49,50] Diese Erkenntnisse haben auch schon in den experimentell-klinischen Alltag Einzug gehalten und werden bei Frakturheilungskomplikationen, wie zum Beispiel Non-Union, bereits als osteoinduktive Therapie erprobt.[51-54] Allerdings sollen sie auch in die Synthese und die Sekretion von anderen Wachstumsfaktoren wie IGF (insulin-like growth factor) und VEGF (vascular-endothelial growth factor) eingreifen. Die Wirkungen der BMPs werden über Bindung an zwei verschiedene Typen von Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren getriggert, welche wiederum die sogenannte „SMAD interzelluläre Signal-Kaskade“ in Gang setzen und so die Transkription im Zellkern regulieren .[45] Cheng et al. ordneten die BMPs hierarchisch nach ihrer Heilungspotenz. So sprachen sie BMP-2, BMP-6 und BMP-9 die größte heilungsfördernde Wirkung zu.[49]

Die nächste Untergruppe stellt der PDGF dar, welche von Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Osteoblasten sezerniert wird, und über die Bindung an einen Rezeptor mit Tyrosin Kinase Aktivität wirkt. Seine Affinität zum Rezeptor kann jedoch über IL-1, TNF- α und TGF- β 1 verändert werden. Sein Aufgabenfeld liegt insbesondere in der Frühphase der Heilung, nämlich in der chemotaktischen Stimulierung von Entzündungszellen, und darüber hinaus ist er einer der wichtigsten Stimuli für die Migration und Proliferation von MSCs und Osteoblasten.[45]

FGFs bilden eine weitere Untergruppe. Diese Familie von Faktoren umfasst 23 Mitglieder und wirkt ebenfalls über die Bindung an Tyrosin-Kinase-Rezeptoren. Ihre Synthese wird während eines Knochenheilungsprozesses von Monozyten, Makrophagen, Osteoblasten, Chondrozyten und Mesenchymzellen übernommen, und dienen hier hauptsächlich der Proliferation von Chondrozyten und Osteoblasten. Allerdings dienen sie einerseits auch den Fibroblasten und Myozyten als Proliferations- und Differenzierungsfaktoren bei der Wundheilung, andererseits stimulieren sie auch die Angiogenese. Ihre Präsenz während Frakturheilungsprozessen konnte speziell in der Frühphase nachgewiesen werden.[45]

Die letzte große Untergruppe stellen die IGFs dar. Von diesen Faktoren sind uns zwei bekannt: IGF-I, welches auch als somatomedinC bekannt ist, und IGF-II, welches auch als skeletal growth factor bezeichnet wird. Gebildet werden diese zwei Faktoren von Endothelzellen, Osteoblasten und Chondrozyten. Ihre Wirkung entfalten sie durch Bindung an die IGFBPs (IGF-binding proteins), wobei IGF-I potenter ist und bei der Knochenmatrixbildung beteiligt ist, und IGF-II in der Spätphase der enchondralen

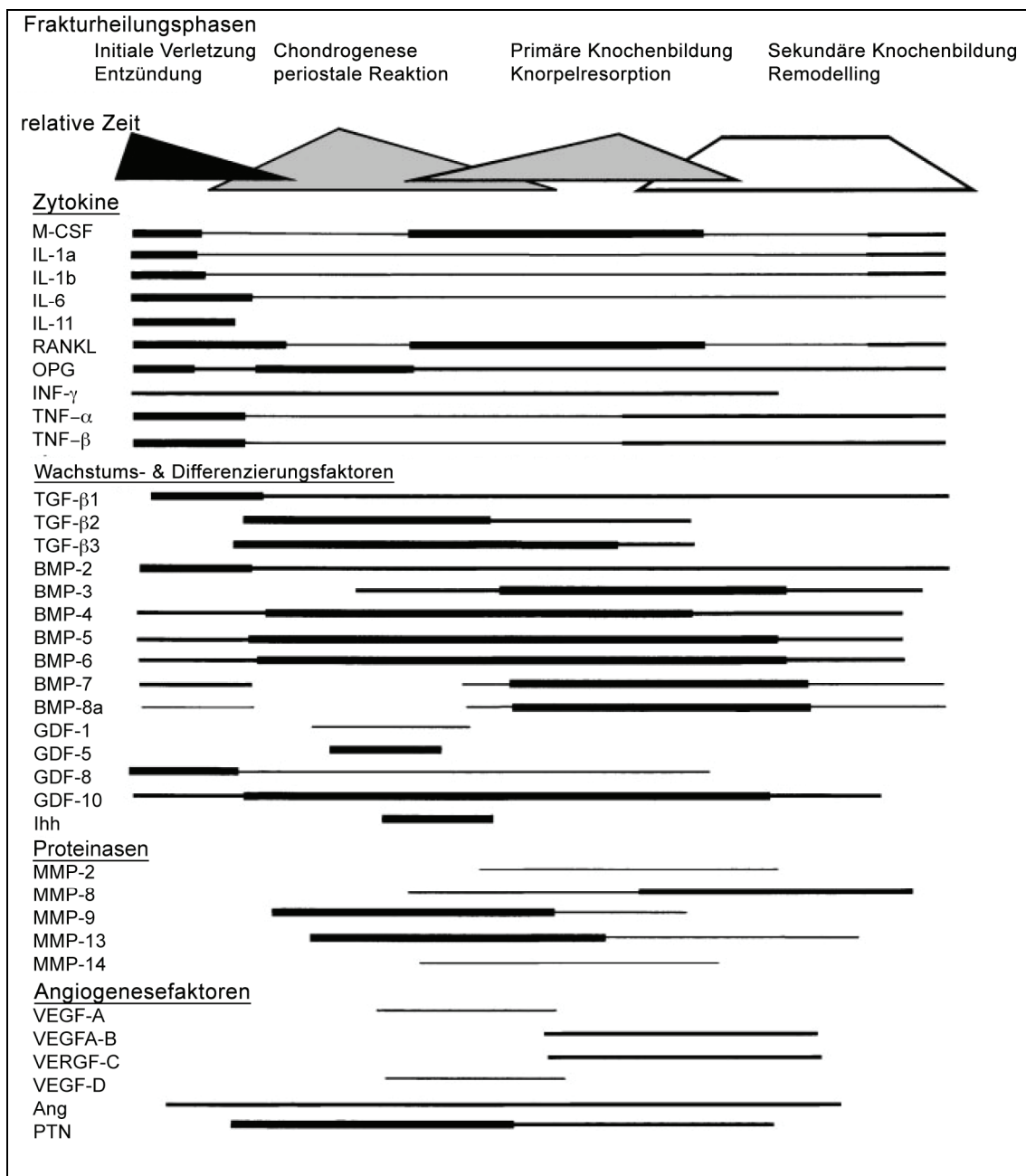
Knochenbildung bei der Bildung von Knorpelmatrix mitwirkt. Jedoch sind hier viele Fragen noch nicht eindeutig geklärt und müssen erst erforscht werden.[45]

MMPs (Metalloproteinasen) und *Angiogenesefaktoren* sind die dritte und letzte Hauptgruppe der molekularen Ebene. Eine optimale Versorgung mit Blut stellt eine der Grundvoraussetzungen für eine rasche und hochwertige Frakturheilung dar. Aus diesem Grund muss durch Bildung neuer Blutgefäße ein guter Blutfluss in der Frakturzone gewährleistet sein. Hierzu werden am Ende der enchondralen Knochenbildung und der Remodellingphase mit Hilfe der MMPs Knorpel und Knochen abgebaut, um Blutgefäßen Platz zum Einwachsen zu schaffen.[45] Man darf auch nicht außer Acht lassen, dass die eigentliche Verknöcherung erst durch das Einwachsen der Blutgefäße und den damit immigrierenden MSCs zustande kommt. Dieser Vorgang wird über bis jetzt zwei bekannte Wege gesteuert: der vascular-endothelial growth factor (VEGF)-abhängige Pfad mit seinen VEGF Rezeptoren 1 und 2; und der Angiopoietin-abhängige Pfad mit seinen Tie-Rezeptoren. Der erste Pfad scheint vor allem bei der Neo-Angiogenese eine wichtige Rolle zu spielen, wohingegen der Zweite durch Blockierung der Apoptose von Endothelzellen sowie deren Stabilisierung und Proliferation für die Bildung größerer Gefäße verantwortlich gemacht wird.[38,45] Die VEGF Familie hat fünf Hauptgruppen (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E) mit zumeist mehreren Mitgliedern, wobei in der Forschung hauptsächlich VEGF-A untersucht ist, und somit nur seine Wirkung ausreichend bekannt ist. Aus diesem Grund wird meist nur von VEGF gesprochen, obwohl es jedoch genauer VEGF-A heißen müsste.[55] Über die Regulierung von VEGF ist man sich noch nicht im Klaren. Man weiß jedoch, dass zahlreiche Zytokine, wie IL-1 und IL-6, und Wachstumsfaktoren, wie IGF-1 und TGF- β , eindeutig in den Regelkreis involviert sind, allerdings wird HIF-1 α (hypoxic inducible factor 1 α) als einer der Schlüsselregulatoren angesehen. [56] HIF-1 α , welches unter hypoxischen Zuständen von Endothelzellen produziert wird, reguliert die Synthese für VEGF, aber auch für BMP-2, hoch.[57] Zelzer et al.[56] zeigten einen weiteren entscheidenden Faktor für die VEGF Regulierung auf, nämlich Runx2/Cbfa1, welches sowohl von Chondrozyten, als auch von Osteoblasten synthetisiert wird. Laut neuesten Erkenntnissen findet man VEGF, zusammen mit BMPs, in Matrixvesikeln, welche bekanntlich die Mineralisierung der Knorpelmatrix bei enchondralen Wachstums- und Heilungsprozessen veranlassen. [58]

Ein weiterer wichtiger Faktor, der aber nicht in die drei oben angeführten Hauptgruppen eingeteilt werden kann, ist Ihh (Indian hedgehog), welcher bereits im Zuge der Knochenentwicklung angesprochen wurde, und auf seine dortige Aufgaben in der Chondrozytendifferenzierung hingewiesen wurde. Untersuchungen während der Knochenheilung ergaben, dass er im Zuge der Knochenheilung die gleichen Aufgaben (über Synthese von PTHrP die Hemmung der terminalen Chondrozytendifferenzierung) erfüllt. Weiters konnte man sehen, dass TGF- β die Synthese von Ihh stimuliert. [59]

Ebenfalls wichtig zu erwähnen, insbesondere im Rahmen dieses Projekts, ist der hypoxia inducible factor 1α (HIF- 1α), welcher schon im Zusammenhang mit VEGF kurz angesprochen wurde. Dieser Faktor, welcher im Rahmen einer hypoxischen Mikroumgebung ausgeschüttet wird, soll über die Aktivierung von Sox9 zur Chondrogenese beitragen. Emans et al. [30] stellten fest, dass HIF1- α vor allem in der chondrogenen Phase der periostalen Kallusbildung ausgeschüttet wird, was den Schluss zulässt, dass dies periostale Reaktion zumindest zeitweilig unter hypoxischen Bedingungen stattfindet.

Abbildung J: Expression der wichtigsten regulatorischen Faktoren
 modifiziert nach Gerstenfeld et al. 2003[40]



2.3.3. Reparaturvorgänge von Epiphysenfugenläsionen

Im Gegensatz zu einem „einfachen“ Knochenbruch, bei dem über den Heilungsprozess die Struktur des Knochens beinahe zu 100% wieder hergestellt wird, ist dies bei Läsionen der Wachstumsfuge nicht ganz so einfach. Das Heilungspotential des knorpeligen Gewebes in der Wachstumsfuge ist nur begrenzt und so kommt es häufig zu

Knochenbrückenbildungen, welche bei genügendem Ausmaß pathologische Formen annehmen können und somit in Wachstumsstörungen resultieren.

Xian et al.[60] beschrieben den Ablauf der Knochenbrückenbildung bei Epiphysenfugenläsionen als ein Geschehen in vier Phasen (siehe Abbildung K):

- 1.) *Phase der entzündlichen Antwort*
- 2.) *Phase der bindegewebigen Antwort*
- 3.) *Phase der osteogenetischen Antwort*
- 4.) *Phase des Knochenbrückenremodellings*

Weiters zeigten sie auf, dass jene Knochenbrücken von epiphysär nach metaphysär einwachsen und sich die Osteoblasten direkt aus den MSCs entwickeln, und somit eine intramembranöse Knochenbildung stattfindet. Über die Herkunft der MSCs ist man sich noch nicht völlig im Klaren. So sprechen Xian et al. [60] von MSCs welche aus dem Knochenmark kommen, wohingegen andere Autoren von MSCs aus dem umgebenden Gewebe sprechen.[61] Die Knochenbrücken können dann im weiteren Verlauf remodelt beziehungsweise aufgrund des weiteren Wachstums wieder gesprengt werden oder zu den schon angeführten hemmenden Wachstumsstörungen führen. Es ist jedoch noch nicht klar, wann und warum es zu dieser Knochenbrückenbildung kommt. Allerdings weiß man, dass auch die molekularen Mechanismen, die bei jeder normalen Knochenheilung mitspielen, involviert sind.

So sind in der anfänglichen *Phase der entzündlichen Antwort* (Tag eins bis drei) die Regulatoren BMP-3, -4, TNF- α , IL-1 β , IGF-I und TGF- β hochreguliert. Die BMPs werden für die Chemotaxie von Entzündungszellen verantwortlich gemacht, die dann die soeben erwähnten Entzündungsmediatoren weiter synthetisieren. Wie wir bereits wissen, sind BMPs die wichtigsten osteogenetischen Faktoren. BMP-4 führt überdies noch zu einer erhöhten Synthese von VEGF, wodurch dann das Einsprossen von Gefäßen veranlasst wird. MSCs wandern in der Folge mit den Gefäßen mit ein, wobei auch eine direkte Stimulierung der MSCs durch BMP-4 diskutiert wird. [46,62]

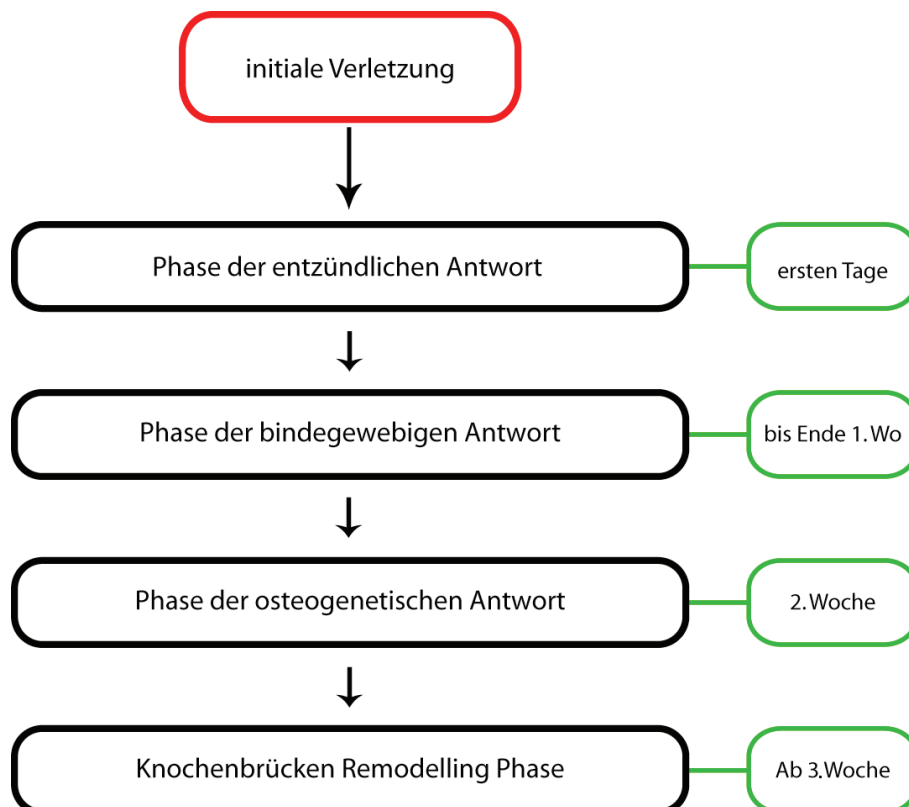
In der anschließenden *bindegewebigen Phase* (Tag drei bis sieben) kommt es zur Infiltration und Proliferation von bindegewebigen MSCs, die mit einer gleichzeitigen Erhöhung von FGF-2 und PDGF-B, welche bei der normalen Knochenheilung die Differenzierung der MSCs zu Osteoblasten fördern, einhergeht. Bei der

Wachstumsfugenheilung scheinen die beiden für MSCs chemotaktisch, sowie für deren Differenzierung in Osteoprogenitorzellen, sehr wichtig zu sein.[46,62]

Ab dem 7. Tag beginnt dann langsam die Knochenzellendifferenzierung (*Phase der osteogenetischen Antwort*), wobei man BMP-2, -3, -4 und -7 in erhöhten Werten vorfand, womit wieder ihre Aufgabe bei der Knochenentstehung untermauert wird. Allerdings scheint BMP-7 auch beim späteren Knochenremodelling eine wichtige Rolle zu spielen, indem es die Osteoklastendifferenzierung und -proliferation fördert. [63] Die Trabekel nehmen im weiteren Verlauf an Zahl und Größe zu. Bei der endgültigen Knochenbrückenbildung sind dann hochregulierte Werte für IGF-I gefunden worden, womit dies eines der wichtigsten Regulatormoleküle zu sein scheint.

In der letzten Phase der *Phase des Knochenbrückenremodellings* fand man dann TGF- β 1 hochreguliert, welches die Osteoblastenbildung und Matrixsynthese fördert. TNF- α hat in dieser Phase seinen zweiten Peak nachdem es schon einen in der Entzündungsphase hatte. [46]

Abbildung K: Phasen der Heilung bei Epiphysenfugenläsionen



2.4. Quantitative Real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Die qRT-PCR, oder auf Deutsch die „quantitative Echtzeit Polymerase Ketten Reaktion“, stellt eine Weiterentwicklung der herkömmlichen Polymerase Ketten Reaktion (PCR) dar, mit welcher eine gleichzeitige Durchführung von Amplifikation und Quantifizierung von Nukleinsäuren möglich ist. Heutzutage werden automatisierte Thermocycler verwendet, wohingegen man früher händisch die nötigen Zusätze zugeben musste und dann die Proben manuell in drei verschiedenen temperierte Wasserbehälter geben musste.

Das Prinzip der Amplifikation bei der qRT-PCR entspricht einer herkömmlichen PCR, welche in Zyklen abläuft, wobei jeder Zyklus aus drei gleichen Schritten aufgebaut ist:

1. Denaturierung der DNS
2. Primerhybridisierung
3. Polymerisation

Anfänglich wird eine geringe Menge der zu vervielfältigenden DNS (Desoxyribonukleinsäure) oder RNS (Ribonukleinsäure) (hier muss diese jedoch erst mit Hilfe von reversen Transkriptasen in DNS umgewandelt werden (RT-PCR)) bei 92-98°C für 5-10 Minuten denaturiert, sprich gespalten, sodass zwei Einzelstränge vorliegen. Danach kommt es im zweiten Schritt zu Anlagerung von zwei Primern, welche für jedes gewünschte Genprodukt spezifisch sind und idealerweise gewisse Grundeigenschaften haben sollten (siehe Tabelle A). Das Anlagern funktioniert dann bei einer für den Primer spezifischen Temperatur, wozu die Reagenz abgekühlt werden muss, da die erforderlichen Temperaturen unter 92-98° Celsius liegen. Die Primer an sich stellen die Ausgangspunkte für den erwünschten neusynthetisierten kompatiblen DNS-Strang dar. Nach der erfolgreichen Anlagerung des Primers wird die Temperatur der Reagenz wieder auf 72°C erhöht, welches die optimale Arbeitstemperatur der zuvor beigegebenen Taq-DNS-Polymerase darstellt und es entsteht wieder eine doppelsträngige DNS, womit der erste Zyklus abgeschlossen ist. Als Substrat für die Taq-DNS-Polymerase müssen auch Monophosphatnukleotide hinzugegeben werden, damit die Polymerase die nötigen Bausteine zum Anlagern hat. Idealerweise bleiben nur die neu entstandenen Abschnitte über, was auf Grund ihrer Kürze die Dauer der Denaturierung verkürzt. Im Normalfall sind 30 bis 35 Zyklen nötig, um genügend Material für einen Nachweis zu haben. Im ersten Zyklus werden noch zu lange Sequenzen hergestellt, aber bereits ab dem zweiten Zyklus

hat man den gewünschten Abschnitt produziert. Die gewünschten kurzen Abschnitte synthetisieren sich im weiteren Verlauf exponentiell, wohingegen sich die zu langen Stücke nur linear vermehren.[64] Rechnerisch kann man die Anzahl der Produkte die man so erhält mit folgenden Gleichungen berechnen:

$$N = N_0 \cdot 2^n$$

Wobei N die Anzahl der amplifizierten Moleküle darstellt, N_0 die Ausgangszahl und n die Anzahl der Zyklen. Dies gilt allerdings nur für den idealisierten Fall, dass sich die Anzahl der amplifizierten Moleküle pro Zyklus verdoppelt.

Daher geht man in der Praxis von folgender Gleichung aus:

$$N = N_0 \cdot (1+E)^n \quad E \in [0,1]$$

Der Korrekturfaktor E, welcher immer einen Wert zwischen 0 und 1 besitzt, ist die Effizienz mit der die Reaktion abläuft. Man muss bedenken, dass im Laufe der Zyklen es zu nicht beabsichtigten Hybridisierungen kommt, die Enzyme und Nukleotide langsam verbraucht werden und dass sie durch die Hitze auch zerstört werden. Unter optimalen Bedingungen kommt man so auf Effizienzwerte zwischen 0,8 und 0,9.

Tabelle A: Anforderungen an einen optimalen Primer [64]

1.) Mindestlänge von 17 Nukleotiden (Optimum: 17-28nt)
2.) ausgeglichener Gehalt an Guanin/Cytosin und Adenosin/Thymin-Paarungen
3.) Schmelzpunkt zwischen 55 und 80°C
4.) möglichst gleicher Schmelzpunkt für beide Primer
5.) keine Haarnadelstruktur
6.) keine Dimer-Bildung mit sich selbst und dem zweiten Primer
7.) keine Guanin/Cytosin-Nukleotide am 3`-Ende
8.) kaum ungewöhnliche Basenabschnitte wie Poly-A oder lange Guanin/Cytosin-Abschnitte

Die Quantifizierung der Probe geschieht während der Amplifikation (daher die Zusatzbezeichnung „Real-time“) und wird über eine Fluoreszenz-Methode bewerkstelligt, bei der mittels Intensität der gemessenen Fluoreszenz auf die Quantität der Probe rückgeschlossen werden kann. Erschwert wird das ganze durch die Tatsache, dass es sich bei der PCR, wie bereits erläutert, um ein exponentielles Geschehen handelt, wo kleinste Störungen schon zu drastischen Änderungen der Produktmenge führen. Da die exponentielle Funktion gegen Ende der Amplifikation in einer immer flacheren Kurve bis hin zu einem Plateau verläuft verändern sich damit auch die E-Werte der vorherigen Berechnungen, was die Schwierigkeit von genauen Quantifizierungen verdeutlicht.

Als Fluoreszenz-Methode kann man Fluoreszenzfarbstoffe verwenden, FRET (fluoreszenz resonance energy transfer)-Sonden oder Weiterentwicklung zu vor genannter Sonden wie Light-Cycler® Sonden.[64,65]

Prinzipiell kann man bei den Quantifizierungsmethoden eine „absolute Quantifizierung“ von einer „relativen Quantifizierung“ unterscheiden. Bei ersteren wird anhand von gegebenen Kalibrierungskurven, welche auf Verdünnungsreihen basieren, eine Quantifizierung durchgeführt, was aber zu fragwürdigen Ergebnissen führt und daher nicht sehr oft angewandt wird. Bei der viel häufiger verwendeten relativen Quantifizierung bezieht man sich bei den Berechnungen auf ein sogenanntes „Housekeeping Gen“ (HKG) oder einen HKG-Index, der sich aus mehreren HKGs zusammensetzt. Dabei werden nicht die absoluten Startkopienanzahl oder -konzentrationen bestimmt, sondern die Expression des zu untersuchenden Gens wird auf ein zweites, ubiquitär und homogen exprimiertes Gen bezogen. Dies wird auch als Normalisierung des Expressionsergebnisses bezeichnet. Die häufigsten HKG stellen jene für Ubiquitin, ribosomale Untereinheiten, Histon Untereinheiten, GAPDH (Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase), und β -Aktin dar. Golden Standard bei den Mengenangaben ist heutzutage nicht mehr die DNS-Produktmenge oder eine Produktkonzentration, sondern die Quantifizierung wird mittels sogenannter Ct (= Cycle threshold)- oder CP (= Crossing Point)-Werte angegeben. Beide Werte geben an, wieviele PCR-Zyklen notwendig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erhalten. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) kann über die sog. $\Delta\Delta$ CP-Methode (delta-delta-CP-Methode) oder über genauere Effizienz korrigierte Modelle erfolgen. Dabei wird im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der CP-Wert des Referenzgens vom CP-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert (Δ CP = CP Zielgen – CP Referenzgen). Nach dieser Normierung wird vom Δ CP-Wert der experimentell behandelten Proben der Δ CP-Wert einer Kontrolle abgezogen (Δ CP); man kommt zum sog. „delta-delta-CT“-Berechnungsmodell. Der relative

Expressionsunterschied zwischen einem Experimentalwert und einem Kontrollwert (Ratio), normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, ergibt sich aus der arithmetischen Formel „ $2^{-\Delta\Delta CP}$ “.[65]

$$\begin{aligned}\Delta CP &= CP_{\text{Zielgen}} - CP_{\text{Referenzgen}} \\ \Delta\Delta CP &= \Delta CP_{\text{Behandlung}} - \Delta CP_{\text{Kontrolle}} \\ \text{Ratio} &= 2^{-\Delta\Delta CP}\end{aligned}$$

Damit die qRT-PCR als Aussagemedium über Konzentrationsunterschiede aus mehreren Proben dienen kann, werden mittels Berechnungssoftware (REST = Relative Expression Software Tool) die Expressionsunterschiede aufgearbeitet und statistisch ausgewertet.[65]

2.5. Magnetresonanztomographie (MRT)

Die Magnetresonanztomographie, oder auch Kernspintomographie genannt, gehört zu den röntgenstrahlenfreien bildgebenden Verfahren in der Radiologie. Den physikalischen Grundstein dieser Untersuchungsmethode stellt der Kernspin dar, welche den Gesamtdrehimpuls eines Atomkerns wiedergibt. Der Gesamtdrehimpuls ergibt sich aus dem Eigendrehimpuls von Protonen und Neutronen, und führt zu magnetischen Eigenschaften eines Atomkerns. Durch das Anlegen zweier normalaufeinander stehender Magnetfelder werden die Atomkerne in eine Art Kreiselbewegung (Präzessionsbewegung) gebracht, wodurch eine Resonanzfrequenz des Atomkerns entsteht. Beim Ausschalten eines Magnetfeldes gehen die Atomkerne wieder in ihre Ausgangslage zurück und geben dabei spezifische Radiofrequenzwellen ab, welche dann eingefangen werden und über ein Computersystem in Bilddaten umgewandelt werden können.

Man kann so T1-gewichtete (Längsrelaxation) Bilder erhalten, bei welchen Fett und fetthaltige Strukturen hyperintens (heller) dargestellt werden, was sich vor allem für die anatomischen Darstellung von Organstrukturen gut eignet. Bei T2-gewichteten Bildern erscheinen stationäre Flüssigkeiten hyperintens, was vor allem für die Darstellung von Ödemen und Ergussformationen von Vorteil ist. Um noch höhere Kontraste bei den Abbildungen zu erreichen, kann man Kontrastmittel injizieren, mit deren Hilfe auch dynamische Aussagen möglich werden (dynamic contrast enhanced MRI = DCE-MRI = DCE-MRT). Hierbei wird mit Hilfe eines Gadolinium-haltigen Kontrastmittels eine Zeit-Intensitäts-Kurve erstellt, mit welcher man Aussagen über die Kontrastmittelintensität zu

einem bestimmten Zeitpunkt, in einem zuvor bestimmten Ausschnitt (region of interest = ROI), treffen kann. Aus diesen Kurven kann man dann Informationen über das Anfluten (up slope), Zeit und Intensität für den maximal Wert (peak), sowie das Auswaschen des Kontrastmittels (down slope) erhalten. Anschließend müssen all diese Werte noch quantifiziert werden, wobei man auf Intensität, Steilheit des Anstiegs zum Maximum und die Zeit für An- und Abfluten des Kontrastmittels achtet, und so eine Kontrastmittel-Aufnahme-Kurve erhält. [66] Aus den Daten der DCE-MRT kann man auch noch einen Transferkoeffizient (K^{trans}) errechnen, welcher als Maß für die endotheliale Permeabilität dient. Da dieser Faktor allerdings neben der Permeabilität auch von der Gefäßoberfläche und dem Blutfluss abhängt, kann er auch als indirekter Messwert für die physiologische Durchblutung dienen. [67]

Diese sehr vereinfachte Darstellung soll nur einen kurzen Einblick schaffen, denn eine ausführliche Erklärung ist hier nicht von Relevanz, und würde auch den Rahmen dieser Dissertation bei weitem sprengen.

3. Material und Methode

3.1. Material

3.1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 75 männliche Sprague Dawley Ratten verwendet, welche vom Institut für Labortierkunde (Himberg, Österreich) im Alter von fünf Wochen (100-120g Körpergewicht) bezogen wurden. Die Fütterung erfolgt ad libitum mit Pellets der Firma (Sniff®). Als Flüssigkeit erhielten die Tiere reines herkömmliches Trinkwasser. Nach der Anlieferung hatten die Ratten eine Ruhephase von 1 Woche in den Tierställen des Institut für biomedizinische Forschung (IBF) an der Medizinischen Universität Graz (MUG), Hahnhof 48, 8036 Graz, bevor sie im Operationsraum des IBF behandelt wurden. Die Tiere wurden per Zufall in 8 Gruppen aufgeteilt (siehe Tabelle B).

Tabelle B: Gruppeneinteilung der Versuchstiere

Gruppe	Anzahl der Ratten	Prozedere	Lebensdauer
Gruppe 1 *	10	qRT-PCR	0 d
Gruppe 2	10	qRT-PCR	1 d
Gruppe 3	10	qRT-PCR	3 d
Gruppe 4	10	qRT-PCR	7 d
Gruppe 5	10	qRT-PCR	14 d
Gruppe 6	10	qRT-PCR	28 d
Gruppe 7	10	qRT-PCR	84 d
Gruppe MRT	5	MRT	84 d

*Kontrollgruppe ohne Läsion

3.1.2. Medikamente

Alle verwendeten Medikamente sind in der unten angeführten Tabelle C ersichtlich.

Tabelle C: Medikamentenliste

Wirkstoff	Handelsname	Hersteller
Fentanyl	Fentanyl®	Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
Midazolam	Midazolam Delta®	Deltaselect GmbH, Dreieich, Deutschland
Medetomedin	Domitor®	Pfizer Corp. Austria GmbH, Wien
Naloxon	Narcanti®	Torrex Chiesi Pharma GmbH, Wien
Flumazenil	Anexate®	Roche Austria GmbH, Wien
Atipamazol	Antisedan®	Pfizer Corp. Austria GmbH, Wien
NaCl 0.9%	NaCl-Fresenius®	Fresenius Kabi Austria GmbH, Graz
Caprofen	Rimadyl®	Pfizer Corp. Austria GmbH, Wien
Metamizol	Novalgine Tropfen®	Sanofi-Aventis GmbH, Wien
Polyvidon-Jod	Betaisodona® Lösung	Mundipharma Ges.m.b.H, Wien
Thiopental-Natrium	Thiopental Sandoz®	Sandoz GmbH, Kundl, Österreich
Isofluran	Furane®	Abbot Laboratories Ltd., Kent, England

3.1.3. Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

Zur Auswertung der Daten wurde das qRT-PCR Gerät „ABI 7900 Sequence Detection System®“ der Firma Applied Biosystems verwendet (siehe Abbildung L).

Abbildung L: ABI 7900 Sequence Detection System®



Die verwendeten Primer sind sogenannte „Assays on Demand“ der Firma Applied Biosystems (TaqMan® Gene Expression Assays) (siehe

Tabelle D: Verwendete Primer der qRT-PCR

Gen Name	Assay ID
Beta-Actin	Rn00667869_m1
GAPDH	Rn99999916_s1
Bmp2	Rn00567818_m1
CD31	Rn01467262_m1
Hif1a	Rn00577560_m1
VEGFR1	Rn00570815_m1
VEGFR2	Rn00564986_m1
VEGF	Rn00582935_m1

3.1.4. Magnetresonanz-Tomograph (MRT) [68]

Die magnetresonanztomographische Untersuchungen wurden mit dem 3-Tesla-MRT MAGNETOM Trio® der Firma Siemens durchgeführt, welches im klinischen Einsatz auf der Universitätsklinik für Radiologie der MUG steht. Zusätzlich wurde, um eine bessere Auflösung zu erzielen, eine eigens dafür gebaute 18mm Oberflächen-Spule verwendet. Als Kontrastmittel wurde Gadovist® (Schering AG) verwendet, ein Kontrastmittel vom Typ Gd-DTPA (Gadolinium-diethylen-triamine penta-acetic acid).

Abbildung M: Siemens Magnetom Trio
(Bild von www.medical.siemens.com)



3.1.5. Laborbedarf und Infrastruktur

Die für die Durchführung meiner Dissertation notwendige weitere Infrastruktur samt aller Apparaturen (Tier-OP, Tierhaltung, Inkubatoren, Kühl- bzw. Gefrierschränke) sind Bestandteile des IBF der MUG, sowie Infrastruktur des Zentrum für medizinische Forschung (ZMF) der MUG.

3.2. Methode

3.2.1. Operative Versorgung der Ratte bei der Fugenläsion

3.2.1.1. Narkose

Die Narkose wurde mittels Isofluran-Inhalation mit Furane 2%® (Abbot Laboratories Ltd., Kent, England) bei einem Sauerstoff Flow von 2l/min in einer speziellen Plexiglasbox eingeleitet. Danach wurde mittels subkutaner Injektion von 0.1ml/100g KG FDD-Narkoselösung (siehe Tabelle E) die Narkose fortgeführt, welche sich so rasch antagonisieren ließ, was wiederum eine äußerst schonende Behandlung der Versuchstiere ermöglichte.

Tabelle E: Herstellung der FDD-Narkoselösung

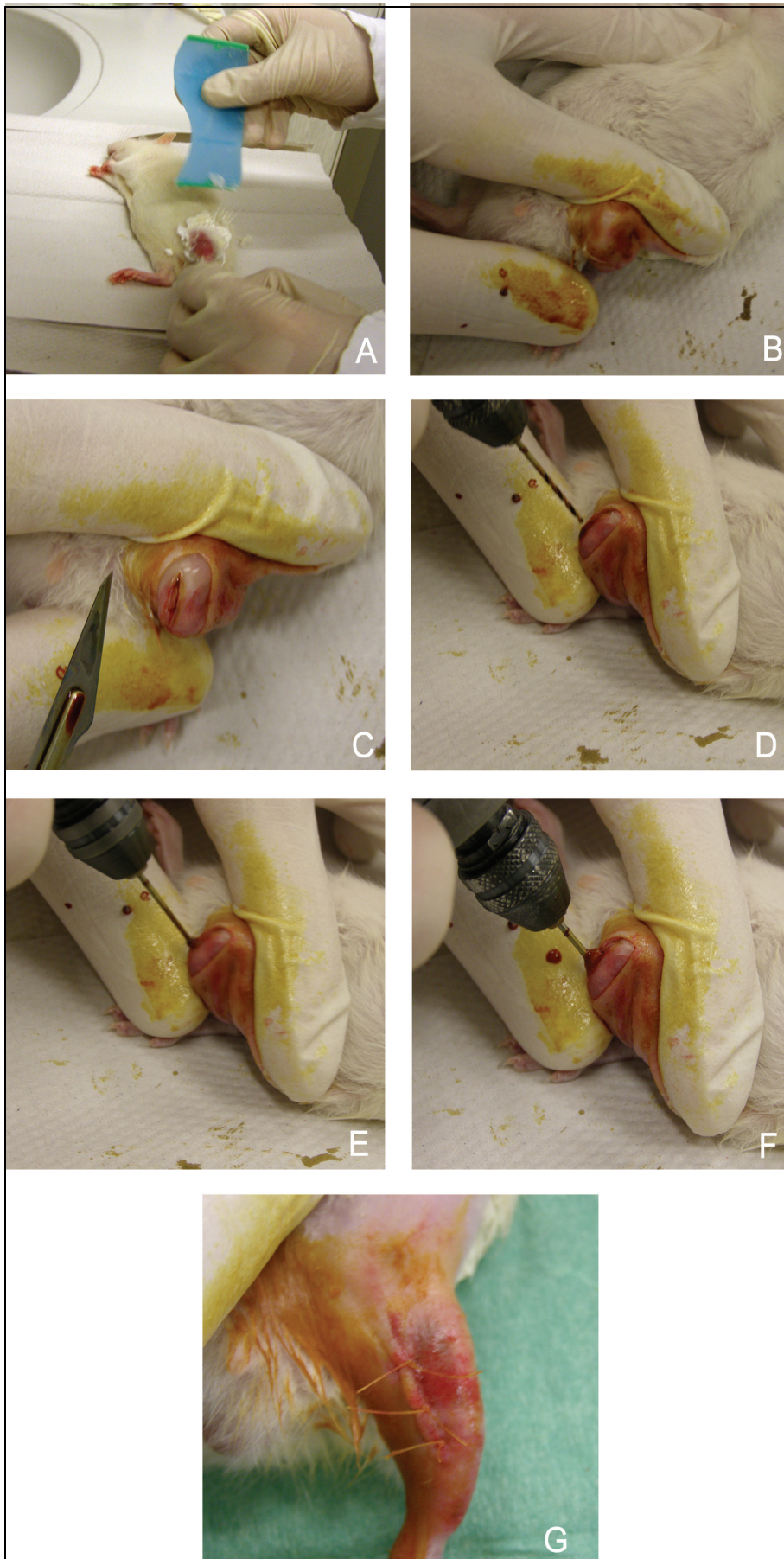
Wirkstoff	Handelsname	Hersteller	Menge pro Ansatz
Fentanyl	Fentanyl®	Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland	100µg
Midazolam	Midazolam Delta®	Deltaselect GmbH, Dreieich, Deutschland	2.0mg
Medetomedin	Domitor®	Pfizer Corp. Austria GmbH, Wien	1.0mg

3.2.1.2. Setzen der Läsion

Als erstes wurde in Narkose das Operationsfeld am linken hinteren Bein der Ratte mittels Veet®-Enthaarungscreme (Reckitt Benckiser Austria GmbH, Wien) entfernt (A), um das Einwachsen oder Eindringen von Haaren ins Operationsgebiet zu verhindern. Danach erfolgte das sterile Waschen mit Betaisodona®-Lösung (B) und das Eröffnen der Haut mit einem ca 1,5 cm großen Schnitt über dem frontalen Aspekt des distalen Femurs auf Höhe des Kniegelenkes mittels Skalpell. Durch schichtweises, stumpfes Präparieren mit der

Schere wurde die Region über dem Kniegelenk freigelegt (C). Mittels elektrischem Handbohrer wurde transartikulär in axialer Richtung ein transepiphysäres Loch in die linke Tibia gebohrt. Es wurde ein Bohrer mit einem Durchmesser von 1,2 mm verwendet und als Bestätigung für die transepiphysäre Bohrung, mussten ein Widerstandsverlust, verursacht durch das Eintreten in die Markhöhle der Tibia, und das Austreten von Knochenmark bemerkbar sein (D-F). Anschließend wurde abermals mit Betaisodona®-Lösung desinfiziert und der Hautverschluss wurde mittels Vicryl® 5-0 Nahtmaterial in Einzelknopftechnik durchgeführt (G).

Abbildung N: Darstellung des Operationsablaufs



3.2.1.3. postoperative Versorgung

Gleich nach dem Verschluss der Haut wurde den Ratten ein Narkose-Antidot (siehe Tabelle F) intraperitoneal gespritzt, so wie eine subkutane Injektion Caprofen (Rimadyl®, Pfizer Corp. Austria GmbH, Wien; 1ml Rimadyl® verdünnt mit 49ml NaCl 0.9%, davon 0.4ml/100g KG) zur Analgesie verabreicht. Danach wurden die Ratten bis zum Aufwachen auf eine Heizplatte (eingestellt auf 38°Celsius) gelegt.

Die weitere Schmerztherapie in der ersten Woche erfolgte täglich mit weiteren subkutanen Injektionen von Caprofen in der gleichen Dosierung wie intraoperativ.

In der zweiten Woche wurden dann dem Trinkwasser 250mg Metamizol (Novalgin Tropfen®, Sanofi-Aventis GmbH, Wien) pro 100ml Wasser beigemischt und die Injektionen wurden gestoppt.

Ab der dritten Woche war keine Schmerztherapie mehr nötig.

Tabelle F: Antidot für FDD Narkose

Wirkstoff	Handelsname	Firma	Menge pro Ansatz
Naloxon	Narcanti®	Torrex Chiesi Pharma GmbH, Wien	1.2mg
Flumazenil	Anexate®	Roche Austria GmbH, Wien	0.5mg
Atipamazol	Antisedan®	Pfizer Corp. Austria GmbH, Wien	2.5mg
NaCl 0.9%	NaCl-Fresenius®	Fresenius Kabi Austria GmbH, Graz	1.5ml

3.2.2. Euthanasie und Probengewinnung

Abhängig von der Gruppe wurden die Ratten an den Tagen 0 (ohne Läsion), 1, 3, 7, 14, 28 und 84 euthanasiert.

Zur Euthanasie wurden die Ratten wieder in den Tier-OP gebracht. Die Tötung der Tiere erfolgte nach Verabreichung einer Inhalationsnarkose mit Furane® durch eine intracardiale Injektion einer Überdosis von 50mg Thiopental-Natrium (Thiopental Sandoz®, Sandoz GmbH, Kundl, Österreich). Vor der Injektion wurde den Ratten noch 2ml Blut in einem Heparinröhrchen aus dem Herzen abgenommen, welches zur

Interleukin-6-Bestimmung (findet Verwendung in einem weiteren Projekt) herangezogen wird. Nach dem Tod erfolgt die Explantation der Tibia beidseits (rechtes Bein war das Experimentalbein, linkes Bein immer die Kontrolle) und daran anschließend die sofortige Schockfrierung der Knochen in Flüssigstickstoff. Selbstverständlich wurde unter größter Vorsicht sämtliches Weichteilgewebe vom Knochen entfernt.

3.2.3. Durchführung der qRT-PCR

Von jedem Knochen, sowohl Läsionsbein als auch Kontrollbein, wurde ein epiphysärer Block, welcher die Epiphysenfuge und ca. 0,5 cm des angrenzenden Knochens, jedoch keinen Gelenksknorpel mehr, enthielt, homogenisiert. Die Extraktion der RNA wurde mittels TRIZOL® (Gibco BRL) unter dem dazugehörigen Hersteller-Protokoll durchgeführt. Die extrahierte RNS (2,5µg) wurde dann mittels Random Hexamer Primer® (Fermentas UAB, Litauen), einer reversen Transkriptase, bei 42°C für 15 Minuten in cDNS umgeschrieben.

Für die Etablierung von quantitativen Expressionsprofilen von BMP-2, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, HIF-1 α und CD-31 wurden die vorgefertigten optimierten TaqMan® Gene Expression Assays von Applied Biosystems für die real time-PCR verwendet. Als Referenzgene für die relative Quantifizierung wurden GAPDH und β -Aktin ausgewertet.

Die Auswertungen wurde dann bei Standardbedingungen mit Hilfe eines ABI 7900 Sequence Detection System® von Appliedbiosystems durchgeführt. Aus statistischen Gründen und wegen der Qualität der DNS wurden für jede Auswertung nur acht Proben der jeweiligen Gruppe herangezogen, wobei aus jeder Probe drei unabhängige Messungen gemacht wurden.

3.2.4. Durchführung der MRT-Untersuchung

An den postoperativen Tagen 1, 3, 7, 14, 28, 42 und 82 wurden die Tiere der Gruppe MRT zur Evaluierung des Heilungsprozesses, zum Nachweis der Knochenbrückenbildung und für die Kontrastmittel gestützte dynamischen MRT-Untersuchung (DCE-MRT), ins MRT gelegt.

Für die Durchführung der MRT wurden die Ratten anfangs mittels subkutaner Injektion von 0.1ml/100g KG FDD-Narkoselösung (siehe Tabelle E) in Narkose versetzt. Während der ca. 35 Minuten dauernden Untersuchung wurde in die Schwanzvene der Ratte 0,2 mmol/kg KG Gd-DTPA Kontrastmittel (Gadovist®, Schering AG) für die dynamische Kontrastmitteluntersuchung injiziert. Für die morphologische Untersuchung der Knochenbrücken wurde eine T2-gewichtete 3D-Flash-Sequenz (256x256 Matrix; Auflösung von 0,19x0,1x0,7; TE 7ms; TR 100ms; FA 15) verwendet. Bei der DCE-MRT wurde eine PD-gewichtete 3D-Flash-Sequenz (256x256 Matrix; Auflösung von 0,19x0,1x0,7; TE 2,95ms; TR 100ms; FA 5) gefahren, sowie eine T1-gewichtete 3D Flash Sequenz (256x256 Matrix; Auflösung von 0,19x0,1x0,7; TE 7ms; TR 8,09ms; FA 30) mit einer temporalen Auflösung von 13,32s für die mittels Kontrastmittel-Bolus verstärkten Messungen als Referenz-Sequenz.

Um die vaskulären Verhältnisse abzuschätzen, wurde der transzytolemmale Wasseraustausch (mittels DCE-MRT) gemessen und als Transferkoeffizient (K^{trans}) ausgewertet. Ebenso wurde eine Kontrastmittel-Aufnahme-Kurve erstellt.

3.2.5. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde die Software SPSS ® (Spss Inc., Chicago) verwendet. Die angewandten Tests waren Mann Whitney U und Wilcoxon W. Ein p-Wert von unter 0,05 wurde als signifikant angesehen. Bei multipler Testung wurde die Bonferroni-Korrektur angewandt, wonach ein p-Wert von unter 0,007 als signifikant angesehen wurde.

4. Ergebnisse

4.1. qRT-PCR

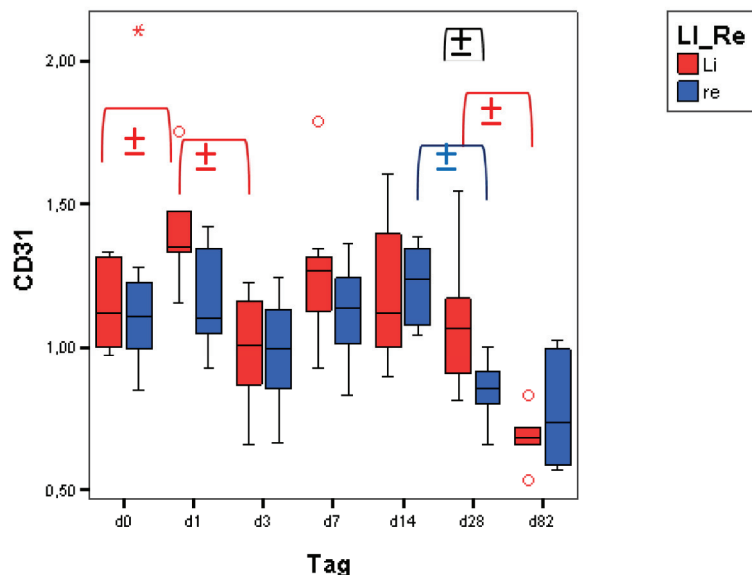
4.1.1. CD31

Die qRT-PCR zeigte einen signifikanten Unterschied ($p < 0,007$) in der Expression von CD31 im Läsionsbein zwischen Tag 0 und Tag 1, sowie Tag 1 und Tag 3, wobei der Peak am Tag 1 lag. Zwischen Tag 28 und Tag 82 wurde im Läsionsbein ebenso ein signifikanter Unterschied ersichtlich ($p < 0,007$), wobei die Expressions-Werte allerdings ab Tag 14 wieder abzunehmen begannen.

Im Vergleich der Kontrollbeine wurde zwischen Tag 14 und Tag 28 ein signifikanter Unterschied ($p < 0,007$) errechnet,

Einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen Läsionsbein und Kontrollbein konnten wir nur am Tag 28 ausmachen. (siehe Abbildung O)

Abbildung O: delta-delta-CP-Werte der CD31 Auswertung mittels qRT-PCR



- ± unbroken: significantly deregulated compared to previous day
- ± broken: significantly deregulated compared to previous day
- ± left: significantly deregulated compared to right

4.1.2. HIF-1 α

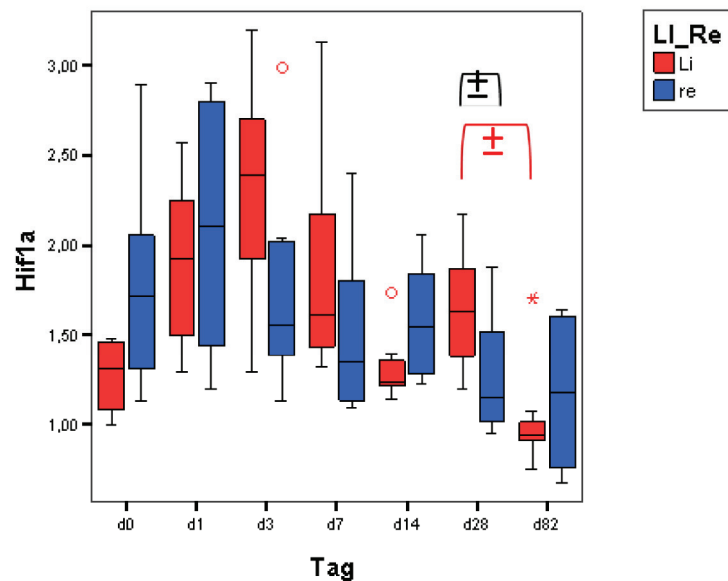
Es konnte ein stetiger Anstieg der Expression von HIF-1 α in Läsions- und Kontrollbein bis zum Tag 3 ausgemacht werden, allerdings ohne Signifikanz, danach fielen die Werte wieder ab.

Von Tag 28 zu Tag 82 konnte ein signifikantes Absinken ($p>0,007$) der Expressionswerte im Läsionsbein nachgewiesen werden.

Die HIF-1 α -Konzentration im Läsionsbein am Tag 28 zeigte einen signifikanten Unterschied ($p<0,05$) im Vergleich zum Kontrollbein zum selben Zeitpunkt.

(siehe Abbildung P)

Abbildung P: delta-delta-CP-Werte der HIF-1 α -Auswertung mittels qRT-PCR



- \pm unbroken: significantly deregulated compared to previous day
- \pm broken: significantly deregulated compared to previous day
- \pm left: significantly deregulated compared to right

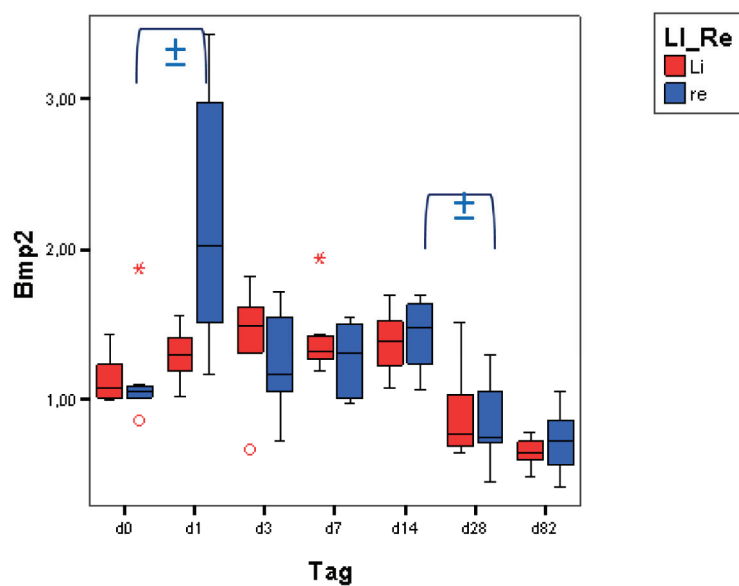
4.1.3. BMP-2

Die Expressionswerte der BMP-2-Auswertung zeigten lediglich zwei signifikante Unterschiede ($p < 0,007$) in den Kontrollbein-Expressionen. So war Tag 1 signifikant erhöht im Vergleich zu Tag 0 und Tag 28 war signifikant erniedrigt im Vergleich zu Tag 14.

Ohne Signifikanz-Nachweis konnte ein geringes Ansteigen der Expression, sowohl in Läsionsbein als auch im Kontrollbein, bis zum Tag 14 nachgewiesen werden, danach fielen die Werte wieder ab.

(siehe Abbildung Q)

Abbildung Q: delta-delta-CP-Werte der BMP-2-Auswertung mittels qRT-PCR



- ± unbroken: significantly deregulated compared to previous day
- ± broken: significantly deregulated compared to previous day
- ± left: significantly deregulated compared to right

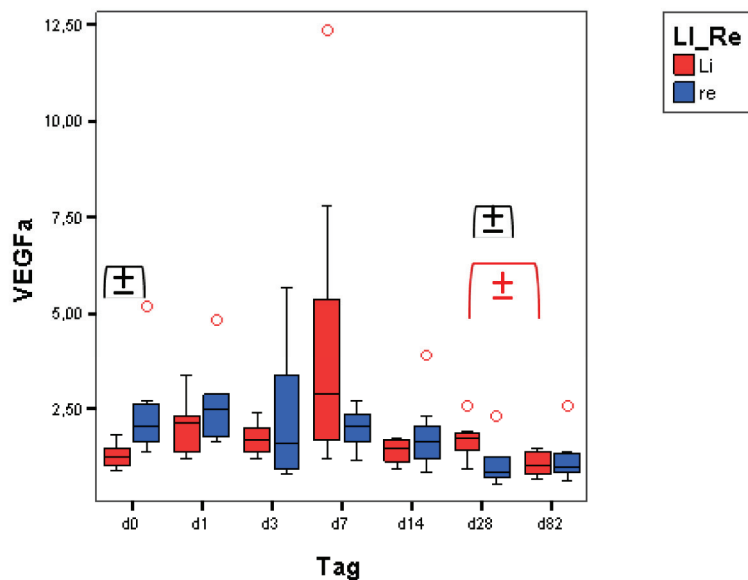
4.1.4. VEGFa

Hier konnten zwei signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Läsionsbein und Kontrollbein zum gleichen Zeitpunkt nachgewiesen werden. So waren am Tag 0 im Kontrollbein die VEGFa Expressionswerte erhöht, und am Tag 28 waren die Werte des Läsionsbeins erhöht.

Im Vergleich der Läsionsbeine ergaben die Werte zwischen Tag 28 und Tag 82 einen signifikanten Unterschied ($p < 0,007$), wobei die Expressionswerte von Tag 28 auf 82 abfielen.

(siehe Abbildung R)

Abbildung R: delta-delta-CP-Werte der VEGFa Auswertung mittels qRT-PCR



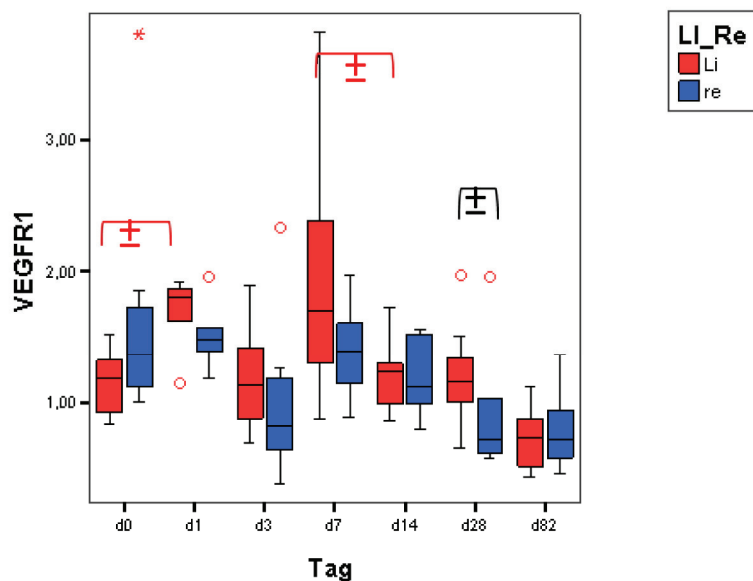
- ± unbroken: significantly deregulated compared to previous day
- ± broken: significantly deregulated compared to previous day
- ± left: significantly deregulated compared to right

4.1.5. VEGF-Rezeptor 1

Die Werte für den VEGFR1 ergaben eine signifikante Erhöhung ($p < 0,007$) am Tag 1 im Vergleich zu Tag 0 im Läsionsbein an, sowie eine signifikante Erniedrigung ($p < 0,007$) zwischen Tag 7 und Tag 14 im Läsionsbein. Danach fielen die Werte weiter ab, jedoch ohne signifikanten Unterschied. Allerdings konnte noch ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen Läsionsbein und Kontrollbein am Tag 28 festgestellt werden, mit verstärkter Expression im Läsionsbein.

(siehe Abbildung S)

Abbildung S: delta-delta-CP-Werte der VEGFR1 Auswertung mittels qRT-PCR

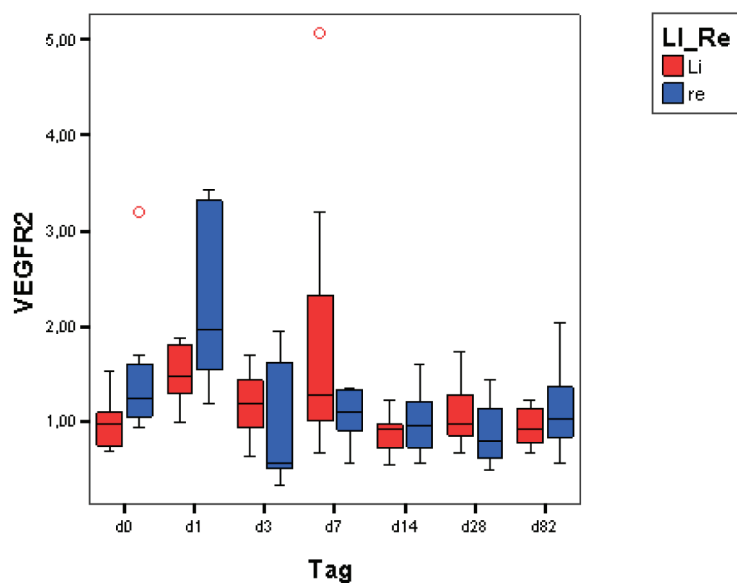


- ± unbroken: significantly deregulated compared to previous day
- ± broken: significantly deregulated compared to previous day
- ± left: significantly deregulated compared to right

4.1.6. VEGF-Rezeptor 2

Hier konnte gar keine signifikante Wertveränderung festgestellt werden. Ein gewisser Trend zu anfänglichen Hochregulierung ist allerdings erkennbar.
(siehe Abbildung T)

Abbildung T: delta-delta-CP-Werte der VEGFR2 Auswertung mittels qRT-PCR



± unbroken: significantly deregulated compared to previous day
± broken: significantly deregulated compared to previous day
± left: significantly deregulated compared to right

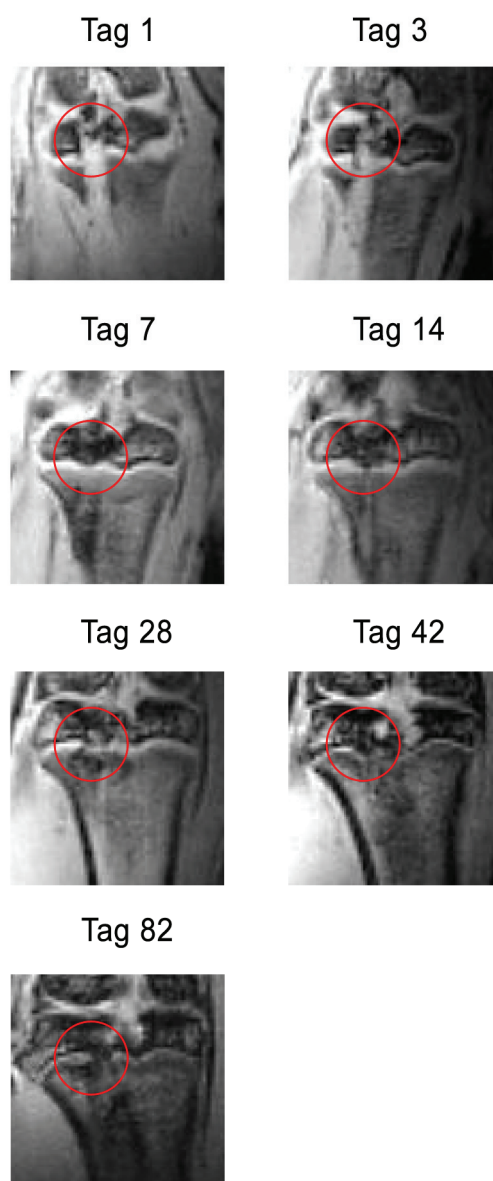
4.2. MRT

Die Bildung von Knochenbrücken konnte mit Hilfe der Magnetresonanztomographie eindeutig und ohne jeden Zweifel nachgewiesen werden; sie zeigte im Zeitverlauf bei allen fünf Kontrolltieren immer die gleichen morphologischen Ergebnisse.

An den Tagen 1 und 3 post Trauma kann die Bohrloch-Läsion eindeutig identifiziert werden. Am 7. Tag postoperativ hat bereits ein Auffüllen der Läsion begonnen, wobei ein

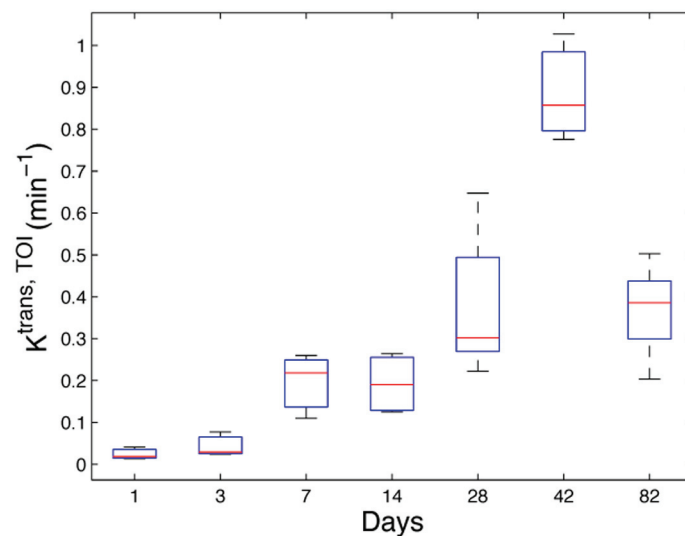
knorpelig konfiguriertes Gewebe erkennbar ist. Am Tag 14 werden erste Unregelmäßigkeiten in der Wachstumsfuge auffällig, die auf eine Diskontinuität in der Fuge hinweisen. Zum nächsten Untersuchungszeitpunkt am Tag 28 wurde dann eine knöcherne Umwandlung des knorpelartigen Gewebes erkennbar, was ab Tag 42 auch zu einer Zerreißung der Epiphysenfuge führte. (siehe Abbildung U)

Abbildung U: T2-gewichtet MRT-Bilder der Ratte 1 aus der MRT-Kontroll-Gruppe
Der rote Kreis markiert die Läsion in der Fuge



Die Daten der DCE-MRI lassen eine Steigerung der Durchblutung erkennen, wenn auch in einer unerwarteten Form. So kommt es überraschenderweise zu keiner wesentlichen Steigung des K^{trans} am Tag 1 post Trauma. Erst zwischen Tag 3 und Tag 7 wird ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) der Durchblutung erkennbar. Das Durchblutungs niveau bleibt am Tag 14 im Vergleich zu Tag 7 konstant und erst am Tag 28 setzt eine starke Steigerung mit signifikantem Unterschied ($p < 0,05$) ein, welche sich am Tag 42 abermals mit signifikantem Unterschied ($p < 0,05$) steigert. Danach fällt der K^{trans} -Wert wieder ab, wobei es zu einem signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen Tag 42 und 82 kommt.

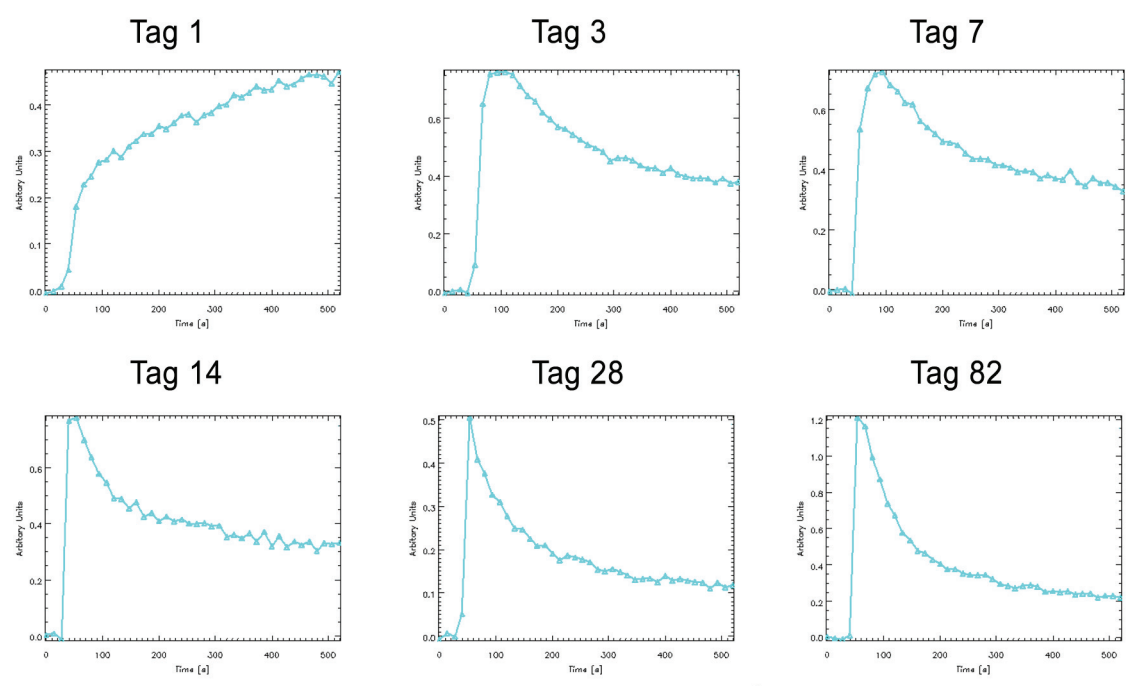
Abbildung V: Transferkoeffizient (K^{trans}) im Verlauf der Heilung



In den Kontrastmittel-Aufnahme-Kurven wurde am Tag 1 ein moderater kontinuierlicher Anstieg ohne Peak festgestellt, wobei dieser Graph als normal durchblutetes Gewebe interpretiert werden kann. Vom Tag 3 an hat die Kurve einen steilen Anstieg bis zu einem Peak, gefolgt von einer Auswasch-Phase. Der Anstieg zum Peak wird zu den späteren Messungen (Tag 7, Tag 14, Tag 28 und Tag 82) hin immer steiler und die Auswaschphase

flacht immer schneller ab, was einem typischen Bild für gut durchblutetes Gewebe gleicht und was somit für eine Hypervaskularität in der Läsion spricht. (siehe Abbildung W)

Abbildung W: Kontrastmittel-Aufnahme-Kurven von Ratte 2 aus der MRT-Kontroll-Gruppe



5. Diskussion

Epiphysenfugenverletzungen im Rahmen von Salter-Harris-Frakturen sind eine relativ häufig diagnostizierte Verletzung im Kindesalter und treten in ca. 15-18 % aller Fälle von Frakturen von langen Röhrenknochen auf.[2] Durch das zahlreiche Auftreten von hemmenden Wachstumsstörungen im Zusammenhang mit Knochenbrückenbildungen bei Epiphysenfugenverletzungen, stellen diese eine besondere Herausforderung in der Kindertraumatologie dar und verlangen ein besonderes Augenmerk des Arztes hinsichtlich einer möglichen Beteiligung der Wachstumsfugen. [1,2,15] Auch wenn die genaueren ursächlichen Zusammenhänge noch lange nicht geklärt sind, so weiß man, dass die Bildung von Knochenbrücken in der Epiphysenfuge während des Heilungsprozesses ausschlaggebend für hemmende Wachstumsstörungen sind. [2,60] Es ist von außerordentlicher Wichtigkeit, die genaueren pathophysiologischen Zusammenhänge samt der molekularen Regler zu kennen, um therapeutische Lösungsansätze für das Problem der hemmenden Wachstumsstörungen zu entwickeln und in den klinischen Alltag einzubringen. Bisher fand die Behandlung ausschließlich nach Auftreten der Wachstumsstörungen in Form einer posttraumatischen Korrekturoperation statt. Wünschenswert wäre allerdings eine Behandlungsmöglichkeit, mit der man bei beginnender Wachstumsstörung eingreifen kann und somit das drohende Fehlwachstum verhindern zu können.

Der Heilungsprozesse von Knochen wird bereits seit vielen Jahren erfolgreich erforscht. [37,38,40,42,44,69-71] Epiphysenfugenverletzungen stellen jedoch aufgrund des knorpeligen Aufbaus der Wachstumsfuge eine Sonderform von Knochenverletzungen dar, und haben bei ihren Heilungsprozessen daher andere Interaktionen der Steuerelemente als jene bei der herkömmlichen Knochenheilung. Die Anzahl der Arbeiten, welche sich mit diesem spezialisierten Thema befassen, sind relativ gering [46,60,62] und somit stellt dieses Thema ein noch eher unerforschtes Eck der medizinischen Wissenschaft dar.

Um die genaueren Grundlagen des Problems „Knochenbrückenbildung bei hemmenden Wachstumsstörungen“ zu beleuchten, haben wir ein besonderes Augenmerk auf die molekularen Regulatoren in der Epiphysenfuge während des Heilungsprozesses gelegt. Die für diesen Zweck verwendeten Ratten als Versuchstiere, haben sich durch die relative

leichte Handhabung der Tiere, sowie ihre mit dem Menschen durchaus vergleichbaren anatomischen und histologischen Verhältnisse, als geeignet erwiesen. Die Art der transartikulären Fugenläsionssetzung mittels Handbohrer hat sich als sehr effektiv erwiesen, und hat darüberhinaus den Vorteil, eine stabile Läsion gesetzt zu haben. Wäre die Läsion instabil, wäre die postoperative Ruhigstellung der Ratte sehr schwierig zu standardisieren, und somit wären die Ergebnisse viel schwieriger zu vergleichen gewesen. Die individuellen mechanischen Einflüsse der sich postoperativ willkürlich bewegenden Ratte, könnten als beeinflussender Faktor des Heilungsprozesse nicht ausgeschlossen werden und würden somit eine unbekannte Variable darstellen. Ein Nachteil der Läsionssetzung mit dem Bohrer ist die Tatsache, dass es hier zu keiner Fraktursetzung im eigentlichen Sinn kommt, sondern zu einem Substanzdefekt innerhalb der Fuge.

Um Aufschluss über die Expression der untersuchten Faktoren zu erhalten, wurde eine quantitative Real-Time Polymerase Ketten Reaktion verwendet. Dieses Verfahren gilt als standardisiert, ist anerkannt und wurde in mehreren Studien erprobt. [30,46,57,62] Die Schwierigkeit der Probengewinnung und die an sich kleine Menge homogenisierten Materials wirft die Möglichkeit eines Bias in der Datenaquirierung auf. So ist es nicht ganz erklärbar, warum es bei der Expression von BMP-2 zu einen signifikanten Unterschied zu Gunsten des läsionsfreien Beins am Tag 1 kommt. Einen Faktor, welchen man nicht außer Acht lassen darf, ist die Tatsache, dass sich unsere Versuchstiere allesamt im Wachstum befanden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass es hier zu einer Überlagerung von physiologischen Wachstumsphänomenen mit den Regulatoren der Heilung kam, welche die Expressionsdaten unterdrückten oder verzerrte.

Mit dieser Methode ist es klarerweise nicht möglich, eine morphologische Bestätigung einer vorhandenen Knochenbrücke zu erhalten. So wurde mit Hilfe einer Magnetresonanztomographie ein morphologisch fassbares Ergebnis erstellt. Die Magnetresonanztomographie stellt eine sehr gute morphologische Methode dar, da es einerseits zu keiner Strahlenbelastung der Tiere kommt, andererseits aber auch eine relativ gute bildliche Auflösung des Knorpelgewebes der Wachstumsfuge hat, was sich mit einem Computertomographen nicht darstellen ließe. Im klinischen Alltag sind bereits Fälle publiziert, bei denen magnetresonanztomographisch-gesteuerte Knochenbrückenentfernungen an Patienten durchgeführt wurden.[72] Dies spricht für diese Methode bei der Knochenbrückenevaluierung. Durch die Möglichkeit der dynamischen Untersuchung war es möglich, Aussagen über die Durchblutungsverhältnisse zu machen. So konnte eine erhöhte Durchblutung

nachgewiesen werden, was somit ein Korrelat für Hypervaskularität darstellt. Die Schwierigkeit dabei ist es einen Zugang an einer der beiden Schwanzvenen der Ratte zu setzen. Komplikationen bei der Kontrastmittelinjektion sind beschrieben, und so kam es auch bei unserer Versuchsreihe zur Tötung zweier Tiere aufgrund von Luftembolien.

Das Studiendesign sowie die Ziele, welche anhand der qRT-PCR-Daten und der MRT-Daten beantwortet wurden, wurden aus folgenden Aspekten gewählt: Den in der Literatur beschriebenen Ablauf der Entstehung einer Knochenbrücke während eines Epiphysenfugenheilungsprozesses [60] wollten wir, durch den Nachweis von CD31, BMP-2, HIF-1 α und VEGF mit seinen Rezeptoren, eine molekulare Basis geben. So sollte nachgewiesen werden, dass die in der Literatur beschriebene direkte Knochenentstehung [60] auf Gefäßeinsprossung zurückzuführen ist, welche durch Hypoxie und einer dadurch verursachten erhöhten Expression von HIF-1 α , welches eine erhöhte Expression von VEGF nach sich zieht, ausgelöst wird. Dies konnte durch die gewonnenen Daten tendenziell bestätigt werden. Die Zeitpunkte, an denen wir Messungen durchführten, waren auf den von Xian et al. [60] beschriebenen Heilungsprozess, sowie auf Erkenntnisse aus früheren Analysen von Frakturheilungsprozessen anderer Autoren [46,62] abgestimmt. Es muss jedoch klar sein, dass bei solchen Prozessen zeitliche Schwankungen immer individuell vorhanden sind, und man nur von Richtwerten für den zeitlichen Ablauf ausgehen kann.

Die ausgewerteten Ergebnisse dieser Studie wurden bereits gegliedert nach den beiden Verfahren getrennt gezeigt.

Auch wenn die Daten, welche mittels qRT-PCR gewonnen wurden, keine signifikanten Unterschiede brachten, so konnte jedoch unsere Hypothese, einer erhöhten HIF-1 α Expression und daraus resultierender verstärkter Expression von VEGF samt dessen Rezeptoren, mit Trend der Ergebnisse bestätigt werden. Der erwartete Anstieg von CD31 als Endothelzellmarker, und somit indirekter Hinweis auf neugebildete Gefäße, konnte nicht gefunden werden, und wirft die Frage auf, ob hier nicht ein gewisses Bias vorliegt. So könnte die Masse der metaphysären Knochenanteile im ausgewerteten Gewebe zu groß gewesen sein, um minimale Expressionsunterschiede der Fuge aufzudecken, beziehungsweise durch das physiologische Wachstums überlagert wird. Die Expression von BMP-2, als wichtiger osteogenetischer Faktor, zeigt keine signifikanten Anstiege auf, wobei jedoch die Expressionslevels mit einer Vergleichsarbeit in der Literatur [62] vereinbar sind.

Die Auswertung der MRT Untersuchung zeigte Ergebnisse, welche die Daten der qRT-PCR bestärken und unterstützen. Die an den Tagen 1 und 3 noch gut erkennbare Läsion, zeigt am Tag 7 bereits eine Auffüllung mit knorpelig konfiguriertem Material. Dies stellt jedoch einen Widerspruch zu den bislang gewonnenen Erkenntnissen dar. Denn Xian et al. [60] postulierten die Bildung der Knochenbrücke als ein Geschehen, welches ohne knorpelige Zwischenstufe direkt intramembranös geschieht. Dies dokumentierten sie mit histologischen Schnitten und dem fehlenden Nachweis von Kollagen-X, als Marker für chondrogenetisches Gewebe. Sie stellten am Tag 7 Osteoprogenitorzellen in der Fuge fest, was sie mittels den Knochenzellmarkern $cbf-\alpha 1$ und Alkaline Phosphatase bewiesen. Ihre These stützten sie noch mit ähnlichen Behauptungen aus einer anderen Arbeit, [73] welche das Fehlen der chondrogenetischen Faktoren Indian hedgehog und Kollagen II im Fugenheilungsprozess beschrieben.

Die eigentliche Bildung von Knochenbrücken scheint ab Tag 14 zu beginnen, wobei sie ab Tag 28 dann eindeutig verifizierbar werden und im weiteren Verlauf an Größe und Dichte zunehmen.

Die dynamischen MRT Untersuchungen korrelierten sehr gut mit den zuvor genannten Ergebnissen. So konnte durch den Anstieg der K^{trans} ab Tag 7 eine verstärkte Durchblutung gezeigt werden, wodurch Hypervaskularität und Knochenbildung als gegeben angenommen werden können. Die Ergebnisse, welche die Kontrastmittel-Aufnahme-Kurven ergaben, stellt ein typisches Bild für gut durchblutetes Gewebe dar, und spricht somit ebenso für eine Hypervaskularität in der Läsion.

Wenn man die Ergebnisse alle zusammen sieht, scheint die Hypothese dieser Arbeit richtig zu sein, und Hypervaskularität einen entscheidenden Faktor für die Knochenbrückenbildung darzustellen. Das Aufscheinen von knorpelig konfiguriertem Gewebe am Tag 7 in der MRT wirft allerdings neue Fragen über den morphologischen Ablauf auf. So muss man evaluieren ob es wirklich, wie in der Literatur beschrieben, zu intramembranöser Knochenbildung ohne knorpeliger Vorstufe kommt.

Die noch offenen Bestätigungsfelder der Forschung auf dem Gebiet der Wachstumsfugenheilung sind zahlreich und bilden somit genügend Aufgaben, welche es in den nächsten Jahren zu lösen gibt. Zhou et al. [46] beschäftigten sich schon mit den proinflammatorischen Zytokinen und einigen wenigen Wachstumsfaktoren (FGF-2, PDGF-B, IGF-1), welche jedoch sowohl für die Osteogenese als auch für die Chondrogenese

verantwortlich sind. Somit kann keine eindeutige Feststellung gemacht werden, ob nun die Knochenbrückenbildung wirklich ohne Knorpelbildung als Zwischenstufe einhergeht. Die Ergebnisse von Lee et al. [73] sprechen für eine direkte Knochenbildung ohne knorpelige Zwischenstufe, denn er konnte keine Expression von Indian hedgehog nachweisen, einen der wichtigsten Faktor der Chondrogenese. Dies steht jedoch im klaren Widerspruch mit den in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnissen über die morphologische Entstehung des Knochenbrücke.

Ngo et al. [62] untersuchten die Expression der BMPs und deren Rezeptoren. So zeigten sie eine erhöhte Expression von BMP-3 und BMP-4 während der anfänglichen Entzündungsantwort, sowie eine erhöhte Expression von BMP-7 in der Phase des Knochenbrückenremodellings. Die Expressionslevels von BMP-2 beschrieben sie als relativ gleichbleibend bis minimal erhöht, was wir in den Ergebnissen dieser Arbeit auch nachweisen konnten. Die Rolle von BMP-2 während der normalen Knochenheilung wird aber als sehr bedeutend beschrieben. So postulierte Bouletreau et al. [57] eine Hochregulierung von BMP-2, durch Stimulierung mit Hypoxie und VEGF in der normalen Knochenheilung.

Ganz außer Acht gelassen hat man bis heute die mechanischen Beeinflussungen der Knochenbrückenbildung bei Fugenläsionen. Ihre Auswirkungen bei der normalen Knochenheilung [34,35] und die dadurch gewonnen Erkenntnisse, haben längst Verwendung im klinischen Alltag gefunden. Ob es überhaupt Auswirkungen der mechanischen Belastung bei der Heilung von Epiphysenfugenläsionen gibt, und wenn ja wie große, war bis lang noch nicht Thema von wissenschaftlichen Arbeiten.

Erste Bausteine des komplexen Heilungsprozesses bei Epiphysenfugenläsionen sind wohl schon bekannt, jedoch wird noch einiges an Arbeit notwendig sein, damit ein zeitlicher Ablaufplan der wichtigsten Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren, wie es Gerstenfeld et al. [40] für die normale Knochenheilung erstellten, für die Heilung von Fugenverletzungen verfügbar sein wird.

So muss es das Ziel sein, die wissenschaftlichen Zusammenhänge die zur Knochenbrückenbildungen führen, von Grund auf zu erforschen und zu verstehen. Erst wenn dies gelungen ist, kann man sich an die Erarbeitung neuer Therapiekonzepte heranwagen, um hemmende Wachstumsstörungen nach Epiphysenfugenläsionen zu verhindern. Denn erst dann wird man verhindern können, dass posttraumatische

Korrekturoperation aufgrund von nicht verhinderbaren Achsfehlstellungen nötig sind und Korrekturoperationen in der Kindertraumatologie als obsolet betrachtet werden können.

Literaturverzeichnis

1. von Laer L, Hasler C. [Spontaneous corrections, growth disorders and post-traumatic deformities after fractures in the area of the forearm of the growing skeleton]. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 2000;32:231-241
2. Hasler CC, von Laer L. [Pathophysiology of posttraumatic deformities of the lower limbs during growth]. *Orthopade* 2000;29:757-765
3. Breiffuss H, Weinberg A, Muhr G. Wachstumsphänomene bei Frakturen im Kindesalter: Spontankorrekturen und Wachstumsstörungen. In: H. T ed, *Unfallchirurgie - Unfallchirurgie im Kindesalter*. Heidelberg: Springer Verlag; 2006:39-49
4. Freizeitunfallstatistik 2007. In: Wien: Kuratorium für Verkehrssicherheit
5. Weinberg A, Kutschera C, Kutscha-Lissberg F, Mayr J, Kahl E. Unterschenkel. In: Weinberg A, Tschernig HH eds, *Unfallchirurgie im Kindesalter*. Berlin, Heidelberg; 2006:741-805
6. Breiffuss H, Muhr G. [Can accelerated longitudinal growth be prevented following pediatric femur shaft fractures?]. *Unfallchirurg* 1988;91:189-194
7. Clement DA, Colton CL. Overgrowth of the femur after fracture in childhood. An increased effect in boys. *J Bone Joint Surg Br* 1986;68:534-536
8. Fanghänel J, Pera F, Anderhuber F, Nitsch R. *Waldeyer Anatomie des Menschen 17th ed*. Berlin ; New York: de Gruyter; 2003
9. Bonewald L. Osteocytes as multifunctional cells. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006;6:331-333
10. Boron WF, EL B. *Medical physiology: a cellular and molecular approach*. updated ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005
11. Schuenke M, Schulte E, Schumacher U. *Atlas of Anatomy*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2004
12. Standring S, Ellis H, Healy J, et al. *Gray's Anatomy: the anatomical basis of clinical practice*. 29th ed. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone; 2005
13. Cohen MM, Jr. The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am J Med Genet A* 2006;140:2646-2706
14. Robey PG. Vertebrate mineralized matrix proteins: structure and function. *Connect Tissue Res* 1996;35:131-136
15. Weinberg A-M, Hoffmann A, P. C. Molekulare physiologische und anatomische Grundlagen der Knochenentwicklung. In: H. T ed, *Unfallchirurgie - Unfallchirurgie im Kindesalter*. Heidelberg: Springer Verlag; 2006:3-14

16. Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, et al. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *ClinOrthopRelat Res* 1998:S247-S256
17. Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. *EndocrRev* 1996;17:308-332
18. Connolly JF. Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. *ClinOrthopRelat Res* 1998:S257-S266
19. Granjeiro JM, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC, Sogayar MC, Taga R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:1463-1473
20. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* 2002;8:147-159
21. Bonewald LF. Osteocytes: a proposed multifunctional bone cell. *JMusculoskeletNeuronalInteract* 2002;2:239-241
22. Gerstenfeld LC. Osteopontin in skeletal tissue homeostasis: An emerging picture of the autocrine/paracrine functions of the extracellular matrix. *J Bone Miner Res* 1999;14:850-855
23. Noble BS, Reeve J. Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Mol Cell Endocrinol* 2000;159:7-13
24. Junqueira L, Carneiro J, Kelley R. *Histologie*. 5. neu übers., überarb. und aktualisierte Auflage ed. Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio: Springer; 2002
25. Platzer W. *Taschenatlas der Anatomie*. 7th ed. Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag; 1999
26. Ballock RT, O'Keefe RJ. The biology of the growth plate. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A:715-726
27. Forriol F, Shapiro F. Bone development: interaction of molecular components and biophysical forces. *Clin Orthop Relat Res* 2005:14-33
28. Shapiro F, Holtrop ME, Glimcher MJ. Organization and cellular biology of the perichondrial ossification groove of ranvier: a morphological study in rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 1977;59:703-723
29. Sadler TW. *Medizinische Embryologie : die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen*. 10. korrigierte Auflage ed. Stuttgart: Thieme Verlag; 2003
30. Emans PJ, Spaapen F, Surtel DA, et al. A novel in vivo model to study endochondral bone formation; HIF-1alpha activation and BMP expression. *Bone* 2007;40:409-418
31. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 2003;423:332-336
32. Goodship AE, Lanyon LE, McFie H. Functional adaptation of bone to increased stress. An experimental study. *J Bone Joint Surg Am* 1979;61:539-546

33. Rauch F. Bone growth in length and width: the Yin and Yang of bone stability. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2005;5:194-201
34. Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int* 1995;57:344-358
35. Henderson JH, Carter DR. Mechanical induction in limb morphogenesis: the role of growth-generated strains and pressures. *Bone* 2002;31:645-653
36. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998:S7-21
37. Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma* 2005;19:S4-6
38. Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Developmental aspects of fracture healing and the use of pharmacological agents to alter healing. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2003;3:297-303
39. Landry PS, Marino AA, Sadasivan KK, Albright JA. Bone injury response. An animal model for testing theories of regulation. *Clin Orthop Relat Res* 1996:260-273
40. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 2003;88:873-884
41. De Bastiani G, Aldegheri R, Renzi Brivio L. The treatment of fractures with a dynamic axial fixator. *J Bone Joint Surg Br* 1984;66:538-545
42. Goodship AE, Kenwright J. The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures. *J Bone Joint Surg Br* 1985;67:650-655
43. Goodship AE, Cunningham JL, Kenwright J. Strain rate and timing of stimulation in mechanical modulation of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998:S105-S115
44. Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77:940-956
45. Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury* 2007;38 Suppl 1:S11-25
46. Zhou FH, Foster BK, Zhou XF, Cowin AJ, Xian CJ. TNF-alpha mediates p38 MAP kinase activation and negatively regulates bone formation at the injured growth plate in rats. *J Bone Miner Res* 2006;21:1075-1088
47. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999;14:1805-1815
48. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002;17:513-520
49. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A:1544-1552
50. De Luca F, Barnes KM, Uyeda JA, et al. Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein-2. *Endocrinology* 2001;142:430-436

51. Burkus JK, Gornet MF, Dickman CA, Zdeblick TA. Anterior lumbar interbody fusion using rhBMP-2 with tapered interbody cages. *J Spinal Disord Tech* 2002;15:337-349
52. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89:747-754
53. Einhorn TA. Clinical applications of recombinant human BMPs: early experience and future development. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A Suppl 3:82-88
54. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A Suppl 1:S151-S158
55. Bluteau G, Julien M, Magne D, et al. VEGF and VEGF receptors are differentially expressed in chondrocytes. *Bone* 2007;40:568-576
56. Zelzer E, Glotzer DJ, Hartmann C, et al. Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires *Cbfa1/Runx2*. *Mech Dev* 2001;106:97-106
57. Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, et al. Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg* 2002;109:2384-2397
58. Nahar NN, Missana LR, Garimella R, Tague SE, Anderson HC. Matrix vesicles are carriers of bone morphogenetic proteins (BMPs), vascular endothelial growth factor (VEGF), and noncollagenous matrix proteins. *J Bone Miner Metab* 2008;26:514-519
59. Murakami S, Noda M. Expression of Indian hedgehog during fracture healing in adult rat femora. *Calcif Tissue Int* 2000;66:272-276
60. Xian CJ, Zhou FH, McCarty RC, Foster BK. Intramembranous ossification mechanism for bone bridge formation at the growth plate cartilage injury site. *J Orthop Res* 2004;22:417-426
61. Caplan AI. Bone development and repair. *Bioessays* 1987;6:171-175
62. Ngo TQ, Scherer MA, Zhou FH, Foster BK, Xian CJ. Expression of bone morphogenic proteins and receptors at the injured growth plate cartilage in young rats. *J Histochem Cytochem* 2006;54:945-954
63. Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 2003;24:218-235
64. Lottspeich F, Zorbach H. *Bioanalytik*. Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH; 1998
65. Pfaffl M. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 2004:92-95
66. Knopp MV, Giesel FL, Marcos H, von Tengg-Kobligk H, Choyke P. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in oncology. *Top Magn Reson Imaging* 2001;12:301-308

67. Cha S, Yang L, Johnson G, et al. Comparison of microvascular permeability measurements, K(trans), determined with conventional steady-state T1-weighted and first-pass T2*-weighted MR imaging methods in gliomas and meningiomas. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006;27:409-417
68. Leroy-Willig A, Geldwerth-Feninger. Textbook of in vivo Imaging in Vertebrates. In: Ntziachristos V, Leroy-Willig A, Tavitian B eds, Textbook of in vivo Imaging in Vertebrates. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.; 2007:1-56
69. Sarmiento A, Schaeffer JF, Beckerman L, Latta LL, Enis JE. Fracture healing in rat femora as affected by functional weight-bearing. *JBone Joint SurgAm* 1977;59:369-375
70. Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC. The expression of cytokine activity by fracture callus. *JBone MinerRes* 1995;10:1272-1281
71. Gerstenfeld LC, Edgar CM, Kakar S, et al. Osteogenic growth factors and cytokines and their role in bone repair. In, Engineering of functional skeletal tissues. London: Springer-Verlag; 2007:17-45
72. Sequeiros RB, Niinimaki J, Ojala R, et al. Magnetic resonance imaging-guided diskography and diagnostic lumbar 0.23T MRI: an assessment study. *Acta Radiol* 2006;47:272-280
73. Lee MA, Nissen TP, Otsuka NY. Utilization of a murine model to investigate the molecular process of transphyseal bone formation. *J Pediatr Orthop* 2000;20:802-806

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung A: Klassifikation von Epiphysenfugenverletzungen nach Salter-Harris I-V	3
Abbildung B: Wachstumsstörungen bei Kindern.....	4
Abbildung C: Abschnitte des Humerus als Beispiel eines langen Knochens	9
Abbildung D: Schematische Darstellung der Zusammensetzung von Knochengewebe [13-15].....	11
Abbildung E: Stammzellendifferenzierung	12
Abbildung F: histologische Übersicht über Epiphyse, Wachstumsfuge (growth plate) und Metaphyse	18
Abbildung G: Detailansicht der Fuge mit Zoneneneinteilung	19
Abbildung H: Aufbau eines hyalinen Knorpels	23
Abbildung I: Zusammenfassung der Regulatoren für das Knochenwachstum.....	29
Abbildung J: Expression der wichtigsten regulatorischen Faktoren	39
Abbildung K: Phasen der Heilung bei Epiphysenfugenläsionen	41
Abbildung L: ABI 7900 Sequence Dtection System®	49
Abbildung M: Siemens Magnetom Trio (Bild von www.medical.siemens.com).....	50
Abbildung N: Darstellung des Operationsablaufs	53
Abbildung O: delta-delta CP Werte der CD31 Auswertung mittels qRT-PCR	57
Abbildung P: delta-delta CP Werte der HIF-1 α Auswertung mittels qRT-PCR	58
Abbildung Q: delta-delta CP Werte der BMP-2 Auswertung mittels qRT-PCR	59
Abbildung R: delta-delta CP Werte der VEGFa Auswertung mittels qRT-PCR.....	60
Abbildung S: delta-delta CP Werte der VEGFR1 Auswertung mittels qRT-PCR	61
Abbildung T: delta-delta CP Werte der VEGFR2 Auswertung mittels qRT-PCR	62
Abbildung U: T2-gewichtet MRT-Bilder der Ratte 1 aus der MRT-Kontroll-Gruppe	63
Abbildung V: Transferkoeffizient (K^{trans}) im Verlauf der Heilung.....	64
Abbildung W: Kontrastmittel-Aufnahme-Kurven von Ratte 2 aus der MRT-Kontroll-Gruppe	65

Tabellenverzeichnis:

Tabelle A: Anforderungen an einen optimalen Primer [63]	43
Tabelle B: Gruppeneinteilung der Versuchstiere	47
Tabelle C: Medikamentenliste.....	48
Tabelle D: Verwendete Primer der qRT-PCR	49
Tabelle E: Herstellung der FDD-Narkoselösung	51
Tabelle F: Antidot für FDD Narkose.....	54