

Aus der Klinik für Unfall-, Hand-, und Wiederherstellungschirurgie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. med. Tim Pohlemann

**Angiogenese und Expression von angiogenen
und osteogenen Wachstumsfaktoren während der
normalen Frakturheilung und in Pseudarthrosen**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2013

vorgelegt von: Arthur Markus Pieruschka
geb. am: 13.03.1984 in Oppeln

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
1.1	Zusammenfassung	1
1.2	Summary.....	2
2.	EINLEITUNG.....	4
2.1	Knochen.....	4
2.2	Frakturen.....	4
2.3	Frakturheilung.....	5
	2.3.1 Primäre Frakturheilung.....	5
	2.3.2 Sekundäre Frakturheilung.....	6
2.4	Störungen der Frakturheilung.....	8
	2.4.1 Verzögerte Frakturheilung.....	9
	2.4.2 Ausbleibende Frakturheilung.....	9
2.5	Pseudarthrosen und Angiogenese.....	11
2.6	Frakturmodell.....	14
2.7	Analyse der Vaskularisierung und Frakturheilung.....	16
	2.7.1 VEGF.....	18
	2.7.2 BMP's und ihre Antagonisten Sclerostin und Noggin.....	20
	2.7.3 Ang-1 und Tie-2.....	22
	2.7.4 MMP13.....	23
	2.7.5 Cyr61.....	24
2.8	Zielsetzung und Fragestellung.....	25
3.	MATERIAL UND METHODEN.....	26
3.1	Studiendesign.....	26
3.2	Versuchstiere.....	27
3.3	Tiermodell.....	27
3.4	Anästhesie.....	29
3.5	Operation.....	30
3.6	Probengewinnung.....	35

3.7	Computer-Tomografie.....	36
	3.7.1 Mikrotomografische Bildgebung.....	36
	3.7.2 Auswertung der Mikrotomografische Bildgebung.....	37
3.8	Histologie.....	39
	3.8.1 Trichromfärbung nach Masson-Goldner.....	39
	3.8.2 Auswertung der Trichromfärbung nach Masson-Goldner.....	40
	3.8.3 Immunhistologische CD-31 Färbung.....	42
	3.8.4 Auswertung der immunhistologischen CD-31 Färbung.....	44
3.9	Western-Blot-Analyse.....	45
	3.9.1 Proteinextraktion, Elektrophorese, Blotting und Detektion.....	45
	3.9.2 Auswertung der Western-Blot-Analyse.....	50
3.10	Statistik.....	50
4.	ERGEBNISSE.....	51
4.1	Postoperativer Verlauf.....	51
4.2	Konventionelle Röntgenbilder.....	53
4.3	Computer-Tomografie.....	54
	4.3.1 Größe des Frakturspalts.....	56
	4.3.2 Überbrückung des Frakturspalts.....	57
	4.3.3 Kallusvolumen.....	58
	4.3.4 Polar Moment of Inertia.....	58
4.4	Histologie.....	59
	4.4.1 Trichromfärbung nach Masson-Goldner.....	59
	4.4.1.1 Größe des Frakturspalts.....	62
	4.4.1.2 Healing Score	62
	4.4.1.3 Periostale Kallusfläche.....	63
	4.4.1.4 Kallusdurchmesser.....	64
	4.4.1.5 Zusammensetzung des periostalen Kallus.....	64
	4.4.1.5.1 Bindegewebe.....	64
	4.4.1.5.2 Knorpel.....	65
	4.4.1.5.3 Knochen.....	66
	4.4.2 Immunhistologische CD-31 Färbung.....	66
	4.4.2.1 Angiogenese im gesamten Kallus.....	67

4.4.2.2	Endostale Angiogenese.....	69
4.4.2.3	Periostale Angiogenese.....	69
4.4.2.4	Zentrale Angiogenese.....	70
4.4.2.5	Intercortikale Angiogenese.....	71
4.5	Western Blot.....	71
4.5.1	VEGF.....	72
4.5.2	BMP-2.....	72
4.5.3	BMP-4.....	73
4.5.4	PCNA.....	74
4.5.5	Sclerostin.....	74
4.5.6	Noggin.....	75
4.5.7	Ang-1.....	76
4.5.8	Tie-2.....	76
4.5.9	MMP13.....	77
4.5.10	Cyr61.....	78
5.	DISKUSSION.....	80
5.1	Frakturmodell.....	80
5.2	Frakturheilung in Unions und Non-Unions.....	82
5.3	Vaskularisierung in Unions und Non-Unions.....	83
5.4	Wachstumsfaktoren in Unions und Non-Unions.....	86
5.4.1	VEGF und BMP-2/-4	86
5.4.2	Sclerostin	90
5.4.3	Noggin	91
5.4.4	Ang-1 und Tie-2	92
5.4.5	MMP13	93
5.4.6	Cyr61	93
5.5	Fazit.....	94
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	97
7.	PUBLIKATIONEN.....	110
8.	DANKSAGUNG.....	111
9.	LEBENS LAUF.....	112

1. Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Ein Ausbleiben der Frakturheilung mit der Ausbildung von Pseudarthrosen (Non-Union) ist nach wie vor ein bedeutsames klinisches Problem. Die Angiogenese ist eng mit der Knochenregeneration verbunden, jedoch bleibt die Rolle der Angiogenese in der Ausbildung von atrophen Pseudarthrosen weiterhin unklar. Weil gezeigt werden konnte, dass etablierte atrophe Pseudarthrosen gut vaskularisiert sind, haben wir die Hypothese aufgestellt, dass eine mangelhafte Expression von angiogenen Wachstumsfaktoren sowie eine verminderte Vaskularisierung während der frühen Phase der Frakturheilung zur Ausbildung von atrophen Pseudarthrosen führen.

In 96 CD-1 Mäusen wurde das rechte Femur mittels Pin-Clip-Osteosynthese stabilisiert und eine Osteotomie mit einer Spaltgröße von 1,80mm (Non-Union-Gruppe) und 0,25mm (Union-Gruppe) erzeugt. Nach 3, 7, 14, 21, 28 und 70 Tagen wurde der Heilungsverlauf mittels Micro-CT und Histologie untersucht. Die Vaskularisierung wurde in verschiedenen Bereichen der Frakturheilung durch immunhistologische Färbung gegen PECAM-1 (CD31) bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression von VEGF, BMP-2, BMP-4, PCNA, MMP13, Ang-1, Tie-2, Cyr61, Noggin und Sclerostin im Western Blot nach 7, 14 und 21 Tagen ermittelt.

Micro-CT und Histologie zeigten in der Union-Gruppe eine normale Frakturheilung mit vollständiger knöcherner Überbrückung der Fraktur, während es in der Non-Union-Gruppe bei allen untersuchten Tieren zur Ausbildung einer atrophen Pseudarthrose kam. Die Vaskularisierung nahm in beiden Gruppen von Tag 3 auf Tag 7 zu und anschließend nach 14 Tagen wieder ab. Insgesamt jedoch unterschied sich die Vaskularisierung zwischen der normalen Frakturheilung und Pseudarthrosen im zeitlichen Verlauf nicht. Interessanterweise war sie im endostalen Bereich der Frakturheilung in der Non-Union-Gruppe nach 14 Tagen stärker ausgebildet als in der Union-Gruppe. Die Expression von VEGF, Ang-1 und MMP13 war signifikant höher in der Non-Union-Gruppe als in der Union-Gruppe, während die Expression von BMP-2, BMP-4, Cyr61 und PCNA in der Non-Union-Gruppe signifikant geringer war als in Tieren mit normaler Frakturheilung. Die Expression von Tie-2, Noggin und Sclerostin war in der

Non-Union-Gruppe nach 14 und 21 Tagen erhöht gegenüber der Union-Gruppe, jedoch ohne statistisch signifikanten Unterschied.

Da die Vaskularisierung in der Non-Union-Gruppe während der frühen Phase der Frakturheilung trotz Ausbleiben einer knöchernen Überbrückung nicht beeinträchtigt war, müssen wir die Hypothese ablehnen. Dementsprechend schlussfolgern wir, dass die Entstehung von atrophen Pseudarthrosen nicht notwendigerweise durch eine verminderte Vaskularisierung oder verminderte Expression von angiogenen Wachstumsfaktoren bedingt ist, sondern eher durch eine verminderte Expression der osteogenen Wachstumsfaktoren BMP-2 und BMP-4 beziehungsweise ein gestörtes Verhältnis von angiogenen zu osteogenen Wachstumsfaktoren.

Weil die Expression von angiogenen Wachstumsfaktoren während der Entstehung der atrophen Pseudarthrosen ausreichend für eine adäquate Vaskularisierung ist, sollten zukünftige Behandlungsstrategien zur Therapie atropher Pseudarthrosen eher auf eine Stimulation der Osteogenese als eine Stimulation der Angiogenese abzielen.

1.2 Summary

Non-union formation due to failure of fracture healing is still a major clinical burden. Angiogenesis is closely associated with bone regeneration, however the role of angiogenesis in non-union formation remains unclear. Since established atrophic non-unions have been shown to be well vascularized, we hypothesized that lack of angiogenic growth factors and impaired vascularization during the early time course of fracture healing determine atrophic non-union formation.

In 96 CD-1 mice femora were stabilized by pin-clip-fixation and osteotomies with a gap size of 1.80mm (non-union group) or a gap size of 0.25mm (union group) were created. After 3, 7, 14, 21, 28 and 70 days fracture healing was analyzed by micro-CT and histomorphometry. Vascularization was determined by immunohistochemical staining of PECAM-1 (CD31) in different healing zones. In addition, expression of VEGF, BMP-2, BMP-4, PCNA, MMP13, Ang-1, Tie-2, Cyr61, Noggin and Sclerostin was analysed in Western Blot after 7, 14 and 21 days.

Micro-CT and histomorphometry showed complete bone bridging in the union group and atrophic non-union formation in the non-union group. Vascularization increased from

day 3 to day 7 in both groups with a decrease after 14 days. However, general vascularization did not differ between unions and nonunions over time. Interestingly, vascularization in the endosteal healing zone was significantly higher in non-unions than in unions after 14 days. Expression of VEGF, Ang-1 and MMP13 was found significantly higher in non-unions, while expression of BMP-2, BMP-4, Cyr61 and PCNA was significantly lower in non-unions compared to unions. Expression of Tie-2, Noggin and Sclerostin was higher in non-unions compared to unions, but without statistical significance.

Because that vascularization during the early time course of fracture healing was not impaired in non-unions despite the failure of bone healing, we have to reject our hypothesis. We rather conclude that atrophic non-union formation is not necessarily due to failure of VEGF or Ang-1 mediated angiogenesis, but is associated with a decreased expression of BMP-2/BMP-4 or an altered ratio of angiogenic to osteogenic growth factors.

Because the intrinsic angiogenic response in atrophic non-unions was sufficient for adequate vascularization, treatment of non-unions should focus on the stimulation of osteogenesis rather than stimulation of angiogenesis.

2. Einleitung

2.1 Knochen

Die Knochen des Menschen bilden mit Muskeln, Bändern und Gelenken den Bewegungsapparat aus und übernehmen vielfältige Aufgaben wie Stützfunktion, Strukturfunktion, Mobilitätsfunktion, Calciumhomöostase und Blutbildung. Es handelt sich dabei nicht um starre destruktionsresistente Struktur, sondern um vitales Gewebe, welches Verletzungen unterliegen kann. Da das Knochengewebe über eine ausgeprägte Heilungsfähigkeit verfügt, können Knochenbrüche folgenlos und ohne Narbenbildung ausheilen (McKibbin 1978). Allerdings kann es unter entsprechenden Umständen auch zu einer verzögerten oder ausbleibenden Heilung kommen, was in dieser Studie unter dem Aspekt der Angiogenese während des Frakturheilungsvorgangs am Mäusefemur näher betrachtet wurde.

Knochen entsteht auf zwei verschiedene Arten: durch Mineralisierung der von den Osteoblasten produzierten Grundsubstanz (= desmale oder intramembranöse oder direkte Ossifikation) oder durch den Ersatz von Knorpelgewebe (= chondrale oder endochondrale oder indirekte Ossifikation). Bei beiden Prozessen entsteht zunächst Geflechtknochen, welcher sich im weiteren Verlauf zu Lamellenknochen umbaut (Kanczler & Oreffo 2008). Diese beiden Vorgänge finden im Rahmen der embryonalen Knochenentwicklung, des Wachstums und der Heilung von Frakturen statt. Dann kommen Geflechtknochen, Lamellenknochen und Resorptionszonen zum Teil nebeneinander vor. Während der Frakturheilung erfolgt die Knochenbildung analog der embryonalen Entwicklung (Ferguson et al. 1999) durch enchondrale und intramembranöse Knochenbildung (Gerstenfeld et al. 2003).

2.2 Frakturen

Unter einer Fraktur versteht man eine Kontinuitätsunterbrechung des Knochens. Ursachen für einen Knochenbruch sind eine direkte Fraktur bei adäquater Gewalteinwirkung von außen auf den Knochen, eine pathologische oder Spontanfraktur

im krankhaft veränderten Knochen bereits bei inadäquater Gewalteinwirkung oder eine Ermüdungsfraktur nach mechanischer Überbeanspruchung des Knochens. Die Form der Fraktur bzw. der Entstehungsmechanismus hängt von der Art der einwirkenden Kraft und der absorbierten Energie ab. Verschiedene Bruchformen werden nach direkter oder indirekter Krafteinwirkung unterschieden. Ziel der Frakturbehandlung ist die Wiederherstellung der Funktion und der Achsen- und Gelenkverhältnisse, soweit dies in Abhängigkeit des Frakturtyps, der Begleitverletzungen und der Gesamtmorbidität möglich ist. Voraussetzungen sind die Reposition und Retention der Fraktur mit dem Ziel der frühfunktionellen Nachbehandlung zur Vermeidung sekundärer Komplikationen. Grundsätzlich stehen konservative und operative Therapieoptionen zur Verfügung. Die Indikationsstellung zur konservativen bzw. operativen Therapie hängt von verschiedenen Faktoren ab: Lokalisation der Fraktur, Frakturtyp, Weichteilzustand, Risikofaktoren des Patienten, Kooperation, Mono- vs. Polytrauma. Die Gesamtprognose hängt sowohl vom Frakturtyp als auch vom Ausmaß der gleichzeitig vorliegenden Weichteilverletzung sowie Gesamtmorbidität des Patienten ab (Rüter et al. 2003).

2.3 Frakturheilung

Knochengewebe besitzt nach erlittenen Verletzungen die Fähigkeit zur narbenlosen Ausheilung. Es handelt sich um ein mehrstufiges Geschehen, welches bestimmten zeitlichen und räumlichen Mustern folgt (Einhorn 1998; Cho et al. 2002; Dimitriou et al. 2005) und mit einer Vielzahl von unterschiedlichsten Prozessen einhergeht, wie der Migration, Differenzierung und Proliferation verschiedener Zellreihen, dem Wiederaufbau der Vaskularisierung und letztlich der Wiederherstellung der ursprünglichen Knochenstruktur. Man unterscheidet eine primäre und eine sekundäre Frakturheilung (Rüter et al. 2003).

2.3.1 Primäre Frakturheilung

Unter primärer Frakturheilung (= direkte Frakturheilung) (Rüter et al. 2003) versteht man die Vereinigung von Frakturfragmenten ohne Ausbildung einer äußeren

Kallusmanschette (Einhorn 1998), wobei man zwei verschiedene Formen der primären Frakturheilung unterscheidet, die Kontaktheilung und die Spaltheilung.

Bei der Kontaktheilung kommt es zu einem direkten Eindringen der Havers-Systeme in die einander gegenüberliegenden Frakturrenden (Anderson 1965; Olerud & Danckwardt-Lillieström 1968). Diese erfolgt durch einwachsende Osteone, wobei Osteoklasten einen Resorptionskanal in die Kortikalis des gegenüberliegenden Fragmentes bohren und den Weg für Osteoblasten freimachen, welche den Resorptionskanal mit Lamellenknochen füllen. Es kommt zu einer direkten Wiedervereinigung der Knochenfragmente ohne Resorption von frakturnahe Knochen (Olerud & Danckwardt-Lillieström 1971). Bei der Spalthheilung wird der Frakturspalt mit Geflechtknochen aufgefüllt und anschließend durch Lamellenknochen ersetzt.

Voraussetzung für die primäre Frakturheilung ist eine ausreichende Vaskularisierung der Frakturrenden und eine ausreichende mechanische Frakturstabilität (McKibbin 1978; Perren 1979). Das medulläre Gefäßsystem wird dabei innerhalb weniger Tage durch Kapillaraussprossung wiederhergestellt. Im klinischen Alltag kommt es zu einer primären Frakturheilung bei anatomischer Frakturposition und stabiler Osteosynthese (Glowacki 1998).

2.3.2 Sekundäre Frakturheilung

Die Mehrzahl der Frakturen heilt klinisch jedoch durch sekundäre Frakturheilung (=indirekte Frakturheilung) (Rüter et al. 2003), an deren Ende es zur Wiederherstellung der anatomisch und der Belastung entsprechenden Knochenstruktur kommt, wobei jedoch die primäre Frakturstabilisierung durch die Bildung eines vorläufigen knorpeligen oder knöchernen Kallus stattfindet (Einhorn 1998). Sie erfolgt, wenn keine anatomische Reposition oder Ruhigstellung der Knochenfragmente erzielt werden kann und geht von den Zellen des Periosts, des Endosts, der Kortikalis, des Knochenmark und der umgebenden Weichteilen aus (Holden 1972). Kennzeichen der sekundären Frakturheilung ist die Ausbildung eines radiologisch sichtbaren Kallus.

Nach einem Knochenbruch wird die Kontinuität des Knochens durch Ausbildung eines bindegewebig-knorpeligen Kallus wieder hergestellt. Im Anschluss finden ein knöcherner Umbau des Kallus und eine Wiederherstellung des Lamellensystems statt.

Auf diese Weise werden mobile Fragmente zunächst ruhiggestellt, um eine knöchernen Überbrückung zu ermöglichen (Probst & Spiegel 1997).

Die sekundäre Frakturheilung erfolgt nach Verletzung des Knochens in fünf sich teilweise überlappenden Phasen (McKibbin 1978; Einhorn 1995), beginnend mit der Hämatombildung nach dem Frakturereignis (Verletzungsphase), gefolgt von der Entzündungsphase (Inflammation), der chondrogenen Phase (soft callus), der osteogenen Phase (hard callus) und letztlich der Phase des Remodeling.

Die initiale Verletzungsphase besteht vom Einsetzen einer Kraffteinwirkung auf den Knochen und das umgebende Weichteilgewebe bis zu dem Augenblick, wenn die gesamte einwirkende Kraft durch den Bruchvorgang aufgehoben wird. Dieser Vorgang verletzt Kortikalis, Spongiosa, Knochenmark, Periost, Endost, Blutgefäße sowie angrenzende Weichteile in unterschiedlichem Ausmaß, so dass es durch Einblutung zur Hämatombildung im Frakturbereich sowie den angrenzenden Weichteilen und zur Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren kommt (Street et al. 2000). Die Verletzung des Gefäßsystems führt zu Nekrose und Hypoxie des Knochens und des umgebenden Gewebes (Glowacki 1998).

Anschließend setzt, bedingt durch Hypoxie und Nekrose, die Entzündungsphase ein mit Migration, Proliferation und Differenzierung von pluripotenten Stammzellen und Entzündungszellen (Lindholm et al. 1969; Iwaki et al. 1997; Einhorn 1998). Zusätzlich kommt es zu einer Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Dimitriou et al. 2005). Einwandernde mesenchymale Vorläuferzellen entstammen zum einen dem Gefäßendothel und wandern mit den einsprießenden Kapillaren ein (Trueta 1968; Bouletreau et al. 2002), zum anderen entstammen sie dem Knochenmark, Periost, Endost und den Weichteilen (Gerstenfeld et al. 2003; Dimitriou et al. 2005). Insgesamt nimmt während des gesamten Vorgangs der Frakturheilung die Durchblutung und Vaskularisierung im betroffenen Areal zu (Glowacki 1998). Mit Abklingen der Entzündungsreaktion wird das Hämatom, in dem sich ein lichtetes Netzwerk von Fibrin und Kollagenfasern gebildet hat, resorbiert und unter dem Einfluss lokal wirksamer Wachstumsfaktoren durch Granulationsgewebe ersetzt (McKibbin 1978).

Aus den mesenchymalen Vorläuferzellen im Kallus differenzieren sich Chondroblasten und Osteoblasten (Caplan 1987; Shea et al. 2003; Gerstenfeld et al. 2003). Osteoblasten entstehen vor allem in der Nähe der Kortikalis und des Periosts, Chondroblasten vor allem im zentralen hypoxischen Bereich der Fraktur. Die

Chondroblasten produzieren Knorpelgewebe (soft callus) und leiten die indirekte Knochenbildung über den Umweg eines Knorpelgerüsts ein (enchondrale Ossifikation), während eine direkte Knochenbildung (hard callus) durch Osteoblasten erfolgt (desmale/intramembranöse Ossifikation). Im Rahmen der Frakturheilung findet somit sowohl eine enchondrale als auch eine intramembranöse Ossifikation statt.

Im Rahmen der enchondralen Ossifikation wird das stabilisierende hyaline Knorpelgewebe des Kallus zu Knochengewebe umgebaut. Dies erfolgt über Mineralisation des weichen knorpeligen Kallus und unter Hypertrophie der Chondrozyten im Kallus, welche anschließend zu Grunde gehen und durch Knochenproduzierende Osteoblasten ersetzt werden (Gerstenfeld et al. 2003). Zeitgleich wachsen Gefäße in den sich transformierenden avaskulären knorpeligen Kallus ein (Erlebacher et al. 1995), was zu einem ausreichenden Sauerstoff- und Nährstoffangebot führt, um das bradytrophe Knorpelgewebe durch enchondrale Ossifikation durch Knochen zu ersetzen (Bolander 1992).

Die unregelmäßig angeordneten Trabekel des Geflechtknochens aus der enchondralen und der intramembranösen Ossifikation verbinden sich im weiteren Verlauf zum knöchernen harten Kallus. Im Gegensatz zu reifem Lamellenknochen verläuft der sich bildende Geflechtknochen des Kallus nicht entlang mechanischer Belastungslinien, sondern entlang der neuen Kapillarsprossen. Durch Mineralisation der Grundsubstanz härtet der Kallus aus. Nekrotischer Knochen wird abgebaut und mineralisierter Knorpel umgebaut. Hierbei wird kalzifizierter Knorpel durch Osteoklasten resorbiert und durch Geflechtknochen ersetzt.

In der letzten Phase wird der entstandene Geflechtknochen entsprechend der mechanischen Belastung in lamellären Knochen umgewandelt (Modeling) und es kommt zur Wiederherstellung (Remodeling) der normalen Knochenkontur, der ursprünglichen Knochenstruktur mit Havers- und Volkmann-Systemen sowie des ursprünglichen durchgehenden Markraums (McKibbin 1978).

2.4 Störungen und Komplikationen der Frakturheilung

Komplikationen nach Knochenbrüchen umfassen neben Blutverlusten, Infektionen, Haut- und Weichteilschäden, Bandverletzungen, Gefäß- und Nervenverletzungen,

Kompartmentsyndrom, Luxationen, Sudeck-Reflexdystrophie auch Störungen und Komplikationen der Knochenbruchheilung wie Fehlstellungen, verzögerte Heilungen, Non-Unions und Pseudarthrosen. Diese Komplikationen können sowohl nach konservativer als auch nach operativer Behandlung auftreten (Rüter et al. 2003).

2.4.1 Verzögerte Frakturheilung

Die Heilung einer Fraktur hängt von verschiedenen Faktoren ab und wird maßgeblich von der Biologie und der mechanischen Stabilität (Osteosynthese) bestimmt. Aufgrund der Vielzahl an Faktoren, die die Knochenheilung beeinflussen, kommt es im klinischen Alltag zu unterschiedlichen Heilungsverläufen bei verschiedenen Patientengruppen. Während Frakturen beim Erwachsenen üblicherweise nach vier Monaten knöchern überbrückt sind, kann dies bei Kindern bereits nach vier bis sechs Wochen und bei Frakturen mit einhergehendem schweren Weichteilschaden erst nach neun Monaten der Fall sein.

Eine verzögerte Frakturheilung (Delayed Union) liegt vor, wenn eine Fraktur nach normaler Heilungszeit noch nicht knöchern überbrückt ist. In diesem Fall sollten weitere therapeutische Maßnahmen ergriffen werden, um die Ausbildung einer Pseudarthrose oder eines Implantatversagens zu vermeiden. Diese Maßnahmen umfassen eine Verbesserung der mechanischen Stabilität, eine biologische Stimulation mittels Anlagerung autologer Spongiosa oder den Einsatz physikalischer Maßnahmen wie z. B. einer Stoßwellentherapie oder die Applikation rekombinanter Wachstumsfaktoren.

2.4.2 Ausbleibende Frakturheilung

Eine Non-Union liegt klinisch vor, wenn sechs Monate nach der Fraktorentstehung weder klinisch noch radiologisch eine knöcherne Heilung der Fraktur nachzuweisen ist. Sie ist definiert als Ende aller reparativen Heilungsprozesse ohne Vereinigung der Knochenfragmente (Rodriguez-Merchan & Forriol 2004). Von einer Pseudarthrose (Falschgelenk) spricht man, wenn es zur Ausbildung eines falschen Gelenks mit einer mit Knorpel ausgekleideten Gelenkhöhle und Produktion von Synovialflüssigkeit kommt

(Megas & Panagiotis 2005). Non-Unions sowie Pseudarthrosen können an Diaphysen und Metaphysen langer Röhrenknochen, aber auch an kurzen Knochen entstehen.

Als Ursachen für eine ausbleibende Frakturheilung lassen sich verschiedene Faktoren ausmachen. Sowohl lokale als auch systemische Faktoren können zur Ausbildung einer Pseudarthrose führen. Diese Faktoren können in mechanische und/oder biologische unterteilt werden. Zu den systemischen Faktoren zählen das Lebensalter, Kachexie, Behandlung mit Corticosteroiden, Zytostatika, schwere Verbrennungen, Bestrahlungen, schlechter Gesundheitszustand, endokrine Erkrankungen, Vitamin C-, Vitamin D- und Calcium-Mangel (Hulth 1989; Glowacki 1998). Lokale Faktoren wie eine mangelnde Ruhigstellung (mechanische Instabilität) der Fraktur mit daraus resultierender permanenter Unruhe sowie Mikrotraumen im Frakturspalt durch Schub- und Scherkräfte, wiederholte Reposition, eine Interposition von Bindegewebe, Distraction der Frakturfragmente, segmentale Defekte, der Verlust von Knochensubstanz, Knochenfragmentnekrosen, Infektionen, ungenügende Blutversorgung der Fragmente, mangelnder Kontakt der Frakturfragmente oder ein schweres Weichteiltrauma begünstigen ebenfalls die Ausbildung einer Pseudarthrose (Charnley 1970; Megas & Panagiotis 2005; Calori et al. 2007).

Pseudarthrosen lassen sich nach verschiedenen Kriterien klassifizieren. In Abhängigkeit vom Vorliegen einer Infektion lassen sie sich in septische und aseptische Pseudarthrosen einteilen, in Abhängigkeit von der Stabilität in stabile und instabile Pseudarthrosen sowie nach ihrem radiologischen Erscheinungsbild in hypertrophe und atrophe Pseudarthrosen (Reed et al. 2002). Hierbei wird nach allgemeingültigem Konsens die hypertrophe Pseudarthrose als biologisch aktiv, vital und hypervaskulär sowie die atrophe Pseudarthrose als biologisch inaktiv, avital und avaskulär beschrieben (Weber & Brunner 1981; Böhler 1982; Paley et al 1989; Frölke & Patka 2007).

Bei der hypertrophen Pseudarthrose findet man demnach eine gute Vaskularisierung mit verbleibendem Frakturspalt. Dieser Frakturspalt kann bei bestehender Instabilität nicht verknöchern, obwohl eine hohe osteogene Potenz vorliegt. Das Problem ist in der mechanischen Instabilität begründet. Radiologisch zeigt sich ein persistierender Frakturspalt mit reaktiver Sklerosierung des umgebenden Knochens und fibrösem Gewebe im Frakturspalt, eine fehlende knöcherne Überbrückung des Frakturspalts sowie eine elefantenfußartige Auftreibung der beiden Knochenenden (Megas &

Panagiotis 2005). Therapeutisch genügt meist eine mechanische Stabilisierung der Fraktur, um eine knöchernen Überbrückung zu erzielen (Schenk et al. 1968).

Der atrophischen Pseudarthrose liegt ursächlich eine Störung des biologischen Heilungsprozesses zugrunde. Radiologisch zeigt sich hier ebenfalls ein persistierender Frakturspalt ohne Kallus-Überbrückung mit fibrösem Gewebe im Frakturspalt, jedoch mit abgerundeten resorbierten Knochenenden, einer reaktiven Sklerosierung und einer quantitativ verminderten Knochensubstanz aufgrund der Atrophie des fraktur-nahen Knochens (Megias & Panagiotis 2005). Die Therapie der atrophischen Pseudarthrose ist häufig schwieriger und aufwendiger (Megias & Panagiotis 2005). So sollten neben einer ausreichenden Stabilisierung (evtl. Reosteosynthese) avitale und infizierte Knochenareale entfernt und der Knochendefekt mit weiteren Maßnahmen wie beispielsweise einer autologen Spongiosa-Transplantation wieder aufgebaut werden (Ring et al. 1997). Die Ursachen für atrophische Pseudarthrosen sind multifaktoriell und noch unzureichend bekannt. Die Behandlung stellt weiterhin eine große therapeutische Herausforderung dar (Choi et al. 2004); bisher konnte keine vollständig zufriedenstellende Behandlungsmöglichkeit gefunden werden (Hannouche et al. 2001).

2.5 Pseudarthrosen und Angiogenese

Die Frakturheilung ist ein komplexer Prozess und bedarf intensiver Erforschung, um unser Verständnis über die zugrunde liegenden Mechanismen zu erweitern. Die Heilung von Knochenfrakturen wurde an einer Vielzahl von Tiermodellen und in klinischen Studien untersucht. Trotz des wachsenden Wissens über die Vorgänge während der Frakturheilung stellen die verzögerte Frakturheilung sowie die Ausbildung von Pseudarthrosen ein erhebliches klinisches sowie sozioökonomisches Problem dar (Heckman & Sarasohn-Kahn 1997; Rodriguez-Merchan & Forriol 2004; Wiese & Pape 2010). Bis zu 10% aller Frakturen heilen nicht aus oder weisen zumindest eine verzögerte Frakturheilung auf (Einhorn 1995; Goldhahn et al. 2000). Die Ursachen der gestörten Frakturheilung bleiben weitgehend unklar (Hayda et al. 1998). Verschiedene Faktoren können die Frakturheilung beeinflussen, wobei die Vaskularisierung und Blutversorgung entscheidende Faktoren darstellen und damit von großer Bedeutung für eine erfolgreiche Frakturheilung sind (Rhineland 1974; Glowacki 1998; Lu et al. 2007).

Atrophe Pseudarthrosen sind als schlecht bzw. nicht vaskularisierte Läsionen beschrieben und als Folge eines avaskulären und biologisch inaktiven Umfeldes bezeichnet worden (Arany et al. 1980; Weber & Brunner 1981; Böhler 1982; Paley et al. 1989; Dickson et al. 1994). Diese Annahme wurde dadurch gestützt, dass eine verminderte Angiogenese, also die Ausbildung von neuen Gefäßen durch Wachstum und Aussprosseln aus bereits bestehenden Gefäßen (Jain 2003), zu einer Verschlechterung der Frakturheilung führte (Hausman et al. 2001; Gaston & Simpson 2007) und die Entstehung von Pseudarthrosen in segmentalen Defekten mit einer verminderten Vaskularisierung einherging (Claes et al. 2003). Auch führte eine Unterbrechung der lokalen Blutversorgung im Frakturbereich zu einer Beeinträchtigung der normalen Frakturheilung (Wallace et al. 1991). Umgekehrt konnten verschiedene Studien zeigen, dass eine Stimulation der Angiogenese zu einer Verbesserung der Frakturheilung führt (Eckardt et al. 2005; Li et al. 2009; Stewart et al. 2011).

Jedoch haben neuere Studien gezeigt, dass atrophe Pseudarthrosen nicht nur metabolisch aktiv (Segmüller et al. 1969; Brownlow & Simpson 2000), sondern auch durchaus vaskularisiert sein können (Santavirta et al. 1992; Volpon 1994; Brownlow et al. 2002; Reed et al. 2002; Reed et al. 2003; Choi et al. 2004; Garcia et al. 2008b).

Unbestritten ist, dass die Ausbildung eines Gefäßsystems und die Mikrozirkulation von immenser Bedeutung sind für die Regeneration von lebendem Knochen (Schmid et al. 1997). Die Angiogenese dient der Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, dem Abtransport von Abbauprodukten sowie der Rekrutierung verschiedenster Zellen und Mediatoren (Lienau et al. 2009).

Verschiedene Autoren haben in der nahen Vergangenheit postuliert, dass die frühe Angiogenese ausschlaggebend für den Frakturheilungsprozess sein könnte und möglicherweise sogar den Ausgang des Frakturheilungsprozesses bestimmt (Reed et al. 2003). Die Angiogenese geht der Osteogenese zeitlich voraus (Winet et al. 1990) und stellt einen der ersten Vorgänge in der Ausbildung von neuem Knochengewebe dar, sowohl bei der enchondralen als auch der intramembranösen Ossifikation (Kanczler & Oreffo 2008).

Obwohl die Angiogenese in unterschiedlichen Frakturmodellen untersucht wurde, ist nicht bekannt, welche Verbindung zwischen der Angiogenese und der Ausbildung einer Pseudarthrose besteht und ob die Vaskularisierung während der Ausbildung einer

Pseudarthrose beeinträchtigt ist und wie dies mit dem Expressionsmuster verschiedener angiogener Moleküle in Verbindung steht.

Während hypertrophe Pseudarthrosen in den meisten Fällen mittels einer stabilen Osteosynthese ausreichend behandelt werden können, verbleibt die Behandlung von atrophen Pseudarthrosen oft eine Herausforderung. Viele verschiedene Strategien sind zur Behandlung einer atrophen Pseudarthrosen beschrieben worden, jedoch besteht kein gemeinsamer Konsens über eine optimale Behandlung (Hayda & Bosse 2006). Ein Grund dafür ist sicherlich das unzureichende Wissen über die beteiligten pathophysiologischen Mechanismen. Wie bei vielen anderen Erkrankungen sind die ätiologischen Faktoren multifaktoriell und nur ungenügend bekannt. Als wichtiger auslösender Faktor wird eine schlechte Biologie angenommen, im Sinne einer veränderten Vaskularisierung im Frakturbereich. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass VEGF, eine der potentesten angiogenen Substanzen, eine wichtige Rolle während der Frakturheilung spielt (Pufe et al. 2002). Eine Stimulation der Angiogenese durch Zusatz von VEGF im Frakturbereich durch Gentransfer (Tarkka et al. 2003) oder direkte Applikation (Eckardt et al. 2005; Geiger et al. 2005) führte zu einer verbesserten Frakturheilung an sich sowie zur Heilung im Pseudarthrose-Modell. Wachstumsfaktoren generell könnten klinisch zur Anwendung kommen, um die Frakturheilung zu stimulieren, z. B. zur Therapie von Pseudarthrosen oder um deren Entstehung zu vermeiden (Lieberman et al. 2002).

Interessanterweise beschrieben Reed et al., dass etablierte atrophe Pseudarthrosen nicht weniger vaskularisiert sind als hypertrophe Pseudarthrosen oder verheilende Frakturen (Reed et al. 2002). Allerdings fanden sie in ihrem Tiermodell einer atrophen Pseudarthrose eine geringere Vaskularisierung in der ersten Woche der Frakturheilung. Nach diesem Zeitpunkt fanden sie keine weiteren Unterschiede zwischen der Non-Union- und der Union-Versuchsgruppe (Reed et al. 2003). Auch Brownlow et al. konnten in ihrer Studie nach einer initial beeinträchtigten Vaskularisierung eine ausreichende Gefäßversorgung von atrophen Pseudarthrosen nachweisen (Brownlow et al. 2002). Jedoch wurde die atrophe Pseudarthrose in beiden Studien durch Resektion des Periosts herbeigeführt. Damit ist fraglich, ob die Verzögerung der frühen Vaskularisierung Ursache der Pseudarthrose war oder lediglich eine Folge der periostalen Resektion.

Der zeitliche Verlauf der Angiogenese scheint von größter Wichtigkeit zu sein und bestimmt möglicherweise den Ausgang der Frakturheilung. Die molekularen Mechanismen, welche die Angiogenese während der Frakturheilung regulieren, sind nicht vollständig verstanden. Darüber hinaus ist die Beziehung zwischen Angiogenese und enchondraler sowie intramembranöser Knochenbildung auch nicht geklärt. So könnte bei intakter Angiogenese in Pseudarthrosen eine beeinträchtigte Expression oder ein Missverhältnis von osteogenen Wachstumsfaktoren als Ursache für das Versagen des Heilungsprozesses in Frage kommen. Um die komplexen Mechanismen zu untersuchen, die einer Pseudarthrose obliegen, auch in Anbetracht einer möglicherweise verzögerten Angiogenese, bedarf es experimenteller Tiermodelle, um die molekularen Vorgänge zu verstehen und um therapeutische Verfahren, pharmakologische Substanzen und Scaffolds in ihrem Potenzial, die Angiogenese und Frakturheilung zu fördern, zu beurteilen.

Deshalb war das Ziel dieser Studie, die zeitliche und räumliche Vaskularisierung während der Ausbildung einer atrophen Pseudarthrose in einem Mäuse-Femur-Frakturmodell im Vergleich zu einer normal heilenden Fraktur quantitativ zu bestimmen und die Expression wichtiger angiogener und osteogener Moleküle und Wachstumsfaktoren während der Frakturheilung quantitativ zu untersuchen.

2.6 Frakturmodell

Tiermodelle sind ein wichtiger Bestandteil für die Erforschung der Vorgänge während der Frakturheilung. Eine Vielzahl von Frakturmodellen wurde für verschiedene Spezies wie z. B. Mäuse (Hiltunen et al. 1993; Garcia et al. 2008b; Holstein et al. 2009), Ratten (Bonnarens & Einhorn 1984; Hietaniemi et al. 1995; Kokubu et al. 2003), Hunde (Olerud & Danckwardt-Lillieström 1968; dos Santos Neto & Volpon 1984; Risselada et al. 2006) oder Schafe (Cheal et al. 1991; Viateau et al. 2004; Claes et al. 2009) zur Untersuchung physiologischer und pathologischer Vorgänge während der Knochenbruchheilung entwickelt. Kleintiermodelle haben sich aufgrund der geringen Kosten für die Tiere, deren Zucht und Haltung sowie der Möglichkeit der Untersuchung großer Versuchsgruppen zunehmend etabliert (Roach et al. 1989). Die Maus wird in vielen Forschungsbereichen verwendet und hat sich auch in der Traumaforschung etabliert,

wo sie die Untersuchung physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge, insbesondere auf molekularer Ebene, während der Frakturheilung zulässt. Dies wird ermöglicht durch die Verfügbarkeit von transgenen sowie Knock-out-Stämmen wie auch durch biomedizinische Werkzeuge wie monoklonale Antikörper (Einhorn 1998; Jacenko & Olsen 1995; Davey et al. 2004). Die anatomischen Größenverhältnisse der Maus stellen hierbei eine Herausforderung in der Entwicklung von Frakturmodellen dar. So sind für die Frakturierung und Osteosynthese eines Mäusefemurs spezielle technische und mikrochirurgische Voraussetzungen notwendig.

In bisherigen Frakturmodellen der Maus wurde die Frakturheilung größtenteils an der Rippe, der Tibia sowie dem Femur untersucht (Bourque et al. 1992; Hiltunen et al. 1993; Cho et al. 2002; Holstein et al. 2007; Nakase et al. 1994; Manigrasso & O'Connor 2004). Die anatomischen Vorteile des Femurs gegenüber der Tibia liegen in einem einheitlichen runden Querschnitt mit guter Weichteildeckung und einer besseren Möglichkeit einer operativen Frakturstabilisierung (Cheung et al. 2003; Holstein et al. 2009). Bei diesen Tibia- und Femurfraktur-Modellen unterscheidet man zwischen geschlossener und offener Frakturierung. Bei den geschlossenen Modellen wird mit einer stumpfen Guillotine eine Fraktur mit geringem Weichteilschaden erzeugt (Hiltunen et al. 1993; Bonnarens & Einhorn 1984; Manigrasso & O'Connor 2004), beim offenen Frakturmodell wird der Knochen über einen lateralen Zugang unter Sicht frakturiert (Cheung et al. 2003; Garcia et al. 2008a). Femur bzw. Tibia werden dann nach definierten Zeitabschnitten explantiert und die Frakturheilung mit radiologischen, biomechanischen, histologischen und molekularbiologischen Methoden untersucht.

Ein Nachteil im Rahmen der angewendeten Frakturmodelle ist eine mangelnde Rotationsstabilität im Frakturbereich. Wegen der schwierigen Reposition nach Frakturerzeugung erfolgte die Frakturierung zumeist nach vorheriger Implantateinbringung (Manigrasso & O'Connor 2004). Zur Verbesserung der Stabilität wurde ein Modell entwickelt, welches über eine Pin-Clip-Fixierung eine rotationsstabile Osteosynthese erzeugt (Garcia et al. 2008a), die über einen segmentalen Knochendefekt zuverlässig zur Ausbildung einer atrophischen Pseudarthrose führt (Garcia et al. 2008b) und damit die Studie von Segmentdefekten und entstehenden Pseudarthrosen erlaubt. Dieses Modell kommt in dieser Studie zur Anwendung.

Daneben gibt es noch eine Vielzahl anderer Modelle mit ihren jeweiligen Vor- und Nachteilen, die zur Ausbildung einer Pseudarthrose führen, beispielsweise durch

Interposition von Weichteilen (Fujita et al. 1998), Stripping des Periosts (Brownlow & Simpson 2000; Kokubu et al. 2003), Kauterisierung des Periosts (Oetgen et al. 2008), Erzeugung von segmentalen Defekten (Einhorn 1998) und Entfernung des Knochenmarks (Oni 1995).

Aufgrund von Unterschieden in der Anatomie sowie der Physiologie der Frakturheilung bei unterschiedlichen Spezies muss die Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen jedoch kritisch diskutiert werden (Nunamaker 1998; Auer et al. 2007). Kein Tiermodell kann direkt auf den Menschen übertragen werden (Roach et al. 1989). So besitzt die Maus im Vergleich zum Menschen beispielsweise eine primitivere Knochenstruktur (Hörner et al. 1997) ohne Havers-Systeme (Nunamaker 1998). Die Schritte der Frakturheilung laufen schneller ab als beim Menschen. So sind beim Menschen die Knochenfragmente nach ca. drei bis vier Wochen durch Bindegewebe und Knorpel weich miteinander verbunden, an der Maus dagegen ist diese Phase der Frakturheilung schon nach 10-14 Tagen zu beobachten (Manigrasso & O'Connor, 2004).

2.7 Analyse der Vaskularisierung und Frakturheilung

Verschiedene Tiermodelle fanden Verwendung zur Untersuchung von angiogenen Vorgängen und unterschiedliche Methoden wurden beschrieben, um die Vaskularisierung während der Frakturheilung zu untersuchen:

- Immunhistochemistry (Brownlow et al. 2002; Lu et al. 2006)
- Genetic labelling of endothelial cells (Lu et al. 2006)
- Optical bone chamber (Winet & Bao 1997)
- Calvarian bone chamber (Klenke et al. 2005)
- Femur window (Hansen-Algenstaedt et al. 2005)
- Blood vessel casting (Lu et al. 2006; dos Santos Neto & Volpon 1984)
- Plastic investment technique (Chao & Inoue 2003)
- Micro-computed tomography (Lu et al. 2006)
- Microangiography (Nottebaert et al. 1989; Rhineland 1974)
- Laser Doppler flow (Murnaghan et al. 2006)
- Power Doppler assessment (Risselada et al. 2006)

Die am weitesten verbreiteten Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Gefäßdichte sind histologische Methoden. Sie sind gut geeignet zur Bestimmung der Gefäßdichte zu einem bestimmten Zeitpunkt, allerdings müssen die Versuchstiere für die Auswertung getötet werden (Brownlow et al. 2002). Jedoch bietet dieses Verfahren nicht die Möglichkeit, den zeitlichen Ablauf der Angiogenese einhergehend mit dem Einsproießen von Gefäßen und der Ausbildung von Gefäß-Netzwerken zu untersuchen. Dynamische Perfusionsprozesse im entstehenden vaskulären Netzwerk können ebenfalls nicht untersucht werden. Auch bieten sie keine Möglichkeit, den Ursprung des Gefäß-Netzwerks zu untersuchen, ob es vom Endost, Periost oder den umgebenden Weichteilen entstammt. Eine weitere Einschränkung der immunhistologischen Verfahren liegt in der Spezifität der verwendeten Antikörper. Bei den zumeist verwendeten Antikörpern handelt es sich um Antikörper gegen CD31, Alpha-smooth Muscle-Actin und den Von-Willebrandt-Faktor. Obwohl nicht alle Blutgefäße eine positive Färbung für Alpha-smooth Muscle-Actin zeigen, nutzen viele dieses Molekül, weil es die stabilsten Ergebnisse liefert.

Knochen-Fenster-Modelle bieten die Möglichkeit, die Angiogenese während der Frakturheilung in vivo zu untersuchen. Im Gegensatz zu histologischen Verfahren sind diese Methoden nicht gut etabliert und kompliziert in ihrer Anwendung. Solche Fenster-Modelle wurden für die Schädel von Mäusen und Ratten sowie auch für das Mäuse-Femur beschrieben. Der Schädel ist ein Knochen ohne Gewichtsbelastung, so dass es unklar bleibt, ob und in welchem Ausmaß die Ergebnisse dieses Modells unser Verständnis für die Frakturheilung in langen Knochen erweitern können. Das Femur-Fenster ist ein vielversprechendes Modell, um die Angiogenese in heilenden Knochendefekten in vivo zu untersuchen, hat aber auch seine Einschränkungen. Leider können nur oberflächliche Knochendefekte, aber nicht vollständige Femur-Frakturen in Mäusen untersucht werden (Hansen-Algenstaedt et al. 2005).

Das Auszählen von Blutgefäßen, die Plastic Investment Technik und das Micro-CT unter Verwendung von Bariumsulfat ermöglichen die Sichtbarmachung von größeren Blutgefäßen im Frakturbereich, nicht aber kleinerer Gefäße und Kapillaren. Auszählmodelle machen es notwendig, die Versuchstiere zu töten und lassen keine Untersuchung der zeitlichen Abfolge der Angiogenese während der Frakturheilung zu. Eine weitere Möglichkeit, die angiogene Potenz während der Frakturheilung quantitativ zu untersuchen, ohne Gefäße auszählen zu müssen, ist die Quantifizierung der

Expression von angiogenen Wachstumsfaktoren. Analog kann zur Beurteilung der osteogenen Potenz während der Frakturheilung anstelle der quantitativen Bestimmung des Kallus die Quantifizierung von osteogenen Wachstumsfaktoren erfolgen.

Viele lokale und systemische Faktoren, die während der Frakturheilung aktiv sind, haben direkte oder indirekte chondrogene, osteogene oder angiogene Wirkungen (Carano & Filvaroff 2003). Unter einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren sind für die Angiogenese und für die Osteogenese während der Frakturheilung unter anderen von besonderer Bedeutung: VEGF, BMP-2/-4, Sclerostin, Noggin, Ang-1, Tie-2, MMP13 und Cyr61. Zusätzlich kann PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) als Proliferationsmarker eingesetzt und damit die Regenerationsfähigkeit des Gewebes bestimmt werden (Sarraf et al. 1991; Iatropoulos & Williams 1996).

2.7.1 VEGF

Vascular Endothelial Growth Factor wurde als Wachstumsfaktor des Gefäßendothels charakterisiert und als VEGF bezeichnet (Ferrara & Henzel 1989; Gospodarowicz et al. 1989; Tischer et al. 1989). Die Funktion der VEGF-Familie ist sehr weitgreifend (Plate & Warnke 1997; Ferrara 2000; Joško et al. 2000; Shibuya 2008), jedoch hauptsächlich verantwortlich für die Angiogenese, Vaskulogenese und die Stimulation von Endothelzellen (Nicosia 1998). Bei intrazellulärem Sauerstoff-Mangel werden Hypoxia Inducible Factors (HIF) gebildet, welche die Synthese und Ausschüttung von VEGF induzieren und damit die Angiogenese fördern (Dor et al. 2001; Semenza 2003).

VEGF spielt eine wichtige Rolle in der Frakturheilung (Deckers et al. 2000; Street et al. 2002; Keramaris et al. 2008; Beamer et al. 2009). Es hat Einfluss auf die Knochenentwicklung durch Regulation des Überlebens und der Aktivität von Endothel-, Knorpel und Knochenzellen (Street et al. 2002; Coultas et al. 2005) und konnte als Schlüsselmolekül für die Angiogenese während der sekundären Frakturheilung bestimmt werden, in der es an verschiedenen Reparaturprozessen involviert ist (Ferguson et al. 1999), zu einer verbesserten Vaskularisierung und Regeneration des frakturierten Knochens führt (Geiger et al. 2005) und die Knochenbildung stimuliert (Gerber et al. 1999). So ist dieser angiogene Wachstumsfaktor während der sekundären Frakturheilung für das Einsprossen von neuen Blutgefäßen und die Differenzierung

mesenchymaler Zellen von Bedeutung (Caplan 1990), wie auch für die Entstehung und die Mineralisierung neuen Knochens (Geiger et al. 2005; Dai & Rabie 2007). Im unverletzten Knochen ist VEGF nur geringfügig nachweisbar (Pufe et al. 2002).

VEGF scheint in der Frühphase der Frakturheilung für die Revaskularisierung des Frakturbereichs verantwortlich (Pufe et al. 2002), wobei sich in den ersten sieben Tagen eine vermehrte Expression nachweisen lässt (Uchida et al. 2003), vor allem im Frakturhämatom (Street et al. 2000). VEGF selbst hat auch Einfluss auf die Knochenbildung durch Stimulation der Expression von Wachstumsfaktoren wie BMP-2 (Bouletreau et al. 2002) oder durch direkte Stimulation von Osteoblasten (Deckers et al. 2000). Weiterhin bedingt VEGF die Proliferation von Fibroblasten, Osteoblasten und Chondroblasten aus mesenchymalen Vorläuferzellen (Gerber & Ferrara 2000; Carlevaro et al. 2000; Horner et al. 1999). Diese sezernieren im reifen Zustand selbst VEGF und stimulieren umgebende Zellen (Carlevaro et al. 2000). Hypertrophe Chondrozyten exprimieren im Rahmen der Frakturheilung VEGF, im Gegensatz zu ruhenden und proliferierenden Knorpelzellen (Gerber et al. 1999; Harper & Klagsbrun 1999; Carlevaro et al. 2000), und leiten die enchondrale Ossifikation ein (Maes et al. 2002). VEGF verbindet während der Frakturheilung die Angiogenese, die Resorption des Knorpels und die Knochenbildung miteinander (Gerber et al. 1999; Street et al. 2002).

Ein VEGF-Mangel durch Anwendung eines löslichen neutralisierenden VEGF-Rezeptors führt zu einer verminderten Angiogenese, Knochenbildung und Mineralisation des Kallus (Street et al. 2002), VEGF-antagonisierende Antikörper zu einer beeinträchtigten Frakturheilung und der Ausbildung einer Pseudarthrose (Chu et al. 2009), ebenso wie eine Inhibition von VEGF (Hausman et al. 2001; Gaston & Simpson 2007). Eine exogene Zufuhr von VEGF stimuliert dagegen die Osteoblastenaktivität und Vaskularisierung des Kallus (Geiger et al. 2005) sowie die Knochenheilung (Street et al. 2002; Tarkka et al. 2003; Eckardt et al. 2005), so dass man VEGF zur Behandlung von Pseudarthrosen einsetzen könnte (Geiger et al. 2005; Keramaris et al. 2008). Jedoch konnte auch beobachtet werden, dass VEGF diese Wirkungen allein nicht zu vermitteln vermag, sondern auf die Anwesenheit anderer Wachstumsfaktoren wie BMP's angewiesen ist (Peng et al. 2002; Peng et al. 2005a). In einem Modell mit beeinträchtigter Frakturheilung konnte einerseits eine verringerte VEGF-Expression in der Versuchsgruppe mit der verzögerten Heilung (Lienau et al. 2009), andererseits eine vermehrte VEGF-Expression im Serum (Sarahrudi et al. 2009) nachgewiesen werden.

2.7.2 BMP's und ihre Antagonisten Sclerostin und Noggin

BMP's (Bone morphogenetic proteins) sind Wachstumsfaktoren, die stimulierend und fördernd auf die Knochenbildung wirken (Urist 1965). Sie gehören zur TGF- β Superfamilie (Transforming Growth Factor) und sind von Bedeutung für die Organogenese, Knochenbildung und Knochenregeneration sowie an verschiedenen Krankheitsprozessen beteiligt (Riley et al. 1996). Sie induzieren eine Vielzahl von Prozessen wie die Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Zellen und Knochenvorläuferzellen (Campbell & Kaplan 1992), die Angiogenese und Synthese von extrazellulärer Matrix (Reddi 2001).

Vor allem BMP-2 und BMP-4 sind von großer Bedeutung für die Frakturheilung (Bostrom et al. 1995; Schmitt et al. 1999), indem sie die Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Chondroblasten und Osteoblasten stimulieren (Yamaguchi et al. 1996; Schmitt et al. 1999; Cheng et al. 2003) und damit die Frakturheilung beeinflussen. BMP-2 fördert die Frakturheilung und Knochenregeneration (Gerhart et al. 1993; Bostrom et al. 1996; Baltzer et al. 2000), indem es die Chondrozytenproliferation (Minina et al. 2001), die enchondrale Knochenbildung (Yasko et al. 1992) und die Differenzierung von Osteoblasten stimuliert (Deckers et al. 2002). Umgekehrt führt ein Fehlen von BMP-2 zu einer Beeinträchtigung der frühen Phase der Frakturheilung (Tsuji et al. 2006). Ein Mangel von BMP-4 dagegen zeigte dagegen keine negative Beeinflussung der Frakturheilung (Tsuji et al. 2008).

Die osteoinduktive Wirkung hat zur klinischen Anwendung von BMP's bei Skelettverletzungen und Skeletterkrankungen geführt und könnte auch einen erfolgversprechenden Einsatz in der Behandlung von segmentalen Knochendefekten und Pseudarthrosen haben (Heckman et al. 1991; Johnson et al. 1992; Wozney & Rosen 1998; Chu et al. 2007; Schmidmaier et al. 2007; Kanakaris et al. 2009; Betz et al. 2009), auch wenn Studien mit Pseudarthrose-Modellen und der Anwendung von BMP's nicht übermäßig erfolgversprechend waren (Bostrom & Camacho 1998; Friedlaender et al. 2001; Kujala et al. 2002). Hinsichtlich der Aktivität der BMP's in Pseudarthrosen ist die Datenlage kontrovers. Zum einen scheinen sie in Pseudarthrosen nicht beeinträchtigt zu sein (Kloen et al. 2003), zum anderen zeigte sich ein vermindertes Vorliegen von BMP's in Pseudarthrosen (Niikura et al. 2006; Kwong et al. 2009b) und eine verminderte Expression im Delayed-Union-Modell (Lienau et al. 2010).

BMP's stimulieren neben der Knochenbildung auch die Angiogenese (Moutsatsos et al. 2001), indem sie die Synthese und Sekretion angiogen wirksamer Wachstumsfaktoren wie VEGF fördern (Deckers et al. 2002). Diese positive Wirkung auf die Angiogenese konnte auch während der Frakturheilung nachgewiesen werden (Ripamonti et al. 2000). Zusätzlich zeigen VEGF und die BMP's eine gemeinsame, synergistische Wirkung auf die Frakturheilung (Peng et al. 2002; Patel et al. 2008; Kumar et al. 2010), wobei das Verhältnis von VEGF zu den BMP's eine wichtige Rolle spielt (Peng et al. 2002; Peng et al. 2005a).

Sclerostin ist ein von Osteozyten exprimiertes Protein, welches reprimierend auf den Knochenstoffwechsel einwirkt (Kusu et al. 2003), indem es die Differenzierung von Mesenchymzellen und Osteoblastenvorläufern hemmt. Durch antagonisierende Wirkung auf den Knochenwachstum-stimulierenden Wnt-Signalweg (Piters et al. 2008; Macsai et al. 2008) vermindert Sclerostin die über BMP's stimulierte Knochenbildung (Li et al. 2005; van Bezooijen et al. 2007; ten Dijke et al. 2008), es fungiert also als BMP-Antagonist. Zusätzlich fördert Sclerostin die Apoptose von Osteoblasten (Sutherland et al. 2004). Eine Inaktivierung von Sclerostin führt zu einer vermehrten Knochenbildung, Knochenmasse und Knochenstärke (Li et al. 2008; Ominsky et al. 2010a), eine Überexpression dagegen entsprechend zu einer Verminderung durch Reduktion der Osteoblastenaktivität (Winkler et al. 2003).

Hinsichtlich der Rolle in der Frakturheilung ist die Datenlage für Sclerostin dürftig. Da der Knochenwachstum-stimulierende Wnt-Signalweg für die Frakturheilung von Bedeutung ist (Hadjjargyrou et al. 2002; Zhong et al. 2006; Secreto et al. 2009) und diese durch zusätzliche Stimulation womöglich beschleunigen könnte (Chen & Alman 2009), wäre eine Ausschaltung der antagonisierenden Wirkung des Sclerostins auf diesen Signalweg von Bedeutung zur Stimulation der Frakturheilung (Ominsky et al. 2010b). So kann eine Inaktivierung von Sclerostin den knöchernen Heilungsverlauf positiv beeinflussen (Agholme et al. 2010), die Kallusdichte und Knochenstärke erhöhen und die Frakturheilung beschleunigen (Paszty et al. 2010). In atrophen Pseudarthrosen zeigte sich eine verminderte Expression von Sclerostin (Niikura et al. 2006).

Noggin (Smith & Harland 1992) ist ebenfalls ein BMP-Antagonist (Gazzerro et al. 1998). Es handelt sich dabei um ein extrazelluläres Polypeptid, welches die durch die TGF- β Familie (Transforming Growth Factor) vermittelte Signaltransduktion inhibiert

(Zimmerman et al. 1996). Die TGF- β Familie moduliert die Proliferation, Apoptose, Aktivierung und Differenzierung seiner entsprechenden Zielzellen (Massagué 1990).

Ein Noggin-Mangel bzw. eine Inhibition bedingen eine Hyperplasie des Knorpels während der Knochenentwicklung, eine beeinträchtigte Ausbildung von Gelenken (Brunet et al. 1998; Gong et al. 1999) und eine vermehrte sowie beschleunigte Knochenbildung (Wan et al. 2007; Tsiologiannis et al. 2009). Eine Überexpression von Noggin bewirkt dagegen eine verminderte Aktivität und Differenzierung von Osteoblasten (Gazzerro et al. 1998; Wu et al. 2003; Tsiologiannis et al. 2009), eine Beeinträchtigung der Knochenbildung (Aspenberg et al. 2001) und eine vermehrte Knochenbrüchigkeit bei vermehrter Knochenmasse (Okamoto et al. 2006).

Noggin spielt eine wichtige Rolle bei der Knochenentwicklung wie auch der Kallusausbildung während der Frakturheilung (Kwong et al. 2009a), wobei die Balance mit BMP-4 von großer Bedeutung ist (Yoshimura et al. 2001), weil es als Antagonist von BMP's beschrieben wurde (Zimmerman et al. 1996).

Jedoch vermittelt Noggin nicht nur eine inhibitorische Wirkung auf die Frakturheilung, es wird auch im Rahmen der normalen Frakturheilung vermehrt exprimiert (Dean et al. 2010) und übt einen positiven Einfluss auf den Heilungsprozess aus (Peng et al. 2005b). Für einen stimulierenden Effekt spricht auch, dass es zusammen mit Sclerostin einen Komplex bildet, was die antagonistische Wirkung der beiden Moleküle reduziert und auf die Knochenbildung stimulierend einwirkt (Winkler et al. 2004).

In Zusammenhang mit Pseudarthrosen ist die Datenlage kontrovers. Einerseits konnte gezeigt werden, dass es zwischen verheilenden und nicht verheilenden Frakturen keinen Unterschied hinsichtlich der Noggin-Expression gibt (Kwong et al. 2009b), andererseits zeigten Delayed Unions (Lienau et al. 2010) und Pseudarthrosen (Niikura et al. 2006) eine erniedrigte Noggin-Expression.

2.7.3 Ang-1 und Tie-2

Angiopoetin-1 ist ein angiogener Wachstumsfaktor und Ligand des Tie-2-Rezeptors (Tunica interna endothelial cell kinase) (Davis et al. 1996; Maisonpierre et al. 1997; Augustin et al. 2009). Dieser ist ein extrazellulärer membranständiger Tyrosinkinase-Rezeptor und wird mit der Ausnahme von hämatopoetischen Vorläuferzellen fast

ausschließlich von vaskulären Endothelzellen exprimiert (Dumont et al. 1992; Maisonpierre et al. 1993; Partanen et al. 1992).

Ang-1 reguliert die Neubildung, Reifung, Umgestaltung und Stabilität des Gefäßsystems (Fukuhara et al. 2010). Dabei spielt Tie-2 in der Vaskulogenese, der Neuausbildung von Gefäßen aus endothelialen Vorläufern, eine untergeordnete Rolle, in der Angiogenese dagegen, der Bildung von Gefäßen aus einem bestehendem Kapillarsystem, ist es von großer Wichtigkeit (Puri et al. 1999). Ang-1 scheint unverzichtbar für die Ausreifung und die Stabilität von Blutgefäßen zu sein (Papapetropoulos et al. 1999; Suri et al. 1996). Darüber hinaus schützt es Endothelzellen vor Apoptose (Kwak et al. 1999; Papapetropoulos et al. 2000).

Tie-2 wird primär von vaskulären Endothelzellen exprimiert. Obwohl nicht von Osteoblasten exprimiert, führt eine Überexpression von Ang-1 neben einer gesteigerten Angiogenese zu einer Zunahme der Osteoblastenaktivität und der Knochenmasse, ohne unmittelbare Aktivierung von Osteoblasten (Suzuki et al. 2007).

Die Angiopoetine zeigen während der enchondralen und intramembranösen Ossifikation wie auch im Stoffwechsel des wachsenden Knochens ein ähnliches Expressionsmuster wie VEGF, so dass sie und ihre Rezeptoren in der Regulation der Angiogenese während der Knochenbildung eine wichtige Rolle spielen müssen (Horner et al. 2001).

Die externe Applikation eines Ang-1 Derivates führte zu einem Voranschreiten der Knochenbildung und veranschaulicht, dass eine positive Beziehung zwischen Angiogenese und Osteogenese besteht (Park et al. 2010). Weiter konnte gezeigt werden, dass Ang-1 die durch BMP-2 induzierte Osteoblasten Differenzierung steigert und damit die Knochenbildung fördert (Jeong et al. 2010). In einem Modell mit verzögerter Frakturheilung konnte eine verringerte Expression von Ang-1 (m-RNA) nachgewiesen werden (Lienau et al. 2009).

2.7.4 MMP13

Die Matrix-Metallo-Proteasen (MMP) sind für die extrazelluläre Zerlegung von Makromolekülen verantwortlich (Woessner 1994), unter anderem bei Gewebeumwandlungen, der Embryonalentwicklung, dem Wachstum, der Angiogenese, der Wundheilung und in pathologischen Prozessen (Birkedal-Hansen et al. 1993; Visse

& Nagase 2003; Amălinei et al. 2007). Die MMP-13 (Kollagenase 3) hydrolysiert Komponenten der extrazellulären Matrix. Unter physiologischen Bedingungen konnte MMP13 nur während der Embryogenese des Knochengewebes in Osteoblasten und hypertrophen Chondrozyten festgestellt werden (Stähle-Bäckdahl et al. 1997; Johansson et al. 1997). In keinem normalen Gewebe (Wernicke et al. 1996; Konttinen et al. 1999) war MMP13 nachweisbar, jedoch in chronischen Wunden (Vaalamo et al. 1997) und bei Rheuma (Wernicke et al. 1996; Stähle-Bäckdahl et al. 1997).

Der Auf- und Abbau von Molekülen der extrazellulären Matrix ist ein wichtiger Prozess während der Frakturheilung. MMP-13 spielt in der Resorption und im Remodelling des Knochens eine wichtige Rolle (Yamagiwa et al. 1999; Uusitalo et al. 2000; Kosaki et al. 2007; Behonick et al. 2007). So konnte eine vermehrte Expression von MMP13 auch während der Frakturheilung in Osteoblasten und hypertrophen Chondrozyten nachgewiesen werden (Yamagiwa et al. 1999; Uusitalo et al. 2000; Behonick et al. 2007). Eine Inaktivierung von MMP-13 führt zu einer Beeinträchtigung der Knorpelresorption, der Knochenbildung und Mineralisierung des Kallus (Kosaki et al. 2007), ohne aber die Kallusfestigkeit zu beeinflussen (Behonick et al. 2007). Ein MMP13 Mangel führt zu einer verlangsamten Rekrutierung von Chondroklasten und zu einer Verzögerung der Frakturheilung mit einem mangelhaften Eindringen von Gefäßen in den Kallus. Somit hat MMP13 einen Einfluss auf die Einleitung der Angiogenese und die Entwicklung von Chondrozyten während der Frakturheilung (Ferguson et al. 1999; Kosaki et al. 2007). In Bezug auf eine beeinträchtigte Frakturheilung konnte bei Patienten mit Pseudarthrosen eine erhöhte Konzentration von MMP's im Serum festgestellt werden (Henle et al. 2005; Zimmermann et al. 2007) und in einem Delayed-Union-Modell eine verminderte Expression von MMP13 (Lienau et al. 2010).

2.7.5 Cyr61

Cysteine-rich-protein Cyr61 (Bork 1993) ist als extrazelluläres Signalmolekül für eine Vielzahl zellulärer Vorgänge und die Synthese von extrazellulärer Matrix von Bedeutung, aber auch für die Regulation von Prozessen wie Differenzierung, Entwicklung, Embryogenese, Chondrogenese, Tumorwachstum, Wundheilung und Gewebeumbau (O'Brien & Lau 1992; Kireeva et al. 1996; Lau & Lam 1999; Chen & Lau

2009). Cyr61 ist auch von Bedeutung für die Angiogenese (Babic et al. 1998; Fataccioli et al. 2002), was sich mitunter darin zeigt, dass Cyr61-defiziente Mäuse durch Mindervaskularisierung der Plazenta versterben (Mo et al. 2002).

Während der Frakturheilung konnten erhöhte Konzentrationen von Cyr61 im Kallus festgestellt werden. Die höchste Expression korrelierte dabei mit der Chondrogenese, was Cyr61 eine Bedeutung in der Frakturheilung zukommen lässt (Hadjjargyrou et al. 2000). Eine stimulierende Wirkung auf die Differenzierung der Osteoblasten scheint Cyr61 über eine Stimulation der Expression von BMP-2 zu vermitteln (Su et al. 2010). Umgekehrt führt eine Inaktivierung von BMP-2 zu einem Verlust der durch Cyr61 vermittelten stimulierenden Wirkung auf die Osteoblasten. Auch beeinträchtigt eine Blockade von Cyr61 erheblich die Knochenbruchheilung (Athanasopoulos et al. 2007). In einem Delayed-Union-Modell konnte eine verringerte Expression von Cyr61 in der Gruppe mit der verzögerten Heilung nachgewiesen werden (Lienau et al. 2006; Lienau et al. 2009).

2.8 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob während der Frakturheilung zwischen einer normal heilenden Fraktur und einer atrophen Pseudarthrose/Non-Union Unterschiede in der Angiogenese bzw. Vaskularisierung bestehen. Unsere Arbeitshypothese war, dass die frühe Angiogenese/Vaskularisierung während der Entstehung einer atrophen Pseudarthrose beeinträchtigt ist. Des Weiteren untersuchten wir die Expression wichtiger angiogener (VEGF) und osteogener (BMP-2/-4) Wachstumsfaktoren während des Heilungsverlaufs.

Die Hypothese lautet:

Die frühe Angiogenese und die Expression von angiogenen Wachstumsfaktoren sind in Pseudarthrosen/Non-Unions beeinträchtigt.

Die Nullhypothese lautet:

Die frühe Angiogenese und die Expression von angiogenen Wachstumsfaktoren sind in Pseudarthrosen/Non-Unions nicht beeinträchtigt.

3. Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Unsere Daten wurden durch tierexperimentelle Versuche an der Maus nach einem bewährten standardisierten Pseudarthrosemodell (Garcia et al. 2008b) gewonnen, basierend auf dem Osteosynthese-Verfahren der Pin-Clip-Fixation zur Stabilisierung von Femur-Frakturen bei Mäusen (Garcia et al. 2008a).

In zwei Versuchsgruppen wurden nach Stabilisierung des Femurs mittels Pin-Clip-Osteosynthese Segmentdefekte mit einer Größe von 0,25mm (Union-Gruppe) bzw. 1,8mm (Non-Union-Gruppe) erzeugt.

Die Versuchstiere wurden 3, 7, 14, 21, 28 und 70 Tage postoperativ getötet. Die Femora wurden nach Explantation mit radiologischen (Micro-CT), histomorphometrischen (Masson-Goldner), immunhistologischen (CD31) sowie proteinbiochemischen Methoden (Western Blot) untersucht.

Eine Untersuchung mittels μ -CT und Histologie erfolgte für beide Versuchsgruppen zu allen Zeitpunkten für je sechs Versuchstiere (n=6), womit sich hier eine Anzahl von n=72 Versuchstieren ergab. Die Western Blot Analyse wurde für beide Versuchsgruppen zu den Zeitpunkten nach 7, 14 und 21 Tagen für jeweils n=4 Versuchstiere durchgeführt, womit hier eine Gesamtanzahl an Versuchstieren von n=24 erreicht wurde. Insgesamt wurden in diese Studie n=96 Versuchstiere einbezogen (Abb. 1).

Der im Rahmen dieser Studie durchgeführte operative Eingriff, die histologische Bearbeitung und Auswertung der Präparate sowie die Durchführung und Auswertung der Western-Blot-Analyse wurden im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar durchgeführt.

Die computertomografische Bildgebung und Auswertung wurde im AO-Research Institut, Davos, Schweiz vorgenommen.

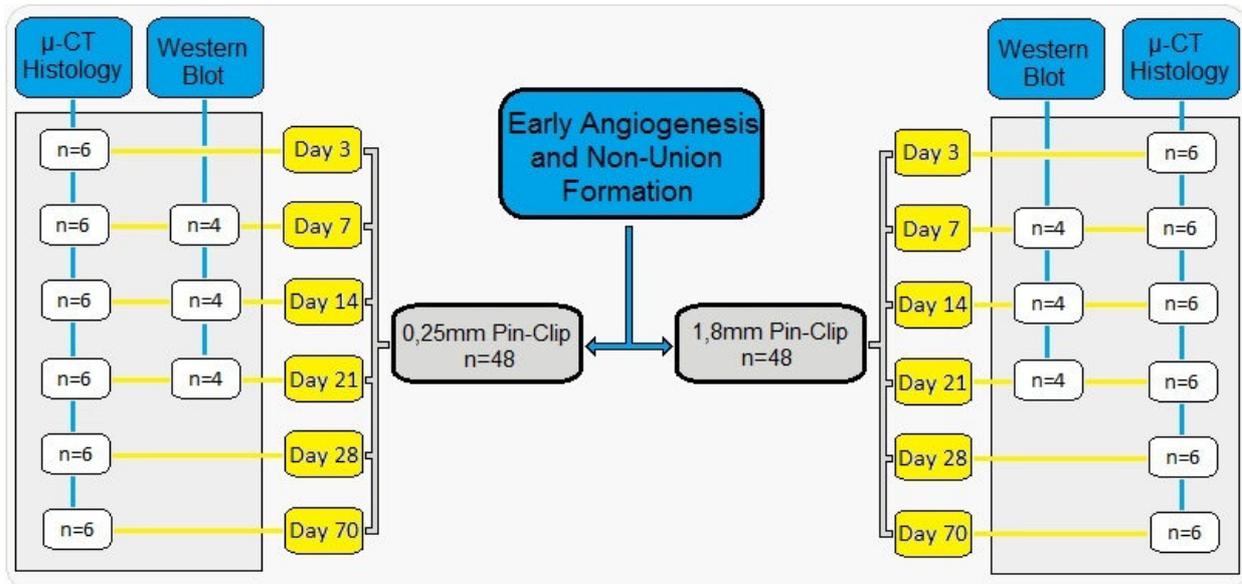


Abb. 1: Darstellung des Studienmodells: Anzahl n der Versuchstiere in den jeweiligen Versuchsgruppen und entsprechend durchgeführten Untersuchungen

3.2 Versuchstiere

Die In-vivo Studie wurde ausschließlich an weiblichen CD-1 Mäusen (Gewicht 31g \pm 2g; Alter 8-14 Wochen) durchgeführt. Die Versuchstiere wurden im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, gezüchtet und unter klimatisierten Raum-Bedingungen (Lufttemperatur 22-24°C, relative Luftfeuchtigkeit 60%) bei einem 12-stündigem Tag/Nachtrhythmus in Fünfer-Käfigen gehalten. Wasser und Standarddiätfutter (Altromin 1320, Altromin, Lage, Deutschland) wurden in Pelletform ad libidum bereitgestellt. Die Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde (Dezernat 5, Saar-Pfalz-Kreis, 66406 Homburg/Saar) genehmigt, nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und standen unter der Aufsicht der Tierschutzbeauftragten der Universität des Saarlandes.

3.3 Tiermodell

Das Tiermodell entspricht dem Modell der Pin-Clip-Fixation (Garcia et al. 2008a). Es wurde unter standardisierten Bedingungen eine Osteosynthese des rechten Femurs von

CD-1 Mäusen mittels eines intramedullären Pins und eines extramedullären Clips durchgeführt. Nach Stabilisierung des Knochens erfolgte eine Osteotomie mit Erzeugung von Segmentdefekten von 0,25mm und 1,8mm (Abb. 2). Um eine möglichst hohe Präzision zu erreichen, wurde die Operation unter einem Operationsmikroskop mit 6 bis 40-facher Vergrößerung (M650, Wild, Heerbrugg, Schweiz) durchgeführt.

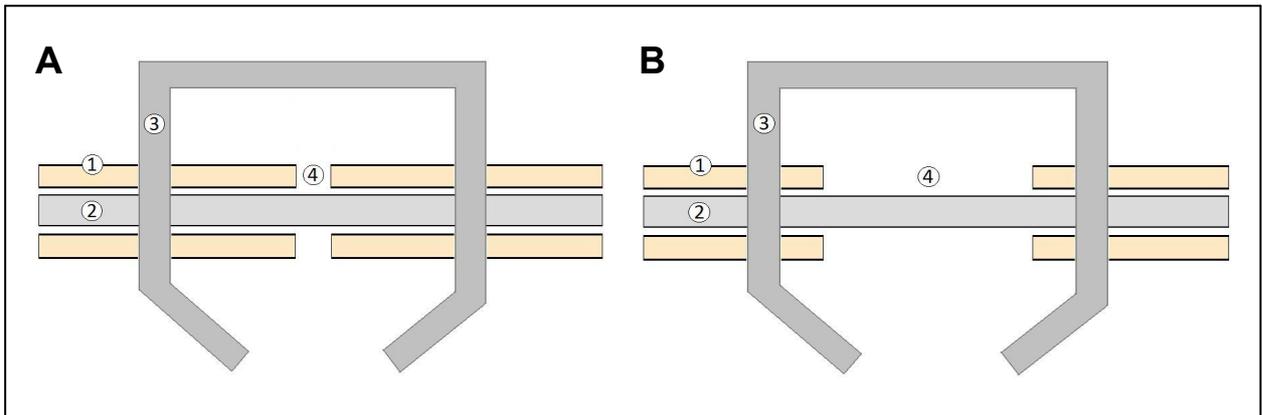


Abb. 2: Schematische Darstellung des 0,25mm (A) und des 1,8mm (B) Segmentdefekts mit Pin-Clip-Osteosynthese; Kortikalis (1), Pin (2), Clip (3), Frakturspalt (4)

Der selbst angefertigte intramedulläre Pin (Abb. 3A) wurde aus einer Spritzen-Kanüle hergestellt. Die Kanüle (BD Microlane 3, 24G 1" 0,55x25mm, Becton Dickinson, Drogheda, Irland) wurde mit einer Flachzange (VBW Werkzeugfabrik GmbH, Remscheid, Deutschland) abgeflacht und in das Femur implantiert.



Abb. 3: A: Intramedullärer Pin aus einer unbearbeiteten (oben) und einer abgeflachten 24G 1" 0,55x25mm Kanüle (unten); B: Extramedullärer Clip aus einer 27G 3/4" 0,4x19mm Kanüle

Beim extramedullären Clip (Abb. 3B) handelt es sich um eine selbst angefertigte Klammer aus einer Spritzenkanüle. Die Kanüle (BD Microlane 3, 27G $\frac{3}{4}$ " 0,4x19mm, Becton Dickinson, Drogheda, Irland) wurde standardisiert mit einer Schablone zu einer Klammer zurechtgebogen. Die Breite der Klammer betrug ca. 4,5mm. Die überstehenden Enden der Clipschenkel wurden mit einer Seitenschneider-Zange (Knipex 7871, C. Gustav Putsch KG, Wuppertal, Deutschland) abgetrennt.

3.4 Anästhesie

Zur Narkose der Versuchstiere wurde präoperativ ein Narkosemittel aus 0,75ml Ketaminhydrochlorid 100mg/ml Injektionslösung (Ursotamin, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland), 1ml Xylazinhydrochlorid 20mg/ml Injektionslösung (Rompun, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) und 8,25 ml 0,9% NaCl-Lösung (B. Braun, Melsungen, Deutschland) angemischt.

Vor Verabreichung des Narkosemittels wurden die Versuchstiere gewogen. Über eine Einmalkanüle/Einmalspritze (1ml) (BD Microlane 3, 27G $\frac{3}{4}$ " 0,4x19mm, Becton Dickinson, Drogheda, Irland/BD Plastipak, Becton Dickinson, Drogheda, Irland) wurde den Versuchstieren intraperitoneal 0,01ml Narkosemittel pro Gramm Körpergewicht gespritzt. Dies entsprach 75mg Ketaminhydrochlorid pro kg Körpergewicht und 20mg Xylazinhydrochlorid pro kg Körpergewicht.

Nach Einsetzen der Narkosewirkung wurde der rechte Oberschenkel einschließlich des proximalen Unterschenkels mit einem Haartrimmer (Elektra 2, Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) und einem Einmalrasierer (P.J. Dahlhausen & Co. GmbH, Köln, Deutschland) enthaart (Abb. 4A). Zum Schutz der Augen vor Austrocknung wurde die Maus mit Bepanthen Augen- und Nasensalbe (Dexpanthenol, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) versorgt. Der Operationsbereich wurde mit Desinfektionsmittel Softasept N (B. Braun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert.

Die Narkosetiefe der Maus wurde während der Operation regelmäßig durch Schmerzreize überprüft. Bei zu schwacher Narkose wurde entsprechend Narkosemittel intraperitoneal nachgespritzt.

3.5 Operation

Alle während des operativen Eingriffs benötigten Instrumente wurden zunächst im Ultraschallbad (Ultraschallreiniger Elmasonic S 60 H, Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co KG, Singen, Deutschland) gereinigt und mit Desinfektionsmittel Softasept N desinfiziert. Die peri- und intraoperative Desinfektion erfolgte mit verdünnter Braunollösung (Povidon-Iod, B. Braun, Melsungen, Deutschland) und Desinfektionsmittel Softasept N.

Nach Inzision der Haut über dem Kniegelenk (11er Skalpellklinge, B. Braun, Aesculap Division AG, Tuttlingen, Deutschland) wurde diese über stumpfe Präparation (Pinzetten von Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland bzw. Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) von den Weichteilen gelöst, die Patella zur Darstellung gebracht und mitsamt ihrer Sehne von medialen Muskel- und Kapselanteilen abgelöst. Der Schnitt erfolgte ausgehend vom Ansatz der Patellasehne am Tibiakopf über den medialen Rand der Patella bis in die Oberschenkelmuskulatur. Anschließend wurde die Patella nach lateral luxiert, so dass die distalen Femurkondylen zum Vorschein kamen (Abb. 4B). Mit einem Bohrer (Proxxon GG 12, Proxxon, Niersbach, Deutschland) mit 0,5mm Mikrobohrer-Aufsatz (Proxxon, Niersbach, Deutschland) wurde ein Loch intercondylär bis in den Intramedullärraum des Mäusefemurs gebohrt. Der Bohrvorgang wurde unter intermittierender Spülung mit NaCl 0,9% Lösung durchgeführt, um Hitzeschäden und Nekrosen zu vermeiden. Ein Austreten von Blut zeigte das Eintreten in den Intramedullärraum an. Anschließend wurde das Bohrloch zur Bestätigung der korrekten Lage mithilfe einer Kanüle (27G $\frac{3}{4}$ " 0,4x19mm) sondiert. Der zuvor aus einer sterilen Einmalkanüle angefertigte Pin wurde mit leichten Drehbewegungen in das Femur vorgeschoben, bis ein weiteres Vorschieben nicht mehr möglich war (Abb. 4C). Die Abflachung des Pins konnte hier einen stabileren Sitz gewährleisten und eine sekundäre Dislokation aus dem Femur vermeiden. Der aus dem Femur hervorstehende Pins wurde kondylennah mit der Seitenschneider-Zange abgetrennt. Nach Reposition wurde die Patella mitsamt ihrer Sehne an die medial abgetrennten Muskel- und Kapselanteile refixiert sowie die Naht der Oberschenkelmuskulatur und der Haut über jeweils mehrere Einzelknöpfe mit einer halbrunden Nähnadel (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) und schwarzer, geflochtener, nicht resorbierbarer Seidenfaser, (6/0 USP; 0,7 metric) (Resorba, Nürnberg, Deutschland) durchgeführt (Abb. 4D).

Nach Umlagerung des Versuchstiers wurde eine ca. 20mm lange Inzision der Oberschenkelhaut parallel zum Verlauf des Femurs durchgeführt (Abb. 4E). Die Oberschenkel-Fascie wurde parallel zum Femur eröffnet, durch Abschieben der Muskulatur ein Zugang zum Femur geschaffen und eine gebogene Klemme (Arterienklemme, Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) unter das Femur geschoben, um durch Öffnen der Klemme die Weichteile vom Femur abzuschieben und Raum für die Clip-Implantation zu schaffen. Dann wurden die beiden zu bohrenden Insertionslöcher für den Clip bestimmt (Abb. 4F). Mit dem 0,5mm-Mikrobohrer wurde unter Stabilisierung des Femurs zunächst das distale Insertionsloch gebohrt. Die Bohrung erfolgte von ventral nach dorsal durch die Kortikalis des Femurs lateral des eingebrachten Pins unter intermittierender Spülung mit NaCl 0,9% Lösung. Anschließend wurde der Clip mit einem Schenkel in das Insertionsloch eingeführt. Durch Anlegen des zweiten Clip-Schenkels an das Femur konnte die Position des proximalen Bohrlochs bestimmt und die Bohrung durchgeführt werden. Der Clip wurde anschließend mit beiden Schenkeln eingebracht, ohne dass der intramedullär eingesetzte Pin das Einfügen behinderte. Um ein Gleiten des Clips zu minimieren und ein Herausrutschen zu vermeiden, wurden die beiden Schenkel des Clips nahe der Kortikalis mit der Seitenschneider-Zange zueinander hingebogen (Abb. 4G). Im Anschluss wurden die beiden Segmentdefekte zirkulär um den Pin erzeugt (0,25mm und 1,8mm), wobei das Periost intraoperativ geschont, intakt belassen und nicht reseziert wurde. Die Erzeugung des 1,8mm Segmentdefekts erfolgte durch Abtragen des Knochens unter intermittierender Spülung mit NaCl 0,9% Lösung mit Diamantkopf-Kugelfräsen (Proxxon, Niersbach, Deutschland) mit einem 1,0mm und 1,8mm-Durchmesser (Abb. 4H und Abb. 5A). Zur Kontrolle der gewünschten Größe wurde eine 1,8mm große Schablone verwendet. Die Erzeugung des 0,25mm Segmentdefekts erfolgte mit einem geflochtenen Draht mit 0,25mm Durchmesser, der Gigli-Drahtsäge (Gigli-Saw-Wire, 0,25mm, AO Research Institute, Davos, Schweiz) (Abb. 5B). Dieser wurde um das Femur gefädelt und die beiden Enden in jeweils eine Kanüle und die zugehörige Verschlusskappe (BD Microlane 3, 27G 3/4" 0,4x19mm, Becton Dickinson, Drogheda, Irland) eingeklemmt. Dies ermöglichte eine flüssige Hin- und Herbewegung der Gigli-Säge über dem Femur, so dass sich dieser immer weiter in den Knochen fräste, bis er diesen vollständig durchdrungen hatte (Abb. 4I). Die Oberschenkelmuskeln und die Haut wurden zuletzt mit mehreren Einzelknöpfen adaptiert (Abb. 4J).

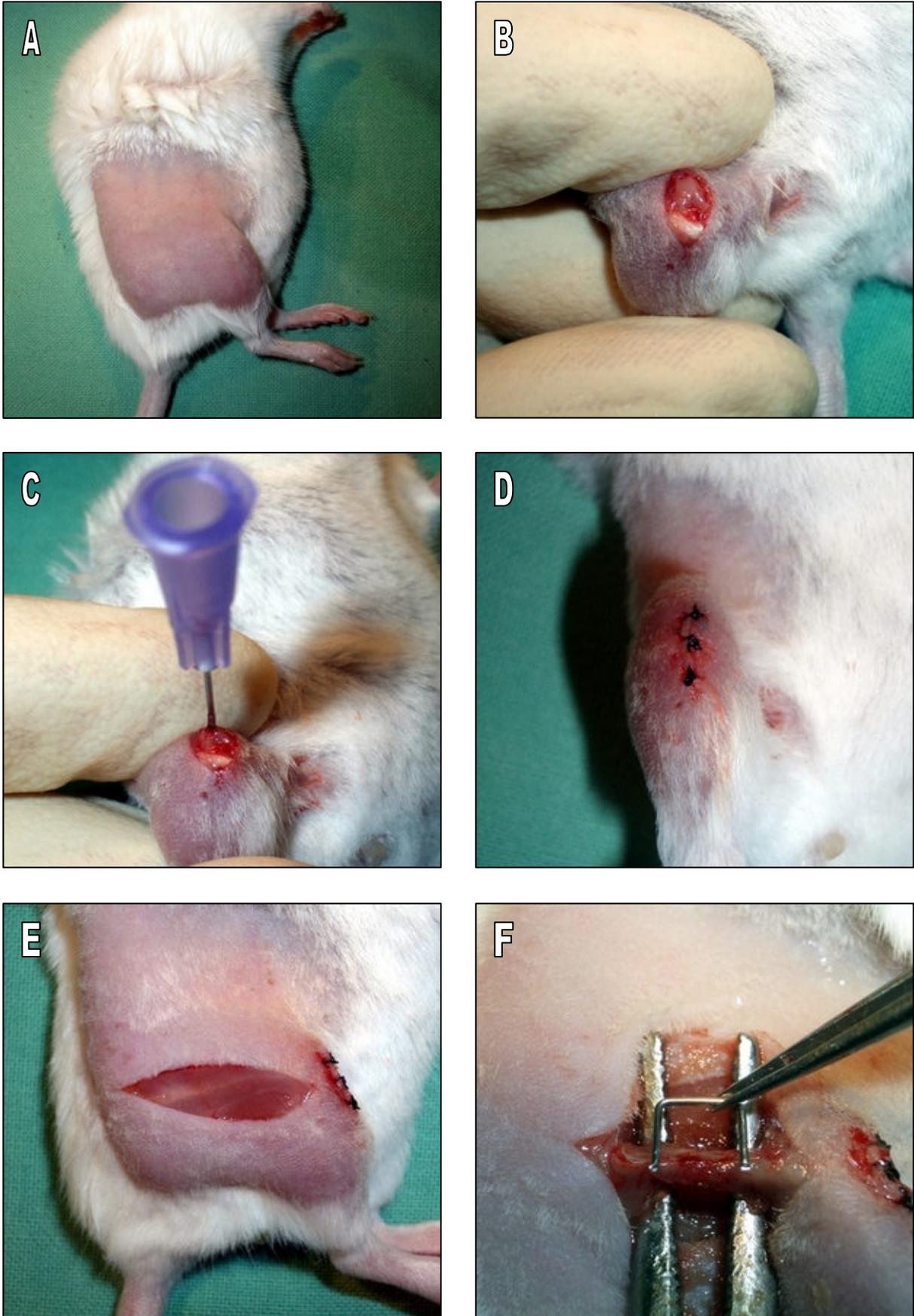


Abb. 4 A-F: Operativer Eingriff: **A:** enthaartes und desinfiziertes OP-Feld; **B:** distaler Zugang zum Femur bei nach lateral luxierter Patella; **C:** von distal ins Femur eingebrachter Pin; **D:** Hautverschluss; **E:** lateraler Zugang zum Femur; **F:** Bestimmung der Clip-Position

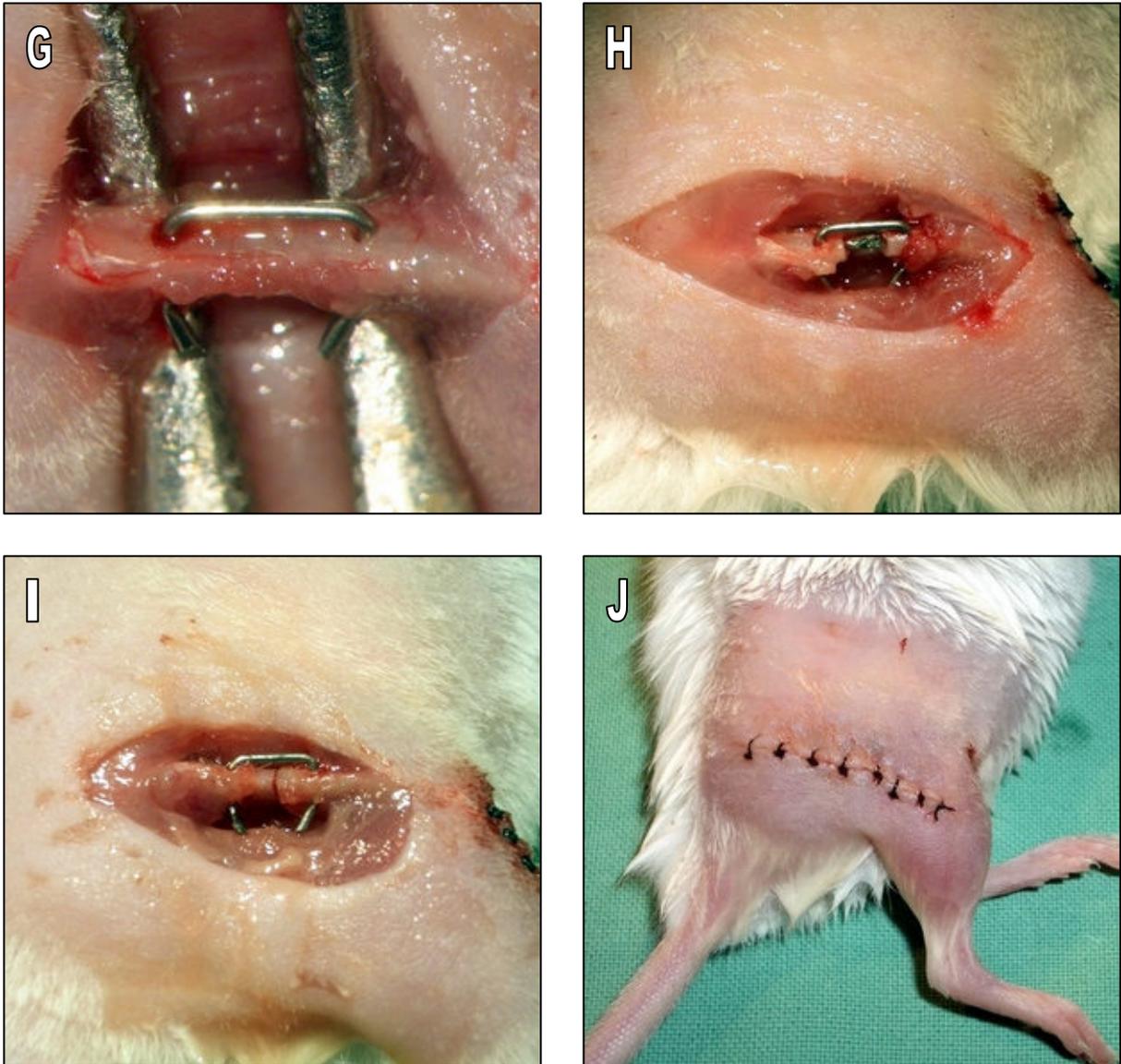


Abb. 4 G-J: Operativer Eingriff: **G:** Clip mit gebogenen Clip-Schenkeln; **H:** Osteosynthese mit 1,8mm Segmentdefekt; **I:** Osteosynthese mit 0,25mm Segmentdefekt; **J:** Wundverschluss

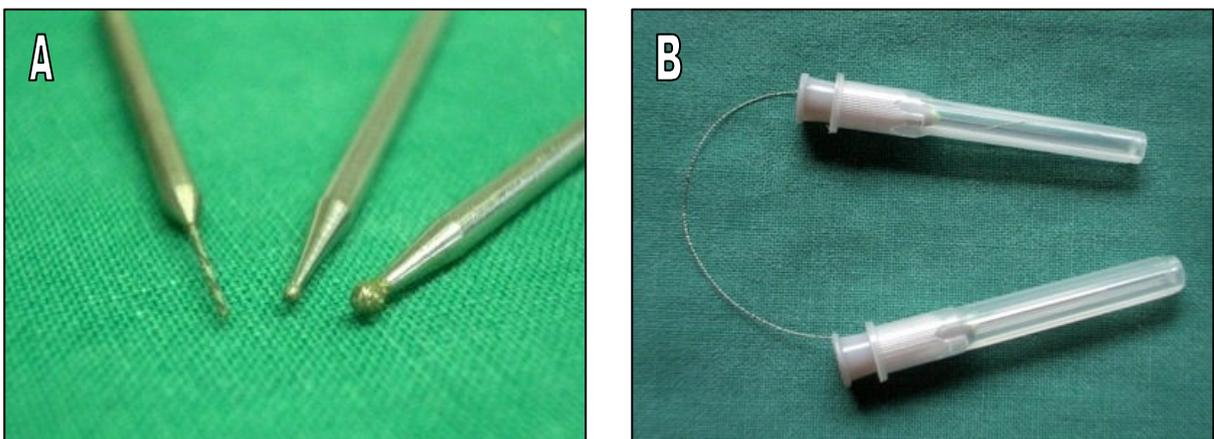


Abb. 5: **A:** Mikrobohrer 0,5mm (links), Diamantkopf-Kugelfräse 1,0mm (Mitte) und 1,8mm (rechts); **B:** Gigli-Drahtsäge, eingespannt zwischen Kanülen und Kanülenkappe

Anschließend erfolgte zur Überprüfung der Osteosynthese eine Röntgenkontrolle (Faxitron X-Ray MX20 Cabinet X-Ray System, Faxitron X-Ray Corporation, Wheeling, USA) bei einer Spannung von 26KV, einer Stromstärke von 10A und 0,01 Sekunden Belichtungszeit (Abb. 6) mit nachfolgender Digitalisierung der Bilder. Schließlich wurden die Augen der Maus nochmals mit Bepanthen eingecremt und das Schmerzmittel Carprofen 50mg/ml (Rimadyl, Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland) injiziert. Dazu wurden zunächst 1ml des Schmerzmittels mit 9ml NaCl 0,9% verdünnt und anschließend 0,05 ml subcutan in die Nackenfalte über eine Einmalkanüle/Einmalspritze (BD Microlane 3, 26G ½" 0,45x13mm Becton Dickinson, Drogheda, Irland / BD Plastipak, Becton Dickinson, Drogheda, Irland) injiziert. Dies entsprach einer Dosis von 0,25mg pro Versuchstier.

Am ersten postoperativen Tag wurden die Versuchstiere einer erneuten Röntgenkontrolle unterzogen. Des Weiteren erhielten die Versuchstiere eine weitere subcutane Schmerzmittelinjektion in gleicher Dosierung wie nach der Operation. Dazu wurden die Tiere mit dem gleichen Narkosegemisch, wie vor der Operation, in eine leichte Narkose versetzt. Dies konnte eine korrekte und komplikationslose Röntgenkontrolle und Schmerzmittelapplikation gewährleisten.

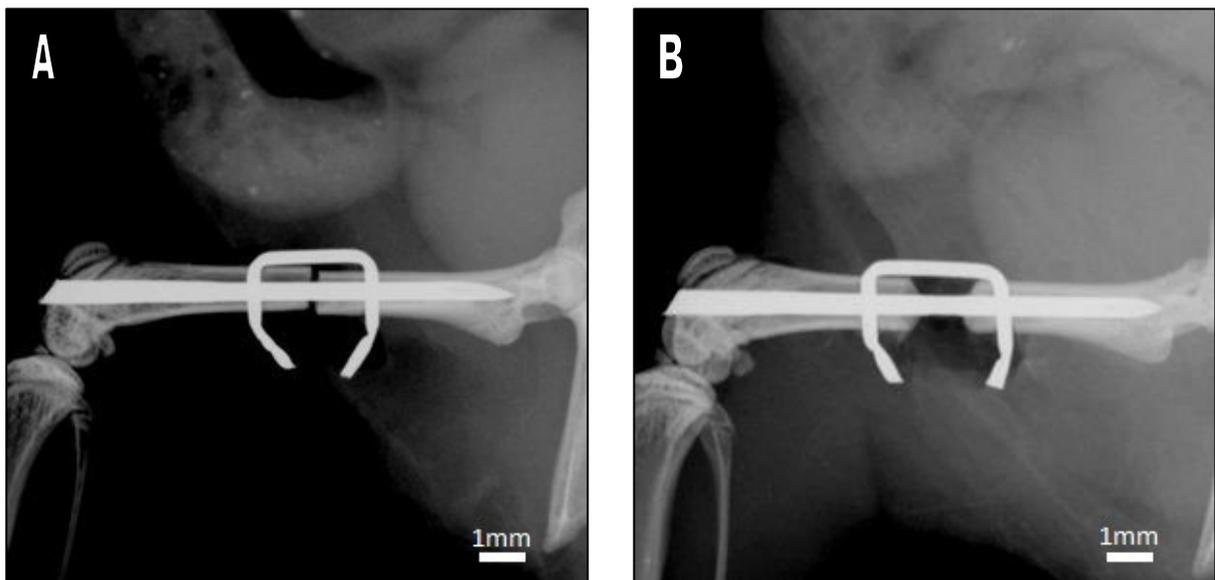


Abb. 6: **A:** postoperative Röntgenkontrolle des 0,25mm Segmentdefekts; **B:** postoperative Röntgenkontrolle des 1,8mm Segmentdefekts

3.6 Probengewinnung

Zur Probengewinnung für die computertomografische und histologische Untersuchung sowie die Western-Blot-Analyse wurde das operativ versorgte Femur je nach Gruppenzuteilung der Versuchstiere nach einer bestimmten festgelegten Standzeit explantiert. Dazu wurden die betreffenden Versuchstiere nach Ermittlung des Gewichts mit 0,01ml Narkosemittel pro Gramm Körpergewicht anästhesiert und anschließend durch cervicale Dislokation getötet. Die operierte Extremität wurde enthaart, mit einer Skalpellklinge eine großzügige Inzision der Haut vom Kniegelenk bis zur Hüfte des Versuchstiers durchgeführt und Femur und Tibia im Kniegelenk mit der Skalpellklinge voneinander getrennt. Die oberflächliche Oberschenkelmuskulatur wurde mit einer Schere abgetrennt. Im Anschluss wurde das Hüftgelenk durch Durchtrennen der Weichteile im Hüftgelenksbereich freigelegt und eine Hüftgelenksexartikulation herbeigeführt. Das Femur wurde mit einem erhaltenen Muskelmantel explantiert.

Für die Western-Blot-Analyse wurde die gesamte Oberschenkelmuskulatur des Femurs mit Schere und Skalpell entfernt, sodass der Clip und der sich gebildete Kallus zum Vorschein kamen. Der Kallus wurde anschließend mit einer Skalpellklinge und einer spitzen Pinzette vom Knochen reseziert, gänzlich entfernt und in durchsichtige Druckverschlussbeutel 50x100mm (Sokufol Folien GmbH, Limburg, Deutschland) verbracht. Diese Druckverschlussbeutel wurden geschlossen in ein Dewar-Transport-Gefäß (KGW Isotherm, Karlsruhe, Deutschland) mit flüssigem Stickstoff (Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland) eingetaucht, wodurch das Probematerial sofort schockgefroren wurde. Bis zu dessen Untersuchung wurde das Probematerial bei ca. -80°C im Gefrierschrank (Revco Ultima 2, Revco Technologies, Asheville, USA) aufbewahrt.

Für die computertomografische und histologische Untersuchung wurde das Femur mit erhaltenem Muskelmantel in ca. 10ml Methanol 70% Lösung (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) in einem Mehrzweckgefäß mit Schnappdeckel (Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) fixiert und bei minus 20° Celsius im Gefrierschrank bis zu dessen Untersuchung aufbewahrt.

Für die Untersuchung im μ -CT musste das Osteosynthese-Material zunächst entfernt werden. Dazu wurde der aus dem distalen Femurende ragende Pin zunächst herausgezogen. Der im Femur befindliche Clip verhinderte beim Herausziehen des Pins

eine Kompression des Frakturbereichs und damit eine mögliche Beschädigung des Kallus. Um die Stabilität nach Entfernung des Osteosynthese-Materials zu erhalten, wurde die Muskulatur belassen. Der Clip wurde mit der Seitenschneider-Zange an seinen beiden Schenkeln vom gemeinsamen Verbindungsstück getrennt und die beiden Clip-Schenkel im Anschluss aus ihren Insertionslöchern herausgedreht.

Nach Durchführung der computertomografischen Untersuchung wurden die Knochen wieder in Methanol 70% eingelegt und bis zur histologischen Untersuchung bei minus 20° Celsius im Gefrierschrank aufbewahrt.

3.7 Computer-Tomografie

3.7.1 Mikrotomografische Bildgebung

Die mikrotomografische Beurteilung der Frakturheilung wurde mit dem Bildgebungssystem μ CT 40 (Scanco Medical, Brüttisellen, Schweiz) durchgeführt. Dieses ist mit einer Röntgenröhre mit 5 μ m Brennfleck als Strahlenquelle ausgestattet und wurde mit 70 keV und 114 μ A bei einer Integrationszeit von 200 ms betrieben.

Die Längsachse des Femurs wurde senkrecht zur Achse des Röntgenstrahls positioniert, um axiale Schichtaufnahmen des Femurs zu erhalten. Hierzu wurden die Knochen in dafür vorgesehene Probehalterungen (Scanco Medical, Brüttisellen, Schweiz) gebracht und mit Fixiermedium Methanol 70% aufgefüllt.

Um Bewegungen der Knochen und damit Positions-Veränderungen in der flüssigkeitsgefüllten Probehalterung während des Scannens zu vermeiden, wurden die Knochen in aus einem handelsüblichen Schwamm zugeschnittenen Schablonen in die Probehalterung eingesetzt.

Zunächst wurden von den Knochen Voraufnahmen (Scouts) angefertigt, auf denen die zu scannende Region bestimmt wurde. Diese umfasste den segmentalen Defekt mit jeweils ca. 1mm Femurfragment proximal und distal, wobei auf einer Gesamtlänge von 2,5mm in der Union-Gruppe (208 Schnitte) und 3,8mm in der Non-Union-Gruppe (317 Schnitte) eine CT-Aufnahme angefertigt wurde. Der Abstand der CT-Schichten betrug 12 μ m. Aus 500 Projektionen wurden zwei-dimensionale CT-Bilder in einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel rekonstruiert, unter Verwendung eines standardisierten

Rückprojektionsverfahrens. Drei-dimensionale Rekonstruktionen des CT-Scans wurden mit einer Voxel-Größe von 12 μm erstellt.

3.7.2 Auswertung der Mikrotomografischen Bildgebung

Zur Beurteilung der Frakturheilung wurde die Größe des Frakturspalts, die Überbrückung des Frakturspalts durch mineralisierten Kallus, das mineralisierte Kallusvolumen im Frakturspalt sowie das Polar Moment of Inertia (PMOI) des überbrückenden Kallus bestimmt (Abb. 7). Das PMOI beschreibt den polaren Torsionswiderstand (Trägheitsmoment) einer Kreisquerschnittsfläche gegen Torsion, also hier den Torsionswiderstand des Kallus in axialer Ebene. Es ist abhängig von der Geometrie und Beschaffenheit des untersuchten Gegenstandes.

Die mit dem μCT zu untersuchende Region, das Volume of Interest (VOI), wurde definiert als der Bereich zwischen den beiden Femurfragmenten und entsprach dem segmentalen Defekt, wobei die ursprüngliche Kortikalis als Begrenzung herangezogen wurde. Innerhalb des Volume of Interest wurde in der zweidimensionalen CT-Darstellung der entstandene Kallus unter Ausschluss der vorbestehenden Kortikalis mit einer internen Software des Bildgebungs-Systems manuell konturiert.

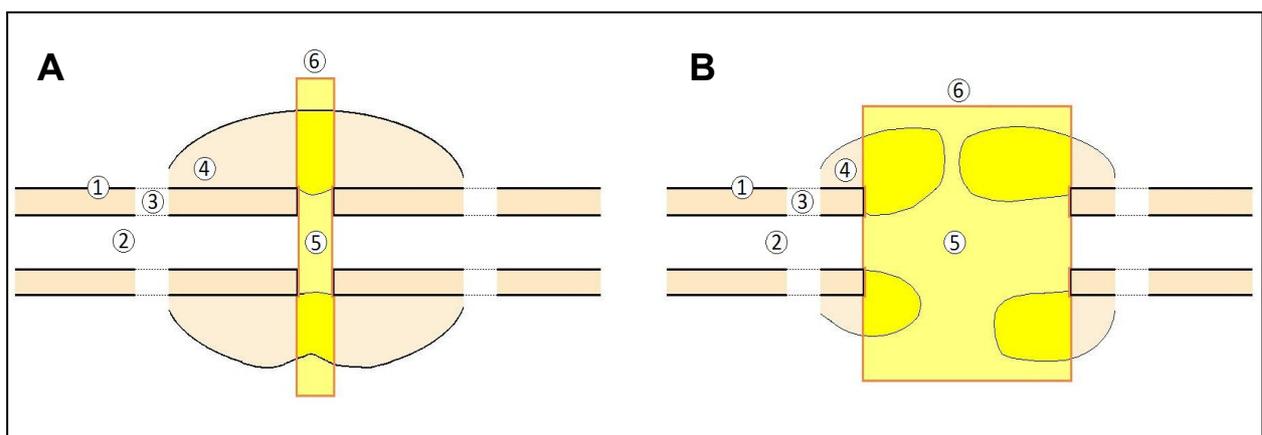


Abb. 7: Schematische Skizze des im Micro-CT gescannten Bereichs des Femurs mit 0,25mm (A) und der 1,8mm (B) Segmentdefekt; Kortikalis (1), Markraum (2), Insertionsloch des Clips (3), Periostaler Kallus (4), Segmentdefekt (5), Volume of Interest (6)

Die Darstellung des gescannten Knochens in der zweidimensionalen CT-Aufnahme erfolgte anhand von Graustufenwerten. Das Volume of Interest wurde mit einem Verfahren, welches anhand von Grenz- bzw. Schwellenwerten innerhalb dieses Graustufenwertschemas arbeitet, untersucht. Dieses Verfahren ermöglichte die Differenzierung von wenig mineralisiertem Kallus (Geflechtknochen) und hoch mineralisiertem Kallus (lamellärer Knochen) sowie die Berechnung der Volumina dieser Strukturen. Die Differenzierung von Geflechtknochen und lamellärem Knochen erfolgte über die Einstellung von prozentualen Abschwächungswerten des maximalen Graustufenwerts in der axialen Bild-Darstellung. Die Grenzwerte wurden auf 14,5% für den Geflechtknochen (geringe Abschwächung der Röntgenstrahlen) und 36% für den lamellären Knochen (starke Abschwächung der Röntgenstrahlen) eingestellt. Diesen Werten lagen vorherige Vergleiche mit histologischen Präparaten zugrunde (Gröngröft et al. 2009). Ein 3D Gaussian Filter wurde verwendet, um eine Verzerrung der Graustufenwert-Darstellung im Übergangsbereich zwischen nicht-mineralisiertem, wenig mineralisiertem und hoch mineralisiertem Kallus zu unterdrücken.

Nach Einstellung dieser Parameter erfolgte eine vom Bildgebungs-System selbstständig durchgeführte Berechnung der konturierten CT-Aufnahmen über ein internes Auswertungsprogramm und die Ausgabe der entsprechenden Werte für die Volumina des mineralisierten Kallus im Frakturspalt sowie des Polar Moment of Inertia zur Beurteilung der mechanischen Stabilität des Kallus. Die Kallusvolumina wurden in Relation zur Größe des Frakturspalts gesetzt und pro mm Frakturspalt angegeben.

Die Überbrückung (Bridging) des Frakturspalts durch entstandenen Kallus wurde anhand der zweidimensionalen CT-Darstellung und der dreidimensionalen Rekonstruktion beurteilt. Zur Bestimmung der Größe des Frakturspalts wurde an vier Punkten in der zweidimensionalen axialen Darstellung der Abstand zwischen den beiden Femurfragmenten bzw. des entstandenen mineralisierten Kallus bestimmt und der sich ergebende Wert gemittelt. Diese vier Punkte wurden in der axialen Darstellung des Knochens in der 3Uhr, 6Uhr, 9Uhr und 12Uhr Position festgelegt und zwischen den jeweils zugehörigen Punkten des proximalen und distalen Femurfragments der Abstand gemessen, indem die Anzahl der CT-Schichten zwischen diesen beiden Punkten ausgezählt und mit dem Schichtabstand von 12 μm multipliziert wurde.

3.8 Histologie

Zur histologischen Beurteilung der Frakturheilung wurde eine Trichromfärbung nach Masson-Goldner und zur Beurteilung der Angiogenese und Vaskularisierung eine immunhistologische Färbung gegen den endothelialen Marker CD31 (PECAM-1 = platelet endothelial cell adhesion molecule) durchgeführt.

Vor der histologischen Bearbeitung wurden die in Methanol 70% fixierten Knochen zunächst über drei Wochen in 10%iger Ethylendiaminotetraessigsäure-Lösung (EDTA, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) dekalzifiziert und anschließend histologische Schnitte angefertigt. Dazu wurden die Knochen zunächst 30 Minuten luftgetrocknet, in Phosphat gepufferter Salzlösung PBS (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) gespült und für 15 Minuten in Saccharose 5% (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) eingelegt. Danach wurden 5µm dicke Schnitte des Knochens in sagittal-longitudinaler Ausrichtung am Gefrier-Mikrotom (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) erstellt. Diese wurden auf Glasobjektträger (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgezogen und anschließend mit Einbettmedium für Gefrierschnitte (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) auf dem Objektträger fixiert.

3.8.1 Trichromfärbung nach Masson-Goldner

Die Färbung nach Masson-Goldner erfolgte anhand eines Standardprotokolls. Die frischen Schnitte wurden zunächst mit Formalin 4% (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) für 5 Minuten fixiert und in Aqua dest (B. Braun, Melsungen, Deutschland) gespült, anschließend für 1-2 Minuten mit Weigert's Eisenhämatoxylin (Mischlösung im Verhältnis 1:1 aus Lösung A: 1g Hämatoxylin (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) in 100 ml 96% Ethanol (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) und Lösung B: 1,16g Eisen(III)-chlorid (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) in 99ml Aqua dest mit 1ml Salzsäure 25% (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)) eine Kernfärbung durchgeführt und für 10-15 Minuten in fließendem Wasser gespült. Dann erfolgte zur Anfärbung des Bindegewebes und der Muskulatur die Applikation von Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin (aus 88ml

0,2%iger Essigsäure (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) mit 7ml Masson-Lösung und 2ml Azophloxin-Lösung (Azophloxin-Lösung aus 0,5g Azophloxin (Waldeck GmbH & Co KG, Münster, Deutschland) in 100ml Aqua dest mit 0,2ml Eisessig (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland; Masson-Lösung aus 0,2g Ponceau (Waldeck GmbH & Co KG, Münster, Deutschland), 0,1g Säurefuchsin (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in 300ml Aqua dest und 0,6ml Eisessig) für 5-7 Minuten und Spülung mit 1%iger Essigsäure (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland). Zur Entfärbung des vollständig angefärbten Präparates von Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin wurde der Objektträger mit Molybdato-phosphorsäure-Orange (aus 3-5g Molybdato-phosphorsäure (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 2g Orange G (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) in 100ml Aqua dest oder Wolframatophosphorsäure-Orange (aus 3-5g Wolframatophosphorsäure (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 2g Orange G in 100ml Aqua dest)) behandelt und mit 1%iger Essigsäure gespült. Lediglich das Bindegewebe und die Muskulatur verblieben angefärbt. Danach wurde eine Gegenfärbung mit Lichtgrün (0,1-0,2g Lichtgrün SF (Waldeck GmbH & Co KG, Münster, Deutschland) in 100ml Aqua dest und 0,2ml Eisessig) bzw. Anilinblau (Serva Feinbiochemika GmbH & Co KG, Heidelberg, Deutschland) für 5 Minuten zur farbigen Darstellung der Nicht-Bindegewebe- und Muskelanteile durchgeführt und das Präparat mit 1%iger Essigsäure für 5 Minuten ausgewaschen. Nachfolgend wurde das Präparate mit Ethanol 100% (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) entwässert und in einem weiteren Schritt das Ethanol durch Xylol (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) verdrängt sowie Eindeckmittel in gelöster Form (Histokitt 2, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) beigefügt. Durch anschließende Verflüchtigung des Xylols verfestigte sich das Eindeckmittel und fixierte das Präparat auf dem Objektträger.

3.8.2 Auswertung der Trichromfärbung nach Masson-Goldner

Die angefärbten Knochenpräparate wurden unter einem Mikroskop (Olympus BX60, Olympus, Tokyo, Japan) bei 1,25-facher Vergrößerung digitalisiert (Zeiss Axio Cam und Axio Vision 3.1, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und die Auswertung mit dem Bildauswertungsprogramm ImageJ (ImageJ Analysis System, National Institutes of

Health, Bethesda, USA) durchgeführt. Dazu erfolgte eine Eichung der ImageJ-Software mittels eines ebenfalls unter 1,25-facher Vergrößerung digitalisierten Maßstabs.

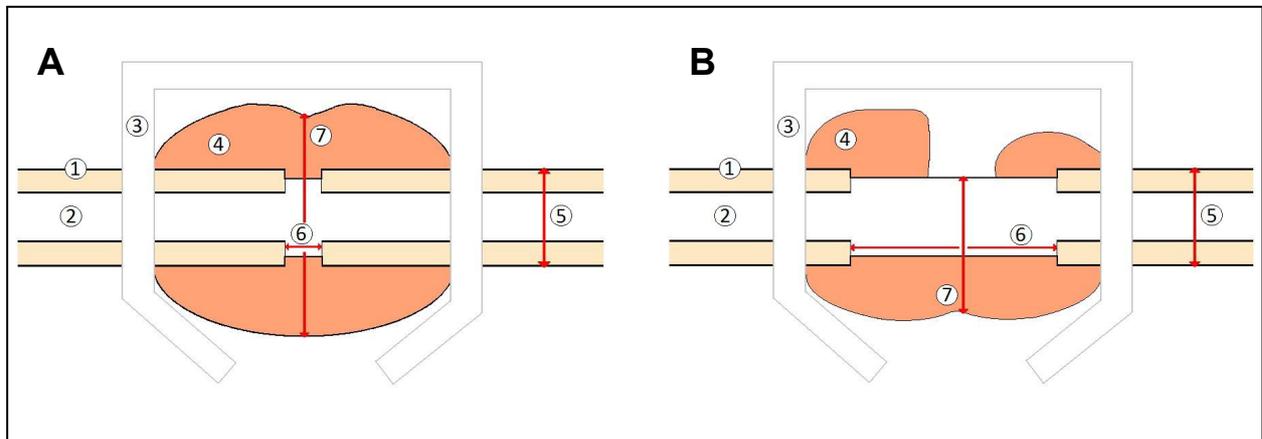


Abb. 8: Schematische Skizze des histologischen Präparates des 0,25mm (A) und des 1,8mm (B) Segmentdefekts; Kortikalis (1), Markraum (2), ehemalige Position des Clips (3), Periostaler Kallus (4), Femurdurchmesser (5), Segmentdefekt (6), Kallus-Durchmesser in Frakturmitte (7)

Im nach Masson-Goldner gefärbten Knochenpräparat (Abb. 8) wurden folgende Parameter bestimmt: die Größe des Frakturspalts [mm], der Femurdurchmesser [mm], der Kallusdurchmesser in der Mitte des Frakturspalts [mm], die periostale Kallusfläche [mm²], die Gewebeverteilung im Kallus anhand der Fläche des knorpeligen Anteils des Kallus [mm²], des bindegewebigen Anteils des Kallus [mm²] und des knöchernen Anteils des Kallus [mm²]. Zusätzlich wurde ein Punktesystem (Healing-Score [0-4 Punkte]) zur qualitativen Beurteilung der Frakturheilung eingesetzt.

Zur Bestimmung der Größe des Frakturspalts wurde auf dem histologischen Schnitt für jeweils beide dargestellte Diaphysen des Femurschafts der Abstand zwischen dem entstandenen verknöchertem Kallus beider Femurfragmente parallel zur Diaphyse vermessen und der Mittelwert als Frakturspalt-Größe festgesetzt.

Der Durchmesser des Femurschafts wurde proximal und distal des Frakturbereichs anhand der ursprünglichen Femurschaft-Kortikalis bestimmt und der Wert gemittelt. Um anatomische Größenunterschiede der Femora zu berücksichtigen, wurden die ermittelten Werte (Kallusdurchmesser und die Kallusflächen) zum Femurdurchmesser in Relation gesetzt.

Der maximale Kallusdurchmesser wurde exakt in der Mitte zwischen den beiden ursprünglichen Femurfragmenten senkrecht zur Diaphyse bestimmt und in Relation zum entsprechenden Femurdurchmesser gesetzt (Kallusdurchmesser/Femurdurchmesser).

Bei Knochenpräparaten ohne vollständige Überbrückung durch den am proximalen und distalen Fragment entstandenen Kallus bzw. ohne über die Mitte des Frakturspalts hinausgehenden Kallus konnte kein Kallusdurchmesser bestimmt werden.

Die Beurteilung der Überbrückung zwischen dem proximalen und distalen Femurfragment erfolgte über die Vergabe von Punkten in einem Punktsystem (Healing Score). Für keine oder eine bindegewebige Überbrückung wurden 0 Punkte, für eine knorpelige Überbrückung 1 Punkt und für eine knöcherne Überbrückung 2 Punkte vergeben. Die Beurteilung wurde für beide Femurdiaphysen durchgeführt, so dass pro Knochenpräparat 0 bis 4 Punkte erreicht werden konnten.

Die Fläche des periostalen Kallus wurde auf beiden Seiten der dargestellten Femurdiaphyse ermittelt und in Relation zum Femurdurchmesser gesetzt (Kallusfläche/Femurdurchmesser). Dazu wurde der gesamte periostale Kallus manuell vermessen, wobei die Femurkortikalis, die Clip-Insertionslöcher und der äußere Rand des Kallus als Begrenzung dienten. Am Frakturspalt wurde zur Abgrenzung des periostalen Kallus vom endostalen Kallus eine Verbindungslinie zwischen der Kortikalis des proximalen und der Kortikalis des distalen Femurfragments parallel zum Femurschaft eingezeichnet. Gewebefreie Areale innerhalb des Kallus wurden vermessen und von der Gesamtkallusfläche subtrahiert. Zuletzt wurden die bindegewebigen, knorpeligen und knöchernen Flächen innerhalb des Kallus vermessen, um die Zusammensetzung zu bestimmen. Diese entsprachen in ihrer Gesamtheit der Gesamtkallusfläche und wurden als prozentualer Anteil [%] dieser Gesamtkallusfläche (Knöcherne Kallusfläche/Gesamt-Kallusfläche; Knorpelige Kallusfläche/Gesamt-Kallusfläche; Bindegewebige Kallusfläche/Gesamt-Kallusfläche) angegeben.

3.8.3 Immunhistologische CD-31 Färbung

Die Knochenpräparate wurden zur Fixierung und Permeabilisierung ca. 5 Sekunden mit Aceton (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) bei 4°C fixiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurde der Schnitt 5 Minuten in Formalin (Formaldehyd, Roti Histofix 4%, Carl Roth GmbH Co KG, Karlsruhe, Deutschland) bei Raumtemperatur fixiert und mit Aqua dest gespült. Die Endogene Peroxidase wurde 30 Minuten in 0,3% H₂O₂ (2ml H₂O₂ 30% (Otto Fischar GmbH & Co

KG, Saarbrücken, Deutschland) + 198ml Methanol 100% (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)) geblockt und erneut mit Aqua dest gespült. Die Blockung der endogenen Peroxidase verhinderte eine Braunfärbung des gesamten Präparates durch im Verlauf zugesetzter DAB-Lösung.

Für 30 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte eine Spülung mit Normal-Goat-Serum (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) in Verdünnung mit PBS (3%), um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nachfolgend wurden 40µl der Primärantikörper PECAM-1 (CD31), Rat-Anti-Mouse, monoklonale Antikörper (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:25 mittels PBS-Lösung auf das Knochenpräparat pipettiert. Ein Deckglas (Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) wurde aufgelegt und der Schnitt über Nacht in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Negativkontrolle wurde anstelle von CD31-Antikörpern PBS auf ein Knochenpräparat aufgetragen.

Nach dem Inkubieren wurde das Deckglas entfernt und zunächst 3 Minuten in PBS gespült. Der verwendete Puffer wurde erneuert und erneut 5 Minuten in PBS gespült. Im Anschluss wurden 100µl Peroxidase-markierter Sekundärantikörper, Goat-anti-Rat, (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) in Verdünnung 1:100 mittels PBS-Lösung aufgetragen und 45 Minuten in feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Peroxidase-markierten Sekundärantikörper Goat-anti-Rat banden an die PECAM-1-Primärantikörper Rat-Anti-Mouse. Der Schnitt wurde erneut 3 Minuten mit PBS gespült, der Puffer erneuert und wieder 5 Minuten gespült. Hiernach wurden 100µl Diaminobenzidin-Lösung DAB (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) auf das Knochenpräparat aufgetragen und 5 Minuten in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert und danach 5 Minuten in Aqua dest gespült.

Als Nächstes erfolgte zur Darstellung der Zellkerne und des Gesamtpräparates eine Gegenfärbung in Mayers Hämalaunlösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mittels 3-5-maligen Eintauchens und erneutem Spülen in Aqua dest. Der Objektträger wurde unter fließendem Leitungswasser für 8 Minuten gewässert und erneut mit Aqua dest gespült. Im Anschluss wurden die Objektträger zur Entwässerung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe Ethanol (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) von 70% bis 100% für je 3 Minuten und zur Verdrängung des Ethanols dreimal mit Xylol für je 3 Minuten versetzt. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Histokitt 2 eingedeckt und auf dem Objektträger fixiert.

3.8.4 Auswertung der Immunhistologischen CD31 Färbung

Die Analyse der Vaskularisierung erfolgte anhand der immunhistologischen Schnitte durch Auszählen der mittels CD31-Färbung markierten Gefäße innerhalb von Gesichtsfeldern (High Power Fields / HPF) in vordefinierten Bereichen des sich gebildeten Kallus (Abb. 9). Die Darstellung eines Lumens war nicht notwendig, um die angefärbte Struktur als Gefäß zu definieren. Die Auszählung erfolgte am Computermonitor, welcher über eine Kamera (Zeiss Axio Cam; Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) an ein Mikroskop (Olympus BX60, Olympus, Tokyo, Japan) angeschlossen war. Die Darstellung des histologischen Präparates erfolgte über die Software Axio Vision (Axio Vision 3.1; Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

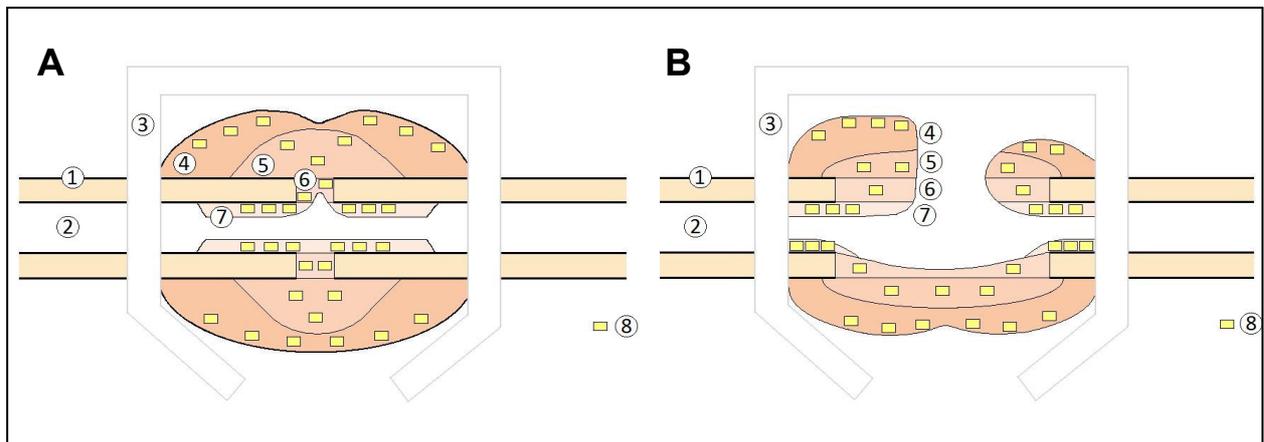


Abb. 9: Schematische Darstellung der Kallus-Unterteilung und der Verteilung der High-Power-Fields im Kallus für die immunhistologische Bestimmung der Gefäßdichte beim 0,25mm-(A) und 1,8mm (B) Segmentdefekt; Kortikalis (1), Markraum (2), ehemalige Position des Clips (3), Periostaler Kallus (4), Zentraler Kallus (5), Intercortikaler Kallus (6), Endostaler Kallus (7), High-Power-Field (8)

Unter dem Mikroskop wurde in 34 HPF die Anzahl der gefärbten Gefäße bestimmt. Ein HPF entsprach im histologischen Präparat einem Bereich von ca. 225 x 180 µm. Jede ununterbrochene angefärbte Struktur wurde als einzelnes Gefäß gewertet. Die ausgezählten Gefäße wurden als Anzahl der Gefäße pro HPF angegeben. Von den insgesamt 34 HPF entfielen 12 HPF auf den endostalen, 12 HPF auf den periostalen, 6 HPF auf den zentralen und 4 HPF auf den interkortikalen Bereich des Kallus.

3.9 Western-Blot Analyse

3.9.1 Proteinextraktion, Elektrophorese, Blotting und Detektion

Die tiefgefrorenen Proben (-80°C) wurden pro 100mg Probematerial mit 500µl Lysispuffer (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), mit 100mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) im Verhältnis 1:50 und mit Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) im Verhältnis 1:100 versetzt, 20 Sekunden mechanisch zerkleinert (Micra D-1, ART Prozess- & Labortechnik GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland) und auf Eis homogenisiert. Die Lösung wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, 30 Minuten bei 4°Celsius bei 13000U/min (16000 x g) zentrifugiert (Heraeus Biofuge Fresco, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland) und der Überstand abpipettiert (Einkanal-Pipette Reference, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Proteinextrakt mit Aqua dest 1:10 verdünnt und 50µl mit 250µl einer alkalischen Kupfersulfat-Lösung (Lösung aus Reagenz A (10g Na₂CO₃ in 500ml NaOH 0,1M (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)) und Reagenz B (0,5g KNa-Tartrat + 0,25g Cu-Sulfat*5 H₂O in 50ml Aqua dest (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)) im Verhältnis 50+1 (50 Teile Reagenz A + 1 Teil Reagenz B)) versetzt und für 15 Sekunden gemischt (Reax Top, Heidolph Instruments GmbH & Co. Kg, Schwabach, Deutschland). Bei Raumtemperatur wurde für 10 Minuten inkubiert, 25µl einer im Verhältnis 1:2 mit Aqua dest verdünnten Folin-Ciocalteu's-Phenol-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) zugesetzt, 15 Sekunden gemischt und weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei bildete sich ein blauer Farbkomplex. Die Absorption des Farbkomplexes wurde mit einem Photometer (GeneQuant Pro, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 595nm ermittelt. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer BSA-Standardkurve (Bovine Serum Albumin) bestimmt und die Proteinextrakte anschließend durch Verdünnung mit Aqua dest so eingestellt, dass sie ca. 60µg Protein in einem Volumen von 20-30µl enthielten (2-3µg Protein/µl).

Die Proteinextrakte wurden mit Laemmli Sample Buffer (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) im Verhältnis 1:2 verdünnt und zweimal für 5 Minuten im

kochenden Wasserbad denaturiert. Die Proteine erhielten eine konstante negative Nettoladung pro Masseneinheit (1,4g SDS/g Protein).

Die denaturierten verdünnten Proteinextrakte (0,65-1µg Protein/µl) wurden auf Eis zur Auftrennung der SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) zugeführt. Zur Trennung wurde Polyacrylamid als Träger verwendet. Die Porengröße des Gels, der pH-Wert, die Temperatur, die eingesetzten Puffersubstanzen und die elektrische Feldstärke wurden durch den Versuchsaufbau bestimmt und gleiche Voraussetzungen für alle Versuchsabläufe geschaffen. Die Gele für die SDS-PAGE wurden laut Anleitung des Herstellers (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) in einer vertikalen Flachgelapparatur mit Gießstand für Minigel (Mini-Protean II, BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gegossen.

Die Western-Blot Analysen wurden als eindimensionale SDS-PAGE unter diskontinuierlichen Bedingungen nach Laemmli mit einer Acrylamidkonzentration von 5% im Sammelgel und einer Acrylamidkonzentration von 10% im Trenngel durchgeführt. (Acrylamid/Bis Solution, 29:1, BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland).

Zusätze	Sammelgel 5%	Trenngel 10%
30 % Acrylamid/Bis	0,67ml	3,3ml
Sammelgel-Puffer	0,5ml	x
Trenngel-Puffer	x	2,5ml
Aqua dest	2,7ml	4,0ml
10% SDS	0,04ml	0,1ml
10% APS	0,04ml	0,1ml
TEMED	0,02ml	0,02ml

Tab. 1: Zusammensetzung von Sammelgel und Trenngel;

Bezugsquellen: Sammelgel-Puffer: TRIS-HCl, pH 6,8 (121,1g TRIS Base + 91ml HCl konz. auf 1000ml mit Aqua dest aufgefüllt); Trenngel-Puffer: TRIS-HCl, pH 8,8 (181,65g TRIS Base + 25ml HCl konz. auf 1000ml mit Aqua dest aufgefüllt); TRIS (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland); HCl konz. (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland); SDS 10% - Natriumdodecylsulfat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland); APS 10% - Ammoniumpersulfat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland); TEMED - Tetramethylethyldiamin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

Nach Beladung der Geltaschen mit 30µl Probematerial (ca. 15-30µg Proteinextrakt) erfolgte die Trennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Mini-Protean II, BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) in Running Buffer (TRIS/Glycinpuffer, pH 8,8). Zur Qualitätskontrolle wurde ein Protein-Molekulargewichtstandard (High-Range Rainbow Molecular Weight

Markers, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) mitgeführt. Die Niederspannung wurde von einem Netzgerät für stabilisierten Gleichstrom (Power Pac 200, BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) erzeugt. Im Sammelgel wurde zur Konzentrierung der Proteine eine Spannung von 100V bei einer Stromstärke von 0,04A für 15 Minuten angelegt, zum Durchlauf des Trenngels eine Spannung von 140V bei einer Stromstärke von 0,04A für 60 Minuten. Die Proteinauftrennung wurde beendet, sobald die Lauffront das untere Gel-Ende erreicht hatte. Die Gele wurden aus der Kammer genommen und das Trenngel in ein Transferpufferbad (12mM TRIS; 96mM Glycin; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) überführt.

Der horizontale Proteintransfer auf eine synthetische proteinbindende Membran erfolgte als Tank-Blotting (Wet-Blot) in einer Mini-Trans-Blot-Kammer (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Die eingesetzte PVDF-Membran (Polyvinyliden-Difluorid) mit 0,2µm Porengröße (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) wurde auf Gelgröße zugeschnitten und zum Ausgleich von Oberflächenladungen für 20 Sekunden in Methanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) getaucht, mit Aqua dest gespült und für 10 Minuten zur Gleichgewichtseinstellung ins Transferpufferbad (12mM TRIS; 96mM Glycin; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gebracht.

Zur Durchführung des Blottings diente eine Blot-Kassette (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland), in welche zu beiden Seiten ein in Transferpuffer getränkter Schwamm (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) und nach innen folgend in Transferpuffer getränktes Filterpapier (Whatman, Schleicher & Schüll GmbH, Dassel, Deutschland) sowie die PVDF-Membran und das Trenngel mit den aufgetrennten Proteinextrakten gelegt wurden.

Die Blot-Kassette wurde so ausgerichtet, dass der Stromfluss einen Proteintransfer vom Gel auf die Membran ermöglichte. Es wurde in die Blotkammer ein Eis-Spacer eingelegt und auf einem Magnetrührer (Ikamag Ret, IKA Labortechnik, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) gearbeitet. Die Blot-Kammer wurde mit Transferpuffer aufgefüllt und an ein Netzgerät für Gleichstrom (Power Pac 200, BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) angeschlossen. Bei einer konstanten Spannung von $U = 50V$ und einer Stromstärke von $I = 0,8A$ erfolgte der Proteintransfer über 2 Stunden. Die proteinbeladene Membran wurde bis zur Detektion in TBS-T Puffer (1,5 mM TRIS Base pH 7,5; 10% NaCl; 0,1% Tween 20 in Aqua dest (Carl Roth GmbH & Co. KG,

Karlsruhe, Deutschland) bei 4° Celsius aufbewahrt. Zur Überprüfung des Gel-Membran-Transfers erfolgte eine Anfärbung der Proteinbanden auf der Membran mit Ponceau S (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Zusätzlich wurde das Trenngel zur Überprüfung des Blot-Vorgangs mit Coomassie Brilliantblau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) angefärbt.

Die Detektion wurde auf einem Horizontalschüttler (Heidolph Polymax 1040, Fisher Scientific) durchgeführt. Die Membranen wurden dreimal mit TBS-T Puffer gewaschen. Unspezifische freie Protein-Bindungsstellen der Membran wurden mit für die Detektion nicht relevanten Proteinlösungen aus Milchpulver 5% (Blotting Grade Blocker (non fat dry milk), BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) in TBS-T, die den Antikörpern keine Bindungsstellen boten, für 30 Minuten inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit TBS-T wurden spezifische unkonjugierte Primärantikörper (Tab. 2), die mit Blockierungsreagenz 5% (Milchpulver 5% in TBS-T) verdünnt waren, zur Bindung an spezifische Epitope des Antigens des Zielproteins appliziert und für eine bestimmte Zeit (siehe Tabelle) bei Raumtemperatur inkubiert. Gleichzeitig wurde ein β -Actin-Antikörper zur Absicherung der Quantifizierbarkeit eingesetzt.

Antikörper	Klon / Spezies / Ig	Bezugsquelle	Verdünnung/Inkubation
VEGF	A-20 / Rabbit / Polyklonales IgG	Santa Cruz	1:50 / 4h RT (7d) 1:100 / 3h RT (14d+21d)
Tie2	rmTie-2 / Goat / Polyklonales IgG H-176 / Rabbit / Polyklonales IgG	R&D Systems Santa Cruz	1:100 / RT 5h (7d+21d) 1:500 / 3h RT (14d)
Ang1	N-18 / Goat / Polyklonales IgG	Santa Cruz	1:50 / 3h RT
Cyr61	M-20 / Goat / Polyklonales IgG	Santa Cruz	1:500 / 3h RT
MMP13	ab35320 / Sheep / Polyklonales IgG	Abcam	1:50 / 3h RT (7d+21d) 1:100 / 3h RT (14d)
PCNA	PC10 / Mouse / Monoklonales IgG	Dako Cytomation	1:2000 / 3h RT (14d) 1:5000 / 3h RT (7d+21d)
Noggin	rmNoggin / Goat / Polyklonales IgG	R&D Systems	1:50 / 3h RT
Sclerostin	ab63097 / Rabbit / Polyklonales IgG	Abcam	1:50 / 3h RT
BMP-2/-4	H-51 / Rabbit / Polyklonales IgG	Santa Cruz	1:50 / üb. N. 4°C
β -Actin	AC-15 / Mouse / Monoklonales IgG	Sigma Aldrich	1:10.000 / 3-5h RT

Tab. 2: Eingesetzte Primär-Antikörper im Western Blot

Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T zur Entfernung unspezifisch sowie nicht gebundener Antikörper erfolgte die Inkubation mit einem mit Blockierungsreagenz 5% verdünntem enzymgekoppeltem Sekundärantikörper (Tab. 3) zur Bindung an konstante Bereiche (Fc-Region) des Primärantikörpers, um die Detektion über eine Chemilumineszenz-Reaktion zu ermöglichen. Nach 90 Minuten Inkubation wurden die Membranen fünfmal in TBS-T gewaschen.

Antikörper	Klon / Spezies / Ig	Bezugsquelle	Verdünnung/Inkubation
VEGF	Goat-anti-rabbit-IgG-POD Donkey-anti-rabbit-IgG-POD	R&D Systems GE Healthcare	1:1000 / 1,5h RT (7d) 1:5000/1,5hRT(14d+21d)
Tie2	Donkey-anti-goat-IgG-POD Donkey-anti-rabbit-IgG-POD	Santa Cruz GE Healthcare	1:1000/1,5h RT (7d+21d) 1:5000 / 1,5h RT (14d)
Ang1	Rabbit-anti-goat-IgG-POD	Dako Cytomation	1:2000 / 1,5h RT
Cyr61	Rabbit-anti-goat-IgG-POD	Dako Cytomation	1:2000 / 1,5h RT
MMP13	Rabbit-anti-sheep-IgG-POD	Dako Cytomation	1:1000 / 1,5h RT
PCNA	Sheep-anti-mouse-IgG-POD	GE Healthcare	1:5000 / 1,5h RT
Noggin	Rabbit-anti-goat-IgG-POD	Dako Cytomation	1:2000/1,5h RT (7d+21d) 1:2500/1,5h RT (14d)
Sclerostin	Donkey-anti-rabbit-IgG-POD	GE Healthcare	1:5000 / 1,5h RT
BMP-2/-4	Donkey-anti-rabbit-IgG-POD	GE Healthcare	1:5000 / 1,5h RT
β-Actin	Sheep-anti-mouse-IgG-POD	GE Healthcare	1:5000 / 1,5h RT

Tab. 3: Eingesetzte Sekundär-Antikörper im Western Blot

Die Membranen wurden auf Filterpapier und Autoklavierfolie (Stericlin, Vereinigte Papierwarenfabriken GmbH, Feuchtwangen, Deutschland) aufgelegt, mit ECL-Detektions-Reagenz (ECL WB Analysis System, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) versetzt und eine Minute inkubiert. Das am Sekundärantikörper gebundene Enzym setzte Chemilumineszenz-Substrat (ECL WB Analysis System, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) aus dem ECL-Detektions-Reagenz in ein Licht emittierendes Produkt um, welches durch Exposition eines Röntgenfilms (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) in einer Röntgenkassette (Amersham Biosciences Europe GmbH,

Freiburg, Deutschland) über dessen Schwärzung die Expressionsstärke des Zielproteins sichtbar machte. Nach 10-20 Minuten Expositionszeit wurden die Filme für 30-120 Sekunden in ein Entwicklungs-Bad (Zahnfilm, Adefo Chemie GmbH, Nürnberg, Deutschland) eingelegt, in Wasser gewaschen und in ein Fixierungs-Bad (Zahnfilm, Adefo Chemie GmbH, Nürnberg, Deutschland) gebracht und an der Luft getrocknet.

Die Absicherung der Quantifizierbarkeit erfolgte über das ubiquitär exprimierte Protein β -Actin, welches eine konstante intrazelluläre Verteilung im Zytoskelett aufweist und als Proteinkonzentrationsstandard herangezogen werden kann. Die Kontrolle wurde mit dem monoklonalen β -Actin-Antikörper-Klon AC-15 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) durchgeführt. Die densitometrisch ermittelte optische Dichte wurde auf gleiche β -Actin Konzentrationen korrekturgerechnet.

3.9.2 Auswertung der Western-Blot-Analyse

Die Auswertung der Röntgenfilme erfolgte mittels Gel-Dokumentationssystem (Gel Doc, BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) und Quantifizierungsprogramm (Quantity One Gel Doc, BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) über eine densitometrische Bestimmung der Lichtabsorption, indem die optische Dichte pro mm^2 der geschwärzten Fläche des Röntgenfilms gemessen wurde. Die erhobenen Daten wurden über den β -Actin-Proteinkonzentrations-Standard korrigiert und in $[\text{OD} \cdot \text{mm}^2 / \beta\text{-Actin-OD} \cdot \text{mm}^2]$ angegeben.

3.10 Statistik

Alle statistischen Daten wurden als Mittelwerte \pm SEM (Standardabweichung des Mittelwertes) angegeben. Nach Bestätigung einer Normalverteilung erfolgte eine statistische Analyse der erhobenen Werte innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe mittels One-Way-Anova und Student-Newman-Keuls-Test sowie zu jedem Zeitpunkt zwischen den beiden Versuchsgruppen mit einem ungepaarten T-Test und einer Bonferroni-Korrektur. Für signifikante Unterschiede wurde ein P-Wert von $< 0,05$ festgelegt. Die statistische Analyse erfolgte mit GraphPad Prism 4.0 (San Diego, USA).

4. Ergebnisse

4.1 Postoperativer Verlauf

Insgesamt wurden 110 weibliche Versuchstiere (CD-1-Mäuse) operiert, die Narkose und der operative Eingriff wurden gut vertragen. Die Versuchstiere wurden während der gesamten Standzeit beobachtet und auf pathologische Verhaltensmuster hin untersucht. Postoperativ konnte eine Schonhaltung bzw. verminderte Belastung der operierten Extremität beobachtet werden mit nachfolgend über wenige Tage zunehmendem Belastungsaufbau bis hin zur Vollbelastung ohne weitere wesentliche erkennbare Beeinträchtigung des Bewegungsablaufs. Das präoperative Gewicht der Versuchstiere betrug $31\text{g} \pm 2\text{g}$. Gewichtsmessungen (Abb. 10) zeigten eine Gewichtsabnahme in den ersten beiden postoperativen Wochen und eine Gewichtszunahme ab der dritten postoperativen Woche. In der Non-Union-Gruppe konnte im Vergleich zur Union-Gruppe ein größerer Gewichtsverlust in den ersten zwei postoperativen Wochen und eine geringere Gewichtszunahme ab der dritten postoperativen Woche ermittelt werden.

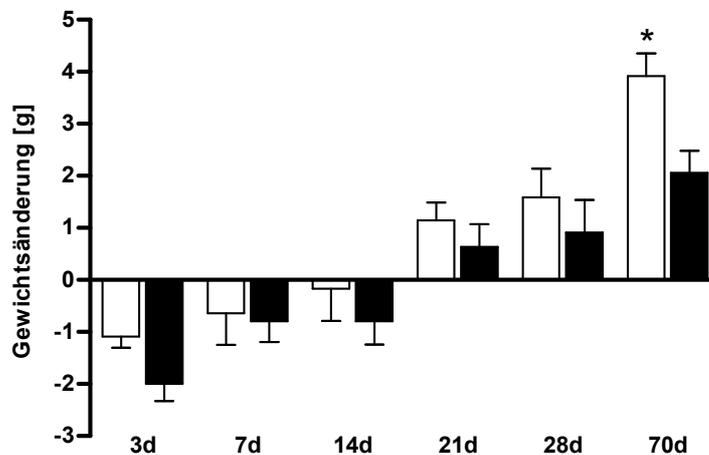


Abb. 10: Gewichtsänderung der Versuchstiere in [g] im Vergleich zum OP-Zeitpunkt in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 3, 7, 14, 21, 28 und 70 Tagen; (Mittelwert \pm SEM); * $p < 0,05$ vs. Non-Union

Für unsere Untersuchungen waren jeweils für beide Versuchsgruppen (Union vs. Non-Union) zu jedem Zeitpunkt sechs Versuchstiere für Micro-CT/Histologie ($n=72$) und für drei Zeitpunkte je vier Versuchstiere für die Western-Blot-Analyse ($n=24$) vorgesehen (Tab. 4). Insgesamt mussten 14 Versuchstiere aufgrund von Komplikationen aus der

Studie genommen und nachoperiert werden. Postoperative Ausschlusskriterien waren eine Knochen- oder Weichteilinfektion, eine Gewichtsabnahme von mehr als 20% des Körpergewichtes sowie eine makroskopisch oder radiologisch erkennbare Dislokation des Pin-Clip-Implantats. Von den ausgenommenen Versuchstieren verstarb ein Tier intraoperativ und zwei Tiere postoperativ (n=3). Bei einem Tier brach der Clip aus, bei einem dislozierte der Clip, bei vier dislozierte der Pin (Abb. 11A) und bei einem dislozierten Clip und Pin zugleich (n=7). Bei vier Versuchstieren konnte eine Infektion festgestellt werden, welche sich durch eine Osteolyse in der Röntgenkontrollaufnahme (Abb. 11B) sowie Eiteraustritt bei Revision des Operationsbereichs nachweisen lies (n=4). Dies entsprach einer Komplikationsrate von insgesamt 12,73% (14/110).

A							B			
Gruppen	3d	7d	14d	21d	28d	70d	Gruppen	7d	14d	21d
0,25mm	6 / 7	6 / 6	6 / 6	6 / 7	6 / 8	6 / 8	0,25mm	4 / 4	4 / 4	4 / 5
1,8mm	6 / 6	6 / 7	6 / 6	6 / 8	6 / 7	6 / 8	1,8mm	4 / 5	4 / 4	4 / 4

Tab 4: A: Versuchstiere für Micro-CT und Histologie; Bei n=72 erforderlichen Versuchstieren für Micro-CT und Histologie wurden n=84 Versuchstiere operiert und 12 Versuchstiere aufgrund von Komplikation aus der Studie genommen; **B:** Versuchstiere für Western Blot; Bei n=24 erforderlichen Versuchstieren für den Western-Blot wurden n=26 Versuchstiere operiert und 2 Versuchstiere aufgrund von Komplikation aus der Studie genommen; Insgesamt waren n=96 Versuchstiere laut Studiendesign erforderlich, n=110 Versuchstiere wurden operiert und 14 Versuchstiere wurden aufgrund von Komplikationen aus der Studie genommen; Zahlenangabe X/Y: X entspricht Anzahl der in Studie einbezogenen Versuchstiere, Y entspricht Anzahl der operierten Versuchstiere

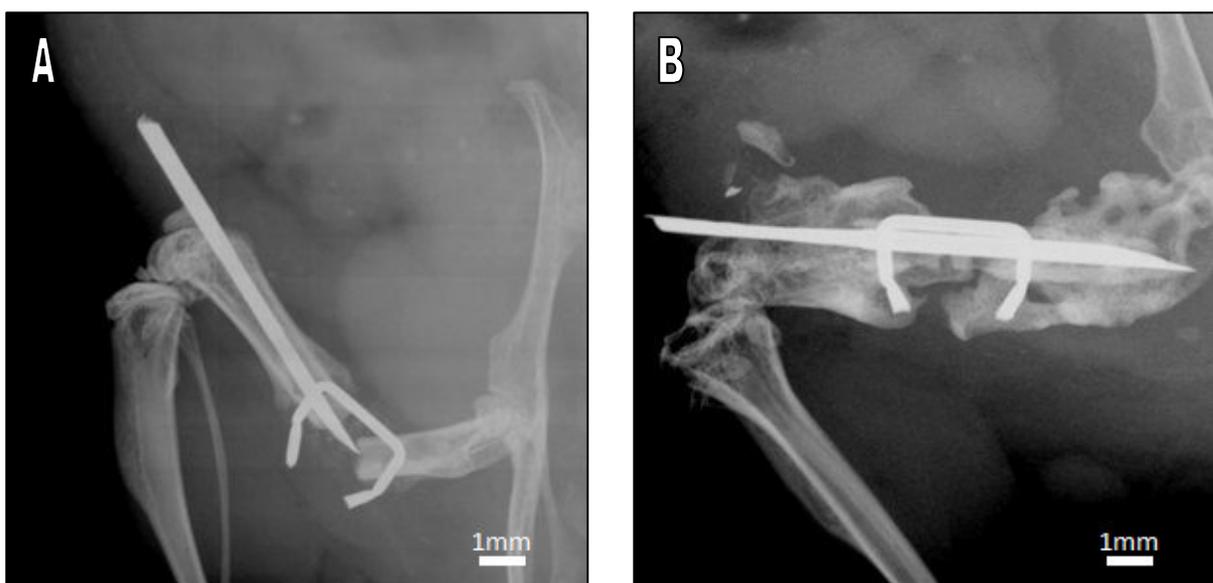


Abb. 11: Röntgenkontrolle nach 2 Wochen (14d) mit Pin-Dislokation (A) und nach 3 Wochen (21d) mit Osteolyse bei Infektion (B)

Die Explantation der Knochen konnte komplikationslos durchgeführt werden (Abb. 12). Alle Versuchstiere wurden makroskopisch auf mögliche vorhandene Pathologien der Beinmuskulatur, der femoro-tibialen sowie femoro-patellaren Gelenkverhältnisse und des Zustands des Pin-Clip-Implantats untersucht. Es gab keine Hinweise auf eine Patella-, Knie- sowie Hüftgelenksluxation oder Muskelatrophien, welche den Ausschluss betroffener Versuchstiere zur Folge gehabt hätten. Weiterhin wurde das Pin-Clip-Implantat auf eine korrekte Position und einen stabilen Sitz überprüft, was bei allen in die Studie aufgenommenen Tieren ohne Beanstandung war.

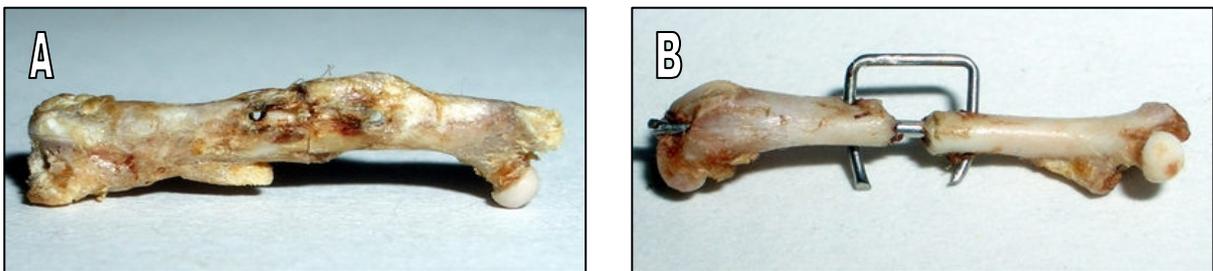


Abb. 12: **A:** Explantation eines Femurs mit 0,25mm Segmentdefekt (Union-Gruppe) nach 70d, Pin-Clip-Implantat entfernt, Femur nicht in Studie einbezogen; **B:** Explantation eines Femurs mit 1,8mm Segmentdefekt (Non-Union-Gruppe) nach 70d, Interfragmentäres Bindegewebe entfernt, Pin-Clip-Implantat belassen, Femur nicht in Studie einbezogen

4.2 Konventionelle Röntgenbilder

Zur Beurteilung des operativen Eingriffs und des Heilungsverlaufs wurden postoperativ und vor Explantation des Femurs Röntgenkontrollaufnahmen angefertigt (Abb. 13). Diese dienten der Kontrolle, ob die Osteosynthese richtig implantiert wurde und ob diese bis zur Explantation stabil fixiert war. Des Weiteren ermöglichten die Aufnahmen, den Heilungsverlauf radiologisch im zeitlichen Verlauf zu betrachten.

In den ersten drei postoperativen Tagen war radiologisch keine Reaktion zu erkennen, nach sieben Tagen erschien erstes röntgendichtes Kallusgewebe im Röntgenbild im periostalen Bereich. Nach 14 Tagen fand sich mineralisiertes Kallusgewebe auch im Bereich des Frakturspalts sowie zwischen den Knochenfragmenten und nach 21 Tagen war die Ausbildung eines mineralisierten periostalen Kallus in beiden Gruppen deutlich zu erkennen. Nach 28 Tagen hatte sich der Kallus in beiden Gruppen nochmals vergrößert und die Röntgendichte weiter zugenommen. In der Union-Gruppe war nach

28 Tagen eine knöcherner Überbrückung, in der Non-Union-Gruppe dagegen kein knöcherner Kontakt zwischen den beiden Fragmenten zu erkennen. Nach 70 Tagen zeigte sich in der Union-Gruppe ein radiologisch geheilter Knochen, in der Non-Union-Gruppe dagegen zwei nicht verbundene abgerundete Fragmente des Femurs.

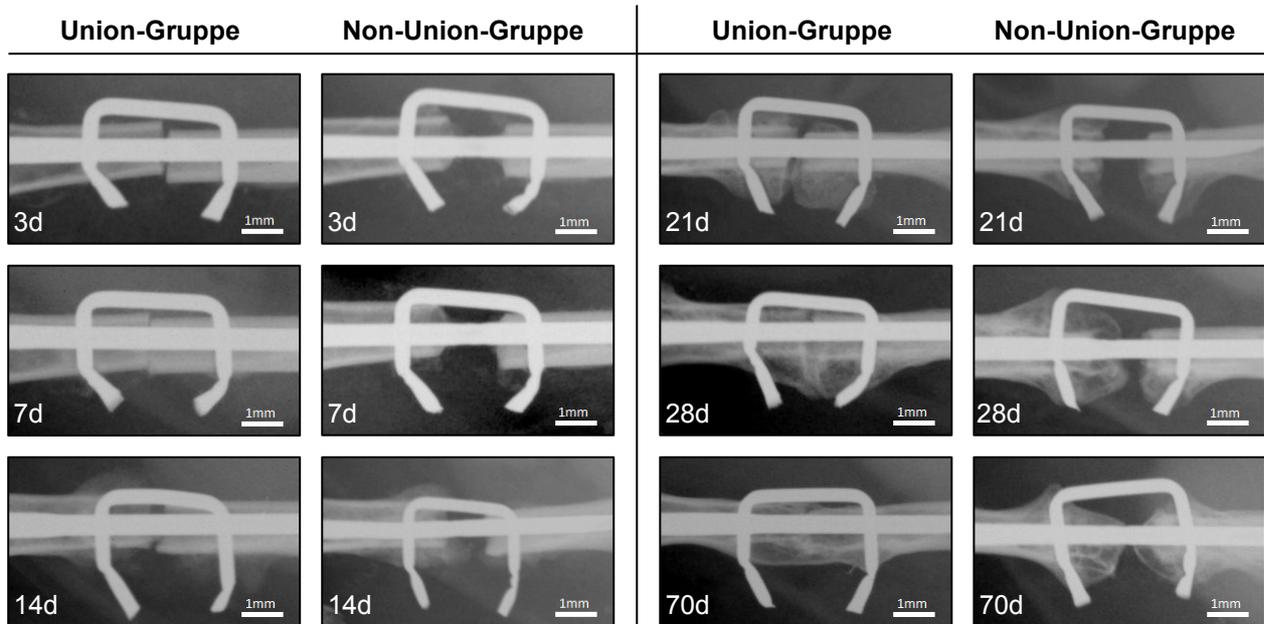


Abb. 13: Röntgenbilder der Pin-Clip-Osteosynthese der Union-Gruppe (0,25mm) und der Non-Union-Gruppe (1,8mm) nach 3, 7, 14, 21, 28 und 70 Tagen post-OP

4.3 Computer-Tomografie

Die Union-Gruppe zeigte computertomografisch eine sekundäre Frakturheilung mit Ausbildung eines periostalen Kallus, Überbrückung des Frakturspalts an Tag 28 und Remodeling bis Tag 70. Im Gegensatz dazu heilte die Non-Union-Gruppe bis Tag 70 nicht aus und zeigte eine geringere Kallusausbildung. Sie präsentierte sich nach 70 Tagen als atrophe Pseudarthrose mit fehlender knöcherner Überbrückung des Frakturspalts und abgerundeten Knochenenden. Die Markhöhle des Femurs war zur Fraktur hin knöchern verschlossen, mit Ausnahme der Austrittspunkte des intramedullären Pins. In der Union-Gruppe nahm der mineralisierte Kallus ab Tag 21 zu, erreichte seinen höchsten Wert nach 28 Tagen und fiel nach 70 Tagen im Rahmen des Remodeling wieder ab. In der Non-Union-Gruppe zeichnete sich entsprechender Verlauf

ebenfalls ab, es bildete sich aber im Vergleich dazu, bezogen auf die Größe des Non-Union-Frakturspalts, eine signifikant geringere Menge von mineralisiertem Kallus aus. Die Analyse des Polar Moment of Inertia als Indikator der mechanischen Stabilität stieg ebenfalls in beiden Gruppen ab Tag 21 an, war aber in der Non-Union-Gruppe signifikant geringer als in der Union-Gruppe.

Nachfolgend sind exemplarisch für alle Versuchsgruppen Scout-Aufnahmen des Micro-CT's dargestellt (Abb. 14). Auf diesen Abbildungen lässt sich analog zu den konventionellen Röntgenaufnahmen der Frakturheilungsverlauf verfolgen.

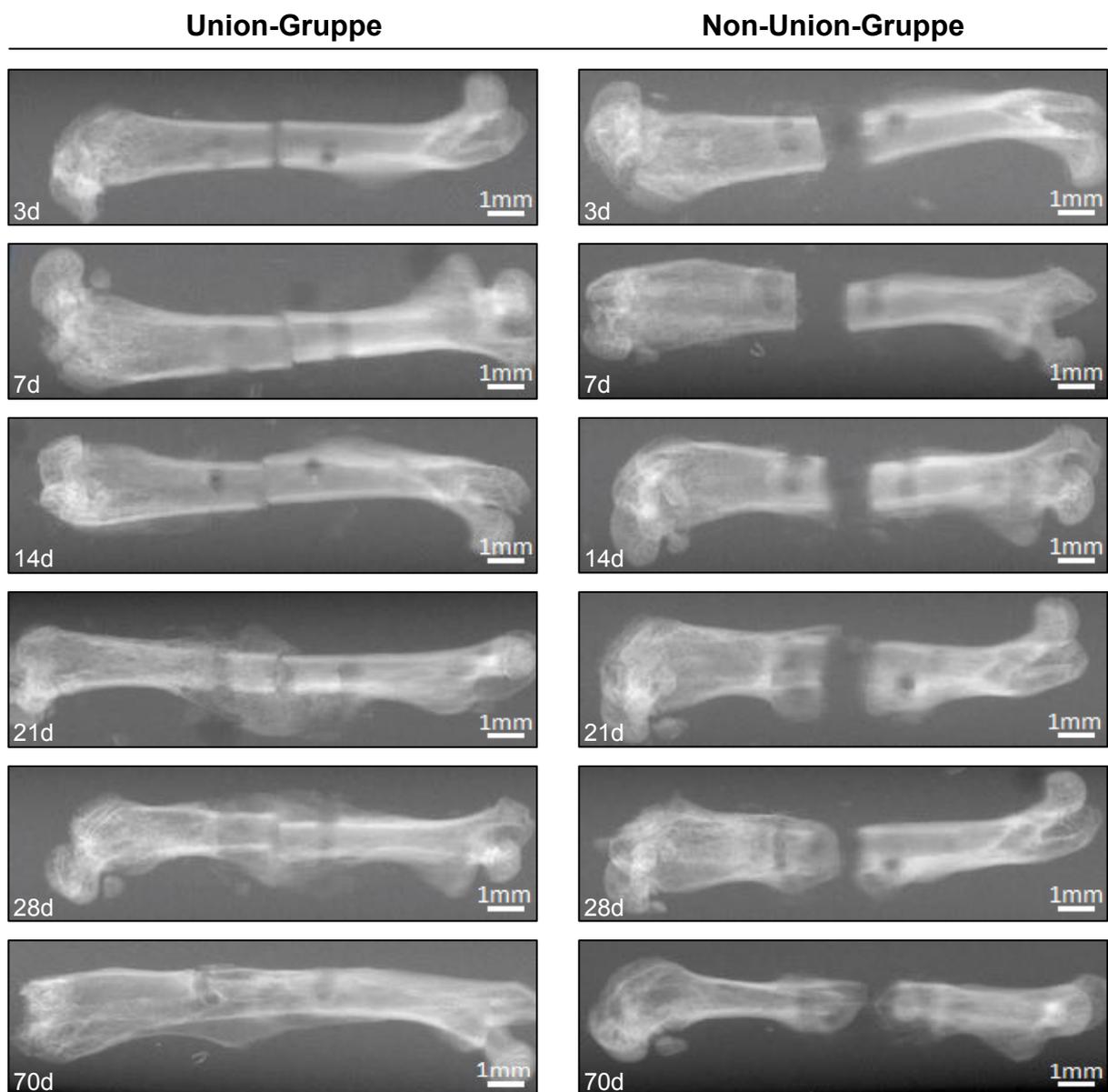


Abb. 14: Micro-CT-Scouts nach Entfernung der Pin-Clip-Osteosynthese der Versuchstiere der Union-Gruppe (0,25mm) und der Non-Union-Gruppe (1,8mm) nach 3, 7, 14, 21, 28 und 70 Tagen

Des Weiteren sind dreidimensionale Rekonstruktionen der CT-Scans der Union-Gruppe und der Non-Union-Gruppe erstellt worden (Abb. 15).

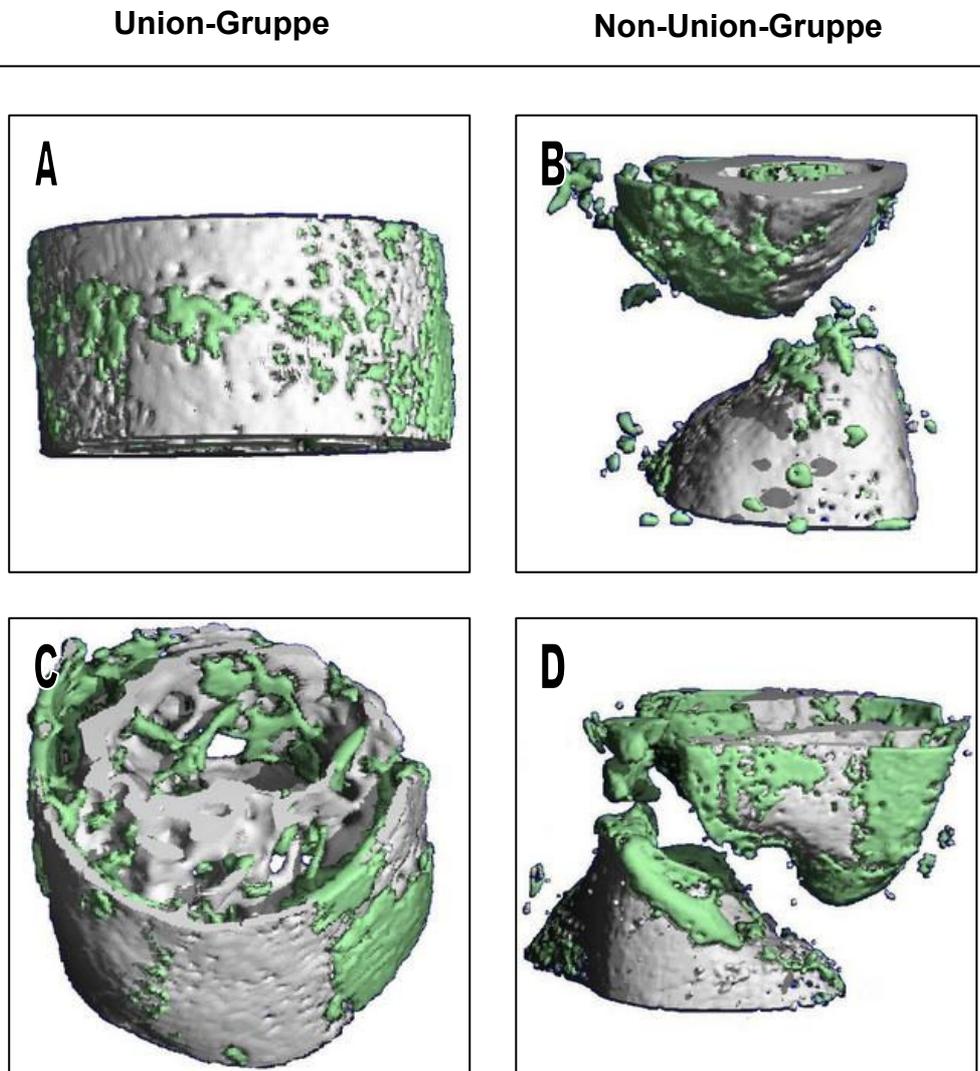


Abb. 15: Dreidimensionale Rekonstruktion von repräsentativen Micro-CT's der Union-Gruppe (A,C) und Non-Union-Gruppe (B,D) nach 70 Tagen. In der Union-Gruppe kam es zur Ausheilung des 0,25mm Segmentdefekts, während sich in der Non-Union-Gruppe eine atrophe Pseudarthrose entwickelte. Geflechtknochen ist grün und lamellärer Knochen weiß dargestellt.

4.3.1 Größe des Frakturspalts

Die Größe des Frakturspalts nahm im zeitlichen Verlauf in beiden Versuchsgruppen ab. Nach 70 Tagen war der Frakturspalt in der Union-Gruppe vollständig verheilt, während

in der Non-Union-Gruppe keine Vereinigung der Frakturfragmente stattgefunden hatte und alle Versuchstiere einen bestehenden Frakturspalt aufwiesen (Abb. 16).

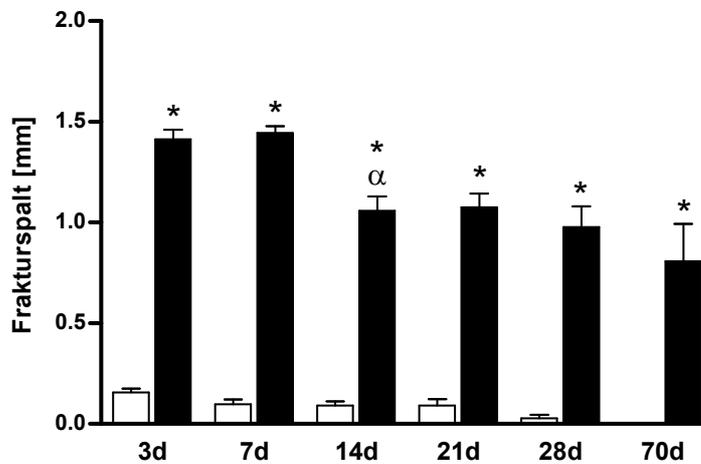


Abb. 16: Mikro-tomografisch ermittelte Größe des Frakturspalts in [mm] in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 3, 7, 14, 21, 28 und 70 Tagen; Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Union; ^α $p < 0,05$ vs. 7d;

4.3.2 Überbrückung des Frakturspalts

Zu keinem Zeitpunkt konnte in der Non-Union-Gruppe mikro-tomografisch eine knöcherner Überbrückung des Frakturspalts festgestellt werden. In der Union-Gruppe zeigte sich hingegen eine knöcherner Überbrückung des Frakturspalts bei 33% (2/6) der Versuchstiere nach 21 Tagen, bei 50% (3/6) der Versuchstiere nach 28 Tagen und bei 100% (6/6) der Versuchstiere nach 70 Tagen (Abb. 17).

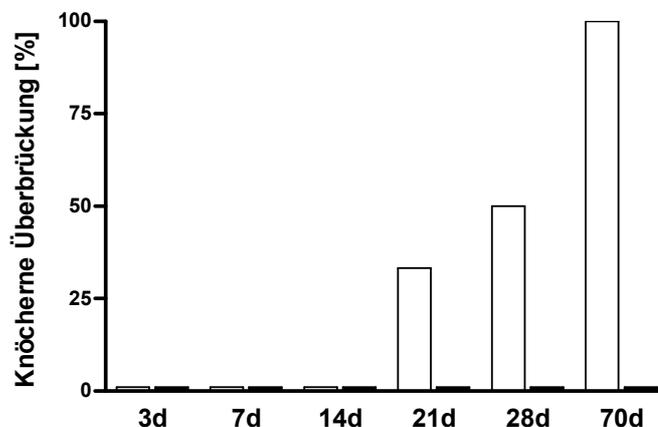


Abb. 17: Prozentualer Anteil der Versuchstiere mit knöcherner Überbrückung des Fraktur-Spalts in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 3, 7, 14, 21, 28 und 70 Tagen

4.3.3 Kallusvolumen

Das Volumen des mineralisierten Kallus im Frakturspalt nahm im zeitlichen Verlauf in beiden Versuchsgruppen zunächst langsam zu, verzeichnete nach 21 Tagen einen leichten Anstieg und erreichte nach 28 Tagen in beiden Versuchsgruppen den höchsten Wert, um anschließend im Rahmen des Remodeling wieder abzufallen. Die Non-Union-Gruppe zeigte im Verlauf eine signifikant geringere Kallusausbildung als die Union-Gruppe (Abb. 18).

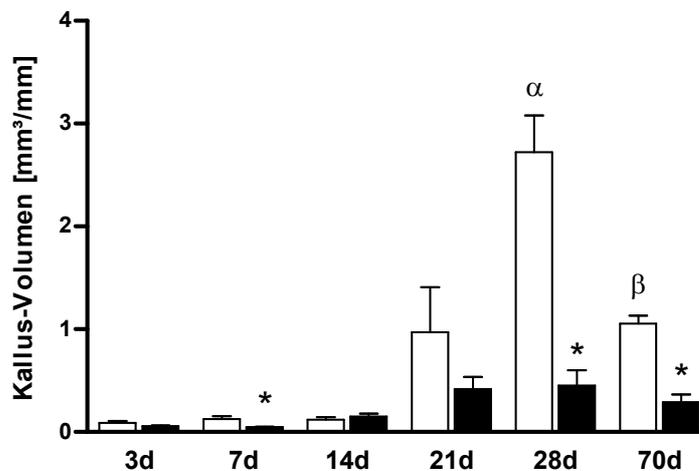


Abb. 18: Mikro-tomografisch bestimmtes Kallus-Volumen in [mm³] pro [mm] Frakturspalt in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen); Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Union; ^α $p < 0,05$ vs. 21d; ^β $p < 0,05$ vs. 28d

4.3.4 Polar Moment of Inertia

Das Polar Moment of Inertia nahm im zeitlichen Verlauf ab Tag 21 in der Union-Gruppe zu, erreichte nach 28 Tagen den höchsten Wert und fiel im Anschluss wieder ab. In der Non-Union-Gruppe blieb das PMOI nach einem Anstieg bis zum höchsten Wert nach 21 Tagen nahezu konstant. Das PMOI der Non-Union-Gruppe war nach sieben, 28 und 70 Tagen signifikant geringer als das PMOI der Union-Gruppe (Abb. 19).

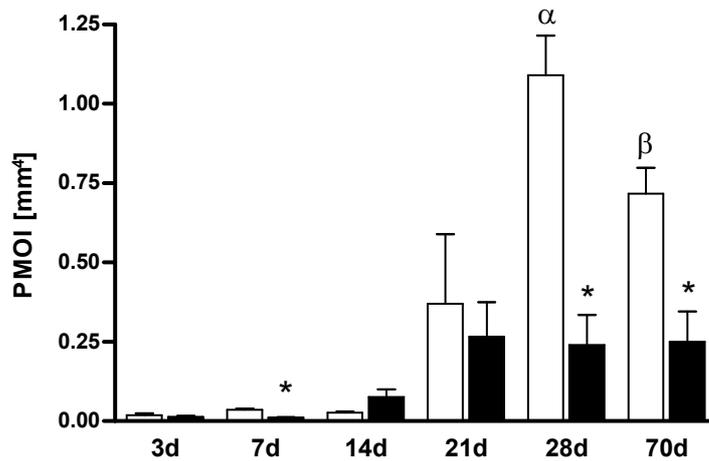


Abb. 19: Mikro-tomografisch ermitteltes Polar Moment of Inertia in [mm⁴] in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 3, 7, 14, 21, 28 und 70 Tagen; Mittelwert \pm SEM; *p<0,05 vs. Union; ^αp<0,05 vs. 21d; ^βp<0,05 vs. 28d;

4.4 Histologie

4.4.1 Trichromfärbung nach Masson-Goldner

Die histologische Untersuchung zeigte sowohl in der Union-Gruppe als auch der Non-Union-Gruppe den Ablauf einer sekundären Frakturheilung mit Ausbildung eines Kallus durch enchondrale Knochenbildung vor allem im Bereich des Frakturspalts sowie durch intramembranöse Knochenbildung ausgehend vom reaktiv verdickten Periost in geringer Entfernung vom Frakturspalt. Die Kallusbildung war überwiegend periostal zu beobachten, während sich endostal nur eine geringe Kallusbildung zeigte. Im Bereich der Clip-Eintrittspunkte zeigte sich in beiden Versuchsgruppen eine verstärkte periostale Kallusreaktion mit enchondraler Knochenbildung.

In der Union-Gruppe kam es bei allen Versuchstieren zur Ausbildung des bindegewebigen Kallus und Knorpelproliferation, zur vollständigen knöchernen Überbrückung des Frakturspalts und zum Remodeling des Knochens und damit zur kompletten Heilung der Fraktur nach 70 Tagen. In der Non-Union-Gruppe konnte eine verminderte Kallusbildung beobachtet werden. Die Femora zeigten nach 70 Tagen die Ausbildung einer atrophischen Pseudarthrose mit resorbierten und abgerundeten Knochenenden und einem zum Frakturspalt hin verschlossenen Markraum. Der Osteotomiespalt bestand zum Ende des Untersuchungszeitraums aus Muskelgewebe und fibrösem Bindegewebe ohne Knorpel- oder Knocheninseln (Abb. 20 und Abb. 21).

Union-Gruppe

Non-Union-Gruppe

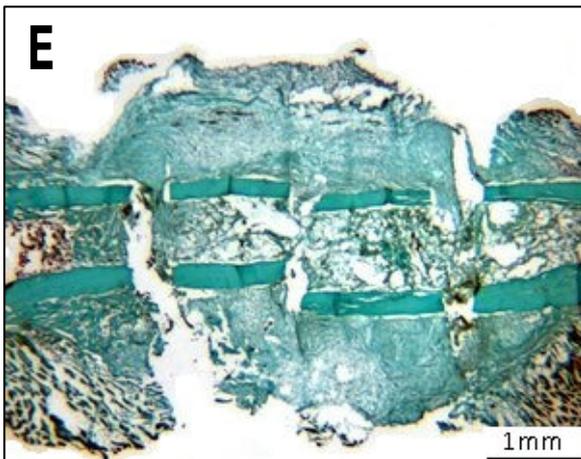
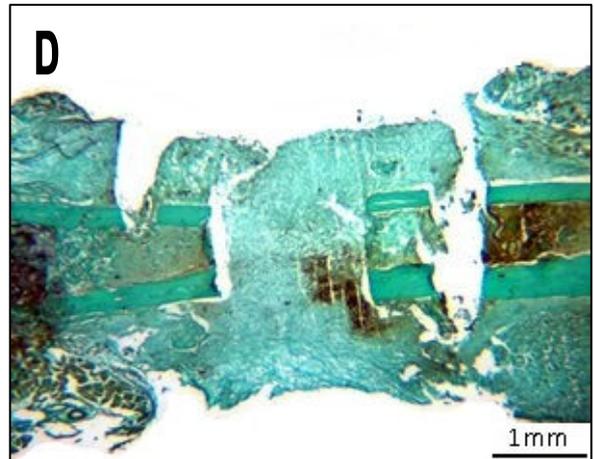
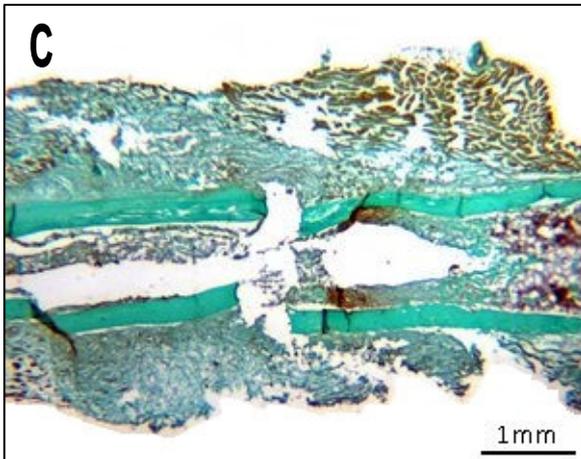
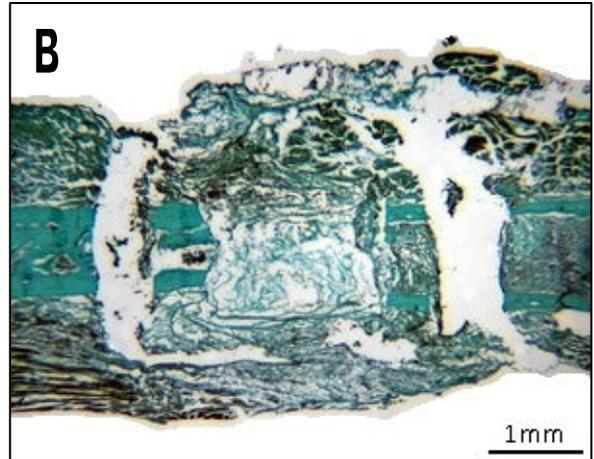
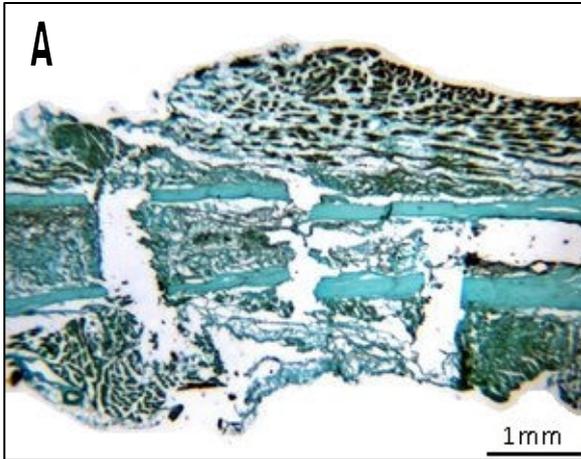


Abb. 20: Repräsentative Masson-Goldner Schnitte der Union-Gruppe und der Non-Union-Gruppe nach 3 Tagen (A,B), 7 Tagen (C,D), und 14 Tagen (E,F)

Union-Gruppe

Non-Union-Gruppe

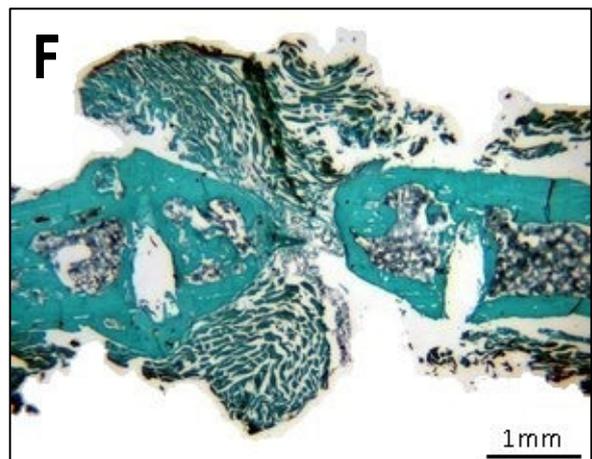
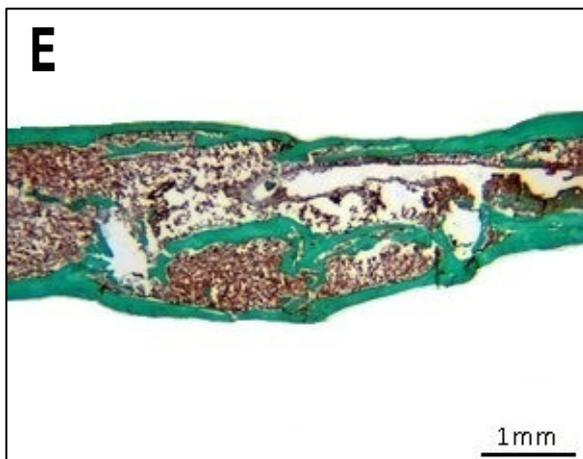
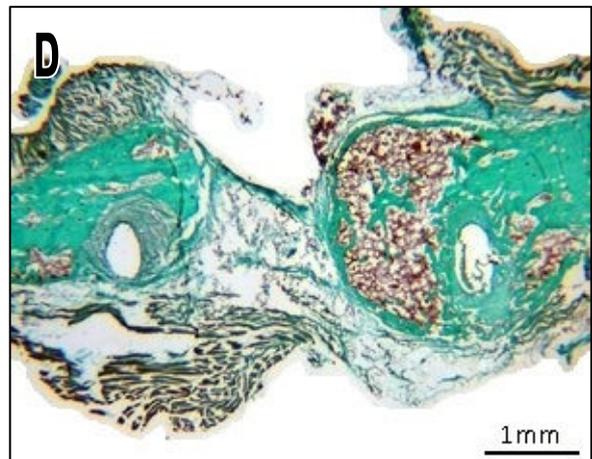
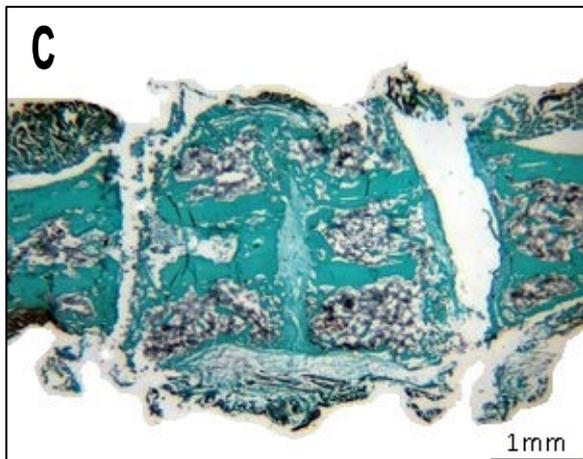
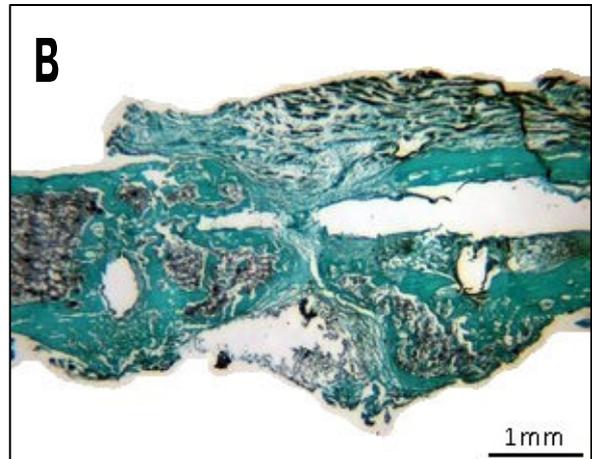
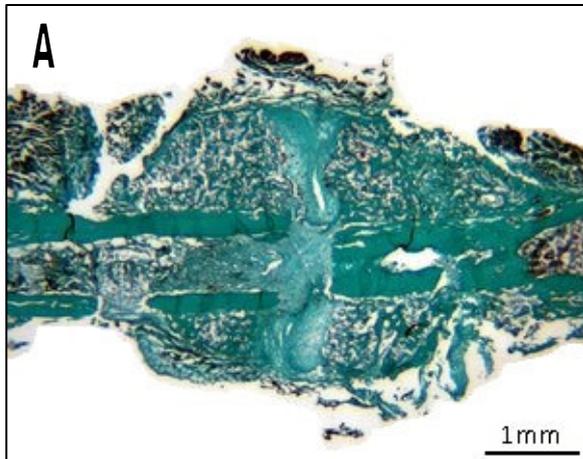


Abb. 21: Repräsentative Masson-Goldner Schnitte der Union-Gruppe und Non-Union-Gruppe nach 21 Tagen (A,B), 28 Tagen (C,D), und 70 Tagen (E,F)

4.4.1.1 Größe des Frakturspalts

Die Größe des Frakturspalts nahm im zeitlichen Verlauf in beiden Versuchsgruppen tendenziell ab. Nach 70 Tagen war der Frakturspalt in der Union-Gruppe histologisch vollständig knöchern überbrückt und verheilt, während in der Non-Union-Gruppe zu keinem Zeitpunkt eine Überbrückung bzw. Vereinigung der Frakturfragmente stattgefunden hatte und alle Versuchstiere einen bestehenden, nicht überbrückten Frakturspalt aufwiesen (Abb. 22).

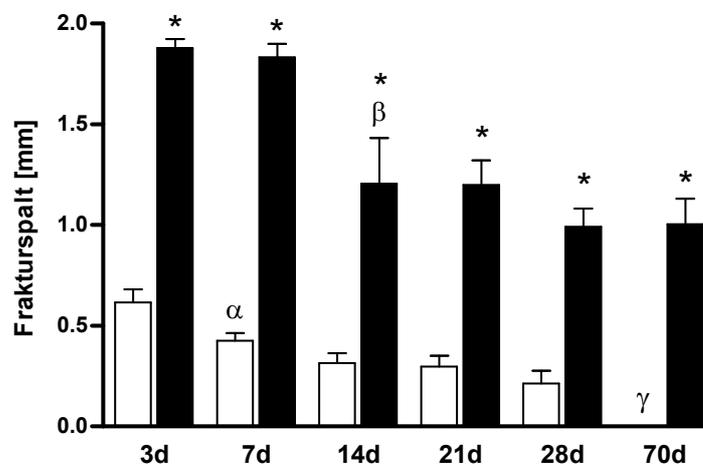


Abb. 22: Histologisch ermittelte Größe des Frakturspalts in [mm] in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 3, 7, 14, 21, 28 und 70 Tagen; Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Union; ^α $p < 0,05$ vs. 3d; ^β $p < 0,05$ vs. 7d; ^γ $p < 0,05$ vs. 28d;

4.4.1.2 Healing Score

Durch knorpelige und knöcherne Überbrückung des Frakturspalts nahm der Healing Score in der Union-Gruppe im zeitlichen Verlauf zu, bis alle Femora vollständig verheilt waren. In der Non-Union-Gruppe konnte keine erfolgreiche Frakturheilung nachgewiesen werden. Lediglich bei einem der Versuchstiere kam es nach 28 Tagen zu einer knorpeligen Überbrückung des Frakturspalts an einer Kortikalis des Schnittpräparats des Femurs (Abb. 23).

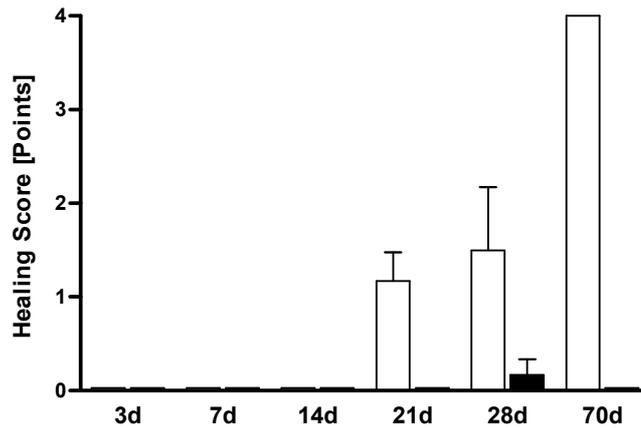


Abb. 23: Histologisch ermittelte Punktwerte des Healing Score in [Punkte(0-4)] in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 3, 7, 14, 21, 28 und 70 Tagen; Mittelwert \pm SEM

4.4.1.3 Periostale Kallusfläche

Die periostale Kallusfläche nahm in beiden Versuchsgruppen zunächst zu, blieb über einen gewissen Zeitraum auf konstantem Niveau und fiel im Rahmen des Remodeling anschließend wieder ab. In der Union-Gruppe bildete sich hierbei eine signifikant größere periostale Kallusfläche aus, als dies in der Non-Union-Gruppe der Fall war (Abb. 24).

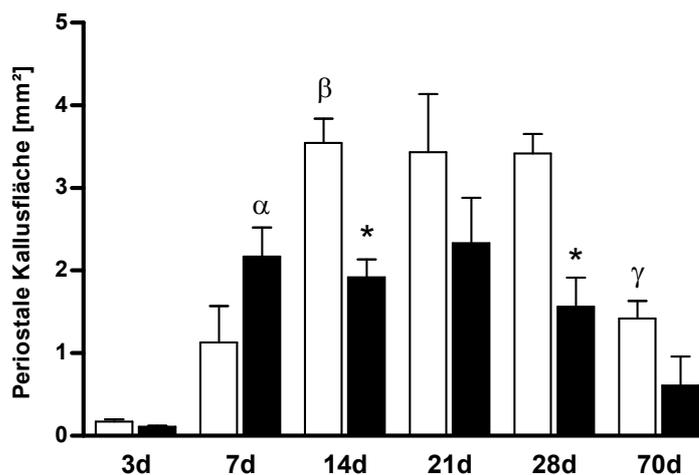


Abb. 24: Histologisch ermittelte periostale Kallusfläche in [mm²] in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 3, 7, 14, 21, 28 und 70 Tagen; Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Union; $\alpha p < 0,05$ vs. 3d; $\beta p < 0,05$ vs. 7d; $\gamma p < 0,05$ vs. 28d;

4.4.1.4 Kallusdurchmesser

Der histologisch bestimmte Kallusdurchmesser in Frakturspaltmitte erreichte in der Union-Gruppe nach 14 Tagen seinen höchsten Wert und blieb bis zum einsetzenden Remodeling-Prozess ab Tag 28 nahezu konstant. In der Non-Union-Gruppe war der Kallusdurchmesser in Frakturspaltmitte nach sieben Tagen maximal ausgeprägt und fiel anschließend ab, bis kein periostaler Kallus mehr in der Mitte des Frakturspalts nach 70 Tagen erfasst werden konnte. Der Kallusdurchmesser in Frakturspaltmitte war in der Union-Gruppe nach 14, 21, 28 und 70 Tagen signifikant höher als in der Non-Union-Gruppe (Abb. 25).

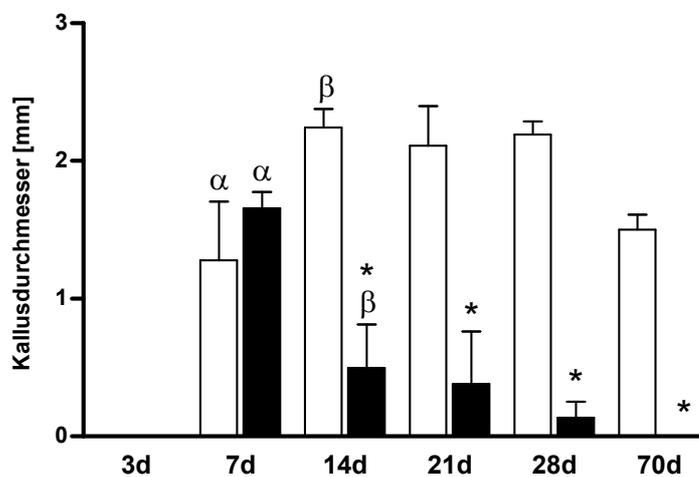


Abb. 25: Histologisch ermittelter Kallusdurchmesser in Frakturmitte in [mm] in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 3, 7, 14, 21, 28 und 70 Tagen; Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Union; $^{\alpha}p < 0,05$ vs. 3d; $^{\beta}p < 0,05$ vs. 7d;

4.4.1.5 Zusammensetzung des periostalen Kallus

4.4.1.5.1 Bindegewebe

Der bindegewebige Anteil des periostalen Kallus nahm im zeitlichen Verlauf in beiden Versuchsgruppen ab, bis nach 70 Tagen kein Bindegewebe mehr nachgewiesen werden konnte. Nach 14 Tagen zeigte sich in der Union-Gruppe ein signifikant höherer Anteil an Bindegewebe als in der Non-Union-Gruppe. Ansonsten fanden sich keine Unterschiede im Bindegewebeanteil zwischen den beiden Versuchsgruppen (Abb. 26).

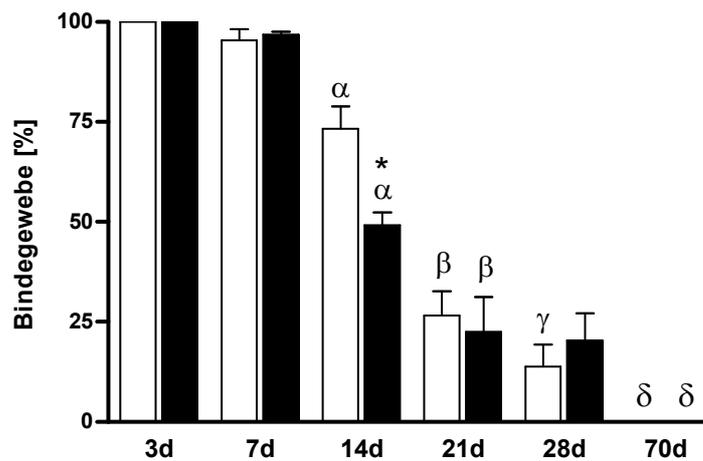


Abb. 26: Bindegewebiger Anteil des periostalen Kallus in [%] in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 3, 7, 14, 21, 28 und 70 Tagen; Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Union; ^α $p < 0,05$ vs. 7d; ^β $p < 0,05$ vs. 14d; ^γ $p < 0,05$ vs. 21d; ^δ $p < 0,05$ vs. 28d

4.4.1.5.2 Knorpel

Der knorpelige Anteil des periostalen Kallus nahm im zeitlichen Verlauf der Frakturheilung in beiden Versuchsgruppen ab Tag 7 zu und anschließend bis zum Ende des Untersuchungszeitraums wieder ab. Zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Union-Gruppe und Non-Union-Gruppe (Abb. 27).

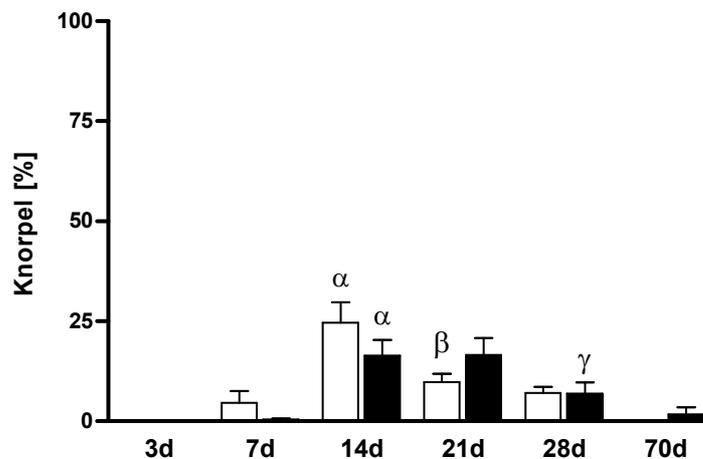


Abb. 27: Knorpeliger Anteil des periostalen Kallus in [%] in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 3, 7, 14, 21, 28 und 70 Tagen; Mittelwert \pm SEM; ^α $p < 0,05$ vs. 7d; ^β $p < 0,05$ vs. 14d; ^γ $p < 0,05$ vs. 21d;

4.4.1.5.3 Knochen

Der knöcherner Anteil des periostalen Kallus nahm im zeitlichen Verlauf in beiden Versuchsgruppen kontinuierlich zu, bis der Kallus nach 70 Tagen in der Union-Gruppe komplett und in der Non-Union-Gruppe nahezu vollständig aus Knochen zusammengesetzt war. Nur nach 14 Tagen zeigte sich in der Non-Union-Gruppe ein signifikant höherer Anteil an Knochen am periostalen Kallus im Vergleich zur Union-Gruppe. Ansonsten fand sich kein Unterschied im prozentualen Knochenanteil zwischen beiden Gruppen (Abb. 28).

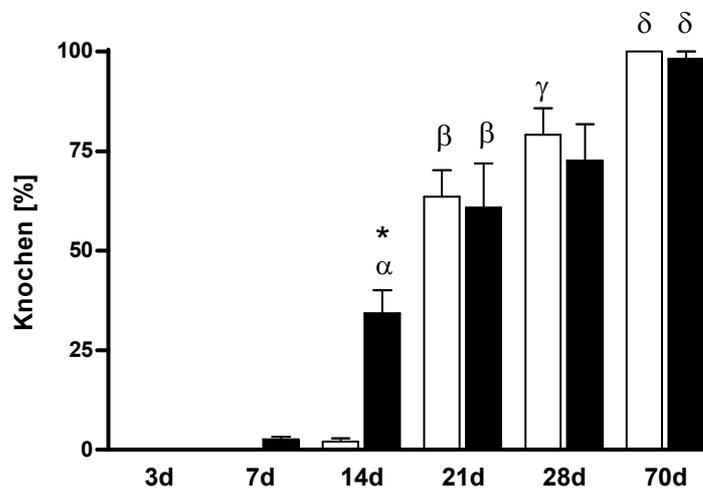


Abb. 28: Knöcherner Anteil des periostalen Kallus in [%] in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 3, 7, 14, 21, 28 und 70 Tagen; Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Union; ^α $p < 0,05$ vs. 7d; ^β $p < 0,05$ vs. 14d; ^γ $p < 0,05$ vs. 21d; ^δ $p < 0,05$ vs. 28d

4.4.2 Immunhistologische CD-31 Färbung

Die quantitative Analyse der Gefäßdichte konnte in keinem der untersuchten Bereiche des Kallus während der Frakturheilung einen signifikanten Unterschied zwischen der Union-Gruppe und der Non-Union-Gruppe aufzeigen, mit einer Ausnahme im endostalen Kallusbereich 14 Tage nach Erzeugung des Segmentdefekts. Beide Versuchsgruppen zeigten im Verlauf der Frakturheilung eine zeitlich und räumlich vergleichbare Vaskularisierung.

4.4.2.1 Angiogenese im gesamten Kallus

Die Anzahl der Gefäße im gesamten Kallus stieg in beiden Versuchsgruppen während der Frakturheilung initial signifikant an und erreichte nach sieben Tagen ihren Höchstwert in beiden Versuchsgruppen. Anschließend nahm Gefäßanzahl in beiden Versuchsgruppen wieder ab und erreichte ein vergleichbares nahezu konstantes Niveau. Auch wenn die Non-Union-Gruppe nach 14 Tagen über eine höhere Gefäßdichte innerhalb des gesamten Kallusbereichs verfügte, konnte zu keinem Zeitpunkt während der Frakturheilung ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Gefäßanzahl zwischen der Union-Gruppe und der Non-Union-Gruppe ausgemacht werden (Abb. 29).

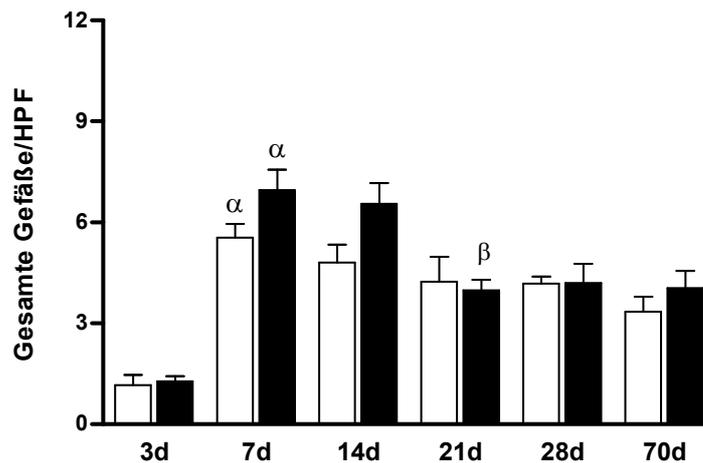


Abb. 29: Anzahl der Gefäße pro High-Power-Field im gesamten Kallus in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 3, 7, 14, 21, 28 und 70 Tagen; Mittelwert \pm SEM; ^α $p < 0,05$ vs. 3d; ^β $p < 0,05$ vs. 14d

Nachfolgende histologische Abbildungen stellen repräsentative Schnitte von immunhistologisch gefärbten CD31-Femur-Präparaten der Union-Gruppe und der Non-Union-Gruppe während der Frakturheilung nach 14 Tagen dar (Abb. 30).

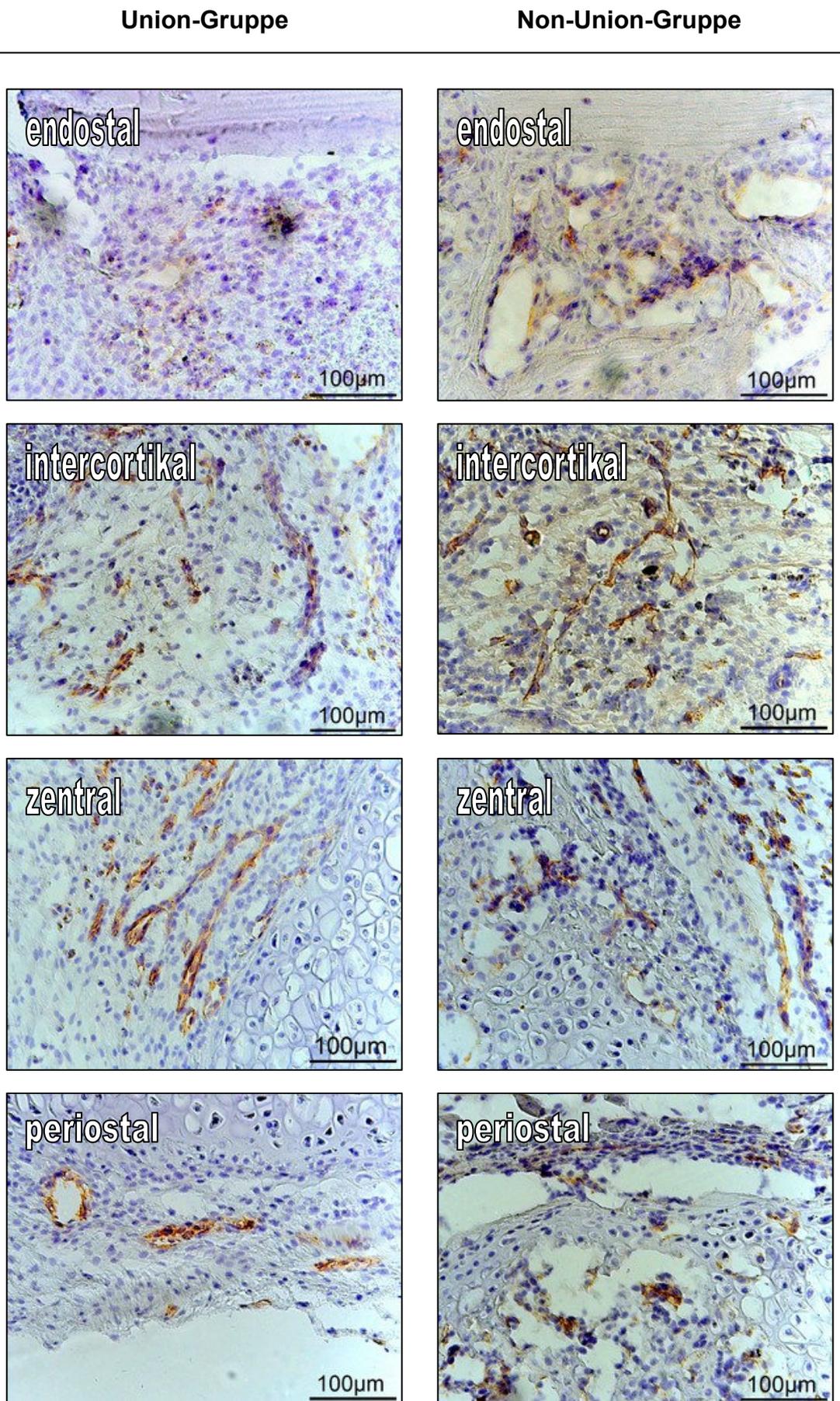


Abb. 30: CD31-Schnitte der Union-Gruppe und der Non-Union-Gruppe nach 14 Tagen. Markierte Gefäße/Endothelzellen stellen sich braun gefärbt dar.

4.4.2.2 Endostale Angiogenese

Die Gefäßdichte im endostalen Bereich des Kallus zeigte während der Frakturheilung im zeitlichen Verlauf in der Non-Union-Gruppe initial eine geringfügige Zunahme zwischen Tag 3 und Tag 7 mit anschließendem Verbleib der Werte auf einem konstanten Niveau. In der Union-Gruppe war die endostale Gefäßdichte im Kallus zunächst nach 14 Tagen niedriger, erreichte jedoch nach 21 Tagen mit der Non-Union-Gruppe vergleichbare Werte (Abb. 31).

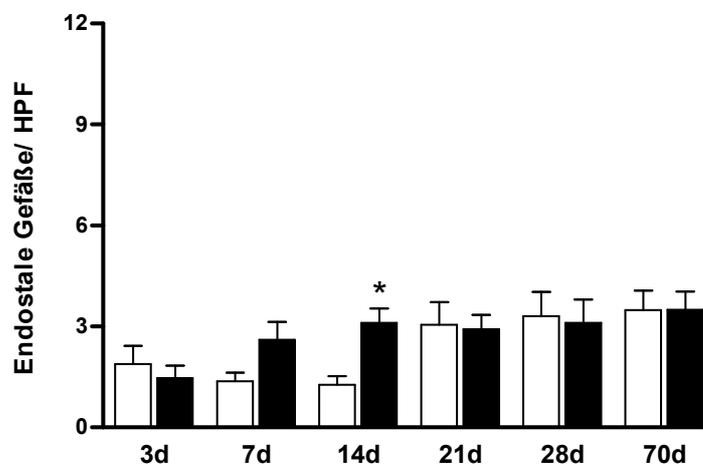


Abb. 31: Anzahl der Gefäße pro High-Power-Field im endostalen Kallus in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 3, 7, 14, 21, 28 und 70 Tagen; Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Union

4.4.2.3 Periostale Angiogenese

Die Anzahl der periostalen Gefäße im Kallus stieg während der Frakturheilung in beiden Versuchsgruppen initial zwischen Tag 3 und Tag 7 signifikant an, erreichte nach sieben Tagen den höchsten Wert und nahm anschließend in beiden Versuchsgruppen wieder ab. Zu keinem Zeitpunkt war ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der periostalen Gefäßdichte im Kallus zwischen der Union-Gruppe und der Non-Union-Gruppe nachzuweisen (Abb. 32).

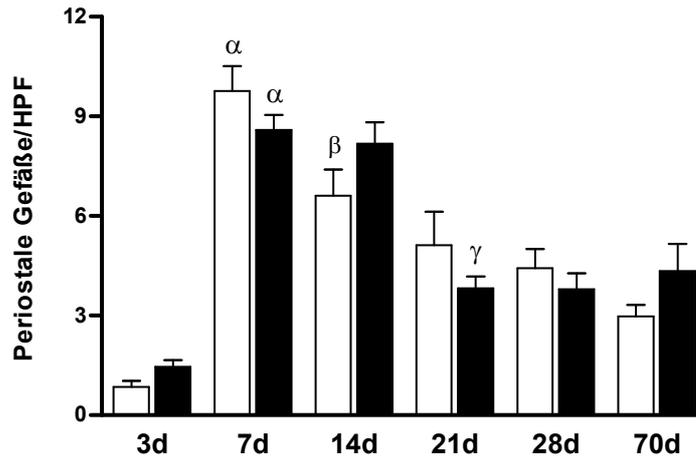


Abb. 32: Anzahl der GefäÙe pro High-Power-Field im periostalen Kallus in der Union-Gruppe (weiÙe Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 3, 7, 14, 21, 28 und 70 Tagen; Mittelwert \pm SEM; $^{\alpha}$ p<0,05 vs. 3d; $^{\beta}$ p<0,05 vs. 7d; $^{\gamma}$ p<0,05 vs. 14d

4.4.2.4 Zentrale Angiogenese

Die Anzahl der GefäÙe im zentralen Kallus stieg in beiden Gruppen initial zwischen Tag 3 und Tag 7 signifikant an, erreichte nach sieben Tagen den Höchstwert und nahm anschließend wieder ab. Auch wenn die Non-Union-Gruppe über eine tendenziell höhere zentrale GefäÙdichte nach 14 Tagen verfügte, konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen der Union-Gruppe und der Non-Union-Gruppe ausgemacht werden. Nach 70 Tagen konnten aufgrund des abgeschlossenen Heilungsverlaufs keine zentralen GefäÙe ausgezählt werden (Abb. 33).

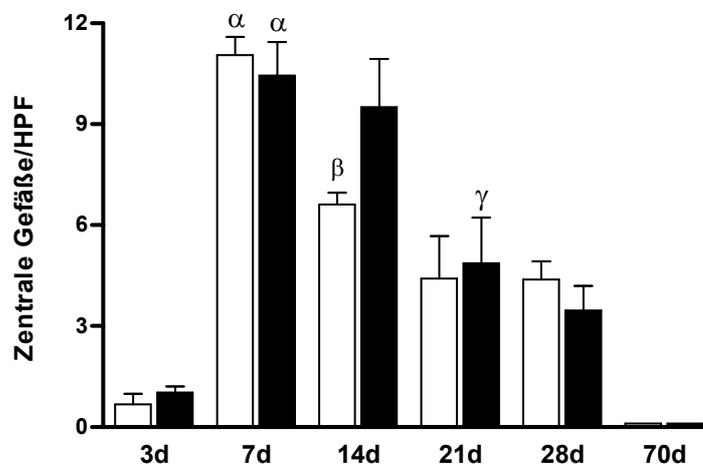


Abb. 33: Anzahl der GefäÙe pro High-Power-Field im zentralen Kallus in der Union-Gruppe (weiÙe Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 3, 7, 14, 21, 28 und 70 Tagen; Mittelwert \pm SEM; $^{\alpha}$ p<0,05 vs. 3d; $^{\beta}$ p<0,05 vs. 7d; $^{\gamma}$ p<0,05 vs. 14d

4.4.2.5 Intercortikale Angiogenese

Die intercortikale Gefäßdichte nahm in beiden Versuchsgruppen initial zwischen Tag 3 und Tag 7 signifikant zu und erreichte nach sieben Tagen in der Non-Union und nach 14 Tagen in der Union den höchsten Wert. Anschließend konnte eine leichte Abnahme der Gefäßdichte beobachtet werden, bis sich in beiden Gruppen ab Tag 21 eine vergleichbare intercortikale Gefäßdichte einstellte. Zu keinem Zeitpunkt lag ein signifikanter Unterschied zwischen der Union- und Non-Union-Gruppe vor. Nach 70 Tagen konnten aufgrund der Heilung der Femora der Union-Gruppe keine intercortikalen Gefäße ausgezählt werden (Abb. 34).

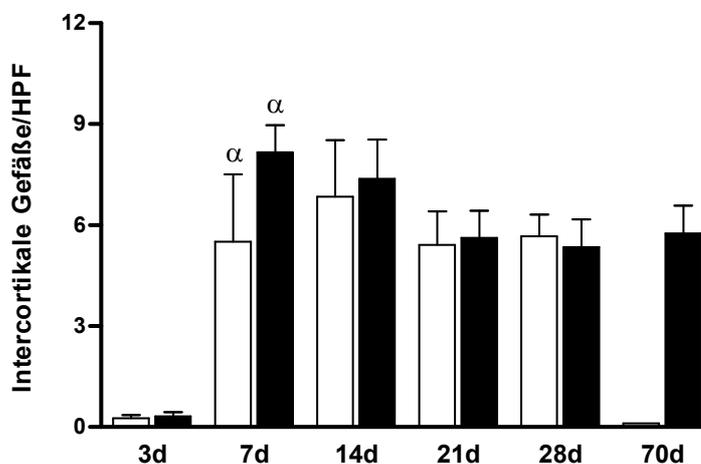


Abb. 34: Anzahl der Gefäße pro High-Power-Field im intercortikalen Kallus in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 3, 7, 14, 21, 28 und 70 Tagen; Mittelwert \pm SEM; ^α $p < 0,05$ vs. 3d

4.5 Western Blot

Die Proben der Union-Gruppe nach sieben Tagen wurden aufgrund der geringen Menge des erhaltenen Kallusmaterials zusammengeführt und als eine Probe analysiert. Da sich dadurch nur ein Wert zum Zeitpunkt nach sieben Tagen ergab, konnte kein T-Test zwischen den Versuchsgruppen nach sieben Tagen durchgeführt werden.

4.5.1 VEGF

In beiden Versuchsgruppen fiel die VEGF-Expression nach initial höheren Werten nach sieben Tagen zum Zeitpunkt nach 14 Tagen signifikant ab. Die Western-Blot-Analyse zeigte in der Non-Union-Gruppe zu allen Zeitpunkten eine tendenziell höhere Expression von VEGF als in der Union-Gruppe. Nach 14 Tagen war die Expression von VEGF in der Non-Union-Gruppe signifikant größer als in der Union-Gruppe (Abb. 35).

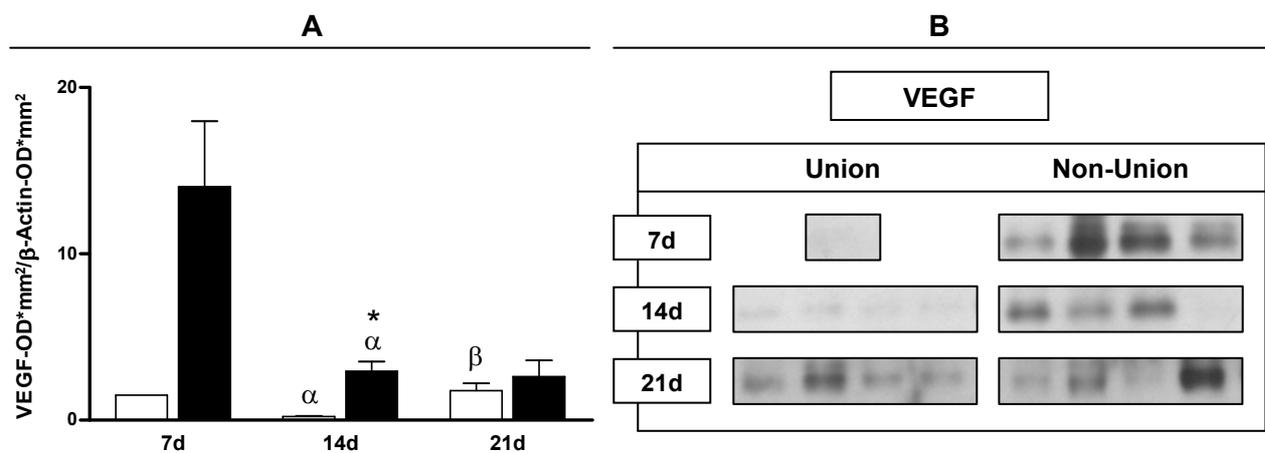


Abb. 35: **A:** VEGF-Expression im Kallus in $[\text{OD} \cdot \text{mm}^2 / \beta\text{-Actin-OD} \cdot \text{mm}^2]$ in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 7, 14 und 21 Tagen; Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Union; $^{\alpha}p < 0,05$ vs. 7d; $^{\beta}p < 0,05$ vs. 14d; **B:** Western-Blot-Expression von VEGF in der Union-Gruppe und der Non-Union-Gruppe nach 7, 14 und 21 Tagen als geschwärzte Banden auf einem Röntgenfilm

4.5.2 BMP-2

Die Expression von BMP-2 nahm im zeitlichen Verlauf in der Union-Gruppe tendenziell gering zu und in der Non-Union-Gruppe leicht ab. Nach sieben Tagen leicht erhöhter Expression von BMP-2 in der Non-Union-Gruppe zeigte sich nach 14 und 21 Tagen eine signifikant niedrigere BMP-2-Expression in der Non-Union-Gruppe im Vergleich zur Union-Gruppe (Abb. 36).

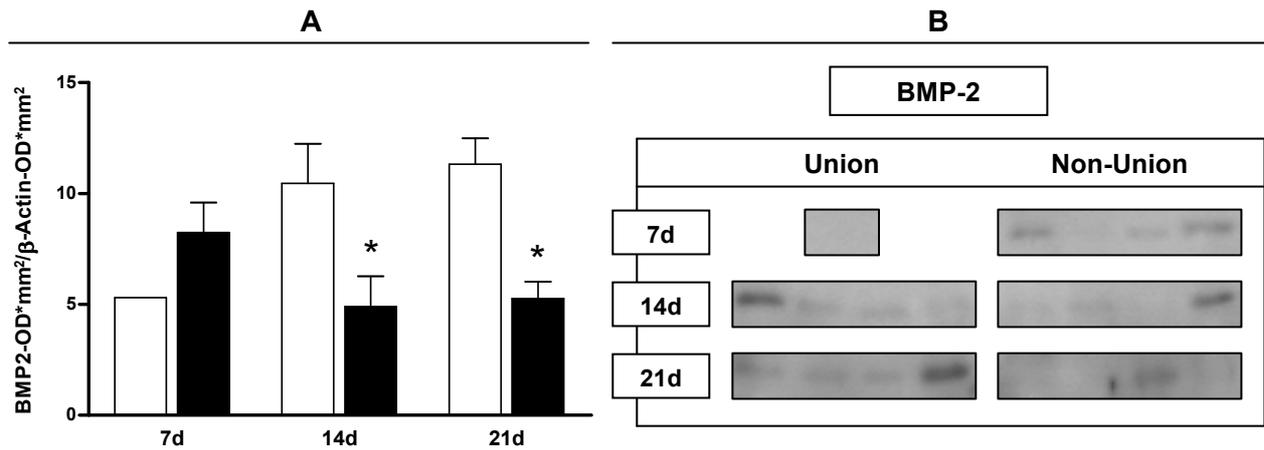


Abb. 36: **A:** BMP-2-Expression im Kallus in $[\text{OD} \cdot \text{mm}^2 / \beta\text{-Actin-OD} \cdot \text{mm}^2]$ in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 7, 14 und 21 Tagen; Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Union; **B:** Western-Blot-Expression von BMP-2 in der Union-Gruppe und der Non-Union-Gruppe nach 7, 14 und 21 Tagen als geschwärzte Banden auf einem Röntgenfilm

4.5.3 BMP-4

Die BMP-4-Expression zeigte sich im zeitlichen Verlauf in der Non-Union-Gruppe konstant, während in der Union-Gruppe eine geringe Abnahme der BMP-4-Expression nach 21 Tagen im Vergleich zu den früheren Zeitpunkten zu beobachten war. Nach 14 Tagen war die Expression von BMP-4 in der Non-Union-Gruppe signifikant niedriger als in der Union-Gruppe (Abb. 37).

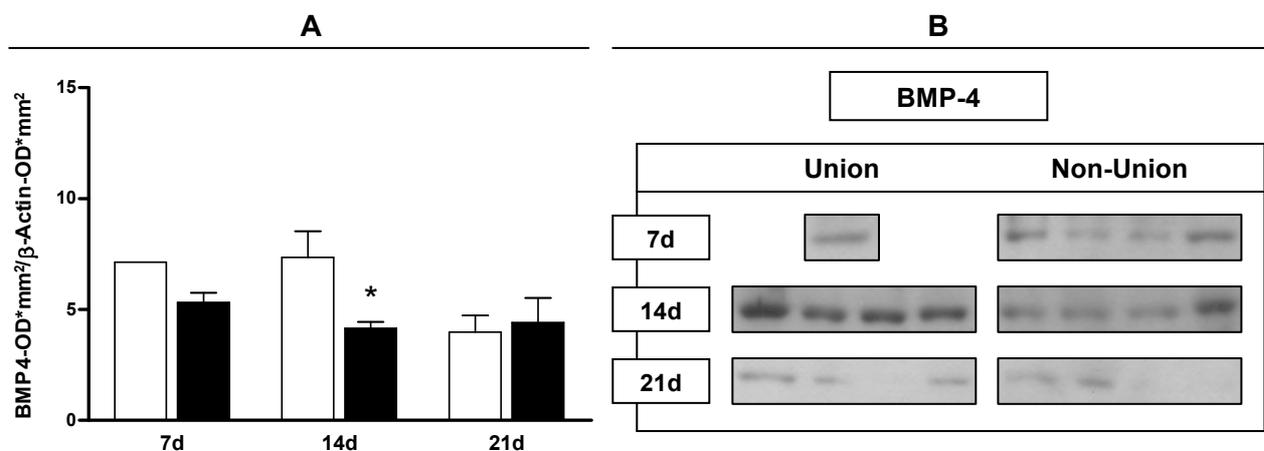


Abb. 37: **A:** BMP-4-Expression im Kallus in $[\text{OD} \cdot \text{mm}^2 / \beta\text{-Actin-OD} \cdot \text{mm}^2]$ in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 7, 14 und 21 Tagen; Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Union; **B:** Western-Blot-Expression von BMP-4 in der Union-Gruppe und der Non-Union-Gruppe nach 7, 14 und 21 Tagen als geschwärzte Banden auf einem Röntgenfilm

4.5.4 PCNA

In der Union-Gruppe zeigte sich nach 14 Tagen eine signifikant höhere PCNA-Expression als nach sieben und 21 Tagen. In der Non-Union-Gruppe waren im Verlauf trotz leicht erhöhtem Wert nach sieben Tagen keine signifikanten Unterschiede in der PCNA-Expression zwischen den einzelnen Zeitpunkten nachzuweisen. Nach 14 Tagen war die Expression von PCNA signifikant höher in der Union-Gruppe als in der Non-Union-Gruppe, was auf eine höhere Proliferationsrate in der Union-Gruppe zu diesem Zeitpunkt hinweist (Abb.38).

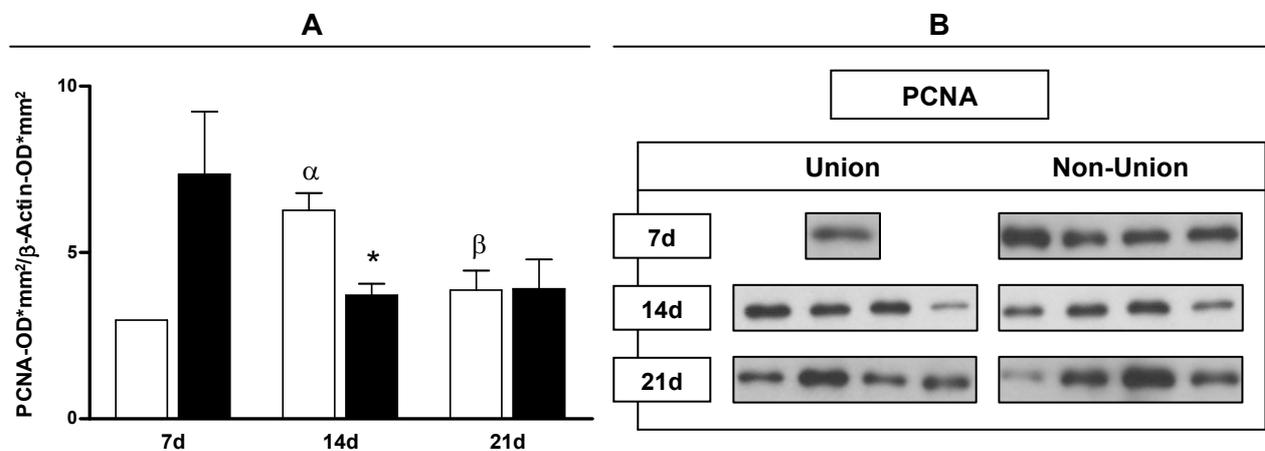


Abb. 38: **A:** PCNA-Expression im Kallus in [$\text{OD} \cdot \text{mm}^2 / \beta\text{-Actin-OD} \cdot \text{mm}^2$] in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 7, 14 und 21 Tagen; Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Union; ^α $p < 0,05$ vs. 7d; ^β $p < 0,05$ vs. 14d **B:** Western-Blot-Expression von PCNA in der Union-Gruppe und der Non-Union-Gruppe nach 7, 14 und 21 Tagen als geschwärzte Banden auf einem Röntgenfilm

4.5.5 Sclerostin

Die Sclerostin-Expression war in der Union-Gruppe zu allen Zeitpunkten in etwa gleich stark ausgeprägt. In der Non-Union-Gruppe nahm die Sclerostin-Expression von Tag 7 auf Tag 14 zu und verblieb nach 21 Tagen auf diesem Niveau. Hierbei war die Sclerostin-Expression in der Non-Union-Gruppe nach 14 und 21 Tagen tendenziell höher als in der Union-Gruppe, jedoch ohne statistisch signifikanten Unterschied (Abb. 39).

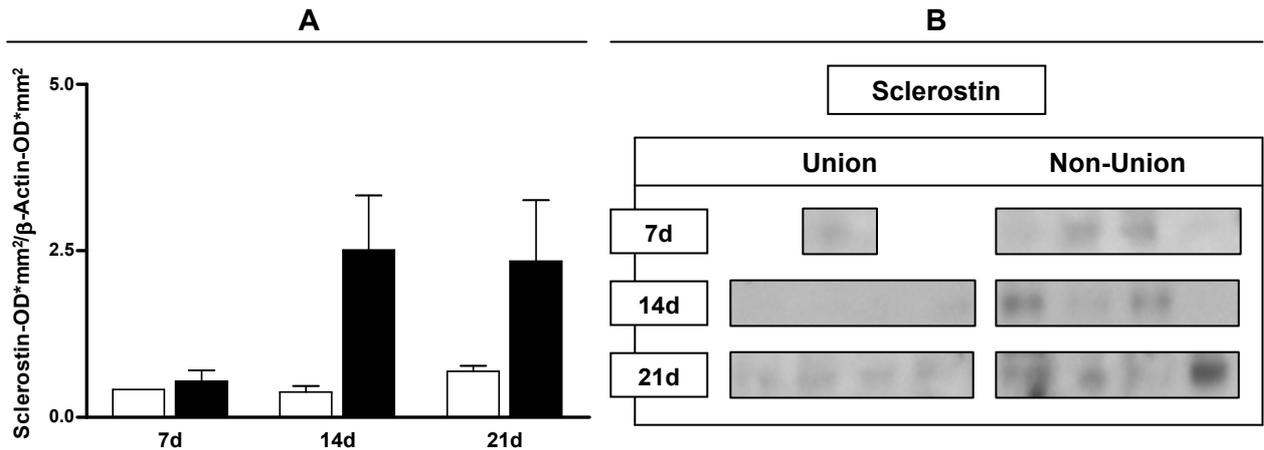


Abb. 39: **A:** Sclerostin-Expression im Kallus in $[\text{OD} \cdot \text{mm}^2 / \beta\text{-Actin-OD} \cdot \text{mm}^2]$ in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 7, 14 und 21 Tagen; Mittelwert \pm SEM; **B:** Western-Blot-Expression von Sclerostin in der Union-Gruppe und der Non-Union-Gruppe nach 7, 14 und 21 Tagen als geschwärzte Banden auf einem Röntgenfilm

4.5.6 Noggin

Die Noggin-Expression war in der Union-Gruppe zu allen Zeitpunkten in etwa gleich stark ausgeprägt, während sie in der Non-Union-Gruppe kontinuierlich zunahm. Die Expression von Noggin war in der Non-Union-Gruppe nach 14 und 21 Tagen höher als in der Union-Gruppe, jedoch ohne statistisch signifikanten Unterschied (Abb. 40).

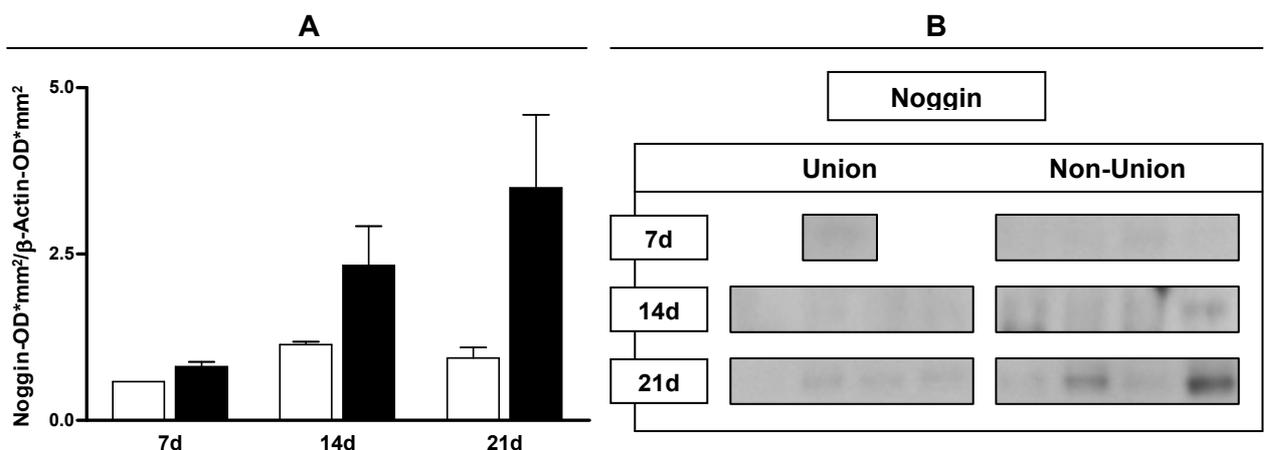


Abb. 40: **A:** Noggin-Expression im Kallus in $[\text{OD} \cdot \text{mm}^2 / \beta\text{-Actin-OD} \cdot \text{mm}^2]$ in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 7, 14 und 21 Tagen; Mittelwert \pm SEM; **B:** Western-Blot-Expression von Noggin in der Union-Gruppe und der Non-Union-Gruppe nach 7, 14 und 21 Tagen als geschwärzte Banden auf einem Röntgenfilm

4.5.7 Ang-1

Die Ang-1-Expression war nach 14 Tagen signifikant höher in der Non-Union-Gruppe als in der Union-Gruppe. Nach sieben und 21 Tagen konnte keine Expression von Ang-1 nachgewiesen werden (Abb. 41).

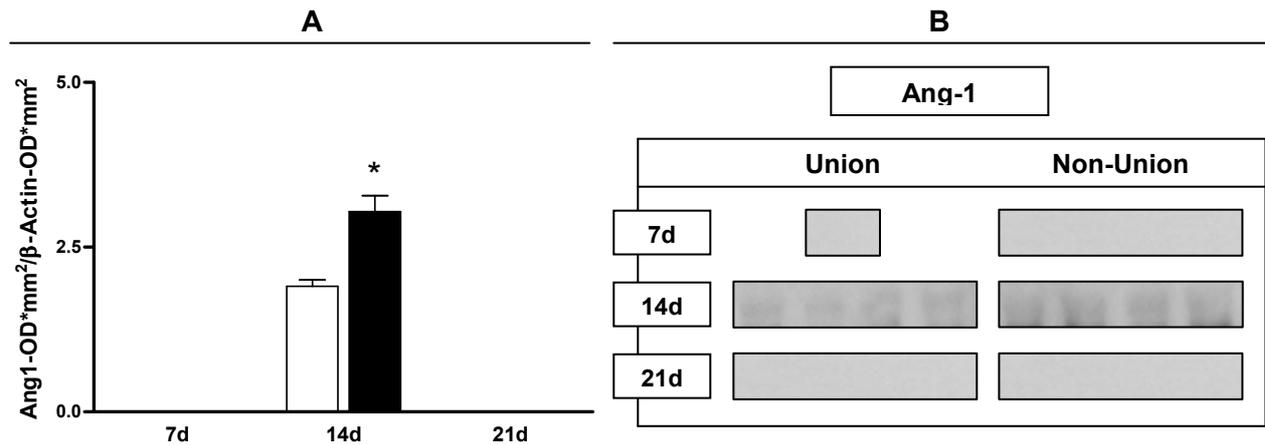


Abb. 41: **A:** Ang-1-Expression im Kallus in [OD*mm²/β-Actin-OD*mm²] in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 7, 14 und 21 Tagen; Mittelwert ± SEM; *p<0,05 vs. Union; **B:** Western-Blot-Expression von Ang-1 in der Union-Gruppe und der Non-Union-Gruppe nach 7, 14 und 21 Tagen als geschwärzte Banden auf einem Röntgenfilm

4.5.8 Tie2

Die Expression von Tie-2 nahm im zeitlichen Verlauf in beiden Versuchsgruppen bis zu Tag 21 zu. Sie war zu allen Zeitpunkten in der Non-Union-Gruppe leicht höher als in der Union-Gruppe, jedoch konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Union-Gruppe und der Non-Union-Gruppe nachgewiesen werden (Abb. 42).

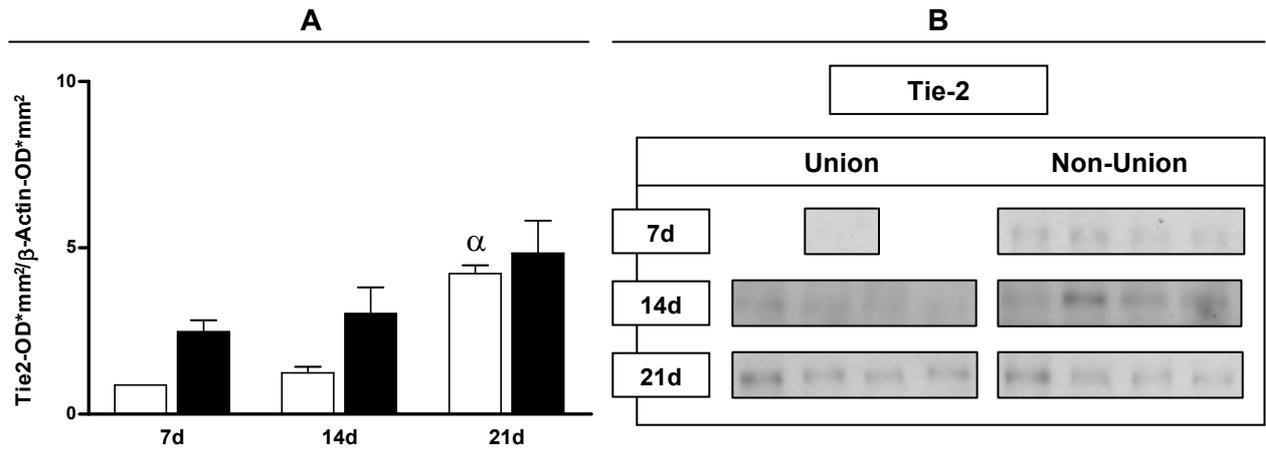


Abb. 42: **A:** Tie-2-Expression im Kallus in $[\text{OD} \cdot \text{mm}^2 / \beta\text{-Actin-OD} \cdot \text{mm}^2]$ in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 7, 14 und 21 Tagen; Mittelwert \pm SEM; ^α $p < 0,05$ vs. 14d; **B:** Western-Blot-Expression von Tie-2 in der Union-Gruppe und der Non-Union-Gruppe nach 7, 14 und 21 Tagen als geschwärzte Banden auf einem Röntgenfilm

4.5.9 MMP13

Die Expression von MMP13 nahm in der Union-Gruppe im Verlauf von Tag 14 bis Tag 21 signifikant zu, während sie in der Non-Union-Gruppe nach einem Anstieg an Tag 14 nach 21 Tagen erneut abfiel. Die MMP13-Expression war nach 14 Tagen in der Non-Union-Gruppe signifikant höher als in der Union-Gruppe (Abb. 43).

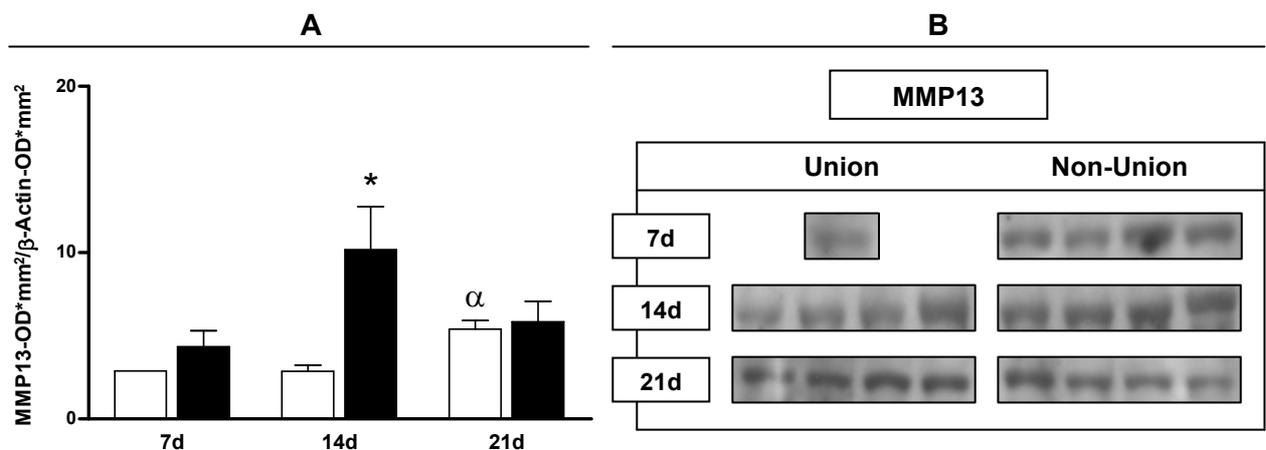


Abb. 43: **A:** MMP13-Expression im Kallus in $[\text{OD} \cdot \text{mm}^2 / \beta\text{-Actin-OD} \cdot \text{mm}^2]$ in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 7, 14 und 21 Tagen; Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Union; ^α $p < 0,05$ vs. 14d; **B:** Western-Blot-Expression von MMP13 in der Union-Gruppe und der Non-Union-Gruppe nach 7, 14 und 21 Tagen als geschwärzte Banden auf einem Röntgenfilm

4.5.10 Cyr61

Die Expression von Cyr61 war nach 14 Tagen in der Union-Gruppe signifikant höher als in der Non-Union-Gruppe. Sowohl nach sieben Tagen als auch nach 21 Tagen konnte keine Expression von Cyr61 nachgewiesen werden (Abb. 44).

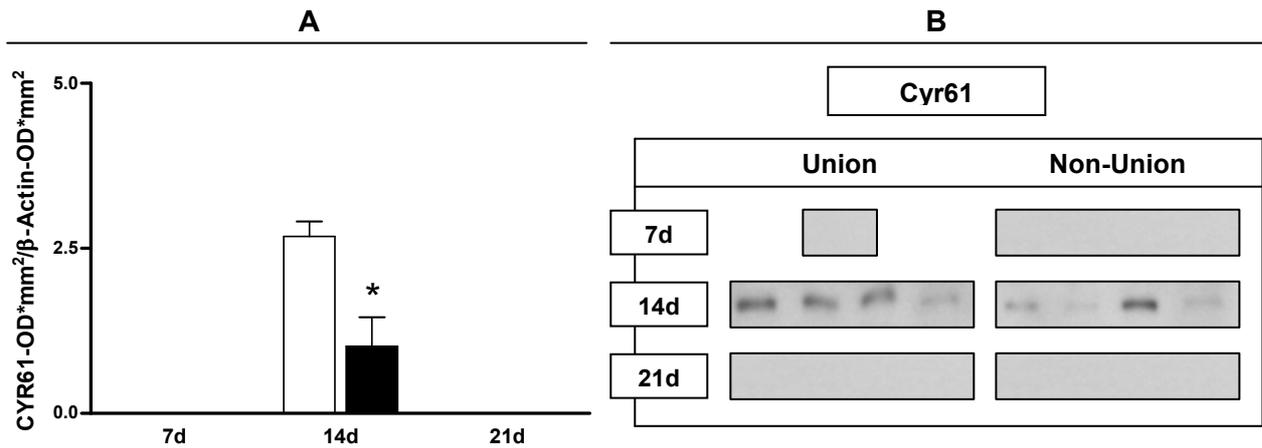


Abb. 44: **A:** Cyr61-Expression im Kallus in [OD*mm²/β-Actin-OD*mm²] in der Union-Gruppe (weiße Säulen) und der Non-Union-Gruppe (schwarze Säulen) nach 7, 14 und 21 Tagen; Mittelwert ± SEM; *p<0,05 vs. Union; **B:** Western-Blot-Expression von Cyr61 in der Union-Gruppe und der Non-Union-Gruppe nach 7, 14 und 21 Tagen als geschwärzte Banden auf einem Röntgenfilm

Ergebnisse

	3d		7d		14d		21d		28d		70d	
	Union	Non-Union	Union	Non-Union	Union	Non-Union	Union	Non-Union	Union	Non-Union	Union	Non-Union
Micro-CT												
Frakturspalt-Größe [mm]	0,16±0,02	1,41±0,05	0,10±0,02	1,44±0,03	0,09±0,02	1,06±0,07	0,09±0,03	1,08±0,07	0,03±0,02	0,99±0,10	0,00±0,00	0,81±0,18
Kallusvolumen [mm³]/[mm]	0,09±0,02	0,06±0,01	0,13±0,03	0,05±0,00	0,12±0,02	0,15±0,02	0,97±0,43	0,42±0,12	2,72±0,36	0,45±0,15	1,05±0,08	0,29±0,07
Polar Moment of Inertia [mm⁴]	0,02±0,00	0,01±0,00	0,04±0,00	0,01±0,00	0,03±0,00	0,08±0,02	0,37±0,22	0,27±0,11	1,09±0,13	0,24±0,09	0,72±0,08	0,25±0,10
Histologie - Trichromfärbung nach Masson-Goldner												
Frakturspalt-Größe [mm]	0,62±0,06	1,88±0,04	0,43±0,04	1,83±0,07	0,31±0,05	1,21±0,23	0,30±0,05	1,20±0,12	0,21±0,06	0,99±0,09	0,00±0,00	1,00±0,13
Healing Score [Points]	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,17±0,31	0,00±0,00	1,50±0,67	0,17±0,17	4,00±0,00	0,00±0,00
Periostale Kallusfläche [mm²]	0,17±0,02	0,11±0,02	1,13±0,44	2,17±0,35	3,54±0,30	1,92±0,22	3,43±0,70	2,33±0,55	3,42±0,23	1,57±0,35	1,42±0,21	0,61±0,35
Kallusdurchmesser [mm]	0,00±0,00	0,00±0,00	1,28±0,43	1,66±0,12	2,24±0,13	0,50±0,32	2,11±0,29	0,38±0,38	2,19±0,10	0,11±0,11	1,50±0,11	0,00±0,00
Zusammensetzung Bindegewebe [%]	100,0±0,00	100,0±0,00	95,34±2,87	96,84±0,68	73,28±5,60	49,23±3,16	26,58±6,06	22,54±8,68	13,82±5,47	20,36±6,80	0,00±0,00	0,00±0,00
Zusammensetzung Knorpel [%]	0,00±0,00	0,00±0,00	4,66±2,87	0,49±0,24	24,65±5,17	16,43±3,91	9,83±2,04	16,59±4,21	7,11±1,47	6,95±2,76	0,00±0,00	1,78±1,78
Zusammensetzung Knochen [%]	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	2,66±0,64	2,07±0,85	34,33±5,71	63,59±6,64	60,87±11,01	79,07±6,73	72,68±9,10	100,0±0,00	98,22±1,77
Histologie - Immunhistologie												
[Gefäße/HPF] Gesamt	1,16±0,31	1,27±0,16	5,54±0,42	6,96±0,61	4,81±0,53	6,56±0,61	4,23±0,74	3,98±0,31	4,17±0,22	4,20±0,57	3,35±0,44	4,05±0,51
[Gefäße/HPF] endostal	1,89±0,53	1,46±0,37	1,36±0,26	2,60±0,54	1,26±0,26	3,11±0,43	3,04±0,68	2,91±0,44	3,31±0,72	3,11±0,69	3,49±0,58	3,50±0,54
[Gefäße/HPF] periostal	0,86±0,18	1,46±0,21	9,76±0,75	8,60±0,45	6,61±0,80	8,18±0,65	5,13±1,01	3,83±0,35	4,43±0,58	3,79±0,48	2,98±0,35	4,34±0,83
[Gefäße/HPF] zentral	0,67±0,31	1,02±0,18	11,96±0,54	10,44±1,01	6,61±0,35	9,50±1,44	4,42±1,26	4,86±1,37	4,39±0,54	3,47±0,73	X	X
[Gefäße/HPF] intercortikal	0,25±0,10	0,31±0,12	5,50±2,00	8,17±0,81	6,85±1,67	7,38±1,17	5,42±0,98	5,63±0,80	5,67±0,65	5,35±0,82	X	5,75±0,83
Western Blot												
VEGF [OD*mm²/β-Actin-OD*mm²]	X	X	1,51±0,00	14,04±3,94	0,07±0,05	2,94±0,58	1,78±0,44	2,61±0,98	X	X	X	X
BMP-2 [OD*mm²/β-Actin-OD*mm²]	X	X	5,3±0,00	8,24±1,35	10,46±1,78	4,90±1,37	11,33±1,16	5,25±0,77	X	X	X	X
BMP-4 [OD*mm²/β-Actin-OD*mm²]	X	X	7,13±0,00	5,32±0,44	7,34±1,19	4,16±0,27	3,98±0,75	4,41±1,11	X	X	X	X
PCNA [OD*mm²/β-Actin-OD*mm²]	X	X	2,97±0,00	7,37±1,87	6,27±0,51	3,72±0,34	3,87±0,58	3,92±0,88	X	X	X	X
Sclerostin[OD*mm²/β-Actin-OD*mm²]	X	X	0,42±0,00	0,55±0,16	0,38±0,09	2,52±0,82	0,69±0,08	2,35±0,91	X	X	X	X
Noggin [OD*mm²/β-Actin-OD*mm²]	X	X	0,58±0,00	0,81±0,07	1,13±0,04	2,33±0,59	0,94±0,16	3,50±1,10	X	X	X	X
Ang-1 [OD*mm²/β-Actin-OD*mm²]	X	X	X	X	1,91±0,1	3,04±0,24	X	X	X	X	X	X
Tie-2 [OD*mm²/β-Actin-OD*mm²]	X	X	0,87±0,00	2,48±0,34	1,24±0,18	3,03±0,78	4,23±0,25	4,85±0,97	X	X	X	X
MMP13 [OD*mm²/β-Actin-OD*mm²]	X	X	2,87±0,00	4,34±0,97	2,86±0,36	10,18±2,59	5,39±0,52	5,85±1,23	X	X	X	X
Cyr61 [OD*mm²/β-Actin-OD*mm²]	X	X	X	X	2,68±0,23	1,02±0,44	X	X	X	X	X	X

Tab. 5: Übersicht über die Ergebnisse von Micro-CT, Histologie und Western Blot; Mittelwert ± SEM

5. Diskussion

5.1 Frakturmodell

Die Operation, Narkose und die postoperative Analgesierung wurden von den Versuchstieren gut vertragen. Trotz der invasiven Operationstechnik konnte man frühzeitig einen physiologischen Bewegungsablauf mit adäquater Belastung beobachten, so dass eine stabile Implantatlage angenommen werden kann. Das gewählte Tiermodell kann ohne Einschränkung als reproduzierbar und zur Beantwortung der Fragestellung als geeignet beurteilt werden.

Der Beobachtungszeitraum wurde so gewählt, dass der Verlauf der Frakturheilung und der Angiogenese großzügig, sowohl in der Frühphase als auch zu einem Endpunkt mit schließlich etablierter atropher Pseudarthrose bzw. vollzogener Frakturheilung, beurteilt werden konnte.

Die Ausbildung der atrophen Pseudarthrose erfolgte auf Basis eines segmentalen Knochen-Defekts, wie dieser häufig zur Erzeugung von Pseudarthrosen auch in anderen Spezies genutzt wurde (Tiedeman et al. 1991; Boyan et al. 1999; Heckman et al. 1999).

Da wir in dieser Studie gezielt die Angiogenese und Vaskularisierung während der Frakturheilung untersuchen wollten, musste ein Frakturmodell zur Anwendung kommen, in welchem die Angiogenese nicht durch das Frakturmodell selbst von vornherein beeinträchtigt ist.

Modelle mit periostalem Stripping oder Kauterisierung des Periosts und damit verbundener Gefäßverletzung durch die Deperiostierung konnten somit nicht eingesetzt werden. Diese mit einer Destruktion des Periosts einhergehenden Frakturmodelle führen zur Ausbildung von atrophen Pseudarthrosen mit einer Beeinträchtigung der enchondralen und intramembranösen Frakturheilung (Kokubu et al. 2003; Kaspar et al. 2008), basieren jedoch auf einer Ausschaltung des Periosts und seines Beitrags zur Angiogenese und Frakturheilung durch Zerstörung von Gefäßen und osteogenen Vorläuferzellen im Periost (Kokubu et al. 2003). Diese Frakturmodelle ermöglichen keinen reliablen Vergleich der Vaskularisierung zwischen Unions und atrophen Pseudarthrosen zur Beantwortung der Frage, ob atrophe Pseudarthrosen von Grund auf

mindervaskularisiert sind, weil sie eine Mindervaskularisierung durch Destruktion des Periosts und der versorgenden Gefäße selbst herbeiführen.

Um eine Untersuchung der Angiogenese zu gewährleisten, erzeugten wir mittels der Pin-Clip-Osteosynthese einen rotationsstabilen segmentalen Knochen-Defekt ohne Destruktion des Periosts. Die Untersuchungen der explantierten Femora haben zum Ende des Beobachtungszeitraums in der Union-Gruppe eine vollständige knöcherne Überbrückung des Frakturspalts ergeben. Mikrotomografisch sowie histologisch war im Verlauf eine progrediente Abnahme der Größe des Frakturspalts bis zur vollständigen Ausheilung der Fraktur zu erkennen. In der Non-Union-Gruppe zeigte sich dagegen computertomografisch wie auch histologisch unter Abnahme der Größe des Frakturspalts die Ausbildung einer atrophen Pseudarthrose mit den dafür typischen Kriterien eines persistierenden Frakturspalts ohne knöcherne Überbrückung, abgerundeten Knochenenden und interfragmentären fibrösem Gewebe.

Folglich handelt es sich bei dem in dieser Studie eingesetzten Frakturmodell mit segmentalen Knochen-Defekten um ein zuverlässiges Modell zur Erzeugung von atrophen Pseudarthrosen, ohne dass die Notwendigkeit einer Destruktion des Periosts besteht. Die Ausbildung der atrophen Pseudarthrose oder Frakturausheilung wird ausschließlich durch die Größe des segmentalen Knochen-Defekts bestimmt.

Neben der Zuverlässigkeit des Frakturmodells waren das niedrige Implantatgewicht, die gute und günstige Verfügbarkeit, die axiale und rotationsstabile Versorgung der Fraktur und die Möglichkeit, definierte Osteotomien zu erzeugen, von Vorteil.

Nachteilig dagegen wirkt sich der große offene operative Zugang mit Traumatisierung des Weichteilgewebes, des Periosts und des kortikalen Knochens aus, was den Verlauf der Frakturheilung negativ beeinflussen könnte. Auch erfolgt keine absolut feste Fixierung des Pin-Clips, so dass der Pin dislozieren kann und der Clip über einen gewissen Bewegungsspielraum verfügt, was Bewegungen im Frakturbereich begünstigen kann (Garcia et al. 2008a).

Einflussfaktoren auf die Frakturheilung wie Alter (Lu et al. 2008) und Geschlecht (Strube et al. 2009; Mehta et al. 2011) wurden umgangen, indem in der vorliegenden Studie ausschließlich weibliche Versuchstiere mit einem Alter von 8-14 Wochen und einem Gewicht von 31 +/- 2g einbezogen wurden.

5.2 Frakturheilung in Unions und Non-Unions

Die Beurteilung der Frakturheilung erfolgte mittels konventioneller Röntgenaufnahmen, Micro-Computer-Tomografie und histologischer Untersuchungen. Es zeigte sich eine sekundäre Frakturheilung mit Ausbildung eines periostalen Kallus und überwiegend eine enchondrale Knochenbildung im Frakturspalt. Die intramembranöse Knochenbildung war weniger ausgeprägt und beschränkte sich auf Anteile des Periosts und der Kortikalis. Endostale Knochenbälckchen konnten beobachtet werden, doch waren diese nur wenig ausgebildet und der intramedulläre Raum hauptsächlich mit Knochenmark gefüllt.

Die quantitativen Untersuchungen des Kallus ergaben ein höheres Kallusvolumen (μ -CT), eine höhere mechanische Stabilität (PMOI im μ -CT), eine größere axiale (μ -CT) sowie periostale Kallusfläche (Histologie) und einen größeren Kallusdurchmesser (Histologie) in der Union-Gruppe im Vergleich zur Non-Union-Gruppe. Sowohl mikrotomografisch als auch histologisch war die Frakturheilung der Union-Gruppe der Non-Union-Gruppe überlegen.

Auch die Bestimmung des Proliferationsmarkers PCNA spricht für eine verminderte Aktivität und Proliferation des Gewebes in der Non-Union-Gruppe einhergehend mit einer signifikant geringeren Kallusbildung. Analog konnten Fujita et al. anhand der Bestimmung von PCNA zeigen, dass in ihrem Non-Union-Modell die Proliferationsrate von Chondrozyten nach zwei Wochen abrupt abfiel (Fujita et al. 1998).

Diese Werte, sowie die ihnen zu Grunde liegende Entwicklung, sprechen unabhängig von der Angiogenese und Vaskularisierung im Frakturbereich, für eine bessere und damit erfolgreichere Frakturheilung in der Union-Gruppe. Die Regeneration des geschädigten Knochengewebes war in der Non-Union-Gruppe beeinträchtigt, eine Heilung der Fraktur wurde trotz Ausbildung eines Kallus und neuen Knochengewebes nicht erreicht. Ein ähnlicher Heilungsprozess konnte ebenfalls in weiteren Studien beobachtet werden, welche die Frakturheilung in segmentalen Defekten untersucht haben. Diese zeigten ebenfalls einen beeinträchtigten Heilungsprozess mit verminderter Knochenbildung und der Ausbildung einer Pseudarthrose in der Versuchsgruppe mit dem größeren segmentalen Defekt (Claes et al. 2003) bzw. einen unvollständigen und beeinträchtigten Heilungsprozess (Augat et al. 1998).

Hinsichtlich der Gewebe-Zusammensetzung des entstandenen Kallus konnte ein nahezu analoger Verlauf in der Union-Gruppe und der Non-Union-Gruppe beobachtet werden. Es zeigte sich überwiegend eine dreistufige Entwicklung mit Ausbildung eines bindegewebigen Kallus mit anschließender knorpeliger sowie knöcherner Umwandlung des Kallusgewebes entsprechend dem Ablauf der enchondralen Ossifikation, wie bei der Maus beschrieben (Manigrasso & O'Connor, 2004). So nahm im Verlauf der bindegewebige Anteil ab und der knorpelige und knöcherner Anteil zu, bis es zur vollständigen Umwandlung des knorpeligen Kallus in Knochen kam. Eine intramembranöse Knochenbildung konnte nur in geringem Ausmaß beobachtet werden.

5.3 Vaskularisierung in Unions und Non-Unions

Anhand der gewonnenen Daten kann die Aussage getroffen werden, dass sich die Angiogenese und damit die Vaskularisierung zwischen den beiden untersuchten Versuchsgruppen der atrophen Pseudarthrose und der verheilenden Fraktur (Non-Union vs. Union) im zeitlichen Verlauf nicht unterscheidet.

Zu Beginn der Studie wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine beeinträchtigte Angiogenese in der frühen Phase der Frakturheilung zur Ausbildung einer atrophen Pseudarthrose führt. Die erhobenen Daten zeigen jedoch, dass sich die Vaskularisierung zwischen atrophen Pseudarthrosen und normal verheilenden Frakturen nicht wesentlich unterscheidet, sondern als gleichermaßen verlaufende Entwicklung betrachtet werden kann. Weil also die Vaskularisierung im Frühstadium der Frakturheilung trotz Ausbildung einer atrophen Pseudarthrose nicht beeinträchtigt war, muss die gestellte Hypothese abgelehnt und damit die Null-Hypothese angenommen werden.

Die Angiogenese war darüber hinaus nicht nur nicht beeinträchtigt bei der Entstehung der atrophen Pseudarthrose, sondern es konnte zusätzlich im endostalen Bereich der atrophen Pseudarthrose nach zwei Wochen eine bessere Vaskularisierung nachgewiesen werden als bei der heilenden Fraktur. Obwohl bisherige Studien während der frühen Phase der Frakturheilung eher dem periostalen Kallus eine bessere Vaskularisierung zusprechen (Brighton & Hunt 1991), leisten alle von der Fraktur betroffenen Zellen und Gewebe, vom Knochenmark bis hin zum umgebenden

Weichteilmantel, ihren Beitrag zur Frakturheilung, auch wenn der Beitrag des Periosts doch am größten ist (Gerstenfeld et al. 2003). Dies bestätigte sich in unserer Studie, in welcher die Gefäßdichte periostal und zentral sowohl in normal heilenden Frakturen als auch der atrophen Pseudarthrose am höchsten war, ein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen ergab sich jedoch nicht.

Eine bedeutende Rolle der Angiogenese und die Notwendigkeit einer vaskulären Versorgung während der Frakturheilung ist unbestritten (Rhineland 1974; Glowacki 1998; Lu et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass eine Beeinträchtigung der Angiogenese, beispielsweise durch Medikamente oder vaskuläre Verletzungen, die Frakturheilung verschlechtert und zur Ausbildung von atrophen Pseudarthrosen führen kann (Hausman et al. 2001; Claes et al. 2003; Gaston & Simpson 2007; Chu et al. 2009), bedingt durch die mangelnde vaskuläre Versorgung (Lu et al. 2007). Wir jedoch konnten in unserer Studie zeigen, dass es trotz vorhandener Angiogenese und vaskulärer Versorgung zur Ausbildung von atrophen Pseudarthrosen kommen kann. Die entstehenden und zum Untersuchungsende schließlich vorliegenden atrophen Pseudarthrosen waren zu keinem Zeitpunkt avaskulär. Die Ausbildung der atrophen Pseudarthrosen ist somit nicht zwangsläufig durch eine verminderte Vaskularisierung und Neubildung von Blutgefäßen bedingt. Bereits Reed et al. konnten hinsichtlich der Gefäßdichte keinen signifikanten Unterschied in atrophen Pseudarthrosen im Vergleich zu hypertrophen Pseudarthrosen und normal verheilenden Frakturen nachweisen (Reed et al. 2002), was unsere gewonnenen Erkenntnisse bestätigt, dass sich die Angiogenese in atrophen Pseudarthrosen und normal verheilenden Frakturen nicht unterscheidet. Jedoch untersuchten Reed et al. bereits etablierte atrophe und hypertrophe Pseudarthrosen zu unterschiedlichsten Zeitpunkten und nicht die frühe Phase des scheiternden Heilungsprozesses, so dass eine Aussage über die Vaskularisierung auf dem Weg zur Ausbildung einer Pseudarthrose von Reed et al. nicht getroffen werden konnte.

Während eine ausreichende Vaskularisierung eine Grundvoraussetzung für eine adäquate Wundheilung ist, fehlen klinische und experimentelle Studien, die zeigen, dass eine beeinträchtigte Angiogenese die Ursache für die Entstehung von Pseudarthrosen darstellt. Einige Tierstudien haben den Prozess der Vaskularisierung während der verzögerten Frakturheilung untersucht. Diese Studien haben gezeigt, dass Instabilität im Frakturbereich die Frakturheilung und Vaskularisierung beeinträchtigt

(Claes et al. 2002; Lienau et al. 2005). Jedoch führt die Instabilität im Frakturbereich zur Ausbildung einer hypertrophen Pseudarthrose mit einer von der atrophen Pseudarthrose unterschiedlichen Pathophysiologie, so dass die Ergebnisse dieser Studien nicht direkt mit den hier präsentierten Ergebnissen verglichen werden können. Claes et al. untersuchten in einer Studie die Vaskularisierung von segmentalen Knochendefekten, welche mit einem externen Fixateur stabilisiert wurden, welche eine axiale Belastung der Osteotomie ermöglichte (Claes et al. 2003). Hier zeigte sich bei größeren Knochendefekten eine verminderte Vaskularisierung, jedoch wurde diese lediglich zu einem Zeitpunkt nach neun Wochen und ohne immunhistologische Anfärbung bestimmt. Reed et al. haben die Vaskularisierung in einem Modell mit atrophen Pseudarthrosen an Ratten untersucht (Reed et al. 2003). Sie beschrieben eine generell verminderte Gefäßdichte in atrophen Pseudarthrosen nach einer Woche und eine signifikant erhöhte Gefäßdichte in atrophen Pseudarthrosen nach acht und 16 Wochen. Jedoch wurde die atrophe Pseudarthrose in ihrer Studie mittels Resektion des Periosts und endostaler Kürettage herbeigeführt. Die auf diese Weise zerstörten endostalen und periostalen Gefäße könnten die Ursache für die verminderte Gefäßdichte in der Pseudarthrose in der ersten Woche der Heilungsphase sein. Somit lässt sich nicht eindeutig belegen, ob die verminderte Vaskularisierung nach einer Woche zur atrophen Pseudarthrose geführt hat oder ob die atrophe Pseudarthrose lediglich das Resultat der endostalen und periostalen Destruktion war.

Dem gegenüber stehen die in unserer Studie gewonnen Erkenntnisse, welche eine in normal heilenden Frakturen und atrophen Pseudarthrosen gleichermaßen verlaufende Entwicklung der Vaskularisierung in der Frühphase der Frakturheilung aufzeigen, wenn Endost und Periost intakt belassen und nicht reseziert werden, auch wenn sich im Verlauf eine atrophe Pseudarthrose ausbildet. Dies zeigt analog zu den Studien von Reed et al. (Reed et al. 2002; Reed et al. 2003), dass sich sowohl in Unions als auch in atrophen Pseudarthrosen während des Frakturheilungsprozesses erfolgreich ein vergleichbares Gefäßnetzwerk ausbilden kann. Die Entstehung von atrophen Pseudarthrosen bei segmentalen Defekten und damit das Versagen der Frakturheilung geht nicht zwangsläufig mit einer gestörten oder beeinträchtigten Angiogenese und Vaskularisierung einher, so dass im Rahmen von Segmentdefekten eine gestörte Vaskularisierung nicht für die Ausbildung der atrophen Pseudarthrose verantwortlich ist. Auch wenn eine Stimulation der Angiogenese in diversen Studien zu einer besseren

oder schnelleren Frakturheilung geführt hat, ist doch die Angiogenese in atrophen Pseudarthrosen von physiologischer Seite aus betrachtet gegenüber der Angiogenese in normal heilenden Frakturen nicht beeinträchtigt.

Auch muss auf Grundlage dieser Erkenntnisse die Definition der atrophen Pseudarthrose überdacht und modifiziert werden. Eine atrophe Pseudarthrose ist laut unseren gewonnenen Daten nicht obligat avaskulär und avital.

5.4 Wachstumsfaktoren in Unions und Non-Unions

5.4.1 VEGF und BMP-2/-4

Wir konnten zeigen, dass die Expression von VEGF in atrophen Pseudarthrosen signifikant höher und die Expression von BMP-2/-4 in atrophen Pseudarthrosen dagegen signifikant niedriger ist als in Unions. Die Entstehung von atrophen Pseudarthrosen war bei adäquat ausgebildeter Vaskularisierung also nicht Folge eines Versagens der VEGF vermittelten Angiogenese.

VEGF selbst ist als wichtigster angiogener Wachstumsfaktor bekannt. Zahlreiche Studien haben eine Beteiligung von VEGF während der Frakturheilung gezeigt (Keramaris et al. 2008; Beamer et al. 2009). Eine Inhibition von VEGF beeinträchtigt die Frakturheilung und führt zur Ausbildung von Pseudarthrosen (Hausman et al. 2001; Gaston & Simpson 2007). Umgekehrt führt eine Behandlung mit VEGF zu einer verbesserten Frakturheilung (Li et al. 2009). In den letzten Jahren wurde zunehmend klar, dass die Funktion von VEGF über die Stimulation der Angiogenese hinausgeht. So kann VEGF auch die enchondrale und intramembranöse Frakturheilung sowie die Rekrutierung von Stammzellen vorantreiben (Keramaris et al. 2008; Beamer et al. 2009). Aufgrund seines stimulierenden Effekts auf die Frakturheilung würde man eine verminderte Expression von VEGF in Pseudarthrosen erwarten. Jedoch zeigte sich in unserer Studie eine erhöhte Expression von VEGF in Pseudarthrosen im Vergleich zur normalen Frakturheilung. Obwohl es leider nur wenig Informationen über die Expression von VEGF in Pseudarthrosen gibt, konnten Studien erhöhte Serumwerte von VEGF in Patienten mit Pseudarthrosen im Vergleich zu Unions zeigen (Sarahrudi et al. 2009; Weiss et al. 2009). Jedoch gibt es bisher keine Studien am Menschen, welche die

Expression von VEGF im Frakturbereich zwischen Unions und Pseudarthrosen vergleichen.

Wir können somit zum ersten Mal von einer erhöhten VEGF-Expression im fraktur nahen Gewebe in atrophen Pseudarthrosen berichten, was mit den erhöhten Serumwerten von VEGF bei Patienten mit atrophen Pseudarthrosen korreliert.

In der Literatur bestehen widersprüchliche Erkenntnisse hinsichtlich der Rolle von VEGF während der Frakturheilung und der Entstehung von Pseudarthrosen. Während VEGF in einigen Studien erfolgreich die Frakturheilung stimulieren konnte (Street et al. 2002; Li et al. 2009), konnte wiederum in anderen Studien kein positiver Effekt beobachtet werden (Peng et al. 2002; Peng et al. 2005a; Chu et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass VEGF allein nicht in der Lage ist, die Knochenbildung zu initiieren und dass eine übermäßige Expression von VEGF sogar die Knochenregeneration behindert (Peng et al. 2002; Peng et al. 2005a). Das könnte bei diesen Studien an der Verwendung eines Frakturmodells gelegen haben, welches über eine intramembranöse Knochenbildung geheilt ist. In diesen Studien fand man einen synergistischen stimulierenden Effekt von VEGF auf die enchondrale Knochenbildung, wenn es mit osteogenen Wachstumsfaktoren wie BMP-4 (Peng et al. 2002) oder BMP-2 kombiniert (Peng et al. 2005a) wurde. Diese Studien zeigten auch, dass eine vermehrte Präsenz von VEGF allein nicht in der Lage ist, kritische Defekte in Abwesenheit von BMP's zu heilen. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass für den stimulierenden Effekt von VEGF ein zusätzlicher osteogener Stimulus notwendig ist, um die enchondrale Knochenbildung einzuleiten. Die stimulierende Wirkung von VEGF auf die Frakturheilung in vorherigen Studien (Street et al. 2002) könnte somit mit einer ausreichenden endogenen Freisetzung von osteogenen Wachstumsfaktoren zusammenhängen oder durch die Verwendung anderer Frakturmodelle bedingt sein. Tatsächlich nutzten Studien, welche über einen positiven Effekt von VEGF auf die Frakturheilung berichtet haben, ein Frakturmodell der Diaphyse, welches üblicherweise durch enchondrale Knochenbildung heilt (Street et al. 2002; Eckardt et al. 2005; Zhao et al. 2007). Im Gegensatz dazu zeigten Studien an desmalen Knochen nach Behandlung mit VEGF keine beschleunigte Knochenbildung (Peng et al. 2002; Kleinheinz et al. 2005). Vermutlich liegt dies an der Abwesenheit der enchondralen Knochenbildung in diesen Knochen.

Weil aber die atrophen Pseudarthrosen eine geringere Expression der endogenen osteogenen Wachstumsfaktoren BMP-2/-4 aufwiesen, nehmen wir an, dass die Ausbildung von atrophen Pseudarthrosen durch eine verminderte Expression von osteogenen Wachstumsfaktoren verursacht wird oder durch ein gestörtes Verhältnis von angiogenen zu osteogenen Wachstumsfaktoren bedingt ist. Ein Zusammenhang zwischen der verminderten Expression von BMP-2/-4 und der verminderten Kallusbildung wie auch dem Versagen der Frakturheilung in der Non-Union-Gruppe ist denkbar. Jedoch kann man anhand der erhobenen Daten nicht sagen, ob die verminderte Expression von BMP-2/-4 in Pseudarthrosen ursächlich für das Versagen der Frakturheilung war oder ob die Gewebedifferenzierung bzw. das Versagen des Heilungsprozesses selbst zu einer verminderten Expression von BMP-2/-4 geführt haben.

Die Expression der Wachstumsfaktoren wurde für den Kallus als Ganzes bestimmt, es erfolgte keine Bestimmung der Expression in Abhängigkeit von ihrer möglichen räumlichen Lokalisation im Kallus oder der Zusammensetzung des Kallus oder der sie produzierenden spezifischen Zelltypen. Deshalb kann man keine Schlüsse darüber ziehen, welche Zellen hauptsächlich an der Produktion und Ausschüttung der Wachstumsfaktoren und regulatorischen Proteine beteiligt waren und ob zellspezifische Unterschiede zwischen Unions und atrophen Pseudarthrosen bestehen.

Die Expression von BMP-2/-4 wurde in dieser Studie untersucht, weil sie zwei der am Besten charakterisierten BMP's sind, sie über ein enormes osteoinduktives Potenzial innerhalb der BMP Familie verfügen und sie in verschiedenen Phasen der Frakturheilung aktiv sind (Cheng et al. 2003; Kwong et al. 2009a).

Vor allem BMP-2 und BMP-4 sind von besonderem Interesse, weil sich zeigte, dass ihre Expression in Pseudarthrosen im Vergleich zu normal verheilenden Frakturen vermindert ist (Niikura et al. 2006; Kwong et al. 2009b), was wir in unserer Studie bestätigen konnten. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass atrophe Pseudarthrosen initial BMP-2 und BMP-4 exprimieren, welche aber später im Frakturspalt nicht mehr nachzuweisen waren (Brownlow et al. 2001).

Weil aber eine Hypoxie generell ein starker Stimulus zur Bildung von VEGF ist (Bouletreau et al. 2002), könnte die hypoxische Umgebung im Bereich großer segmentaler Defekte, wie in der Non-Union-Gruppe, zu einer erhöhten Expression von VEGF führen. Wir nehmen an, dass in segmentalen Defekten mit kritischer Größe und

in Situationen mit beeinträchtiger Vaskularisierung sowie bestehender Hypoxie das primäre Ziel des verletzten Gewebes ist, wieder ein vaskuläres Netzwerk für eine adäquate Sauerstoff- und Nährstoffversorgung aufzubauen, um das Überleben der Zellen im Bereich der Fraktur zu sichern. Dies gelingt über eine erhöhte Expression von VEGF unter diesen Bedingungen. Im Gegensatz dazu scheint die Expression von Wachstumsfaktoren, welche die Differenzierung von Osteoblasten und die Knochenbildung fördern, wie dies bei BMP-2 und BMP-4 der Fall ist, herunterreguliert und nur von sekundärer Bedeutung zu sein, um ein Überleben des Gewebes im Frakturbereich sicherzustellen. Dies korreliert mit unserer Beobachtung einer erhöhten Expression des angiogenen Wachstumsfaktors VEGF und einer erniedrigten Expression von osteogenen Wachstumsfaktoren wie BMP-2 und BMP-4 in der Gruppe der atrophen Pseudarthrose. Auch spricht die verminderte Kallusbildung in der Non-Union-Gruppe sowie die geringere PCNA-Expression und damit verminderte Gewebeproliferation für eine Vernachlässigung der Frakturheilung zu Gunsten der Angiogenese.

Unsere Hypothese wird gestützt durch die Beobachtung, dass eine übermäßige Expression von VEGF im Verhältnis zu BMP-2 bzw. BMP-4 die Frakturheilung beeinträchtigt (Peng et al. 2002; Peng et al. 2005a), indem die übermäßige Applikation von VEGF zu einer vermehrten Proliferation von mesenchymalen Stammzellen zu Endothelzellen anstatt zu einer chondrogenen/osteoblastischen Zelllinie führt. Dazu untersuchten Peng et al. den Einfluss von BMP-4 und VEGF sowohl auf die Heilung von kritischen Knochendefekten als auch die ektopische Knochenbildung in Muskelgewebe und konnten zeigen, dass ein bestimmtes Verhältnis von BMP-4 zu VEGF (5:1) die Knochenheilung fördert, während eine vermehrte Stimulation von VEGF gegenüber BMP-4 (5:1) die Knochenheilung sogar beeinträchtigt und isoliertes VEGF ohne BMP-4 keine Knochenheilung herbeiführen kann (Peng et al. 2002).

Ein ähnliches Verhalten konnte auch für BMP-2 beschrieben werden, welches ebenfalls einen synergistischen Effekt zusammen mit VEGF auf die Knochenheilung zeigte, wenn es in einem bestimmten Verhältnis appliziert wurde. Demnach führte ein Verhältnis zu Gunsten BMP-2 gegenüber VEGF (5:1) zu einer besseren Knochenheilung kritischer Defekte als umgekehrt ein Verhältnis zu Gunsten VEGF (5:1) gegenüber BMP-2 (Peng et al. 2005a).

So kann also die in unserer Studie beobachtete relative Überexpression von VEGF gegenüber BMP-2/-4 die Ursache für die Ausbildung der atrophen Pseudarthrosen sein,

bedingt durch das primäre Ziel des geschädigten Gewebes die Vaskularisierung wieder herzustellen unter initialer Vernachlässigung der Frakturheilung.

Ohne Zweifel sind die BMP's wie auch VEGF essenziell für die Regeneration des Knochens. So stehen sie hinsichtlich der Regulation der regenerativen Vorgänge in enger Beziehung miteinander (Gerstenfeld et al. 2003), indem sie ihre jeweilige Expression regulieren und beeinflussen (Deckers et al. 2002; Bouletreau et al. 2002) und synergistisch auf die Frakturheilung wirken (Peng et al. 2002; Patel et al. 2008; Kumar et al. 2010).

Die weitere Untersuchung der Rolle von BMP-2/-4 in der Ausbildung von Pseudarthrosen, auch in Zusammenhang und Interaktion mit VEGF, ist von großer Bedeutung, insbesondere, da die erfolgreiche Behandlung von Knochendefekten mittels BMP's und VEGF abhängig ist vom applizierten Verhältnis dieser Faktoren (Peng et al. 2002; Peng et al. 2005a) und ein Überwiegen der angiogenen Stimulation gegenüber der osteogenen Stimulation zum Scheitern der Frakturheilung führt.

5.4.2. Sclerostin

Sclerostin als BMP-Antagonist wirkt negativ regulierend auf den Knochenstoffwechsel (Kusu et al. 2003; Winkler et al. 2003) und nimmt an der Regulation der Knochenbildung und Frakturheilung teil.

So kann eine Inaktivierung von Sclerostin den knöchernen Heilungsverlauf positiv beeinflussen (Agholme et al. 2010), die Kallusdichte und Knochenstärke erhöhen und die Frakturheilung beschleunigen (Paszty et al. 2010).

Die Rolle von Sclerostin während der Frakturheilung und die Verbindung mit der Ausbildung von Pseudarthrosen bleibt unklar. Niikura et al konnten zeigen, dass die Expression von Sclerostin in atrophen Pseudarthrosen geringer war als in der normal verheilenden Vergleichsgruppe (Niikura et al. 2006). Dies widerspricht jedoch unseren Ergebnissen, welche keinen Unterschied feststellen konnten.

5.4.3 Noggin

Verschiedene Studien zeigten zwischen verheilenden und nicht verheilenden Frakturen keinen Unterschied in der Noggin-Expression (Kwong et al. 2009b) sowie eine verminderte Expression in Delayed Unions (Lienau et al. 2010) und Pseudarthrosen (Niikura et al. 2006). Anhand dieser unterschiedlichen Ergebnisse ist eine Einordnung der Funktion von Noggin im Rahmen einer gestörten oder verzögerten Frakturheilung schwierig. Unsere Ergebnisse zeigen eine erhöhte Expression von Noggin in der Non-Union-Gruppe im Kallus nach 7, 14 und 21 Tagen, jedoch ohne signifikanten Unterschied. Da in diversen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass eine Überexpression von Noggin die Differenzierung und Aktivität von Osteoblasten vermindert (Gazzerro et al. 1998; Wu et al. 2003; Tsiologiannis et al. 2009), zu einer erhöhten Knochenbrüchigkeit bei vermehrter Knochenmasse (Okamoto et al. 2006) oder insgesamt zu einer verminderten Knochenbildung (Aspenberg et al. 2001) führt, wäre ein Zusammenhang zwischen einer vermehrten Expression von Noggin und der Ausbildung einer atrophen Pseudarthrose nicht abwegig. Da es die Differenzierung von Osteoblasten und die Knochenbildung behindert, könnte es über diese negative Einwirkung auf die Frakturheilung erheblich zur Entstehung einer Pseudarthrose beitragen. Warum eine erhöhte Expression von Noggin in der Non-Union-Gruppe vorliegt und wodurch diese bedingt ist, bleibt unklar und kann durch diese Studie nicht beantwortet werden. Jedoch führen unsere Ergebnisse, unter Bezug auf die bisher bekannten Wirkungen von Noggin, zu der Annahme, dass Noggin zur Ausbildung der atrophen Pseudarthrose beiträgt. Da Noggin als Antagonist von BMP's bekannt ist (Zimmerman et al. 1996), und deren Expression, also die von BMP-2 und BMP-4, in der Non-Union-Gruppe vermindert war, könnte es in Verbindung mit der Regulation der Osteogenese durch BMP-2/-4 stehen und die Frakturheilung negativ beeinflussen.

Da Noggin jedoch auch während der normalen Frakturheilung hochreguliert ist (Dean et al. 2010) und zusammen mit Sclerostin einen Komplex bildet, der die antagonistische Wirkung der beiden Moleküle reduziert und auf die Knochenbildung positiv stimulierend wirkt (Winkler et al. 2004), könnte die vermehrte Expression von Noggin und Sclerostin in den atrophen Pseudarthrosen im Gegensatz zur angenommenen inhibitorischen Wirkung der beiden Moleküle einen stimulierenden Effekt auf die Frakturheilung

vermitteln, der aber unzureichend für eine erfolgreiche Heilung war und in einer Pseudarthrose resultierte.

5.4.4 Ang-1 und Tie-2

Neben VEGF ist auch Angiopoetin-1 ein wichtiger angiogener Wachstumsfaktor und Ligand des Tie-2-Rezeptors. Die Analyse der Expression des Angiopoetins Ang-1 zeigte in der Non-Union-Gruppe eine höhere Expression als in der Union Gruppe. Die Expression von Tie-2 war in beiden Versuchsgruppen gleich.

In einem Modell mit verzögerter Frakturheilung konnte eine verringerte Expression von Ang-1 (m-RNA) nachgewiesen werden (Lienau et al. 2009). In unserem Modell mit der atrophen Pseudarthrose zeigte sich hingegen eine vermehrte Expression in der Non-Union-Gruppe. Diese vermehrte Expression von Ang-1 in der Non-Union-Gruppe könnte durch eine ausgeprägte Hypoxie im größeren segmentalen Knochen-Defekt bedingt sein und dem Zweck dienen, den beeinträchtigten Heilungsprozess durch vermehrte Angiogenese positiv zu beeinflussen und die Frakturheilung zu fördern. Da Ang-1 und Tie-2 eine stimulierende Wirkung auf die Angiogenese und Knochenbildung haben (Horner et al. 2001; Suzuki et al. 2007; Park et al. 2010), scheint die vermehrte Expression ein kompensatorischer Versuch des geschädigten Gewebes zu sein, die Gefäßbildung im Frakturbereich wie auch den Heilungsprozess zu fördern.

Trotz der vermehrten Expression von Ang-1 und Tie-2 kommt es zum Scheitern der Frakturheilung und Ausbildung einer atrophen Pseudarthrose. Eine therapeutische Applikation von Angiopoetin scheint demnach eher fragwürdig, weil auch eine physiologischerseits vermehrte Expression dieser Faktoren die Ausbildung der atrophen Pseudarthrose nicht zu verhindern vermag und gegebenenfalls an ihrer Entstehung beteiligt ist über eine Überstimulation der Angiogenese auf Kosten der Osteogenese.

Eine bestimmte Balance zwischen angiogenen und anti-angiogenen Faktoren ist notwendig, um den knorpeligen Kallus zu bewahren und eine geordnete Verknöcherung zu bewirken (Glowacki 1998). Über eine Überexpression von Ang-1 ist eine vorzeitige Vaskularisierung des sonst avaskulären knorpeligen Kallus denkbar, mit der Folge einer dadurch induzierten und früher einsetzenden Verknöcherung.

5.4.5 MMP13

Bei Patienten mit erfolgloser Frakturheilung und Ausbildung von Pseudarthrosen zeigte sich im Serum eine erhöhte Konzentration von MMP's (Henle et al. 2005; Zimmermann et al. 2007), was sich mit unseren Ergebnissen deckt, die für die Non-Union-Gruppe eine erhöhte Expression von MMP13 im Vergleich zur Union-Gruppe nach 14 Tagen zeigten. MMP13 ist essenziell für die Frakturheilung und Angiogenese (Ferguson et al. 1999; Kosaki et al. 2007; Behonick et al. 2007), indem es die Einleitung der Angiogenese und die Entwicklung von Chondrozyten während der Frakturheilung und damit die Resorption des Knorpels fördert.

Wir konnten eine vermehrte Expression von MMP13 in atrophen Pseudarthrosen nachweisen, es bleibt dennoch offen, dies in den pathophysiologischen Prozess der Frakturheilung einzuordnen. Es ist denkbar, dass eine beeinträchtigte Frakturheilung, wie in unserem atrophen Non-Union-Modell, zu einer vermehrten Expression von MMP13 führt, damit den Heilungsprozess und die Angiogenese stimuliert und versucht diese positiv zu beeinflussen und der Ausbildung der atrophen Pseudarthrose entgegenzuwirken. Auch wäre ein negativer Effekt von übermäßig exprimiertem MMP13 auf die Frakturheilung denkbar. So könnte die gesteigerte Expression von MMP13 zu einer übermäßigen Degradation und Resorption des Kallus führen und folglich zum Versagen der Frakturheilung.

5.4.6 Cyr61

Cysteine-rich-protein Cyr61 ist für eine Vielzahl zellulärer Vorgänge verantwortlich und auch für die Angiogenese und Frakturheilung von Bedeutung. In einem Delayed-Union-Modell konnte eine verringerte Expression von Cyr61 nachgewiesen werden. Cyr61 scheint somit für die Frakturheilung von Bedeutung zu sein. (Lienau et al. 2006; Lienau et al. 2009). Diese verringerte Expression von Cyr61 im Delayed-Union-Modell ist mit unseren Ergebnissen in Übereinstimmung zu bringen, welche eine signifikant geringere Expression von Cyr61 in der Non-Union-Gruppe gegenüber der Union-Gruppe zeigen. Da Cyr61 die Chondrogenese wie auch die Knochenbildung stimuliert (Hadjjargyrou et al. 2000), steht eine verminderte Expression und damit eine geringere Stimulation

möglicherweise in Zusammenhang mit der Ausbildung einer atrophen Pseudarthrose. Bedingt die Entstehung einer atrophen Pseudarthrose eine Verringerung der Cyr61 Expression oder umgekehrt eine erniedrigte Cyr61 Expression die Ausbildung der atrophen Pseudarthrose, muss in Zukunft untersucht werden. Tatsache ist jedoch, dass die Ausbildung einer atrophen Pseudarthrose mit einer verminderten Cyr61 Expression assoziiert ist. Und weil eine Blockade von Cyr61 die Frakturheilung beeinträchtigt (Athanasopoulos et al. 2007) und es in Delayed Unions vermindert exprimiert wird (Lienau et al. 2006; Lienau et al. 2009), liegt die Vermutung nahe, dass ein erniedrigtes Cyr61 mit ursächlich für die Ausbildung einer Pseudarthrose sein könnte.

Da die osteoinduktive Wirkung von Cyr61 durch Stimulation von BMP-2 zu vermittelt sein scheint (Su et al. 2010), steht die signifikant erniedrigte Expression von BMP-2 bei der atrophen Pseudarthrose in unserer Studie nicht in Widerspruch zur signifikant verminderten Cyr61-Expression, sondern ist durch diese eher mit bedingt.

5.5 Fazit

Wir können infolge der gewonnenen Ergebnisse die Aussage treffen, dass in unserem Modell atrophe Pseudarthrosen nicht mindervaskularisiert sind und dass in atrophen Pseudarthrosen angiogene Wachstumsfaktoren vermehrt und osteogene Wachstumsfaktoren vermindert exprimiert werden. Die Entstehung der atrophen Pseudarthrose ist in unserem Modell nicht die Folge einer gestörten über angiogene Wachstumsfaktoren vermittelten Vaskularisierung, sondern durch eine verminderte Expression von osteogenen Wachstumsfaktoren verursacht. Wir sprechen hierbei dem Verhältnis der angiogenen zu osteogenen Wachstumsfaktoren eine große Bedeutung zu. Warum aber die Angiogenese und Vaskularisierung in atrophen Pseudarthrosen mit der von Unions vergleichbar und nicht schlechter ist, wie früher mehrfach beschrieben und angenommen, liegt womöglich daran, dass das geschädigte Gewebe sämtliches regeneratives Potenzial in die Angiogenese und Entwicklung eines neuen Gefäßsystems steckt, um das Überleben des betroffenen Gewebes sicherzustellen, und dies zu Ungunsten der Frakturheilung, der Chondrogenese und Osteogenese. Immerhin zeigte sich in der Non-Union-Gruppe eine quantitativ schlechtere Frakturheilung mit Versagen einer überbrückenden Kallusbildung bei einer adäquaten Angiogenese und

Vaskularisierung des Kallus. Möglich ist, dass diese Vaskularisierung durch eine vermehrte Expression von VEGF, Ang-1, Tie-2 und MMP13 erreicht wurde. Vermutlich wäre eine mit der Union-Gruppe vergleichbare Vaskularisierung ohne eine vermehrte Expression besagter Wachstumsfaktoren gar nicht erzielt worden, sondern war nur unter einer aktiv erhöhten Expression dieser Faktoren möglich. Das soll bedeuten, dass das geschädigte Gewebe und das im Rahmen der frühen Stadien der Frakturheilung entstehende und proliferierende Gewebe aktiv daran mitwirken, ein adäquates und zum Überleben ausreichendes Gefäßnetzwerk aufzubauen. Das nach sieben Tagen in der Non-Union-Gruppe erhöhte PCNA könnte der übermäßig gesteigerten Proliferation des Gefäßnetzwerkes unter der Stimulation von VEGF, Ang-1, Tie-2 und MMP13 entsprechen. Nach 14 Tagen könnte das regeneratorsche Potenzial der atrophen Pseudarthrose bereits eine gewisse Erschöpfung zeigen und folglich nicht mehr zu einer ausreichenden Kallusbildung und Frakturheilung führen, was sich in einer verminderten Gewebeproliferation anhand einer verminderten Expression von PCNA darstellt, sowohl gegenüber der Union-Gruppe nach 14 Tagen als auch der Non-Union-Gruppe nach sieben Tagen. Es ist möglich, dass das Ausmaß der Knochenbildung und der Regeneration unter definierten biomechanischen Bedingungen begrenzt ist und einfach nicht zur erfolgreichen Ausheilung segmentaler Defekte bestimmter Größe ausreicht und deshalb zum Versagen der Frakturheilung führt. In der Union-Gruppe dagegen wurde mit einer geringeren Mobilisierung der angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF, Ang-1, Tie-2 und MMP13 die gleiche Vaskularisierung erreicht und somit das Potenzial zur vollständigen Ausheilung der Fraktur gewahrt, so dass nach 14 Tagen noch eine ausreichende Gewebeproliferation und Frakturheilung erfolgen konnte.

Analog der aktiven Stimulation der Angiogenese und des Aufbaus des Gefäßnetzwerkes könnte zusätzlich eine Suppression von Cyr61 und ebenso eine vermehrte Expression von Sclerostin und Noggin stattfinden, um die Kallusbildung zunächst zu supprimieren und auf diesem Weg primär die Angiogenese zu fördern, was aber letztendlich zum Überleben des Gewebes, jedoch zum Versagen der Frakturheilung geführt hat.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Angiogenese ausreichend und die Osteogenese in atrophen Pseudarthrosen beeinträchtigt ist, sollte in Zukunft in weiteren Studien mit atrophen Pseudarthrosen gezielt die Osteogenese gefördert werden, eventuell sogar in Kombination mit Faktoren, die zusätzlich die Angiogenese

stimulieren. So konnte bisher ein positiver Effekt für die gemeinsame Applikation von VEGF und BMP's auf die Frakturheilung beobachtet werden als auch für BMP's allein. Auch sollte überprüft werden, ob Pseudarthrosen auf diese Weise vermieden und behandelt werden könnten und ob ein klinischer Einsatz von therapeutischen Maßnahmen zur Förderung der Osteogenese in atrophen Pseudarthrosen, insbesondere über eine Stimulation mit osteogenen Faktoren, möglich und Erfolg versprechend wäre.

Mit zunehmendem Verständnis über die Vorgänge während der Frakturheilung, vor allem auch bei pathologischen Prozessen wie der Entstehung von Pseudarthrosen, erhofft man sich einen Informationsgewinn, der zu einer sinnvollen und erfolgreichen Behandlung dieser klinischen Problemfälle beitragen könnte.

6. Literaturverzeichnis

1. Agholme F, Li X, Isaksson H, Ke HZ, Aspenberg P (2010) Sclerostin antibody treatment enhances metaphyseal bone healing in rats. *J. Bone Miner. Res.* 25: 2412–2418.
2. Amălinei C, Căruntu ID, Bălan RA (2007) Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol* 48: 323–334.
3. Anderson LD (1965) Treatment of ununited fractures of the long bones: compression plate fixation and the effect of different types of internal fixation on fracture healing. *J Bone Joint Surg Am* 47: 191–208.
4. Arany L, Baranyai T, Mândi A, Kunkli F (1980) Arteriographic studies in delayed-union and non-union of fractures. *Radiol Diagn (Berl)* 21: 673–681.
5. Aspenberg P, Jeppsson C, Economides AN (2001) The bone morphogenetic proteins antagonist Noggin inhibits membranous ossification. *J. Bone Miner. Res.* 16: 497–500.
6. Athanasopoulos AN, Schneider D, Keiper T, Alt V, Pendurthi UR, Liegibel UM, Sommer U, Nawroth PP, Kasperk C, Chavakis T (2007) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced up-regulation of CCN1 in osteoblasts mediates proangiogenic activities in endothelial cells and promotes fracture healing. *J. Biol. Chem.* 282: 26746–26753.
7. Auer JA, Goodship A, Arnoczky S, Pearce S, Price J, Claes L, Rechenberg B von, Hofmann-Antenbrinck M, Schneider E, Müller-Terpitz R, Thiele F, Rippe K, Grainger DW (2007) Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. *BMC Musculoskelet Disord* 8: 72.
8. Augat P, Margevicius K, Simon J, Wolf S, Suger G, Claes L (1998) Local tissue properties in bone healing: influence of size and stability of the osteotomy gap. *J. Orthop. Res.* 16: 475–481.
9. Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K (2009) Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 165–177.
10. Babic AM, Kireeva ML, Kolesnikova TV, Lau LF (1998) CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 6355–6360.
11. Baltzer AW, Lattermann C, Whalen JD, Wooley P, Weiss K, Grimm M, Ghivizzani SC, Robbins PD, Evans CH (2000) Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene. *Gene Ther.* 7: 734–739.
12. Beamer B, Hettrich C, Lane J (2009) Vascular Endothelial Growth Factor: An Essential Component of Angiogenesis and Fracture Healing. *HSS J.*
13. Behonick DJ, Xing Z, Lieu S, Buckley JM, Lotz JC, Marcucio RS, Werb Z, Micalau T, Colnot C (2007) Role of matrix metalloproteinase 13 in both endochondral and intramembranous ossification during skeletal regeneration. *PLoS ONE* 2: e1150.
14. Betz OB, Betz VM, Abdulazim A, Penzkofer R, Schmitt B, Schröder C, Augat P, Jansson V, Müller PE (2009) Healing of large segmental bone defects induced by expedited bone morphogenetic protein-2 gene-activated, syngeneic muscle grafts. *Hum. Gene Ther.* 20: 1589–1596.
15. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4: 197–250.
16. Böhler J (1982) An approach to non-union of fractures. *Surg Annu* 14: 299–315.
17. Bolander ME (1992) Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200: 165–170.
18. Bonnarens F, Einhorn TA (1984) Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J. Orthop. Res.* 2: 97–101.
19. Bork P (1993) The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett.* 327: 125–130.

20. Bostrom M, Lane JM, Tomin E, Browne M, Berberian W, Turek T, Smith J, Wozney J, Schildhauer T (1996) Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: 272–282.
21. Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, Missri AA, Tomin E, Weiland A, Doty SB, Glaser D, Rosen VM (1995) Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J. Orthop. Res.* 13: 357–367.
22. Bostrom MP, Camacho NP (1998) Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: S274-82.
23. Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA, Longaker MT (2002) Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 109: 2384–2397.
24. Bourque WT, Gross M, Hall BK (1992) A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Lab. Anim. Sci.* 42: 369–374.
25. Boyan BD, Caplan AI, Heckman JD, Lennon DP, Ehler W, Schwartz Z (1999) Osteochondral progenitor cells in acute and chronic canine nonunions. *J. Orthop. Res.* 17: 246–255.
26. Brighton CT, Hunt RM (1991) Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg Am* 73: 832–847.
27. Brownlow HC, Simpson AH (2000) Metabolic activity of a new atrophic nonunion model in rabbits. *J. Orthop. Res.* 18: 438–442.
28. Brownlow HC, Reed A, Simpson AH (2001) Growth factor expression during the development of atrophic non-union. *Injury* 32: 519–524.
29. Brownlow HC, Reed A, Simpson AHRW (2002) The vascularity of atrophic non-unions. *Injury* 33: 145–150.
30. Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM (1998) Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* 280: 1455–1457.
31. Calori GM, Albisetti W, Agus A, Iori S, Tagliabue L (2007) Risk factors contributing to fracture non-unions. *Injury* 38 Suppl 2: S11-8.
32. Campbell JT, Kaplan FS (1992) The role of morphogens in endochondral ossification. *Calcif. Tissue Int.* 50: 283–289.
33. Caplan AI (1987) Bone development and repair. *Bioessays* 6: 171–175.
34. Caplan AI (1990) Cartilage begets bone versus endochondral myelopoiesis. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: 257–267.
35. Carano RAD, Filvaroff EH (2003) Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov. Today* 8: 980–989.
36. Carlevaro MF, Cermelli S, Cancedda R, Descalzi Cancedda F (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J. Cell. Sci.* 113 (Pt 1): 59–69.
37. Chao EYS, Inoue N (2003) Biophysical stimulation of bone fracture repair, regeneration and remodelling. *Eur Cell Mater* 6: 72-84; discussion 84-5.
38. Charnley J (1970) *The closed treatment of common fractures*. Third edition. Edinburgh and London. E. & S. Livingstone Ltd.
39. Cheal EJ, Mansmann KA, DiGioia AM, Hayes WC, Perren SM (1991) Role of interfragmentary strain in fracture healing: ovine model of a healing osteotomy. *J. Orthop. Res.* 9: 131–142.
40. Chen C, Lau LF (2009) Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41: 771–783.
41. Chen Y, Alman BA (2009) Wnt pathway, an essential role in bone regeneration. *J. Cell. Biochem.* 106: 353–362.
42. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Sztatkowski JP, Park JY, He T (2003) Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 85-A: 1544–1552.

43. Cheung KMC, Kaluarachi K, Andrew G, Lu W, Chan D, Cheah KSE (2003) An externally fixed femoral fracture model for mice. *J. Orthop. Res.* 21: 685–690.
44. Cho T, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (2002) Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J. Bone Miner. Res.* 17: 513–520.
45. Choi P, Ogilvie C, Thompson Z, Miclau T, Helms JA (2004) Cellular and molecular characterization of a murine non-union model. *J. Orthop. Res.* 22: 1100–1107.
46. Chu TG, Warden SJ, Turner CH, Stewart RL (2007) Segmental bone regeneration using a load-bearing biodegradable carrier of bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials* 28: 459–467.
47. Chu T, Liu Y, Wang Z, Zhu P, Jiao W, Wen J, Gong S (2009) Sustained vascular endothelial growth factor blockade by anti-vascular endothelial growth factor antibodies results in nonunion in the process of fracture healing in rabbits. *J Trauma* 66: 1180–1183.
48. Claes L, Wolf S, Augat P (2000) [Mechanical modification of callus healing]. *Chirurg* 71: 989–994.
49. Claes L, Eckert-Hübner K, Augat P (2002) The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J. Orthop. Res.* 20: 1099–1105.
50. Claes L, Eckert-Hübner K, Augat P (2003) The fracture gap size influences the local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *Langenbecks Arch Surg* 388: 316–322.
51. Claes L, Veeseer A, Göckelmann M, Simon U, Ignatius A (2009) A novel model to study metaphyseal bone healing under defined biomechanical conditions. *Arch Orthop Trauma Surg* 129: 923–928.
52. Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J (2005) Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* 438: 937–945.
53. Dai J, Rabie ABM (2007) VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *J. Dent. Res.* 86: 937–950.
54. Davey RA, MacLean HE, McManus JF, Findlay DM, Zajac JD (2004) Genetically modified animal models as tools for studying bone and mineral metabolism. *J. Bone Miner. Res.* 19: 882–892.
55. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD (1996) Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87: 1161–1169.
56. Dean DB, Watson JT, Jin W, Peters C, Enders JT, Chen A, Moed BR, Zhang Z (2010) Distinct functionalities of bone morphogenetic protein antagonists during fracture healing in mice. *J. Anat.* 216: 625–630.
57. Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Löwik CW (2000) Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology* 141: 1667–1674.
58. Deckers MML, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, van der Bent C, Papapoulos SE, Löwik CWGM (2002) Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 143: 1545–1553.
59. Dickson K, Katzman S, Delgado E, Contreras D (1994) Delayed unions and nonunions of open tibial fractures. Correlation with arteriography results. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: 189–193.
60. Dijke P ten, Krause C, Gorter DJJ de, Löwik CWGM, van Bezooijen RL (2008) Osteocyte-derived sclerostin inhibits bone formation: its role in bone morphogenetic protein and Wnt signaling. *J Bone Joint Surg Am* 90 Suppl 1: 31–35.
61. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV (2005) Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 36: 1392–1404.
62. Dor Y, Porat R, Keshet E (2001) Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 280: C1367-74.
63. dos Santos Neto FL, Volpon JB (1984) Experimental nonunion in dogs. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: 260–271.

64. Dumont DJ, Yamaguchi TP, Conlon RA, Rossant J, Breitman ML (1992) tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene* 7: 1471–1480.
65. Eckardt H, Ding M, Lind M, Hansen ES, Christensen KS, Hvid I (2005) Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. *J Bone Joint Surg Br* 87: 1434–1438.
66. Einhorn TA (1995) Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am* 77: 940–956.
67. Einhorn TA (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: S7-21.
68. Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R (1995) Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* 80: 371–378.
69. Fataccioli V, Abergel V, Wingertsmann L, Neuville P, Spitz E, Adnot S, Calenda V, Teiger E (2002) Stimulation of angiogenesis by Cyr61 gene: a new therapeutic candidate. *Hum. Gene Ther.* 13: 1461–1470.
70. Ferguson C, Alpern E, Mclau T, Helms JA (1999) Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech. Dev.* 87: 57–66.
71. Ferrara N, Henzel WJ (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161: 851–858.
72. Ferrara N (2000) Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog. Horm. Res.* 55: 15-35; discussion 35-6.
73. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, Zych GA, Calhoun JH, LaForte AJ, Yin S (2001) Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1: S151-8.
74. Frölke JPM, Patka P (2007) Definition and classification of fracture non-unions. *Injury* 38 Suppl 2: S19-22.
75. Fujita M, Matsui N, Tsunoda M, Saura R (1998) Establishment of a non-union model using muscle interposition without osteotomy in rats. *Kobe J Med Sci* 44: 217–233.
76. Fukuhara S, Sako K, Noda K, Zhang J, Minami M, Mochizuki N (2010) Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis. *Histol. Histopathol.* 25: 387–396.
77. Garcia P, Holstein JH, Histing T, Burkhardt M, Culemann U, Pizanis A, Wirbel RJ, Pohlemann T, Menger MD (2008a) A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: impact of stability on fracture healing. *J Biomech* 41: 1689–1696.
78. Garcia P, Holstein JH, Maier S, Schaumlöffel H, Al-Marrawi F, Hannig M, Pohlemann T, Menger MD (2008b) Development of a reliable non-union model in mice. *J. Surg. Res.* 147: 84–91.
79. Gaston MS, Simpson AHRW (2007) Inhibition of fracture healing. *J Bone Joint Surg Br* 89: 1553–1560.
80. Gazzo E, Gangji V, Canalis E (1998) Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. *J. Clin. Invest.* 102: 2106–2114.
81. Geiger F, Bertram H, Berger I, Lorenz H, Wall O, Eckhardt C, Simank H, Richter W (2005) Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J. Bone Miner. Res.* 20: 2028–2035.
82. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N (1999) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat. Med.* 5: 623–628.
83. Gerber HP, Ferrara N (2000) Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc. Med.* 10: 223–228.
84. Gerhart TN, Kirker-Head CA, Kriz MJ, Holtrop ME, Hennig GE, Hipp J, Schelling SH, Wang E (1993) Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: 317–326.

85. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA (2003) Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J. Cell. Biochem.* 88: 873–884.
86. Glowacki J (1998) Angiogenesis in fracture repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: S82-9.
87. Goldhahn S, Moser R, Bigler R, Matter P (2000) [Treatment methods and outcomes of tibial shaft fractures in Switzerland. A prospective multicenter study of the Swiss AO]. *Swiss Surg* 6: 315–322.
88. Gong Y, Krakow D, Marcelino J, Wilkin D, Chitayat D, Babul-Hirji R, Hudgins L, Cremers CW, Cremers FP, Brunner HG, Reinker K, Rimoin DL, Cohn DH, Goodman FR, Reardon W, Patton M, Francomano CA, Warman ML (1999) Heterozygous mutations in the gene encoding noggin affect human joint morphogenesis. *Nat. Genet.* 21: 302–304.
89. Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J (1989) Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 7311–7315.
90. Gröngroft I, Heil P, Matthys R, Lezuo P, Tami A, Perren S, Montavon P, Ito K (2009) Fixation compliance in a mouse osteotomy model induces two different processes of bone healing but does not lead to delayed union. *J Biomech* 42: 2089–2096.
91. Hadjiargyrou M, Ahrens W, Rubin CT (2000) Temporal expression of the chondrogenic and angiogenic growth factor CYR61 during fracture repair. *J. Bone Miner. Res.* 15: 1014–1023.
92. Hadjiargyrou M, Lombardo F, Zhao S, Ahrens W, Joo J, Ahn H, Jurman M, White DW, Rubin CT (2002) Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. *J. Biol. Chem.* 277: 30177–30182.
93. Hannouche D, Petite H, Sedel L (2001) Current trends in the enhancement of fracture healing. *J Bone Joint Surg Br* 83: 157–164.
94. Hansen-Algenstaedt N, Schaefer C, Wolfram L, Joscheck C, Schroeder M, Algenstaedt P, Rütther W (2005) Femur window--a new approach to microcirculation of living bone in situ. *J. Orthop. Res.* 23: 1073–1082.
95. Harper J, Klagsbrun M (1999) Cartilage to bone--angiogenesis leads the way. *Nat. Med.* 5: 617–618.
96. Hausman MR, Schaffler MB, Majeska RJ (2001) Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone* 29: 560–564.
97. Hayda RA, Brighton CT, Esterhai JL (1998) Pathophysiology of delayed healing. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: S31-40.
98. Hayda RA, Bosse MJ (2006) Moderators' summary: management of segmental bone defects. *J Am Acad Orthop Surg* 14: S142-4.
99. Heckman JD, Boyan BD, Aufdemorte TB, Abbott JT (1991) The use of bone morphogenetic protein in the treatment of non-union in a canine model. *J Bone Joint Surg Am* 73: 750–764.
100. Heckman JD, Sarasohn-Kahn J (1997) The economics of treating tibia fractures. The cost of delayed unions. *Bull Hosp Jt Dis* 56: 63–72.
101. Heckman JD, Ehler W, Brooks BP, Aufdemorte TB, Lohmann CH, Morgan T, Boyan BD (1999) Bone morphogenetic protein but not transforming growth factor-beta enhances bone formation in canine diaphyseal nonunions implanted with a biodegradable composite polymer. *J Bone Joint Surg Am* 81: 1717–1729.
102. Henle P, Zimmermann G, Weiss S (2005) Matrix metalloproteinases and failed fracture healing. *Bone* 37: 791–798.
103. Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P (1995) An experimental model for non-union in rats. *Injury* 26: 681–686.
104. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT (1993) A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J.*
105. Holden CE (1972) The role of blood supply to soft tissue in the healing of diaphyseal fractures. An experimental study. *J Bone Joint Surg Am* 54: 993–1000.

106. Hörner K, Loeffler K, Holtzmann M (1997) [Comparison of the histologic structure of the compact bone of the long hollow bones of mouse, hamster, rat, guinea pig, rabbit, cat, and dog during development]. *Anat Histol Embryol* 26: 289–295.
107. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T (2007) Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech* 40: 215–219.
108. Holstein JH, Garcia P, Histing T, Kristen A, Scheuer C, Menger MD, Pohlemann T (2009) Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration. *J Orthop Trauma* 23: S31–8.
109. Horner A, Bishop NJ, Bord S, Beeton C, Kelsall AW, Coleman N, Compston JE (1999) Immunolocalisation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human neonatal growth plate cartilage. *J. Anat.* 194 (Pt 4): 519–524.
110. Horner A, Bord S, Kelsall AW, Coleman N, Compston JE (2001) Tie2 ligands angiopoietin-1 and angiopoietin-2 are coexpressed with vascular endothelial cell growth factor in growing human bone. *Bone* 28: 65–71.
111. Hulth A (1989) Current concepts of fracture healing. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: 265–284.
112. Iatropoulos MJ, Williams GM (1996) Proliferation markers. *Exp. Toxicol. Pathol.* 48: 175–181.
113. Iwaki A, Jingushi S, Oda Y, Izumi T, Shida JI, Tsuneyoshi M, Sugioka Y (1997) Localization and quantification of proliferating cells during rat fracture repair: detection of proliferating cell nuclear antigen by immunohistochemistry. *J. Bone Miner. Res.* 12: 96–102.
114. Jacenko O, Olsen BR (1995) Transgenic mouse models in studies of skeletal disorders. *J Rheumatol Suppl* 43: 39–41.
115. Jain RK (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.* 9: 685–693.
116. Jeong B, Kim H, Bae I, Lee K, Lee K, Oh W, Kim S, Kang I, Lee S, Koh G, Kim K, Koh J (2010) COMP-Ang1, a chimeric form of Angiopoietin 1, enhances BMP2-induced osteoblast differentiation and bone formation. *Bone* 46: 479–486.
117. Johansson N, Saarialho-Kere U, Airola K, Herva R, Nissinen L, Westermarck J, Vuorio E, Heino J, Kähäri VM (1997) Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. *Dev. Dyn.* 208: 387–397.
118. Johnson EE, Urist MR, Finerman GA (1992) Resistant nonunions and partial or complete segmental defects of long bones. Treatment with implants of a composite of human bone morphogenetic protein (BMP) and autolyzed, antigen-extracted, allogeneic (AAA) bone. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: 229–237.
119. Joško J, Gwóźdź B, Jedrzejowska-Szypułka H, Hendryk S (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med. Sci. Monit.* 6: 1047–1052.
120. Kanakaris NK, Lasanianos N, Calori GM, Verdonk R, Blokhuis TJ, Cherubino P, Biase P de, Giannoudis PV (2009) Application of bone morphogenetic proteins to femoral non-unions: a 4-year multicentre experience. *Injury* 40 Suppl 3: S54–61.
121. Kanczler JM, Oreffo ROC (2008) Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater* 15: 100–114.
122. Kaspar K, Matziolis G, Strube P, Sentürk U, Dormann S, Bail HJ, Duda GN (2008) A new animal model for bone atrophic nonunion: fixation by external fixator. *J. Orthop. Res.* 26: 1649–1655.
123. Kempen DHR, Lu L, Heijink A, Hefferan TE, Creemers LB, Maran A, Yaszemski MJ, Dhert WJA (2009) Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration. *Biomaterials* 30: 2816–2825.
124. Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, Schemitsch EH, Giannoudis PV (2008) Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury* 39 Suppl 2: S45–57.
125. Kireeva ML, MO FE, Yang GP, Lau LF (1996) Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. *Mol. Cell. Biol.* 16: 1326–1334.

126. Kleinheinz J, Stratmann U, Joos U, Wiesmann H (2005) VEGF-activated angiogenesis during bone regeneration. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 63: 1310–1316.
127. Klenke FM, Merkle T, Fellenberg J, Abdollahi A, Huber PE, Gebhard MM, Ewerbeck V, Sckell A (2005) A novel model for the investigation of orthotopically growing primary and secondary bone tumours using intravital microscopy. *Lab. Anim.* 39: 377–383.
128. Kloen P, Di Paola M, Borens O, Richmond J, Perino G, Helfet DL, Goumans MJ (2003) BMP signaling components are expressed in human fracture callus. *Bone* 33: 362–371.
129. Kokubu T, Hak DJ, Hazelwood SJ, Reddi AH (2003) Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur. *J. Orthop. Res.* 21: 503–510.
130. Konttinen YT, Ainola M, Valleala H, Ma J, Ida H, Mandelin J, Kinne RW, Santavirta S, Sorsa T, López-Otín C, Takagi M (1999) Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 58: 691–697.
131. Kosaki N, Takaishi H, Kamekura S, Kimura T, Okada Y, Minqi L, Amizuka N, Chung U, Nakamura K, Kawaguchi H, Toyama Y, D'Armiento J (2007) Impaired bone fracture healing in matrix metalloproteinase-13 deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354: 846–851.
132. Kujala S, Raatikainen T, Ryhänen J, Kaarela O, Jalovaara P (2002) Composite implant of native bovine bone morphogenetic protein (BMP) and biocoral in the treatment of scaphoid nonunions--a preliminary study. *Scand J Surg* 91: 186–190.
133. Kumar S, Wan C, Ramaswamy G, Clemens TL, Ponnazhagan S (2010) Mesenchymal Stem Cells Expressing Osteogenic and Angiogenic Factors Synergistically Enhance Bone Formation in a Mouse Model of Segmental Bone Defect. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy.*
134. Kusu N, Laurikkala J, Imanishi M, Usui H, Konishi M, Miyake A, Thesleff I, Itoh N (2003) Sclerostin is a novel secreted osteoclast-derived bone morphogenetic protein antagonist with unique ligand specificity. *J. Biol. Chem.* 278: 24113–24117.
135. Kwak HJ, So JN, Lee SJ, Kim I, Koh GY (1999) Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells. *FEBS Lett.* 448: 249–253.
136. Kwong FNK, Hoyland JA, Evans CH, Freemont AJ (2009a) Regional and cellular localisation of BMPs and their inhibitors' expression in human fractures. *Int Orthop* 33: 281–288.
137. Kwong FNK, Hoyland JA, Freemont AJ, Evans CH (2009b) Altered relative expression of BMPs and BMP inhibitors in cartilaginous areas of human fractures progressing towards nonunion. *J. Orthop. Res.* 27: 752–757.
138. Lau LF, Lam SC (1999) The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Exp. Cell Res.* 248: 44–57.
139. Li R, Stewart DJ, Schroeder HP von, Mackinnon ES, Schemitsch EH (2009) Effect of cell-based VEGF gene therapy on healing of a segmental bone defect. *J. Orthop. Res.* 27: 8–14.
140. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE, Wu D (2005) Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* 280: 19883–19887.
141. Li X, Ominsky MS, Niu Q, Sun N, Daugherty B, D'Agostin D, Kurahara C, Gao Y, Cao J, Gong J, Asuncion F, Barrero M, Warmington K, Dwyer D, Stolina M, Morony S, Sarosi I, Kostenuik PJ, Lacey DL, Simonet WS, Ke HZ, Paszty C (2008) Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J. Bone Miner. Res.* 23: 860–869.
142. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA (2002) The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 84-A: 1032–1044.
143. Lienau J, Schell H, Duda GN, Seebeck P, Muchow S, Bail HJ (2005) Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability. *J. Orthop. Res.* 23: 639–645.
144. Lienau J, Schell H, Epari DR, Schütze N, Jakob F, Duda GN, Bail HJ (2006) CYR61 (CCN1) protein expression during fracture healing in an ovine tibial model and its relation to the mechanical fixation stability. *J. Orthop. Res.* 24: 254–262.

145. Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Haschke F, Duda GN, Perka C, Bail HJ, Schütze N, Jakob F, Schell H (2009) Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. *J. Orthop. Res.* 27: 1133–1140.
146. Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Weber H, Bail HJ, Duda GN, Perka C, Schell H (2010) Insight into the molecular pathophysiology of delayed bone healing in a sheep model. *Tissue Eng Part A* 16: 191–199.
147. Lindholm R, Lindholm S, Liukko P, Paasimäki J, Isokääntä S, Rossi R, Autio E, Tamminen E (1969) The mast cell as a component of callus in healing fractures. *J Bone Joint Surg Br* 51: 148–155.
148. Lu C, Marcucio R, Miclau T (2006) Assessing angiogenesis during fracture healing. *Iowa Orthop J* 26: 17–26.
149. Lu C, Miclau T, Hu D, Marcucio RS (2007) Ischemia leads to delayed union during fracture healing: a mouse model. *J. Orthop. Res.* 25: 51–61.
150. Lu C, Hansen E, Sapozhnikova A, Hu D, Miclau T, Marcucio RS (2008) Effect of age on vascularization during fracture repair. *J. Orthop. Res.* 26: 1384–1389.
151. Macsai CE, Foster BK, Xian CJ (2008) Roles of Wnt signalling in bone growth, remodelling, skeletal disorders and fracture repair. *J. Cell. Physiol.* 215: 578–587.
152. Maes C, Carmeliet P, Moermans K, Stockmans I, Smets N, Collen D, Bouillon R, Carmeliet G (2002) Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Mech. Dev.* 111: 61–73.
153. Maisonpierre PC, Goldfarb M, Yancopoulos GD, Gao G (1993) Distinct rat genes with related profiles of expression define a TIE receptor tyrosine kinase family. *Oncogene* 8: 1631–1637.
154. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277: 55–60.
155. Manigrasso MB, O'Connor JP (2004) Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma* 18: 687–695.
156. Massagué J (1990) The transforming growth factor-beta family. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6: 597–641.
157. McKibbin B (1978) The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 60-B: 150–162.
158. Mehta M, Schell H, Schwarz C, Peters A, Schmidt-Bleek K, Ellinghaus A, Bail HJ, Duda GN, Lienau J (2011) A 5-mm femoral defect in female but not in male rats leads to a reproducible atrophic non-union. *Arch Orthop Trauma Surg* 131: 121–129.
159. Megas P, Panagiotis M (2005) Classification of non-union. *Injury* 36 Suppl 4: S30-7.
160. Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, Karp S, Gaffield W, McMahon AP, Vortkamp A (2001) BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 128: 4523–4534.
161. Mo F, Muntean AG, Chen C, Stolz DB, Watkins SC, Lau LF (2002) CYR61 (CCN1) is essential for placental development and vascular integrity. *Mol. Cell. Biol.* 22: 8709–8720.
162. Moutsatsos IK, Turgeman G, Zhou S, Kurkalli BG, Pelled G, Tzur L, Kelley P, Stumm N, Mi S, Müller R, Zilberman Y, Gazit D (2001) Exogenously regulated stem cell-mediated gene therapy for bone regeneration. *Mol. Ther.* 3: 449–461.
163. Murnaghan M, Li G, Marsh DR (2006) Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced fracture nonunion: an inhibition of angiogenesis? *J Bone Joint Surg Am* 88 Suppl 3: 140–147.
164. Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y, Oikawa S, Ono K, Takaoka K (1994) Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J. Bone Miner. Res.* 9: 651–659.
165. Nicosia RF (1998) What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis? *Am. J. Pathol.* 153: 11–16.

166. Niikura T, Hak DJ, Reddi AH (2006) Global gene profiling reveals a downregulation of BMP gene expression in experimental atrophic nonunions compared to standard healing fractures. *J. Orthop. Res.* 24: 1463–1471.
167. Nottebaert M, Lane JM, Juhn A, Burstein A, Schneider R, Klein C, Sinn RS, Dowling C, Cornell C, Catsimpoilas N (1989) Omental angiogenic lipid fraction and bone repair. An experimental study in the rat. *J. Orthop. Res.* 7: 157–169.
168. Nunamaker DM (1998) Experimental models of fracture repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: S56-65.
169. O'Brien TP, Lau LF (1992) Expression of the growth factor-inducible immediate early gene *cyr61* correlates with chondrogenesis during mouse embryonic development. *Cell Growth Differ.* 3: 645–654.
170. Oetgen ME, Merrell GA, Troiano NW, Horowitz MC, Kacena MA (2008) Development of a femoral non-union model in the mouse. *Injury* 39: 1119–1126.
171. Okamoto M, Murai J, Yoshikawa H, Tsumaki N (2006) Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts and osteoblasts during bone development. *J. Bone Miner. Res.* 21: 1022–1033.
172. Olerud S, Danckwardt-Lillieström G (1968) Fracture healing in compression osteosynthesis in the dog. *J Bone Joint Surg Br* 50: 844–851.
173. Olerud S, Danckwardt-Lillieström G (1971) Fracture healing in compression osteosynthesis. An experimental study in dogs with an avascular, diaphyseal, intermediate fragment. *Acta Orthop Scand Suppl* 137: 1–44.
174. Ominsky MS, Vlasseros F, Jollette J, Smith SY, Stouch B, Doellgast G, Gong J, Gao Y, Cao J, Graham K, Tipton B, Cai J, Deshpande R, Zhou L, Hale MD, Lightwood DJ, Henry AJ, Popplewell AG, Moore AR, Robinson MK, Lacey DL, Simonet WS, Paszty C (2010a) Two doses of sclerostin antibody in cynomolgus monkeys increases bone formation, bone mineral density, and bone strength. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.*
175. Ominsky MS, Li C, Li X, Tan HL, Lee E, Barrero M, Asuncion FJ, Dwyer D, Han C, Vlasseros F, Samadfam R, Jollette J, Smith SY, Stolina M, Lacey DL, Simonet WS, Paszty C, Li G, Ke HZ (2010b) Inhibition of sclerostin by monoclonal antibody enhances bone healing and improves bone density and strength of non-fractured bones. *J. Bone Miner. Res.*
176. Oni OO (1995) A non-union model of the rabbit tibial diaphysis. *Injury* 26: 619–622.
177. Paley D, Catagni MA, Argnani F, Villa A, Benedetti GB, Cattaneo R (1989) Ilizarov treatment of tibial nonunions with bone loss. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: 146–165.
178. Papapetropoulos A, García-Cardeña G, Dengler TJ, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD, Sessa WC (1999) Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab. Invest.* 79: 213–223.
179. Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, Kalb RG, O'Connor DS, Li F, Altieri DC, Sessa WC (2000) Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *J. Biol. Chem.* 275: 9102–9105.
180. Park B, Yoon SJ, Jang KY, Kim M, Lee H, Kim K, Park H, Lee SY, Park HS, Lim ST, Song K, Kim JR (2010) COMP-angiopoietin-1 accelerates bone formation during distraction osteogenesis. *Bone.*
181. Partanen J, Armstrong E, Mäkelä TP, Korhonen J, Sandberg M, Renkonen R, Knuutila S, Huebner K, Alitalo K (1992) A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains. *Mol. Cell. Biol.* 12: 1698–1707.
182. Paszty C, Turner CH, Robinson MK (2010) Sclerostin: a gem from the genome leads to bone-building antibodies. *J. Bone Miner. Res.* 25: 1897–1904.
183. Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong MEK, Mikos AG (2008) Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone* 43: 931–940.

184. Peng H, Wright V, Usas A, Gearhart B, Shen H, Cummins J, Huard J (2002) Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J. Clin. Invest.* 110: 751–759.
185. Peng H, Usas A, Olshanski A, Ho AM, Gearhart B, Cooper GM, Huard J (2005a) VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J. Bone Miner. Res.* 20: 2017–2027.
186. Peng H, Usas A, Hannallah D, Olshanski A, Cooper GM, Huard J (2005b) Noggin improves bone healing elicited by muscle stem cells expressing inducible BMP4. *Mol. Ther.* 12: 239–246.
187. Perren SM (1979) Physical and biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: 175–196.
188. Piters E, Boudin E, van Hul W (2008) Wnt signaling: a win for bone. *Arch. Biochem. Biophys.* 473: 112–116.
189. Plate KH, Warnke PC (1997) Vascular endothelial growth factor. *J. Neurooncol.* 35: 365–372.
190. Probst A, Spiegel HU (1997) Cellular mechanisms of bone repair. *J Invest Surg* 10: 77–86.
191. Pufe T, Wildemann B, Petersen W, Mentlein R, Raschke M, Schmidmaier G (2002) Quantitative measurement of the splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor in the time flow of fracture healing: a study in the rat. *Cell Tissue Res.* 309: 387–392.
192. Puri MC, Partanen J, Rossant J, Bernstein A (1999) Interaction of the TEK and TIE receptor tyrosine kinases during cardiovascular development. *Development* 126: 4569–4580.
193. Reddi AH (2001) Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1: S1-6.
194. Reed AAC, Joyner CJ, Brownlow HC, Simpson AHRW (2002) Human atrophic fracture non-unions are not avascular. *J. Orthop. Res.* 20: 593–599.
195. Reed AAC, Joyner CJ, Isefuku S, Brownlow HC, Simpson AHRW (2003) Vascularity in a new model of atrophic nonunion. *J Bone Joint Surg Br* 85: 604–610.
196. Rhinelander FW (1974) Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: 34–81.
197. Riley EH, Lane JM, Urist MR, Lyons KM, Lieberman JR (1996) Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: 39–46.
198. Ring D, Barrick WT, Jupiter JB (1997) Recalcitrant nonunion. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: 181–189.
199. Ripamonti U, Crooks J, Matsaba T, Tasker J (2000) Induction of endochondral bone formation by recombinant human transforming growth factor-beta2 in the baboon (*Papio ursinus*). *Growth Factors* 17: 269–285.
200. Risselada M, Kramer M, Saunders JH, Verleyen P, van Bree H (2006) Power Doppler assessment of the neovascularization during uncomplicated fracture healing of long bones in dogs and cats. *Vet Radiol Ultrasound* 47: 301–306.
201. Roach HI, Shearer JR, Archer C (1989) The choice of an experimental model. A guide for research workers. *J Bone Joint Surg Br* 71: 549–553.
202. Rodriguez-Merchan EC, Forriol F (2004) Nonunion: general principles and experimental data. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: 4–12.
203. Rüter A, Trentz O, Wagner M (2003) *Unfallchirurgie*. 2. Auflage. Elsevier. München
204. Santavirta S, Konttinen YT, Nordström D, Mäkelä A, Sorsa T, Hukkanen M, Rokkanen P (1992) Immunologic studies of nonunited fractures. *Acta Orthop Scand* 63: 579–586.
205. Sarahrudi K, Thomas A, Braunsteiner T, Wolf H, Vécsei V, Aharinejad S (2009) VEGF serum concentrations in patients with long bone fractures: a comparison between impaired and normal fracture healing. *J. Orthop. Res.* 27: 1293–1297.

206. Sarraf CE, McCormick CS, Brown GR, Price YE, Hall PA, Lane DP, Alison MR (1991) Proliferating cell nuclear antigen immunolocalization in gastro-intestinal epithelia. *Digestion* 50: 85–91.
207. Schenk RK, Müller J, Willenegger H (1968) [Experimental histological contribution to the development and treatment of pseudarthrosis]. *Hefte Unfallheilkd* 94: 15–24.
208. Schmid J, Wallkamm B, Hämmerle CH, Gogolewski S, Lang NP (1997) The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. A case report of a rabbit experiment. *Clin Oral Implants Res* 8: 244–248.
209. Schmidmaier G, Schwabe P, Wildemann B, Haas NP (2007) Use of bone morphogenetic proteins for treatment of non-unions and future perspectives. *Injury* 38 Suppl 4: S35–41.
210. Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, Hollinger JO (1999) Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J. Orthop. Res.* 17: 269–278.
211. Secreto FJ, Hoepfner LH, Westendorf JJ (2009) Wnt signaling during fracture repair. *Curr Osteoporos Rep* 7: 64–69.
212. Segmüller G, Cech O, Bekier A (1969) [Osteogenic activity in the area of pseudarthrosis of the long tubular bones]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 106: 599–609.
213. Semenza GL (2003) Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu. Rev. Med.* 54: 17–28.
214. Shea CM, Edgar CM, Einhorn TA, Gerstenfeld LC (2003) BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J. Cell. Biochem.* 90: 1112–1127.
215. Shibuya M (2008) Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep* 41: 278–286.
216. Smith WC, Harland RM (1992) Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* 70: 829–840.
217. Stähle-Bäckdahl M, Sandstedt B, Bruce K, Lindahl A, Jiménez MG, Vega JA, López-Otín C (1997) Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab. Invest.* 76: 717–728.
218. Stewart R, Goldstein J, Eberhardt A, Chu GTG, Gilbert S (2011) Increasing vascularity to improve healing of a segmental defect of the rat femur. *J Orthop Trauma* 25: 472–476.
219. Street J, Winter D, Wang JH, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP (2000) Is human fracture hematoma inherently angiogenic? *Clin. Orthop. Relat. Res.*: 224–237.
220. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RAD, Filvaroff EH (2002) Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 9656–9661.
221. Strube P, Mehta M, Baerenwaldt A, Trippens J, Wilson CJ, Ode A, Perka C, Duda GN, Kasper G (2009) Sex-specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. *Bone* 45: 1065–1072.
222. Su J, Chiou J, Tang C, Zhao M, Tsai C, Chen P, Chang Y, Chien M, Peng C, Hsiao M, Kuo M, Yen M (2010) CYR61 regulates BMP-2-dependent osteoblast differentiation through the $\alpha_3\beta_3$ integrin/integrin-linked kinase/ERK pathway. *J. Biol. Chem.* 285: 31325–31336.
223. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD (1996) Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87: 1171–1180.
224. Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Turcott E, Skonier JE, Winkler DG, Latham JA (2004) Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone* 35: 828–835.
225. Suzuki T, Miyamoto T, Fujita N, Ninomiya K, Iwasaki R, Toyama Y, Suda T (2007) Osteoblast-specific Angiopoietin 1 overexpression increases bone mass. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362: 1019–1025.

226. Tarkka T, Sipola A, Jämsä T, Soini Y, Ylä-Herttua S, Tuukkanen J, Hautala T (2003) Adenoviral VEGF-A gene transfer induces angiogenesis and promotes bone formation in healing osseous tissues. *J Gene Med* 5: 560–566.
227. Tiedeman JJ, Connolly JF, Strates BS, Lippiello L (1991) Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and demineralized bone matrix. An experimental study in dogs. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: 294–302.
228. Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, Crisp T, Fiddes JC, Abraham JA (1989) Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165: 1198–1206.
229. Trueta J (1968) *Studies of the Development and Decay of the Human Frame*. London: William Heinemann Ltd,
230. Tsiologiannis E, Polyzois I, Oak Tang Q, Pavlou G, Tsiridis E, Heliotis M, Tsiridis E (2009) Targeting bone morphogenetic protein antagonists: in vitro and in vivo evidence of their role in bone metabolism. *Expert Opin. Ther. Targets* 13: 123–137.
231. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, Einhorn T, Tabin CJ, Rosen V (2006) BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat. Genet.* 38: 1424–1429.
232. Tsuji K, Cox K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Tabin CJ, Rosen V (2008) BMP4 is dispensable for skeletogenesis and fracture-healing in the limb. *J Bone Joint Surg Am* 90 Suppl 1: 14–18.
233. Uchida S, Sakai A, Kudo H, Otomo H, Watanuki M, Tanaka M, Nagashima M, Nakamura T (2003) Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats. *Bone* 32: 491–501.
234. Urist MR (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science* 150: 893–899.
235. Uusitalo H, Hiltunen A, Söderström M, Aro HT, Vuorio E (2000) Expression of cathepsins B, H, K, L, and S and matrix metalloproteinases 9 and 13 during chondrocyte hypertrophy and endochondral ossification in mouse fracture callus. *Calcif. Tissue Int.* 67: 382–390.
236. Vaalamo M, Mattila L, Johansson N, Kariniemi AL, Karjalainen-Lindsberg ML, Kähäri VM, Saarialho-Kere U (1997) Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcers but not in normally healing wounds. *J. Invest. Dermatol.* 109: 96–101.
237. van Bezooijen RL, Svensson JP, Eefting D, Visser A, van der Horst G, Karperien M, Quax PHA, Vrieling H, Papapoulos SE, Dijke P ten, Löwik CWGM (2007) Wnt but not BMP signaling is involved in the inhibitory action of sclerostin on BMP-stimulated bone formation. *J. Bone Miner. Res.* 22: 19–28.
238. Viateau V, Guillemin G, Yang YC, Bensaid W, Reviron T, Oudina K, Meunier A, Sedel L, Petite H (2004) A technique for creating critical-size defects in the metatarsus of sheep for use in investigation of healing of long-bone defects. *Am. J. Vet. Res.* 65: 1653–1657.
239. Visse R, Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* 92: 827–839.
240. Volpon JB (1994) Nonunion using a canine model. *Arch Orthop Trauma Surg* 113: 312–317.
241. Wallace AL, Draper ER, Strachan RK, McCarthy ID, Hughes SP (1991) The effect of devascularisation upon early bone healing in dynamic external fixation. *J Bone Joint Surg Br* 73: 819–825.
242. Wan DC, Pomerantz JH, Brunet LJ, Kim J, Chou Y, Wu BM, Harland R, Blau HM, Longaker MT (2007) Noggin suppression enhances in vitro osteogenesis and accelerates in vivo bone formation. *J. Biol. Chem.* 282: 26450–26459.
243. Weber BG, Brunner C (1981) The treatment of nonunions without electrical stimulation. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: 24–32.
244. Weiss S, Zimmermann G, Pufe T, Varoga D, Henle P (2009) The systemic angiogenic response during bone healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 129: 989–997.

245. Wernicke D, Seyfert C, Hinzmann B, Gromnica-Ihle E (1996) Cloning of collagenase 3 from the synovial membrane and its expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J. Rheumatol.* 23: 590–595.
246. Wiese A, Pape HC (2010) Bone defects caused by high-energy injuries, bone loss, infected nonunions, and nonunions. *Orthop. Clin. North Am.* 41: 1-4, table of contents.
247. Winet H, Bao JY, Moffat R (1990) A control model for tibial cortex neovascularization in the bone chamber. *J. Bone Miner. Res.* 5: 19–30.
248. Winet H, Bao JY (1997) Fibroblast growth factor-2 alters the effect of eroding polylactide-polyglycolide on angiogenesis in the bone chamber. *Wound Repair Regen* 5: 355–363.
249. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M, Brunkow ME, Latham JA (2003) Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J.* 22: 6267–6276.
250. Winkler DG, Yu C, Geoghegan JC, Ojala EW, Skonier JE, Shpektor D, Sutherland MK, Latham JA (2004) Noggin and sclerostin bone morphogenetic protein antagonists form a mutually inhibitory complex. *J. Biol. Chem.* 279: 36293–36298.
251. Woessner JF (1994) The family of matrix metalloproteinases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 732: 11–21.
252. Wozney JM, Rosen V (1998) Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: 26–37.
253. Wu C, Chen W (2000) A revised protocol for more clearly classifying a nonunion. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 8: 45–52.
254. Wu X, Li Y, Schneider A, Yu W, Rajendren G, Iqbal J, Yamamoto M, Alam M, Brunet LJ, Blair HC, Zaidi M, Abe E (2003) Impaired osteoblastic differentiation, reduced bone formation, and severe osteoporosis in noggin-overexpressing mice. *J. Clin. Invest.* 112: 924–934.
255. Yamagiwa H, Tokunaga K, Hayami T, Hatano H, Uchida M, Endo N, Takahashi HE (1999) Expression of metalloproteinase-13 (Collagenase-3) is induced during fracture healing in mice. *Bone* 25: 197–203.
256. Yamaguchi A, Ishizuya T, Kintou N, Wada Y, Katagiri T, Wozney JM, Rosen V, Yoshiki S (1996) Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220: 366–371.
257. Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, Rosen V, Wozney JM, Wang EA (1992) The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J Bone Joint Surg Am* 74: 659–670.
258. Yoshimura Y, Nomura S, Kawasaki S, Tsutsumimoto T, Shimizu T, Takaoka K (2001) Colocalization of noggin and bone morphogenetic protein-4 during fracture healing. *J. Bone Miner. Res.* 16: 876–884.
259. Zhao D, Yang J, Wu S, Qiu L, Liu J, Wang H, Xu F, Cai J (2007) Effect of vascular endothelial growth factor 165 gene transfection on repair of bone defect: experiment with rabbits. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 87: 1778–1782.
260. Zhong N, Gersch RP, Hadjiargyrou M (2006) Wnt signaling activation during bone regeneration and the role of Dishevelled in chondrocyte proliferation and differentiation. *Bone* 39: 5–16.
261. Zimmerman LB, Jesús-Escobar JM de, Harland RM (1996) The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86: 599–606.
262. Zimmermann G, Müller U, Wentzensen A (2007) The value of laboratory and imaging studies in the evaluation of long-bone non-unions. *Injury* 38 Suppl 2: S33-7.

7. Publikationen

Originalpublikationen:

Garcia P, Pieruschka A, Klein M, Tami A, Histing T, Holstein JH, Scheuer C, Pohlemann T, Menger MD (2012) Temporal and spatial vascularization patterns of unions and non-unions: Role of Vascular Endothelial Growth Factor and Bone Morphogenetic Proteins. J Bone Joint Surg Am 94: 49-58.