

Untersuchung der Wachstumsfuge nach transepiphysärer Bohrung

-

Etablierung der Kollagenfärbung I und II

Diplomarbeit
zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor (in) der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der
Medizinischen Universität Graz
Universitätsklinik für Kinderchirurgie – LKH Graz

eingereicht von
Ursula Neun
Matrikelnr.: 0433358

Betreuung durch
Prof. Dr. med. Annelie-Martina Weinberg
Dr. med. univ. Eva Elisa Widni

Graz, am 6.10.2010

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	9
2. GRUNDLAGEN.....	10
2.1. Der Knochen.....	10
2.1.1. Knochenarten.....	12
2.2 Die Knochenbildung.....	12
2.2.1 Desmale/Intermembranöse Ossifikation.....	13
2.2.2 Enchondrale Ossifikation.....	13
2.2.3 Perichondrale Ossifikation.....	14
2.3. Die einzelnen Zellen des Knochens.....	15
2.4. Die Wachstumsfuge (Epiphysenfuge).....	16
2.5. Regulation des Längswachstums.....	18
2.5.1. Hormonelle Wachstumsregulation.....	18
2.5.2. Lokale Regulation.....	20
2.6. Die extrazelluläre Matrix von Knochen und Knorpel.....	23
2.6.1. Die Kollagene.....	23
2.6.2. Andere Matrixproteine.....	24
2.7. Die Matrix des Knorpelgewebes.....	25
2.8 Vaskularisation des Knochens - im Speziellen der Wachstumsfuge.....	26
2.9 Die Knocheninnervation.....	27
2.10 Allgemeine Frakturlehre.....	28
2.10.1 Klinik und Diagnostik.....	29
2.10.2 Allgemeine Therapiemaßnahmen bei Frakturen.....	30
2.11 Verletzungen der Epiphysenfuge.....	31
2.11.1 Klassifikation nach Salter Harris:.....	31
2.11.2 Übergangsfrakturen.....	34
2.12 Therapeutische Maßnahmen und Folgeerscheinungen bei Wachstumsfugenverletzungen.....	34
2.12.1 Die Spontankorrektur.....	35
2.12.2 Wachstumsstörungen.....	35
2.13 Der Prozess der Frakturheilung.....	36
2.14. Reparaturmechanismen bei Verletzungen der Epiphysenfuge.....	39
3. MATERIAL UND METHODIK.....	40
3.1. Das verwendete Material.....	40
3.1.1 Die Versuchstiere.....	40
3.1.2 Tierställe, Kühlgeräte, Operationsräumlichkeiten.....	41
3.1.3. Verwendete Medikamente.....	41

3.1.4.	Labor, Geräte für die Anfertigung der Schnitte	43
3.1.5	Verwendete Antikörper.....	43
3.2.	Methodik	44
3.2.1	Die Operation.....	44
3.2.2	Euthanasie und Entnahme der Knochen	48
3.2.3	Die Aufbereitung der Knochen.....	48
3.2.4	Die Herstellung der Gefrierschnitte.....	49
3.2.5	Immunhistochemische Färbung – Kollagen I und Kollagen II.....	51
3.2.5.1	Das Färbeprotokoll	51
4.	ERGEBNISSE	55
4.1.	Erster postoperativer Tag.....	55
4.2.	Dritter postoperativer Tag.....	58
4.3.	Siebenter postoperativer Tag	60
4.4.	14. postoperativer Tag	62
4.5.	28. postoperativer Tag	66
4.6.	42. postoperativer Tag	68
4.6.	82. postoperativer Tag	69
4.7.	Negative Kontrolle.....	72
4.8.	Ein kurzer Überblick.....	73
5.	DISKUSSION	74
6.	Literaturverzeichnis	76

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 am 6.10.2010

Neun Ursula

DANKSAGUNG

Zu Beginn möchte ich mich bei meinen beiden Betreuerinnen Prof. Dr. Annelie- Martina Weinberg, der Leiterin unserer Forschungsgruppe, und Dr. med. univ. Eva Elis Widni für die tatkräftige Unterstützung danken.

Die praktische Arbeit im Labor wäre ohne die Hilfe von Fr. Kuesz Anna und das organisatorische Talent von Mag. Kraitsy Klaus nicht möglich gewesen. Herzlichen Dank für Eure stetige Hilfe, ohne die ich diese Arbeit nicht hätte bewältigen können.

Bedanken möchte ich mich bei allen Kollegen in der Forschungsgruppe, die auch immer Lösungsvorschläge für Probleme und offene Ohren für meine Fragen hatten.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich das ganze Studium hindurch immer tatkräftig unterstützt haben.

DANKESCHÖN !!!

Zusammenfassung

Einleitung:

Frakturen mit Beteiligung der Wachstumsfuge sind ein häufig auftretendes Problem im klinischen Alltag. Infolge der Verletzung dieser sensiblen Struktur kann es zum Auftreten einer Wachstumsstörung kommen. Dies macht sich in Form von Achsen- und Rotationsfehlstellungen bemerkbar. Trotz intensiver Forschung sind die genauen Zusammenhänge und die genauen Mechanismen, die für die Entstehung einer Knochenbrücke, die nach einer Fraktur auftreten kann, noch nicht bekannt.

Material und Methodik:

Für die Versuche wurden 42 fünf Wochen alte Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht von 100-120g in sieben randomisierte Gruppen a sechs Tiere eingeteilt. Nach dem Setzen der Bohrlochläsion in die jeweilige linke Tibia von 5 Tieren pro Gruppe, wurden an den postoperativen Versuchstagen 1, 3, 7, 14, 28, 42 und 82 die Ratten euthanasiert und die Knochen entnommen. Eine Ratte pro Gruppe diente als Kontrolltier. Nach dem Entkalken der Knochen wurden die Gefrierschnitte angefertigt. Mit Hilfe der primären Antikörper Anti-Collagen Type I der Firma Sigma® und ClIC1 Ak der Firma IOWA® wurden die Kollagen I und Kollagen II Färbungen angefertigt. Die Auswertung erfolgte unter dem Lichtmikroskop und anhand der Fotografien.

Ergebnisse:

Am ersten Versuchstag zeigen sich hauptsächlich Hämatom und abgesplitterte Knochenfragmente in der gesetzten Läsion. Am Tag 3 findet man aufgrund der Inflammation vermehrt Entzündungszellen. Das Hämatom beginnt sich zu organisieren. Am Tag 7 treten vermehrt mesenchymale Zellen und erste Anzeichen für eine Knochenneubildung auf. Im Randbereich der Läsion ordnen sich Zellen an, die wie Knorpelzellen imponieren. In den meisten Schnitten zeigen sie eine Kollagen II positive Färbung. Diese Zellen bleiben bis inkl. Tag 42 sichtbar. Am Tag 14 sind die Knochenbälkchen bereits ausgebildet, von einer Knochenbrücke kann man am Tag 28 sprechen. Bis zum Tag 82 bildet sich eine den ganzen Defekt ausfüllende Knochenbrücke.

Diskussion:

Eine Knochenbrückenbildung konnte anhand der Kollagenfärbungen eindeutig nachgewiesen werden. Die Knochenbildung scheint am Tag 7 bereits zu beginnen und endgültig von einer zusammenhängenden Brücke kann man am Tag 28 sprechen. Auf welchem Weg diese Brücke entsteht kann nicht eindeutig nachgewiesen werden. Jedoch findet man im Randbereich der Läsion Zellen, die wie Knorpelzellen imponieren und in den meisten Schnitten eine Kollagen II positive Färbung aufweisen. Dies könnte ein Hinweis auf eine enchondrale Knochenbildung sein.

Abstract

Introduction:

Fractures involving the physal growth plate is a daily clinic problem. Damage to this fragile structure might cause growth arrest which lead to limb deformities. Although there's intensive research at this topic, the background of the formation of the bone bridge is still a mystery.

Methodes and Material:

42 Sprague-Dawley rats at the age of 6 weeks and a mass of 100 up to 120g were splitted in 7 groups by random. Five rats were operated and one was used as control. After drilling an axial hole through the proximal epiphyses of the left tibia, the rats were euthanized on day 1, 3, 7, 14, 28, 42, 82. Bones were extracted carefully. After the decalcification slides were made with a cryomicrotom. Histological staining was made with collagen I (Sigma®) and collagen II (Iowa®) antibodies according to the protocol. All sections were analyzed under the microscop.

Results:

On the first postoperativ day there is hematoma and bone fragments caused by drilling. On day 3 you can find a lot of inflammatory cells and an organizing hematoma. The first signs for new bone tissue appear on day 7. You can also find mesenchymal cells. Joining the fracture zone there are a few chondrocyte like cell with positiv collagen II immunostaining. The cells can be seen until day 42. On day 14 bone trabeculae cross the epiphyseal growth plate. A mature

bone bridge had been found on day 28 which fills up the whole lesion on day 82.

Discussion:

The formation of a bone bridge was documented by this research. The first signs of a new bone tissue appear on day 7 and a mature bone bridge can be found on day 28. The origin of this bone tissue is still not clear. The chondrocyte like cells which were found along the lesion might be a hint that the bone bridge is formed by enchondral ossification, but further investigation is necessary to proof it.

1. EINLEITUNG

Zwischen dem kindlichen und dem erwachsenen Bewegungsapparat bestehen grundsätzliche Unterschiede. Die Besonderheit des Kindes gegenüber dem Erwachsenen liegt in seiner Potenz zum Wachstum. Kindliche Frakturen sind ein alltägliches Vorkommen in vielen Kliniken dieser Welt. Ist jedoch die Wachstumsfuge, der sensibelste Teil des kindlichen Knochens, von der Fraktur betroffen, ist mit eventuellen späteren Wachstumsstörungen zu rechnen. Vor allem während Phasen raschen Wachstums ist die Epiphysenfuge extrem anfällig für Verletzungen, weil sie zu diesem Zeitpunkt am fragilsten ist. Während Salter Harris Typ I und Typ II Verletzungen meist ohne schwerwiegende Folgen ausheilen, kommt es bei Typ III und IV Verletzungen häufig zu Achsenfehlstellungen, Rotationsfehlstellungen und Fehlstellungen ganzer Extremitäten.[1], [2], [3], [4]

Die Therapie von Verletzungen der Wachstumsfuge ist abhängig von der Lokalisation, vom Schweregrad und vom Alter des Patienten. Man sollte darauf achten, dass die Reposition immer in kindgerechter Anästhesie erfolgt um das Kind nicht noch mehr zu verschrecken. Wiederholte Repositionen sind unbedingt zu vermeiden um weitere Verletzungen dieses sensiblen Bereiches des Knochens zu schonen. [4]

Bei all dem Wissen und der Vorsicht in der Behandlungsweise kann man trotzdem erst am Ende des Wachstums ein Endergebnis der Heilung sehen. Deshalb ist es von großer Wichtigkeit, die Vorgänge in der Wachstumsfuge bei deren Verletzung genau zu untersuchen und zu verstehen. So besteht die Chance spätere Fehlstellungen und Einschränkungen im Bewegungsapparat zu vermeiden. [4]

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Entstehung einer Knochenbrücke nach dem Setzen einer Bohrlochläsion. Es wurde im Rattenmodell eine Fraktur der proximalen Epiphysenfuge einer Tibia imitiert. Danach wurden histologische Färbungen mit Kollagen I und Kollagen II Antikörpern erstellt um exakt feststellen zu können, wann genau das erstmals Anzeichen für eine Knochenbrücke im Bohrlochkanal auftreten.

2. GRUNDLAGEN

2.1. Der Knochen

Der Knochen hat als Teil des menschlichen Bewegungsapparates sowohl eine wichtige Stütz- als auch Haltefunktion. Das Skelettsystem besteht aus ca. 204 Knochen, welche dem Körper seine individuelle Form verleihen. Außerdem hat der Knochen neben seiner Schutz- und Stützfunktion [5] auch eine entscheidende Rolle im Kalzium- und Phosphathaushalt.

Der Knochen baut sich aus **4 makroskopisch trennbaren Anteilen** auf. Von Außen nach Innen beschreibend, trifft man zuerst auf die Knochenhaut, auch **Periost** genannt. [5] Während des Knochenwachstums baut sich das Periost aus zwei Schichten auf. Das zellreiche und gefäßdurchzogene Stratum osteogenicum stellt eine Differenzierungszone für osteogenetische Stammzellen dar, die hier zu Osteoblasten heranreifen. Nach Abschluss des Wachstums findet man diese Zone im gesunden Knochen nicht mehr. Die dickere äußere Schicht des Periostes, das Stratum fibrosum, besteht hauptsächlich aus einem Geflecht von bindegewebigen Fasern. Das Periost ist nicht nur von vielen Blut- und Lymphgefäßen durchzogen, sondern auch sehr gut innerviert, was zu hoher Schmerzempfindlichkeit führt. Die **Substantia compacta oder Kortikalis** ist der äußere harte, formgebende Anteil des Knochens. In der Compacta befinden sich kleine Kanälchen, welche die Blutgefäße für die Versorgung der **Substantia spongiosa** und des **Knochenmarks**, enthalten. Die Substantia spongiosa ist die innere bälckchenartig aufgebaute Struktur des Knochens. Zwischen diesem maschenartigen Netzwerk befindet sich das Knochenmark. [5], [6]

Nach der äußeren Form können verschieden Knochentypen unterschieden werden:

- Ossa longa: Diese Knochen bilden die menschlichen Extremitäten und werden auch als Röhrenknochen bezeichnet. Sie setzen sich aus dem

Schaft/Diaphyse und zwei Epiphysen zusammen. Zwischen der Diaphyse und der Epiphyse befindet sich die Metaphyse. Während der Wachstumsphase liegt zwischen der Metaphyse und der Epiphyse die Wachstumsfuge.

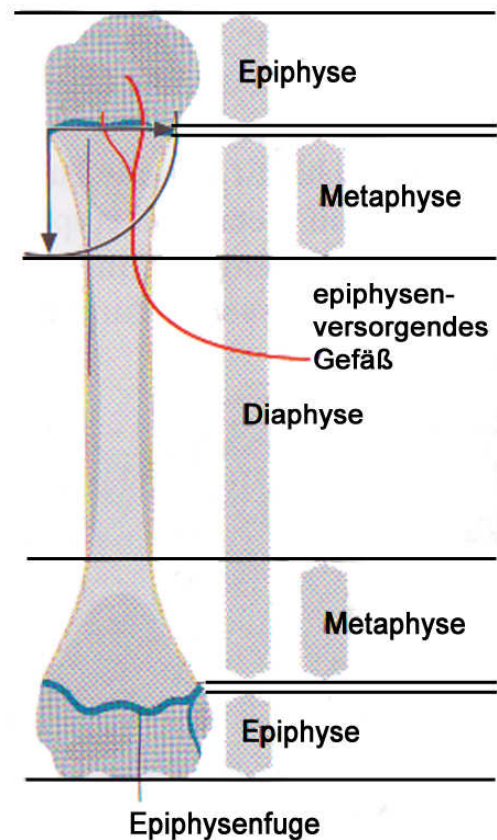


Abb. 1 :Abschnitte des Humerus als Beispiel eines langen Knochens
 (aus Weinberg, Tscherne, 2006, Unfallchirurgie im Kindesalter Band I, S.4, Abb.1.2.)

- Ossa brevia: Kurze Knochen befinden sich im Bereich der Hand- und Fußwurzel. Ihre Kortikalis ist im Vergleich zu den Röhrenknochen wesentlich dünner.
- Ossa plana: Platte Knochen bestehen aus eine äußeren und inneren Kortikalis, die dazwischen eine unterschiedlich dicke Spongiosa enthalten. Beispiele für platte Knochen sind Brustbein, Schulterblatt und Hüftbein
- Ossa pneumatica: Dieser Typ Knochentyp enthält pneumatisierte, mit Schleimhaut ausgekleidete Hohlräume. Ossa pneumatica befinden sich im Bereich des Schädels wie z.B. das Sieb-, das Keil- oder der Oberkiefer

- Ossa irregularia: Das sind jene Knochen, welche sich nicht in die eben erwähnten Kategorien einordnen lassen. Dazu gehören die Wirbelknochen. [5]

2.1.1.Knochenarten

Histologisch lassen sich zwei Arten von Knochen unterscheiden. Der Geflechtknochen (oder Primärknochen) tritt vor allem während der Knochenbildung auf und wird in der Entwicklung fast überall durch Lamellenknochen ersetzt. Dieser Knochen unterscheidet sich vom Lamellenknochen dadurch, dass er weniger Mineralgehalt besitzt und die Kollagenfibrillen nicht regelmäßig angeordnet sind.

Der Lamellenknochen baut sich, wie der Name bereits verrät, aus lamellären Schichten von Kollagenfibrillen auf, die sich konzentrisch um einen zentralen Kanal anordnen. Dieser Kanal wird Haver-Kanal genannt und enthält die nutritiven Gefäße, Nerven und lockeres Bindegewebe. Die konzentrischen Lamellen und der Kanal werden als Havers-System oder Osteon bezeichnet. Untereinander kommunizieren die Osteone über sogenannte Volkmannkanäle, die meist schräg verlaufen und eine Verbindung zum Knochenmark und Periost besitzen. Lamellen, die sich nicht in einem Haver-System befinden sondern irregulär dazwischen verlaufen nennt man Schaltlamellen. [7]

2.2 Die Knochenbildung

Wenn Knochen direkt aus dem mesenchymalen Bindegewebe entsteht spricht man von desmaler Ossifikation. Die meisten Anteile des Skelettsystems werden aber in der embryonalen Entwicklung zuerst als hyaliner Knorpel angelegt. Diese Form der Knochenbildung wird als enchondrale Ossifikation bezeichnet. [8]

2.2.1 Desmale/Intermembranöse Ossifikation

Zu Beginn der desmalen Ossifikation sammeln sich Mesenchymzellen und bilden das primäre Ossifikationszentrum. Diese Zellen wandeln sich in mehreren Schritten zu Osteoblasten um, welche mit der Produktion von Knochematrix beginnen. Durch das Verkalken der Knochengrundsubstanz und das Einkapseln der Osteoblasten entstehen Knochenbälkchen. Für die weitere Versorgung und Entwicklung sprossen Blutgefäße ein. Weitere Mesenchymzellen differenzieren sich zu Knochenmarkszellen. Durch das Verschmelzen der Ossifikationszentren formt sich der heranwachsende Knochen.

Durch desmale Ossifikation entstehen Teile des Neurocraniums sowie die Maxilla und Mandibula. [7]

2.2.2 Enchondrale Ossifikation

Am Anfang der enchondralen Ossifikation steht die Kondensation von mesenchymalen Zellen zu einem Cluster. Anders als bei dem oben beschriebenen Vorgang der desmalen Ossifikation entstehen nicht sofort Osteoblasten, sondern primär Knorpelzellen (Chondrozyten). Diese Zellen im Zentrum der Knochenanlage beginnen zu proliferieren und sezernieren eine Matrix, die reich an Kollagen I und Aggrecan (einem Proteoglycan) ist. Die Knorpelmasse vergrößert sich nun immer mehr durch Vermehrung und Matrixproduktion der Chondrozyten. Irgendwann stoppen die innersten Chondrozyten ihre Zellteilungen und beginnen hypertrophieren. Von jetzt an synthetisieren diese Zellen Kollagen Typ X. Diese hypertrophen Chondrozyten regulieren die Mineralisation der umgebenden Matrix und locken unter anderem durch die Produktion von VEGF (vascular endothelial growth factor) Blutgefäße an. Außerdem signalisieren sie den Zellen des Perichondriums sich zu Osteoblasten zu differenzieren, sodass diese Zellen beginnen den äußeren Knochenring zu formen. Wenn dies alles initialisiert wurde, treten die hypertrophierenden Knorpelzellen in die Apoptose ein. Zurück bleibt ein

Knorpelgerüst, welches von den einsprossenden Gefäßen durchzogen ist. Mit den Blutgefäßen wandern hämatopoetische Stammzellen, Chondroklasten (Zellen, welche die Knorpelsubstanz zum Teil wieder abbauen) und Osteoblasten ein. Prolifizierende Chondrozyten am Rande des Knorpelgerüsts verändern ihre Form. Sie werden flach, diskoid und ordnen sich in Säulen an. Mit dieser Veränderung beginnen die Zellen auch mit vermehrtem Wachstum in eine Achse um den Knochen seine typische Form zu verleihen. Sobald der Knochen eine bestimmte Größe erreicht hat, bilden sich sogenannte sekundäre Ossifikationszentren aus. Damit ist gemeint, dass an bestimmten Stellen erneut Chondrozyten zu hypertrophieren beginnen. In den langen Röhrenknochen der Extremitäten bildet sich nun zwischen diesen beiden Ossifikationszentren eine Knorpelschicht aus. Jene Schicht stellt die Wachstumsfuge oder auch Epiphyse dar. Sie verschließt sich nach dem abgeschlossenen Wachstum am Ende der Pubertät. [9], [10]

2.2.3 Perichondrale Ossifikation

Um die stabile Form eines Knochens zu gewährleisten, darf er nicht nur in die Länge wachsen. Er muss auch an Breite zunehmen um nicht zu brechen. Rund um die Diaphyse liegt das Periost, welches in der inneren Schichte osteogenetische Zellen besitzt. An der Epiphyse geht das Periost in einen Ring aus Knorpelgewebe über (perichondraler Ring). Dort wird der Knochen durch den Vorgang der Apposition gebildet. Die Osteoblasten im Periost produzieren Knochenmatrix, die sie immer weiter anbauen. Manche von ihnen werden „eingemauert“ und es entstehen Osteozyten. Im kindlichen Körper scheint dies ein kontinuierlicher Prozess zu sein, während man annimmt, dass beim Erwachsenen An-, Um- und Abbauvorgänge einem Zyklus unterliegen. [11]

2.3. Die einzelnen Zellen des Knochens

Osteoblasten

Osteoblasten sind im aktiven Zustand kubische bis zylinderförmige Zellen, die die organischen Komponenten der Knochenmatrix produzieren. Zu erkennen sind sie an ihrem basophilen Zytoplasma und einer hellen Golgi-Zone. Im gut formierten endoplasmatischen Retikulum werden die Matrixproteine wie Kollagen I und Proteoglykane synthetisiert, die im Golgiapparat in Vesikel verpackt werden und über die Zelloberfläche freigesetzt werden. So entsteht zunächst Osteoid, wie die noch nicht verkalkte Matrix auch genannt wird. [7]

Osteozyten

Osteozyten machen 90-95% aller Knochenzellen aus. Warum aus manchen Osteoblasten Osteozyten entstehen ist noch nicht geklärt. Manche von den knochenbildenden Zellen werden komplett von Osteoid umgeben. Sobald das Osteoid ist verkalkt und die Zellen „eingemauert“ sind, nennt man sie Osteozyten. Lange Zeit hat man geglaubt, dass diese Zellen wenig Funktion haben und nur als Platzhalter dienen. Osteozyten reagieren auf Formveränderungen und Kräfteeinwirkungen von außen auf den Knochen. Sie kommunizieren mit den anderen Zellen des Knochens um sich dementsprechend an die äußeren Belastungen anzupassen. Wie können Osteozyten untereinander und mit anderen Zellen in Verbindung treten? Sie besitzen lange Fortsätze (Dendriten), die sich in den Kanalikuli erstrecken. Außerdem können sie diese Dendriten ausstrecken und wieder einziehen. Der Zellkörper verändert sich laufend und reagiert auf Scherkräfte. [12]

Osteoklasten

Osteoklasten sind jene Zellen, die Knochenmatrix abbauen. Dadurch helfen sie den Kalziumhaushalt des menschlichen Körpers zu kontrollieren. Sie gehören zum mononukleären Phagozytosesystem und entstehen aus der myeloischen Stammreihe. Durch ihre resorptive Fähigkeit spielen sie eine entscheidende Rolle in Knochenumbauprozessen. Sie sind mit einem Durchmesser von 50-100µm relativ große Zellen. Da sie durch die Verschmelzung von

Vorläuferzellen entstehen, besitzen sie mehrere Zellkerne. Am häufigsten findet man sie in der Metaphyse von wachsenden Knochen. [7], [13]

2.4. Die Wachstumsfuge (Epiphysenfuge)

Morphologie

Die Wachstumsfuge baut sich histologisch aus vier verschiedenen Zonen auf. Beginnen wir mit der „obersten Schicht“ und arbeiten uns bis zu dem Teil der Wachstumsfuge, der der Metaphyse am nächsten ist, durch.

1. Zone des ruhenden Knorpels (*Resting zone*)

Hier ist das Verhältnis von Interzellulärsubstanz zu Chondrozyten relativ hoch. Die Zellen befinden sich in einer Ruhephase. [15]

2. Proliferative Zone (*columnar zone, zone of maturation*)

In dieser Schicht der Wachstumsfuge flachen die Chondrozyten ab und beginnen sich zu teilen. Durch die Synthese von Matrix können die neu gebildeten Zellen von einander getrennt werden. Die Extrazellulärsubstanz besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ II. Jedoch werden auch Kollagen Typ IX und Typ XI exprimiert. Kollagen IX Moleküle winden sich um die Oberfläche von Kollagen II Fibrillen, mit denen sie in kovalenter Verbindung stehen. Typ XI Kollagen soll die Interaktion zwischen Kollagen II Fibrillen und der extrazellulären Matrix mediieren. Aggrecan das größte Proteoglykan der Wachstumsfuge, ist verantwortlich für die osmotischen Eigenschaften des Knorpelgewebes. Das ermöglicht es dem Knorpel sich an die einwirkenden Druckkräfte anzupassen. Man findet auch Decorin und Biglycan, zwei kleinere Proteoglykane, sowie COMP (Cartilage oligomeric protein) in der Extrazellulärsubstanz.

Die Knorpelzellen sind hier, wie der Name columnar zone bereits verrät in Säulen angeordnet. Jede Säule aggiert eigenständig und wächst durch Zellteilung. Die Chondrozyten teilen sich nur in dieser Schichte der Wachstumsfuge. [14], [15], [16]

3. Hypertrophe Zone

Hier differenzieren sich die Chondrozyten endgültig. Ihr Zellvolumen steigt auf das 5-10fache an. Damit nimmt auch die Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase zu. Die Chondrozyten beginnen mit der Produktion von Kollagen X, welches einzig in dieser Schicht des Knorpels zu finden ist. In dieser Zone beginnt die Synthese von wenig kristallinem Hydroxylapatit, der später durch Mineralisation zu hartem Knochen wird. Außerdem bereiten hypertrophe Chondrozyten in geordneten Säulen die entstehende Knochematrix für die Kalzifikation und das Einsprossen von Gefäßen vor. Die Knochematrix „wächst“ zwischen den Knorpelzellensäulen in Septen bzw. Bälkchen. [14], [15], [16]

4. Resorptionszone (*Zone of vascular invasion*)

Diese Schicht wird von Blutgefäßen aus der Metaphyse, die bis in die hypertrophe Zone eindringen, durchbrochen. Zwei Drittel der longitudinalen Septen werden aktiv von Chondroklasten abgebaut. Das andere Drittel bleibt als Leitstruktur für die Osteoblasten bestehen. Diese übriggebliebenen Septen enthalten sowohl mineralisierten Knorpel als auch Knochenmatrix. Man spricht von Primärtrabekel, welche in der Metaphyse zu Knochenlamellen umgewandelt werden. Die terminal differenzierten Chondrozyten treten nach Vollendung ihrer Aufgabe in die Apoptose ein und schaffen somit auch Platz für die eintretenden Blutgefäße.[14],[15],[16]

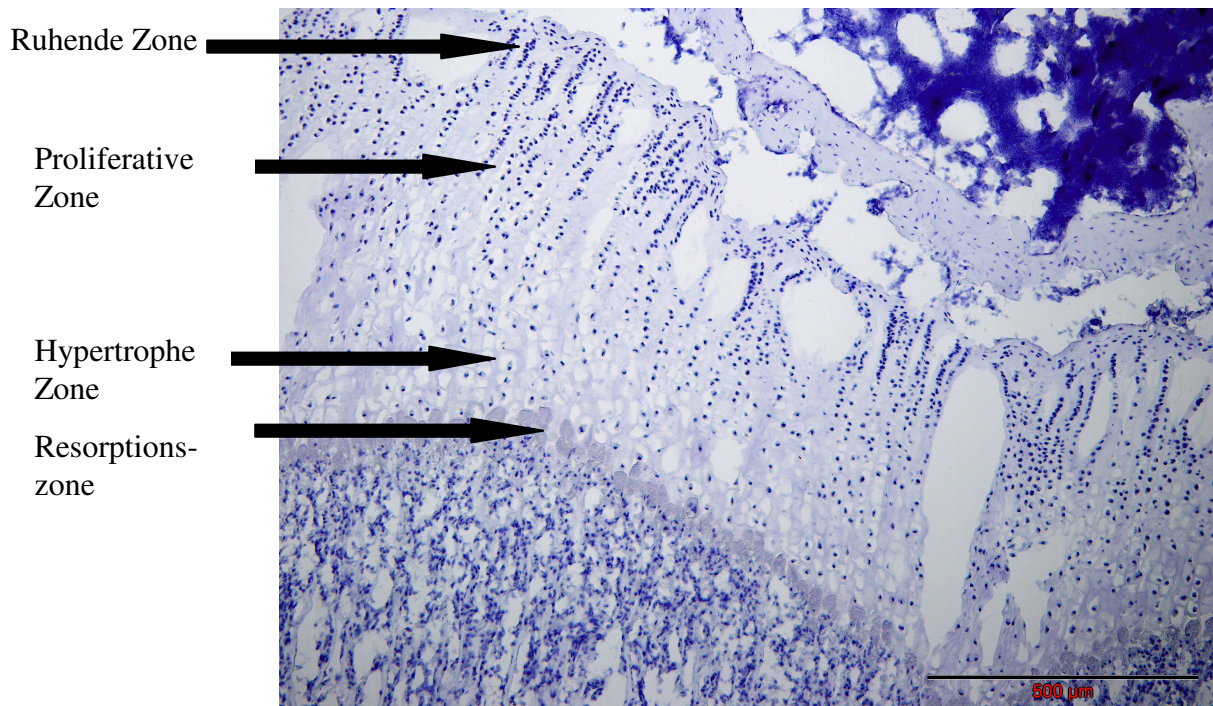


Abb.2: Fotografie einer Epiphysenfuge mit Darstellung der einzelnen Wachstumszonen. Negativfärbung D0R5_Neg._S60b (nicht gebohrt)

2.5. Regulation des Längswachstums

Das Längswachstum von Röhrenknochen wird sowohl von systemischen Faktoren als auch von lokalen Vorgängen kontrolliert.

Man kann das Wachstum in drei endokrine Phasen einteilen. Im Mutterleib wächst der Fetus sehr rasch, was sich nach der Geburt bis etwa zum dritten Lebensjahr wieder verlangsamt. Danach wächst das Skelett eines Kindes mit konstanter Geschwindigkeit bis zur Pubertät. In der Pubertät befindet sich der Mensch erneut in einer Phase erhöhten Längswachstums. Dieser Wachstumsschub setzt sich fort, bis die endgültige Körpergröße erreicht wird und sich die Epiphysenfugen schließen. [17]

2.5.1. Hormonelle Wachstumsregulation

Die wichtigsten Hormone, welche das Skelettwachstum während der Kindheit steuern sind GH (*Growth hormone*, Wachstumshormon), IGF-I (*Insulinlike growth factor*), die Schilddrüsenhormone (T3 und T4) sowie Glukokortikoide.

Während der Pubertät übernehmen Androgene und Östrogene die entscheidende Rolle. [17]

1. GH und IGF I

Vor der Geburt regulieren vor allem IGF I und II unabhängig von GH das Längswachstum. Postnatal sind GH und IGF I Schlüsselhormone in der Hypothalamus-Hypophysen-Wachstumsfugen-Achse. Das Wachstumshormon (GH)

wird von der Hypophyse in pulsatiler Form sezerniert. GH wirkt auf Chondrozyten in der Ruhezone und stimuliert die lokale IGF I – Produktion, welches die Hypertrophie und Differenzierung der Chondrozyten kontrolliert. IGF wird auch in der Leber synthetisiert und kann genauso wie GH direkt die Stammzellen der Wachstumsfuge anregen. Die Ausschüttung von GH führt zu einer vermehrten Zellteilung und Verdickung der Fuge. [16], [17]

2. Schilddrüsenhormone

T3 und zu einem geringeren Grad auch T4 sind für eine normale Knochenentwicklung mitverantwortlich. Kongenitale Hypothyreose oder ein Defizit an T3 führen zu schwerer Wachstumsretardierung wobei eine Hyperthyreose zu einer höherer Wachstumsgeschwindigkeit und einem frühzeitigem Schluss der Wachstumsfuge führt. Beide Hormone beeinflussen die GH-Sekretion aus der Hypophyse und wirken auch lokal auf die Wachstumsfuge. Thyroxin induziert außerdem die Synthese von Kollagen Typ X durch die Induktion von BMP 2 (bone morphogenetic protein). [16], [17]

3. Glukokortikoide

Glukokortikoide in höheren Dosen und über einen längeren Zeitraum verursachen eine geringere Extension der Wachstumsfuge, steigern die Apoptoserate von ausdifferenzierten Chondrozyten und reduzieren Proliferationszone durch Hemmung der Proteinsynthese. Außerdem interferieren sie mit der GH-IGF-Achse, stimulieren Osteoklasten und supprimieren die Osteoblastenfunktion. In Überdosierung verhindern Glukokortikoide die Gefäßeinsprossung im Knochen-Knorpelzonenübergang. Auf den Muskel besitzen sie eine tonussenkende Wirkung. [16]

4. Östrogene und Androgene

Die Sexualhormone tragen vor allem in der Pubertät zur Kontrolle des Längswachstums bei. Östrogen hat sowohl inhibitorische als auch stimulierende Auswirkung auf das longitudinale Wachstum (über die GH-IGF Achse) und ist wichtig für den späteren Schluss der Wachstumsfuge. Androgene haben eine rein wachstumssteigernde Wirkung. Beide Hormone besitzen die Fähigkeit zur direkten Einflussnahme an den Chondrozyten in der Epiphysenfuge über die entsprechenden Hormonrezeptoren. [16], [18]

2.5.2. Lokale Regulation

Indian hedgehog (Ihh) und Parathyroid hormon related peptid (PTHrP)

Indian hedgehog ist ein Protein, das von prähypertrophen Chondrozyten und gerade hypertrophierten Chondrozyten während der enchondralen Ossifikation synthetisiert wird. Es koordiniert die Chondrozytenproliferation- und Differenzierung und die Differenzierung von Osteoblasten. Ihh bindet an seinen Rezeptor Patched-1 (Ptc-1), was zu einer Aktivierung des Membranproteins Smoothed (Smo) führt und eine intrazelluläre Signalkaskade bis zur Genaktivierung auslöst. Mäuse mit einem Defekt im Ihh System zeigen zwar einen normalen Knochenaufbau, aber Defizite im Knochenwachstum. Bei Tieren mit Fehlern in der Signalkaskade sind alle Knorpel Elemente des Knochens durch eine erniedrigte Chondrozytenproliferation vermindert. Hypertrophe Chondrozyten treten aber vermehrt auf. Dies entsteht möglicherweise dadurch, dass die Knorpelzellen verfrüht in das Stadium der Hypertrophie eintreten. Des Weiteren fehlen diesen Mäusen Osteoblasten in der primären Spongiosa. [9]

PTHrP wird in der Fetalperiode von perichondralen Zellen und von Knorpelzellen in der Proliferationszone produziert. Deren Rezeptoren sitzen in geringem Ausmaß auf proliferierenden Knorpelzellen und in höherem Ausmaß auf hypertrophen Chondrozyten. Die Hauptaufgabe von PTHrP ist es proliferierende Chondrozyten so lange wie möglich in diesem Stadium zu

halten. Ihh besitzt die Fähigkeit die PTHrP Synthese zu stimulieren und PTHrP verlangsamt den Prozess der Hypertrophie. Gemeinsam koordinieren sie die Länge der Proliferationszone und die Größe der einzelnen Knorpelsäulen in den jeweiligen Knochen. [9]

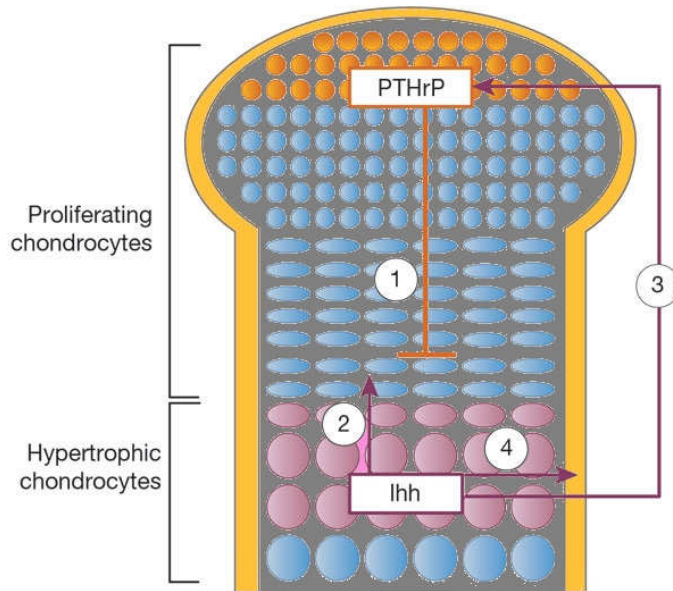


Abb.3: Schematische Darstellung des neg. Rückkopplungsmechanismus von Ihh (Indian hedgehog) und PTHrP (Parathyroid hormone related protein). PTHrP wird von perichondralen Zellen und Chondrozyten sezerniert. (1) PTHrP arbeitet an den Rezeptoren auf proliferierenden Chondrozyten um die Zellen sich weiter teilen zu lassen. PTHrP verzögert die Produktion von Ihh. Wenn die Quelle der PTHrP Produktion weit genug entfernt ist, kommt es zur Produktion von Ihh. Ihh wiederum steigert die Proliferationsrate von Chondrozyten und (2) stimuliert über einen wenig bekannten Mechanismus die Synthese von PTHrP am Ende des Knochens (3). Ihh hat auch eine Wirkung auf die perichondralen Zellen. Diese werden durch Ihh angeregt sich in Osteoblasten der Knochenmanschette umzuwandeln. (in Anlehnung an Kronenberg H.M. Developmental regulation of the growth plate. Nature 2003; S. 334: Figure 2)

Fibroblast Growth Factor (FGF)

Die bisher bekannten Wachstumsfaktoren aus dieser Familie besitzen ähnliche molekulare Struktur und können an vier verschiedenen Tyrosinkinase-Rezeptoren binden. [19], [20]

Die FGF-Rezeptoren 1-3 spielen in der Knochenentwicklung eine Rolle. FGFR3 wird auf den proliferierenden Knorpelzellen der Wachstumsfuge exprimiert. FGFR1 findet man auf hypertrophen und prähypertrophen Chondrozyten und FGFR2 konnte auf perichondralen Zellen nachgewiesen werden. [9]

Ein Ausschalten des FGFR3 Rezeptors führt im Mausversuch zu einer höheren Rate an Proliferation der Chondrozyten und zu einer Expansion der Knorpelsäulen. FGF3 greift auch in die PTHrP und Ihh Signalwege ein und führt bei Aktivierung zu einer verminderten Ihh Expression. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass FGF durch eine verminderte Chondrozytenproliferation und durch eine Suppression der Ihh Expression zu einer Verkürzung des Säulenknorpels führt. [9]

Bone morphogenetic protein (BMP)

BMPs, die auch *Growth and differentiation factors* (GDFs) genannt werden haben verschieden Rollen in der Knochen- und Knorpelentwicklung. Sie gehören zu einer Familie von parakrinen Faktoren, die heterodimere Rezeptoren aktivieren, welche Serin/Threonin-Aktivität besitzen. Entdeckt wurden die BMPs, weil sie nach s.c. Injektionen in Mäusen das enchondrale Knochenwachstum induziert haben. BMPs wirken in der frühembryonalen Entwicklung auf Mesenchymzellen ein und führen zu deren Kondensation. Im späteren Verlauf der Entwicklung sind sie für die Knorpelentwicklung wichtig. BMP2, -3, -4, -5, und 7 werden im Perichondrium exprimiert. BMP2 und -6 findet man an hypertrophen Chondrozyten und BMP7 befindet sich an proliferierenden Chondrozyten. BMP induziert sowohl die Proliferation als auch

die Differenzierung der Knorpelzellen. Es kann des Weiteren die Expression von Ihh steigern und hat somit antagonistische Wirkungen zu FGF. [9]

2.6. Die extrazelluläre Matrix von Knochen und Knorpel

2.6.1. Die Kollagene

Kollagene sind eine der am häufigsten vorkommenden Proteine des menschlichen Körpers (30% des Gesamtproteins). [21] Sie sind Hauptbestandteile von Knochen, Knorpel, Sehnen und Haut, wo sie sich dem entsprechenden Gewebe nach unterschiedlich anordnen. Kollagenfibrillen entstehen dadurch, dass sich die einzelnen Kollagenmoleküle zu seilartigen Strukturen verbinden, welche sich wiederum zusammenschließen und sich gegenseitig umwinden und eine Superhelix bilden. Diese Fibrillen lagern sich in einem geordneten System aneinander und es kommt zur Ausbildung von Kollagenfasern. [22]

Die unterschiedlichen Kollagentypen wurden nach ihrer Entdeckung mit römischen Ziffern chronologisch geordnet. Man kann Kollagene auch nach ihrer Struktur einteilen. Die Kollagentypen I –III, V, XI formen Fibrillen. Die Kollagenmoleküle vom Typ IV, VI-X, XII und XIX bilden keine Fibrillen. Zusätzlich sind die Kollagene IX, XII, XIV, XVI und XIX in die Kollagenfibrillen anderer Kollagene eingebaut und bilden daher keine eigene supramolekulare Struktur. [21]

	Knochen	Knorpel
Hauptkomponenten	Kollagen Typ I Kollagen Typ III Kollagen Typ X	Kollagen Typ II Kollagen Typ IX Kollagen Typ XI
Geringerer Anteil an	Kollagen Typ V Kollagen Typ VI Kollagen Typ XIII Kollagen Typ XIV	Kollagen Typ III Kollagen Typ VI Kollagen Typ XII Kollagen Typ XIII Kollagen Typ XIV

Tab.1: Kollagene von Knochen und Knorpelgewebe [21]

Kollagen I ist ein tripelhelicales Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 406 kDa und stellt das Hauptkollagen des Knochens dar. Durch die fibrilläre Struktur die über *cross-links* zusammengehalten wird, gibt es dem Knochen seine Festigkeit. Kollagen I interagiert mit den Matrixproteinen Decorin und Fibronectin. [21]

Kollagen II setzt sich ebenfalls aus einer Tripelhelix zusammen und hat ein Molekulargewicht von 425kDa. Es stellt das vorherrschende Kollagen des Knorpels und der intervertebralen Bandscheiben dar. Diese Kollagen verleiht dem Gewebe sowohl seine Festigkeit als auch seine Anpassungsfähigkeit gegenüber Scherkräften. Außerdem unterstützt es die Chondrozytenadhäsion und induziert die phänotypische Differenzierung der Zellen. [21]

2.6.2. Andere Matrixproteine

Obwohl eine Vielzahl an Matrixproteinen im Knochengewebe enthalten sind, haben drei davon eine größere Relevanz. Osteocalcin ist neben dem Kollagen das häufigste. Es gehört zur Familie der Gla-Proteine und wird spezifisch von Osteoblasten synthetisiert. Osteocalcin bindet Hydroxylapatit und reguliert den Anbau von Apatitkristallen. Osteonectin kommt in vielen verschiedenen

Gewebe vor und wird vermehrt in der Knochenentwicklung exprimiert und tritt in höheren Konzentrationen bei Knochenumbauvorgängen auf. Es bindet auch Hydroxylapatit und ist in die Osteoblasten Adhäsion involviert. Sialoprotein ist eine einzelne Polypeptidkette, die hauptsächlich Glutamatsäure, Aspartat und Glycin umfasst. Sialoprotein wird vor allem in neu gebildetem Knochen eingelagert. Es kann via Integrin mit anderen Zellen Kontakt aufnehmen und bindet wie die anderen beiden Proteine an Hydroxylapatit. Weitere Matrixproteine des Knochens sind die Glykoproteine Osteopontin, Alkalische Phosphatase, Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin. Zu den Gla Proteinen des Knochens gehören neben Osteocalcin noch Matrix Gla Protein und Protein S. Die Proteoglycane Decorin, Biglycan und Fibromodulin sind ebenfalls Bestandteile des Knochengewebes. [21]

2.7. Die Matrix des Knorpelgewebes

Die Grundsubstanz des Knorpelgewebes ist je nach anatomischer Lage und Alter eines Menschen unterschiedlich aufgebaut. Hier sind nur einige Beispiele kurz herausgegriffen. Aggrecan, ein großes chondroitinsulfathaltiges Proteoglycan, ist für den osmotischen Druck des Knorpels verantwortlich und kann dem Gewebe somit die Anpassungsfähigkeit an Kompressionskräfte ermöglichen. Die Hauptaufgabe dieses Proteoglycans besteht in der Hydratation des Kollagennetzwerkes. Aggrecan interagiert mit Hyaluronan, einem Polysaccharid, das von der Plasmamembran von Zellen produziert wird. Hyaluronan kommt in vielen Geweben vor und ist vor allem für die Entwicklung und Differenzierung verantwortlich. Des Weiteren ist es wichtig für die Wasser und Plasmaprotein Homeostase. Fibromodulin ist ein kleines chondroitinsulfat- und dermatansulfathaltiges Proteoglycan, welches an Kollagen Typ I und Typ II bindet. In vitro hat es die Eigenschaft, Kollagenfibrillogenese zu blockieren. Weitere Komponenten der Grundsubstanz sind Fibronectin, Vitronectin, Link protein, Chondroadherin, Prolargin, Thrombospondin, Biglycan, Decorin und einige mehr. [21]

2.8 Vaskularisation des Knochens - im Speziellen der Wachstumsfuge

Der Knochen wird über sogenannte Vasa nutricia, die nur an einigen wenigen Stellen des Knochens eintreten, versorgt. Diese Gefäße verzweigen sich nach dem Eintritt durch Foramina nutricia, welche beim Röhrenknochen im Schaftbereich angesiedelt sind, im endostalen Netzwerk. [5]

Die Wachstumsfuge besitzt eine epiphysäre und eine metaphysäre Grenze oder Anteil. Der epiphysäre Anteil wird von der Epiphyse durch eine Knochenspanne abgegrenzt. Diese Knochenspanne besteht aus Osteozyten, die von sehr dichtem Knochengewebe umgeben sind. Osteoklasten findet man hier keine vor. Zwischen den einzelnen Knochenspannen befinden sich kleine Lücken, durch die kleine Ateriolen hindurchtreten. Diese Gefäße reichen bis zu den ersten Schichten der Ruhezone. Dort verlieren sie ihre Membran und scheinen direkten Kontakt mit der vorhandenen Matrix zu haben (elektronenmikroskopisch sichtbar). Danach bilden sie eine Art Schleife und gehen als venöses Gefäß meist durch eine andere Lücke in der Knochenspanne wieder zurück. Nach dem Betreten der Wachstumsfuge konnte zwischen den einzelnen Gefäßen keine Verbindung mehr hergestellt werden. Erwähnenswert ist auch, dass diese Gefäße im gesunden Knochen niemals die ganze Wachstumsfuge durchziehen und daher auch keine Anastomose zu den metaphysären Gefäßen besitzen. Zusätzlich ist zu betonen, dass im gesunden artikulären Knorpel niemals solche Gefäße auftreten. [23],[24]

An der metaphysären Seite treten die Gefäße, wobei es sich hier um die letzten Verzweigungen der nutritiven Arterie handelt, parallel in die Wachstumsfuge ein. Diese Gefäße reichen mit ihren Endigungen bis zu den letzten Lagen der hypertrophen Chondrozyten. Danach ziehen sie alle auf ungefähr der gleichen Höhe eine Schleife und kehren zur Metaphyse als venöses Gefäß wieder zurück. Dazwischen stellen sich nur noch Sinusoide dar. Diese scheinen keine eigenen Zellwände mehr zu besitzen sondern sind durch die Membran der Chondrozyten von der extrazellulären Matrix getrennt. Auffällig ist, dass die Kalzifizierung des Knorpels und die Knochenbildung erst stattfinden, wenn auch Blutgefäße darstellbar sind. Direkter Kontakt zwischen der Grundsubstanz und den Gefäßen lässt sich nicht nachweisen. [23], [24]

Schneidet man im Tierversuch die epiphysäre Blutzufuhr ab, kommt es an diesen Stellen zum Absterben des umliegenden epiphysären Knochens. Die Wachstumsfuge selbst scheint in einigen Versuchstieren im Vergleich zu gesunden Anteilen etwas verbreitert. An manchen Stellen sterben die Chondrozyten der Ruhenden Zone ab und hinterlassen eine V-förmige Läsion aus Matrix und den nekrotischen Zellen. In weiterer Folge wird dieser Abschnitt einfach vom Wachstum ausgeschlossen und bleibt zurück, während das umliegende Gewebe sich erholt und normal weiterentwickelt. Dehnt sich diese Stelle in die Länge und beginnen neue Gefäße von der metaphysären Seite einzuwachsen, bildet sich dort neuer Knochen und eine Knochenbrücke entsteht. Bei sehr großflächiger Schädigung durch die induzierte Ischämie, stirbt die ganze Wachstumsfuge ab und die Zellen gehen alle durch Nekrose zu Grunde. Dies wiederum führt auch zur Einsprossung von kapillären Gefäßen und zur Ausbildung einer Knochenbrücke, die über die ganze Länge der Wachstumsfuge ausgedehnt ist. [25]

Wenn man an der metaphysären Seite eine Ischämie produziert, zeigt sich ein massiver Anstieg an hypertrophen Chondrozyten. Die Epiphysenfuge ist dadurch stark verbreitert. Die verstärkte Anwesenheit und die fehlende Degeneration der Zellen wird begleitet von einem Mangel an Kalzifizierung. Die hypertrophen Chondrozyten scheinen sich nicht zu verändern und weiterzuentwickeln. An dieser Seite der Wachstumsfuge versucht sich das Gewebe rasch zu regenerieren und über neu einsprossende Gefäße wieder zu erholen um den verlorenen Knochenaufbau wieder aufzuholen. Erst wenn die Blutzufuhr lange und großflächig abgesperrt war, kommt es zum Untergang der Fuge, der darauf folgend zum Neueinsprossen von Gefäßen aus beiden Systemen und zur Ausbildung einer Epiphysiodese. [25]

2.9 Die Knocheninnervation

Der Knochen selbst wird vom autonomen Nervensystem innerviert, welche Einfluss auf den Blutfluss nehmen. Des Weiteren finden sich auch sensorische Fasern und Fasern für die Nozizeption. Die Nervenfasern treten in den Knochen über dieselben Öffnungen wie die Gefäße ein und folgen deren

Verlauf im Inneren. Das Periost ist ebenfalls gut innerviert und hauptsächlich für die Schmerzwahrnehmung verantwortlich. [16], [26], [27]

2.10 Allgemeine Frakturlehre

Definitionsgemäß ist eine Fraktur eine Unterbrechung der Knochenkontinuität, die durch Kräfte entsteht, die die Belastbarkeit des Knochens übersteigen. Bei traumatischen Frakturen, dies sind jene, wo der gesunde Knochen durch eine Gewalteinwirkung von außen bricht, unterteilt man prinzipiell in offene und geschlossene Frakturen. Bei einer offenen Fraktur muss durch die Verbindung zur Außenwelt immer an die erhöhte Infektionsgefahr gedacht werden. [28], [29] Offene Frakturen werden im angloamerikanischen Raum nach Gustillo und Anderson eingeteilt. Bei Typ I Frakturen nach Gustillo und Anderson ist die Wunde kleiner als 1cm und sauber. Typ II Frakturen haben eine Laceration von über 1 cm ohne extreme Weichteilschädigung, wohingegen bei einer Typ III Verletzung eine extrem großflächige Wunde sowie ein großer Weichteilschaden mit gleichzeitiger Verschmutzung der Wunde vorliegen. [30] Zusammenfassend werden alle Knochenbrüche international nach der AO-Klassifikation (Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen) eingeteilt. In der AO-Klassifikation wird auch das Ausmaß der Weichteilschädigung beschrieben. [28],[30] Die erste Ziffer in diesem Unterteilungssystem beschreibt den Knochen der gebrochen ist. Wenn es sich dabei um einen langen Röhrenknochen handelt, steht die zweite Ziffer für die Region des Knochens (1 entspricht proximal, 2 diaphysär, 3 distal). Mit Hilfe von Buchstaben erfolgt dann eine weitere Beschreibung der Fraktur wie sie zum angrenzenden Gelenk im Bezug steht. Eine weitere Unterteilung erfolgt dann jeweils knochenspezifisch. Wie bereits erwähnt, wird auch die Weichteilschädigung inklusive Nerven und Gefäßläsionen in dieser Klassifikation genau beschrieben. [28], [31]

Neben den traumatischen Knochenbrüchen gibt es noch Sonderformen. Bei der sogenannte Infraktion oder dem Knickbruch ist der Knochenquerschnitt nicht komplett durchgebrochen. Am kindlichen Röhrenknochen kann eine

Grünholzfraktur auftreten, welche durch eine vollständige Unterbrechung der Kortikalis auf der einen Seite und eine erhaltene Gegenkortikalis gekennzeichnet ist. Sie entsteht durch die besondere Elastizität des kindlichen Knochens. Zu den Spontanfrakturen zählen die pathologische Fraktur und die Ermüdungsfraktur, welche ohne adäquates Trauma auftreten. Zu pathologischen Knochenbrüchen kommt es bei generalisierten Knochenerkrankungen wie Osteoporose, primären und sekundären Knochentumoren, bei endokrinen Erkrankungen und entzündlichen Vorgängen im Knochen. Ermüdungsfrakturen treten nach rezidivierenden Belastungen auf, die durch viele Mikrotraumen das gesunde Knochengewebe schädigen, sodass es dann ohne akute Gewalteinwirkung zum Bruch kommt. [28], [29], [32].

2.10.1 Klinik und Diagnostik

Am Beginn der Untersuchung steht die Unfallanamnese, die je nach Verletzungsmuster unterschiedlich genau ausfällt. Danach steht die körperliche Untersuchung mit Inspektion, Palpation und Überprüfung von Beweglichkeit, Durchblutung und Sensibilität. [28], [30]

Sichere Frakturzeichen:

- Fehlstellung (Achsenfehler, Deformität)
- Abnorme Beweglichkeit
- Krepitation
- Stufenbildung in der Knochenkontinuität
- Offene Fraktur, mit sichtbaren Knochenfragmenten

Unsichere Frakturzeichen:

- Schmerzen
- Bewegungseinschränkung
- Schwellung
- Hämatom

[28],[33]

Als Bildgebung werden das konventionelle Röntgen, die Computertomografie (CT) sowie die Magnetresonanztomografie (MR) verwendet. Das konventionelle Röntgen wird standardmäßig in zwei Ebenen aufgenommen und sollte bei langen Röhrenknochen die zwei angrenzenden Gelenke enthalten. Das CT dient zur Beurteilung komplexer Verletzungen. Das MR eignet sich zur Beurteilung der Weichteilschädigung. [30]

Allgemeine Beschreibung einer Fraktur

1. Welcher Knochen ist der Betroffene?
2. Region des gebrochenen Knochens
3. Handelt es sich um eine einfache oder multifragmentäre Fraktur
4. Beschreibung der Frakturform (Spiral-, Quer-, Schräg- oder Trümmerfraktur)
5. Dislokation?
6. Wenn eine Dislokation vorliegt, Beschreibung der Dislokation
7. Liegt ein Bezug zum Gelenk vor

[30]

2.10.2 Allgemeine Therapiemaßnahmen bei Frakturen

Das Ziel jeder Behandlung ist die Wiederherstellung der ursprünglichen Funktion mit den geringsten möglichen Komplikationen. Im Grunde bestehen alle Maßnahmen die in Rahmen von Knochenbrüchen angewendet aus zwei Prinzipien – nämlich der Reposition und Stabilisation.

Die Reposition erfolgt entweder offen oder geschlossen. Der Schlüssel zum Erfolg bei der geschlossenen Reposition ist das Weichteilgewebe optimal zu nutzen um die Fraktarenden zu führen.

Zur Stabilisation stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Die konservative Variante ist die Ruhigstellung bis zur Ausheilung mit Hilfe von Gipsen. Die Extension als vorübergehende Stabilisation bis zur endgültigen Behandlung. Als Nebeneffekt hat der Patient unter Extensionsbehandlung wesentlich weniger Schmerzen. Operative Stabilisation der Fraktur mittels Verplattung oder Fixation mittels Kirschnerdrähten (häufig auch kurzfristig intraoperativ verwendet), sowie intramedulläre Marknägel werden standardmäßig angewandt. Bei komplexen Knochenbrüchen oder bei

Polytraumen mit anderen lebensbedrohlichen Verletzungen muss man sich für die temporäre Versorgung mit einem Fixateur externe entscheiden. Am Ende aller Möglichkeiten steht die Prothesenchirurgie, welche in manchen Fällen Mittel der Wahl ist. [30]

2.11 Verletzungen der Epiphysenfuge

Da die Epiphysenfuge die Wachstumszone des Knochens darstellt, kann es bei Verletzungen in diesem Bereich zu Störungen des Wachstums, zu Achsenabweichungen und Funktionseinschränkungen kommen. Die endgültigen Auswirkungen einer Wachstumsfugenverletzung hängen von der Lokalisation, dem Ausmaß der Schädigung, dem Alter des Kindes und dem Wachstumspotential der Fuge ab. Die am meist verwendete Einteilung ist die Klassifikation nach Salter und Harris aus dem Jahr 1963, die sowohl den Verletzungsmechanismus als auch den Verlauf der Frakturlinie berücksichtigt. Eine Aussage über die Prognose lässt sich, wie zu Beginn eigentlich erwartet wurde, nicht treffen. In dieser Klassifikation unterscheidet man 5 Typen. Die Aitken-Klassifikation aus dem Jahr 1965 besteht aus 3 Typen und ist wesentlich weniger geläufig. [4]

2.11.1 Klassifikation nach Salter Harris:

Typ I

Dieser Typ stellt eine Epiphysenlyse dar, d.h. die Epiphysenfuge hat sich vollständig von der Metaphyse abgetrennt. Die Fraktur verläuft durch den mineralisierten Anteil der Fuge.

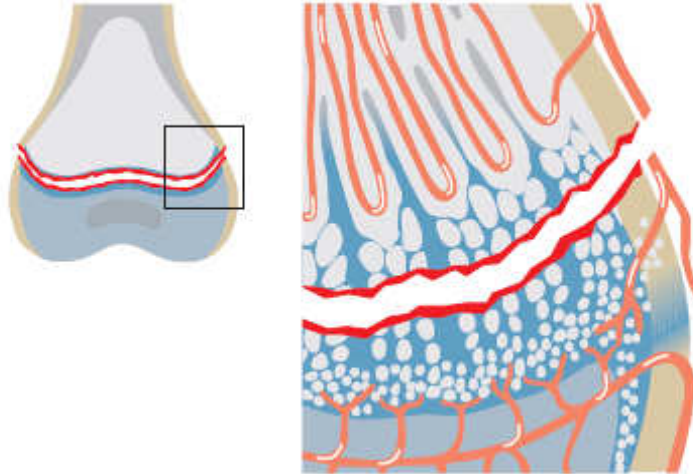


Abb. 4 : Schematische Darstellung einer Salter Harris Typ I Verletzung

(aus Weinberg, Tscherne 2006 , Unfallchirurgie im Kindesalter Band I, S. 17, Abb. 2.2)

Typ II

Epiphysiolyse wie bei Typ I mit zusätzlichem metaphysärem Keil. Dieser Keil wird auch als Thurston-Holland-Zeichen bezeichnet.

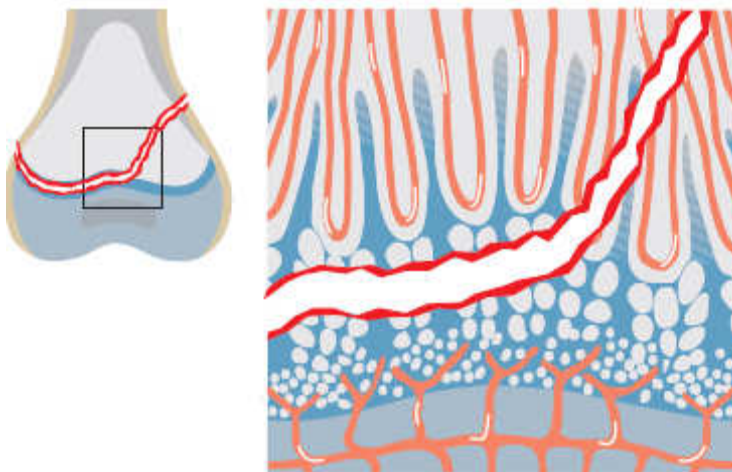


Abb. 5 : Schematische Darstellung einer Salter Harris Typ II Verletzung

(aus Weinberg, Tscherne 2006 , Unfallchirurgie im Kindesalter Band I, S. 17, Abb. 2.3)

Typ III

Die Bruchlinie beginnt senkrecht zur Fuge und kommt meist von der Gelenksfläche, geht durch die Epiphyse und endet in der Wachstumsfuge. Bei Salter Harris III Verletzungen geht die Fraktur immer auch durch den proliferativen Anteil der Fuge.

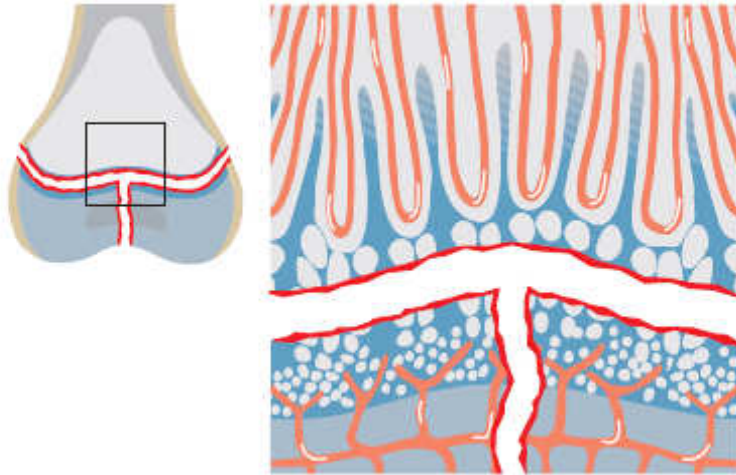


Abb. 6 : Schematische Darstellung einer Salter Harris Typ III Verletzung
 (aus Weinberg, Tscherne 2006 , Unfallchirurgie im Kindesalter Band I, S. 17, Abb. 2.4.)

Typ IV

Keilbruch, der durch Metaphyse, Fuge und Epiphyse bis in den Gelenkspalt reicht. In diesem Fall sind alle Anteile der Fuge betroffen.

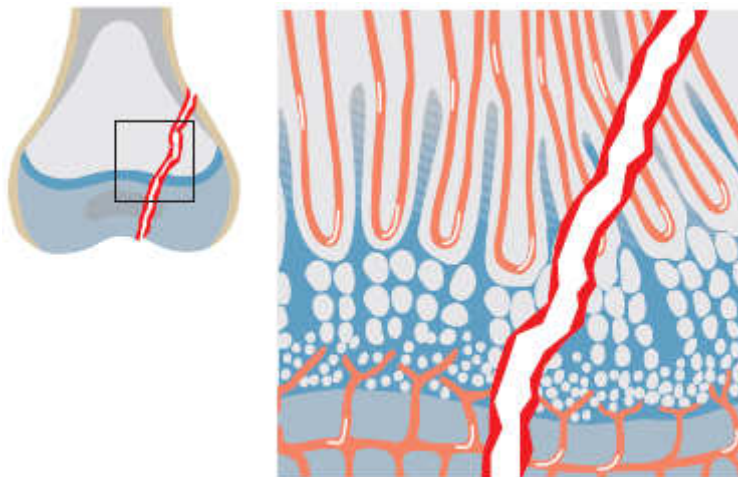


Abb. 7 : Schematische Darstellung einer Salter Harris Typ IV Verletzung
 (aus Weinberg, Tscherne 2006 , Unfallchirurgie im Kindesalter Band I, S. 17, Abb. 2.4.)

Typ V

Diese Form der Verletzung entsteht durch eine axiale Stauchung der Wachstumsfuge. Sie wird auch als „crush lesion“ bezeichnet. Ein Problem stellt

die Diagnose dieser Fraktur dar, weil sie zum Unfallzeitpunkt nativradiologisch nicht sichtbar ist. Durch die Druck- bzw. Quetschverletzung kommt es zu Durchblutungsstörungen im Bereich der Fuge. [4],[34]

2.11.2 Übergangsfrakturen

Zu den Übergangsfrakturen zählen Brüche von partiell geschlossenen Fugen. Diese Verletzungen treten am Beginn der Adoleszenz auf und führen nicht zu Wachstumsstörungen, weil sich die Epiphysenfuge sowieso im Schluss befindet. Überwiegend treten sie an der distalen Tibia auf. Zu diesen Brüchen gehören die *Two-plane*- und die *Tri-plane fracture*. [4], [35]

Two-plane fracture und Tri-plane fracture

Zu den *Two-plane* Frakturen gehören Übergangsfrakturen bei denen lediglich die Fuge betroffen ist. Liegt zusätzlich ein metaphysärer Keil vor, handelt es sich um eine sogenannte *Tri-plane fracture*. [35], [36]

2.12 Therapeutische Maßnahmen und Folgeerscheinungen bei Wachstumsfugenverletzungen

Als Ziel der Behandlung setzt man sich die Erhaltung des Wachstums und gute Funktion des Gelenkes. Auf alle Fälle sind wiederholte frustrane Repositionen zu vermeiden, weil sich daraus häufig Wachstumsstörungen ergeben und in der Mehrzahl der Fälle eine hohe Spontankorrekturpotenz besteht. „ *Je jünger der Patient desto eher können inkomplette Repositionsergebnisse toleriert werden und desto eher sollten Nachrepositionen vermieden werden, um nachfolgende Fugenläsionen durch wiederholte Manipulation zu vermeiden* „ [4]

Prognostisch wäre noch zu erwähnen, dass es bei Fugenverletzungen von Kindern, die kurz vor dem Schluss der Wachstumsfuge stehen weniger gravierende Wachstumsstörungen auftreten als bei jüngeren Kindern. Des Weiteren hat ein vorzeitiger Epiphysenfugenschluss einer langsam

wachsenden Fuge weniger Auswirkungen auf das Endergebnis als bei einer rasch wachsenden Fuge. Die häufigste und gefürchtetste Komplikation ist der posttraumatische vorzeitige partielle oder totale Fugenschluss. Pseudoarthrosen oder die Entwicklung eines Kompartmentsyndroms sind bei Kindern selten. [4]

2.12.1 Die Spontankorrektur

Unter Spontankorrektur versteht man die Fähigkeit des wachsenden Knochens Achsen- und Rotationsfehler ohne Intervention zu beheben. Dieses Potential kann man bewusst in die Behandlungsstrategie miteinbeziehen und so auch Defizite in der Therapie ausgleichen. Rotationsfehler können durch physiologische Detorsionsvorgänge ausgeglichen werden. Dabei ist aber immer zu bedenken, dass sich diese Korrektur weder berechnen noch steuern lässt und nur für bestimmte Knochen mit funktionellem Endergebnis nachgewiesen werden konnte. Die Epiphysenfuge selbst trägt zu Spontankorrekturen bei, indem sie bei Achsenknicken versucht durch asymmetrisches Wachstum sich wieder senkrecht zur Belastungsebene einzustellen. Dies führt zum „Aufrichten“ der Epiphysenfuge. [37], [38]

2.12.2 Wachstumsstörungen

Es gibt zwei Formen der posttraumatischen Wachstumsstörungen des kindlichen Skeletts. Mit einer **stimulativen** Wachstumsstörung ist nach jeder Fraktur zu rechnen. Gehäuft treten sie nach wiederholten Manipulationsmanövern und frustranen Repositionen auf. Insgesamt ist auf eine anatomische End-zu-End-Reposition zu achten, weil es dabei zu den geringsten Längendifferenzen kommt. Entscheidend sind vor allem Wachstumsstörungen an der unteren Extremität, da sie einen wesentlichen Einfluss auf die Statik und Funktion des Bewegungsapparates haben. Zu **hemmenden** Wachstumsstörungen kommt es durch den vorzeitigen

Verschluss der Epiphysenfuge, was meist nur einen Teil der Fuge betrifft. Komplette Fugenschlüsse sind extrem selten und deuten auf eine vollständige Zerstörung des epiphysären Gefäßsystems hin, was hauptsächlich nach schweren Weichteil- und Quetschverletzungen beobachtet werden kann. Durch den partiellen Schluss einer Fuge kommt es zur Ausbildung einer Knochenbrücke im Bereich der verletzten Zone. Diese kann bei weiterem Wachstum bestehen bleiben oder durch das Wachstum gesprengt werden. Wenn die Knochenbrücke bestehen bleibt und nicht therapeutisch interveniert wird, kommt es zu Deformationen und Achsenfehlstellungen der entsprechenden Extremität. Grundsätzlich sollte man bedenken, dass vor dem 10. Lebensjahr eher Verlängerungen und nach dem 10. Lebensjahr eher Verkürzungen der betroffenen Extremität unabhängig vom Therapiemanagement auftreten. [37], [39]

2.13 Der Prozess der Frakturheilung

In diesem ganz speziellen Prozess der Wundheilung spielen viele perfekt aufeinander abgestimmte Faktoren auf zellulärer und molekularer Ebene eine tragende Rolle. Dadurch entsteht auch eine Vielzahl an Fehlerquellen, die zu einer schlechten bis überhaupt nicht einsetzenden Frakturheilung führen können. Anders als bei Wundheilungen von anderen Gewebearten entsteht bei einer korrekt ablaufenden Heilung eines Bruches kein Narbengewebe sondern zu großen Teilen wieder Knochengewebe. Eine komplette Wiederherstellung des Originalzustandes vor der Verletzung ist zwar nur am kindlichen Skelett möglich, aber auch bei Erwachsenen entsteht mechanisch stabiles Knochengewebe.

[40], [41]

Grundsätzlich unterscheidet man histologisch zwischen einer primären und einer sekundären Frakturheilung. Diese Form der Einteilung bezieht sich vor allem auf die Reaktion des kortikalen Knochens. Bei der **primären** Knochenheilung besitzt die Corticalis die Fähigkeit sich selbst, ohne die vorherige Ausbildung von Knorpelgewebe, zu regenerieren - ohne die vorherige Ausbildung von Knorpelgewebe. Dies ist nur dann möglich, wenn eine exakte anatomische Stellung der Fraktarenden zueinander besteht und

genug interfragmentäre Zugspannung vorhanden ist. Das zerstörte Gewebe wird abtransportiert und es bilden sich neue Havers'sche Kanäle aus, welche die einsprossenden Blutgefäße zur Fraktur führen. Die **sekundäre** Frakturheilung beinhaltet die Ausbildung eines Kalluses, wobei hier natürlich auch das Periost und des umliegende Bindegewebe direkt in den Heilungsprozess involviert sind. [41], [42]

Eine primäre Knochenheilung findet nur sehr selten statt. Der Großteil aller Frakturen heilt sekundär, wobei hier der Knochen sowohl intramembranös als auch enchondral gebildet wird. Unmittelbar nach der Verletzung kommt es zur Hämatombildung und Inflammation des Gewebes. Gefäße sprossen nach und nach ein. Durch die Angiogenese werden auch die Knorpelbildung, der Knorpelumbau und schließlich das Ersetzen des Knorpels durch Knochen (enchondral) initiiert. Am Rande der Fraktur im Bereich des Periostes differenzieren sich mesenchymale Stammzellen zu Osteoprogenitorzellen, welche direkt Knochengewebe bilden können und die Fraktur durch einen harten Kallus stabilisieren. [41], [42]

Allgemein ist zu erwähnen, dass sehr viele Ähnlichkeiten in den Mechanismen und der Regulation dieses Prozesses zwischen der Frakturheilung und der embryonalen Knochenbildung bestehen. [43]

Die Frakturheilung setzt sich im Wesentlichen aus fünf Teilen zusammen, wobei wir hier von der sekundären Form ausgehen, weil eine primäre Heilung ohne Interventionen, wie oben bereits erwähnt, sehr selten auftritt. Als erstes kommt es unmittelbar nach der Verletzung zu einer sog. „response to injury“ – Reaktion. Durch die Zerstörung der knöchernen Architektur und Integrität sowie der Unterbrechung der normalen Blutzufuhr und Versorgung des Gewebes kommt es zur Infiltration mit inflammatorischen Zellen und zur Ausbildung eines Hämatoms. Der Heilungsprozess wird vor allem durch die Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren in Gang gesetzt. Ohne eine Inflammation und Angiogenese des Gewebes kann es also nie zu einer Knochenheilung kommen. Die am besten untersuchten Faktoren in diesem Kontext sind Interleukin 1, Interleukin 6, TNF α (Tumornekrosefaktor Alpha), MCSF (macrophage colony stimulating factor) sowie lokal vorhandene Faktoren wie FGF (fibroblast growth factor), PDGF (platelet-derived growth

factor), TGF β (transforming growth factor beta), VEGF (vascular endothelial growth factor) und die Familie der BMPs (bone morphogenetic proteins). Wie bereits beschrieben, haben all die Faktoren auch eine tragende Rolle im Rahmen der embryonalen Knochenentwicklung. Die ersten detektierbaren Faktoren sind PDGF und TGF β , welche von degranulierenden Thrombozyten ausgeschüttet werden. Dadurch werden Makrophagen und andere Entzündungszellen angezogen, die zur Ausschüttung von FGF führen. Innerhalb von 24 Stunden organisieren sich die zellulären Elemente und es erfolgen Differenzierungen zu osteoblastischen Phänotypen. Die Osteoblasten, die in der Nähe der Kortikalis liegen, beginnen sich zu teilen und weiterzuentwickeln und formen über den intermembranösen Weg den harten Kallus. Dies lässt sich frühestens am dritten Tag nach Auftreten der Fraktur beobachten und hat seinen Peak zwischen dem 7-10 Tag. Diese Aktivität verschwindet dann ungefähr 14 Tage nach der Verletzung. Unter den Bedingungen einer operativen Versorgung mittels Platten und/ oder Verschraubungen des Bruches reicht dieser Reparaturmechanismus aus. Durch die Bildung einer kortikalen Knochenbrücke schließt sich die interfragmentäre Lücke und die Fraktur heilt ohne die Ausbildung eines sog. weichen Kalluses im Sinne der primären Form aus. Ansonsten reagiert das umliegende Gewebe und mesenchymale Zellen sowie Fibroblasten wandern ein und ersetzen das Hämatom. Diese Zellen differenzieren sich weiter zu Chondrozyten und formen durch Knorpelproduktion den weichen Kallus. Dort wo der harte und der weiche Kallus aufeinandertreffen, verändern sich die Chondrozyten weiter. Sie exprimieren typischerweise nicht mehr Kollagen II und Aggrecan, sondern werden zu hypertrophen Chondrozyten, welche wie in der Epiphysenfuge auch Kollagen X exprimieren. Es handelt sich um jene Zellen, die neutrale Proteasen freisetzen und den Knorpel auf die Kalzifikation vorbereiten. Sobald genügend Knochen aufgebaut wurde, begeben sich die hypertrophen Chondrozyten in die Apoptose. [43], [44], [45]

Zu erwähnen ist auch, dass eine diaphysäre Fraktur sehr wohl auch Einfluss auf die Vorgänge in der Wachstumsfuge hat. Und zwar konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass vermehrt Chondrozyten in die Apoptose treten und so ein höherer Zellumsatz zustande kommt. Es wird vermehrt Knorpel resorbiert und Knochen angebaut. Somit lässt sich ein überschießendes Wachstum nach

einer diaphysären Fraktur erklären. Dabei dürfte es sich um einen lokal geregelten Vorgang handeln, weil im Tierversuch die unverletzten Kontrollbeine keinen Hinweis auf ein überschießendes Wachstum geben. [46], [47]

2.14. Reparaturmechanismen bei Verletzungen der Epiphysenfuge

Man kann anhand von Studien im Tierversuch vier Stadien der Reparaturvorgänge beobachten.

Die erste Phase nach einer Frakturimitation mittels Setzen einer Bohrlochläsion ist die Ausbildung eines **Hämatoms** und der **Entzündungsreaktion**. Während der Entzündungsphase werden Zytokine und Wachstumsfaktoren ausgeschüttet wie TNF α (Tumor Nekrose Faktor) und IL 1 β (Interleukin), welche auch in der bereits beschriebenen Frakturheilung eine entscheidende Rolle spielen. Außerdem findet man eine erhöhte Expression an TGF β (Transforming Growth Factor) und PDGF (Platelet-derived Growth Factor), die wichtig für die Knochenheilung sind. Während dieser Phase und der darauffolgenden **Fibrogenic phase** findet man auch BMP 2 (Bone morphogenic protein), welches die Osteoblastendifferenzierung stimuliert und die Knochenbildung initiiert. In der zweiten Phase, die vom 3-7 Tag im Rattenversuch beobachtet wird, ist FGF-2 (Fibroblastic Growth Factor) auf den mesenchymalen Zellen exprimiert. FGF-2 spielt möglicher Weise eine Rolle in der Migration und Proliferation von mesenchymalen, Osteoprogenitorzellen und schlussendlich deren Differenzierung in Osteoblasten. Vom 7-14 Tag durchläuft der verletzte Tierknochen die sogenannte **osteogenic phase**. In dieser Zeit laufen alle Prozesse für die Knochenbrückenbildung ab. Am siebten Tag findet man erstmals Hinweise auf neue Knochenbildung. In diesem Zeitraum zeigt sich ein erhöhter Level an IGF-1 (Insulin-like growth factor). Immunhistochemisch findet man IGF-1 im Zytoplasma von Osteoblasten und der Knochenmatrix im Bereich der Fugenverletzung. In der vierten und letzten Phase reift die Knochenbrücke heran. In der **Reifungsphase** wird vermehrt BMP 7 exprimiert, welches höchstwahrscheinlich einen starken Promotor für

die Knochenbildung und Umbauvorgänge des Knochengewebes darstellt. [48], [49], [2]

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1. Das verwendete Material

3.1.1 Die Versuchstiere

Für diese Studie wurden 42 männliche Sprague Dawley Ratten, die aus dem Institut für Labortierkunde in Himberg aus Niederösterreich stammen, verwendet. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Lieferung 5 Wochen alt und wogen zwischen 100-120g. Sie wurden im IBF (Institut für biomedizinische Forschung), welches zur Medizinischen Universität Graz gehört, gehalten. Die erste Woche hatten die Tiere Zeit um sich einzugewöhnen bevor sie operiert wurden. Die Ernährung basierte auf Fertigpellets der Firma Sniff®, welche sich die Ratten nach belieben selbst aus den Vorratsbehältern entnehmen konnten. Für die Flüssigkeitszufuhr wurde reines Leitungswasser, das täglich gewechselt wurde, zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden per Zufallsprinzip in sieben Gruppen zu jeweils sechs Versuchstieren eingeteilt. Ein Tier pro Gruppe wurde nicht operiert und als Kontrolle herangezogen.

Gruppennummer	Anzahl der Versuchstiere	Postoperative Lebensdauer in Tagen
1	6	1
2	6	3
3	6	7
4	6	14
5	6	28
6	6	42
7	6	82

Tab. 2: Einteilung der Versuchstiere

3.1.2 Tierställe, Kühlgeräte, Operationsräumlichkeiten

Alle Operationen wurden im Gebäude des IBF am Hahnhof durchgeführt, wo auch die Ratten die gesamte Versuchsdauer über untergebracht waren. Die benötigten Geräte für die Operationen wurden zum Teil vom IBF und zum Teil von der eigenen Forschungsgruppe bereitgestellt.

3.1.3. Verwendete Medikamente

Für die Narkose während der Operation, zur Antagonisierung danach, für die postoperative Analgesie sowie für die Euthanasie der Ratten wurden verschiedenste Medikamente verwendet, die ich in der folgenden Tabelle anführen möchte.

Handelsname	Wirkstoff	Herstellerfirma
Anexate®	Flumazenil	Roche Austria GmbH, Wien, Österreich
Antisedan®	Atipamazol	Pfizer Corp. Austria GmbH, Wien, Österreich
Betaisodona® Lösung	Polyvidon-Jod	Mundipharma GmbH, Wien, Österreich
Domitor®	Medetomedin	Pfizer Corp. Austria GmbH, Wien, Österreich
Fentanyl®	Fentanyl	Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
Furane®	Isofluran	Abbot Laboratories Ltd., Kent, England
Midazolam Delta®	Midazolam	Deltaselect GmbH, Dreieich, Deutschland
NaCl- Fresenius®	NaCl 0,9%	Fresenius Kabi Austria GmbH, Graz, Österreich
Narcanti®	Naloxon	Torrex Chiesi Pharma GmbH, Wien, Österreich
Novalgin® Tropfen	Metamizol	Sanofi-Aventis GmbH, Wien, Österreich
Rimadyl®	Caprofen	Pfizer Corp. Austria GmbH,

		Wien, Österreich
Thiopental Sandoz®	Thiopental	Sandoz GmbH, Kundl, Österreich

Tab.3: Verwendete Medikamente

3.1.4. Labor, Geräte für die Anfertigung der Schnitte

Die Räumlichkeiten und technischen Geräte für die Präparation der Knochen, sowie für die Anfertigung der Schnitte und der Färbungen wurden vom ZMF (Zentrum für medizinische Forschung) der Medizinischen Universität Graz zur Verfügung gestellt. Auch das Mikroskop (Olympus EX 51) sowie die Kamera (Olympus PD 71) für die Anfertigung der Fotografien sind Eigentum des ZMF. Die Pipetten inklusive Spitzen sowie die Aufbewahrungsbehälter für die Knochen gehören der Forschungsgruppe von PD Weinberg oder wurden von Fr. Anna Kuesz zur Verfügung gestellt. Zum Schneiden der Gefrierschnitte wurde das Cryotom „MIKROTOM HM 560“ von der Firma Zeiss im ZMF verwendet.

3.1.5 Verwendete Antikörper

Kollagen I Antikörper

Für die Kollagen I Färbung wurde als primärer Antikörper der *monoklonale Anti-Collagen Type I vom Mouse IgG1 Isotyp* der Firma Sigma® verwendet. Die Produktnummer des Antikörpers lautet C2456. Der Antikörper stammt vom COL 1 Hybrid welcher durch die Fusion von Myelomzellen der Maus und Splenozyten von BALB/c Mäusen. Diese wurden mit bovinem Skin collagen I immunisiert. Der Antikörper reagiert mit Kollagen Typ I von Mensch, Rind, Kaninchen, Reh, Schwein und Ratte. Das Produkt kann sowohl immunhistochemisch als auch für ELISA und Dot-Blot Techniken verwendet werden.

Kollagen II Antikörper

Der ClIC1 Antikörper wurde von der Development Studies Hybridoma Bank der Universität Iowa bezogen. Dieser monoklonale Antikörper ist vom IgG2a Isotyp (Kappa Leichtkette). Der Antikörper wird durch Hybridomtechnik gewonnen. Die Mäuse werden mit dem Antigen, das in diesem Fall vom Huhn stammt, immunisiert. Durch Fusion der B-Zellen und der Myelomzelle, die auch von der Maus stammen, entsteht die antikörper-produzierende Hybridomzelle. Der ClIC1 Ak der Firma Iowa® färbt mit Hyluronidase vorbereitetes Knorpelgewebe der fetalen und ausgewachsenen Maus sowie menschliches Knorpelgewebe.

3.2. Methodik

3.2.1 Die Operation

Nach der Eingewöhnungswoche der Ratten im IBF wurde die Operation in den Räumen des IBF durchgeführt.

Die Narkose

Zuerst wurden die Ratten in eine Plexiglasbox gesetzt und der Deckel verschlossen. Durch eine Öffnung wurden Sauerstoff und Narkosegas zugeleitet. Für diese Inhalationsnarkose wurde ein Gemisch aus Furane® 2% und einem Sauerstoffflow von 2L/min verwendet.

Nach der Einleitung der Inhalationsnarkose wurden die Tiere aus der Box genommen und erhielten zur weiteren Anästhesie die sogenannte FDD Lösung mittels subkutaner Injektion in die Nackenfalte. Diese Lösung ist rasch antagonistisierbar und bietet eine schonende Narkose für die Versuchstiere. Die Dosierung liegt bei 0.1ml/100g Lebendgewicht der Ratte.

Zusammensetzung der **FDD-Lösung**:

- Fentanyl® 100 µg
- Midazolam Delta® 2,0 mg
- Domitor® 1,0 mg

Durchführung der Operation

Als die gewünschte Narkosetiefe erreicht wurde, wurde das Operationsfeld mit Veet® Enthaarungscreme vorbereitet. Die Enthaarung mittels Creme hat gegenüber der Rasur den Vorteil, dass es zu keinen Mikroverletzungen der Haut kommt und später keine Haare in die Operationswunde einwachsen können. Des Weiteren ist es bei der Anwendung dieser Creme unwahrscheinlicher, lose Haar in das Operationsgebiet zu verschleppen.

Nach der Enthaarung wurde das Operationsgebiet mit Betaisodona®-Lösung mehrmalig gewaschen und desinfiziert. Nach der Desinfektion wurde der Hautschnitt mit einem Skalpell gesetzt. Der Schnitt mit einer Länge von ca. 1,5 cm erfolgte ventral vom distalen Femur über das Kniegelenk bis zur proximalen Tibia. Danach wurde mit einer Schere unter Sicht schichtweise stumpf eingegangen und das Kniegelenk dargestellt.

Die Läsion wurde mit einem elektrischen Handbohrer mit einem Durchmesser von 1,2 mm gesetzt. Die Bohrung wurde transartikulär in axialer Richtung in die jeweils linke Tibia durchgeführt. Als Richtwert für eine exakte transepiphysäre Bohrung galt ein deutlicher Widerstandsverlust, der durch das Eintreten in den Knochenmarksraum zustande kommt. Nach einer korrekten Bohrung ist Knochenmark aus dem gesetztem Loch ausgetreten. Danach wurde die Wunde nochmals mit Betaisodona®-Lösung sorgfältig gereinigt um eine postoperative Infektion und Wundheilungsstörungen möglichst zu vermeiden. Zum Abschluss wurde die Haut mit Einzelknopfnähten mit Vicryl 5.0 verschlossen.

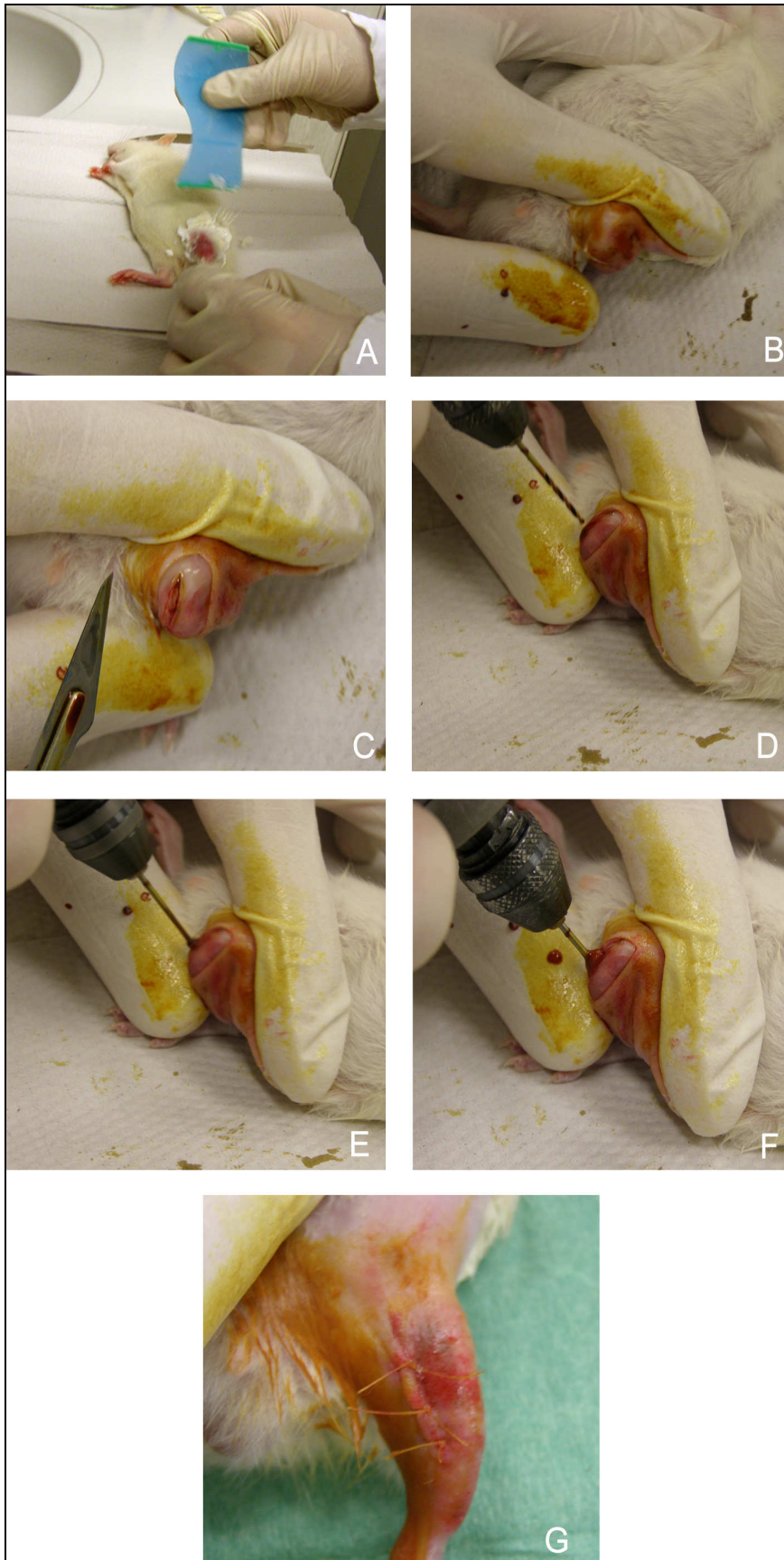
Die Narkose wurde mit einer speziellen Lösung, die intraperitoneal gespritzt wurde, antagonisiert.

Zusammensetzung der Lösung zur Antagonisierung:

- Narcanti® 1,2 mg
- Anexate® 0,5 mg
- Antisedan® 2,5 mg
- NaCl Fresenius® 1,5 ml

Postoperativ wurde den Versuchstieren zur Analgesie Rimadyl® subcutan injiziert. Die Lösung wurde mit NaCl Fresenius® in einem Verhältnis von 1:50 verdünnt. Die Dosierung lag bei 0,4ml/ 100g Lebendgewicht des Versuchstieres.

Die Tiere wurden bis zum vollständigen Erwachen auf eine Heizplatte mit einer Temperatur von 38 °C gelegt, um eine Unterkühlung zu vermeiden.



(A) Enthaarung des linken Beines im Bereich des Kniegelenkes

(B) Darstellung des Operationsgebietes nach dem Hautschnitt

(C) Eröffnung des Kniegelenks

(D) Ansetzen des Bohrers in axialer Richtung

(E) Transepiphysäre Bohrung

(F) Widerstandsverlust durch Eintreten in den Markraum. Austreten von Knochenmark durch das Bohrloch

(G) Mit Einzelknopfnähten verschlossene Operationswunde

Abb.8: Fotos zum Operationsablauf

Nach dem vollständigen Erwachen wurden die Ratten wieder in ihre Käfige verteilt und konnten sich von der Operation erholen. Vom 1.-7. postoperativen Tag bekamen die Versuchstiere täglich eine subkutane Injektion mit der bereits oben beschriebenen Rimadyl-Lösung um die Heilung schmerzfrei zu gestalten. Vom 8.-14. postoperativen Tag wurde den Tieren statt der Rimadyl-Lösung 250mg Novalgin® in Tropfenform mit dem Trinkwasser verabreicht.

3.2.2 Euthanasie und Entnahme der Knochen

Die sechs Tiere der entsprechenden Gruppe wurden an den postoperativen Tagen 1, 3, 7, 14, 28, 42 und 82 getötet. Die Tötung und Entnahme der Knochen erfolgte wieder in den Operationsräumen des IBF am Hahnhof.

Die Narkotisierung für die Euthanasie erfolgte analog zur Narkotisierung bei der Operation. Dies bedeutet eine Einleitung mittels Isofluran-Inhalationsnarkose und anschließender subkutaner Injektion der FDD-Lösung. Zuerst wurden den Ratten aus dem Herzen ca. 2ml Blut für eine andere Versuchsreihe entnommen. Danach wurden die Tiere mit einer Überdosis Thiopental Sandoz®, die intracardial injiziert wurde, euthanasiert. Nach dem Eintreten des Todes wurde beidseitig die Tibia entnommen. Der rechte Knochen diente als Kontrolle. Die Weichteile wurden von den Knochen feinsäuberlich abpräpariert. Nach erfolgter Präparation und Einsortierung in die bereits beschrifteten Behälter wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Knochen dann bei -20°C in einem Tiefkühlgerät am IBF gelagert.

3.2.3 Die Aufbereitung der Knochen

Um mit den Knochen weiter arbeiten zu können und um ein Schneiden überhaupt erst möglich zu machen, mussten sie als erstes einer Entkalkung unterzogen werden. Dazu wurden die Knochen vom IBF in die Labors des ZMF gebracht. Zunächst wurden die Knochen in andere Behälter mit Schraubverschluss umsortiert, damit ein leichteres Handling ermöglicht wurde. Zur Fixation wurden die Proben für 24 Stunden in ein 100%iges Methanolbad gegeben. Dabei standen die Proben im Kühlraum des ZMF bei 4°C.

Nach dem Methanolbad wurde die Lösung vorsichtig abgegossen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Knochen nicht berührt wurden um Infektionen mit Pilzen oder Bakterien zu vermeiden.

Zum Entkalken wurden die Proben 14 Tage lang in EDTA eingelegt, welche täglich ausgewechselt werden musste um eine Besiedelung mit Keimen zu vermeiden. Zu beachten waren eine saubere Arbeitsweise wegen des Keimwachstums und ein vollständiges Eintauchen der Proben in die Lösung. Die Grundsubstanzen Ethylendiamintetraacetat in Pulverform stammt von der Firma Sigma-Aldrich®. Die Lösung wurde von uns selbst laut Herstellerhinweis produziert.

Zur zweiten Fixation kamen die Knochen erneut in 100%iges Methanol für 8-12 Stunden. Darin konnten sie bis zur Verarbeitung bei 20 °C gelagert werden.

3.2.4 Die Herstellung der Gefrierschnitte

Um das Methanol aus den Knochen zu waschen und die einzelnen Zellen auf das Gefrierschneiden vorzubereiten, wurden sie für 24 Stunden in eine Lösung aus PBS und 5%iger Sucrose gelegt. Dazu wurde das Methanol abgegossen und die Schraubverschlussbehälter mit dieser Lösung gefüllt. In dieser Lösung konnten die Knochen nur den kurzen Zeitraum von 4 Tagen gelagert werden um keine Keimbesiedelung zu riskieren. Sollte die Lösung trotzdem trüb werden, muss man die Proben erneut für 24 Stunden in Methanol legen. Wenn man die Knochen direkt aus der Methanollösung Gefrierschneiden würde, würden die Zellen durch das rasche Gefrieren massiven Schaden nehmen - deshalb wird das Methanol zuerst ausgewaschen.

Zusammensetzung der Lösung: 200 ml PBS + 10 g Sucrose

Die Lösung wurde in einem Glas mit einem Rührgerät des ZMF hergestellt.

Einbettung für das Gefrierschneiden

Die jeweils zu schneidenden Knochen wurden mit einer Pinzette aus der Sucrose-Lösung genommen und auf Kücherrollenpapier zum Abtropfen gelegt. Danach wurde der Knochen im Bereich des Schaftes auf die optimale Länge für die Einbettungsschälchen gekürzt. Dies erfolgte mit dem Skalpell auf einer Glasplatte. Dann wurde der Knochen auf der rundlichen Einbettungschale so platziert, dass die Tuberositas tibiae nach oben ausgerichtet war, um sich in den später produzierten Schnitten orientieren zu können.

Das Einbettungsschälchen wurde mit „tissue freezing medium“ (Tissue-Tec® der Firma Sakura Finetec Europe) aufgefüllt. Dabei wurde darauf geachtet, möglichst Luftbläschen, die beim Schneiden stören würden, zu vermeiden. Die Proben wurden 15 Minuten so belassen, um sich in diesem Medium auszurichten. Danach wurden sie auf die Gefrierplatte des Cryotoms gelegt und erneut tissue freezing medium aufgefüllt. Nach ca. 15 Minuten war die Probe komplett durchgefroren und zum Schneiden bereit.

Schneiden am Cryotom

Die eingefrorenen und vorbereiteten Knochenstücke wurden im Block in das Cryotom eingespannt. Die Tibiae wurden immer gleich zum Schneiden eingespannt, um sich besser orientieren zu können. Dann wurde mit dem Schneiden begonnen, indem man sich bis zur Fuge getrimmt hat. Danach wurde unter ständiger Mikroskopkontrolle das Bohrloch aufgesucht. Wenn das Bohrloch erreicht wurde, wurden Schnitte mit einer Schichtdicke von 12 µm angefertigt. Jeweils zwei Schnitte wurden auf einen Objektträger nebeneinander platziert. Danach wurden die Objektträger sofort mit allen Angaben zum Knochen beschriftet, um Verwechslungen zu vermeiden. Die frischen Schnitte wurden luftgetrocknet und anschließend in den entsprechend vorbereiteten Kassetten verstaut. Bis zum Färbetag wurden die Proben in den Kassetten bei -20° C in Tiefkühlgeräten des ZMF untergebracht.

3.2.5 Immunhistochemische Färbung – Kollagen I und Kollagen II

Je Versuchstag verwendete ich einen Objektträger mit zwei Schnitten pro primären Antikörper. Mit jedem Färbegang wurde ein Objektträger als Negativkontrolle mitgefärbt. Als Kontrolle wurde pro Versuchstag (1, 3, 7, 14, 28, 42, 82) eine rechte, nicht gebohrte Tibia gefärbt.

Somit wurden 35 Objektträger a 70 Schnitte mit Kollagen I und ebenfalls so viel mit Kollagen II gefärbt. Die Anzahl der Objektträger mit nicht gebohrten Knochen lag bei 7 – einer pro Versuchstag. Negativkontrollen wurde eine pro Färbedurchgang mitgeführt.

Da ich bis zu diesem Zeitpunkt wenig Erfahrung in Laborarbeit hatte, habe ich zu Beginn weniger Schnitte gefärbt und dann die Anzahl auf max. 14 Objektträger erhöht um die Einwirkzeiten auch korrekt einhalten zu können.

3.2.5.1 Das Färbeprotokoll

1. Entnahme der Proben aus dem Tiefkühlgerät (- 20° C); Die Proben wurden danach eine Stunde luftgetrocknet
2. Die Schnitte wurden mit einem Fettstift (Dako-Pen) umrandet um das Abrinnen bzw. das Vermischen der einzelnen Reagentien zu vermeiden. Um dies zu gewährleisten muss weitere 10 Min. Trockenzeit eingehalten werden.
3. Danach wurden die Schnitte für 5 Min in eine PBS-Tween® Lösung zur Rehydrierung getaucht.

Herstellung der PBS-Tween® Lösung: 1000ml PBS + 1ml Tween® 20
(Tween® 20: Polyoxyethylenesorbitan Monolurate tween wurde von der Firma Sigma® bezogen)

4. Hemmung der endogenen Peroxidase durch Einlegen der Schnitte in ein Methanolbad für die Dauer von 15 Minuten

Methanolbad: 100ml 100%iges Methanol + 1ml 30% H₂O₂

5. Erneuter Waschvorgang in PBS-Tween®; 3x5 Minuten; wobei hier gemeint ist, dass die Waschlösung drei Mal erneuert wird.
6. Die Schnitte werden mit Hyaluronidase vorbehandelt. Da das Enzym nur bei 37° C seine Wirkung entfaltet, wird ein Inkubator für diesen Schritt vorgeheizt. Die Schnitte werden auf einer feuchten Kammer platziert und jeweils 100µl vorsichtig auf die Schnitte aufgetropft. Die Kammer mit dem Deckel verschlossen und 30 Minuten im Inkubator belassen.

Hyaluronidaslösung: 999 µl PBS + 1µl Hyaluronidase Stock 1,5 U/ml

Hyaluronidase: Typ I-S H3506 von der Firma Sigma

7. Nach 30 Minuten im Inkubator erfolgt wieder ein Waschvorgang für 3x5 Minuten mit PBS-Tween®
8. Behandlung der Schnitte mit BSA (bovines Serum Albumin), welches die unspezifischen Proteinbindungsstellen blockiert und somit eine Hintergrundfärbung vermeidet. Es werden wieder 100µl pro Schnitt aufgetropft und 60 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer belassen.

BSA: 0,01g BSA Pulver (Firma Sigma-Aldrich) + 1ml PBS

9. Abkippen der BSA-Lösung! Cave: kein Waschvorgang mit PBS-Tween®!
10. Aufbringen des primären Antikörpers zu je 100µl pro Schnitt. Auf die Negativkontrolle wird 100µl PBS-Tween® getropft und wirkt 30 Min bei Raumtemperatur ein.

Verdünnung:

Kollagen I Antikörper (C2456 von Sigma®) in einer Dilution von 1 : 2000

Kollagen II Antikörper (CIIcI von IOWA®) in einer Dilution von 1 : 5

11. 3x 5 Minuten Waschen in PBS-Tween®
12. Auftropfen des sekundären Antikörpers, wobei es sich dabei um den Biotinylated Anti-Mouse Antibody BA 2001 von der Firma Vector Laboratories inc. handelt. Er gehört zur Gruppe der IgG Antikörper und wird in Pferden produziert. Dieser Antikörper ist auch speziell für die Verwendung von Rattengewebe geeignet. Es werden wieder jeweils 100µl mit einer Verdünnung des Ak von 1:200 pro Schnitt aufgetropft (ebenfalls auf die Negativprobe). Der sekundäre Ak bleibt ebenfalls 30 Min bei Raumtemperatur auf den Schnitten.
13. 3 x 5 Minuten Waschen in PBS-Tween®
14. Während der sekundäre Ak einwirkt, muss man mit der Vorbereitung des ABC-Komplexes beginnen, weil dieser vor Gebrauch mind. 30 Min zusammengefügt und bei 4 °C gelagert werden sollte.

ABC Komplex:

1ml PBS + 20µl A + 20 µl B

Produktinformation: Vectastain ABC Kit, Elite PK 6100, Standard
Vector Laboratories Inc. ®

15. Auftropfen des ABC Komplexes mit je 100µl pro Schnitt und für 30 Min einwirken lassen
16. 3x 5 Minuten Waschen in PBS-Tween®
17. Zum Anfärben wird die AEC-Lösung aufgetropft (Ready to use Lösung, die ohne Pipette aufgetropft werden kann) wobei darauf zu achten ist, dass die

feucht Kammer sofort nach dem Auftropfen geschlossen wird, weil diese Reaktion nur in Dunkelheit stattfinden kann. Der AEC- Komplex muss 7 Minuten einwirken.

Produktinformation: AEC High Sensitivity Substrat Chromogen ready to use solution der Firma DAKO®, Produktnummer K3461

18. Stoppen der Reaktion nach 7 Minuten indem man die Schnitte in Aqua dest. gibt. Dort bleiben sie für 2-3 Minuten.
19. Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun für 30 sec
20. So lange unter fließendes Wasser halten bis das Wasser wieder klar wird
21. Schnitte für 15 sec. in NH₄ getaucht und danach in Aqua dest gestellt.
22. Entnahme der einzelnen Schnitte. Vorsichtiges Abtupfen und Abtrocknen des Objektträgerrandes. Danach werden die Schnitte mit Kayser's Glyceringelatin, welches bereits durch Erwärmen verflüssigt wurde, eingedeckelt. Kontrolle unter dem Mikroskop. Falls sich störende Luftblasen ergeben haben, wurde der Objektträger nochmals in warmes Wasser getaucht. Dabei löst sich das Deckglas von allein und es kann erneut mit dem Eindeckeln begonnen werden.
23. Nach einigen Tagen, wenn die Glyceringelatine vollständig aufgetrocknet war, wurden (um eine längere Haltbarkeit zu gewährleisten) die Deckgläser mit durchsichtigem Nagellack aus der Drogerie luftdicht verschlossen.

4. Die Ergebnisse

Für die Auswertung der Studie wurden die von mir angefertigten Fotos verwendet. Die Fotos wurden wie bereits erwähnt mit einer Olympus PD 71 im ZMF angefertigt. Es werden im folgenden Abschnitt die jeweiligen Tage einzeln als auch zum Schluss ein Gesamtüberblick über den Heilungsprozess vom ersten bis zum 82. postoperativen Tag gezeigt. Da sich bei diesen Färbungen genau der jeweiligen anderen Teil des Gewebes hervorgehoben wird, zeige ich die Bilder nicht getrennt, sondern habe mich entschlossen sie gemeinsam zu präsentieren.

4.1. Erster postoperativer Tag

Am ersten postoperativen Tag zeigen sich im Bohrlochkanal vorwiegend Hämatom, Knochensplitter und Entzündungszellen.

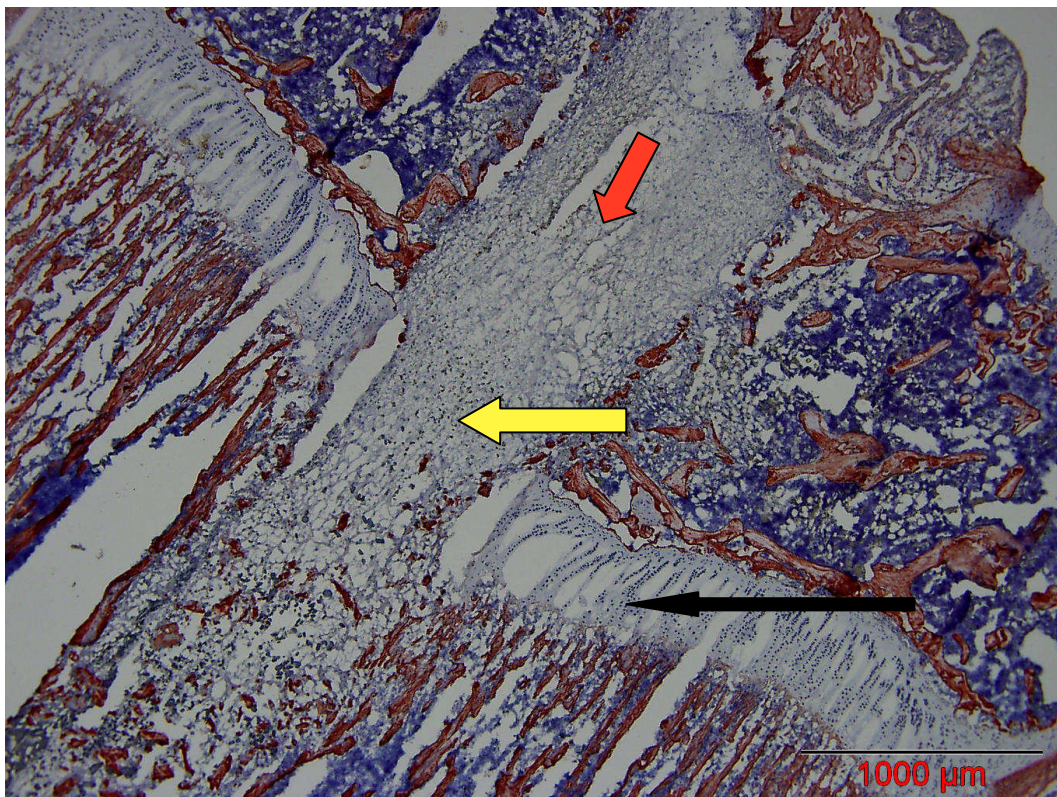


Abb.9 : Dieses Bild zeigt eine Kollagen I gefärbte Tibia (D1R5_S5a). In der Mitte des Bildes weist der gelbe Pfeil auf den Bohrlochdefekt hin. Der schwarze Pfeil zeigt auf den gesunden Teil der Wachstumsfuge. Kollagen I

färbt hier sehr schön den Knochen an. Am unteren Rand des Bildes sind deshalb die durch die Bohrung entstandenen Knochensplitter eindeutig erkennbar. Der rote Pfeil zeigt die Richtung in welcher die Bohrung erfolgt ist – dies bedeutet das am oberen Rand die Gelenksfläche des Knochens liegt.

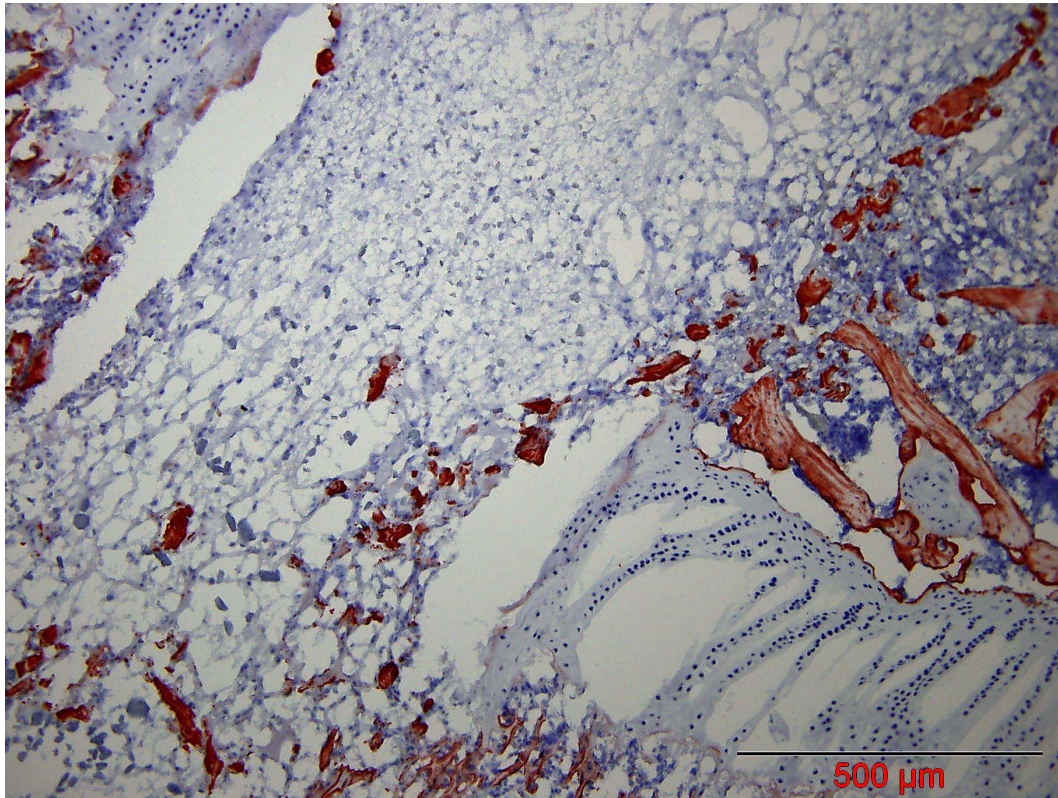


Abb.10: Dieses Bild zeigt eine vergrößerte Aufnahme des vorangegangenen Schnittes (D1R5_S5c). Rechts zeigt sich die noch intakte Wachstumsfuge mit ihren einzelnen Knorpelsäulen. Im Bohrlochdefekt befindet sich das Hämatom mit einigen Entzündungszellen und Knochensplittern.

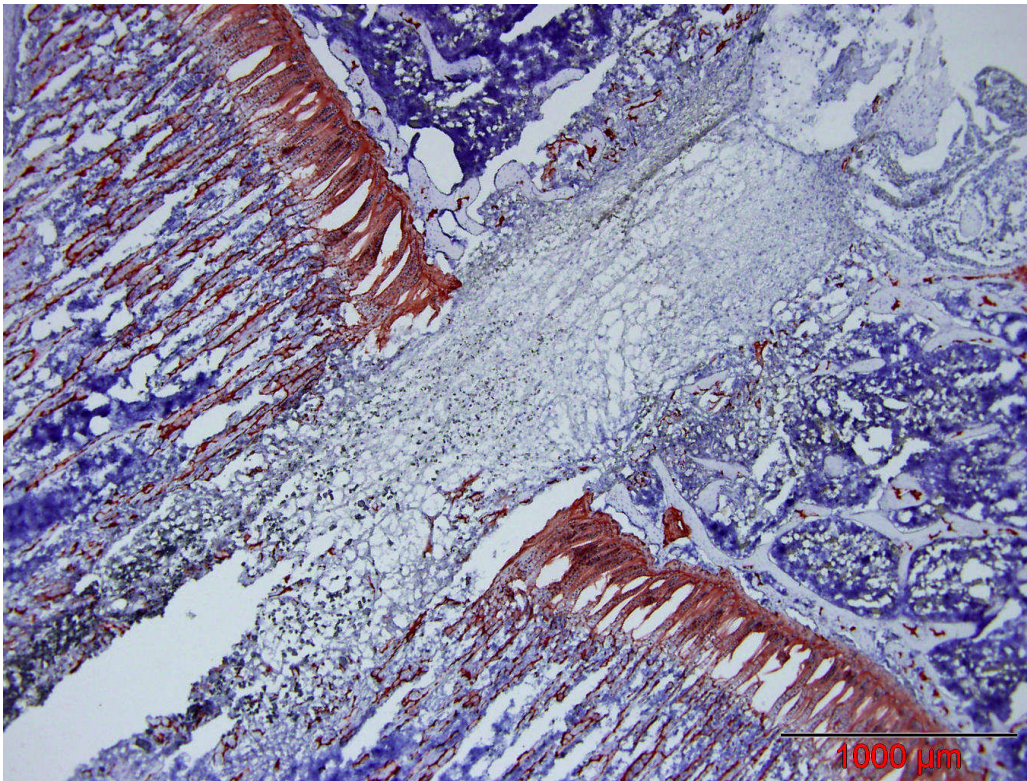


Abb.11: Kollagen II Färbung derselben Ratte (D1R5_S6a). Das Knorpelgewebe der Epiphysenfuge stellt sich positiv gefärbt dar.

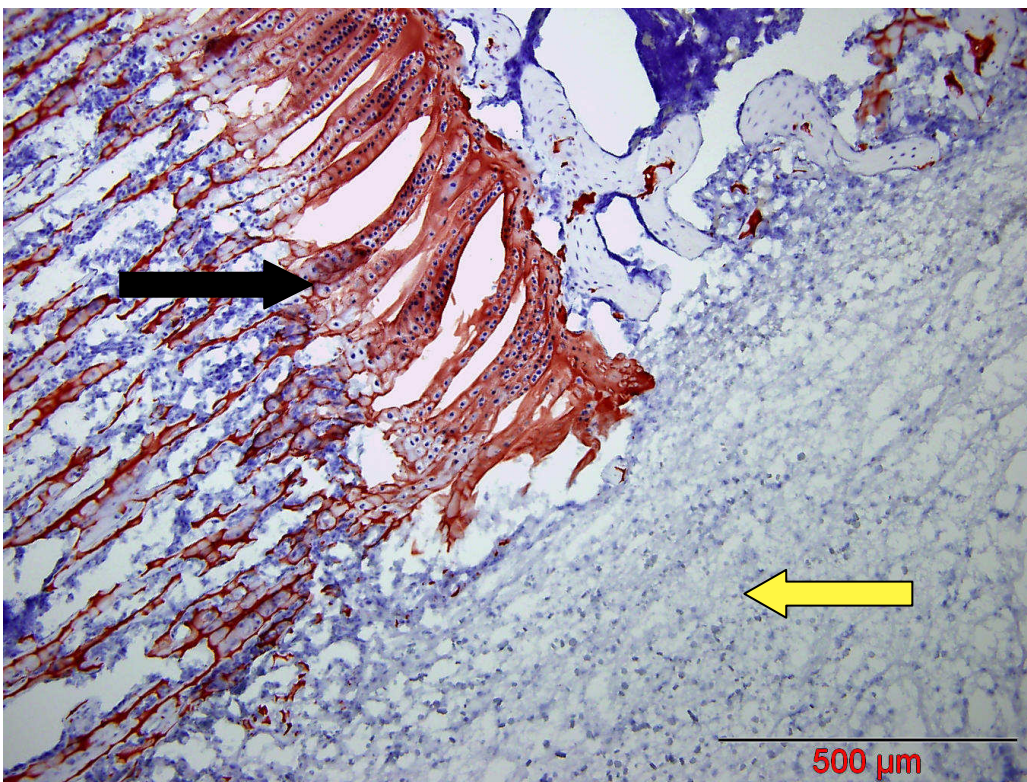


Abb. 12: Vergrößerte Aufnahme des oben abgebildeten Schnittes (D1R5_S6c). Der gelbe Pfeil zeigt den Bohrlochkanal. Der schwarze Pfeil weist auf die pos. gefärbte Fuge.

4.2. Dritter postoperativer Tag

Im Vergleich zum ersten postoperativen Tag, ist kein massiver Unterschied feststellbar. Es wandern vermehrt Entzündungszellen ein und das Hämatom beginnt sich zu organisieren. Die Vorbereitungen für die Abräumung des Hämatoms werden angelegt.

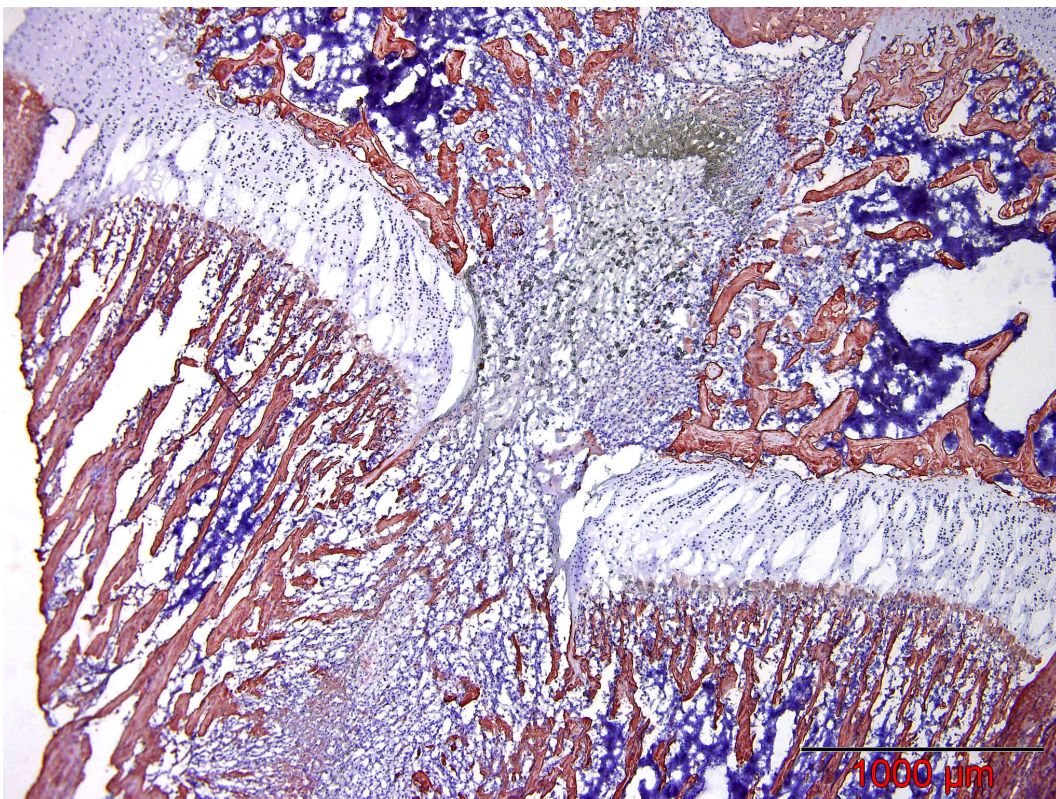


Abb.13: Kollagen I Färbung (D3R6_S23a) Die Knochenbälkchen sind schön positiv gefärbt. Der Bohrlochkanal ist noch von einem Hämatom ausgefüllt.

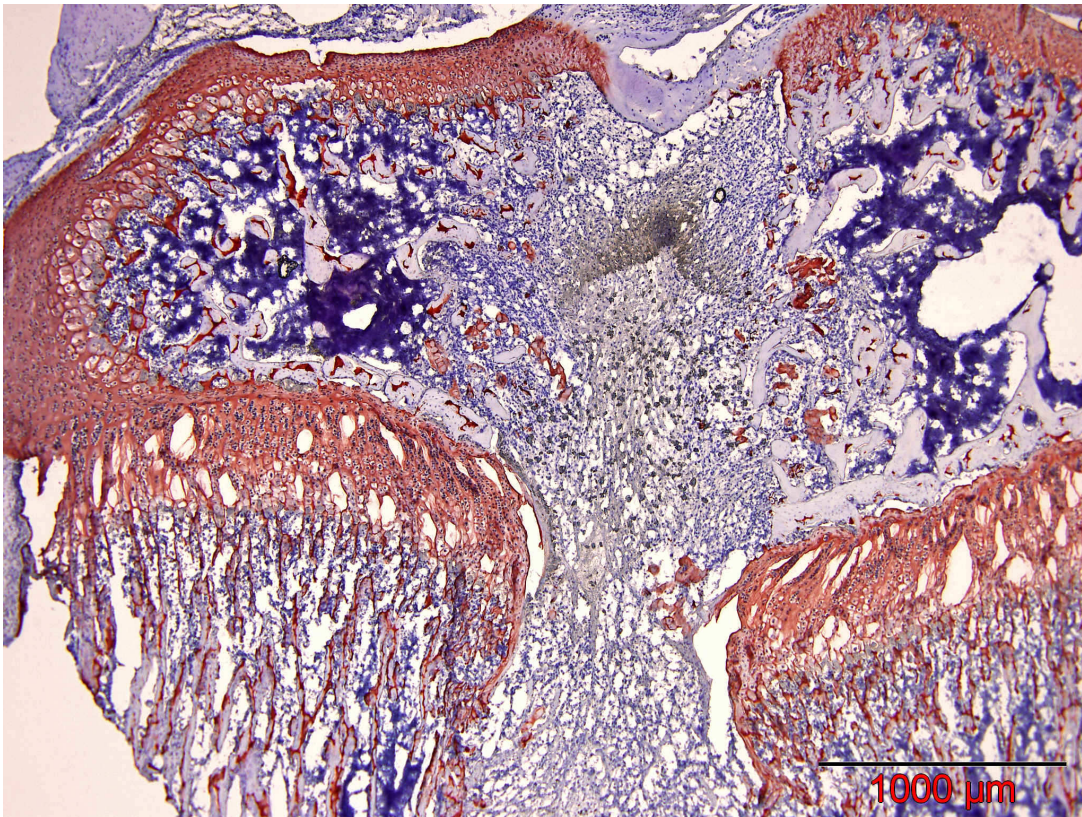


Abb.14: Kollagen II Färbung von D3R6_S24a. Hier zeigt sich als kleines Detail am Rande, dass auch das Knorpelgewebe des Gelenksknorpels positiv angefärbt wird.

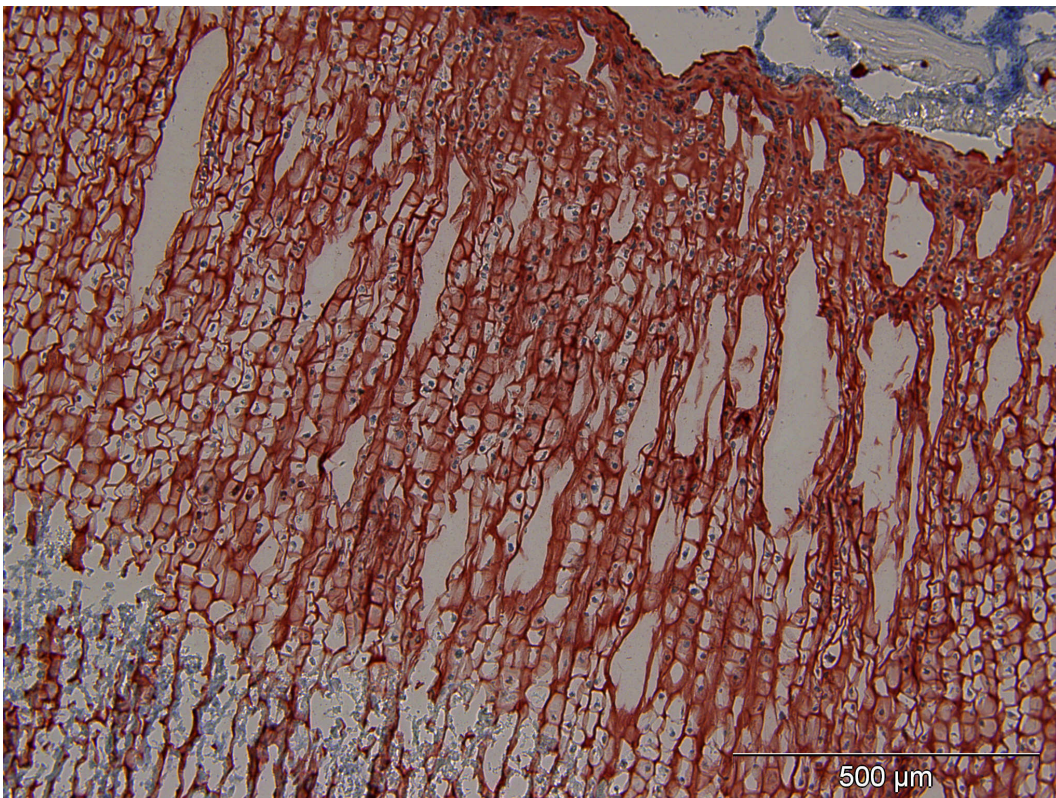


Abb.15: Kollagen II gefärbte intakte Fuge.

4.3. Siebenter postoperativer Tag

Am siebten postoperativen Tag ist das Hämatom abgeräumt und die verletzte Fuge bereitet sich für die Bildung einer Knochenbrücke vor. Der Defekt stellt sich sehr zellreich dar. In einigen Schnitten fällt auf, dass sich am linken Rand des Defektes in die Tiefe reichend Zellen, die wie Knorpelzellen imponieren aneinanderreihen. Da dies immer nur linksseitig auftritt, stellt sich die Frage ob dies durch die Art der Bohrung und das Aufsetzen des Bohrers zustande kommt. Wurden diese Zellen durch die Bohrung nach unten verschleppt oder wandern sie selbstständig dorthin? Diese Zellen sind in einigen Fällen positiv auf die Kollagen II Färbung, in anderen aber nicht.

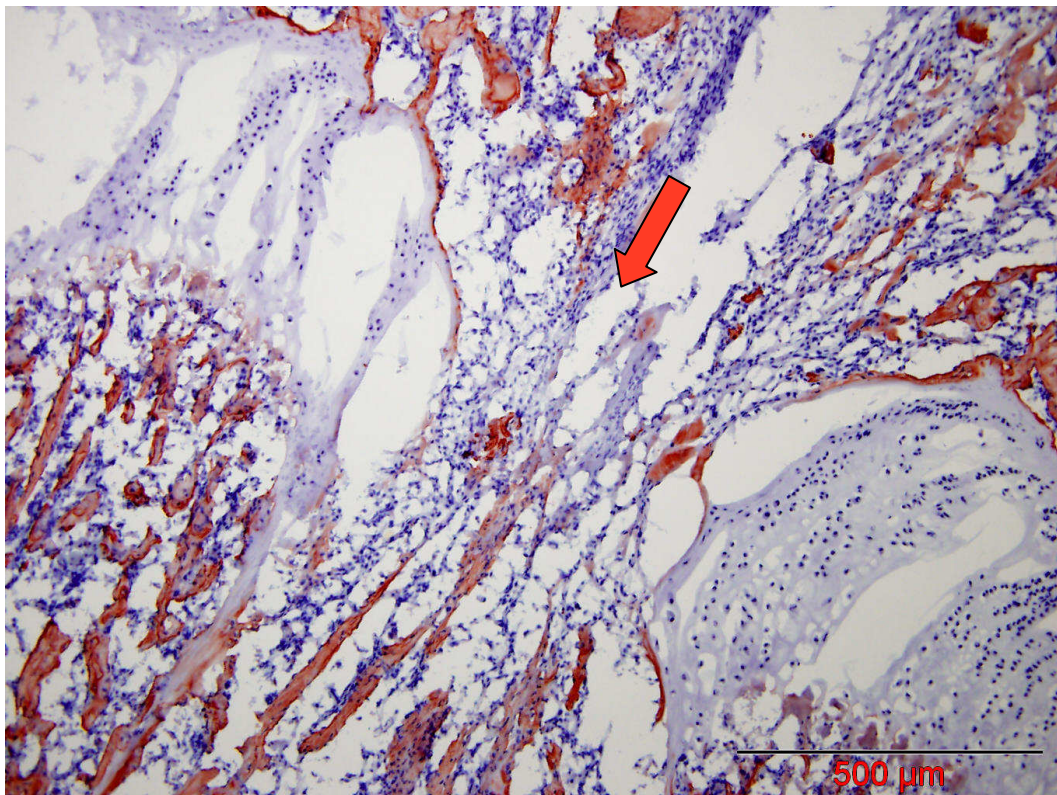


Abb.16: Kollagen I Färbung von D7R11_S22d. Darstellung des Bohrloches. Vereinzelt finden sich bereits Knochenspäne und ansonsten viele mesenchymale Zellen. Das Gewebe im Defekt zeigt z.T. eine leicht positive Färbung und wirkt bereits sehr gut organisiert. Der rote Pfeil zeigt die Bohrrichtung an – Pfeilspitze weist Richtung Metaphyse.

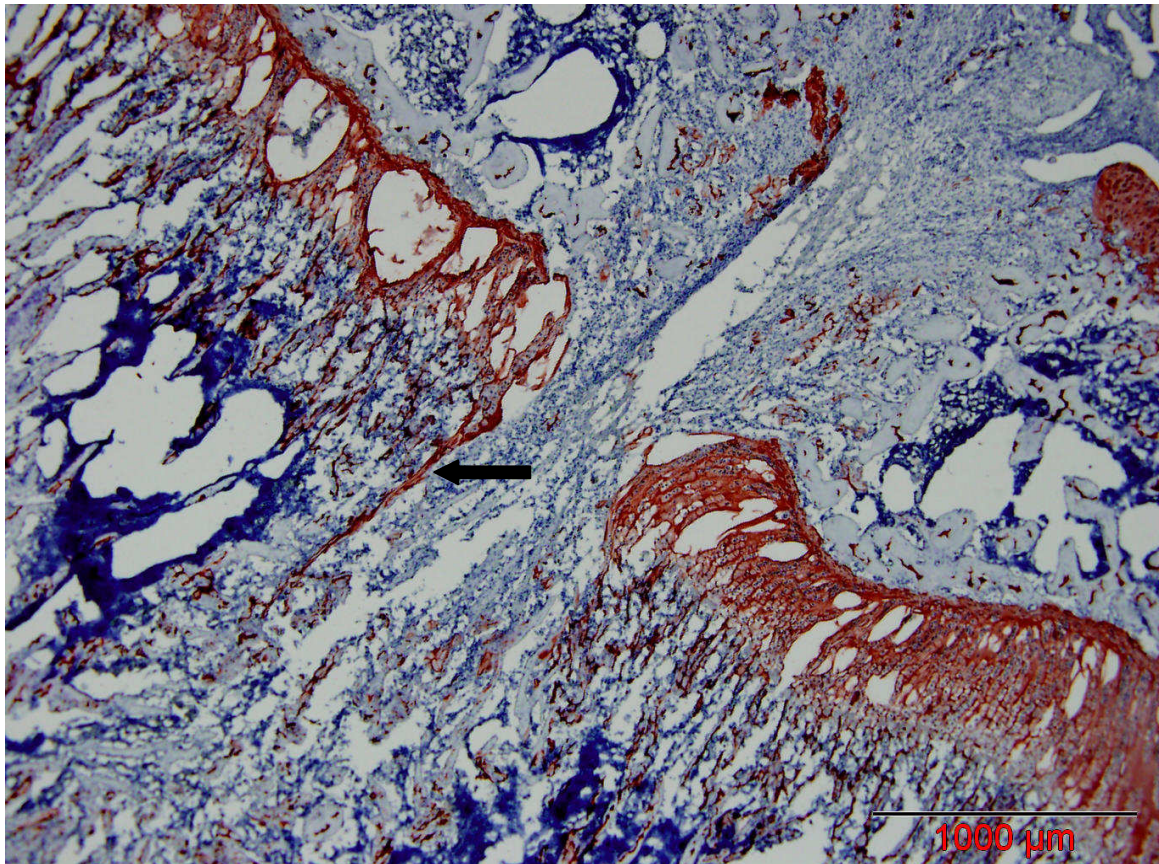


Abb.17: Kollagen II Färbung von D7R11_S23. Hier zeigt sich wie oben bereits erwähnt eine Zellreihe, die hier Kollagen 2 positiv erscheint (schwarzer Pfeil). Der Schnitt selbst ist durch die Präparation leicht beschädigt, was man an den Löchern und Rissen sehen kann.

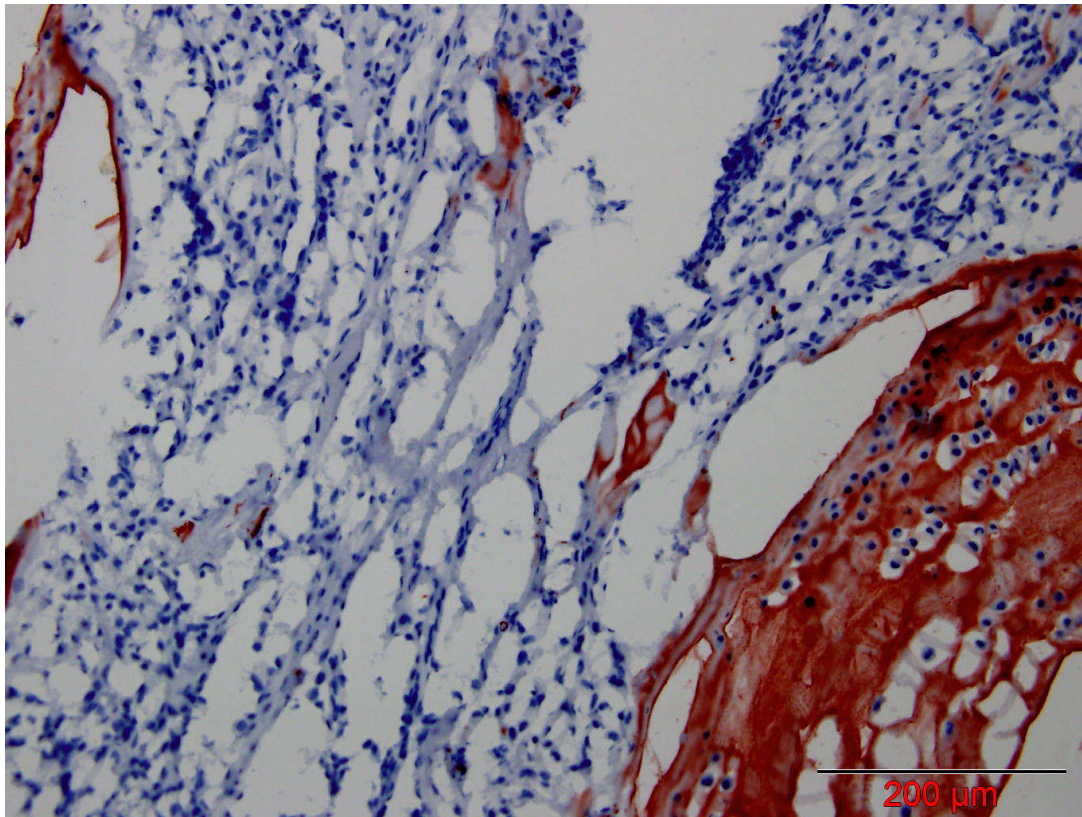


Abb.18: Nahaufnahme (D7R11_S23) des Bohrlochkanales, der durch die Fuge zieht. Links im Bild zeigt sich die Kollagen II gefärbte Epiphysenfuge.

4.4. 14. postoperativer Tag

Am 14. postoperativen Tag finden sich in allen Schnitten, in denen der Bohrlochkanal vollständig durch die Fuge zieht, Knochenbalken, die eindeutig Kollagen I positiv gefärbt sind. Wie bereits in den vorigen Schnitten angedeutet, findet man hier auch linksseitig im Bohrkanal Zellen aneinandergereiht, die positiv gefärbt sind. Am Tag 14. treten diese Zellen noch deutlicher hervor.

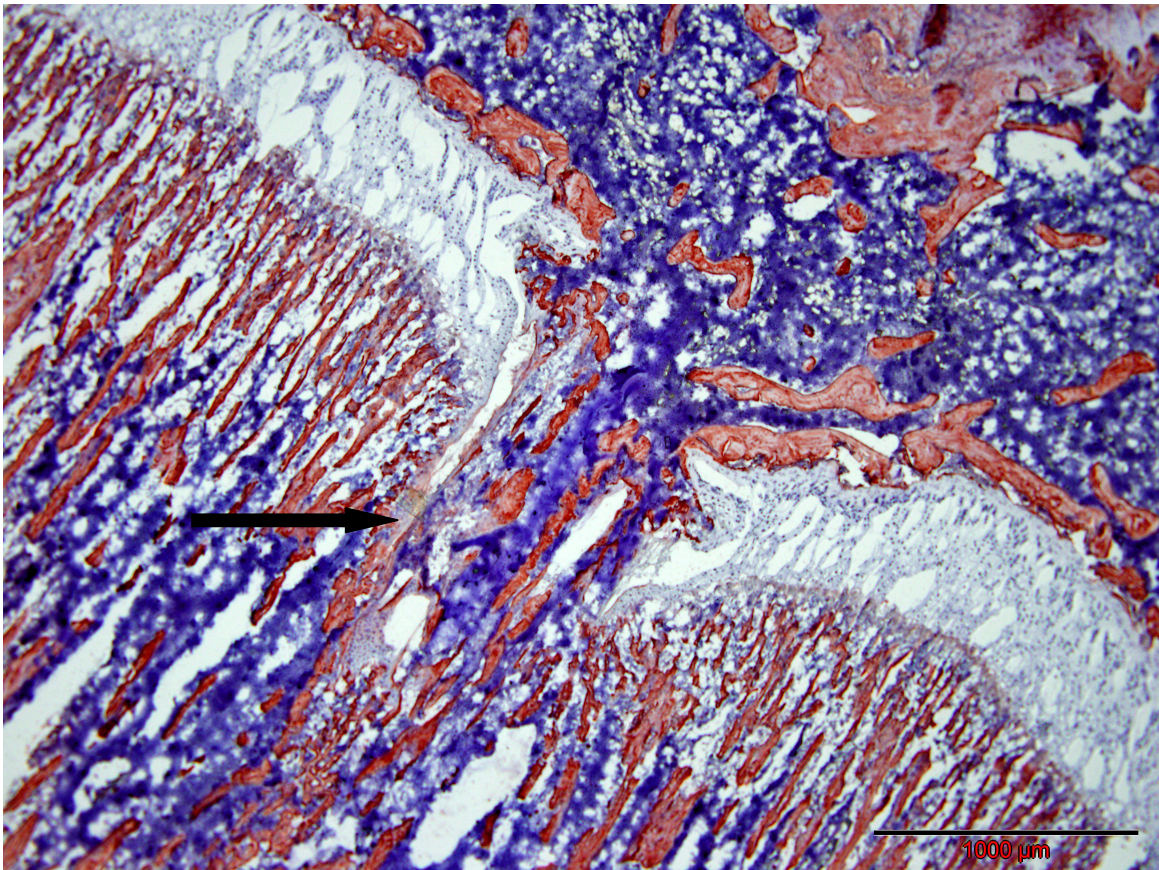


Abb.19: Kollagen I Färbung von D14R1_S12. Es zeigen sich die ersten Knochenbalken im Fugendefekt. Hier handelt es sich um eine stark positive Färbung und Gegenfärbung weshalb die Farben sehr intensiv erscheinen. Der schwarze Pfeil markiert die linkseitig angeordnete Zellzone, welche oben im Text kurz beschrieben wurde. In diesem Schnitt wirkt diese Zone leicht Kollagen 1 positiv.

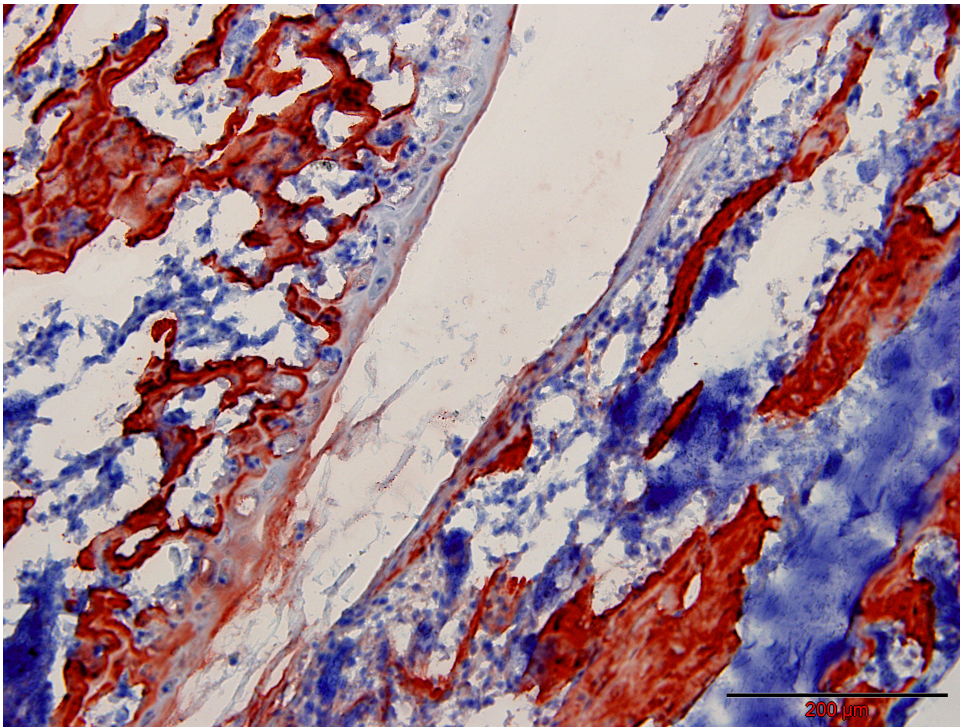


Abb.20:
 Hier wurde
 von dem
 selben Schnitt
 wie im oberen
 Bild eine
 vergrößerte
 Aufnahme der
 Zone im
 linken
 Randbereich
 des
 Bohrlochkana
 ls

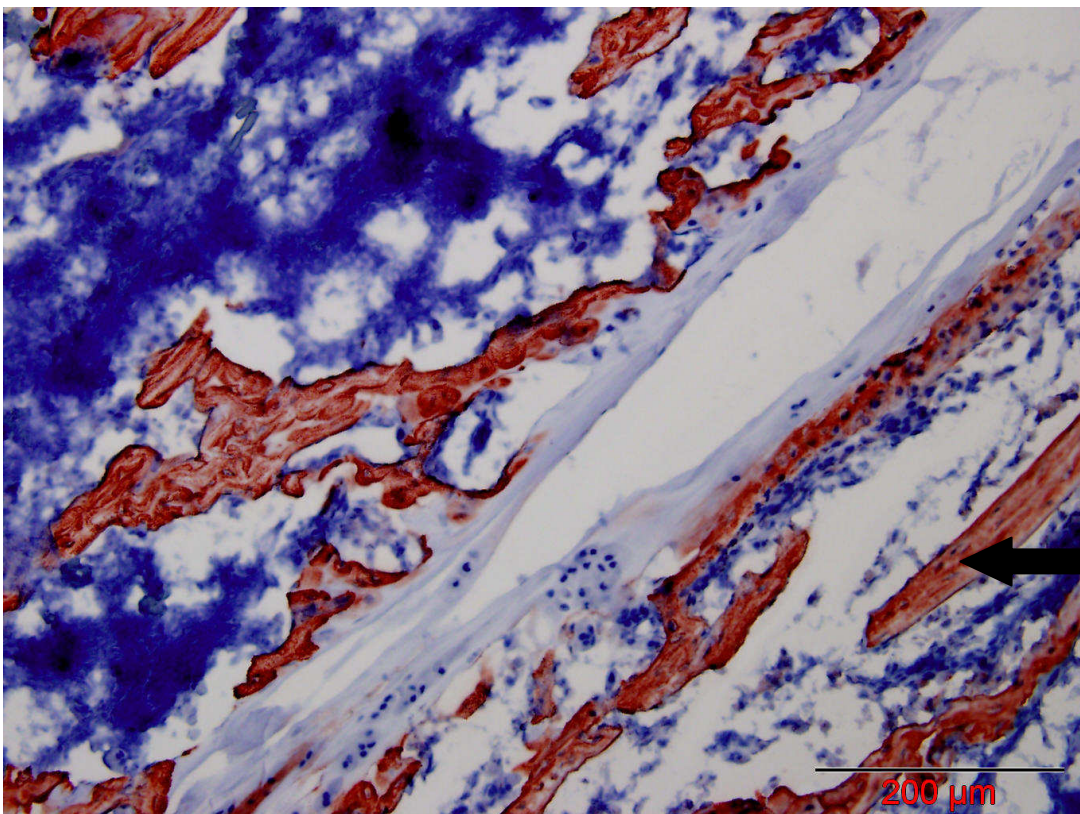


Abb.21: In diesem Schnitt (D14R10_S12) zeigen jene Zellen, die sich an der linken Seite des Bohrkanals anordnen und bis in die Tiefe reichen keine positive Färbung. Der schwarze Pfeil zeigt auf ein eindeutig Kollagen II positives Knochenstück.

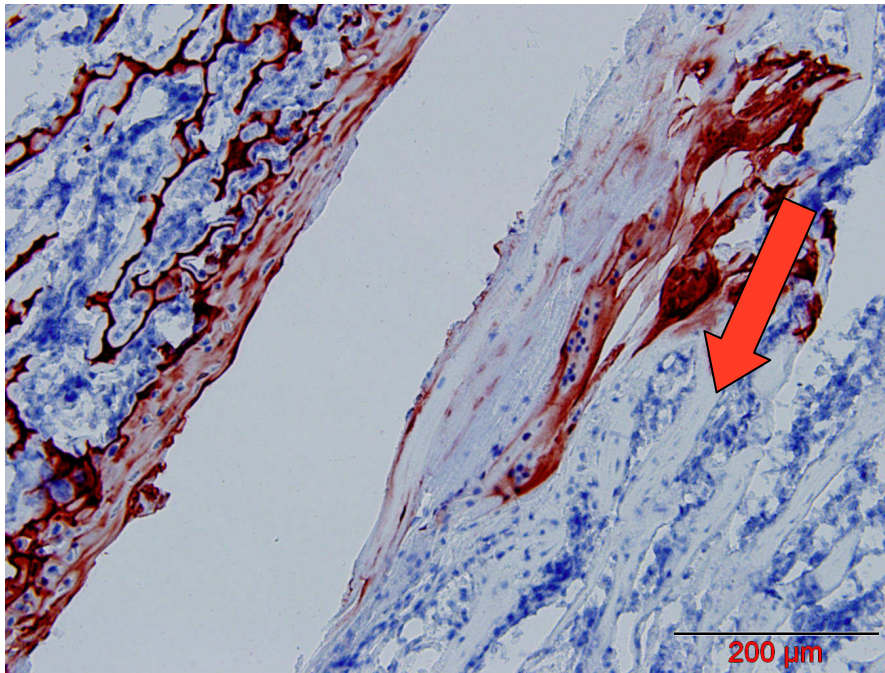


Abb.22: In dem dazugehörigen Kollagen II gefärbten Schnitt (D14R10_S12) sieht man eine eindeutig positive Färbung dieser Zellen. Der rote Pfeil zeigt die Bohrrichtung und den Defekt mit nicht angefärbten Knochenbälkchen.

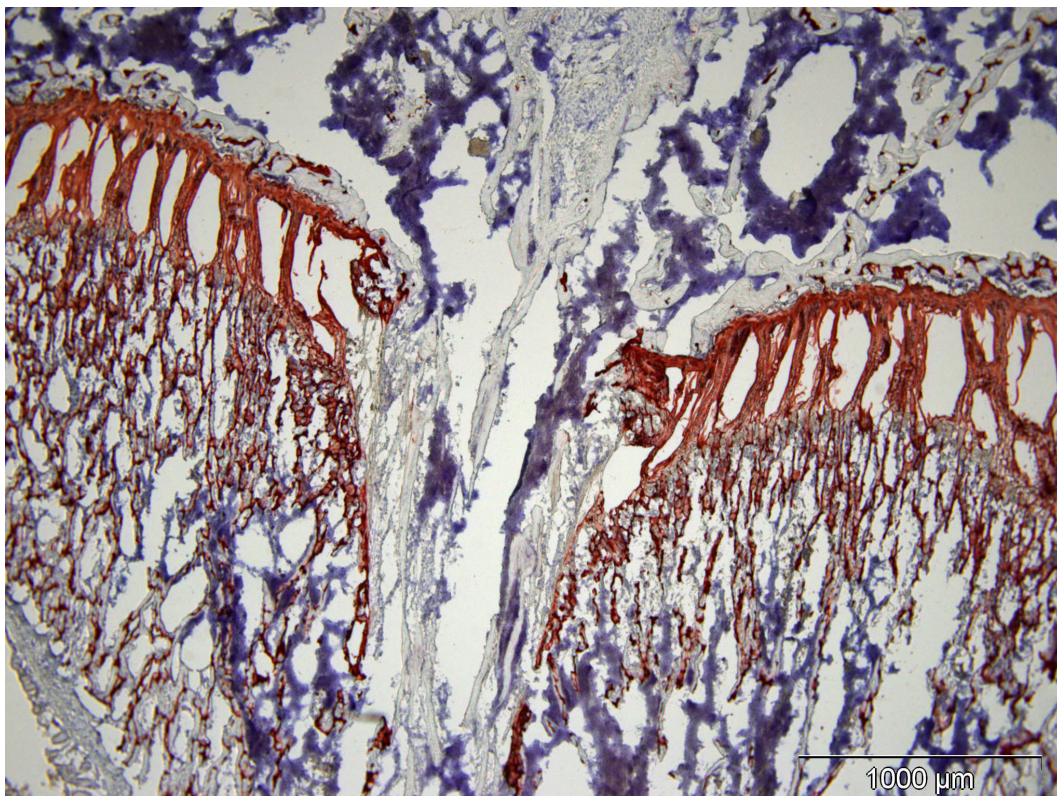


Abb.23: Kollagen II Übersichtsbild von D14R12_S21 Die Fuge ist eindeutig angefärbt. Im Bereich des Bohrloches zeigen sich starke Knochenbalken, die man bereits als Knochenbrücke bezeichnen kann.

4.5. 28. postoperativer Tag

Wie bereits bei Tag 14. ersichtlich findet man hier auch eine Knochenbrücke vor, die unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Die Zellen am Randbereich des Bohrlochkanals treten in diesen Schnitten auch auf.

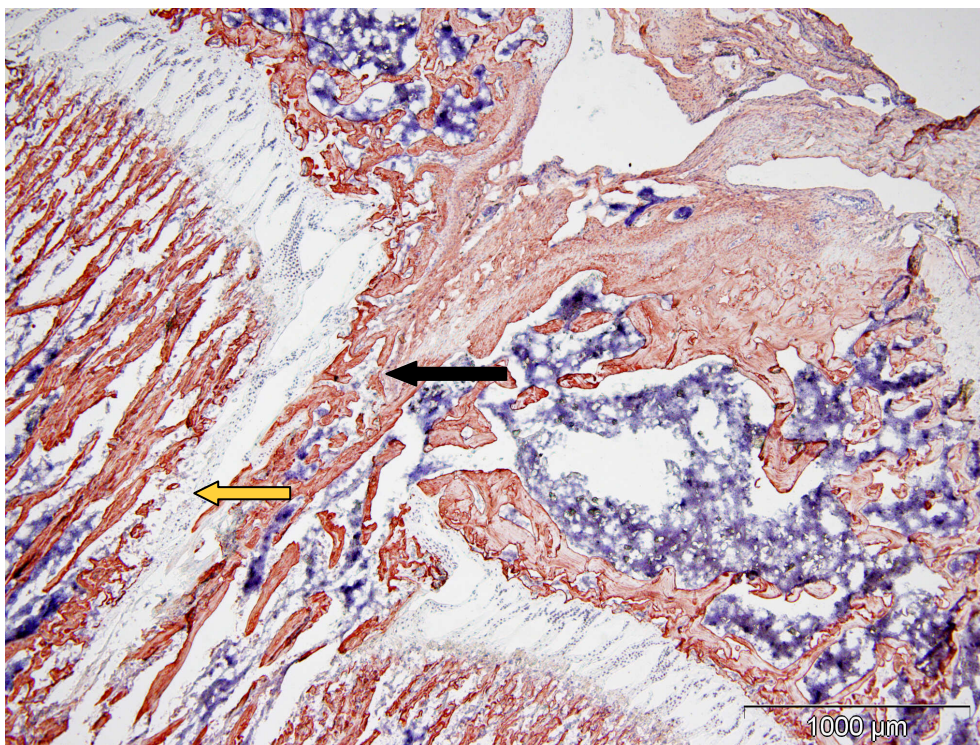


Abb.24: Kollagen I Färbung von D28R10_S10. Die Knochenbrücke ist in diesem Schnitt stark ausgeprägt und eindeutig erkennbar (schwarzer Pfeil). Am Rand zeigt der gelbe Pfeil auf die Zellen im Randbereich, die in diesem Fall keine positive Färbung zeigen.

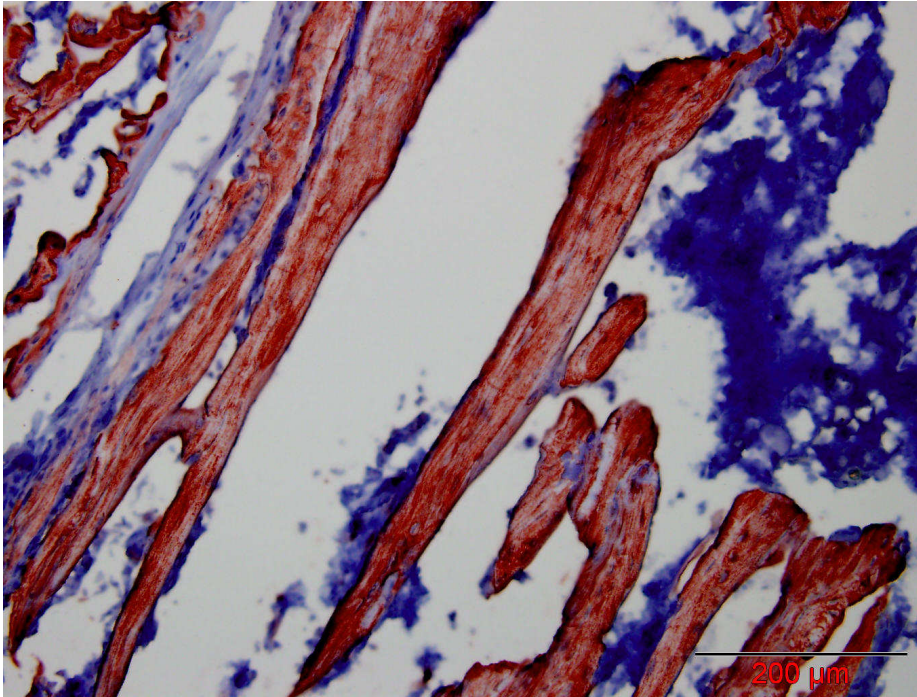


Abb.25: Vergrößerte Aufnahme der Kollagen I positiven Knochenbalken im Bereich des Bohrkanals von D28R13_S32

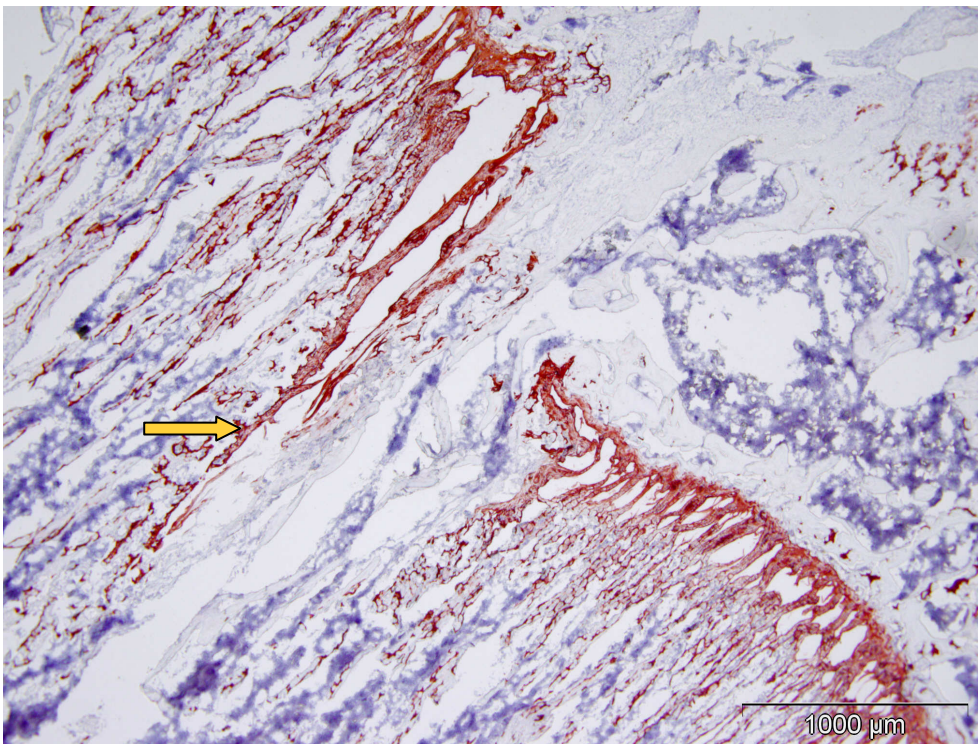


Abb.26: Kollagen II Färbung von D28R10_S11. Die Knochenbrücke zeigt eindeutig keine Färbung. Die Zellen im Randbereich des Bohrkanals sind positiv angefärbt (gelber Pfeil)

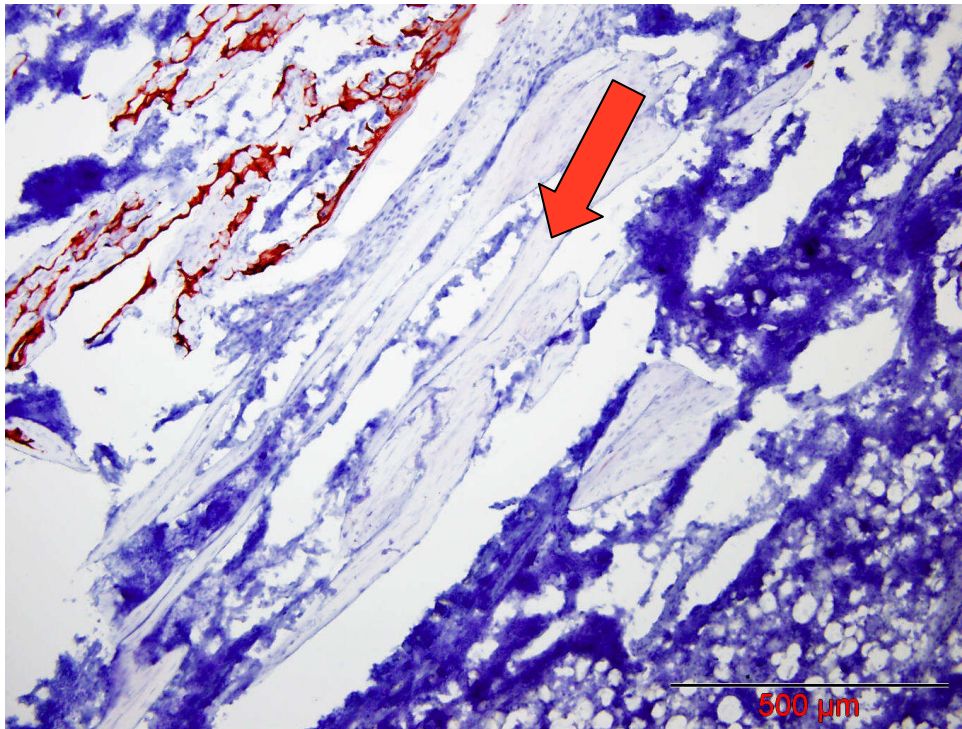


Abb. 27: Kollagen II negative Knochenbalken im Bereich des Bohrlochkanals (D28R13_S33) Der rote Pfeil zeigt die Bohrrichtung von Seiten der Gelenksfläche.

4.6. 42. postoperativer Tag

Aufgrund der Tatsache, dass man hier nicht viel Veränderung im Vergleich zu Tag 28 sieht, werden hier nur zwei Bilder gezeigt. Die Knochenbrücke füllt den ganzen Defekt auf.

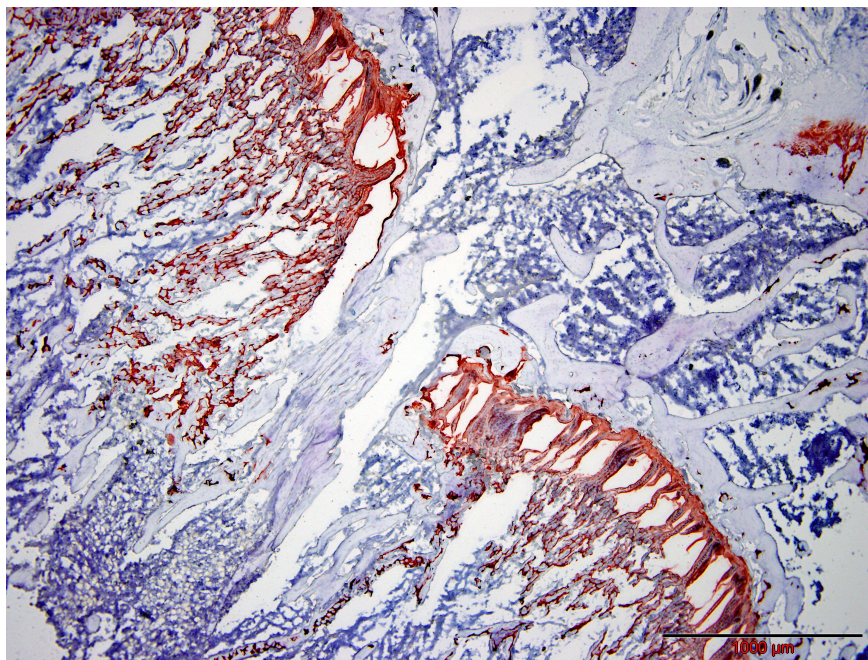
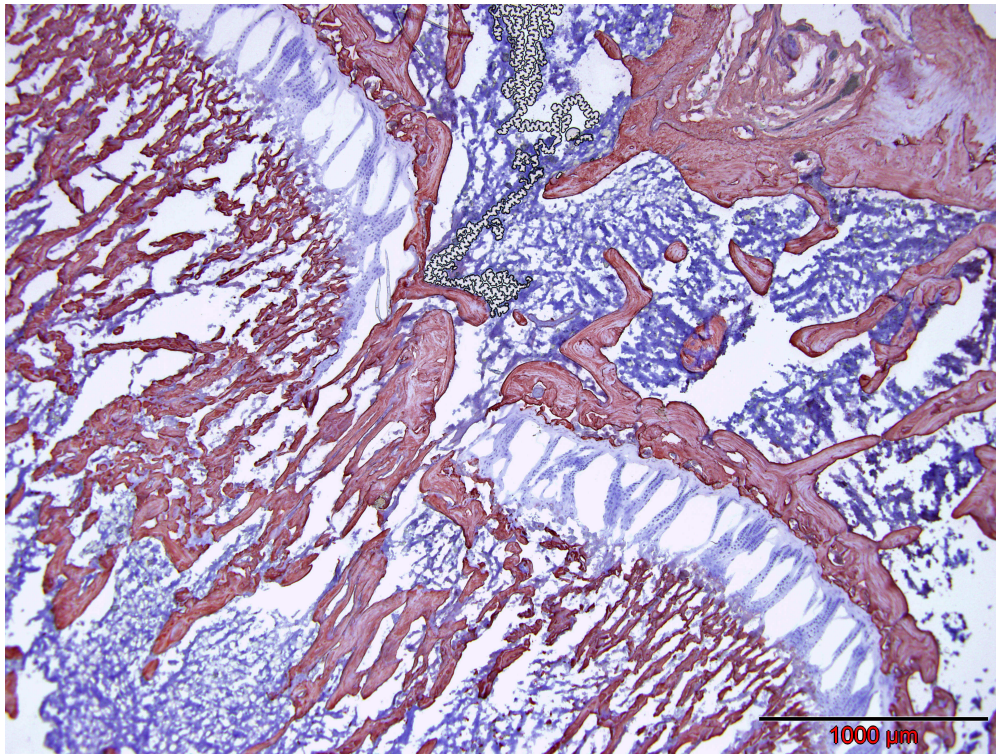


Abb. 28:
 Oben Kollagen
 I Färbung von
 D42R19_S4
 Links ist ein ein
 Kollagen II
 gefärbter
 Schnitt von
 D42R19_S5
 dargestellt. In
 beiden ist die
 Knochenbrücke
 gut sichtbar.

4.6. 82. postoperativer Tag

Am 82. Tag ist die Knochenbrücke gut ausgebildet und zeigt in einigen Schnitten einen schönen zusammenhängenden Verlauf. In der Knochenbrücke verlaufen offenbar auch größere Gefäße.

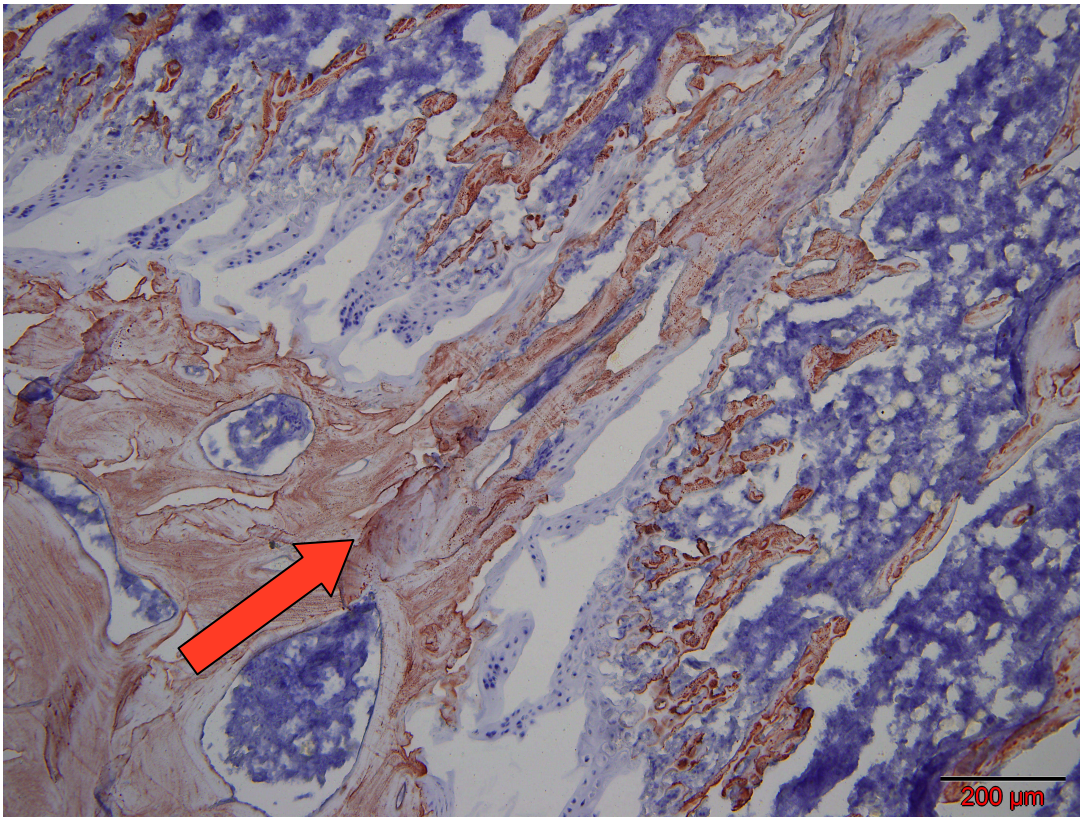


Abb.29: Kollagen I Färbung von D82R5_S113. Der Defekt wird fast vollständig von der Knochenbrücke durchzogen. Der rote Pfeil zeigt die Bohrrichtung von Seiten der Gelenksfläche an.

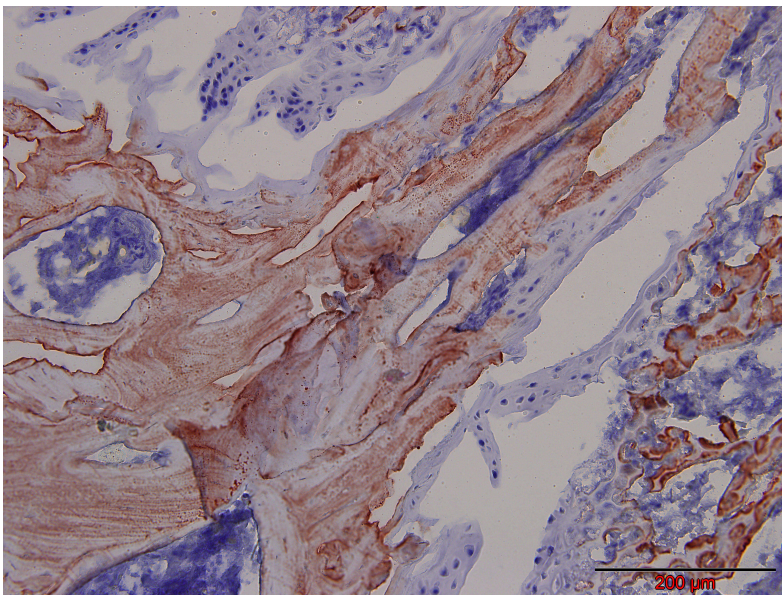


Abb.30:
Vergößerte
Aufnahme
des oben
gezeigten
Schnittes.
D82R5_S113

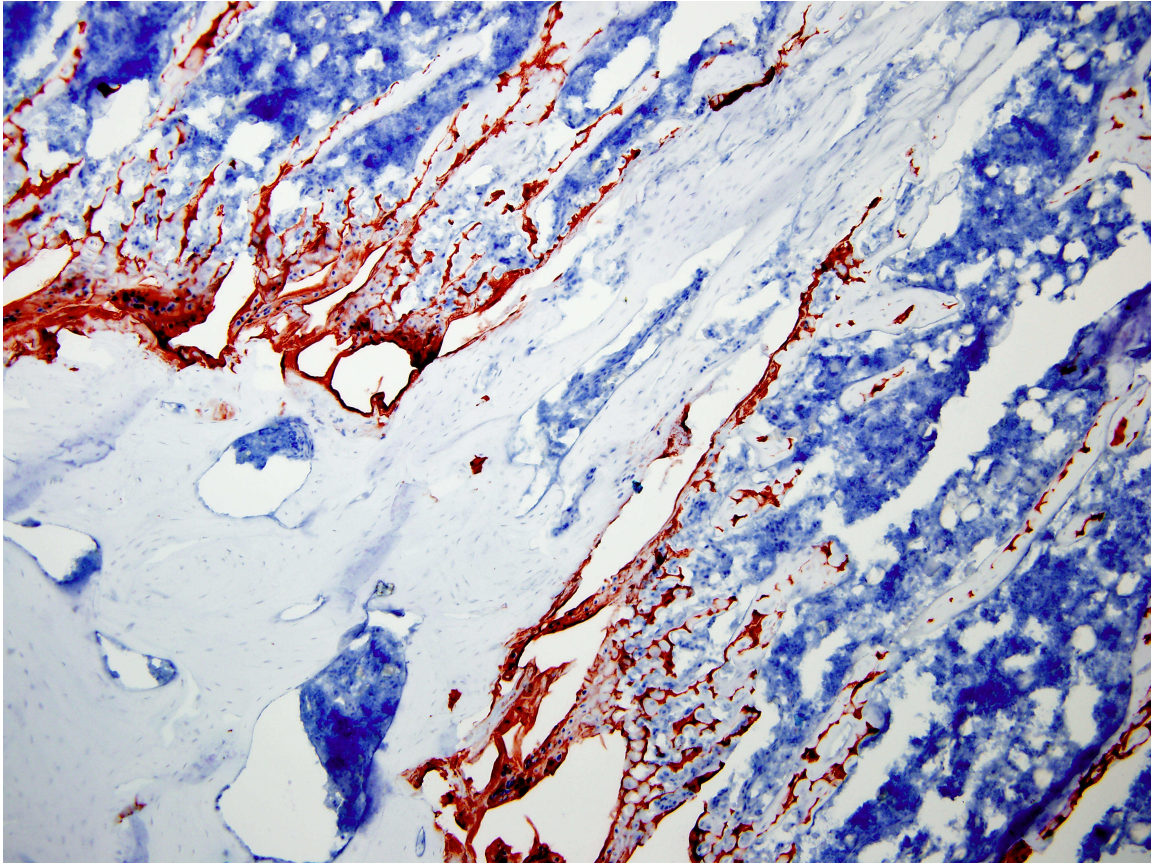


Abb.31: Kollagen II gefärbter Schnitt (D82R5_S114) Die Fuge zeigt eine schöne Färbung. Die Knochenbrücke im Bohrdefekt zeigt keine Färbung. Dazwischen sind auch größere Gefäße sichtbar.

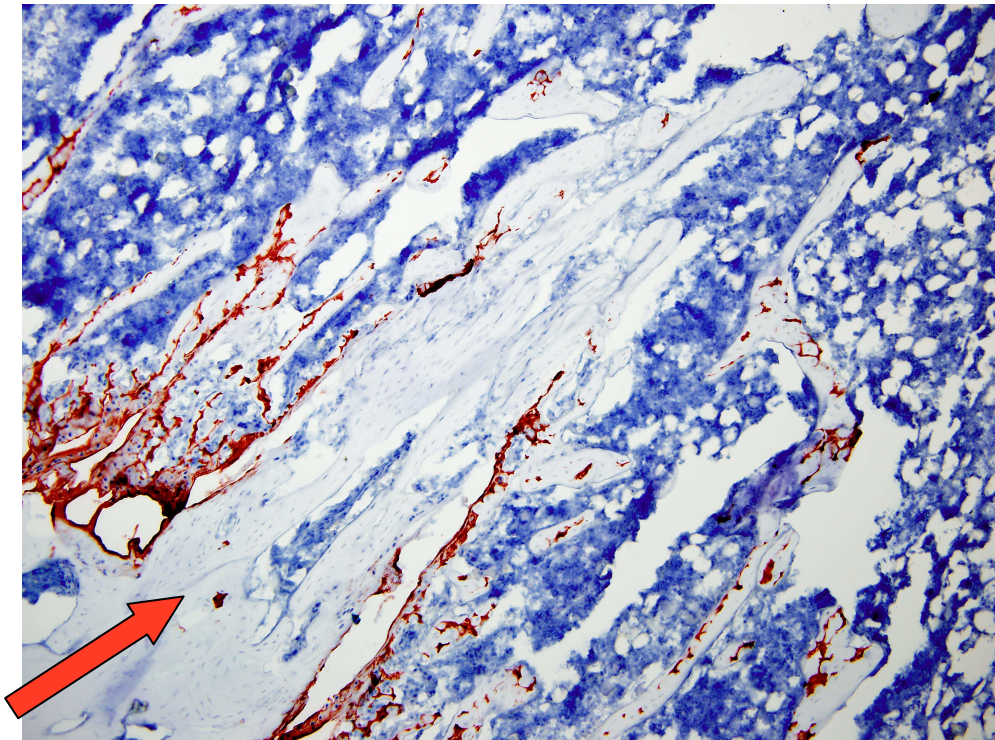


Abb.32: Kollagen II Färbung von D82R5_S114. Darstellung der Knochenbrücke seitlich von der Epiphysenfuge begrenzt. Der rote Pfeil weist auf die Bohrriechtung von Seiten der Gelenksfläche

4.7. Negative Kontrolle

Bei jeder Färbung wurde als Kontrolle ein Objektträger mit einem ungebohrten Knochen, statt mit dem primären Antikörper mit PBS behandelt. Dies diente als negative Kontrollfärbung.

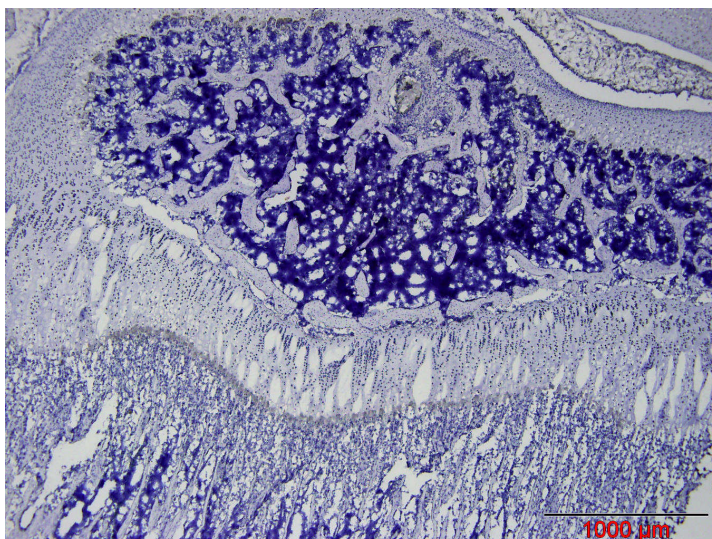


Abb.33: Ungebohrte negative Kontrolle. Es zeigt sich keine Kollagenfärbung.

4.8. Ein kurzer Überblick

1. postoperativer Tag

Hier findet man hauptsächlich Hämatom und durch die Bohrung abgesplitterte Knochenstücke

3. postoperativer Tag

Es tauchen vermehrt Entzündungszellen auf. Das Hämatom beginnt sich zu organisieren und die Knochensplitter werden weggeräumt.

7. postoperativer Tag

Das Hämatom ist bereits abgeräumt. Im Bereich des Defektes finden sich viele mesenchymale Zellen und vereinzelt Kollagen I positives Gewebe, welches eventuell schon auf eine Knochenneubildung hindeutet. Am Rand des Defektes ordnen sich Zellen an, die wie Knorpelzellen imponieren und zum Teil Kollagen II positive Färbung zeigen.

14. postoperativer Tag

Im Bohrlochkanal zeigen sich nun schon sehr eindeutig positive (Kollagen I) gefärbte Knochenbälkchen, die den ganzen Defekt durchziehen. Im Randbereich findet man wiederum diese Knorpelzellen, die z.T. wie hypertrophe Chondrozyten aussehen. Sie zeigen in den meisten Schnitten eine Kollagen II positive Färbung.

28. postoperativer Tag

Die Knochenbalken sind nun stärker ausgeprägt. Man spricht von einer Knochenbrücke. Die Knorpelzellen am Rande sind noch vorhanden.

42. postoperativer Tag

An diesem Tag zeigt sich keine massive Veränderung der Knochenbrücke im Vergleich zum 28. postoperativen Tag. Allerdings sind die Knorpelzellen in dieser Übergangszone zwischen Bohrlochkanal und intaktem Gewebe zunehmend weniger zu beobachten.

82. postoperativer Tag

Stark ausgebildete Knochenbrücke, die den gesamten Bohrkanal durchzieht. Die Zellen im Randbereich sind nicht mehr zu finden.

5. DISKUSSION

Kindliche Frakturen, die die Wachstumsfuge verletzen, können für diesen kleinen Menschen massive Auswirkungen für den Rest seines Lebens haben. Deshalb ist es wichtig, die Vorgänge in der Wachstumsfuge zu untersuchen und verstehen zu lernen. Und trotz der vielen Forschung, habe ich das Gefühl, dass wir bis jetzt nur einen Bruchteil dessen verstehen, was sich im menschlichen Körper abspielt.

Im gesamten Versuchsaufbau wurde die Ratte gewählt, weil sie relativ einfach zu versorgen sind und dem menschlichen Knochen sehr ähnlich sind. Ihr Wachstum erfolgt rascher und ist deshalb gut zu beobachten. In vorangegangenen Studien konnte eine Knochenbrückenbildung in einem gewissen Zeitraum bereits nachgewiesen werden. Da unsere Ratten alle Mitte des dritten Monates euthanasiert wurden, konnte ein vollkommener Verschluss der Epiphysenfuge nicht beobachtet werden. Auch ein vorzeitiger kompletter Schluss der Wachstumsfuge wurde nicht nachgewiesen. Der normale Fugenschluss der Ratten beginnt bei beiden Geschlechtern um den dritten Monat und endet für männliche Ratten um das 10. Monat und bei Weibchen um das achte Monat. [50];[51]

Die dargestellte Versuchsreihe mit den immunhistochemischen Färbungen von Kollagen I und II wurde im Rahmen eines ganzen Forschungsprojektes von Prof. Weinberg an der Abteilung für Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Graz durchgeführt. Ich habe mich speziell auf die Kollagen I und Kollagen II Färbungen konzentriert um den genauen Ablauf der Knochenbrückenbildung zu untersuchen und Knorpel eindeutig von Knochen zu unterscheiden. In diesen Färbungen zeigen sich erstmals am Tag 7 Hinweise auf eine Knochenbildung, wie es auch in anderen Studien bei Xian et al [2] gezeigt wurde. Am Tag 14. sieht man schon eindeutig Knochenbalken, die den Bohrlochkanal komplett ausfüllen. Eine durchgehende Knochenbrücke zeigt sich in meinen Färbungen

erst ab Tag 28. Lee et al [52] beschreibt eine homogene durchgehende Knochenbrücke 3 Wochen postoperativ im Mausversuch. Sowohl bei Xian et al [2] als auch Lee et al [52] wurde die Fraktur durch eine Bohrung imitiert, die durch ein kortikales Fenster von der Metaphyse durch die Fuge geführt wurde. Dabei wurde strikt darauf geachtet, was im Gegensatz zu unseren Bohrungen steht, die Gelenksfläche nicht zu verletzen. Am Tag 82 zeigt sich eine stark ausgebildete Knochenbrücke, die fest verankert zu sein scheint.

Schon Trueta et al [21] beschäftigte sich mit Verletzungen der Wachstumsfuge. Er konnte bereits 1960 die Ausbildung von Knochenbalken am achten Tag, nach dem Setzen einer Bohrlochläsion im Kaninchen, nachweisen. Er führte dies auf die einsprossenden kapillären Gefäße zurück, die die Läsion besiedelten. [21]

Wie genau diese Knochenbrücke entsteht, stellt noch immer ein Rätsel dar. Kalzifizieren direkt Osteoblasten, die sich aus mesenchymalen Zellen differenzieren, und entsteht das Knochengewebe somit auf dem intermembranösen/ direkten Weg? Oder wird der Knochen indirekt/ enchondral über die Zwischenstufe Knorpelgewebe gebildet? Zhou et al. [53] und Xian et al [2] fanden Hinweise auf einen reinen direkten Weg der Knochenbildung in ihren Versuchen mit Ratten. Wie bereits erwähnt, erfolgte die Bohrung durch ein kortikales Fenster ohne Verletzung der Gelenksfläche. Dies mag möglicherweise einen entscheidenden Unterschied zu unserer Studie darstellen. Auch Lee et al [d] versucht in seiner Studie zu zeigen, dass der Knochen direkt über eingewanderte Osteoprogenitorzellen entsteht. In unserer Studie fanden wir jedoch im seitlichen Bereich des Bohrlochkanals vom Tag 7-28 Zellen, die in vielen Schnitten Col 2 positiv gefärbt waren und wie Knorpelzellen imponierten. Diese Zellen fanden sich gehäuft im linken Bereich des Präparates, was eventuell mit der Bohrrichtung oder dem Gewinde des Bohrers zu tun haben könnte. Natürlich könnte auch die Tatsache, dass wir die Bohrung über den Zugang der Gelenksfläche gewählt haben, eine Rolle spielen. Meine Ergebnisse und auch die Ergebnisse von anderen Studienteilnehmern, die sich mit der Gefäßeinsprossung und Färbung von Kollagen 10 beschäftigt haben, deuten darauf hin, dass der Prozess der Knochenbrückenbildung eine Kombination von enchondraler und intermembranöser Ossifikation ist. Da jedoch vor allem Salter Harris Typ III und Typ IV Verletzung zu

Wachstumsstörungen führen [49], ist die Imitation der Fraktur über die Bohrung durch die Gelenksfläche viel nahe liegender, weil genau bei diesen Graden der Verletzung immer ein Beteiligung der Gelenksfläche vorliegt.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Linhart W.E., Laer L: Allgemeine Gesichtspunkte zur kinderorientierten Behandlung von Verletzungen. *Der Orthopäde* 2005; 34: 1169-1186
- [2] Xian C.J., Zhou F.H., McCarty R.C., Foster B.K: Intramembranous ossification mechanism for bone bridge formation at the growth plate cartilage injury site. *Journal of Orthopaedic Research* 2004; 22:417-426
- [3] Caine D., DiFiori J., Maffulli N: Physeal injuries in children's and youth sports: reason for concern?. *Br J Sports Med* 2006; 40: 749-760
- [4] Weinberg A.M., Tscherne H: Tscherne Unfallchirurgie – Unfallchirurgie im Kindesalter- Allgemeiner Teil, Kopf, Obere Extremität, Wirbelsäule. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag (2006), S 15-37
- [5] Fanghänel J., Pera F., Anderhuber F., Nitsch R: Waldeyer Anatomie des Menschen. 17. Auflage, Berlin: De Gruyter (2003), S.22-27.
- [6] Bucher O., Wartenberg H: Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 12. Auflage, Bern: Verlag Hans Huber (1997), S. 129-140.
- [7] Junqueira L.C.U., Carneiro J, Gratzl M: Histologie. 6. Auflage, Heidelberg (2005), S.92-103.
- [8] Sadler T.W: Medizinische Embryologie – Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen. 10. Auflage, Stuttgart: Thieme Verlag (2003) S. 150.
- [9] Kronenberg H.M: Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 2003; 423: 332-336.
- [10] Kronenberg H.M: The role of the perichondrium in fetal bone development. *Annals of the New York academy of sciences* 2007; 1116: 59,60.
- [11] Rauch F: Bone Growth in Length and Width: The Yin and Yang of Bone Stability. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2005; 5(3): 197-199.
- [12] Bonewald LF: Osteocytes as Dynamic Multifunctional Cells. *Annals of the New York academy of sciences* 2007; 1116: 281-284
- [13] Roodman G.D: Osteoclast differentiation. *Clinical Review in Oral Biology & Medicine* 1991; 2: 389-393
- [14] Ballock R.T., O'Keefe R.J: The Biology of the Growth Plate. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 2003; 85: 715-726
- [15] Ballock R.T., O'Keefe R.J: Physiology and Pathophysiology of the Growth Plate. *Birth Defects Research (Part C)* 2003; 69: 123-143

- [16] Forriol F, Shapiro F: Bone Development. *Clinical Orthopaedics and related Research* 2005; 432: 14-33
- [17] Van der Eerden B.C.J., Karperien M., Wit J.M: Systemic and Local Regulation of the Growth Plate. *Endocrine Reviews* 2003; 24(6): 782-801
- [18] Lindberg M.K., Alatalo S.L., Halleen J.M., Mohan S., Gustafsson J.A., Ohlsson C: Estrogen receptor specificity in the regulation of the skeleton in femal mice. *Journal of Endocrinology* 2001; 171: 229-236
- [19] Ornitz D.M., Jingsong X., Colvin J.S., McEwen D.G., MacArthur C.A., Coulier F., Gao G., Goldfarb M: Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family. *The Journal of Biological Chemistry* 1996; 271 (25): 15292-15297
- [20] Colvin J.S., Bohne B.A., Harding G.W., McEwen D.G., Ornitz D.M: Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nature Genetics* 1996; 12: 390-397
- [21] Meyer U., Wiesmann H.P: *Bone and Cartilage Engineering*. 1.Auflage, Berlin Heidelberg: Springer (2006), S. 10-30
- [22] Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P: *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. 2. Auflage, Weinheim: Wiley-VCH Verlag (2001), S.643-646
- [23] Trueta J., Morgan J.D: The vascular Contribution to Osteogenesis I – Studies by the Injection Method. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1960; 42 B (1): 97-109
- [24] Trueta J., Little K: The vascular Contribution to Osteogenesis II – Studies with the Electron Microscope. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1960; 42 B (2): 367-376
- [25] Trueta J: The vascular Contribution to Osteogenesis III – Changes in the Growth Cartilage Caused by Experimentally Induced Ischaemia. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1960; 42B (3): 571-587
- [26] Hausbrandt P: Reaktionen der Wachstumsfuge auf physikalische Verletzungen mit Fokussierung auf Knochenbrückenbildung – Eine Evaluierung im Rattenmodell mittels qRT-PCR und vergleichender MRT. Graz (2009); S. 21
- [27] Duncan C.P., Shim Sun-Shik: The autonomic nerve supply of bone. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1977; 59B (3): 323-330

- [28] Tscheliessnig K.H., Uranüs S., Pierer G: Lehrbuch der Allgemeinen und Speziellen Chirurgie. 3. Auflage, Wien-München-Bern: Wilhelm Maudrich Verlag (2005), S.345-354
- [29] Liehn M., Middelanis-Neumann I., Steinmüller L., Döhler J.R: OP-Handbuch. 4. Auflage, Heidelberg: Springer Verlag (2007), S. 152
- [30] Williams N.S., Bustrade C.J.K., O'Connell P.R: Bailey & Love's Short Practice of Surgery. 25th Edition (int. Students Edition), London: Hodder Arnold (2008), S 353-365
- [31] Colton C.L., Fernandez Dell'Oca A., Holz U., Kellam J.F., Ochsner P.E: AO Principles of Fracture Management. New York, Thieme Verlag (2001), S. 46-53
- [32] Scharf H.P., Rüter A: Orthopädie und Unfallchirurgie. 1. Auflage, München: Elsevier Verlag (2009), S. 349
- [33] Guterath L., Gerstorf M: Schockraum-Management – Organisation und Patientenversorgung. 1. Auflage, München: Elsevier Verlag (2009), S 194
- [34] Fehmer T., Arens S., Muhr G., Kälicke T: Klassifikation von Frakturen im Wachstumsalter. Trauma Berufskrankheit 2005; 7: 11-14
- [35] Weinberg A.M., Tscherne H: Tscherne Unfallchirurgie – Unfallchirurgie im Kindesalter- Allgemeiner Teil, Kopf, Obere Extremität, Wirbelsäule. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag (2006), S 51-55
- [36] Täger G., Hussmann B., Lendemans S., Nast-Kolb D: Epiphysäre und epiphysennahe Frakturen bei Kindern – Teil II Untere Extremität. Unfallchirurg 2009; 112: 185-201
- [37] Weinberg A.M., Tscherne H: Tscherne Unfallchirurgie – Unfallchirurgie im Kindesalter- Allgemeiner Teil, Kopf, Obere Extremität, Wirbelsäule. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag (2006), S 39-49
- [38] Hasler CC., Laer L: Pathophysiologie post-traumatischer Deformitäten der unteren Extremität im Wachstumsalter. Der Orthopäde 2000; 29: 757-765
- [39] Linhart W.E., Laer L: Allgemeine Gesichtspunkte zur kinderorientierten Behandlung von Verletzungen. Der Orthopäde 2005; 34: 1169-1186
- [40] Einhorn T.A: The Science of Fracture Healing. Journal of Orthop. Trauma 2005; 19 (Suppl.): 4-6
- [41] Einhorn T.A: The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing. Clinical Orthopaedics and related research 1998; 355: 7-21

- [42] Einhorn T.A., Lee C.A: Bone Regeneration: New Findings and Potential Clinical Applications. *Journal of American Academic Orthopedic Surgery* 2001; 9: 157-165
- [43] Barnes G.L., Kostenuik P.J., Gerstenfeld L.C., Einhorn T.A: Perspective Growth Factor Regulation of Fracture Repair. *Journal of Bone and Mineral Research* 1999; 11 (Vol 14): 1805-1815
- [44] Phillips A.M: Overview of the fracture healing cascade. *Injury, Int. Journal of the Care of the Injured* 2005; 36: 5-7
- [45] Carano R.A.D., Filvaroff E.H: Angiogenesis and bone repair. *DDT (Drug discovery today)* 2003; 8: 980-988
- [46] Gaber S., Fischerauer E.E., Fröhlich E., Janezic G., Amerstorfer F., Weinberg A.M: Chondrocyte apoptosis enhanced at the growth plate: a physal response to diaphyseal fracture. *Cell Tissue Research* 2009; 335: 539-549
- [47] Janezic G., Widni E.E., Haxhija E. Q., Stradner M., Fröhlich E., Weinberg A.M: Proliferation analysis of the growth plate after diaphyseal midshaft fracture by 5'-bromo-2'-deoxy-uridine. *Virchows Arch* 2010; 457: 77-85
- [48] Xian C.J., Chung R., Mascai C.E., Foster B.K: Injury responses and repair mechanisms at the growth plate cartilage. *Res. Adv In Histochem. & Cytochem.* 2008;1: 1-6
- [49] Ngo T.Q., Scherer M.A., Zhou F.H., Foster B.K., Xian C.J: Expression of Bone Morphogenic Proteins and Receptors at the Injured Growth Plate Cartilage in Young Rats. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2006; 54(8): 945-954
- [50] Garces G.L., Mugica-Garay I., Lopez-Gonzalez Coviella N., Guerado E: Growth plate modifications after drilling. *Journal of pediatric orthopedics* 1994; 14(2):225-228
- [51] Martin E.A., Ritman E.L., Turner R.T: Time course of epiphyseal growth plate fusion in rat tibiae. *Bone* 2003; 32: 261-276
- [52] Lee M.A., Nissen T.P., Otsuka N.Y: Utilization of a Murine Model to Investigate the Molecular Process of Transphyseal Bone Formation. *Journal of Pediatric Orthopaedics* 2000; 20:802-806

[53] Zhou F.H., Foster B.K., Sander G., Xian C.J: Expression of proinflammatory cytokines and growth factors at the injured growth plate cartilage in young rats. Bone 2004; 35: 1307-1315

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Abschnitte des Humerus als Beispiel eines langen Knochens.....	S11
Abb. 2: Fotografie einer Epiphysenfuge zur Darstellung der einzelnen Zonen.....	S18
Abb. 3: Schematische Darstellung des neg. Rückkopplungsmechanismus von Ihh und PTHrP.....	S21
Abb. 4: Schematische Darstellung einer Salter Harris Typ I Fraktur.....	S32
Abb. 5: Schematische Darstellung einer Salter Harris Typ II Fraktur.....	S32
Abb. 6: Schematische Darstellung einer Salter Harris Typ III Fraktur.....	S33
Abb. 7: Schematische Darstellung einer Salter Harris Typ IV Fraktur.....	S33
Abb. 8: Fotos zum Operationsablauf.....	S47
Abb. 9-33: Fotos von histologischen Schnitten	

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Kollagene.....	S23
Tab. 2: Einteilung der Versuchstiere.....	S41
Tab. 3: Verwendete Medikamente.....	S42

