Institut für
Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik
der Universität Ulm
(Leiter: Prof. Dr. Lutz Claes)

Die Bedeutung des Vaskulo – Endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) in der Heilung von Frakturen unter Weichteilschaden und Schock

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Mirjam Jehle
Offenburg

2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Augat
2. Berichterstatter: PD Dr. Christian Willy
Tag der Promotion: 12. Mai 2006

1 Inhaltsverzeichnis 1

2 Abkürzungsverzeichnis 3

3 Einleitung 6

3.1 Fraktur und Frakturheilung 7

3.1.1 Primäre Frakturheilung 7

3.1.2 Sekundäre Frakturheilung 8

3.1.3 Desmale und enchondrale Ossifikation 9

3.1.4 Regionen der sekundären Frakturheilung 10

3.2 Weichteilkonsolidierung 11

3.3 Angiogenese 13

3.4 Das Zytokin Vascular- endothelial- growth- factor (VEGF) 14

3.4.1 Struktur, Isoformen und Rezeptor des VEGF 14

3.4.2 Aufgaben und Regulation des VEGF 16

3.4.3 VEGF in der Frakturheilung 16

3.4.4 VEGF in der Weichteilkonsolidierung 18

3.5 Klassifikation des Weichteilschadens 19

3.6 Ziele der Arbeit 20

4 Material und Methoden 21

4.1 Versuchstiere und Tierhaltung 21

4.2 Einteilung der Studie und Umfänge 22

4.3 Frakturmodell 23

4.4 Operationsablauf 24

4.4.1 Anästhesie und Operationsvorbereitung 24

4.4.2 Operatives Vorgehen 24

4.5 Postoperatives Vorgehen 28

4.5.1 Haltung und Pflege 28

4.5.2 Versuchsabschluss 28

4.6 Histologische Aufarbeitung 29

4.6.1 Paraffinhistologie 29

4.6.2 Immunenzymhistologie 30

4.7 Histologische Auswertung 31

4.7.1 Frakturheilung 32

4.7.2 Weichteilschaden 34

4.8 Statistik 35

5 Ergebnisse 36
5.1 Postoperativer klinischer Verlauf 36
5.1.1 Histologische Aufarbeitung 36
5.2 Auswertung der Frakturgruppen 37
5.2.1 Semiquantitative Auswertung der Frakturgruppen 37
5.2.2 Einfluss Weichteilschaden auf die Frakturheilung (Gruppen Fraktur gegenüber Fraktur + WTS) 46
5.2.3 Einfluss des hypovolämischen Schocktraumas auf die Frakturheilung (Gruppen Fraktur gegenüber Fraktur + Schock) 52
5.3 Auswertung der Weichteilschadengruppen 56
5.3.1 Deskriptive Auswertung der Weichteilkonsolidierung 56
5.3.2 Einfluss des hypovolämischen Schocktraumas auf die Weichteilkonsolidierung (Gruppen WTS gegenüber WTS + Schock) 60
6 Diskussion 66
6.1 Frakturheilung 66
6.1.1 Heilungsverlauf 66
6.1.2 Einfluss Weichteilschaden 68
6.1.3 Einfluss hypovolämischer Schockzustand 71
6.2 Weichteilkonsolidierung 74
6.2.1 Heilungsverlauf 74
6.2.2 Einfluss hypovolämischer Schockzustand 76
6.2.3 Behandlung des Schocktraumas 80
6.3 Kritik an Methoden der Studie 81
6.4 Schlussfolgerung 83
7 Zusammenfassung 85
8 Literatur 87
Danksagung 101

2. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ant.	anterior
AP	Alkalische Phosphatase
BG	Bindegewebe
BK	Bindegewebskallus
BKK	Bindegewebsknorpelkallus
BMP	bone morphogenetic protein
Ch	Chondroblasten
E	Entzündungszellen
eNOS	Stickstoffmonoxid- Synthase
EDTA	Ethylendiaminessigsäure
Ery	Erythrozyten
Fb	Fibroblast
FGF-β	Fibroblast growth factor beta
bFGF	Basic fibroblast growth factor
FIGF	c- fos- induced growth factor
FS	Frakturspalt
FV	Fibroblastenähnliche Vorstufen
GK	Geflechtknochen
GM-CSF	granuloyte/ macrophage colony stimulating factor
Groα	melanoma growth stimulatory activity protein alpha
H	Hämatom
HAES®	Hydroxyethylstärke
hCh	hypertrophierte Chondrozyten
HyperHAES®	7,2%iges NaCl
IE	Internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
K	Kallus
K- Draht	Kirschner- Draht

Kf	Kollagenfasern
Kn	Knochen
Kp	Kapillareinsprossung
Kr	Knorpel
KZellen	kernhaltige Markraumzellen
M	Myoblast
M.	Musculus
Ma	Makrophagen
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
$Muskel_{nek}$	nekrotische Muskulatur
$Muskel_{oB}$	intakte Muskulatur
$Muskel_{gew}$	gewellte nicht vollständig regenerierte Muskulatur
MZ	Mesenchymzellen
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
O	Osteoblasten
O_2	Sauerstoff
Ö	Ödem
Oz	Osteozyten
P	Periostaler Knochen
Ph	Phagozytosetätigkeit
PDGF	Platelet derived growth factor
PGE	Prostaglandin E
PIGF	Plazenta Wachstumsfaktor
PO	Präosteoblasten
s.c.	subkutan
SM	Schlittenmikrotom
SVR	small volume resuscitation
T	Tibia
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TFZ	Tierforschungszentrum
TGF-β	Transforming growth factor beta
Tr	Trabekel

V.	Vena
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
VPF	Vascular permeability factor = Vascular endothelial growth factor
WT	Weichteilgewebe
WTS	Weichteilschaden

3. Einleitung

Eine Fraktur ist definiert als eine Kontinuitätsunterbrechung der Knochenstruktur, welche mit Schmerzen und Funktionsverlust einhergeht. Dabei gibt es unterschiedliche Ursachen einer Fraktur: beispielsweise ein krankhaft poröser Knochen, Dauerbeanspruchung oder ein adäquates Trauma.

Die folgende Studie möchte sich mit den Frakturen und umgebenden Weichteilschäden auseinandersetzen, welche durch ein Unfalltrauma verursacht werden können.

Trotz verbesserter medizinischer Versorgung und intensiver Forschung, kommt es heutzutage noch immer in 5-10% der Fälle zu Heilungskomplikationen. Dabei ist es von einer Vielzahl an Faktoren abhängig, wie sich der Heilungsverlauf des kombinierten Traumas gestaltet.

In vielen Fällen führt eine Fraktur mit umliegendem Weichteilschaden zu einem erheblichen Blutverlust und dadurch zu einer potentiell lebensbedrohlichen Situation sowie sekundär zu einer möglichen Beeinflussung des Heilungsvorgangs.

Zusätzlich ergibt sich für den Organismus eine hypovolämische Notsituation, die als lebensrettende Maßnahme die intravenöse Volumengabe erforderlich macht. Dadurch wird das Herzzeitvolumen gesteigert und eine Zentralisierung des Blutvolumens sowie deren weit reichende Folgen für den Körper möglichst verhindert (85). Weiterhin wird die Sauerstoffversorgung im peripheren Gebiet verbessert und dient dadurch der verbesserten Konsolidierung der Fraktur sowie des Weichteiltraumas (48).

Bisher gilt als Standard in der Notfallmedizin die Substitution mit isoosmolaren Natriumchloridlösungen. Diese Studie soll die Auswirkungen der Volumensubstitution mit hyperosmolarer Kochsalzlösung und der Einfluss eines umgebenden Muskelschadens auf den Verlauf der Frakturheilung zeigen und dient somit einem viel versprechenden Ansatz für die weitere Zukunft.

Eine weitere wichtige Vorraussetzung für eine erfolgreiche Knochenheilung ist die Revaskularisierung der Frakturenden (26, 88). Dabei nimmt eine Reihe von im Frakturspalt befindlichen Wachstumsfaktoren stimulierenden Einfluss auf die Gefäßneubildung. Auf einen dieser Faktoren - Vascular endothelial growth factor (VEGF)- soll im Rahmen unserer Studie das Augenmerk gelenkt werden. Bisher gibt es noch keine tierexperimentellen Studien, die Aussagen über Vascular endothelial growth factor im Zusammenhang mit Frakturheilung, Weichteilkonsolidierung und Schockgeschehen treffen können.

3.1 Fraktur und Frakturheilung

3.1.1 Primäre Frakturheilung

Der Begriff "primäre Frakturheilung" wurde wahrscheinlich von Lane (1914) geprägt, der vorschlug, bei Heilung ohne sichtbaren Kallus von "bone healing by primary intention" zu sprechen. Vorraussetzung hierfür ist die ausreichende Vaskularität der Frakturfragmente und die mechanische Stabilität im Frakturgebiet (26, 118, 119). Die beiden Kortikalisenden vereinigen sich ohne Ausbildung eines periostalen Kallus, d.h. ohne zusätzliche Knochensubstanz außerhalb der Frakturzone. Das medulläre Gefäßsystem wird innerhalb von Tagen durch Kapillarsprossung wiederhergestellt. In Abhängigkeit von der absoluten Frakturspaltweite (größer oder kleiner als etwa 0,2 mm) unterscheidet man Kontaktheilung und Spaltheilung (97).

Kontaktheilung

Beide Kortikalisenden haben direkten Kontakt miteinander, so dass die Knochenregeneration durch longitudinal einwachsende Osteone erfolgen kann (14). Dabei bohren Osteoklasten einen Kanal in die gegenüber liegende Kortikalis und räumen somit den Weg für Osteoblasten, welche anschließend im Zuge der Wiederauffüllung des Resorptionkanals, Lamellenknochen bilden. So werden die Knochenfragmente direkt miteinander vereinigt.

Spaltheilung

Sie ist bei einer Spaltbreite von ca. 0,2 mm zu beobachten (137). Dabei wird der Spalt innerhalb von 3- 4 Wochen zunächst mit Geflechtknochen aufgefüllt. Anschließend wird in einer zweiten Phase das gebildete Knochengeflecht zu Lamellenknochen umgebaut, der parallel zur Schaftachse ausgerichtet ist (138).

3.1.2 Sekundäre Frakturheilung

Die sekundäre Knochenbruchheilung ist charakterisiert durch eine periostale Kallusbildung, die dann entsteht, wenn keine absolut stabile Fixation der Fragmente vorliegt (136). Eine solche Situation ergibt sich durch die Behandlung langer Röhrenknochen mit flexiblen Osteosyntheseverfahren wie z.B. Fixateur externe, Marknagelung oder Gips, da diese Bewegungen im Frakturspalt zulassen und damit eine Kallusbildung induzieren.
Dieser Regenerationsprozess lässt sich in 5 fließend ineinander übergehende Stadien gliedern (7, 13, 37):

- Hämatom und Entzündung
- Angiogenese und Knorpelbildung
- Knorpelkalzifikation
- Knochenbildung
- Remodeling

Durch Zerreißung von Blutgefäßen kommt es im Frakturgebiet zur Ausbildung eines Nekroseherdes und Hämatoms, bestehend aus vorwiegend Erythrozyten und Thrombozyten. Diese sezernieren Wachstumsfaktoren mit chemotaktischer Wirkung und setzen damit eine Kaskade der Proliferation, Migration und Differenzierung von vorwiegend polymorphkernigen Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen und pluripotenten Stammzellen in Gang (98). Dadurch wird im sauerstoffarmen Gebiet das Granulationsgewebe lysiert, phagozytiert und durch faseriges Bindegewebe und Faserknorpel ersetzt (14, 37). Durch das Einwandern von Kapillaren wird die Versorgung des Gebietes mit Sauerstoff verbessert und fördert das Einschwemmen von zur Defektreparatur wichtiger Zellen.
Frakturspaltfern beginnt die periostale Osteoblastenproliferation und die Ablagerung von Geflechtknochen zwischen der Diaphysenoberfläche und dem Periost. Ausgehend vom Periost, Knochenmark, umgebenden Bindegewebe und Kortikalis proliferieren Knorpelzellen und stabilisieren die Frakturzone, indem sie den Frakturspalt überbrücken. Im weiteren Verlauf kalzifiziert der Knorpel, begleitend mit dem Einwachsen von kleinen Blutgefässen und damit von perivaskulären Mesenchymzellen, die sich zu Chondroklasten und Osteoblasten differenzieren. Chondroklasten bauen das Chondroid ab, lassen jedoch

die Verkalkungspunkte stehen. Anschließend setzten sich Osteoblasten an diesen Punkten ab, um anschließend mit der Ausscheidung von Osteoid und der geordneten Ausfällung von Kalksalzen zu beginnen. Somit kommt es zu einer Umwandlung des Kalkgerüstes in Osteoid und neuen Faserknochen. In der letzten Phase erfolgt durch Remodeling die Umgestaltung von Geflecht- zu Lamellenknochen, so dass die ursprüngliche Knochensubstanz und die volle Belastbarkeit wieder hergestellt werden (58).
Dabei nehmen die biomechanischen Bedingungen entscheidend Einfluss auf die knöcherne Regeneration. Eine Spaltgröße von 2 mm oder weniger fördert eine schnelle und mechanisch stabile Heilung (30). Ein Abstand zwischen den Frakturenden von bis zu 6 mm verzögert die Heilung und die mechanische Situation ist weniger stabil als bei kleineren Spalten. Zudem führen interfragmentäre Bewegungen zur schnelleren Kallusüberbrückung des Frakturspaltes (3). Dabei spielt ihre Richtung eine entscheidende Rolle für den Heilungserfolg. Axiale interfragmentäre Bewegungen führen zu einer besseren Knochenheilung, als Bewegungen quer zur Knochenlängsachse (4).

3.1.3 Desmale und enchondrale Ossifikation

Neben der makroskopischen Unterscheidung in primäre und sekundäre Knochenheilung kann eine mikroskopische Unterscheidung der Frakturheilung beobachtet werden: die desmale und enchondrale Ossifikation (138).
Bei der desmalen Ossifikation erfolgt die Knochenneubildung direkt aus einer bindegewebigen bzw. mesenchymalen Vorstufe. Einzelne Mesenchymzellen differenzieren zu Osteoblasten, die um sich herum Grundsubstanz in Form von Osteoid und Kollagenfasern ausscheiden. Durch weitere Osteoidbildung und Verkalkung an schon bestehende Knochensubstanz (108) entwickelt sich aus den einzelnen Ossifikationspunkten schließlich Knochenspangen, die zu einem einheitlichen Geflechtknochen zusammenwachsen.
Enchondrale Ossifikation bedeutet, dass sich hypertrophierte Chondrozyten in ihre Extrazellulärmatrix einmauern und das umgebende Knorpelgewebe kalzifizieren. Anschließend wachsen Kapillare durch die Knochenmanschette in das Innere des Knorpels ein. Chondroklasten bauen den kalzifizierten Knorpel ab und Osteoblasten ersetzen ihn durch Osteoid. Dieses wird mit Kalk angereichert und entwickelt sich so zu Gefechtknochen und durch weiteren Umbau abschließend zu Lamellenknochen (50, 72, 100).

3.1.4 Regionen der sekundären Frakturheilung

Bei der Beobachtung der Frakturheilung wird das Hauptaugenmerk auf die folgend beschriebenen Regionen gelenkt (37, 121):

- Äußere Bindegewebsregion
- Knöcherner Kallus
- Kortikalis
- Kortikaler Frakturspalt

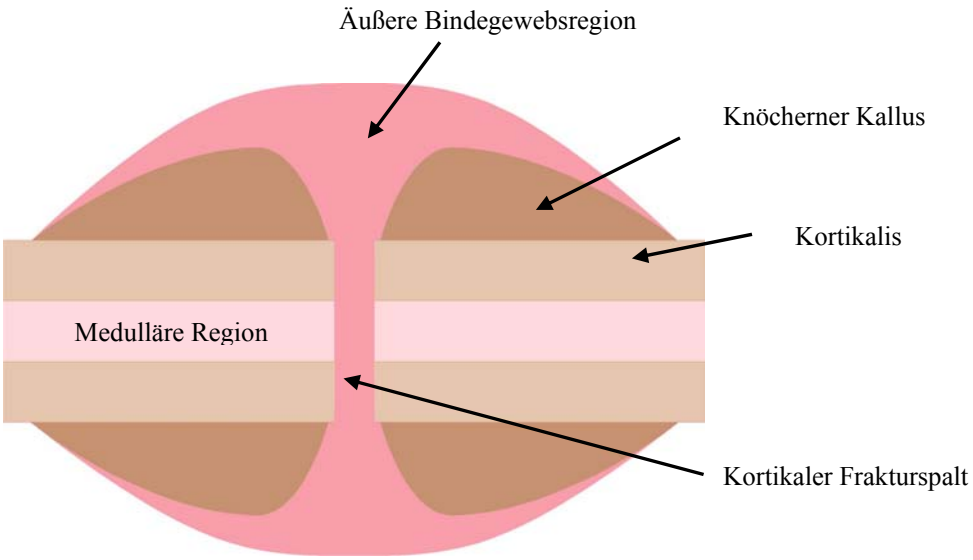


Abb. 1: Einteilung der Frakturzonen

Die früheste Reaktion kann am 3. Tag anhand eines sichtbaren, desmal gebildeten Kallus periostal beobachtet werden. Im weiteren Verlauf findet in der äußeren Bindegewebsregion eine Überbrückung des Frakturspaltes durch einen bindegewebigen Kallus mit knorpeligen Anteilen (soft callus) statt (97, 171). Diese Überbrückung schreitet somit innerhalb von sechs bis acht Tagen von periostal in Richtung Frakturspalt fort und leistet einen wichtigen Beitrag zur mechanischen Stabilität.

Des Weiteren treten innerhalb der medullären Region die Angiogenese und die Umwandlung von fibrösem Gewebe zu Knochen sehr früh auf und sind weitgehend unabhängig von mechanischen Einflüssen.

Bei ausreichender Stabilität bildet der periostal gebildete Geflechtknochen zunächst eine periphere Kallusbrücke und wächst später in die Interkortikalregion ein und verbindet so die Kortikalisenden miteinander (37, 100).

3.2 Weichteilkonsolidierung

Nach einem Weichteiltrauma besteht die Gefahr größerer nekrotischer Areale, sowie der Verlust von Blutvlolumen bzw. Flüssigkeit und Wärme (22). Zur Vermeidung dieser Folgen kommt es zu einem schnellen Wundverschluss, parallel dazu muss der Körper vor dem Eintreten einer Infektion geschützt (107, 170) und die Mikrozirkulation mit Hilfe von Volumensubstitution aufrechterhalten werden (100).
Mit dem Eintritt einer Gewebeschädigung reagiert der Körper häufig mit einer Reaktion, die sich wie folgt in vier Phasen einteilen lässt (17):

- Exsudation/ Entzündung (Tag 1)
- Resorption (Tag 1- 3)
- Proliferation (Tag 3- 6)
- Regeneration und Remodeling (Tag 7- 8)

Die aktive Exsudation beginnt mit der Ausschüttung von Katecholaminen und anschließender Vasokonstriktion der Gefäße im Traumabereich. Dieser Mechanismus führt zu einer lokalen Hypoxie und damit verbundenen Azidose, welche zunächst eine schlechte Ausgangslage für eine gute Heilung darstellen. Deshalb ist es unerlässlich für eine ausreichende Kapillarisierung und eine adäquate Oxygenisierung im Wundgebiet zu sorgen (107).
Nach wenigen Minuten erfolgt durch die Sekretion von Entzündungsmediatoren wie Prostaglandinen, Serotonin, Histamin und Bradykinin eine Dilatation der Gefäße. In der letzten Phase der Entzündung führt das freigesetzte Histamin zur Gefäßkonstriktion der kleinen Venen. Ein intaktes Gerinnungssystem sorgt dafür, dass die ausgiebige Blutung sistiert und ein Hämatom gebildet wird.
Durch die Aktivierung des Komplementssystems im Rahmen der Gerinnungskaskade und die Freisetzung chemotaktischer Substanzen wandern Makrophagen und Granulozyten ins Traumagebiet ein. Sie phagozytieren nekrotisches Muskelareal und wirken chemotaktisch auf weitere Makrophagen. Gleichzeitig wirken sie sich durch die Produktion von Angiogenesefaktoren wie PDGF oder VEGF positiv auf die Rekapillarisierung des Wundgebietes aus (158). Neutrophile Granulozyten bekämpfen eine drohende Infektion, indem sie für die Beseitigung von Mikroorganismen zuständig sind (91).

Durch die Abgabe von mitogenen Substanzen aus Thrombozyten werden die Fibroblastenproliferation und die Proteinsynthese stimuliert. Histamin und Prostaglandine bewirken eine Permeabilitätssteigerung der Kapillaren, die eine Flüssigkeitsverschiebung in Richtung Wundgebiet (Ödem) zur Folge hat. Dadurch wandeln sich Fibroblasten in Fibrozyten und toxische Substanzen werden in ihrer Konzentration vermindert (86).

Die Phase der Reparatur ist gekennzeichnet durch die Bildung neuer Muskelfasern durch persistierende Myoblasten- veraltet auch Satellitenzellen genannt (59) Sie stehen in engem Kontakt zu den Muskelfasern und können durch z.B. FGF zur Proliferation und Teilung angeregt werden. Neben der eigentlichen Reparatur, dominiert die Regeneration: Fibroblasten bilden Granulationsgewebe durch die Produktion von Kollagenfasern (57, 130).

Die letzte Phase widmet sich dem Remodeling und der Herstellung der ursprünglichen Morphologie und Funktion. Bei kleinen Tieren können durch Neubildung von Muskelzellen aus Myoblasten große Muskelschäden behoben werden. Bisher gibt es nur unzureichend Literatur darüber, ob ein vollständiges Remodeling- wie aus der Knochenheilung bekannt- beim Weichteilschaden eines Menschen erfolgen kann.

Es wurde gezeigt, dass die Regeneration eines Muskelschadens beim Menschen einen Zeitraum von 3 Wochen benötigt (49). Carlson und Faulkner stellten eine Ausheilung eines Weichteiltraumas bei Nagetieren bereits nach 14 Tagen fest (22, 23).

3.3 Angiogenese

Die Durchblutung von Röhrenknochen im diaphysären Bereich konzentriert sich fast ausschließlich auf die Markraumgefäße und wird über die metaphysären Arterien, die periostalen Arterien sowie die A. nutricia sichergestellt. Dabei erfolgt die kortikale Blutversorgung aus dem medullären Raum (16). Diese Markraumgefäße dringen zentrifugal durch die Volkmann´schen Kanäle in die Kortikalis, verzweigen sich und breiten sich in den längsgerichteten Havers´schen Systemen aus (33). Dabei gelangen wichtige, für die erfolgreiche Frakturheilung essentielle Zellen und Nährstoffe nur über die Canaliculi zu den Osteozyten. Als Transportwege zu den gefäßferneren Osteozyten werden einerseits die untereinander in Verbindung stehenden Osteozytenfortsätze, andererseits das nicht mineralisierte Osteoid in den Knochenkanälchen genutzt. Der venöse Abstrom erfolgt über die Sinusoide des Markraumes (16).

Man unterscheidet zwei verschiedene Formen von Angiogenese „sprouting“ und „nonsprouting.“ Beim „nonsprouting“ handelt es sich um die Teilung bereits vorhandener Gefäße durch die Fortsätze der extrazellulären Matrix (63, 122). „Sprouting“ hingegen läuft in vier Schritten ab: Zuerst erfolgt die Aktivierung durch einen Stimulus z.B. Hypoxie oder Zytokine. Dadurch wird extrazelluläre Matrix abgebaut, Endothelzellen verändern ihre Form und migrieren in Richtung des Stimulus. Am Ende des Fortsatzes proliferieren die Zellen und beginnen ein Gefäßlumen auszubilden. Durch die Adhäsion der Zellen wird ein kontinuierliches oder fenestriertes Endothelzellmonolayer gebildet, welcher das Lumen umgibt. Zur Stabilisation des neuen Gefäßes sezernieren die Endothelzellen neue extrazelluläre Matrix und werden anschließend von Perizyten und Muskelzellen umgeben (48).

Zahlreiche Faktoren regulieren das Zusammenspiel der Angiogenese. Hierbei seien nur einige wenige genannt: Fibroblast growth factor (FGF-1 und -2) (7, 96), Platelet- derived growth factor (PDGF-AA, -AB, -BB) (7, 96), Transforming growth factor- β (TGF–β) (2, 25, 29), Interleukin- 8 (IL-8) (82) und Melanoma growth stimulatory activity protein alpha (Groα).

Als einer der wichtigsten angiogenetischen Faktoren nimmt der Wachstumsfaktor Vascular endothelial growth factor- kurz VEGF- im Rahmen einer erfolgreichen Frakturheilung eine wichtige Position ein (149). Er regelt im Zusammenspiel mit weiteren, u. a. bereits genannten Faktoren nicht nur die Gefäßneubildung, sondern auch die anschließenden zellulären Prozesse der Knochenheilung (32, 67, 74, 114, 150, 156).

3.4 Das Zytokin Vascular- Endothelial- Growth- Factor (VEGF)

Zytokine sind eine inhomogene Gruppe löslicher Proteine und Peptide kurzer Halbwertszeit, die von verschiedenen Zellarten gebildet und sezerniert werden. Sie dienen als interzelluläre Mediatoren zur Kommunikation der Zellen untereinander. Zytokine wirken normalerweise in nano- oder pikomolaren Konzentrationen und modulieren die Aktivität einzelner Zellen oder Gewebe (73, 143).

Charakteristisch ist ein para- oder autokrines Verhalten. Zytokine können jedoch auch systemische Wirkung entfalten und dadurch wie endokrine Hormone agieren. Sie binden an spezifische hochaffine Rezeptoren und lösen einzelne oder ganze Kaskaden von zellspezifischen Aktionen aus (161).

Das Spektrum der Funktionen, die von Zytokinen koordiniert werden, ist sehr vielseitig. Sie regulieren u. a. grundlegende Zellaktivitäten: Wachstum, Aktivierung, Proliferation, Differenzierung, Migration und Chemotaxis. Auch der programmierte Zelltod, die Apoptose, wird durch Zytokine eingeleitet. Weitere Aufgabe ist die Auslösung systemischer Reaktionen wie Fieber, Septischer Schock, Akute-Phase-Reaktion, Wundheilungsprozesse oder Frakturheilung (20, 40).

3.4.1 Struktur, Isoformen und Rezeptor des VEGF

VEGF wurde erstmals 1983 von Senger et al. als „Vascular permeability factor“ (VPF) beschrieben (140).

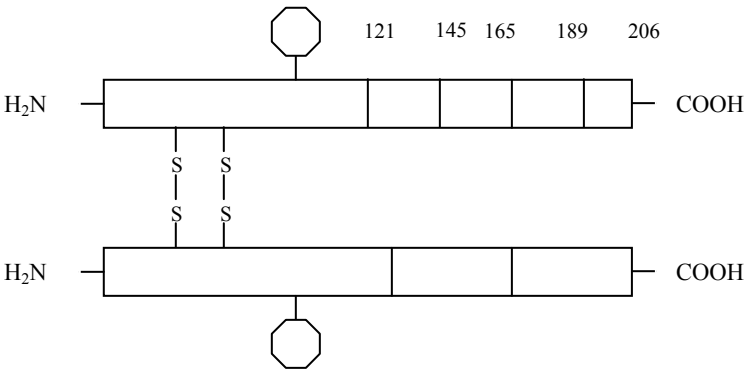


Abb. 2:
Struktur des VEGF A. Es besteht aus zwei über Disulfidbrücken verknüpfte Peptdiketten. Gezeigt sind die unterschiedlich langen Aminosäurenketten der Splicevarianten und die Glykosylierungsstellen.

Als einer der wichtigsten Überlebens- und Wachstumsfaktoren des Gefäßendothels wurde der Vaskulo-Endotheliale-Wachstumsfaktor 1989 durch unabhängige Arbeitsgruppen isoliert und charakterisiert (42, 55, 159).

Inzwischen sind viele weitere Mitglieder der VEGF-Familie identifiziert worden, wie z.B. VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, c-*fos*-induced growth factor (FIGF) oder der Placenta-Wachstumsfaktor PIGF1, 2 und 3, zu dem sich eine ca. 20% Homolgie findet (111). Ihre Funktion ist derzeit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (76, 77, 139). Alle Mitglieder haben die Fähigkeit, Endothelzellen zu stimulieren (105). Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht vor allem das VEGF-A.

VEGF-A ist ein dimeres Glykopeptid von ca. 45 kDa Größe, deren Monomere über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (Abb. 2) (43). Durch alternatives Splicen des VEGF-Genes, entstehen fünf unterschiedliche Isoformen des VEGF beim Menschen (bei der Ratte vier Isoformen: VEGF $_{120, 144, 164, 188}$) (71, 46). Sie werden nach der Länge ihrer Aminosäurenketten bezeichnet und haben unterschiedliche biologische Eigenschaften. So sind die kürzeren Formen $VEGF_{121}$ und $VEGF_{165}$ weitgehend frei diffusibel und haben ein hohes angiogenetisches Potential. Vor allem $VEGF_{121}$ kann unter günstigen Umständen über weite Distanzen wirken, dafür fehlt die Eigenschaft Heparin-Sulfat zu binden. $VEGF_{189}$ und $VEGF_{206}$ haben dagegen eine sehr viel höhere Affinität zu Molekülkomplexen aus Kohlenhydraten und Proteinen (Heparin-Sulfat enthaltene Proteoglykane) der Zelloberfläche und der extrazellulären Matrix als $VEGF_{145}$ und $VEGF_{165}$. Sie sind entsprechend weniger diffusibel und haben ein niedrigeres angiogenetisches Potential (167). Die meisten Zellen produzieren verschiedene Isoformen gleichzeitig. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass während der Frakturheilung die Splicevarianten VEGF $_{121}$ und $VEGF_{189}$ (110) vorherrschend sind.

Kurz nach Entdeckung des VEGF wurden 1990 dessen Rezeptoren durch Vaisman et al. (164) identifiziert. Dabei handelt es sich um intrazelluläre und membranständige spezifische Strukturen, welche für die Vermittlung zwischen VEGF Molekül und dessen biochemisch bzw. physiologische Wirkung auf die jeweilige Zelle zuständig sind.

Die VEGF- Rezeptoren gehören zu der Untergruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Es konnten drei Mitglieder dieser Familie charakterisiert werden: VEGFR-1(flt-1, fms-like tyrosine kinase 1) (34), VEGFR-2 (KDR, flk-1, fetal liver kinase 1)(159, 173) und VEGFR-3 (flt-4) (78).

VEGFR- 1 bindet $VEGF_{121}$ und $VEGF_{165}$. Zusätzlich bindet VEGFR-2 $VEGF_{145}$ (104). Diese Rezeptoren werden auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert, allerdings

kommen sie auch auf einigen anderen Zelltypen vor (u. a. Trophoblastenzellen (27), Monozyten (6), renale Mesangiumszellen (153), hämatopoetische Stammzellen (80), Megakaryozyten, retinale Vorläuferzellen (28) und Tumorzellen). VEGFR-3 (flt-4) konnte nur in Lymphgefäßen gefunden werden und bindet VEGF-C und –D (78).

3.4.2 Aufgaben und Regulation des VEGF

In der Embryonalperiode ist VEGF lebensnotwendig zur Entwicklung des kardiovaskulären Systems (24, 44). Er führt zu einer Induktion der Gefäßneubildung, der Endothelzellproliferation und –migration (45).
Während eine erfolgreiche Embryogenese an das Vorhandensein von VEGF essentiell gebunden ist (41), spielt es im adulten Lebensalter eine etwas untergeordnetere Rolle z.B. im weiblichen Zyklus (93, 160) oder im Rahmen der Wundheilung (47). Vor allem bei pathologischen Prozessen, wie der diabetischen Retinopathie (28), der altersbedingten Makuladegeneration oder rheumatischen Arthritis kann man ein Ansteigen der VEGF Konzentrationen beobachten (114). Zurzeit forscht man intensiv innerhalb der Tumortherapie an der Blockade der VEGF Wirkung auf Tumorzellen und erreicht damit erstaunliche Fortschritte (79, 109, 117). Außerdem nimmt VEGF Einfluss auf den systemischen Kreislauf, denn durch die Stimulation der NO-Synthase in Endothelzellen erfolgt eine Gefäßdilatation mit anschließendem Absinken des Herzzeitvolumens (174).

3.4.3 VEGF in der Frakturheilung

VEGF ist maßgeblich an den zellulären Prozessen der Frakturheilung beteiligt (41). Es lässt sich in gesunden Knochen nicht nachweisen (115).
In der frühen Phase der Knochenheilung ist u. a. dieser Wachstumsfaktor verantwortlich für die Revaskularisierung der Frakturumgebung. Das den Frakturspalt meist umgebende Hämatom enthält reichlich Thrombozyten, welche VEGF produzieren (98). Es kommt zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität und damit zum erleichterten Einwandern sowie Chemotaxis von Entzündungszellen wie Granulozyten, Makrophagen oder Monocyten. Diese und Endothelzellen produzieren ihrerseits Wachstumsfaktoren wie FDF (5), PDGF (11, 141), TGF-β (4, 29, 94, 132, 133), Il-1 und Il-6, welche die Produktion von VEGF stimulieren (8) und locken damit erneut Makrophagen etc. ins Frakturgebiet (38, 39). Andere im Frakturbereich befindliche Wachstumsfaktoren mit VEGF-stimulierenden

Einfluß sind: Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) (9, 36), Prostaglandine E2 und E1 (64) und Fibroblast growth factor 2 (FGF- 2) (133).

Durch das Vorhandensein von VEGF wird die Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten, Osteoblasten (35, 65, 142) und Chondroblasten (21, 53, 147) aus Mesenchymvorstufen angeregt. Diese Zellen sezernieren im reifen Zustand VEGF und stimulieren dabei weiterhin die umgebenden Zellen.

Mit dem Grad der Chondrozytenhypertrophie nimmt die VEGF Produktion und damit die Gefäßneubildung zu. Dabei wachsen vom Knochen ausgehende Blutgefäße in den avaskulären Knorpel. Dadurch wird die Knorpelapoptose eingeleitet, mit den Gefäßen eingebrachte Chondroklasten bauen Knorpelmatrix ab und führen somit zur Umwandlung von Knorpel zu Knochen (21, 52, 66).

Street et al. (150) beobachteten durch die Gabe eines VEGFR-3 Antikörpers eine deutliche Volumenminderung sowohl im fibrösen, wie auch im Knochenkallus. Die exogene Gabe von VEGF führt zur Aktivitätssteigerung der Osteoblasten und der Kallusvaskularisierung. Während am 10. postoperativen Tag in hypertrophierten Knorpelzellen reichlich VEGF im Zytoplasma vorhanden war, konnte im fibrösen Kallus kein VEGF nachgewiesen werden (115). Kleine zentral im Kallus gelegene Knorpelzellen waren wie die Kortikalis der Tibia VEGF negativ. Endothelzellen und Osteoblasten über den gesamten Beobachtungszeitraum hingegen sehr positiv gefärbt (115).

Deckers et al. (35) zeigten eine geringe Produktion von VEGF-A_{120}, -A_{164} A-$_{188}$, VEGF-B und VEGF–D zu Beginn der Osteoblastendifferenzierung und eine maximale Abgabe der Osteoblasten während der Mineralisierung des Knorpels, 21 Tage nach Setzen des Traumas.

Haper und Klagsbrun et al. (66) beobachteten 1999 durchaus rot gefärbte VEGF positive hypertrophierte Knorpelzellen, in ruhenden sowie proliferierenden Knorpelzellen sahen sie keine VEGF Produktion.

Tatsuyama et al. (156) untersuchten die Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren während der Farkturphasen: Makrophagen sezernieren FGF, PDGF und TGF-β und stimulieren dabei Mesenchymzellen (130) und ihre Differenzierung zu Chondroblasten (12). Basic FGF (bFGF) wurde in einfachen Chondroblasten, Chondrocyten und Osteoblasten entdeckt. Sie alle haben stimulierenden Einfluss auf VEGF-produzierende Chondroblasten und hypertrophierte Chondrozyten.

Andere Studien zeigten, dass bei einem hypovolämischen Trauma die systemischen Plasmakonzentrationen von VEGF erhöht sind. Man kann davon ausgehen, dass ein solches Trauma lokale Auswirkungen auf die Umgebung des Frakturbereiches hat.
Eine hypoxische und azidotische (10, 142, 168) Stoffwechsellage dient als einer der Hauptstimuli für die VEGF-Expression durch die oben genannten Zelltypen (19, 45, 95, 145, 146).
Da Knorpelgewebe nicht durchblutet wird, stellt es hiermit eine wichtige VEGF Quelle dar (52). Hiermit stellt sich die Frage, ob ein systemisch veranlasster Volumenmangel auf die lokale VEGF Produktion Einfluss hat.

3.4.4 VEGF in der Weichteilkonsolidierung

Die wichtigste Voraussetzung einer erfolgreichen Weichteilkonsolidierung ist die Wiederherstellung der Kapillarisierung (130). Als ein potenter Angiogenesefaktor findet man VEGF im Traumabereich vor allem in proliferierenden Endothelzellen (154). Über die Produktion bzw. Anfärbbarkeit von VEGF durch die regenerierenden Muskelzellen oder umgebenden Fibroblasten ist im Rahmen der Weichteilkonsolidierung bisher nur wenig bekannt.
Rissanen et al. (123) untersuchten acht Patienten mit kritischer Ischämie und folgender Amputation des Unterschenkels. VEGF lies sich in atrophischen und regenerierenden nicht jedoch in gesunden Skelettmuskelzellen beobachten. Regenerierende Muskelzellen waren anhand ihres kleinen Aussehens und dem zentral gelegenen Zellkern zu erkennen. Je atrophischer bzw. hypoxischer die Muskelzelle, desto stärker war sie angefärbt. Zudem sah er mehr Blutgefäße in der Umgebung atrophischer Zellen. Weiterhin zeigte eine anschließende Hasenstudie eine VEGF-Expression des monozytären Infiltrates und nekrotischen Muskelmaterials am dritten postoperativen Tag. Ein und drei Wochen nach Muskeltrauma und zusätzlicher Muskelischämie stellten regenerierende Myozyten die Hauptquelle von VEGF dar. Nach drei Wochen sah man VEGF negative Fibroblasten. Nach sechs Wochen war die Regeneration weitgehend abgeschlossen. Regenerierende Myozyten produzierten noch geringe Mengen an VEGF.
Während Rissanen et al. (123) eine positive VEGF Reaktion in minderperfundierten Gewebe beobachteten, zeigte Gemani et al. (54), dass auch in normaldurchbluteten Muskelarealen Satellitenzellen VEGF produzieren. Nach ischämischer Phase identifizierte er zusätzlich regenerierende Skelettmuskelfibrillen als VEGF positiv.

Nach submaximalem Ausdauertraining und somit erzieltem metabolischem Stress konnten bei Studienprobanden in Muskelbiopsien zwei bzw. sechs Stunden später, eine erhöhte Konzentration von VEGF-A_{165} und VEGF-A_{189} beobachtet werden (60).
Weitere in vitro Studien belegen, dass in geschädigten Muskeln die Expression von VEGFR-1 und VEGFR-2 in Satellitenzellen und regenerierenden Muskelfibrillen deutlich erhöht ist. Zudem schützt VEGF myogene Zellen vor deren Apoptose (1, 54).

3.5 Klassifikation des Weichteilschadens

Eine Fraktur kann durch ein zusätzliches Weichteiltrauma in ihrer Heilung verzögert werden. Dabei bestimmt die Schwere des Weichteilschadens direkt die Prognose komplexer Frakturverletzungen (135). Gerade deshalb ist es von äußerster Wichtigkeit, eine Einschätzung der Traumaschwere vornehmen zu können.
Da die klinischen Verletzungsbilder von vielen Merkmalen abhängig sind, ist eine richtige Einteilung nach Umfang und Schwere des Traumas nur schwer zu treffen. Sie erfordert deshalb eine sorgfältige klinische Untersuchung (85, 128).
Bisher etablierten sich zwei Klassifikationssysteme: Klassifikation von Frakturen mit offenem Weichteilschaden nach Gustilo (61, 62) und von Frakturen mit geschlossenem Weichteilschaden nach Oestern und Tscherne (107). Neuere Einteilungen, wie die von Knopp et al. (81) konnten sich international noch nicht durchsetzten. Sie empfehlen eine erneute Einteilung mehrere Tage nach dem Trauma, da das wahre Ausmaß des Schadens häufig erst dann zu erkennen ist: Spannungsblasen, peripherer Neurologiestatus, Mikrozirkulation.
In unserer Studie wählten wir das bewährte Klassifikationsschema nach Oestern und Tscherne: Fraktur mit geschlossenem Weichteilschaden (Tab. 1).

Tab. 1: Einteilung der geschlossenen Frakturen nach Oestern und Tscherne (107)
- kein Trauma, + leichtes Trauma, ++ mittleres Trauma, +++ schweres Trauma.

Klassifikation	Weichteilschaden	Fraktur	Kontamination
Grad O	-	+	-
Grad I	+	+ bis ++	-
Grad II	++	+ bis +++	-
Grad III	+++	+ bis +++	-

3.6 Ziele der Arbeit

Unfalltraumata erfordern eine Behandlung vieler einzelner Verletzungen. So werden Frakturen oft von umliegenden Weichteilschäden begleitet und bewirken dadurch sekundär Verzögerungen in ihrer Regeneration (128, 135). Extremitätenverletzungen können zudem zu einem erheblichen Blutverlust führen, der für den Patienten ein potentielles lebensbedrohliches Risiko darstellt. Ein hypovolämisches Schocktrauma verursacht akut nicht nur Störungen der Makrozirkulation, sondern später auch der Mikrozirkulation (101, 135, 165) und erhöht die Infektanfälligkeit (116). Die dadurch bedingte Gewebshypoxie und Gewebsazidose führt zu sekundären Heilungsschäden sowohl im Frakturbereich, als auch im umliegenden Muskelgewebe.
Umso wichtiger erscheint es, für eine ausreichende Volumensubstitution noch am Unfallort zu sorgen. In dieser Studie soll unter anderem geklärt werden, welcher Volumenersatz (isotone Kochsalzlösung oder hyperosmolares NaCl) in der Behandlung kombinierter Fraktur- und Weichteilschäden ein besseres Outcome aufweist.
Eine ausreichende Angiogenese sowohl im Fraktur- als auch im Weichteilgebiet erscheint als eine der wichtigsten Voraussetzungen einer erfolgreichen Heilung, im Sinne der Herstellung der ursprünglichen Gewebestruktur. Der mitunter wichtigste angiogenetische Faktor ist dabei der Vaskulo- Endotheliale- Wachstumsfaktor VEGF. Anhand einer immunoreaktiven VEGF Färbung soll sowohl die Fraktur als auch der Weichteilschaden im Verlauf ihrer Heilungsphasen beurteilt werden.

Im Einzelnen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Welche Zellen produzieren zu welchem Zeitpunkt VEGF im Rahmen der Frakturheilung?
- Welchen Einfluss nimmt ein Weichteilschaden auf diese Expression?
- Welchen Einfluss nimmt ein hypovolämischer Schockzustand und seine Behandlung (Volumensubstitution mit HyperHAES®) auf diese Expression?
- Welche Zellen produzieren zu welchem Zeitpunkt VEGF im Rahmen der Weichteilkonsolidierung?
- Welchen Einfluss nimmt ein hypovolämischer Schockzustand und seine Behandlung (Volumensubstitution mit HyperHAES®) auf diese Expression?

4. Material und Methoden

4.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Für den Tierversuch wurden nach erteilter Genehmigung des Regierungspräsidiums Tübingen (Tierversuchsantrag Nummer 707 vom 17.10.2001) 77 Tage alte, männliche WISTAR Ratten des Versuchtier-Großhandels Charles River Deutschland (Sulzbach, Deutschland) sowie Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) ausgewählt.
Die Tiere, mit einem Gewicht von 365-400g (Mittelwert: 375g) wurden in der Zentralen Tierversuchsanlage (Oberberghof, Universität Ulm) zu dritt oder viert in Makrolon Typ IV Käfigen (35 x 30cm Grundfläche, 20cm Deckenhöhe) gehalten. Dabei herrschte eine Umgebungstemperatur von 21 +/- 1,5°C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 55 +/- 10%. Nach einwöchiger Anlieferung vor Versuchsbeginn, erfolgte die Gewöhnung an Haltung sowie Futter Altromin 1314 Forti (Fa. Altromin, Lage) und Wasser ad libitum mit einem pH Wert von 2,5 bis 3 zur Reduktion der Trinkwasserkeimbesiedelung.
Die Tieranzahl für den jeweiligen Studienarm basiert auf einem Gutachten des Institutes für Biometrie und medizinischer Statistik der Universität Ulm (Leiter Prof. Dr. W. Gaus), in dem die Gesamtzahl der verwendeten Tiere als sinnvoll geplant und zur Durchführung empfohlen wurde.

4.2 Einteilung der Studie und Umfänge

Ziel dieser tierexperimentellen Studie ist es, die Auswirkung einer hypovolämischen Schocksituation und deren Therapie auf den Verlauf einer Frakturheilung und die Konsolidierung eines Weichteilschadens zu untersuchen.
Hierzu wurde ein Studienprotokoll erstellt, welches sich, wie folgt in drei Gruppen aufteilt (Tab. 2):

Arm A: Frakturheilung
Arm B: Weichteilschaden
Arm C: Frakturheilung kombiniert mit Weichteilschaden

Tab. 2: Studieneinteilung
[1]HAES: Hydroxyethylstärke, kolloidales Volumenersatzmittel
[2]SVR: Small Volume Resuscitation, hyperosmolares 7,2% NaCl, HyperHAES
WTS: Weichteilschaden

Studie	Gruppe	WTS	Fraktur	Schock	Volumen	Umfang
Arm A	1	-	+	+	HAES[1]	5
	2	-	+	+	SVR[2]	5
	3	-	-	-	-	5
Arm B	4	+	-	+	SVR	8
	5	+	-	-	SVR	8
Arm C	6	+	+	+	SVR	15
	7	+	+	-	SVR	15
						n= 61

Arm A (n=15) wurde in drei Untergruppen (A1, A2, A3) mit jeweils 5 zufällig ausgewählten Tieren eingeteilt. Nach Erzeugung einer rechten Tibiaquerfraktur mit anschließendem Schock, erfolgte in Gruppe A1 eine Volumenersatztherapie mit kolloidalem und in Gruppe A2 mit osmotischem Volumenersatzmittel. Gruppe A3 diente als Kontrollgruppe, um den Heilungsverlauf ohne Volumenersatztherapie untersuchen zu können.

Nach einem Beobachtungszeitraum von 1, 3, 7, 14 und 28 Tagen wurde zufällig jeweils ein Tier ausgewählt und getötet.

Arm B (n=16) wurde in zwei Untergruppen (B1, B2) mit jeweils 8 zufällig ausgewählten Tieren eingeteilt. Nach Erzeugung eines Weichteilschadens am rechten Unterschenkel, erfolgte nach den Erfahrungen aus den Vorversuchen die Volumenersatztherapie mit dem osmotischen Volumenersatzmittel (Gruppe B1). Gruppe B2 diente als Kontrollgruppe ohne herbeigeführte Schocksituation. Die Tötung der jeweils zwei Tiere erfolgte hier nach den Beobachtungszeitpunkten 1, 3, 7, und 14 Tage. Auf den Beobachtungszeitraum 28 Tage wurde hier verzichtet, weil man davon ausging, dass der Weichteilschaden nach 14 Tagen weitgehend verheilt sein sollte.

Arm C (n=30) wurde ebenfalls in zwei Untergruppen (C1, C2) mit jeweils 15 zufällig ausgewählten Tieren eingeteilt. Mit ihr wurde ein Kombinationstrauma aus Weichteilschaden und Fraktur untersucht. Das methodische Vorgehen entspricht dem der Gruppen A und B, wobei hier ein Beobachtungszeitraum von 28 Tagen eingehalten wurde. Zu jedem Heilungszeitpunkt wurden zufällig drei Tiere ausgewählt und getötet.

4.3 Frakturmodell

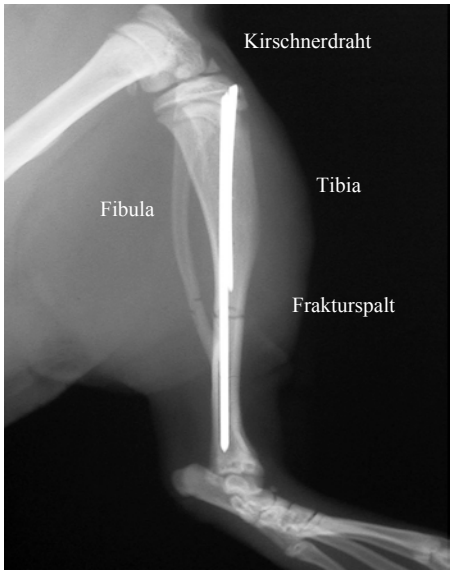


Abb. 3:
Röntgenaufnahme des Rattenunterschenkels nach Fraktur und Fixation mit Kirschner Draht

Als Frakturmodell diente die quere Osteotomie lokalisiert im mittleren Abschnitt der Diaphyse ca. 3 cm distal des Tibiaplateaus der Ratte (Abb. 3). Diese Osteotomie wurde anschließend durch eine Marknagelung mittels zweier Kirschner-Drähte (Mizuho Medical Co., Tokyo, Japan) versorgt, der klinisch üblichen und heute standardisierten, am meisten verbreiteten Methode zur Stabilisierung von Frakturen der langen Röhrenknochen (87, 131). Diese wurden appliziert, ohne den Markraum durch Aufbohrung zusätzlich zu beschädigen (151).

Durch die flexible Fixierung der Frakturenden kam es sehr rasch zur Bildung eines großen Frakturkallus, welcher sehr einfach in der späteren Histologie zu untersuchen war.

4.4 Operationsablauf

4.4.1 Anästhesie und Operationsvorbereitung

Nachdem das Tier in den Operationssaal (Labor 214 der Tierversuchsanlage, Oberberghof) gebracht worden war, wurde das Köpergewicht ermittelt. Zusätzlich legte man für jedes zu operierende Tier ein Narkoseprotokoll an.
Im Rahmen der Operationsvorbereitung erfolgte eine Rasur des rechten Rattenbeines sowie des Halses oberhalb des Sternums.
Nach subkutaner Prämedikation (Atropinsulfat® Hersteller Braun AG, Melsungen mit Atropin 0,05ml/kg KG), wurde die Ratte zehn Minuten später in Rückenlage fixiert und die Narkose mit einer intraperitonealen Mischinjektion (0,8ml Rompun® + 1ml Ketanest® 10%) eingeleitet (Rompun® 2%, Hersteller Bayer, Deutschland mit Xylazinhydrochlorid 12 mg/kg KG sowie Ketanest®, Hersteller WDT, Deutschland mit Ketamin 75 mg/kg KG).
Nach Wirkungseintritt der Narkose wurde die Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung von einem Pulsoxymeter (Nellcor, USA) am linken Hinterlauf kontinuierlich bestimmt.
Die Augen wurden mit Vidisic®Gel (Dr. Mann Pharma, Berlin) zum Schutz vor Hornhautaustrocknung versehen.
Das Operationsgebiet wurde anschließend mit Äthanol 70% und Kodan®-Spray (Schülke und Mayr GmbH) desinfiziert und nach Trocknung unter Verwendung von sterilen OP-Tüchern abgedeckt.
Mit Hilfe eines Wärmekissens versuchte man eine Auskühlung des Tieres zu verhindern.

4.4.2 Operatives Vorgehen

Weichteilschaden

Der Weichteilschaden wurde anhand einer modifizierten Apparatur nach Schaser et al (135) auf Höhe des Musculus gastrognemicus durchgeführt (Gruppe B1, B2, C1, C2). Dazu verwendete man ein Guillotine-System, auf dessen Amboss, die zu traumatisierende Extremität (rechts) platziert wurde. Ein Fallgewicht (170g) aus einer definierten Fallhöhe (1,80m) wurde auf eine Aufprallgeschwindigkeit von 5,94 m/s beschleunigt und übertrug anschließend die freigesetzte Energie über eine Gegendruckplatte auf das Weichteilgewebe

(Kontusionstrauma). Zunächst wurde ein Impact von medial nach lateral appliziert, danach von lateral nach medial, um ein reproduzierbares klinisches Weichteiltrauma Grad II nach Oestern und Tscherne (107) zu erreichen.

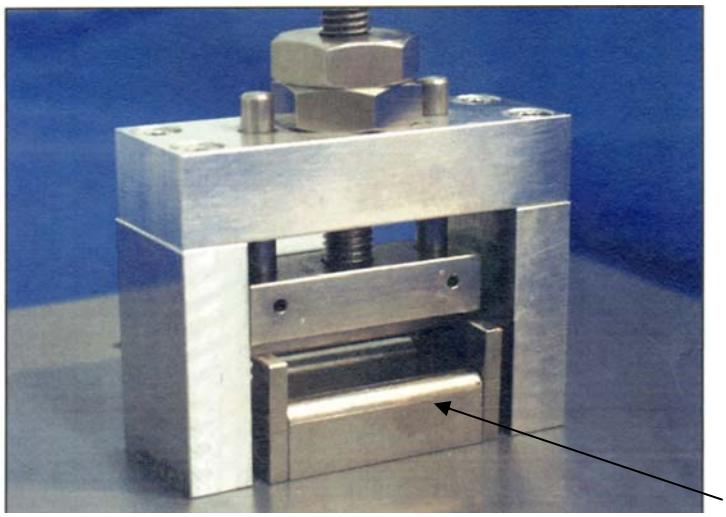


Abb. 4:
Apparatur zur Erzeugung eines Weichteilschadens

Fraktur

Die Fraktur der Tibia und distalen Fibula wurde auf gleicher Höhe unter Verwendung einer instituteigenen modifizierten Apparatur nach Bonnarens (9) über eine Drei-Punkt-Biegung ohne Weichteilschaden erzeugt (Gruppe A1, A2, A3, C1, C2). Dazu wurde die Einrichtung zur Erzeugung des Weichteilschadens so modifiziert, dass die beiden abgeflachten Blöcke durch ein Dreipunktauflager ersetzt wurden. Die Fraktur des Unterschenkels wurde mit einem Fallgewicht von 650 g (Fallhöhe 13 cm) und einer Aufprallgeschwindigkeit von 1,6 m/s erzeugt.

Die unaufgebohrte und unverriegelte Marknagelung erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt durch einen 0,7 mm breiten intramedullären Kirschner-Draht, wobei ein zweiter Kirschner-Draht zur Verbesserung der Rotationsstabilität im proximalen Anteil verklemmt wurde (Abb.5).

Anschließend Desinfektion des Wundgebietes und Anlage eines Klebesprühverbandes (Sprühpflaster Johnson & Johnson, Deutschland).



Abb. 5:
Frakturkonsolidierung mit einem Kirschner- Draht

Hypovolämische Schocksituation

Bei den Schocktieren (Gruppe A1, A2, B1, C1) wurden zusätzlich mittels eines paramedianen Schnittes (Skalpell Nr.15, Feather, Japan) die Halsgefäße freipräpariert und nach zentraler Ligatur (Vicryl 4-0, Polyglactin 910, Johnson & Johnson, Deutschland) der V. jugularis externa dextra ein Zentralvenenkatheter (Vygon Leader Cath 20 G- 8 cm REF 115.09, Deutschland) mit Hilfe eines Seldinger-Drahtes gelegt. Über ihn wurde individuell je nach Narkosetiefe 0,03- 0,1 ml Ketamin zur Aufrechterhaltung des Narkosezustandes und 0,1- 0,15 ml 1000 IE Heparin (Liquemin N 5000, Heparin-Natrium, Hoffmann- La Roche AG, Deutschland) zum Spülen des Katheters zugeführt.

Ein möglichst herznaher Katheter der A. carotis dextra wurde mit Hilfe eines Dreiwegehahns (Discofix, Braun, Deutschland) an einen Überwachungsmonitor (Servomed Hellige, Deutschland) angeschlossen, um ein Dauermonitoring des mittleren arteriellen Druckes (MAP) zu gewährleisten.

MAP, Sauerstoffsättigung und Herzfrequenz wurde jede Minute protokolliert (zeitlicher Mittelwert der Drücke am jeweiligen Messort im Arteriensystem).

Um einen hypovolämischen Schock herbeizuführen, musste innerhalb von 10 min 10ml/kg KG Blutvolumen aus dem Dreiwegehahn des arteriellen Katheters entnommen werden, d.h. pro Minute wurde 1/10 der Dosierung entnommen, wobei darauf geachtet wurde, dass der mittlere arterielle Druck nicht unter 60 mmHg fiel und mittels Heparinspülung der Zentralvenenkatheter frei lag.

Anschließend wurde eine Schockphase von 20 min eingehalten, bevor den Tieren der Gruppe A1, wiederum in einer Zeit von 10 min, HAES 6% (HAES 200/0,5, Fresenius-Kabi, Deutschland) isovolumetrisch bzw. der Gruppe A2 SVR (4ml/kg KG, Fresenius-Kabi, Deutschland) über den Zentralvenenkatheter zugeführt wurde (Abb. 6).
In den Weichteilschadengruppen wurde das hypovolämische Schocktrauma ausschließlich mit SVR substituiert, da Vorversuche eine deutlichere Stabilisierung der Vitalparameter zeigten und weniger Tiere zu Tode kamen.
Zur Verhinderung einer Sepsis wurde das Operationsgebiet mehrmalig desinfiziert. Ab einer Sauerstoffsättigung unter 70% wurde den Tieren über eine Maske O_2 zugeführt.
Bevor die Katheter entfernt wurden, erfolgte ein 10 minütiges Monitorring, sowie die Osteosynthese der Tibiaquerfraktur. Dazu wurde die Tibia zunächst manuell reponiert und anschließend intramedullär mit Hilfe eines Kirschner-Drahtes (Durchmesser 0,7mm) stabilisiert. Hierzu wurde medial der Tuberositas tibiae über eine Stichinzison der Draht in den Markraum eingedreht. Nach Entfernung des überstehenden Drahtanteils, wurde ein zweiter K-Draht von lateral der Tuberositas tibiae in den Markraum eingebracht, der die Fraktur nicht kreuzte, jedoch den ersten Draht verkeilte und somit eine Stabilisierung der Rotation gewährleistete. Die Fibulafraktur wurde nicht stabilisiert. Der Hautverschluss erfolgte mittels Sprühpflaster.
Nach Explantation der Katheter erfolgte eine vollständige Ligatur der Gefäße mit Vicryl 4-0-Faden (Fa Ethicon, Hamburg). Der Wundverschluss der Haut erfolgte durch Einzelkopfnähte mit Risolon 3-0 –Faden (Fa. Ethicon, Hamburg).

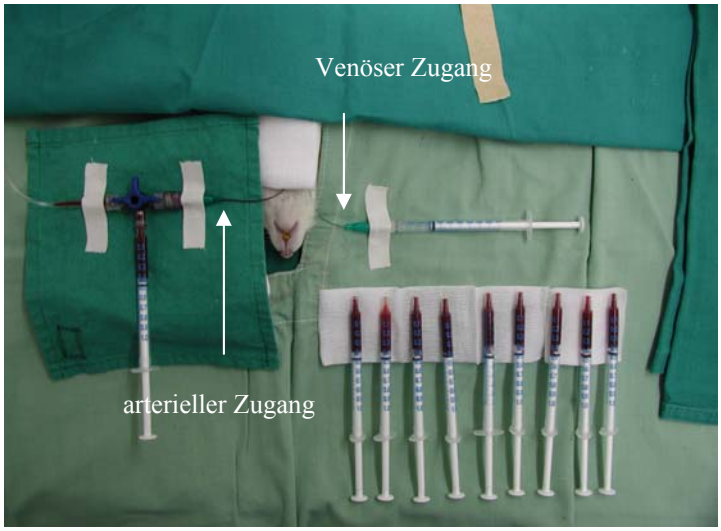


Abb. 6:
Anlage zur Herbeiführung eines hypovolämischen Schockzustandes

Zur Schmerzmedikation in den ersten 24 Stunden postoperativ wurde einmalig Tramal (1,5mg/kg KG, Grünenthal, Aachen) subkutan verabreicht.
Auf eine Infektionsprophylaxe mit einem Antibiotikum wurde verzichtet, da sich bei keiner Ratte postoperativ Wundheilungsstörungen beobachten ließen.
Von jeder Ratte wurde unmittelbar postoperativ eine Röntgenaufnahme (Faxitron, 43805NX- Raysystem, Hewlett Packard, USA) auf AGFA Filmmaterial (24 x 30 cm) in Bauchlage bei abduzierten Extremitäten durchgeführt, um eine korrekte Stellung der Fraktur sowie der Implantate zu gewährleisten. Expositionsdaten: 25-30 kV, 3mA für 5 Minuten.

4.5 Postoperatives Vorgehen

4.5.1 Haltung und Pflege

Anschließend wurden die Tiere postoperativ in ihre Einzelkäfige verbracht (bei freiem Zugang zu Futter und Wasser), wo sie unter täglicher Kontrolle der allgemeinen Gesundheit und der Frakturstabilisierung bis zu ihrer Tötung verblieben.
Eine qualitative Bewertung des Bewegungsablaufs als Gütemaß für die Belastung der frakturierten Extremität wurde ebenfalls vorgenommen.

4.5.2 Versuchsabschluss

Die Tötung der Tiere erfolgte zu den Zeitpunkten 1, 3, 7, 14 und 28 Tag- entsprechend der Gruppeneinteilung und deren Beobachtungszeitpunkte- mittels einer intrakardialen Injektion von Ketanest® (Ketamin 0,6ml kg/ KG). Kurz zuvor wurde jedem Tier zur Narkoseeinleitung eine intraperitoneale Injektion von Ketanest® (Ketamin, 75mg/kg KG) und Rompun® (Xylazin, 12mg/kg KG) verabreicht.
Zur Kontrolle der korrekten Lage der Marknägel wurde erneut eine Röntgenaufnahme des gesamten rechten Unterschenkels im Vergleich zur Gegenseite angefertigt und anschließend die Tibiae und Fibulae explantiert (Abb. 7 und 8).



Abb. 7:
Explantierte untere Extremitäten der Gruppe 7 (WTS)
Links: Frakturierte Tibia und Fibula + WTS
Rechts: Gesunde Gegenseite

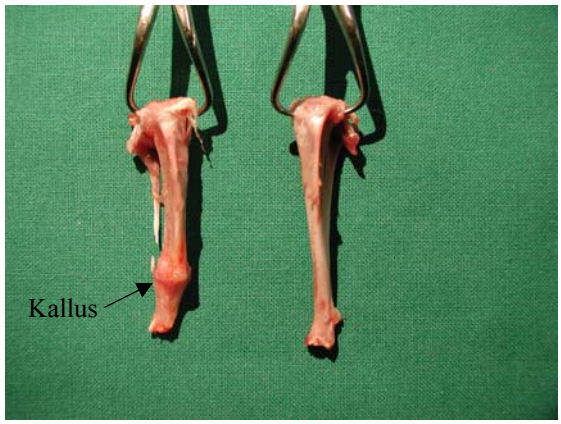


Abb. 8:
Explantierte untere Extremität der Gruppe 1 (Fraktur)
Links: Deutlich erkennbarer Kallus der Tibia
Rechts: Gesunde Gegenseite

4.6 Histologische Aufarbeitung

4.6.1 Paraffinhistologie

Nach Tötung der Tiere wurden deren rechte sowie linke untere Extremität auf Höhe des Kniegelenkes abgetrennt, die K- Drähte bei Frakturtieren entfernt, die Präparate auf ein Gebiet von 0,5 bis 1cm proximal und distal des Frakturspaltes zugesägt und anschließend in abgepufferter, neutraler 4% Formalinlösung (pH 7,0- 7,4) für 16 Stunden eingelegt und somit fixiert. Nach der Fixierung wurde das Formalin vier Stunden unter fließendem Leitungswasser ausgewaschen (124).

Sämtliche Präparate wurden der entkalkten Knochenhistologie zugeführt (112). Um die Entkalkung der Knochenstückchen durchführen zu können, musste das Formalin nochmals mittels PBS und 6% Glucoseansatz ausgewaschen werden. Anschließend erfolgte die Entkalkung nach VERSEN mit EDTA- Lösung über einen Zeitraum von 18 Tagen unter achtmaligem Wechsel der Lösung und abschließendem Auswaschen der Säurelösung durch PBS- Saccharose- Lösung. Durch eine aufsteigende Ethanolreihe wurden die Präparate gründlich entwässert und entfettet, um einer späteren Schrumpfung oder Sprödigkeit des Paraffinmaterials und einer schlechteren Schneidbarkeit entgegen zu wirken. Anschließend wurden die Unterschenkel in eine mit flüssigem Paraffin gefüllte Edelstahlausgießform gegeben. Nach ca. 15 Minuten waren die Paraffinblöcke erkaltet (125).

Von diesen Paraffinblöcken konnten je nach Materialbeschaffenheit 4-5 µm dünne Schnitte an einem Mikrotom (Schlittenmikrotom SM 2500 E, Leica Instruments GmbH, Nussloch) angefertigt werden (126). Vor dem Schneiden wurde das anteromediale Weichteilgewebe reseziert.

Von sämtlichen Präparaten der späteren Immunenzymhistologie wurden zwei Gruppen von Längsschnitten angefertigt: eine Schnittfolge mit Knochen und knochennahem Weichteilgewebe und eine zweite Schnittfolge mit nur Weichteilgewebe. Die operierten Tibiae und Fibulae wurden zentral, anteromedial längsgeschnitten. Anschließend wurden die Paraffinpräparate auf vorhandene Objektträger gebracht (127).

4.6.2 Immunenzymhistologie

Je 1 Tier pro Gruppe des Armes A, 2 Tiere pro Gruppe des Armes B und je 3 Tiere pro Gruppe des Armes C wurden anschließend der histologischen Immunenzymtechnik zugeführt.

Sämtliche Paraffinschnitte wurden zunächst durch eine aufsteigende Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert. Eine zehnminütige Andauung mit 0,1% Pronase-Lösung diente der Antigenmaskierung. Anschließend erfolgte die Inkubation des VEGF-Rattenantigens mit Verdünnungen (1:50, 1:75, 1:100 mit TBS) des Primärantikörper (VEGF (147): sc- 507, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) über Nacht. Dieser polyklonale IgG-Antikörper (200 µm/ml) entstammt dem Kaninchen und erfasst die 121, 165 und 189 Aminosäuren VEGF-Splice-Varianten des Menschen, Maus und der Ratte.

Die Präparate wurden fünf Minuten mit TBS (Tris gepufferte Kochsalzlösung) gespült, danach mit einem sekundären Antikörper (DAKO EnVision™ , DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg) über 30 Minuten inkubiert, der der Ziege entstammt und gegen die Anti-Kaninchen-/ Rattenimmunglobuline gerichtet ist.

Dieser Anti-Antikörper konjugiert an Alkalische Phosphatase markiertes Dextranpolymer in PBS-Puffer mit Trägerproteinen und Natriumthiazid.

40 Minuten vor Ablauf der Inkubation der Primär-Antikörper-Verdünnung wurde der Sekundärantikörper mit 5% Rattenserum inaktiviert, um eine Reaktion mit Antigenen des Rattenpräparats zu verhindern.

Anschließend erneute Spülung durch TBS und Inkubation mit einem geeigneten Substrat-Chromogen (Vector-Red-Substrat-Kit, Fa. Vector/ Linaris, Wertheim-Bettingen) für ca. 10

Minuten , Zellkerngegenfärbung mit Methyl-Grün (DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg) für ca. 5 Minuten und Eindecken des fertigen Präparats mit Merckoglas.
Neben den Verdünnungspräparaten wurden VEGF-Negativkontrollen ohne Kaninchen-Anti-IgG, sowie VEGF-Positivkontrollen an Rattennieren- und Human-Mamma-Schnitten angefertigt. Die linke untere Extremität des Armes A (Gruppe1-3) wurde zusätzlich zur Kontrolle gegenüber der operierten Gegenseite der histologischen Aufarbeitung unterzogen.

4.7 Histologische Auswertung

Die histologischen Präparate wurden zunächst mit einem Photomikroskop Axiophot (Fa. Zeiss, Oberkochen) in unterschiedlichen Vergrößerungen subjektiv beurteilt: dazu wurden zunächst Skizzen angefertigt, die den morphologischen Verlauf der Frakturheilung (knöcherne Durchbauung und Aktivitätszonen) innerhalb der verschiedenen Gruppen verdeutlichen sollten. Zudem wurde die unterschiedliche Entwicklung der einzelnen Zelltypen anhand der in der Literatur beschriebenen Frakturphasen nachvollzogen.
Die im Folgenden aufgezählten Zellen sind maßgeblich an einer erfolgreichen Fraktur- und Wundheilung beteiligt und dienten der weiteren Auswertung. Dabei wurde auf eine rötliche positive VEGF- Färbung der Entzündungszellen um das Frakturgewebe, der Bindegewebszellen in Fraktur-, bzw. Kallusregion, sowie in dem umgebenen Weichteilgewebe, der Osteoblasten, Knorpelzellen, auf die eventuell vorhandene knöcherne Durchbauung des peripheren Kallus und auf die Konsolidierung des vorhandenen Weichteilschadens geachtet.
Zur histologischen semiquantitativen Auswertung wurden die Präparate in der Übersicht mit einer Digitalkamera Coolpix 950 (Fa. Nikon, Japan) fotografiert, die an das Mikroskop (Axiophot, Fa. Zeiss, Oberkochen) angeschlossen wurde (Abb. 9).



Abb. 9:
Mikroskop Axiophot mit angeschlossener Bildverarbeitungsanlage

4.7.1 Frakturheilung

Unterschieden wurde innerhalb der Frakturgruppen zwischen einer begleitenden Weichtteilkonsolidierung (Gruppe 6 + 7), einem zusätzlich zugeführtem hypovolämischen Schocktrauma (Gruppe 1 + 2 + 6) und der Therapie dieses Traumas (HAES: Gruppe 1; SVR: Gruppe 2, 6, 7; keine Therapie: Gruppe 3).

Die Präparate wurden zum einen rein deskriptiv ausgewertet und zum anderen mittels einer Vertikalen durch den Frakturspalt und einer Horizontalen durch den Markraum in vier Quadranten eingeteilt. Jeder dieser Quadranten enthielt vier Zonen: Zone 1 Frakturspalt, Zone 2 nicht überbrückter Kallus auf Höhe des Osteotomiespaltes, Zone 3 periostaler Knochen-Knorpelkallus und Zone 4 angrenzendes Weichteilgewebe in Form von Muskulatur und Bindegewebe. (Abb. 10)

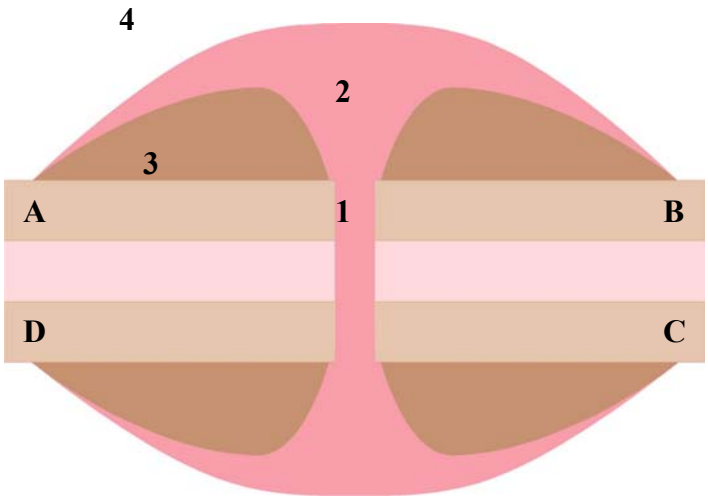


Abb. 10:
Schema Fraktur mit Kallus sowie eingezeichnete Quadranten und Zonen
1= Frakturspalt, 2= nicht überbrückter Kallus auf Höhe des Frakturspaltes,
3= periostaler Knochen- Knorpelkallus, 4= Weichteilgewebe.

Dabei muss beachtet werden, dass auf Grund der Individualität des Heilungsvorgangs die Grenzen dieser Zonen von Schnitt zu Schnitt leicht variierten (Abb. 11).

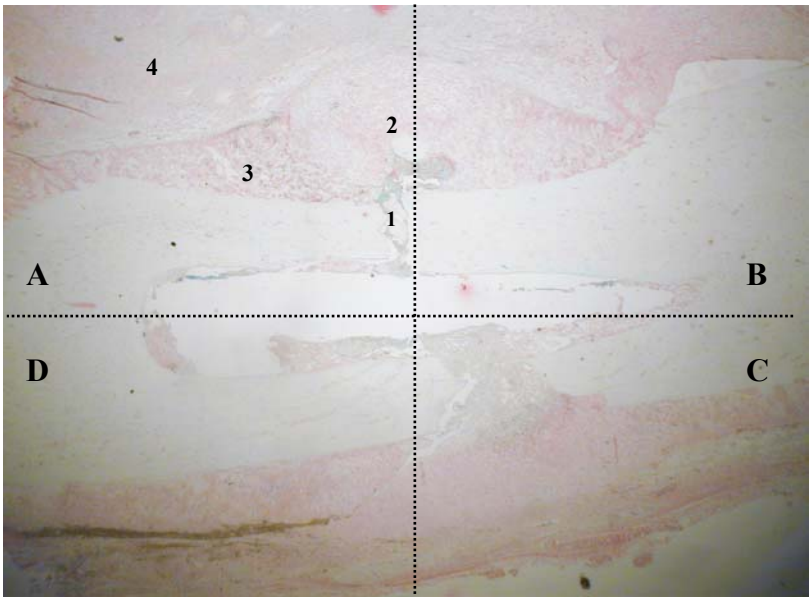


Abb. 11:
Tibia mit Frakturspalt, Kallus und eingezeichneten Quadranten
sowie Zonen

Für die Auswertung wurden fünf, für die erfolgreiche Frakturheilung essentielle Zelltypen herangezogen: Entzündungszellen, Fibroblasten, Osteoblasten, Chondroblasten und hypertrophierte Chondrozyten.

Die Unterteilung in aktivierte und hypertrophierte Knorpelzellen wurde vorgenommen, da diese ein unterschiedlich starkes Färbeverhalten zeigten und zudem einen bedeutenden Platz im Verlauf der enchondralen Ossifikation einnehmen.

Jede Zone in den Quadranten A- D wurde hinsichtlich der positiven VEGF- Färbung für jeden dieser fünf Zelltypen ausgewertet.

Eine positive rote, für die beschriebene VEGF- Immunenzymhistologie typische Färbung des jeweiligen Zelltyps wurde mit 1, keine Anfärbung mit 0 bewertet.

So ergab sich pro Gruppe für jeden Heilungszeitpunkt ein Quadrantendurchschnitt für jede Zone hinsichtlich eines Zelltypmerkmals zwischen 0/4 und 4/4 bzw. 0% und 100%.

0% bedeutet in keiner der Zonen ist eine Zellaktivität für VEGF Produktion vorhanden, 100% sagt aus, dass in jeder Zone aller vier Quadranten der zu untersuchende Zelltyp VEGF produziert (unabhängig davon wie viel Zellmaterial angefärbt war).

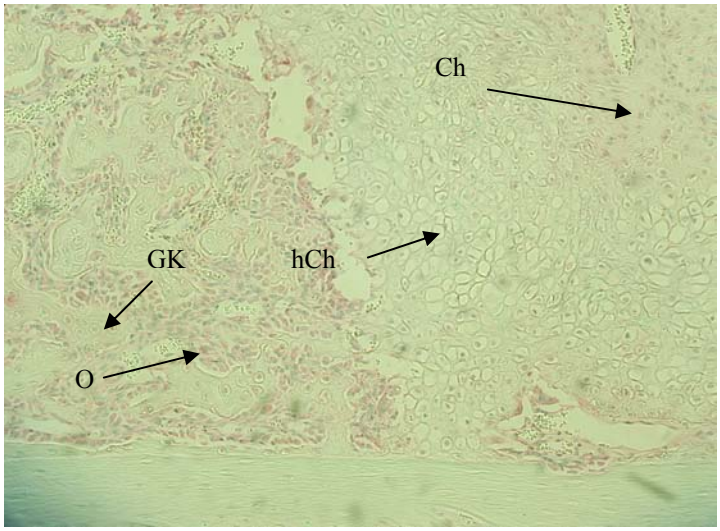


Abb. 12:
Links: Geflechtknochen (GK) mit VEGF-positiv angefärbten Osteoblasten (O).
Rechts: Knorpelgewebe mit positivangefärbten Chondroblasten (Ch) und hypertrophierte Chondrozyten (hCh).

4.7.2 Weichteilschaden

Die Auswertung des angrenzenden Weichteilschadens wurde rein qualitativ vorgenommen und beschreibt den Verlauf der Phasen der Weichteilkonsolidierung und der daran beteiligten hauptsächlich VEGF- produzierenden Zellen (Entzündungszellen, Fibroblasten, Myoblasten).
Unterschieden wurde innerhalb der Weichteilschadengruppen zwischen zusätzlich zugeführten hypovolämischen Schocktrauma (Gruppe 4, 6), sowie einem begleitenden Frakturereignis (Gruppe 6, 7).
Die Dokumentation erfolgte wie auch bei der Frakturheilung anhand digitaler Fotoaufnahmen der Digitalkamera Coolpix 950 (Fa. Nikon, Japan).

4.8 Statistik

Auf eine statistische Auswertung der wenigen Tiere wurde verzichtet. Es erfolgte stattdessen eine deskriptive histologische Beschreibung, sowie eine Richtungsweisende semiquantitative Auswertung.
Alle Berechnungen und Tabellen der Studie wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel (Version 2002; Microsoft Inc.) durchgeführt.

5. Ergebnisse

5.1 Postoperativer klinischer Verlauf

Die Ratten erholten sich rasch nach der Operation und zeigten nach wenigen Stunden eine Wiederaufnahme des Ess- und Trinkverhaltens. Die Fixierung durch die nachfolgende Marknagelung führte zu keiner wesentlichen Bewegungsbehinderung des Versuchtieres.
Nach der Operation wurden die Tiere in ihre Käfige zurückgebracht. Dabei hing die Aufenthaltsdauer von dem Anhalten der Narkose ab. Eine fortlaufende Beobachtung bis zum Aufwachen der Ratten wurde durch den Operateur gewährleistet. Anschließend wurden sie ihrem gewohnten 12-stündigen Tag- Nachtrhythmus zugeführt.
Die ersten drei postoperativen Tage wurde das Trink- und Essverhalten, sowie die Bewegungsaktivität der Ratte qualitativ betrachtet. Dabei zeigte sich eine deutliche Lastenzunahme des frakturierten Beines zwischen dem zweiten und dritten postoperativen Tag.
Das Körpergewicht wurde regelmäßig überprüft (am ersten postoperativen Tag, anschließend einmal pro Woche). Bei starkem Gewichtsverlust erhielten die Tiere zusätzlich Sonnenblumenkerne.
Eine Dislokation der Fragmentenden oder ein Nagelbruch konnte nicht beobachtet werden. Zudem ließen sich keine Infektionen im Bereich der operativen Hautinzision oder im Frakturspalt beobachten.

5.1.1 Histologische Aufarbeitung

Die Präparate der Gruppen 1-3 mussten am Ende der Versuchsreihe wegen Farbverlust der Immunanfärbung erneut gegengefärbt werden. Qualitativ konnte nach der Farbauffrischung kein Intensitätsunterschied zu den anderen Gruppen festgestellt werden, so dass alle Präparate ausgewertet wurden.

5.2 Auswertung der Frakturgruppen

5.2.1 Semiquantitative Auswertung der Frakturheilung

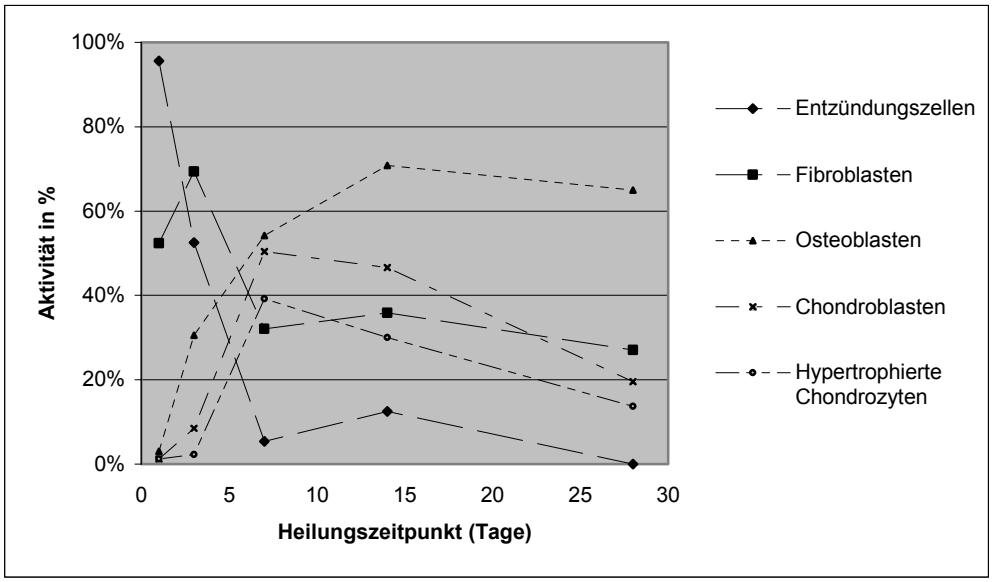


Abb. 13:
VEGF- Produktion der einzelnen Zelltypen je Beobachtungszeitraum (1., 3., 7., 14. und 28. postoperativer Tag).
Punkte: prozentuale Aktivität der Zelltypen je Beobachtungszeitraum.

Insgesamt konnte die Einteilung in Frakturphasen anhand unserer Studie immunhistologisch bestätigt werden (Abb. 13):

1.- 3. Tag: Inflammation und Hämatom

3.- 7. Tag: Organisation (soft callus), desmale Ossifikation und Knorpelbildung

7.- 14.Tag: Desmale und enchondrale Ossifikation (hard callus)

14.-28 Tag: Remodeling

Am ersten postoperativen Tag war in keiner der Frakturgruppen eine Kallusbildung erkennbar. Das histologische Bild wurde von Hämatomen dominiert, welche sich vor allem (bedingt durch den Abriss von Blutgefäßen) zwischen und über den Frakturenden, im Markraum und periostal des Knochens befanden (Abb. 14). Zusätzlich erkennbar war die Einwanderung von VEGF- produzierenden und damit positiven Entzündungszellen, bestehend aus neutrophilen Granulozyten und phagozytierenden Makrophagen, welche für die Organisation und Abbau des Hämatoms, sowie der nekrotischen Anteile der Fraktur verantwortlich waren (Abb. 13).

Durch die Produktion von VEGF wurden weitere, für die erfolgreiche Frakturheilung notwendige Zellen angelockt und zur Zellproliferation, - differenzierung, –migration sowie zusätzlicher VEGF- Produktion angeregt. Die durch die VEGF- Wirkung bedingte Permeabiliätssteigerung diente ebenfalls dem erleichterten Einwandern noch weiterer Zellen, steigerte die Entwicklung der Angiogenese und entließ Fibroblasten in den extravasalen Raum.

Das Einwachsen von Kapillaren, Fibroblasten sowie Mesenchymzellen aus dem umliegenden Gewebe war zudem durch eine ebenfalls auffällig rötliche VEGF-Färbung gekennzeichnet (Abb. 15).

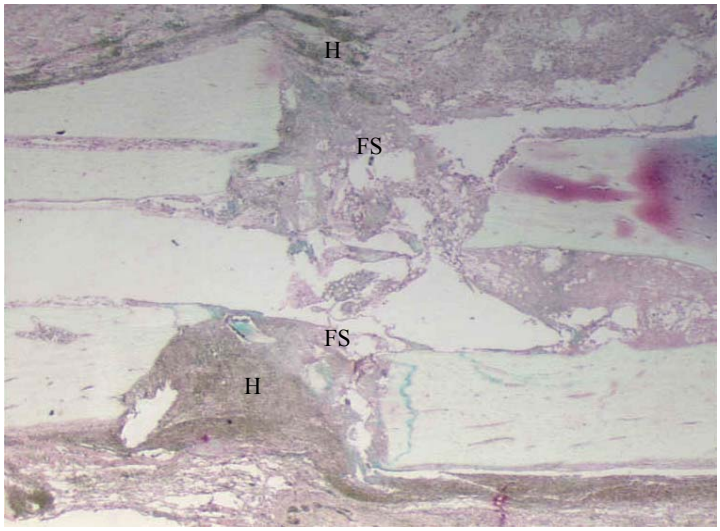


Abb. 14:
Histologischer Schnitt der Gruppe **Fraktur** am ersten postoperativen Tag zur Beurteilung der Fakturheilung (VEGF Färbung, Vergrößerung 2,5fach).
Um den Frakturspalt (FS) gelegenes Hämatom (H).

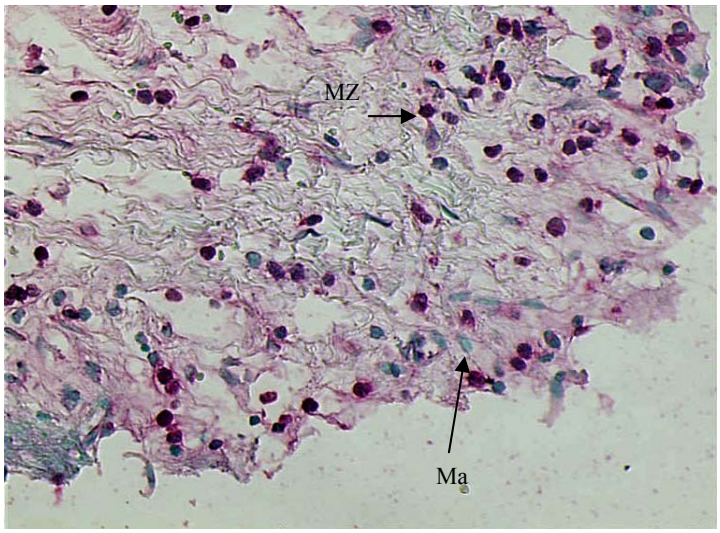


Abb. 15:
Histologischer Schnitt der Gruppe **Fraktur** am ersten postoperativen Tag zur Beurteilung der Fakturheilung (VEGF Färbung, Vergrößerung 40fach).
Undifferenziertes Bindegewebe mit Mesenchymzellen (MZ), VEGF produzierende Granulozyten und Makrophagen (Ma)

Der dritte postoperative Tag zeichnete sich durch einen fibrösen Kallus aus, bestehend aus maximal VEGF- produzierenden Fibroblasten, Kollagen und undifferenziertem Bindegewebe. Das Entzündungsinfiltrat sowie die Hämatomansammlungen hatten zu diesem Zeitpunkt deutlich abgenommen und waren weniger angefärbt (Abb. 13).

Deutlich zu erkennen war der schmale periostale Osteoblastensaum (Abb. 17), der zu diesem Zeitpunkt schon sichtbar VEGF produzierte (Abb. 13) und somit, durch Migration und Zelldifferenzierung von Mesenchymzellen zu weiteren Osteoblasten, die desmale Ossifikation vorantrieb.

Auch hier fand man viele neu gebildete Gefäße, deren Endothel sich durch eine dezente rosa Färbung auszeichneten (Abb. 16), sowie sehr vereinzelt und selten einige periostale Chondroblasten, die sich in der Nähe des Frakturspaltes befanden (Abb. 13).

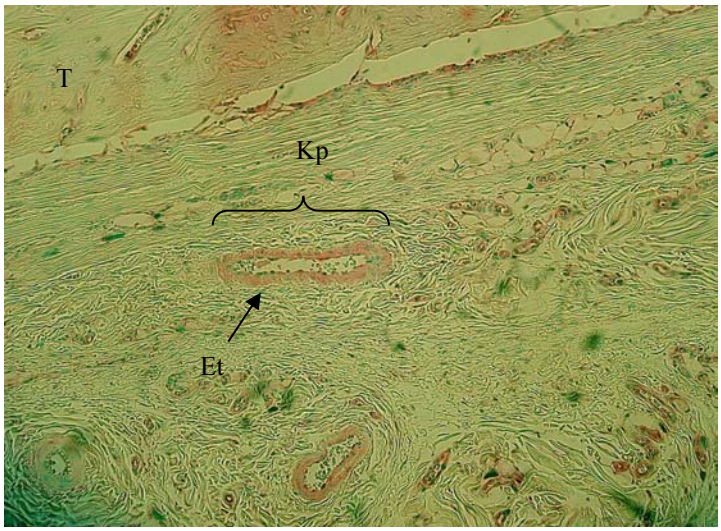


Abb. 16:
Histologischer Schnitt der Gruppe **Fraktur** am dritten postoperativen Tag zur Beurteilung der Fakturheilung (VEGF Färbung, Vergrößerung 10fach).
Periostal der Tibia (T) gelegene VEGF- angefärbte Endothelzellen (Et) neuer Kapillare (Kp).

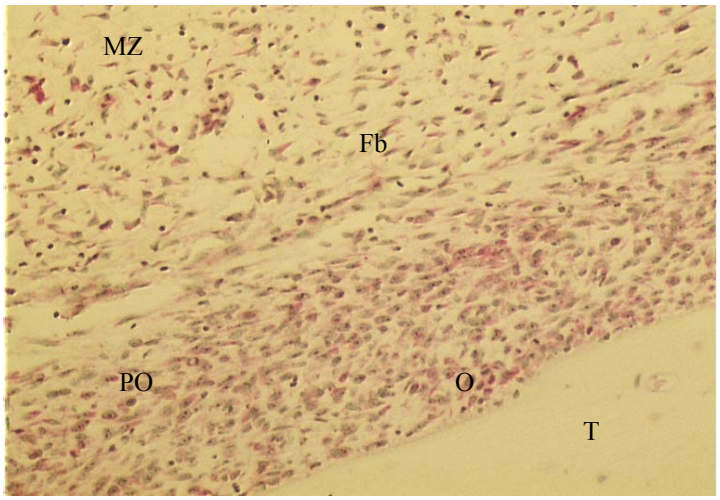


Abb. 17:
Histologischer Schnitt der Gruppe **Fraktur** am dritten postoperativen Tag zur Beurteilung der Frakturheilung (VEGF Färbung, Vergrößerung 20fach).
Periostal des Tibiaanschnitts (T) VEGF rot gefärbte Präosteoblasten (PO) und Osteoblasten (O). Weiterhin erkennt man undifferenziertes Bindegewebe mit Mesenchymzellen (MZ) und VEGF produzierenden Fibroblasten (Fb).

Eine Woche nach dem Trauma bildete sich schon ein deutlicher Bindegewebs- Knochen-Kallus, durch desmale Ossifikation entstanden Trabekel frakturspaltfern periostal, sowie durch enchondrale Ossifikation entstandenen Knorpel im direkt über dem Frakturspalt gelegenen Kallus (Abb. 18).

Dieser trabekuläre Geflechtknochen bestand aus Osteoid, in das anschließend Kalksalze eingelagert wurden. Um die Trabekel säumten sich deutlich Osteoblasten, welche zu diesem Zeitpunkt periostal und in der Kalluszone maximal VEGF produzierten (Abb. 20). Entzündungszellen waren frakturspaltfern in keinem der Quadranten erkennbar. Im Markraum bildete sich nun Fett- und blutbildendes Gewebe, welches histologisch leicht mit einer Entzündungsreaktion zu verwechseln war (Abb. 21).

Die VEGF- Produktion seitens der Fibroblasten im Kallus als auch im umliegenden Weichteilgewebe hatte deutlich abgenommen (Abb. 13). Auch hier stellte sich Endothelgewebe der Gefäße durchweg als VEGF positiv dar.

In vielen Präparaten waren im Frakturspalt keine Zellen zu erkennen, in manchen wenige Entzündungszellen, Erythrozyten, Osteoblasten, sehr selten wenige Chondroblasten.

Knorpelzellen die sich sowohl frakturnah periostal als auch im Kallusgewebe befanden, produzierten jetzt deutlich VEGF (Abb. 13), welches dazu führte, dass weitere Chondrozyten aus fibroblastenähnlichen Vorstufen heranreiften, mit zunehmenden Reifegrad hypertrophierten und ebenfalls zur Produktion von VEGF angeregt wurden (Abb. 19). Durch die zunehmende Kalzifikation des Kallus und damit bedingte Stabilität der Knochenfragmente erfolgte die Vaskularisierung und damit Abbau der abgestorbenen Chondrozyten durch Chondroklasten und gleichzeitige Einwanderung von Osteoblasten, welche an sich nun für die Osteoidbildung zuständig waren.

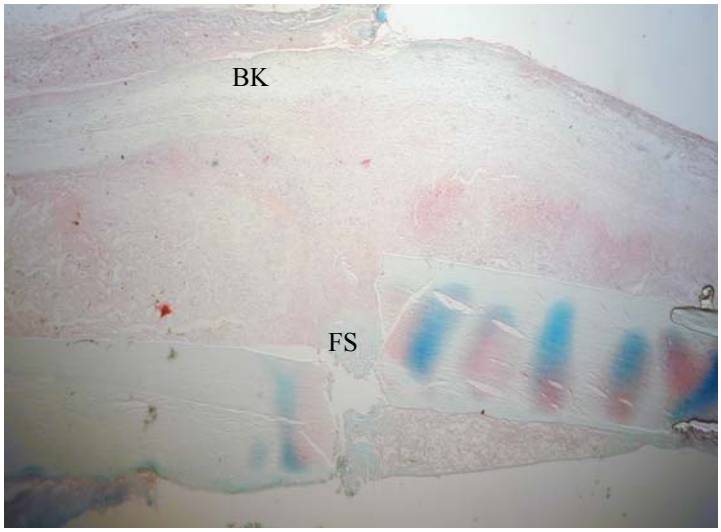


Abb. 18:
Histologischer Schnitt der Gruppe **Fraktur** am siebten postoperativen Tag zur Beurteilung der Fakturheilung (VEGF Färbung, Vergrößerung 2,5fach).
Obere zwei Quadranten mit Frakturspalt (FS) überbrückenden Bindegewebskallus (BK).

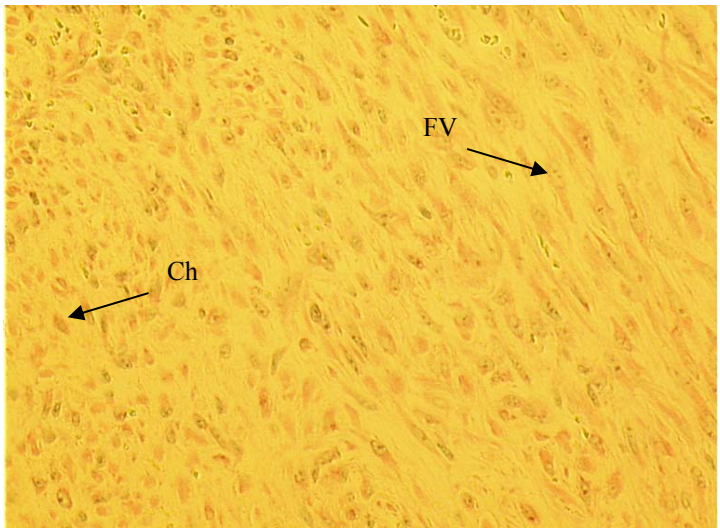


Abb. 19:
Histologischer Schnitt der Gruppe **Fraktur** am siebten postoperativen Tag zur Beurteilung der Fakturheilung (VEGF Färbung, Vergrößerung 40fach).
Fibroblasten- ähnliche Vorstufen (FV) der Chondroblasten (Ch), beide VEGF positiv angefärbt. Die Vorstufen sind gut anhand ihrer spindelförmigen Gestalt von reifen Knorpelzellen zu unterscheiden.

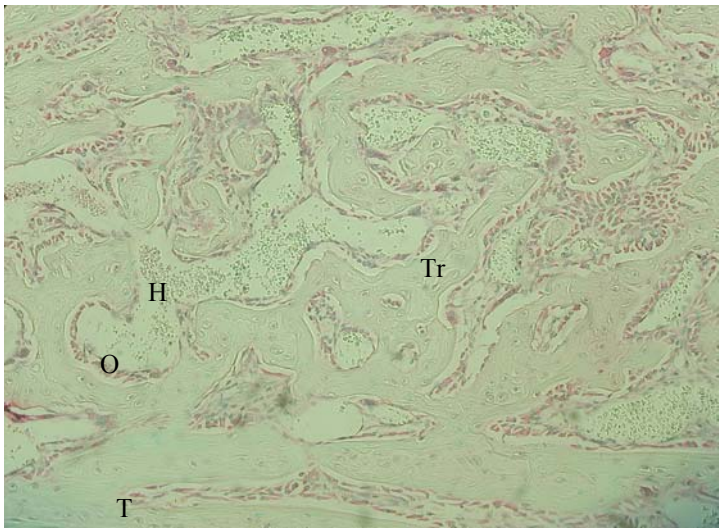


Abb. 20:
Histologischer Schnitt der Gruppe **Fraktur** am siebten postoperativen Tag zur Beurteilung der Frakturheilung (VEGF Färbung, Vergrößerung 10fach).
Ausschnitt des oberen rechten Quadranten mit Tibia (T) unten, periostal gelegenen Knochentrabekel (Tr) in der Bildmitte mit aufgelagertem rotem Osteoblastensaum (O) sowie Hämatom (H).

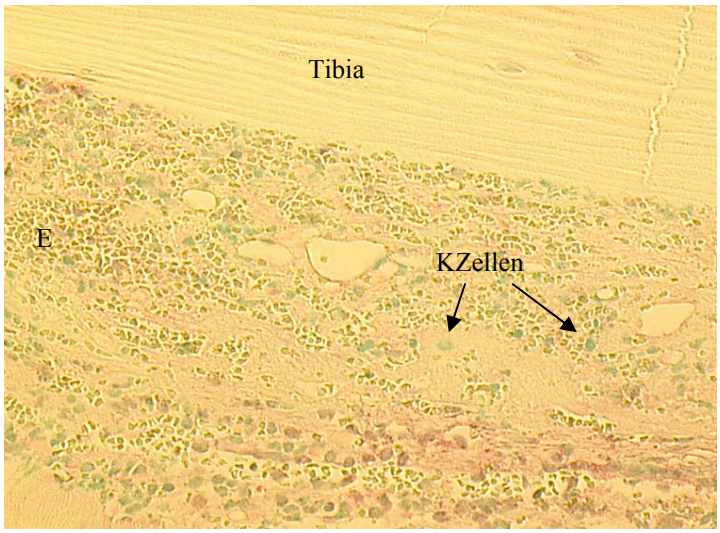


Abb. 21:
Histologischer Schnitt der Gruppe **Fraktur** am siebten postoperativen Tag zur Beurteilung der Fakturheilung (VEGF Färbung, Vergrößerung 10fach).
Markraum mit vielen kernhaltigen (grün gefärbt) Zellen (KZellen) und Erythrozyten (E).

In Abb. 13 kann man sehen, dass ein Maximum an VEGF Produktion seitens der Knorpelzellen sowohl im Kallus, als auch periostal am siebten postoperativen Tag stattfindet, hingegen im Frakturspalt leicht versetzt am 14. Tag nach dem Trauma. Dabei erkennt man eine zeitlich verzögerte Produktion der stark hypertrophierten Chondrozyten, deren Zellmatrix zwar sehr intensiv anfärbt, allerdings vielleicht aufgrund der Schnittebenen sehr selten zu sehen ist.

Neben der beschriebenen enchondralen Ossifikation, fand man 14 Tage nach der Osteosynthese noch immer sehr viele VEGF abgebende Osteoblasten im gesamten Frakturgebiet.

Im Kallus war der Anteil an Knochengewebe im Vergleich zum siebten Tag angestiegen.

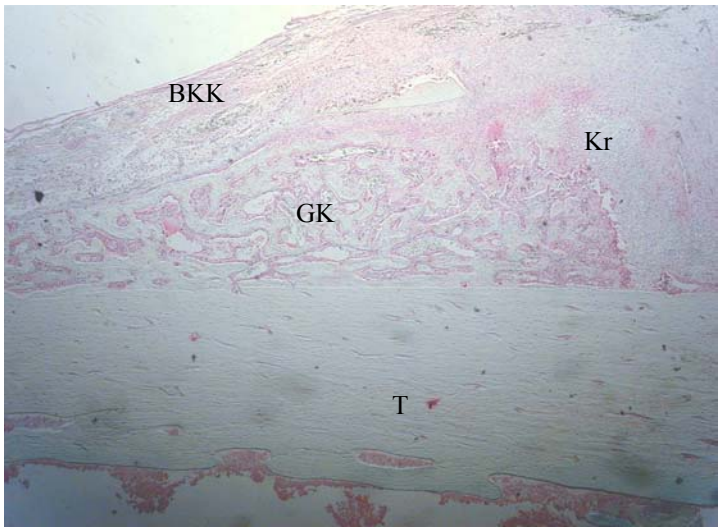


Abb. 22:
Histologischer Schnitt der Gruppe **Fraktur** am 14. postoperativen Tag zur Beurteilung der Fakturheilung (VEGF Färbung, Vergrößerung 5fach). Ausschnitt oberer linker Quadrant mit Tibia (T), Geflechtknochen (GK), über Frakturspalt befindliche Knorpelzone (Kr) und Bindegewebs-Knochen- Kallus (BKK).

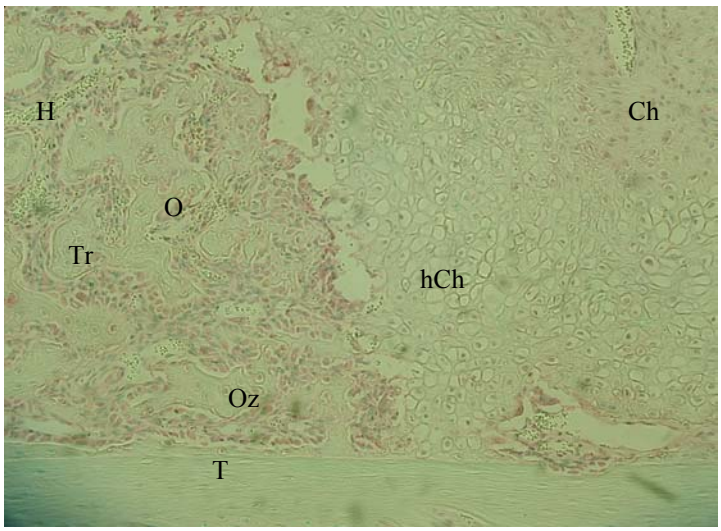


Abb. 23:
Histologische Schnitte der Gruppe **Fraktur** am 14. postoperativen Tag zur Beurteilung der Frakturheilung (VEGF Färbung, Vergrößerung 10fach). Ausschnitt des oberen linken Quadranten mit Tibia, links Trabekel (Tr) mit aufgelagerten Osteoblasten (O), eingemauerten nicht produzierenden Osteozyten (Oz), vereinzelten Erythrozyten in Form eines Hämatoms (H). Rechts proliferierende rote Chondroblasten (Ch) und hypertrophierte Chondrozyten (hCh) weniger stark gefärbt.

28 Tage nach dem Trauma nahm der Kallus deutlich an Höhe ab- eine VEGF intensive Färbung fand man noch in einigen wenigen Ossifikationszentren, sowohl in den Osteoblasten um die neugebildeten Bälkchen, als auch in Knorpelzonen, die sich vornehmlich noch im Kallus und Frakturspalt befanden.

Diese Zentren hatten zwar in Anzahl und Ausdehnung abgenommen, fanden sich allerdings noch in allen Quadranten.

In manchen der Präparate war der Frakturspalt teils gut durchbaut, teils ein Ort der noch immer aktiven enchondralen Ossifikation (Abb. 24) und teils noch völlig unbeteiligt.

Aus immunhistologischer Sicht konnte man daher zu diesem Zeitpunkt keine vollständig histologische Ausheilung des Traumas erkennen.

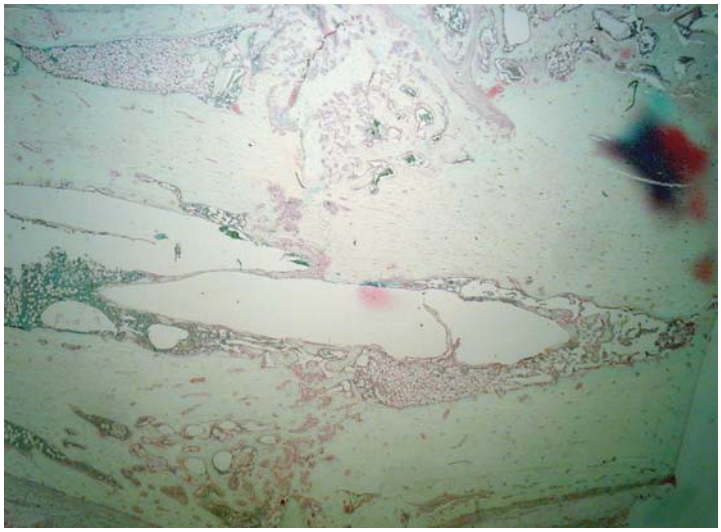


Abb. 24:
Histologischer Schnitt der Gruppe **Fraktur** am 28. postoperativen Tag zur Beurteilung der Frakturheilung.
(VEGF Färbung, Vergrößerung 1,25fach).

5.2.2 Einfluss Weichteilschaden auf die Frakturheilung (Gruppen Fraktur gegenüber Fraktur + WTS)

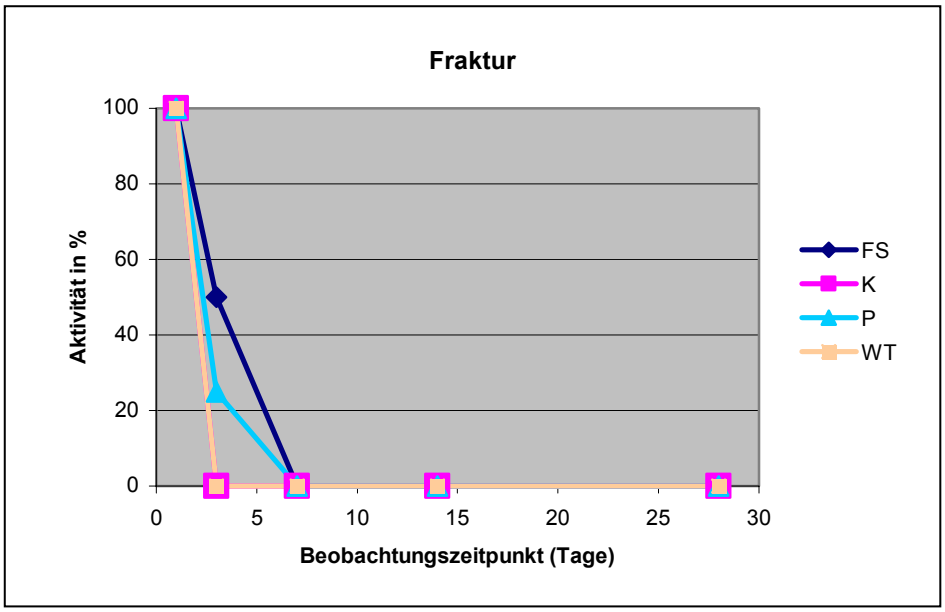


Abb. 25:
VEGF Expression der Entzündungszellen (Gruppe Fraktur) in den Zonen Frakturspalt (FS), Kallus (K), Periostaler Knochen (P) und umliegendes Weichteilgewebe (WT).
Punkte: prozentuale Aktivität der Entzündungszellen je Beobachtungszeitraum.

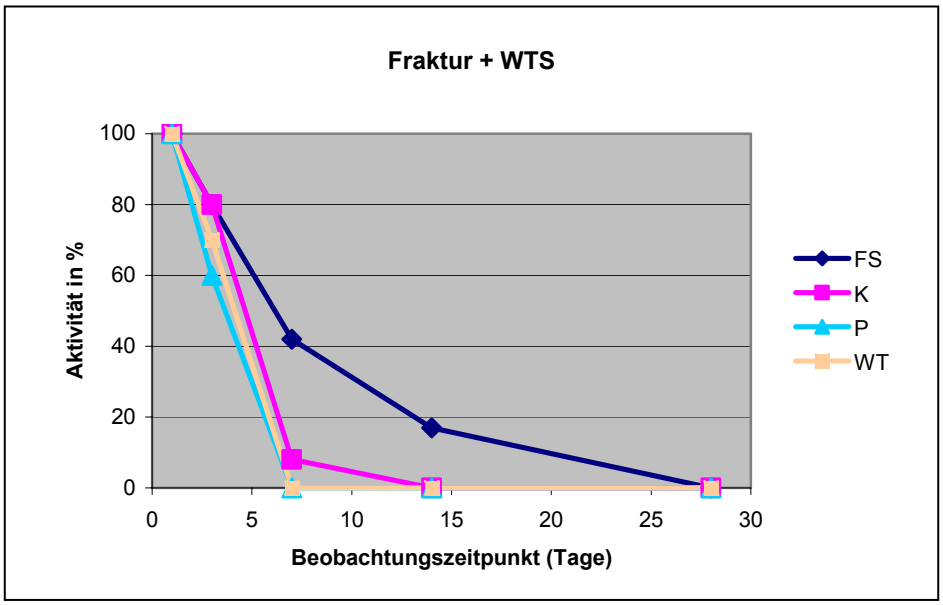


Abb. 26:
VEGF Expression der Entzündungszellen (Gruppe Fraktur + WTS) in den Zonen Frakturspalt (FS), Kallus (K), Periostaler Knochen (P) und umliegendes Weichteilgewebe (WT).
Punkte: prozentuale Aktivität der Entzündungszellen je Beobachtungszeitraum.

Am ersten postoperativen Tag (Abb. 25) war in beiden Frakturgruppen eine hohe Aktivität der Entzündungszellen in allen Zonen vorhanden. Während in der Frakturgruppe am dritten postoperativen Tag im umliegenden Weichteilgewebe sowie im Kallus keine VEGF Produktion mehr stattfand, produzierten die Entzündungszellen durch ein zusätzliches Weichteiltrauma nach wie vor in allen Zonen reichlich VEGF (Abb. 26).

Sieben Tage nach dem Trauma konnte in der Frakturgruppe keinerlei VEGF-Expression durch Entzündungszellen festgestellt werden, wobei am 14. Beobachtungstag in der Gruppe Fraktur + Weichteilschaden noch in 17% der Quadranten und Zonen VEGF aktive Entzündungszellen zu sehen waren.

Das zusätzliche Weichteiltrauma führte dazu, dass vermehrt Entzündungszellen aus dem umliegenden beschädigten Muskel in das Frakturgebiet einwanderten. Dies hatte auch zur Folge, dass diese Zellen insgesamt mehr VEGF produzierten, als bei einem isolierten Frakturtrauma. Durch diese Produktion wurden weitere Inflammationszellen wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen aus dem umliegenden Gewebe angelockt, die ihrerseits wiederum an der Synthese von VEGF beteiligt waren. Dieser „Reboundeffekt“ verlängerte und verstärkte somit die Entzündungsphase, wobei 28 Tage nach dem Trauma kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden konnte.

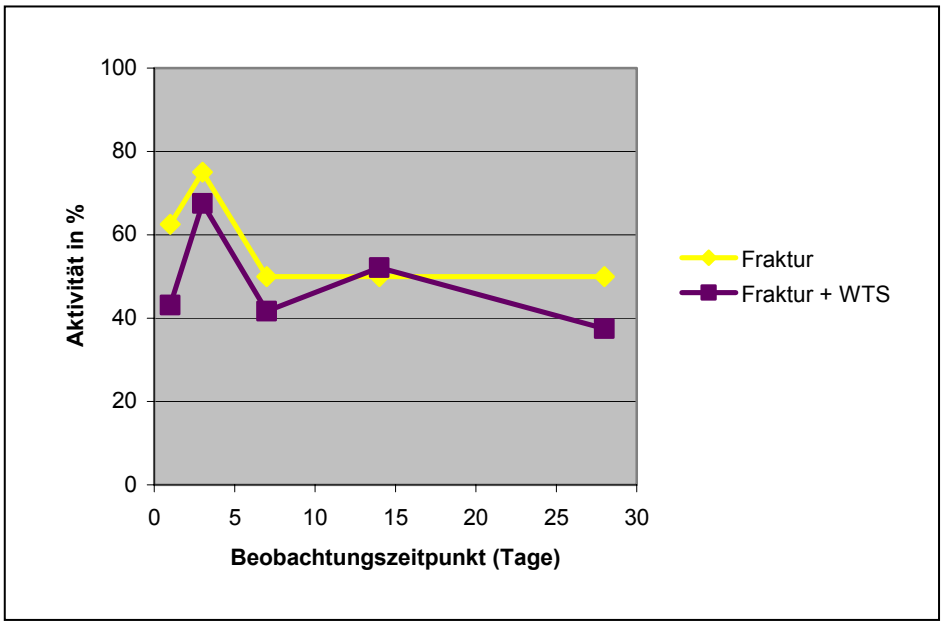


Abb. 27:
VEGF Expression der Fibroblasten je Beobachtungszeitraum.
Punkte: prozentuale Aktivität der Fibroblasten je Beobachtungszeitraum.
WTS: Weichteilschaden

Insgesamt produzierten in der Frakturgruppe mit zusätzlichem Weichteilschaden weniger Fibroblasten VEGF (Abb. 27). Während in der isolierten Frakturgruppe ein Maximum an Expression am 3. Tag stattfand, zeigte die Frakturgruppe + WTS (ebenfalls am 3. Tag Produktionshöhepunkt) ein erneuten Anstieg der roten Färbung am 14. postoperativen Tag, was dadurch erklärt werden könnte, dass zwei Wochen nach einem Weichteilschaden die Reparationsvorgänge voll im Gange sind: die Bildung von Narbengewebe aus von Fibroblasten produziertem Kollagen. Diese um diesen Zeitpunkt, in der umliegenden Gewebsnachbarschaft vorhanden Zellen, könnten durch chemotaktische Reize ins Frakturgebiet überwandern.

In der Gruppe Fraktur fand ein, um einen Beobachtungszeitraum versetztes Ansteigen der Produktion von VEGF in den Osteoblasten statt (Abb. 28), beginnend mit einem periostalen Maximum am 3. postoperativen Tag, gefolgt mit dem Auftreten der Osteoblasten im Kallus zwischen dem 3. und 7. Beobachtungstag. Während im Frakturspalt zwei Wochen nach dem Trauma am meisten VEGF von den knochenbildenden Zellen abgegeben wurde, nahm periostal die Produktion schon wieder deutlich ab. Bis vier Wochen nach der Fraktur konnte im Kallus wie auch im Frakturspalt keine Abnahme der VEGF Expression festgestellt werden.

Das benachbarte Weichteiltrauma förderte die initiale periostale desmale Ossifikation, was man an den bereits am ersten postoperativen Tag auftretenden roten Präosteoblasten bzw. Osteoblasten erkennen konnte. Allerdings hatte dies im Verlauf der Frakturheilung keinerlei Einfluss auf die Kallusbildung, da der weitere Anstieg, wie auch die Abnahme der Aktivität träger verlief als in der Frakturgruppe (Abb. 29).

Auch im Frakturspalt fand sich eine frühere Aktivität als in der Gruppe ohne Weichteilschaden, was sich eher durch eine Artefaktbildung erklären ließ, denn auch hier verlief der weitere Anstieg sehr viel träger. Der Verlauf der VEGF Bildung im Kallus unterschied sich nicht wesentlich zur Gruppe mit dem isolierten Frakturtrauma.

Grund für die verzögerte desmale Frakturheilung könnte sein, dass durch das zusätzliche Weichteiltrauma weniger undifferenzierte Bindegewebs- und Knochenzellen für die Heilung im Frakturgebiet zur Verfügung stehen, da der benachbarte Muskelschaden seinerseits teilweise auf dieselbe Quelle an Vorläuferzellen angewiesen ist.

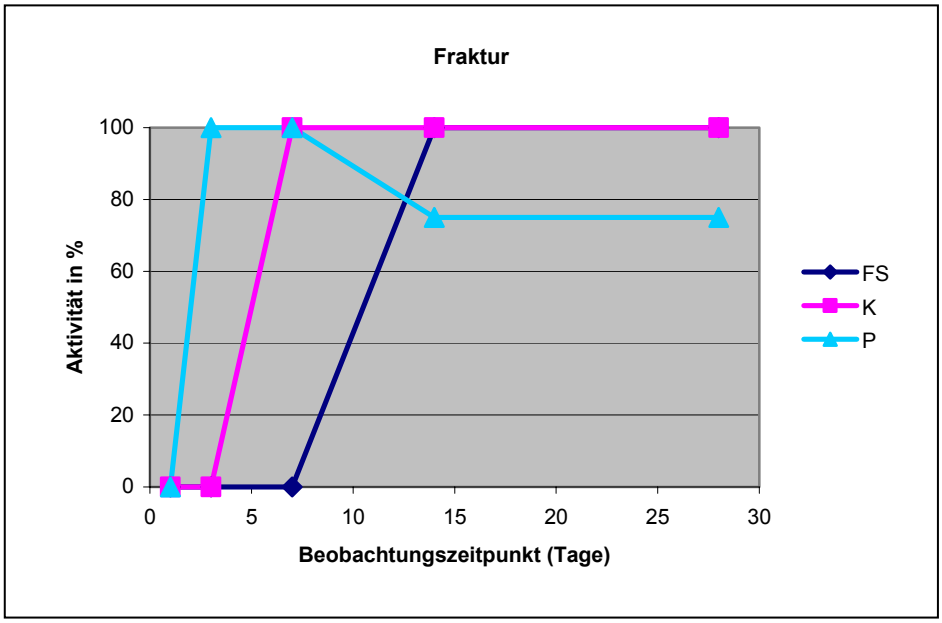


Abb. 28:
VEGF Expression der Osteoblasten (Gruppe Fraktur)in den Zonen Frakturspalt (FS), Kallus (K) und Periostaler Knochen (P).
Punkte: prozentuale Aktivität der Entzündungszellen je Beobachtungszeitraum.

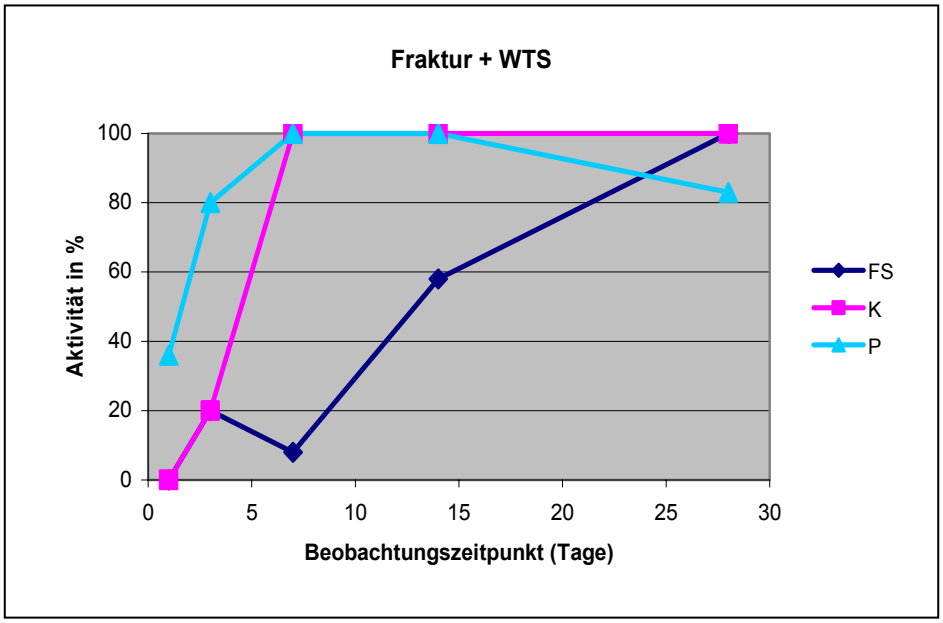


Abb. 29:
VEGF Expression der Osteoblasten (Gruppe Fraktur + WTS) in den Zonen Frakturspalt (FS), Kallus (K) und Periostaler Knochen (P).
Punkte: prozentuale Aktivität der Entzündungszellen je Beobachtungszeitraum.

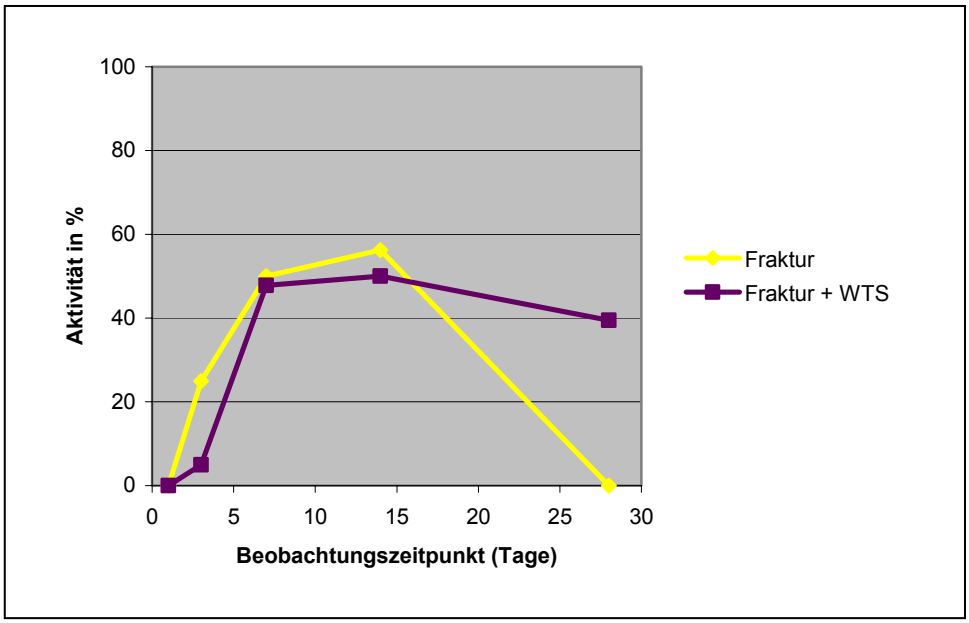


Abb. 30:
VEGF Expression der proliferierenden und ruhenden Chondroblasten je Beobachtungszeitraum.
Punkte: prozentuale Aktivität der Chondroblasten je Beobachtungszeitraum.
WTS: Weichteilschaden

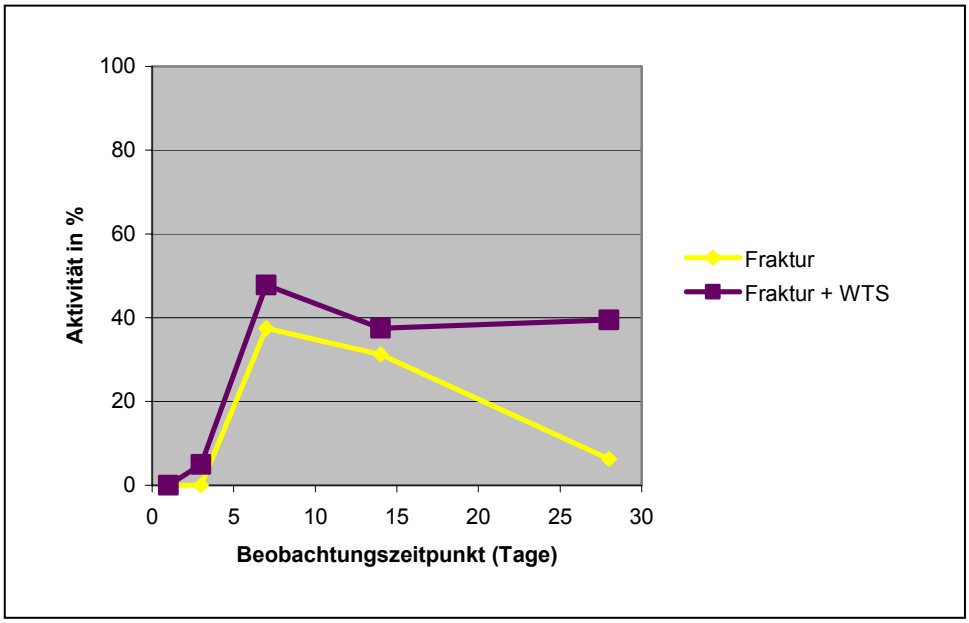


Abb. 31:
VEGF Expression der hypertrophierten Chondrozyten je Beobachtungszeitraum.
Punkte: prozentuale Aktivität der hypertrophierten Chondrozyten je Beobachtungszeitraum.
WTS: Weichteilschaden

Im Verlauf der VEGF Produktion sieht man in Abb. 30 und Abb. 31 einen durch das Weichteiltrauma verzögerten Anstieg der VEGF Produktion durch proliferierenden Knorpelzellen, sowie durch hypertrophierten Blasenknorpel zu Beginn der Fakturheilung. Während bei der Frakturgruppe am 28. Tag keine Aktivität mehr vorhanden war, fand man zu diesem Zeitpunkt noch reichlich rote Knorpelzellen in der Gruppe Fraktur + WTS, was

drauf schließen lässt, dass ein zusätzliches Weichteiltrauma die enchondrale Ossifiktion vor allem in der frühen Phase der Heilung verzögert (Abb. 32 und 33).

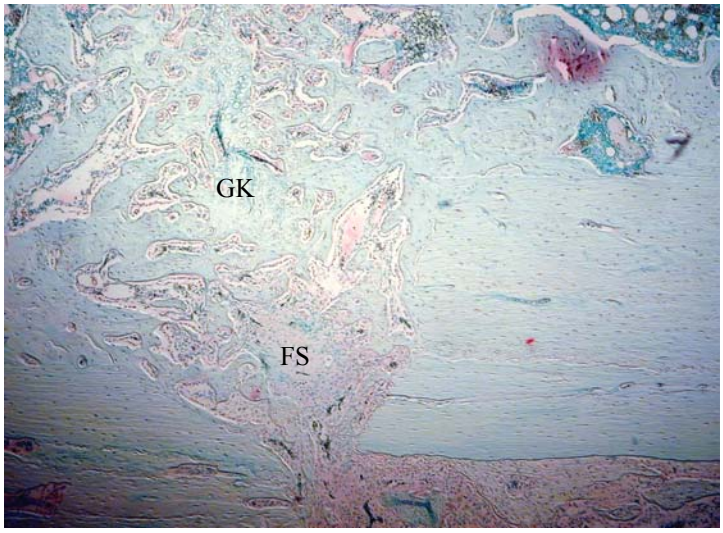


Abb. 32:
Histolgischer Schnitt der Gruppe **Fraktur** am 28. postoperativen Tag zur Beurteilung des Weichteilschaden- Einflusses auf die Frakturheilung (VEGF-Färbung, Vergrößerung 5fach).
Gute knöcherne Durchbauung des Frakturspaltes (FS) mit Geflechtknochen (GK). Keine Knorpelzonen vorhanden. Insgesamt wenig VEGF positive Zonen.

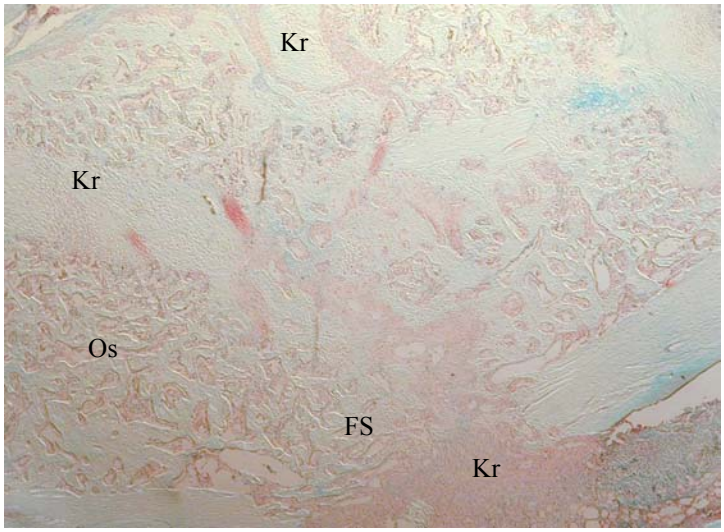


Abb. 33:
Histolgischer Schnitt der Gruppe **Fraktur + WTS** am 28. postoperativen Tag zur Beurteilung des Weichteilschaden- Einflusses auf die Frakturheilung (VEGF-Färbung, Vergrößerung 5fach).
Innerhalb des Frakturspaltes (FS) VEGF positive Aktivitätszonen: Osteoid (Os) und Knorpel (Kr).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein zusätzliches Weichteiltrauma die Entzündungsphase im Verlauf der Frakturheilung verlängert, weniger Fibroblasten zur VEGF Bildung anregt, sowie die desmale und enchondrale Ossifikation deutlich verzögert.

5.2.3 Einfluss des hypovolämischen Schocktraumas auf die Frakturheilung (Gruppen Fraktur gegenüber Fraktur + Schock)

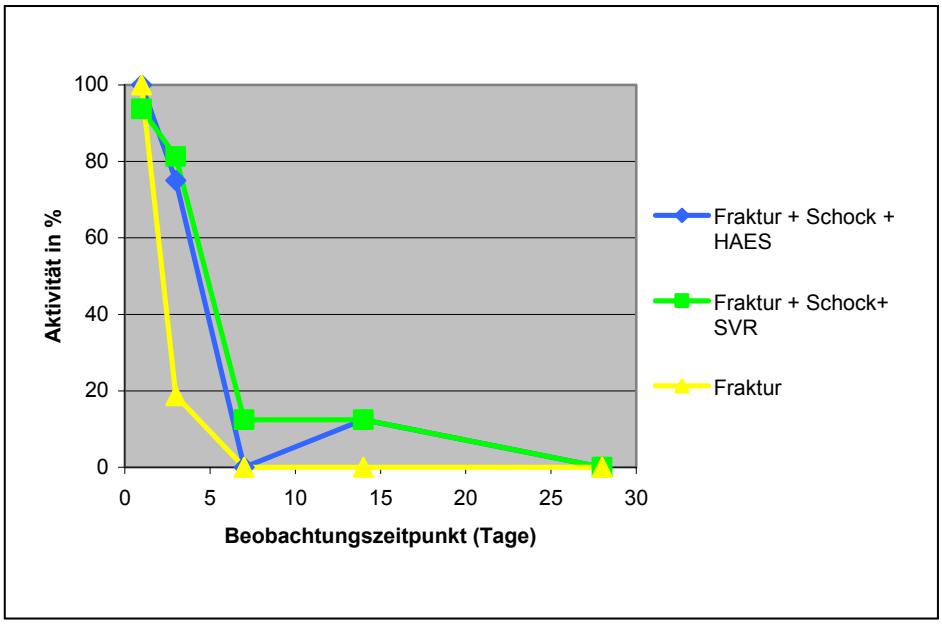


Abb. 34:
VEGF Expression der Entzündungszellen je Beobachtungszeitraum.
Punkte: prozentuale Aktivität der Entzündungszellen je Beobachtungszeitraum.
HAES: Hydroxyethylstärke, SVR: small volume resuscitation

Die Frakturgruppen mit zusätzlich hypovolämischen Schocktrauma zeigten einen verzögerten Verlauf der Entzündungsphase. Während in der isolierten Frakturgruppe ohne Schock bereits am 3. postoperativen Tag ein deutlicher Rückgang der Entzündungsaktivität auf 20% festzustellen war, fand sich zu diesem Zeitpunkt in noch ca. 80% der Quadranten und Zonen der beiden Gruppen mit Schock deutliche VEGF Aktivität der Inflammationszellen (Abb. 34). Vor allem in der Frakturzone, sowie im umliegenden Weichteilgewebe lassen sich viele Entzündungszellen initial beobachten (Abb. 35).

Eine Woche nach dem Trauma gab es in der Gruppe Fraktur und in der Gruppe Fraktur + Schock + HAES (blaue Kurve in Abb. 34) keine aktiven Entzündungszellen, die Gruppe Faktur + Schock + SVR (grüne Kurve in Abb. 34) hingegen wies ab diesem Zeitpunkt bis zum 14. Tag eine konstante VEGF Produktion auf.

Im weiteren Verlauf verlief in diesen beiden Gruppen die VEGF-Aktivität der Entzündungszellen bis zum 28. Beobachtungstag parallel gegen null.

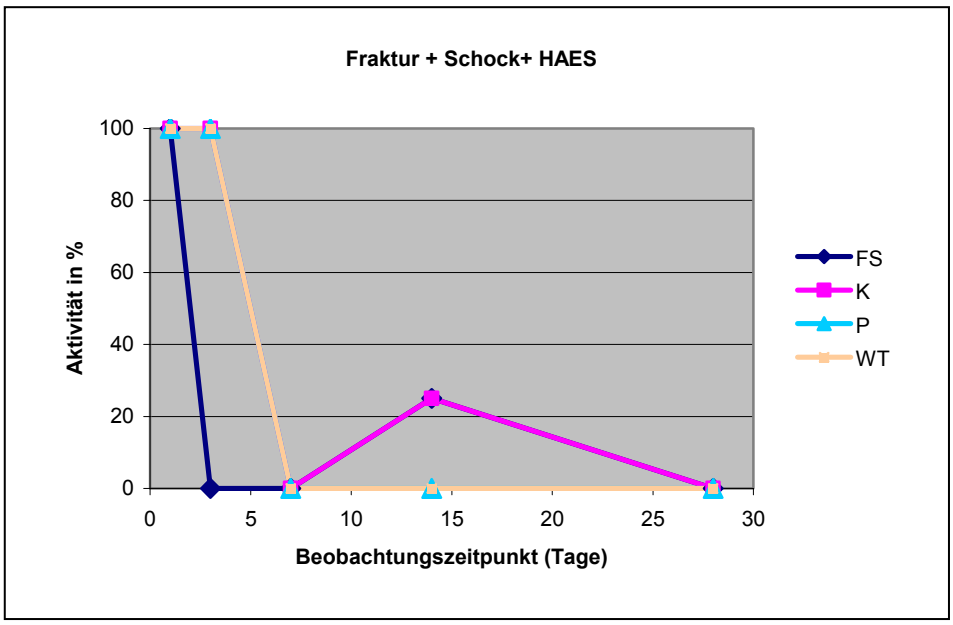


Abb. 35:
VEGF Expression der Entzündungszellen (Gruppe Fraktur + Schock + HAES) in den Zonen Frakturspalt (FS), Kallus (K), Periostaler Knochen (P) und umliegendes Weichteilgewebe (WT). Punkte: prozentuale Aktivität der Entzündungszellen je Beobachtungszeitraum.

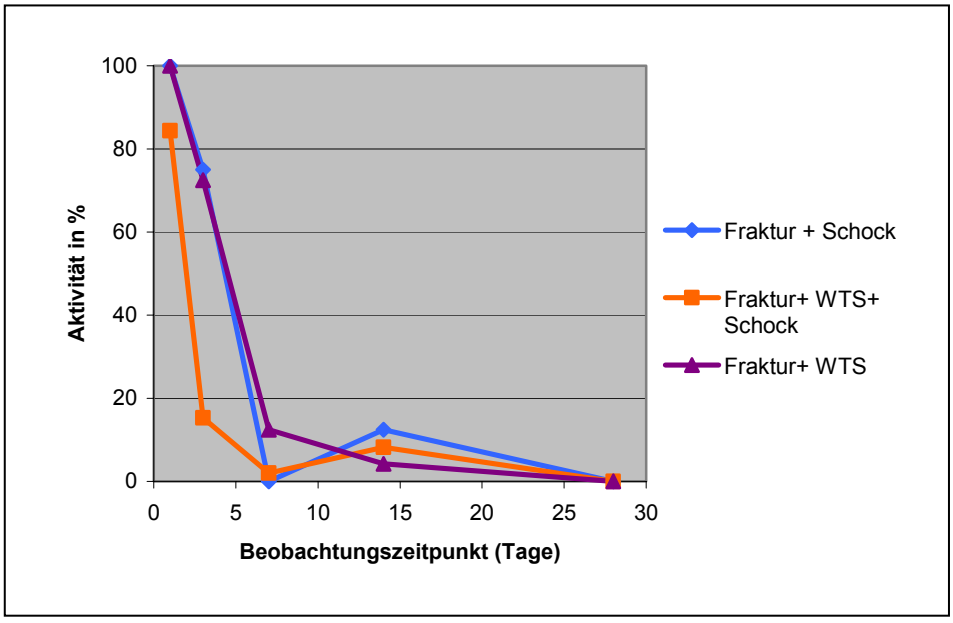


Abb. 36:
VEGF Expression der Entzündungszellen je Beobachtungszeitraum.
Punkte: prozentuale Aktivität der Entzündungszellen je Beobachtungszeitraum.
WTS: Weichteilschaden

Ein zusätzlicher Weichteilschaden wirkte sich ähnlich auf den Verlauf der VEGF Expression der Entzündungszellen aus, wie ein zusätzliches Schocktrauma.

Ein zusätzliches Weichteiltrauma kombiniert mit Schock hingegen verhielt sich eher wie die isolierte Gruppe ohne Schocktrauma (Abb. 36).

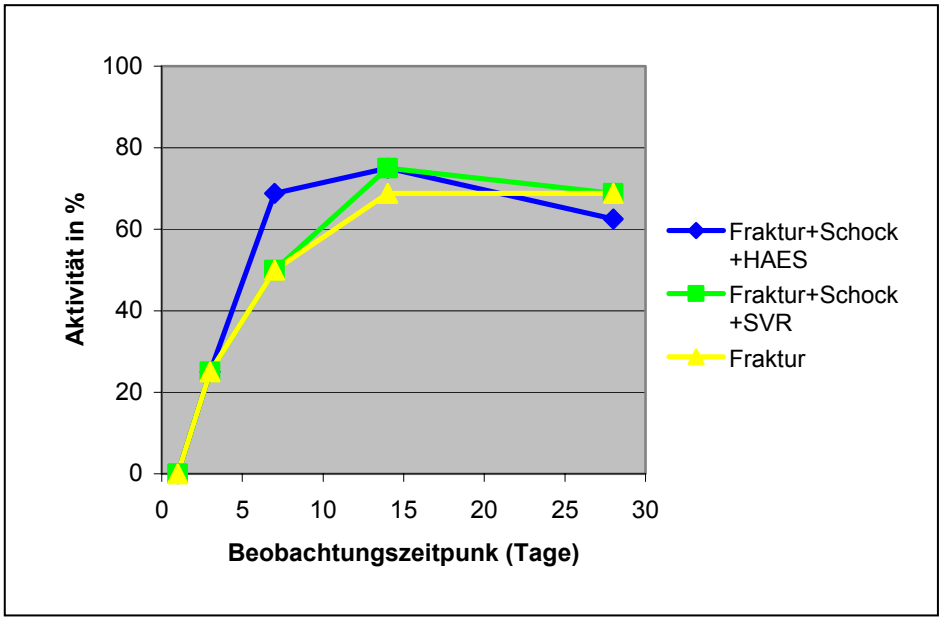


Abb. 37:
VEGF Expression der Osteoblasten je Beobachtungszeitraum.
Punkte: prozentuale Aktivität der Entzündungszellen je Beobachtungszeitraum.
HAES: Hydroxyethylstärke, SVR: small volume resuscitation

Die Osteoblasten wiesen in den verschiedenen Gruppen keine wesentlichen Unterschiede auf. Lediglich in den Schockgruppen zeigten die Osteoblasten vor allem zwischen dem 7. und 14. Tag eine stärkere VEGF Ausschüttung (Abb. 37).

Die Schockgruppen zeigten einen frühen Anstieg der VEGF-Aktivität in den Chondroblasten bereits am 3. postoperativen Tag, wobei in der Frakturgruppe ohne Schock erst sieben Tage nach Trauma eine Chondroblastenaktivität zu verzeichnen war.
Während in den beiden Schockgruppen die Aktivität bis zum 28. Tag stetig auf Null zurückging, zeigte die Gruppe ohne hypovolämisches Trauma zum letzten Beobachtungszeitpunkt immer noch VEGF aktive Chondroblasten vor allem im Frakturspalt.

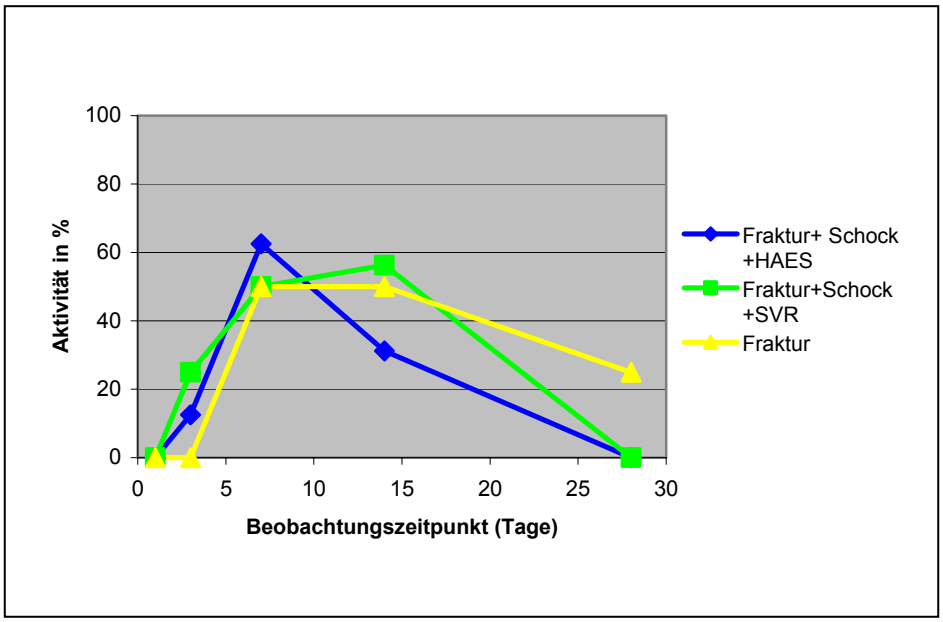


Abb. 38:
VEGF Expression der Chondroblasten je Beobachtungszeitraum.
Punkte: prozentuale Aktivität der Entzündungszellen je Beobachtungszeitraum.
HAES: Hydroxyethylstärke, SVR: small volume resuscitation

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein zusätzlicher hypovolämischer Schock oder ein benachbartes Weichteiltrauma die Entzündungsphase der Frakturheilung verlängert.

Hingegen die Kombination aus Schock und Muskeltrauma im Vergleich zur isolierten Fraktur keinen Einfluss auf die Entzündungszellen hinsichtlich der Produktion von VEGF zu haben scheint.

Die durch die hypovolämische Schocksituation bedingte Hypoxie sowie die sofortige Therapie mit HyperHAES® beschleunigte durch vermehrte VEGF Produktion und damit Angiogenese die Apoptose von Knorpelzellen und die Einwanderung von Chondroklasten. Diese wiederum ebneten den Weg für mehr osteoidbildende Osteoblasten und damit eine beschleunigte enchondrale Ossifikation.

Im Rahmen der Schockbehandlung ließen sich nur geringfügige Unterschiede in den histologischen Schnitten feststellen. Tiere mit HAES®- Substitution zeigten initial etwas mehr Entzündungszellen, Fibroblasten, Osteoblasten und Knorpelzellen. Mit HyperHAES® hingegen war das Maximum an VEGF produzierenden Zellen meist um einen Beobachtungszeitraum nach hinten versetzt (Abb. 34, 37, 38).

War die Entzündungsphase noch geringfügig länger andauernd, so fand man am 28. postoperativen Tag annähernd die gleiche Aktivität aller Zelltypen in den beiden Gruppen.

5.3 Auswertung der Weichteilschadengruppen

5.3.1 Deskriptive Auswertung der Weichteilkonsolidierung

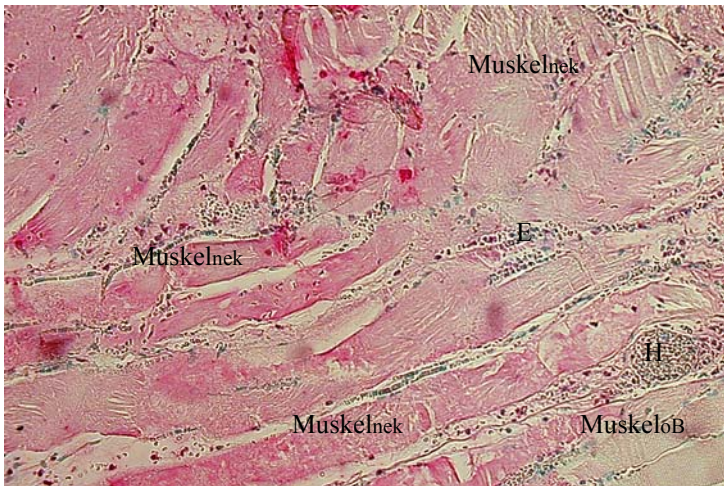


Abb. 39:
Histologischer Schnitt der Gruppe **WTS** am ersten postoperativen Tag zur Beurteilung der Weichteilkonsolidierung (VEGF Färbung, Vergrößerung 10fach). Schollig zerfallene Muskulatur (Muskelnek), intakte Muskulatur (MuskeloB) mit Querstreifung und peripheren länglichen Zellkernen. Hämatom (H) mit Erythrozyten-infiltrat, gemischtzelliges Entzündungsinfiltrat (E) mit grün gefärbten Zellkernen. Flüssigkeits-einlagerung erkennbar in Form eines Ödems.

Die histologischen Schnitte des ersten postoperativen Beobachtungstags wurden durch das Auftreten von großen Arealen zerstörter Muskulatur dominiert (Abb. 39). Dabei verloren die Muskelzellen ihre charakteristische Querstreifung, waren in ihrem Verlauf deutlich unterbrochen und an den Muskelstümpfen erkannte man leere Sakrolemmschläuche. Neben einigen Bereichen mit VEGF angefärbter, schollig zerfallener Muskulatur als Zeichen einer Koagulationsnekrose, fand man ebenfalls intakt gebliebene Muskelzellen, erkennbar an der noch vorhandenen Querstreifung und den länglichen, peripher gelegenen Zellkernen. Diese Zellen produzierten in geringerem Maße VEGF, was den Schluss nahe legt, dass je nekrotischer bzw. zerfallener die Muskelzellen sind, desto intensiver färben sie sich immunhistochemisch an.

Das durch das Weichteiltrauma entstandene Ödem drängte die einzelnen Muskelfasern weit auseinander.

Im Interstitium fand man weiterhin ein, durch frei im Interzellularraum verteilte Erythrozyten gekennzeichnetes Hämatom, sowie ein gemischtzelliges entzündliches Infiltrat (polymorphkernige, neutrophile Granulozyten, Mastzellen).

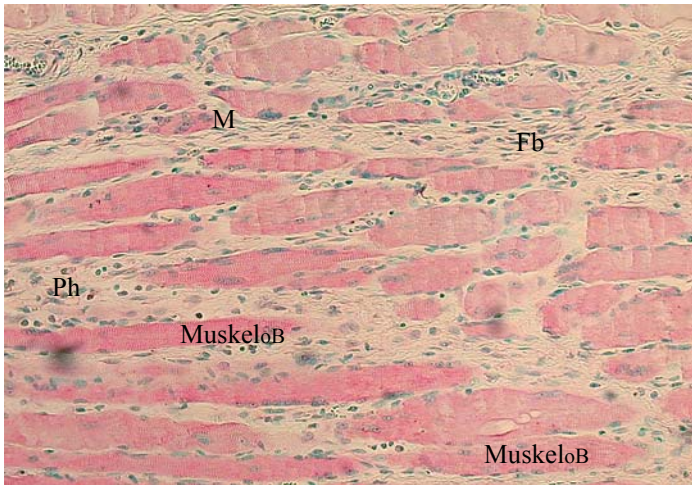


Abb. 40:
Histologischer Schnitt der Gruppe **WTS** am dritten postoperativen Tag zur Beurteilung der Weichteilkonsolidierung (VEGF Färbung, Vergrößerung 10fach).
Phagozytosetätigkeit erkennbar an grün gefärbten Makrophagen und Granulozyten (Ph). Muskelinseln intakter VEGF- roter Muskulatur (MuskeloB) mit vorhanderen Querstreifung und peripher gelegenen Zellkernen; Fibroblasten (Fb) in Form von spindelzellförmigen länglichen Zellen. Myoblasten (M) mit großen, kugeligen Zellkernen, die am peripheren Zellende liegen.

Drei Tage nach dem Trauma fand eine Einwanderung von deutlich VEGF produzierenden Makrophagen statt, die gemeinsam mit den polymorphkernigen Zellen an der Phagozytose des nekrotischen Muskelanteils beteiligt waren, so dass man zu diesem Zeitpunkt einen geringeren Anteil an nekrotischen Fasern sah. Nach Phagozytose blieben Inseln intakter rot gefärbter Muskulatur zurück an deren Peripherie sich einzelne teils mehrkernige große kugelige Zellen befanden (Abb.40).

Im Interstitium sah man eine Zunahme des Ödems, sowie die Entstehung von Reparations- bzw. Granulationsgewebe, bestehend aus vereinzelten Erythrozyten, Entzündungszellen, Kapillareinsprossungen und Fibroblasten, welche zu diesem Heilungszeitpunkt ein Maximum an VEGF produzierten. Dies bewirkte die Migration, Proliferation sowie Differenzierung weiterer Fibroblasten, Endothel- und phagozytierender Zellen.

Außerdem sah man mit Hilfe eines polarisierenden Lichts die Produktion von kollagenen Fasern.

Neben den Reparationsvorgängen (Ersatz der zerstörten Muskulatur durch Narbengewebe) erkennt man auch Regenerationsvorgänge, welche sich dadurch kennzeichnen, dass mehrkernige (meist zwei Zellkerne) Myoblasten von peripher in die Muskelstümpfe nach zentral einwandern.

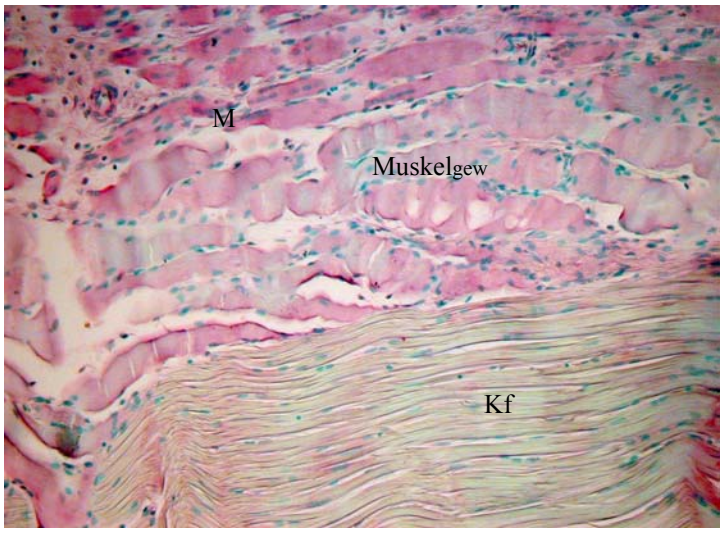


Abb. 41:
Histologischer Schnitt der Gruppe **WTS** am siebten postoperativen Tag zur Beurteilung der Weichteilkonsolidierung (VEGF Färbung, Vergrößerung 10fach).
Myoblasten (M), die zentral an Muskelenden liegen; gewellte Muskulatur (Muskel$_{gew}$). Im polarisierten Licht erkennbare kollagene Fasern (Kf).

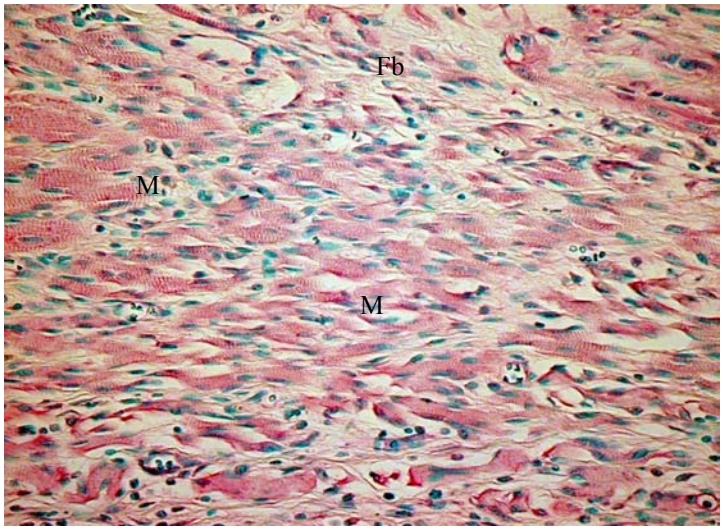


Abb. 42:
Histologischer Schnitt der Gruppe **WTS** am siebten postoperativen Tag zur Beurteilung der Weichteilkonsolidierung (VEGF Färbung, Vergrößerung 20fach).
Fibroblasten (Fb) in spindelförmiger Gestalt; Myoblasten (M) mit großen kugeligen Kernen, die zentral an Muskelstumpfenden liegen.

Sieben Tage nach dem Weichteiltrauma phagozytierten Makrophagen weiterhin weniger gewordenes nekrotisches Material. Das Schnittbild wurde durch eine hohe Zelldichte an nun blass gefärbten Fibroblasten dominiert, das Ödem in Form von Flüssigkeitseinlagerung hat deutlich abgenommen.

Die leeren Sakrolemmschläuche, die man am ersten sowie dritten Tag sehr gut erkennen konnte, wurden dabei mit proliferierenden Myoblasten aufgefüllt und produzierten zu diesem Zeitpunkt ein Maximum an VEGF. Weiterhin erkannte man gewellte Muskulatur als Zeichen dafür, dass die Migration der Myoblasten in die Zellmitte noch nicht erfolgt, bzw. nicht erfolgreich war (Abb. 41) Auch diese Muskulatur produzierte in großen Mengen VEGF, was die Anlockung von Myoblasten in die zerstörten Muskelzellareale zur Folge haben könnte.

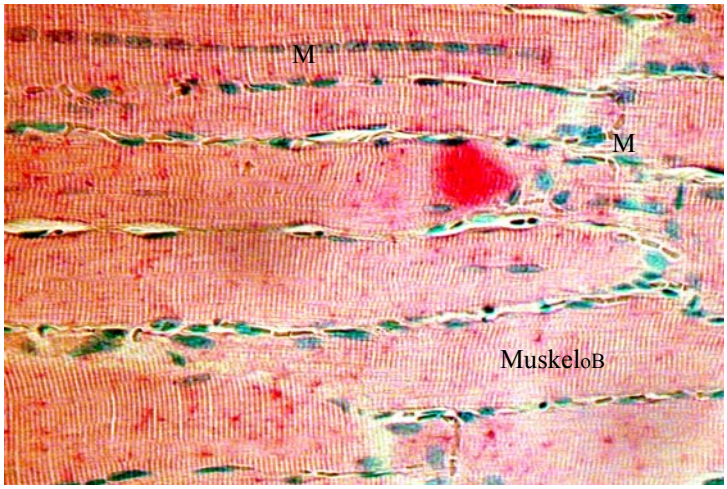


Abb. 43:
Histologischer Schnitt der Gruppe **WTS** am 14. postoperativen Tag zur Beurteilung der Weichteilkonsolidierung (VEGF Färbung, Vergrößerung 20fach). Teils intakte an Querstreifung und peripheren Zellkernen erkennbare Muskulatur (MuskeloB), aber auch andauernde Regeneration, die durch zentrale Myoblastenkerne (M) an den Muskelstumpfenden gekennzeichnet ist.

Am 14. Beobachtungstag wiesen die Schnitte eine hohe Dichte an Narbengewebe auf, welche sich als Zeichen einer erfolgreichen Reparation darstellte, wobei durch die Betrachtung im polarisierten Licht Kollagen zu finden war.

Weiterhin sah man ein Nebeneinander von viel gewellter, stark VEGF gefärbter Muskulatur, nur noch vereinzelten Muskelinseln sowie insgesamt verringerter interstitieller Zellularität.

Zu diesem Beobachtungszeitpunkt dauerten die Regenerationsvorgänge noch deutlich an (gewellte Muskelfasern, zentral gelegene Myoblasten). Somit lies sich feststellen, dass 14 Tage nach Setzen des Weichteiltraumas die Ausheilung noch nicht erfolgt war (Abb. 43).

5.3.2 Einfluss des hypovolämischen Schocktraumas auf die Weichteilkonsolidierung (Gruppen WTS gegenüber WTS + Schock)

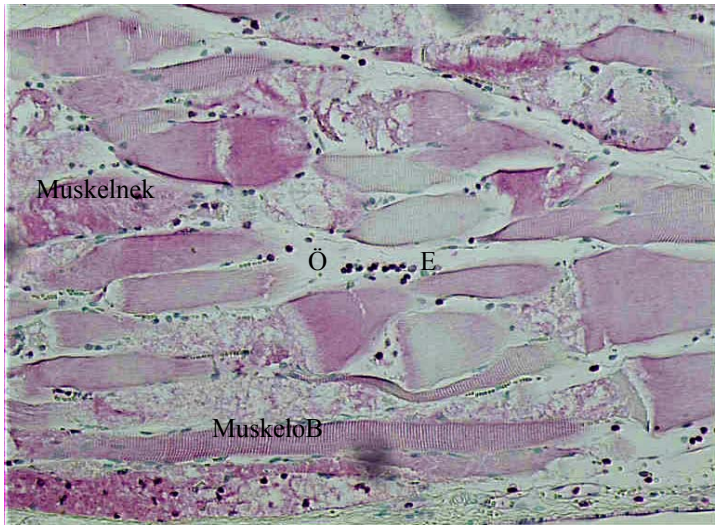


Abb. 44:
Histologischer Schnitt der Gruppe
WTS + Schock am ersten postoperativen Tag (VEGF Färbung, Vergrößerung 10fach).
Schollig zerfallene nekrotische Muskelzellen (Muskelnek) umgeben von beginnendem Ödem (Ö), Entzündungszellen (E) und intakter Muskulatur (MuskeloB).

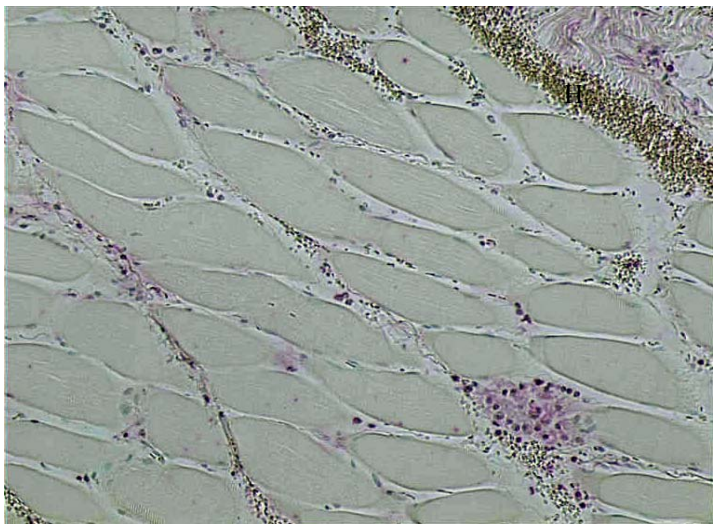


Abb. 45:
Histologischer Schnitt der Gruppe **WTS** am ersten postoperativen Tag (VEGF Färbung, Vergrößerung 10fach).
Weniger nekrotisches Muskelmaterial. Große Areale mit Hämatomen (H).

Am ersten postoperativen Tag zeigten die histologischen Schnitte beider Gruppen große Areale zerstörter Muskulatur. Dabei wurde in beiden Schnitten die noch vorhandene Muskulatur durch ein Ödem auseinander gedrängt.

In den Schockgruppen (Abb. 44) fand man mehr positiv angefärbtes nekrotisches Muskelmaterial, als in den Gruppen mit reinem Weichteilschaden (Abb. 45). Diese wiesen hingegen eine größere interstitielle Einblutung auf.

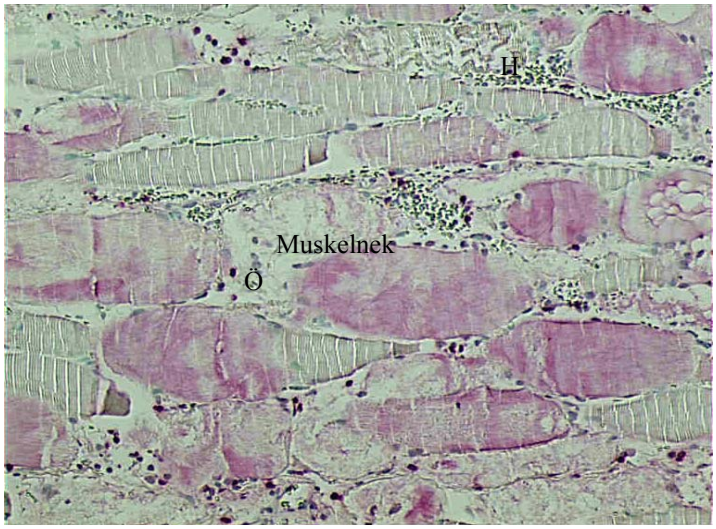


Abb. 46:
Histologischer Schnitt der Gruppe
WTS + Schock am dritten postoperativen Tag (VEGF Färbung, Vergrößerung 10fach).
Organisation durch phagozytierende Zellen. Geringe Zunahme des Ödems (Ö) im Vergleich zum vorherigen Beobachtungszeitpunkt. Weiterhin viel nekrotisches Muskelmaterial (Muskelnek) und Einblutungen (H).



Abb. 47:
Histologischer Schnitt der Gruppe **WTS** am dritten postoperativen Tag (VEGF Färbung, Vergrößerung 10fach).
Organisation durch phagozytierende Zellen. Kaum nekrotisches Muskelmaterial vorhanden. Beginnende Fibrose, erkennbar an spindelzellförmigen Fibroblasten (Fb). Geringeres Ödem (Ö) im Vergleich zur Gruppe WTS + Schock.

Drei Tage nach dem Weichteiltrauma war der Anteil nekrotischer Muskulatur vor allem in den reinen Weichteilschadengruppen deutlich rückgängig (Abb. 47). Die Gruppe WTS + Schock zeichnete sich durch noch bestehende Phagozytoseaktivität des schollig zerfallenen Materials aus (Abb. 46). Zudem konnte man eine geringe Zunahme des interstitiellen Ödems im Vergleich zum ersten Tag und zur Referenzgruppe erkennen.
Beim Vergleich der Gruppen sah man eine beginnende Fibrosetätigkeit in den Gruppen WTS als Zeichen der Reparation und eine rückgängige Wassereinlagerung des Interstitiums.

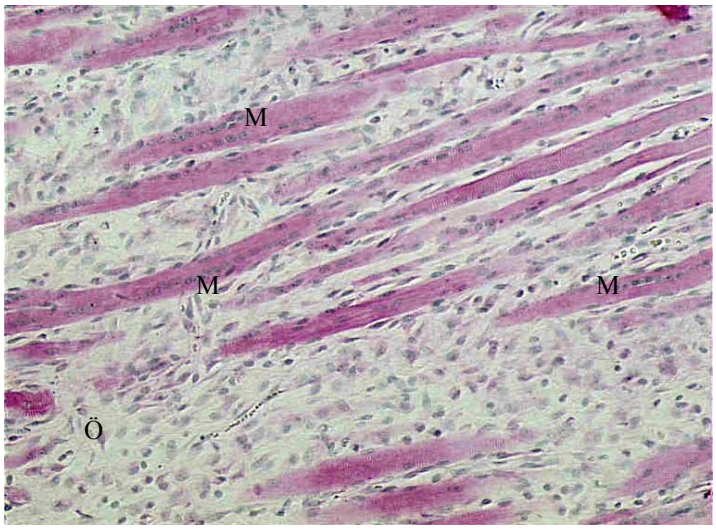


Abb. 48:
Histologischer Schnitt der Gruppe **WTS+ Schock** am siebten postoperativen Tag (VEGF Färbung, Vergrößerung 10fach).
Dieser Schnitt lässt noch ein deutliches Ödem (Ö) erkennen.
Weiterhin sieht man regenerierende Muskelstümpfe mit vielen zentral liegenden Myoblasten (M) und eine hohe interstitielle Zelldichte.

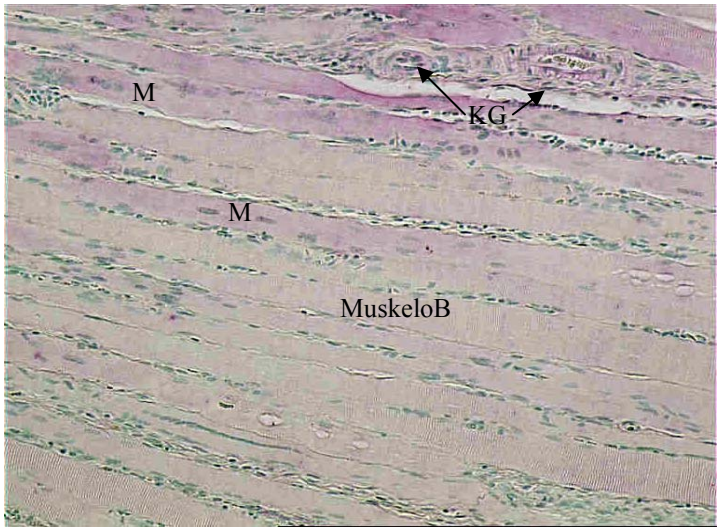


Abb. 49:
Histologischer Schnitt der Gruppe **WTS** am siebten postoperativen Tag (VEGF Färbung, Vergrößerung 10fach).
Hohe interstitielle Zelldichte, regenerierende Muskelzellen mit Myoblasten (M) bis hin zu schon intakten Muskelzellen (MuskeloB)- erkennbar an der vorhandenen Querstreifung. VEGF positive Kapillargefäße (KG)

Am siebten postoperativen Beobachtungstag wiesen beide Gruppen (WTS > WTS + Schock) im Rahmen der Reparationsvorgänge eine hohe interstitielle Zelldichte an Fibroblasten auf. Während in der Gruppe WTS + Schock (Abb. 48) viele Myoblasten zentral in den verbliebenen Muskelstümpfen die stark VEGF positiven Zellen regenerierten, sah man in der Gruppe WTS (Abb. 49) einige, schon quergestreifte intakte

Muskelzellen mit peripher liegenden Zellkernen, welche eine weniger intensive Färbung annahmen.

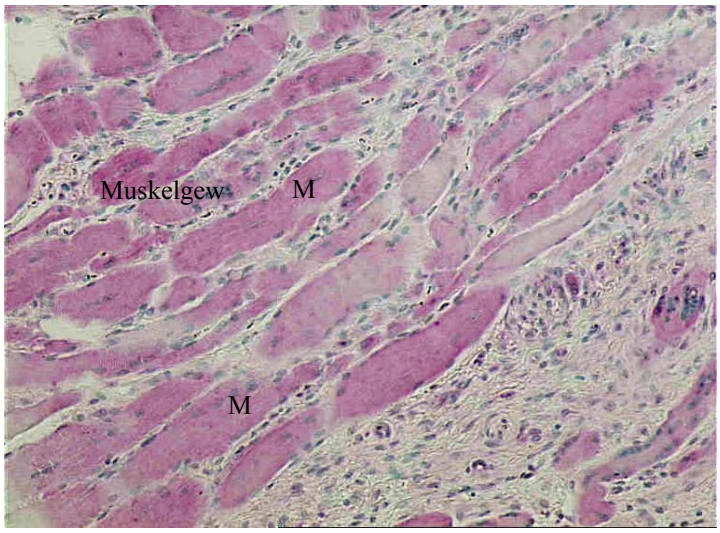


Abb. 50:
Histologischer Schnitt der Gruppe **WTS + Schock** am 14. postoperativen Tag (VEGF Färbung, Vergrößerung 10fach).
Hohe interstitielle Zelldichte, regenerierende Muskelzellen mit Myoblasten (M). Gewellte Muskelzellen (Muskelgew) als Zeichen einer anhaltenden Regeneration.

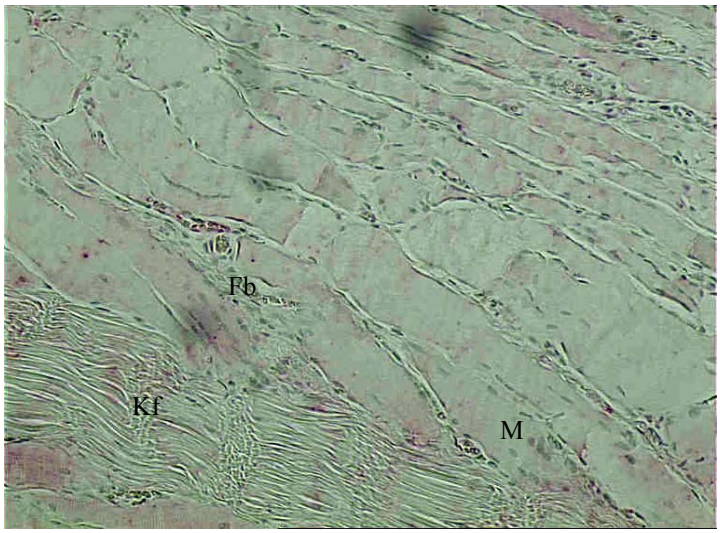


Abb. 51:
Histologischer Schnitt der Gruppe **WTS** am 14. postoperativen Tag (VEGF Färbung, Vergrößerung 10fach).
Geringere Zelldichte im Vergleich zur Gruppe WTS + Schock. Narbenbildung, erkennbar an Fibroblasten (Fb) und kollagenen Fasern (Kf). Regenerierende Zellen mit zentral gelegenen Myoblasten (M)

Am letzten Beobachtungstag wies die Gruppe WTS (Abb. 51) im direkten Vergleich bereits eine geringere interstitielle Zellularität auf als die Schockgruppen, allerdings sah man in diesen histologischen Schnitten viel mehr kollagene Fasern (erkennbar im polarisierten Licht) als Zeichen der Reparatur. In der Gruppe WTS + Schock (Abb. 52) hingegen hielten die Regenerationsvorgänge nach wie vor an und dominierten das Bild. Kollagene Fasern fand man nur selten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch ein zusätzliches Schocktrauma in Verbindung mit einer Volumentherapie mit HyperHAES® mehr Koagulationsnekrose induziert wurde, welche deutlich VEGF positiv war. Zudem wiesen die histologischen Schnitte der Schockgruppen eine geringere interstitielle Einblutung auf, später jedoch wurden die noch vorhandenen Muskelstümpfe durch ein deutlicheres Ödem auseinandergedrängt. Während die reinen Weichteilschadengruppen insgesamt eine geringere Anfärbbarkeit zeigten, vollzogen sich die einzelnen Phasen der Regeneration bzw. Reparation schneller als in den Gruppen WTS + Schock.
Durch die Migration von Myoblasten in die zerstörten Muskelareale, womöglich durch VEGF Produktion angelockt und durch die Volumenersatztherapie mit SVR verursacht, wurde in den Gruppen WTS + Schock (+ SVR) mehr regenerierende Muskelzellen beobachtet (stark VEGF positiv), als in den Gruppen ohne Schock. Reine WTS Gruppen zeigten am letzten Beobachtungstag weniger Regeneration- als Zeichen der Ausheilung- dafür viel kollagenes Gewebe im Sinne einer Fibrose.

6. Diskussion

Die eingangs formulierten Fragestellungen zur VEGF Expression in der Fraktur- und Weichteilheilung konnten in der vorliegenden Arbeit mit den ausgewählten Methoden erfolgreich beantwortet werden.
Entzündungszellen und Fibroblasten produzieren vor allem in der Initialphase eines Knochen- oder Weichteiltraumas VEGF. Osteoblasten sowie Chondroblasten tragen durch die Expression von VEGF zwischen der ersten und zweiten Woche nach dem Trauma zur Konsolidierung bei.
Während ein zusätzliches Weichteiltrauma die Expression der Zellen vor allem in der initialen Phase der Frakturheilung hemmt, fördert eine hypovolämische Schocksituation in Verbindung mit HyperHAES® Gabe die VEGF- Expression der Osteoblasten und Chondroblasten.
Neben den schon oben genannten Zellen sieht man innerhalb der Weichteilkonsolidierung vor allem nekrotische Muskelabschnitte und regenerierende Myoblasten VEGF positiv. Durch einen hypovolämischen Schockzustand und dessen Volumentherapie mit HyperHAES® wird die VEGF Produktion dieser Zellen verstärkt.

6.1 Frakturheilung

6.1.1 Heilungsverlauf

Die verschiedenen Phasen der Frakturheilung konnten in dieser Studie anhand VEGF produzierender Zellen nachvollzogen werden (156).
Die erste Phase der Inflammation (Tag 1- 3) war von, im Frakturbereich befindlichen Hämatomen gekennzeichnet, welche anschließend von VEGF positiven Makrophagen und Granulozyten organisiert wurden. Ebenfalls offensichtlich war die beginnende, durch VEGF rote Endothelzellen erkenntliche Kapillarisierung.
In der nächste Phase der Organisation und desmalen Ossifikation (Tag 3- 7) bildeten VEGF produzierende Fibroblasten einen schwachen VEGF positiven „soft callus“. Aus gering VEGF roten Mesenchymzellen entwickelten sich Osteoblasten und –sehr selten- Chondroblasten, welche in jeder Phase der Heilung VEGF positiv waren.
Die Tage 7 und 14 war durch ein Nebeneinander von desmaler und enchondraler Ossifikation gekennzeichnet. Osteoblasten sowie Knorpelzellen waren in dieser Phase

maximal gefärbt und nahmen in der letzten Phase des Remodelings (14.- 28. Tag) deutlich ab, waren jedoch in vielen Schnitten nach wie vor VEGF positiv.

Vergleich unserer Ergebnisse mit experimentellen Studien

Mit dieser Studie konnte gezeigt werden, dass zu jedem Heilungszeitpunkt einer Fraktur der Rattentibia verschiedene Zellen VEGF produzieren und diese Produktion wohl zu einer erfolgreichen Konsolidierung vier Wochen nach Trauma beiträgt.
Viele bereits vorausgegangene tierexperimentelle Studien (45, 52, 150) belegen die Anwesenheit des Wachstumsfaktors VEGF als Voraussetzung für eine Gefäßneubildung in und um zerstörtes Knochengewebe. Nach der Blockade der VEGF Wirkung in frakturierten Mäuseknochen, verzögerte sich die anschließende Angiogenese und damit Knochenneubildung sowie Kallusmineralisation in diesen Frakturzonen. Die exogene Gabe von VEGF förderte die Blutgefäßformation, Ossifikation und Knochenneureifung (150).
Diese Beobachtungen rechtfertigen eine genaue Auswertung des VEGF Expressionsverlaufs über verschiedene Zeitpunkte der Frakturheilung hinweg. Bisher findet man keine genauen Aussagen über den Verlauf der Expression durch verschiedene Zelltypen. Während Tatsuyama et al. (156) die Expression in Chondroblasten und hypertrophierten Chondrozyten nachweisen konnten, jedoch nicht in Mesenchymzellen und Osteoblasten, beobachteten Gerber et al. (52) eine deutliche VEGF Färbung allein in hypertrophierten Knorpelzellen. Ruhende oder proliferierende Knorpelzellen ließen sich kaum anfärben. Pufe et al. (115) sprach hingegen nur von einer positiven Reaktion in Knorpelzellen. Verglichen mit tierexperimentellen Studien an Ratten (115, 156) konnten wir eine zunehmende VEGF Reaktion mit dem reifenden Zustand der Knorpelzellen beobachten. Aufgrund der verschiedenen Schnittebenen konnten die Zellen allerdings nicht in allen Quadranten nachgewiesen werden. Wir gehen jedoch davon aus, dass aufgrund des zunehmenden Zellvolumens der Wachstumsfaktor histologisch schwieriger zu erfassen war. Die Intensität der Reaktion nahm jedoch im hypertrophierten Zustand deutlich zu. Die autokrine Wirkung des Wachstumsfaktors auf die Knorpelzelle verstärkte deren weitere Expression und damit auch Reifegrad und führte letztendlich zur Apoptose.
Dieser Auswerteunterschied lässt sich auf Grund der verschiedenen Immunenzymhistologietechniken der einzelnen Studien erklären. Während Pufe et al. (115) nicht weiter auf die Auswahl ihres VEGF Antikörpers eingehen, verwendeten Tatsuyama et al. (156) einen kreuzreaktiven Antikörper des Kaninchens. Dieser ließ sich in

Mesenchymzellen und Osteoblasten nicht anfärben. Wir hingegen erhielten auch in diesen Zelltypen starke Färbeergebnisse, was die Ergebnisse früherer Studien (35, 65, 142) bestätigte.
Die von uns beobachtete VEGF Reaktion des Frakturhämatoms wurde bereits von Street et al. (150) in einer Mausstudie beschrieben und lässt ein angiogenetisches Potential dieses Hämatoms im Anfangsstadium der Heilung vermuten. Durch die Expression verschiedenster, sich gegenseitig stimulierender Wachstumsfaktoren (u. a. VEGF) wird die Differenzierung der periostalen Vorläuferzellen vorangetrieben. Damit wird dem Frakturhämatom eine wichtige Schlüsselrolle im Initialstadium der Frakturheilung zugeschrieben.
Zum ersten Mal konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass Endothelzellen über den gesamten Heilungsverlauf VEGF positiv sind. Inwieweit andere Zytokine Auswirkung auf dieses Verhalten haben, konnte mit vorliegender Studie nicht geklärt werden.
Parallele Studien der Blutflussmessung (18) und Standardhistologie (69, 99) hatten einen fast vollständig ausgeheilten Knochen vier Wochen nach Trauma zum Ergebnis.
Mit Hilfe der Immunhistologie konnte jedoch gezeigt werden, dass nach 28 Tagen, trotz Remodeling, rege Aktivität in den Zellen um dem vermeintlichen Frakturspalt herrschte und damit, immunhistologisch gesehen, keine vollständige Ausheilung erfolgt war.

6.1.2 Einfluss Weichteilschaden

Geklärt werden sollte unter anderem die Frage, welchen Einfluss ein zusätzlicher Weichteilschaden auf die Heilung einer Fraktur nimmt.
Hauptergebnis der semiquantitativen Auswertung war eine verlängerte Entzündungsphase in den Frakturgruppen mit Weichteiltrauma. Weiterhin wurde die desmale und enchondrale Ossifikation deutlich in ihrem Fortschreiten verzögert. Zwar förderte der Weichteilschaden periostal die desmale Ossifikation, allerdings sah man zu den späteren Beobachtungszeitpunkten ein zeitlich verzögertes Auftreten der VEGF- positiven Osteoblasten und Knorpelzellen im Vergleich zur Frakturgruppe. Am 28. postoperativen Tag fand man in den Frakturguppen mit Weichteiltrauma noch viele enchondrale Ossifikationspunkte, die mehr VEGF positive Chondroblasten aufwiesen als die wenigen Knorpelzonen in den Frakturgruppen ohne Weichteilschaden.
Fibroblasten gab es in den Gruppen mit Weichteilschaden mit Ausnahme des 14. Beobachtungstages weniger. Zwei Wochen nach Trauma war die fibröse Reparation des

umliegenden Muskelgebietes voll im Gange. Durch chemotaktische Reize- von Zellen aus dem Frakturgebiet freigesetzt- konnten vermehrt Fibroblasten in Richtung Knochenheilung migrieren.

Vergleich unserer Ergebnisse (Fraktur + WTS) mit klinischen Studien

Eine klinische Studie von Rommens et al (129) untersuchte die Heilung einer Pilonfraktur in Abhängigkeit von einem primären Weichteilschaden. Dieser führte häufiger zu Komplikationen wie Infektion und verzögerter Frakturheilung.
Auch weitere experimentelle Studien (31, 128, 129) zeigen, dass ein begleitendes Weichteiltrauma zu einer verzögerten Heilung der Fraktur führt. Dabei deuten klinische Erfahrungen und Studien auf ein Korrelat zwischen Schwere eines Weichteilschadens und einer verzögerten Frakturheilung hin (89, 107).
Die Ausheilungszeit einer humanen Tibiaschaftfraktur mit Tscherne Grad II-Weichteilschaden (107) benötigte durchschnittlich 24 Wochen, die einer Fraktur mit schwerem Weichteilschaden im Durchschnitt ca. 10 Wochen länger (128).
Dabei ist das Endergebnis einer Fraktur von zahlreichen Regenerationsprozessen geprägt. Neben den mechanischen Umgebungsbedingungen ist eine suffiziente Blutversorgung für den Heilungserfolg notwendig (38, 72, 100). Für die klinische Versorgung von Frakturen mit zusätzlichem Weichteilschaden ist gerade die initialen Phase der Frakturheilung besonders kritisch und bedarf deshalb erhöhter Aufmerksamkeit und Sorgfalt.

Vergleich unserer Ergebnisse (Fraktur + WTS) mit experimentellen Studien

Bei Frakturen ohne Weichteilschaden erfolgt die Blutversorgung besonders in der initialen Heilungsphase über Muskel- Periost Verbindungen- auch als periostale oder extraossäre Blutversorgung bezeichnet (120). Bei Frakturen mit zusätzlichem umgebendem Weichteilschaden kann man davon ausgehen, dass die periostale Blutversorgung des Frakturkallus und damit die initiale Heilungsphase gestört wird (162).
Die mangelnde Blutversorgung im Frakturgebiet führt zur lokalen Ischämie und ruft insbesondere in der initialen Heilungsphase eine deutliche Hypertrophie und Hyperplasie der periostalen Zellen mit einer osteogenen Differenzierung hervor. Solche Prozesse haben als Ziel die rasche Wiederherstellung des lokalen Blutflusses (152). Unsere Ergebnisse zeigten ein Tag nach dem Trauma ein deutlicher VEGF gefärbtes und größeres Hämatom

in den Frakturgruppen mit zusätzlichem Weichteilschaden. Am dritten postoperativen Tag beobachteten wir eine massive osteogene Zellproliferation in der fibrösen Schicht des Periosts auf der Seite des Weichteiltraumas. Auch Landry (90) beobachtete durch ein umgebendes Weichteiltrauma ein vorzeitiges Auftreten der periostalen Ossifikation. Dies kann als eine Initiierung für eine umfangreiche Revaskularisierung der Frakturzone angesehen werden und unterstreicht das angiogene Potential des VEGF. Neben dem Periost hat das osteogene und angiogene Potential des Hämatoms wesentliche Bedeutung für die periostale Kallusbildung sowie die initiale Osteo- und Chondrogenese, d.h. die Differenzierung mesenchymaler Zellen zu Osteoblasten und Chondroblasten (72).

Im weiteren Verlauf der Frakturheilung lässt sich durch den WTS ein verzögertes Auftreten der einzelnen Phasen und daran beteiligten Zellen beobachten. Parallel durchgeführte Studien zur Blutflussmessung unterstützen dieses Ergebnis.

Bumann-Melnyk (18) beobachtete in den Gruppen Fraktur sowie Fraktur + WTS eine Blutflussreduzierung, die in der Gruppe mit zusätzlichem Weichteilschaden stärker ausgeprägt war, als in der Frakturgruppe ohne Weichteiltrauma. Zwischen dem dritten und siebten postoperativen Tag trat eine Normalisierung des Blutflusses ein, welcher eine Woche nach dem Trauma in eine Hypervaskularisierung überging. Dieses Ergebnis kann als Erklärung für die initial verzögerte Frakturheilung nach umgebendem Weichteiltrauma angesehen werden.

Parallel durchgeführte Untersuchungen der Kallusgröße und Gewebedifferenzierung mittels Giemsa- Färbung (99) und die Auswertung der Blutflussmessung mit Laser-Dopplerflowmetrie (18) erbrachten keine Unterschiede zwischen den Gruppen Fraktur und Fraktur + WTS vier Wochen nach dem Trauma. Immunhistologisch betrachtet, verzögerte das Weichteiltrauma die enchondrale Ossifikation, was nicht nur im Initialstadium der Heilung zu beobachten war, sondern auch am Ende der Untersuchungszeit vier Wochen nach dem Trauma. In der Gruppe Fraktur + WTS gab es im Gegensatz zur Gruppe mit isolierter Fraktur noch reichlich VEGF gefärbte knorpelige Ossifikationszentren im Bereich des Frakturspaltes.

Im Rahmen der enchondralen Ossifikation wirkt sich ein zusätzliches Weichteiltrauma insofern negativ auf die weitere Heilung aus, als dass zerstörtes umgebendes Muskelgewebe nur noch bedingt als Quelle undifferenzierter potentieller Knochen-, Knorpel- und Bindegewebszellen zur Verfügung steht (72).

Utvag et al. (163) konnten in ihrer Studie bei der Bestimmung der Kallusfläche keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Gruppen Fraktur und Fraktur + WTS

feststellen. Dabei weicht deren Studienmodell in einigen Punkten von unserem ab. In unserer Studie wurde das Fraktur- bzw. Weichteiltrauma mittels Aufpralltechnik erzeugt. Utvag et al. (163) verwendete eine Zange zur Quetschung der Weichteile und die Osteotomie als Modell für eine Fraktur. Weiterhin wählte er nur einen Beobachtungszeitpunkt von 28 Tagen, wir hingegen fünf verschiedene Heilungszeitpunkte zur Auswertung. Damit konnte der ganze Verlauf genauestens betrachtet werden. Wir hatten eventuell das größere Weichteiltrauma, welches im Gegensatz zu Utvag mehr negativen Einfluss auf die Frakturheilung nahm.

6.1.3 Einfluss hypovolämischer Schockzustand

Durch den hypovolämischen Schock induzierte Mikrozirkulationsstörungen führten zu einer hypoxischen Gewebesituation im Frakturgebiet und induzierten damit eine verlängerte Entzündungsphase, in der mehr nekrotisches Material und Hämatom abgebaut werden konnte. Die Hypoxie diente allerdings als Stimulus für die VEGF Produktion durch viele, schon oben beschriebene Zellen, die im weiteren Verlauf der Heilung die Kapillarisierung in Verbindung mit der SVR- Wirkung förderten und damit zu einer Beschleunigung der enchondralen Ossifikation führten. In den Schockgruppen + SVR Therapie konnten im Vergleich zu den reinen Frakturgruppen ohne Schock vier Wochen nach Fraktur keine VEGF positiven Knorpelzellen mehr entdeckt werden.

Vergleich unserer Ergebnisse (Fraktur + Schock) mit klinischen Studien

Massive Blutverluste nach Fraktur- und Weichteiltraumata können als Ursache eines lebensbedrohlichen Schockzustandes sein. Bisher gilt die Volumensubstitution mit isomolarer Kochsalzlösung als anerkannter Standard. Seit wenigen Jahren setzten jedoch immer mehr Notärzte im Rettungsdienst HyperHAES® ein, jedoch nur für den schnellen Ersatz größerer Blutverluste. In Kliniken gilt aber nach wie vor der Standard mit isomolarer Kochsalzlösung oder kolloidalen Volumenersatzmitteln. Es gibt bis zum heutigen Zeitpunkt keine klinischen Studien weder zum Thema des Einflusses eines mit HyperHAES® therapierten hypovolämischen Schockzustandes auf die Frakturheilung, noch Untersuchungen des Wachstumsfaktors VEGF. Untersuchungsgegenstand bisheriger klinischer Studien der hyperosmolaren Volumenersatztherapie war deren Einfluss auf Herzkreislauf und auf periphere osmotische Wirkung (83).

Vergleich unserer Ergebnisse (Fraktur + Schock) mit experimentellen Studien

Es finden sich zwei experimentelle Studien, die den Effekt eines hypovolämischen Schockzustandes auf den Verlauf der Frakturheilung histologisch untersucht haben.
Wichmann et al. (169) zeigten anhand einer Mausstudie, dass ein hämorrhagischer Schock zu einer Einschränkung der Osteoblastenaktivität und zu einer Vergrößerung der Osteozytennekrose führt. In unsere Studie wiesen die Osteoblasten der Frakturgruppen mit und ohne Schockereignis nur sehr wenige Unterschiede auf. Zwischen ein und zwei Wochen nach dem Trauma fand man eine stärkere VEGF Produktion der Osteoblasten in den Schockgruppen. Wichmann hingegen untersuchte seine Mäuse nur zu einem Zeitpunkt: 3 Tage nach dem Trauma. Weiterhin wählte er eine längere Schockphase von 90 Minuten und ersetzte den Blutverlust mit isomolarer Kochsalzlösung.
In einer weiteren Studie wurden vier Ziegen mit Fraktur und hypovolämischen Schocktrauma histologisch untersucht (144). Es fanden sich keine Unterschiede in Knochenmasse, Osteoblastenoberfläche und Osteoidoberfläche zwischen den Schock- und Kontrollgruppen. Allerdings sei auf die geringe Anzahl an Versuchstieren hingewiesen, wovon eines im Verlauf der Studie verstarb. Zudem wurden keine Aussagen über andere, an der Frakturheilung beteiligten Zelltypen getroffen.
Eine durch die Minderperfusion resultierende hypoxische und azidotische Stoffwechsellage stimuliert verschiedenste Zellen zur Produktion von VEGF (75, 81). Dies führt zu einem verstärkten chemotaktischen Reiz, der weitere Zellen ins Traumagebiet lockt. Dies erklärt eine verstärkte Entzündungsreaktion in den Schockgruppen unserer Studie.
VEGF bewirkt weiterhin eine verstärkte Aktivierung der Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) (70). Dadurch wird vermehrt NO ausgeschüttet und der oben genannten Endotheldysfunktion und deren Folgen (eine Verstärkung der Entzündungsreaktion) versucht entgegen zu wirken (51).
Allerdings hätten wir uns diesbezüglich einen noch stärkeren Effekt des HyperHAES® erwünscht. Nolte et al. (106) konnten eine anti- inflammatorische Wirkung hyperosmolarer Infusionen mit Hilfe der Intravitalmikroskopie aufzeigen. So führte eine Applikation von hyperosmolarer Kochsalzlösung im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikanten Reduktion der Leukozyten, die während der Reperfusion im Bereich der postkapillären Venolen am Gefäßendothel entlang rollen und die an das Gefäßendothel adhärieren. Zudem kam es mit der Abnahme der Leukozyten- Endothel- Interaktion auch zu einer

ausgeprägten Verringerung der postischämisch gesteigerten Kapillarpermeabiliät und zu einer Zunahme der funktionellen Kapillardichte bzw. lokalen Durchblutung.

Leider hatten wir in unserer Studie keine Frakturgruppe mit Schockereignis, welche nicht mit HAES® oder HyperHAES® therapiert wurden, da die Tiere das Trauma nicht überlebt hätten. Somit können wir letztendlich keine Aussagen über den direkten histologischen Effekt der Volumenersatztherapie treffen. Wir gehen jedoch davon aus, dass die bisher beschriebenen Ergebnisse der Schockgruppen, vor allem ab dem dritten postoperativen Tag, in engem Zusammenhang mit der SVR-Gabe stehen.

Weiterhin konnten wir Steinbrech et al (145) in seinem Ergebnis nur bestätigen. Zum Zeitpunkt der desmalen und enchondralen Ossifikation war in den Schockgruppen eine verstärkte VEGF Produktion seitens der Osteoblasten zu beobachten und legt somit den Schluss nahe, das eine hypoxische Stoffwechsellage stimulierend auf Osteoblasten wirkt.

Nach der anfänglichen Entzündungsphase erscheinen die ersten VEGF positiven knorpelähnlichen Zellen im Frakturgebiet. Dieser Knorpel wird ersetzt nachdem Kapillargefäße in den Frakturkallus eingewachsen sind. Gerber et al. (52) demonstrierten die Bedeutung des VEGF für das Einwachsen von Gefäßen in den hypertrophierten Knorpel von Wachstumszonen. Durch die Gabe von neutralisierenden VEGF Antikörpern wurde die Kapillarisierung und damit das skeletale Wachstum gehemmt.

Tarkka et al. (155) brachten mit Hilfe eines adenoviralen Vektors das VEGF A Gen in den umgebenden Muskel eines Frakturgebietes. Die Knochenheilung lies sich anhand von drei Beobachtungszeitpunkten untersuchen. Eine Woche nach dem Trauma beobachteten sie eine erhöhte Anzahl an Kapillaren in der Frakturumgebung. Eine weitere Woche später sah man weniger nekrotisches Material als in den Kontrollgrupppen. Durch eine VEGF Überexpression kam die enchondrale Ossifikation schneller zum Abschluss und die Knochenmineralisierung wurde ebenfalls durch VEGF Expression gefördert. Diese Ergebnisse gleichen weitestgehend den unseren, nur dass wir durch eine hypoxische Stimulation und nicht durch exogene Gabe, die VEGF Expression der Zellen begünstigten.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass in Schockgruppen zum Zeitpunkt des letzten Beobachtungstages die Bildung von Knochen aus Knorpel deutlich fortgeschrittener war, als in den Frakturgruppen ohne Schockereignis. Über alle anderen Heilungszeitpunkten hinweg, lies sich eine verstärkte VEGF Anfärbung in den hypoxischen Schockgruppen erkennen.

Umgekehrt lässt sich also sagen, dass durch ein vermehrtes Auftreten von VEGF die Gefäßneubildung angeregt wird, die Kapillarisierung von Knorpelzonen besser erfolgen kann und damit die enchondrale Ossifikation gefördert wird.

6.2 Weichteilkonsolidierung

6.2.1 Heilungsverlauf

Auch hier konnte anhand der immunhistologischen VEGF Färbung eine Einteilung der Weichteilkonsolidierung in Phasen vorgenommen werden (54, 102).
Die erste Phase der Heilung war durch schollig zerfallene nekrotische Muskelzellen gekennzeichnet, welche deutlicher VEGF positiv angefärbt waren, als umliegende intakte Muskulatur. Weiterhin sah man eingeblutete Areale umgeben von Gewebsödem, welches die Muskelzellen auseinander drängte.
Drei Tage nach Trauma phagozytierten VEGF positive Makrophagen und Granulozyten nekrotisches Material. Zurück blieben sehr stark VEGF positive Muskelstümpfe umgeben von regenerierenden Myoblasten. Diese produzierten ebenfalls VEGF und lockten damit weitere Myoblasten ins Traumagebiet.
Eine Woche postoperativ fand man ein Maximum an VEGF produzierenden Myoblasten, weiterhin etwas schwächer gefärbte Fibroblasten, welche für die Reparationsvorgänge verantwortlich waren.
Am 14. und somit letzten postoperativen Beobachtungstag dauerten die Regenerationsvorgänge nach wie vor an, erkennbar an zentral gelegenen Zellkernen der Myoblasten sowie an reichlich vorhandener gewellter Muskelfaserabschnitte.

Vergleich unserer Ergebnisse mit experimentellen Studien

In der Literatur findet man leider nur sehr wenige Angaben darüber, in welchen Phasen der Weichteilkonsolidierung hauptsächlich welche Zelltypen an der Produktion des vaskulären Wachstumsfaktors beteiligt sind.
Rissanen et al. (123) untersuchten zwanzig Hasenhinterläufe, nachdem intraoperativ durch Entfernung der A. femoralis superficialis und Ligatur der tiefen Femoralgefäße eine lokale Ischämie induziert wurde. Anschließend erfolgte eine semiquantitative Auswertung der Hinterlaufmuskeln mittels VEGF Immunhistologie über einen Zeitraum von 6 Wochen.

In gesundem Muskelgewebe konnte er keine VEGF Färbung nachweisen. Drei Tage nach Traumasetzung beobachtete er eine diffuse VEGF-Expression durch Skelettmuskelzellen und umgebenden mononukleären Entzündungszellen. Eine Woche später stellten die nekrotischen und bereits regenerierenden Muskelzellen die Hauptquelle der VEGF-Produktion. Drei Wochen postoperativ war die Regeneration deutlich fortgeschritten und Fibrose kennzeichnete das histologische Bild. Nach 6 Wochen war die Muskelheilung in den meisten Fällen vollzogen und allein regenerierte Muskelzellen zeigten einen schmalen zytoplasmatischen Saum von VEGF Färbung.

Unsere Ergebnisse können mit wenigen Ausnahmen mit denen von Rissanen sehr gut verglichen werden. In unserer Studie wurde ein zentrales hypovolämisches Schockgeschehen induziert, welches das lokal gesetzte Weichteiltrauma verstärkte. Rissanen et al. (123) induzierten ihren Weichteilschaden mittels eines lokalen Ischämietraumas. Auch in seinen Schnitten nekrotisierten Muskelzellen, wenn auch in geringerem Ausmaß. Im Gegensatz zu ihm konnte bei unseren Schnitten eine dezente VEGF Färbung auch in gesunden Muskelzellen beobachtet werden. Zudem fanden wir bereits am siebten postoperativen Tag vereinzelt kollagene Fasern als Zeichen der Reparation, welche jedoch im Einklang zu seinen Ergebnissen nicht VEGF positiv waren.

Järvinen (75) konnte ebenfalls bereits recht früh (fünfter postoperativer Tag) eine Kollagenfaserbildung nachweisen und bestätigt dadurch unseren Nachweiszeitpunkt innerhalb einer Woche. Allerdings beschrieb er die Kollagenfasern lediglich deskriptiv, wir betrachteten zudem die Schnitte im polarisierten Licht, wodurch auch schon gering ausgeprägte Kollagenfasern auffällig waren. Durch die Eigenschaft der Doppelbrechung von Kollagen in polarisiertem Licht kann man diese Bindegewebsfasern in histologischen Schnitten als helle Areale erkennen. Ein Grund für den unterschiedlichen Zeitpunkt des Fibrosenachweises in diesen Studien mag darin liegen, dass wir im Gegensatz zu Järvinen ein wesentlich größeres Weichteiltrauma vorliegen hatten. Zudem untersuchte Järvinen, verglichen mit vorliegender Studie, nur das Monotrauma Weichteilschaden und nicht den Einfluss eines zusätzlichen Schockgeschehens auf die Weichteilkonsolidierung. Bei Rissanens Hasen wurden die Blutzufuhr und damit die Chance auf Wiederherstellung der kapillären Perfusion unterbunden. Somit stellte dies wahrscheinlich ein größeres lokales Trauma dar, als in unseren Gruppen mit WTS ohne Schockgeschehen. Dies würde erklären, weshalb Rissanen erst drei Wochen nach Setzen des Weichteilschadens die ersten Fibrosezeichen beobachtete. Zudem war die Beobachtungseinheit von einer zu drei Wochen recht lange gewählt. In unseren Schnitten mit zusätzlichem Schockgeschehen

traten kollagene Fasern auch etwas zeitlich verzögert und auch in geringerem Maße auf, als in der Gruppen mit isoliertem Weichteilschaden.
Weiterhin konnte Rissanen nur in regenerierenden Muskelzellen sowie in mononukleären Entzündungszellen die VEGF Produktion nachweisen. Unsere Ergebnisse bewiesen eine VEGF Färbung zudem in Fibroblasten. Diese Anfärbung war allerdings deutlich geringer, als in den schon beschriebenen Zelltypen.
Parallel zur vorliegenden Arbeit durchgeführte histologische Untersuchungen (99) bestätigen die noch andauernden Reparations- und Regenerationvorgänge des Weichteiltraumas. Rissanens Ergebnisse zeigen, dass zwei Wochen für die Ausheilungszeit eines Weichteilschadens deutlich als zu kurz gewählt wurde. Der Weichteilschaden in seiner Studie war nach weiteren vier Wochen ausgeheilt und sollte somit Anlass für wieterführende Studien sein.
Weiterhin produzieren nach unseren Ergebnissen Myoblasten bzw. Skelettmuskelvorläuferzellen und in Regeneration befindliche Myofibrillen aufs deutlichste VEGF. Germani et al. (54) erbrachten einen VEGF Rezeptornachweis in ruhenden Satellitenzellen und regenerierenden Myozyten. Während unsere Schnitte eine geringe VEGF Färbung in unbeschädigten Muskelzellen zeigten, fand Germani et al. (54) in normal durchbluteten Muskelzellareal lediglich einen VEGF Rezeptornachweis in den umgebenden Satellitenzellen. Dies könnte daran liegen, dass das Trauma, im Sinne einer lokalen Ischämie, durch die Ligatur der blutzuführenden Gefäße zustande kam. Zudem verwendeten Germani et al. (54) und Rissanen et al. (123) als Tiermodell die Maus und wir in unserer Untersuchung die Ratte. Unser Trauma wurde, wie schon oben erwähnt, durch eine Muskelquetschung bzw. zusätzlich zentraler Ischämie verursacht. Dies könnte ein stärkerer Stimulus für die Produktion durch zusätzliche Zellen sein.

6.2.2 Einfluss hypovolämischer Schockzustand

Durch ein hypovolämisches Schocktrauma vergrößerte sich der nekrotische Muskelzellanteil. Als Gründe für diesen vermehrten Anteil an zerstörter Muskulatur sind dabei die im Schock verminderte periphere Durchblutung und die daraus resultierende Ischämie mit sekundären Gewebeschäden zu nennen.
Die Konsolidierung eines Weichteilschadens war im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Schock zeitlich verzögert. Während jedoch ohne Schock viel Reparationsgewebe in Form von Kollagen bzw. Fibrose auffiel, sah man in den Schockgruppen mit SVR Therapie mehr

VEGF Färbung in allen Muskelzellen und weniger Fibrose, so dass man den Schluss ziehen kann: je nekrotischer die Muskelzelle, desto mehr VEGF gefärbt ist sie, desto mehr Myoblastenaktivität und damit Regenerationstendenz ist erkennbar. Wir gehen davon aus, dass dies wohl eher an der Wirkung des HyperHAES®, als an den direkten Schockfolgen liegt. Dies muss allerdings anhand weiterer Studien geklärt werden.

Vergleich unserer Ergebnisse (WTS + Schock) mit klinische Studien

Die Schocktherapie mit hyperosmolaren Volumenersatzmittel bedeutet auch heute noch relatives Neuland im Bereich der klinischen Volumensubstitution. Deshalb finden sich auch bis zum jetzigen Zeitpunkt keine klinischen Studien zum Thema des Einflusses einer mit HyperHAES® therapierten hypovolämischen Schocksituation auf die Weichteilkonsolidierung.

Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Weichteilkonsolidierung ist auch hier der adäquate Volumenersatz noch am Unfallort. Durch Zerreißung und Beschädigung von Blutgefäßen kommt es zur Abnahme der kapillären Perfusion und zur Induktion von Gewebsnekrosen.

Die metabolische Reaktion ist gekennzeichnet durch Abnahme des Sauerstoffverbrauchs direkt nach dem Trauma. Im weiteren Verlauf wird mit Einsetzen der Reperfusion der Stoffwechsel hochreguliert, in erster Linie um den Bedarf zur Produktion von Akutephasenproteinen zu befriedigen. Hierzu und zur Energiegewinnung werden vor allem Muskeleiweiße verstoffwechselt, so dass regelhaft nach Stunden bilanzmäßig eine Katabolie resultiert, die sich wiederum negativ auf das Muskelgewebe im Sinne von Nekrosen auswirkt. Es entsteht eine starke Stimulation des Entzündungssystems mit Aktivierung von Granulozyten und Gewebemakrophagen. Weiterhin werden Mediatoren wie Sauerstoffradikale oder Zytokine freigesetzt, die ihrerseits mit ungesättigten Fettsäuren in den Zellmembranen reagieren und somit zur Entstehung potenter Chemotaxine beitragen, welche ihrerseits noch weitere Entzündungszellen ins Traumagebiet locken. Die Akkumulation von polymorphkernigen Leukozyten führt durch weitere Bildung von Sauerstoffradikalen und Freisetzung von Proteasen zur Schädigung des Gefäßendothels. Folge ist die Zunahme der Gefäßpermeabilität, Abnahme des Kapillarquerschnitts und Zunahme des Gewebeödems im Sinne einer Endothelzellschwellung (106, 134).

Auch unsere Studie zeigte in den Schockgruppen eine vermehrte inflammatorische Reaktion, bei der allerdings zu vermuten ist, dass sie durch die Gabe von SVR schon

deutlich weniger reaktiv auftrat, als ohne eine Volumenintervention unsererseits. Weiterhin war eine Endothelzellschwellung anhand eines die Muskelzellen auseinanderdrängenden Ödems zu erkennen. Dies war in den Schockgruppen zeitlich verzögert rückgängig und unterstützt somit oben dargelegte These.
Eine periphere Gefäßkontraktion, Abnahme der Blutfluidität sowie Vasomotion in der Schockphase verminderte zudem die Durchblutung des geschädigten Muskelareals und führte zu einer verstärkten Muskelzellnekrose, welche wiederum eine verstärkte Induktion von phagozytierenden Zellen mit sich zog.

Vergleich unserer Ergebnisse (WTS + Schock) mit experimentellen Studien

Anhand der histologischen Auswertungen zeigte es sich, dass die Regeneration bzw. Reparation des Weichteilschadens auch nach Schocksituationen möglich ist.
Ein Grund für den guten Heilungsverlauf ist wahrscheinlich die schon mehrfach beschriebene positive Auswirkung der SVR Volumenersatztherapie.
Mittlmeier et al. (103) sprachen sogar von einer Verbesserung der Mikrozirkulation nach geschlossenem Weichteilschaden durch SVR. Wenn man mehrere Forschungsberichte betrachet, müsste man folglich sogar annehmen können, dass Schockpatienten mit SVR Therapie gegenüber Nicht- Schock/SVR- Patienten bessere Heilungsvoraussetzungen haben. Dies wurde anhand von Studien bisher noch nicht überprüft. Allerdings stützt dies die Erfahrungen des klinischen Alltags (68).
Experimentelle Studien wie die von Rissanen et al. (123) und Germani et al. (54) zeigen eine starke VEGF Expression in atrophischen Muskelzellen, die umso ausgeprägter erscheint, je hypoxischer die Zelle ist. Dadurch werden Kapillaren in der Umgebung zur Proliferation angeregt, das Überleben der umliegenden, noch nicht abgestorbenen Zellen bis zur Initialisierung der Angiogenese verlängert und Satellitenzellen in regenerierende Areale angelockt. Es wird angenommen, dass das Einwandern von Satellitenzellen eine autokrine Schleife der regenerierenden Muskelzellen auslöst (123) und somit die „Selbstheilung“ fördert.
Weiterhin stimuliert die Expression von VEGF nicht nur die Myoblasten- Funktion und damit die Neubildung von funktionsfähigem Muskelgewebe, sondern schützt zudem die umliegenden Muskelstammzellen vor der Apoptose (54).
Die histologische Auswertung ergab eine deutlichere VEGF Produktion bei den Schocktieren. Genauer betrachtet, waren die Muskelzellen mit umgebenden Myoblasten

am stärksten gefärbt, welche die größten Nekroseherde aufwiesen. Damit konnten die Thesen der oben genannten zwei Studien nur bestätigt werden: Schock induziert eine Muskelzellnekrose und steigert damit die VEGF Produktion.

In vivo Studien (1, 123) belegen eine starke Hochregulation von VEGF Rezeptoren sowohl in Satellitenzellen zerstörter Muskeln, als auch in vitro regenerierenden Myotuben. Durch das Einschleusen von VEGF Antikörper sollte die Auswirkung der Angiogenesehemmung auf das weitere Wachstum von Muskelfibrillen in Mäusen untersucht werden (154). In „VEGF inaktivierten" Regionen verringerte sich die Kapillardichte und somit das Kapillar-Muskelzell- Verhältnis. Dies führte zur Apoptose und somit zum Untergang von Skelettmuskeln in diesen Mäusen.

Gowdak et al. (56) stimulierten die Angiogenese durch das Einbringen des VEGF 121-Genes und förderten dadurch die Gewebeperfusion nach einer Ischämiephase. Somit wurde erneut die enorme Bedeutung der VEGF Expression gerade im Initialstadium von Weichteilschäden bewiesen und ist damit Voraussetzung einer erfolgreichen Heilung.

Unsere Schockgruppen zeigten ein zeitlich verzögertes Heilungsverhalten, allerdings konnten zwei Wochen nach dem Weichteiltrauma weniger Fibrose und dafür mehr Regeneration - im Sinne von neu entstehendem Muskelgewebe - als in den Nicht-Schockgruppen beobachtet werden. Ein Mehr an Narbengeweben würde eher eine minderwertigere Ausheilung bedeuten, da dieses Gewebe nicht mehr kontraktionsfähig und weniger belastbar ist. Diese Ergebnisse korrelieren mit den klinischen und experimentellen Beobachtungen, jedoch wäre ein weiterer Heilungszeitpunkt von 28 Tagen für eine differenzierte Beurteilung sinnvoll gewesen. Verantwortlich für die nicht abgeschlossene Heilung des Weichteilschadens nach 14 Tagen war dabei vermutlich ein massiveres Weichteiltrauma als in den Vergleichsstudien.

Die von Buckwalter et al. (17) aufgestellte These der restitutio ad integrum für ein Weichteiltrauma konnte mit dieser Studie abschließend weder bestätigt noch widerlegt werden. Die Ergebnisse der ersten 14 Tage neigen eher dazu, einen Weichteilschaden nach Schocktrauma als für wieder vollständig ausgeheilt zu betrachten. Zudem unterstützen sie die Beobachtungen des klinischen Alltags: ein Weichteilschaden mit zusätzlichem Schocktrauma regeneriert aus immunhistologischer Sicht besser, als ein isolierter Weichteilschaden. Ob dies Auswirkung auf die zukünftige Behandlung von Weichteiltraumata hat, ist zu bezweifeln und muss nach zusätzlichen weiteren experimentellen und praeklinischen Studien abgewartet werden.

6.2.3 Behandlung des Schocktraumas

Die histologischen Schnitte der beiden Frakturgruppen mit zusätzlichem Schockgeschehen unterschieden sich nur in sehr wenigen Merkmalen. Während in der HAES® Gruppe initial mehr Entzündungszellen, Fibroblasten, Osteoblasten und Knorpelzellen auftraten, verzögerte sich die Frakturheilung in der HyperHAES® Gruppe. Zudem beobachtete man, gegen alle Erwartung, eine geringfügig verlängerte Entzündungsphase. Diese Ergebnisse sind sehr kritisch zu betrachten, da in jeder Gruppe lediglich nur ein Tier pro Beobachtungszeitraum zur Verfügung stand. Leider konnten keine weiteren Vergleiche mit HAES® Tieren gestartet werden, da intra- und postoperativ zu viele Tiere unter HAES® Substitution verstarben.

In einer Studie von Bumann- Melnyk (18), die parallel zur vorliegenden Arbeit an denselben operierten Tieren durchgeführt wurde, sollten die bisher unklaren Effekte von HyperHAES® auf die Mikrozirkulation der Unterschenkelmuskulatur der Ratte nach Weichteiltrauma mit bzw. ohne zusätzliches Schockgeschehen mittels Laserdoppler-Flowmetrie untersucht werden.

In den Weichteilschadengruppen mit Schockgeschehen stellte er unmittelbar nach der Operation einen noch größeren Druchblutungsrückgang fest, als in den isolierten Weichteilschadengruppen. Bereits einen Tag post Trauma normalisierte sich die Durchblutung in der Schockgruppe mit der Volumensubstitution mit SVR, während sie in der Gruppe WTS im Vergleich zum Ausgangszustand noch reduziert war.

Die durch das Schockgeschehen induzierte Minderdurchblutung der peripheren Muskulatur vergrößerte wahrscheinlich in unserer Studie die vorliegenden Traumata Fraktur und Weichteilschaden. Allerdings konnte mit Hilfe der SVR Therapie die Durchblutung der Schockgruppen innerhalb eines Tages normalisiert werden. Dies wiederum ermöglichte die verhältnismäßig schelle Reparation und Regeneration der Gewebe mit induziertem Schock.

In der Gruppe WTS + Schock ließ sich sogar eine Tendenz zur Verbesserung der Muskelregeneration im Vergleich zu Gruppe WTS feststellen.

Diese Tatsachen heben die klinische Relevanz der SVR Therapie unter Schockbedingungen hervor und sollten Anlass zu weiteren klinischen Studien mit HyperHAES® geben.

6.3 Kritik an Methoden der Studie

Für die Untersuchungen unserer Studie wählten wir die Ratte als Tiermodell, da dies eine einfache Pflegehaltung sowie geringe räumliche Kapazität erforderlich machte und die Ratte sich zudem durch eine hohe Infektionsresistenz auszeichnet. Die Ratte besitzt eine große Regenerationskapazität (172), sowie einen höheren metabolischen Umsatz, d.h. eine höhere Knochenbildungsrate als der Mensch (172). Unsere Ergebnisse zeigten, dass nach 4 Wochen eine Fraktur der Ratte weitgehend ausgeheilt war, ein Weichteiltrauma nach 14 Tagen allerdings noch eine deutliche Regeneration zeigte. Ob dies auf den Menschen ebenfalls zutrifft, konnte in dieser Studie nicht abschließend geklärt werden.

Die beschriebene Auswertungsergebnisse und deren Diskussion beruhen unter anderem auf einer speziell für das Rattenmodell entwickelten Methodik zur Erzeugung von reproduzierbaren Weichteilschäden. Damit gelang ein geschlossener Tscherne Grad II Weichteilschaden (107) ohne zusätzliche Fraktur der Tibia und Fibula.

Ziel war es, einen umfassenden Schaden der Weichteilstrukturen herzustellen und somit dem klinischen Bild einer großflächigen Muskelkontusion nahe zu kommen. Es wurde auf eine selektive Auswahl der zu verletzenden Muskeln verzichtet. Stattdessen wurde die gesamte Wadenmuskulatur auf einer bestimmten Höhe in transversaler Ausrichtung traumatisiert. Dabei wurde die anterolaterale und mediale Wadenmuskulatur beschädigt.

Voruntersuchungen konnten zeigen, dass geringere Aufprallgeschwindigkeiten oberflächliche Einblutungen erkennen ließen, jedoch keine schweren Verletzungen der Muskelstrukturen und tiefere Einblutungen hervorriefen. Die histologischen Auswertungen der Weichteilschäden unserer Studie zeigte ähnlich dimensionierte und damit reproduzierbare Weichteiltraumata.

Als einer der größten Kritikpunkte soll an dieser Stelle die zu geringe Anzahl an Versuchstieren genannt werden. Insgesamt wurden 61 Versuchstiere auf sieben Gruppen mit ihren unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten verteilt. So standen uns pro Beobachtungszeitpunkt nur zwischen ein und drei Tiere zur Verfügung. Dies lässt nur eingeschränkte Aussagen über die Fragestellung der hypovolämischen Schocktherapie zu, da wir pro Heilungszeitpunkt nur ein Tier der Gruppe HAES® gegenüber einem anderen Tier der Gruppe HyperHAES® untersuchten konnten.

Um den Einfluss eines hypovolämischen Schocktraumas auf die Weichteilkonsolidierung eindeutiger klären zu können, wäre ein weiterer Untersuchungszeitpunkt von 4 Wochen

nötig gewesen. So konnten wir nur Aussagen über die, in der initialen Weichteilkonsolidierung VEGF produzierenden Zellen treffen.

Weiterhin war es uns nicht gelungen, den mittleren arteriellen Blutdruck unter 60 mmHg zu senken, da die meisten Tiere den operativen Eingriff, sowie die anschließende Heilungszeit von zwei Wochen nicht überlebt hätten. Vollmar et al. (165, 166) schlugen eine maximale Schocktiefe bei Ratten mit Werten von 44 mmHg vor. Demnach wäre der von uns erreichte mittlere arterielle Druck nicht tief genug gewesen. In vorliegender Studie war die entnommene Blutmenge bei der Ratte 2,5 mal so groß wie der anschließende Volumenersatz mit HyperHAES®. Dieses wurde während 10 Minuten, in Minutenabständen fraktioniert der Ratte infundiert und damit nach und nach der mittlere arterielle Blutdruck angehoben. Kramer et al. (83) empfehlen Infusionsraten für den Menschen von 10 bis 20 Minuten, demnach wären wir an der unteren Grenze seiner Vorgaben. Obwohl die tierexperimentellen Daten verschiedenster Arbeitsgruppen die positiven Effekte der Infusion hyperosmolarer Kochsalz- Kolloidlösung auf die Makro- und Mirkozirkulation eindeutig belegen (85, 84, 113), ist in den bis heute vorgelegten klinischen Studien der definitive Beweis noch nicht erbracht worden, dass dieses Konzept der konventionellen Volumentherapie überlegen ist. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss jedoch die Heterogenität des Studiendesigns, die Zusammensetzung der Prüflösung sowie der Applikationsmodus berücksichtigt werden.

Weiterhin standen uns keine Kontrolltiere in den Gruppen mit Fraktur sowie Weichteilschaden ohne Substitution der hypovolämischen Notsituation zur Verfügung.

So konnten keine Aussagen über den direkten, histologisch zu beobachteten, Effekt des HyperHAES® getroffen werden.

Eine quantitative Auswertung der Kapillarisierung und damit direkte Wirkung des Angiogenesefaktors VEGF konnte nicht vorgenommen werden. Zu allen Beobachtungszeitpunkten in allen histologischen Schnitten waren Endothelzellen VEGF rot gefärbt, und die Gruppen unterschieden sich nicht in diesem Merkmal.

Des Weiteren können Artefaktbildungen und Schnittebenen die semiquantitative Auswertung beeinflussen, da keine Rotfärbung des Zelltyps als VEGF negativ bewertet wurde. Indem wir verschiedene Schnittebenen desselben Tieres färbten und untereinander verglichen, konnten wir gravierende Fehler in der Auswertung ausschließen.

Der von uns verwendete VEGF Antikörper richtete sich nur gegen die Splicevarianten 121, 189 sowie 165 Aminosäuren des VEGF A. Zelltypen, welche weiterhin an der

Frakturheilung beteiligt sind und weitere VEGF Varianten produzieren, wurden mit unserer immunhistochemischen Färbung nicht erfasst.
Allerdings zeigten Deckers et al. (35) und Germani et al. (54), dass die von uns erfassten Splicevarianten maßgeblich die Hauptformen in der Frakturheilung und Weichteilkonsolidierung sind.
Da die Schnitte zwischen 4- 5 µm in der Breite variierten, lässt sich eine unterschiedlich starke Bindung des Antikörpers nicht sicher ausschließen. Außerdem kann die individuelle Antigenbindung jeder einzelnen Ratte leicht variieren und somit Einfluss auf das Färbeergebnis haben. Der primäre oder sekundäre Antikörper ließ nach einiger Zeit in seiner Funktion nach, was anhand der verblassenden Färbung beobachtet wurde.

6.4 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die Vorgänge der Frakturheilung und Weichteilkonsolidierung mittels einer Immunenzymhistologie des Wachstumsfaktors VEGF beobachtet.
Hauptergebnis der Auswertungen der Gruppe Fraktur und Fraktur + WTS war eine verzögerte Frakturheilung nach zusätzlichem Weichteilschaden. Die von Bumann- Melnyk (164) mittels Laserdoppler- Flowmetrie gemessenen Mirkozirkulationsunterschiede der beiden Gruppen in der initialen Phase der Frakturheilung müssen als Hauptgründe für die verzögerte Regeneration angesehen werden. Während Biomechanik und Standardhistologie keine Unterschiede nach vier Wochen erkennen ließen, konnte man immunhistologisch reichlich aktive Zentren als Zeichen der Heilungsverzögerung in der Gruppe Fraktur + WTS gegenüber der Gruppe mit isolierter Fraktur beobachten.
Im Rahmen der Frakturheilung konnte eine durch Schockgeschehen induzierte verbesserte Heilungstendenz gezeigt werden. Die durch Schock hervorgerufene lokale Ischämie stimulierte die Bildung von VEGF und damit wurden die Wiederherstellungsprozesse auf zellulärer Ebene beschleunigt. Ob diese Ergebnisse eine klinische Relevanz besitzen, muss durch weitere Frakturheilungsstudien geklärt werden. Dabei sollte die Rolle wichtiger weiterer Zytokine wie TGF-β oder BMP gerade im Zusammenhang mit Schocktraumata untersucht werden.
Im Hinblick auf die Untersuchung des Einflusses eines hypovolämischen Schockgeschehens auf die Weichteilkonsolidierung, sollte wie schon bereits oben beschrieben, eine Anschlussstudie mit 6 Wochen Beobachtungszeit angestrebt werden. Sie

sollte klären, ob ein zusätzliches Ischämietrauma das Regenerationspotential eines Muskelschadens fördert bzw. ob ein solches Kombinationstrauma in Zukunft klinisch neueren Therapiezielen unterworfen werden muss. Auch in diesem Zusammenhang wäre eine Analyse von anderen Wachstumsfaktoren und Zytokinen notwendig, um noch genauere Einblicke in die Weichteilkonsolidierung mit bzw. ohne Schock zu erhalten.

Weiterhin sollte über eine Erweiterung des Klassifikationsschemas nach Oestern und Tscherne (107) nachgedacht werden. Es wäre sinnvoll das Schema in seinen Grundprinzipien und Kategorisierung beizubehalten. Allerdings sollte es hinsichtlich sekundärer Schäden wie Ödem, Konsistenzzunahme und Nekrose ergänzt werden. Damit wird man der Tatsache gerecht, dass ein zunächst wenig dramatisch anmutender Weichteilschaden, sein volles Ausmaß erst nach Stunden und Tagen zeigt. Mit der verbesserten Einschätzung eines Weichteilschadens könnte man nachhaltige Heilungsstörungen wie Vernarbung oder Infektionen schon frühzeitig erkennen und schwerwiegende Folgen durch eine frühe Intervention vermeiden.

Die VEGF Histologie diente sehr gut zur Verlaufsbeobachtung der Traumakonsolidierung. Allerdings konnten nur semiquantitative Aussagen getroffen werden. Es bleibt weiterführenden Studien überlassen, quantitative Methoden der VEGF Immunhistologie in Zusammenhang mit oben genannten Ergebnissen zu entwickeln.

Sehr positive Aussagen konnte über die Volumenersatztherapie mit HyperHAES® / SVR getroffen werden. Obwohl uns sehr wenige Vergleichstiere zur Verfügung standen, hatten Tiere mit SVR Therapie unter Schockbedingungen die wesentlich besseren Heilungsvoraussetzungen als Tiere unter konventioneller Volumenersatztherapie. SVR reduzierte Herzkreislaufinstabilitäten und verbesserte die periphere Durchblutung der Traumagebiete. Damit wurde die wichtigste Voraussetzung für eine erfolgreiche Heilung gesetzt. Es bleibt allerdings noch zu überprüfen, ob die von uns gewonnenen positiven Erkenntnisse der Volumensubstitution mit SVR auf das Großtiermodell und damit auch auf den Menschen übertragbar sind.

7. Zusammenfassung

Zur Klärung des Einflusses eines Weichteilschadens (WTS) und hypovolämischen Schockgeschehens auf die Frakturheilung und des Einflusses dieses Schockgeschehens auf die Weichteilkonsolidierung wurden insgesamt 61 WISTAR Ratten (385g, 77 Tage alt) zufällig in die Gruppen Fraktur, Fraktur + Schock, Fraktur + WTS, WTS und WTS + Schock unterteilt. Die Frakturen und der Weichteilschaden wurden mechanisch durch Dreipunktbiegung bzw. dynamische Quetschung erzeugt. Die Osteosynthese der Frakturen erfolgte mittels Marknagelung. Der Volumenmangel wurde mit HyperHAES® substituiert. Der Schwerpunkt dieser Studie wurde auf die immunhistologische Untersuchung der Produktion des Wachstumsfaktors VEGF nach dem 1., 3., 7., 14. und 28. postoperativen Tag gelegt. Als einer der wichtigsten angiogenetischen Faktoren nimmt Vascular endothelial growth factor (VEGF) auch im Rahmen der Frakturheilung eine wichtige Position ein. Zum ersten Mal ist es gelungen rein deskriptiv Angaben über die, an der Konsolidierung der beiden Traumata beteiligten Zellen und deren Produktion von VEGF über den gesamten Heilungsverlauf zu machen.

Die bekannten Phasen der Frakturheilung konnten dabei auch über die Phasen der VEGF Expression nachvollzogen werden: Entzündungsphase, Phase der Organisation und desmalen Ossifikation, enchondrale Ossifikationsphase und Remodeling. Durch die deskriptive und semiquantitative histologische Auswertung konnten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Dabei erkennt man, dass ein zusätzliches Weichteiltrauma die Frakturheilung vor allem in den frühen Phasen verzögert. Ein hypovolämisches Schockgeschehen mit anschließendem Volumenersatz hingegen verlängert zwar die Entzündungsphase, allerdings wird die Frakturheilung nicht verzögert.

Bei der Weichteilkonsolidierung ließen sich ebenfalls die charakteristische Heilungsphasen der VEGF Expression darstellen: Entzündungsphase, Organisationsphase, Reparation- und Regenerationsphase sowie die Phase des Remodelings. Die Ergebnisse zum WTS legen den Schluss nahe, dass nach hypovolämischen Schock der Weichteilschaden initial mehr Koagulationsnekrosen aufweist und die Heilung zeitlich verzögert wird. Allerdings wird durch den hypovolämischen Schock in Verbindung mit der Volumensubstitution die Regeneration verbessert, was sich in mehr funktionsfähigem Muskelgewebe und weniger Narbengewebe widerspiegelt. Leider war die Heilung des WTS in beiden Gruppen auch am 14. postoperativen Tag noch nicht abgeschlossen, so dass hinsichtlich des endgültigen Ausheilungsresultates keine verlässlichen Aussagen gemacht werden können.

Die Therapie des Schockgeschehens mittels HyperHAES® hat sich im Rahmen unserer Studie als eine geeignete Volumensubstitution am Rattenmodell erwiesen. Allerdings bedürfen die gezeigten Ergebnisse einer Bestätigung im Großtiermodell und am Menschen. Die klinische Relevanz dieser immunhistologischen Studie sollte mittels weiterführenden Studien auch mit anderen Wachstumsfaktoren sowie einer zusätzlichen Beobachtungszeit von vier Wochen untersucht werden.

8. Literatur

1. **Arsic N, Zaccigna S, Zentilin L, Ramirez- Correa G, Pattarini L, Salvi A, Sinagra G, Giacca M:** Vascular endothelial growth factor stimulates muscle regeneration in vivo. Mol Ther 10: 844- 854 (2004)

2. **Assoian RK, Fleurdelys BE, Stevenson HC, Miller PJ, Madtes DK, Rain EW, Ross R, Sporn MB:** Expression and secretion of type β transforming growth factor by active human macrophages. Proc Natl Acad Sci USA 84: 6020- 6024 (1987)

3. **Augat P, Merk J, Wolf S, Claes L:** Mechanical stimulation by external application of cyclic tensile strains does not effectively enhance bone healing. J Orthop Trauma 15: 54- 60 (2001)

4. **Augat P, Burger J, Schorlemmer S, Henke T, Peraus M, Claes L:** Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model. J Orthop Res 21: 1011- 1017 (2003)

5. **Baird A, Mormede P, Bohlen P:** Immunoreactive fibroblast growth factor in cells of the peritoneal exudate suggests its identity with macrophage- derived growth factor. Biochem Biophys Res Commun 126: 358- 364 (1985)

6. **Barleon B, Sozzano S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marmé D:** Mirgration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt- 1. Blood 87: 3336- 3343 (1996)

7. **Barnes G, Kostenuik P, Gerstenfeld L, Einhorn TA:** Growth factor regulation of fracture repair. J Bone Miner Res 14: 1805- 1815 (1999)

8. **Bolander ME:** Regulation of fracture repair by growth factors. Proc Soc Exp Biol Med 200: 165- 170 (1992)

9. **Bonnarens F, Einhorn TA:** Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. J Orthop Res 2: 97- 101 (1984)

10. **Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Steinbrech DS, Mehrara BJ, Longaker MT:** Factors in the fracture microenvironment induce primary osteoblast angiogenic cytokine production. Plast Reconstr Surg 110: 139- 148 (2002)

11. **Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA, Longaker MT:** 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 (2002)

12. **Bourque WT, Gross M, Hall BK**: A histological processing technique which preserves the integrity of calcified tissue (bone, enamel), yolky amphibian embryos and growth factor antigen in skeletal tissue. J Histochem Cytochem 41: 1429- 1439 (1993)

13. **Bourque WT, Gross M, Hall BK:** A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. Lab Anim Sci 42: 369- 374 (1992)

14. **Braun W, Rüter A:** Frakturheilung- Morphologische und physiologische Gesichtspunkte. Unfallchirurg 99: 59- 67 (1996)

15. **Brookes M, Richards DJ, and Singh M.** Vascular sequelae of experimental osteotomy. Angiology 21: 355- 367 (1970)

16. **Brookes M, Revell W:** Blood supply of bone- scientific aspects. Springer, Berlin, S.172 (1997)

17. **Buckwalter JA, Einhorn TA, Bolander ME, Cruess RL**: Healing of the Musculoskeletal Tissues. In: Rockwood CA, Green DP, Bucholz RW, Heckman JD (Hrsg) Fractures in Adults. Vol. 1, 4. Aufl, Lippincott-Raven, Philadelphia, S. 261- 303 (1996)

18. **Bumann-Melnyk M:** Der Einfluss eines Weichteilschadens auf die Frakturheilung- eine biomechanische und angiographische Untersuchung. Dissertation Universität Ulm (2004)

19. **Campbell B, Chuhran C, Lefer AM:** Vascular endothelial growth factor attenuates trauma- induced injury in rats. Br J Pharmacol 129: 71- 76 (2000)

20. **Cannon JG, Tompkins R, Gelfand, JA, Michie H, Standford G, van der Meer JW, Endres S, Lonnemann G, Corsetti J, Chernow B:** Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. J Infect Dis 161: 79-84 (1990)

21. **Carlevaro MF, Cermelli S, Cancedda R, Descalzi Cancedda F:** Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. J Cell Sci 113: 59- 69 (2000)

22. **Carlson B**: The Regeneration of Skeletal Muscle- A Review. Am J Anat 137: 119-149 (1973)

23. **Carlson B, Faulkner**: The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review. Med Sci Sports Exerc 15: 187- 198 (1983)

24. **Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A:** Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. Nature 380: 435- 439 (1996)

25. **Centrella M, McCarthy T, Canalis E:** Current concepts review transforming growth factor-beta and remodeling of bone. J Bone Joint Surg 73-A: 1418- 1427 (1991)

26. Chao EYS, Aro HAT: Biomechanics of fracture repair and fracture fixation. 3rd coference of the ISFR, Brussels/ Belgium (1992)

27. Charnock- Jones DS, Sharkey AM, Boocock CA, Ahmed A, Pelvin R, Ferrara N, Smith SK: Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and chorocarcinoma cells. Biol Reprod 51: 524- 530 (1994)

28. Chavakis E, Riecke B, Li J, Linn T, Bretzel RG, Preissner KT, Brownlee M, Hammes HP: Kinetics of integrin expression in the mouse model of proliferative retinopathy and success of secondary intervention with cyclic RGD peptides. Diabetologia 45: 262- 267 (2002)

29. Chua CC, Hamdy RC, Chua BH: Mechanismof transforming growth factor beta 1 induced expression of vascular endothelial growth factor in murine osteoblastic MC3T3- E1 cells. Biochem Biophys Acta 1497: 68- 76 (2000)

30. Claes L, Augat P, Suger G, Wilke HJ: Influence of size and stability of the osteotomy gap on the sucess of fracture healing. J Orthop Res 15: 577- 584 (1997)

31. Claes L, Grass R, Schmickal T, Kisse B, Eggers C, Gerngross H, Mutschler W, Arand M, Wintermeyer T, Wentzensen A: Monitoring and healing analysis of 100 tibial shaft fractures. Langenbecks Arch Surg 374: 146- 152 (2002)

32. Collin- Osdoby P: The role of vascular endothelial cells in bone biology. J Cell Biochem 55: 304- 309 (1994)

33. Dambe L: Revaskularisation der Diaphyse langer Röhrenknochen nach Fraktur und Osteosynthese. Inaug Diss Univ Saarl. (1971)

34. De Vries C, Escobedo JA, Uneo H, Houck K, Ferrara N, Williams LT: The fms- like tyrosine kinase, a receptor for the vascular endothelial growth factor. Science 255: 989- 991 (1992)

35. Deckers MM, Karperien M, van Der Bent C, Yamashita T, Papapoulus SE, Lowik CW: Expression of vascular endothelial growth factor and their receptors during osteoblast differentiation. Endocrinology 141: 1667- 1674 (2000)

36. Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hogendam J, van Der Bent C, Papapoulus SE, Lowik CW: Bone morphogenetic proteins stimulates angiogenesis through osteoblast- derived vascular endothelial growth factor A. Endocrinology 143: 1545- 1553 (2002)

37. Einhorn TA: The biology of fracture healing. 3rd Conference of the international Society for Fracture Repair, Brussels/ Belgium 1- 15 (1992)

38. Einhorn TA: Enhancement of fracture healing. J Bone Joint Surg Am 77: 940- 956 (1995)

39. **Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC:** The expression of cytokine activity by fracture callus. J Bone Miner Res 10: 1272- 1281 (1995)

40. **Endres S, van der Meer JW, Dinarello CA:** Interleukin-1 in the pathogenesis of fever. Eur J Clin Invest 17: 469- 474 (1987)

41. **Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA:** Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? Mech Dev 87: 57- 66 (1999)

42. **Ferrara N, Henzel WJ:** Pituiary follicular cells secrete a novel heparin- binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Bioch Biophys Res Commun 161: 851- 858 (1989)

43. **Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW:** The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. J Cell Biochem 47: 211- 218 (1991)

44. **Ferrara N, Carvermoore K, Chen H, Dowd M, Lu L, Oshea KS, Powellbraxton L, Hillan KJ, Moore MW:** Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. Nature 380: 439- 442 (1996)

45. **Ferrara N, Davis- Smyth T**: The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev 18: 4- 25 (1997)

46. **Ferrara N, Keyt B:** Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications. EXS 79: 209- 232 (1997)

47. **Ferrara N:** Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. J Mol Med 77: 527- 543 (1999)

48. **Folkman J, Shing Y:** Angiogenesis. J Biol Chem 267: 10931- 10934 (1992)

49. **Frayn KN**: Hormonal control of metabolism in trauma and sepsis. Clin Endocrinol 24: 577- 599 (1986)

50. **Frost H:** The biology of fracture healing. An overview for clinicans. Part I. Clin Orthop Relat Res 248: 283- 293 (1989)

51. **Gauthier TW, Scalia R, Murohara T, Guo JP, Lefer AM:** Nitric oxide protects against leukocyte- endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. Arterio Thromb Vasc Biol 15: 1652- 1659 (1995)

52. **Gerber HP, VU TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N:** VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. Nat Med 5: 623- 628 (1999)

53. **Gerber HP, Ferrara N:** Angiogenesis and bone growth. Trends Cardiovasc Med 10: 223- 228 (2000)

54. Germani A, Di Carlo A, Mangoni A, Straino S, Giacinti C, Turrini P, Biglioli P, Capogrossi MC: Vascular endothelial growth factor modulates skeletal myoblast function. Am J Pathol 163: 1417- 1428 (2003)

55. Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J: Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produces by pituitary- derived folliculo stellate cells. Proc Natl Acad Sci USA 86: 7311- 7315 (1989)

56. Gowdak LH, Poliakova L, wang X, Kovesdi I, Fishbein KW, Zacheo A, Palumbo R, Straino S, Emanueli C, Marrocco- Trischitta M, Lakatta EG, Anversa P, Spencer RG, Talan M, Capogrossi MC: Adenovirus mediated VEGF (121) gene transfer stiumulates angiogenesis in normoperfused skeletal muscle and preserves tissue perfusion after induction of ischemia. Circulation 102: 565- 571 (2000)

57. Gratzl M: Regeneration, Hyperplasie und Hypertrophie von Muskelgewebe. In: Gratzl M (Hrsg) Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO: Histologie, 5.Auflage, Springer Berlin, Heidelberg, New York, S. 161 (2002)

58. Greenbaum M, Kanat I: Current concepts in bone healing. Review of the literature. J Am Podiatr Med Assoc 83: 123- 129 (1993)

59. Gresham GA: Reparation und Regeneration. In: Gresham GA (Hrsg): Allgemeine Pathologie, Ullstein Mosby Berlin, S. 83- 84 (1993)

60. Gustafsson T, Ameln H, Fischer H, Sundberg CJ, Timmons JA, Jansson E: VEGF- A splice variants and related receptor expression in human skeletal muscle following submaximal exercise. J Appl Physiol 98: 2137- 2146 (2005)

61. Gustilo RB, **Mendoza RM, Williams DN**: Problems in the management of type III (severe) open fractures: a new classification of type III open fractures. J Trauma 24: 742- 746 (1984)

62. Gustilo RB, Anderson JT: Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty- five open fractures of long bones: retrospective and prospective analyses. J Bone Joint Surg Am 58: 453- 458 (1996)

63. Hanahan D, Folkman J: Patterns and emerging mechanism of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 86: 353- 364 (1996)

64. Harada S: Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E1 und E2 in osteoblasts. J Clin Invest 93: 2490- 2496 (1994)

65. Harada S, Rodan SB, Rodan GA: Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in osteoblasts. Clin Orthop 313: 76- 80 (1995)

66. Harper J, Klagsbrun M: Carilage to bone- angiogenesis leads the way. Nat Med 5: 617- 618 (1999)

67. Hausmann M, Schaffler M, Majeska: Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. Bone 29: 560-564 (2001)

68. Henke T: (2004 Persönliche Mitteilung)

69. Höhl MA: (2004 Persönliche Mitteilung)

70. Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HD: VEGF upregulates ecNOS message, protein and NO production in human endothelial cells. Am J Physiol 274: 1074- 1058 (1998)

71. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW: The vascular endothelial growth factor family: identificationof a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. Mol Endocrinol 5: 1806- 1814 (1991)

72. Hulth A: Current conceptsof fracture healing. Clin Orthop Relat Res 265- 284 (1989)

73. Ibelgraufts H: COPE Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia. Version 3.1 http://www.copewithcytokines.de/.

74. Ichigatani M, Saga T, Yamaki K, Yoshizuka M: Appearance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in femoral head in the growing rat. Histol Histopathol 16: 463- 468 (2001)

75. Järvinen M: Healing of a crush injury in rat striated muscle 2. A histological study of early mobilization and immobilization on the repair process. Acta Path Microbiol Scan Sect A 83: 269- 282 (1975)

76. Joukov V, Kaipainen A, Jeltsch M, Pajusola K, Olofsson B, Kumar V, Eriksson U, Alitalo K: Vascular growth factors VEGF- B and VEGF- C. J Cell Physiol 173: 211- 215 (1997)

77. Jussila L, Alitalo K: Vascular growth factors and lymphangiogenesis. Physiol Rev 82: 673- 700 (2002)

78. Jussila L, Valtola R, Partanen TA, Salven P, Heikkilae P, Matikainen MT, Rekonen R, Kaipainen A, Detmar M, Tschachler E, Alitalo R, Alitalo K: Lymphatic endothelium and Kaposi´s Sarcoma spindle cells detected by antibodies against the vascular endothelial growth factor receptor. Cancer Res 58: 1599- 1604 (1998)

79. Kakeji Y, Koga T, Sumiyoshi J, Shibahara K, Oda S, Maehara J, Sugimachi K: Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer. J Exp Clin Cancer Res 21: 125- 129 (2002)

80. Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y: Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. Cancer Res 55: 5687- 5692 (1995)

81. Knopp W, Muhr G, Wanner K, Steinau HU: Das Primat der Weichteilrekonstruktion beim komplizierten Unterschenkelbruch- ein neues Konzept. Langenbecks Arch Chir Suppl (Kongressbericht) 239: 576- 578 (1991)

82. Koch AE, Poverini PJ, Kunkel SL: Interleukin-8 as a macrophage- derived mediator of angiogenesis. Science 258: 1798- 1801 (1992)

83. Kramer GC: Hypertonic resuscitation: Physiologic mechanism and recommendations for trauma care: J Trauma 54: 89- 99 (2003)

84. Kreimeier U, Thiel M, Messmer K: Hypertonic- hyperoncotic solutions In: Risberg B (Hrsg) Trauma care- an update. Pharmacia & Upjohn Sverige Ab, Stockholm, S. 142- 153 (1996)

85. Kreimeier U, Christ F, Frey L Habler O, Thiel M, Welte M, Zwissler B, Peter K: Small-volume Resuscitation beim hypovolämischen Schock. Anaesthesist 46: 309-328 (1997)

86. Krettek C: Fracture and soft tissue damage. Chirurg 69: 684- 700 (1998)

87. Krettek C: Principles of intramedullary fracture stabilization. 2. Surgical technique. Unfallchirurg 104: 749- 769; quiz 717- 741 (2001)

88. Kurdy NM, Weiss JB, Bate A: Endothelial stimulating angiogenic factor in early fracture healing. Injury 27: 143- 145 (1996)

89. Kutznetsova LV, Tomasek N, Sigurdsson GH, Banic A, Erni D, Wheatley AM: Dissociation between volume blood flow and laser Doppler signal from rat muscle during changes in vascular tone. Am J Physiol 274: 1248- 1254 (1998)

90. Landry PS, Marino AA, Sadasivan KK, Albright JA: Effect of soft- tissue trauma on the early periosteal response of bone to injury. J Trauma 48: 479- 483 (2000)

91. Lang F: Bindegewebe- Physiologie und allgemeine Pathophysiologie. In: Lang F (Hrsg) Pathophysiologie, Pathobiochemie, Bd 3. Auflage, Aufl, Enke Verlag, Stuttgart, S. 475 (1987)

92. Laurnen, EL, Kelly PJ: Blood flow, oxygen consumption, carbon-dioxide production, and blood-calcium and pH changes in tibial fractures in dogs. J Bone Joint Surg Am 51: 298- 308 (1969)

93. Lee A, Christenson LK, Patton PE, Burry KA, Stouffer KL: Vascular endothelial growth factor production by human luteinized granulosa cells in vitro. Human Reprod 12: 2756- 2761 (1997)

94. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ: Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. Bone 19: 1- 12 (1996)

95. Li TS, Hamano K, Suzuki K, Ito H, Zempo M, Matsuzaki M: Improved angiogenic potency by implantation of ex vivo hypoxia prestimulated bone marrow cells in rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol 283: 468- 473 (2002)

96. Lieberman J, Daluiski A, Einhorn TA: The role of growth factors in the repair of bone. J Bone Joint Surg 84: 1032- 1044 (2002)

97. Lungershausen W, Schulz F: Regelhafte und gestörte Frakturheilung. Zentralbl Chir 125: 57-62 (2000)

98. Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, Wang J, Tuder RM, Voelkel NF: In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. Am J Physiol 275: 1054- 1061 (1998)

99. Maurer- Klein N: Einfluss eines Weichteilschadens auf die Frakturheilung und die Zusammenhänge zwischen Schockgeschehen und Weichteilkonsolidierung am Rattenmodell. Dissertation Universität Ulm (2004)

100. McKibbin B: The biology of fracture healing in long bones. J Bone Joint Surg Br 60: 150-162 (1978)

101. Menger MD, Barker JH, Messmer K: Capillary blood reperfusion during postischemic reperfusion in striated muscle. Plast Reconstr Surg 89: 1104-1114 (1992)

102. Menger Md, Lehr HA: Scope and perspectives of intravital microscopy-bridge over form in viro to in vivo. Immunol Today 14: 519- 522 (1993)

103. Mittlmeier T, Vollmar B, Menger MD, Schewior L, Raschke M, Schaser KD: Small volume hypertonic hydroxyl starch reduces acute microvascular dysfunction after closed soft- tissue trauma. J Bone Joint Surg 85: 126- 132 (2003)

104. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z: Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its receptors. FASEB 13: 9- 22 (1999)

105. Nicosia RF: VEGF- related molecules in tumors. Am J Pathol 153: 11- 15 (1998)

106. Nolte B, Bayer M, Lehr HA et al: Attenuation of postischemic microvascular disturbance in striated muscle by hyperosmolar saline dextran. Am J Physiol 263: 259- 273 (1992)

107. Oestern HJ, Tscherne H: Patholphysiology and classification of soft tissue damage in fractures. Orthopaede 12: 2-8 (1983)

108. Oni O: The bony callus. Injury 28: 629- 631 (1997)

109. Paydas S, Zorludemir S, Baslamisli F, Tuncer I: Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in plasmocytoma. Leuk Lymphoma 43: 139- 143 (2002)

110. Petersen W, Wildemann B, Pufe T: Das angiogenetische Peptid VEGF wird während der Frakturheilung exprimiert. Z Orthop (2001)

111. Plate KH, Warnke PC: Vascular endothelial growth factor. J Neuro-Oncology 35: 365- 372 (1997)

112. Plenk H jr.: Knochengewebe und Zähne. In: Böck P (Hrsg): Romeis Mikroskopische Technik, 17. Aufl, Urban und Schwarzenberg München, Wien, Baltimore, S. 527- 566 (1989)

113. Prough DS, Whitley JM, Taylor CL et al: Small- Volume resuscitation from hemorrhagic shock in dogs: effects on systemic hemodynamics and systemic blood flow. Crit Care Med 19: 364- 372 (1991)

114. Pufe T, Petersen W, Tillmann B, Mentlein R: The splice variants VEGF121 and VEGF165 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor are expressed in the synovia of patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol 28: 1482- 1485 (2001)

115. Pufe T, Wildemann B, Petersen W, Mentlein R, Raschke M, Schmidmaier G: 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 (2002)

116. Raff G, livingston DH, Wang MT, Rameshwar P: Hemorrhagic shock abolishes the myelopoietic response to turpentine- induced soft- tissue injury.J Surg Res 59: 75- 79 (1995)

117. Restucci B, Papparella S, Maiolino P, De Vico G: Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. Vet Pathol 39: 202- 209 (2002)

118. Rhinelander FW, and Baragry RA: Microangiography in bone healing. I. Undisplaced closed fractures. J Bone Joint Surg Am 44: 1273- 1298 (1962)

119. Rhinelander FW: The normal microcirculation of diaphyseal cortex and its response to fracture. J Bone Joint Surg Am 50: 784- 800 (1968)

120. Rhinelander FW: Tibial blood supply ub relation to fracture healing. Clin Orthop 105: 34- 81 (1974)

121. Rhinelander FW: Vascular proliferation and blood supply during fracture healing. In: Brooker, A.F.//Edwards, C.C.- External Fixation: The current state of the Art, The Williams and Wilkins Co (Baltimore) 9- 14 (1979)

122. Risau W: Mechanism of angiogenesis. Nature 386: 671- 674 (1997)

123. Rissanen T, Vajanto I, Hiltunen M, Rutanen J, Kettunen M, Niemi M, Leppänen P, Turunen MP, Markkanen JE, Arve K, Alhava E, Kauppinen RA, Ylä- Herttuala S: Expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor- 2 (KDR/ FLK- 1)in ischemic skeletal muscle and ist regeneration. Am J of Pathol 160: 1393- 1403 (2002)

124. Romeis B: Fixierung histologischer Präparate. In: Böck P (Hrsg): Romeis Mikroskopische Technik, 17. Aufl, Urban und Schwarzenberg München, Wien, Baltimore, S. 69- 111 (1989 a)

125. Romeis B: Einbetten der fixierten Präparate. In: Böck P (Hrsg): Romeis Mikroskopische Technik, 17. Aufl, Urban und Schwarzenberg München, Wien, Baltimore, S. 113- 151 (1989 b)

126. Romeis B: Mikrotome. In: Böck P (Hrsg): Romeis Mikroskopische Technik, 17. Aufl, Urban und Schwarzenberg München, Wien, Baltimore, S. 154- 165 (1989 c)

127. Romeis B: Aufziehen der Schnitte und Vorbereitung zur Färbung. In: Böck P (Hrsg): Romeis Mikroskopische Technik, 17. Aufl, Urban und Schwarzenberg München, Wien, Baltimore, S. 168- 178 (1989 d)

128. Rommens PM, Broos PL: The significanc of soft- tissue trauma for fracture healing. Unfallchirurg 95: 133- 141 (1992)

129. Rommens PM, Claes P, De Boodt P, Stappaerts KH, Broos PL: Therapeutisches Vorgehen und Langzeitergebnisse bei der Pilonfraktur in Abhängigkeit vom primären Weichteilschaden. Unfallchirurg 97: 39- 46 (1994)

130. Ross R, Benditt EP: Woundhealing and collagen formation. J Biophys Biochem Cytol 11: 667- 700 (1961)

131. Ruedi TP, Sommer C, Leutenegger A: New techniques in indirect reduction of long bone fractures. Clin Orthop 347: 27- 34 (1998)

132. Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Dudziak ME, Greenwald JA, Luchs JS, Spector JA, Ueno H, Gittes GK, Longaker MT: Transforming growth factor- beta 1 medulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts. Am J Physiol 277: 628- 637 (1999)

133. Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Spector JA, Greenwald JA, Chin GS, Ueno H, Gittes GK, Longaker MT: Mechanism of fibroblast growth factor-2 modulation of vascular endothelial growth factor expression by osteoblastic cells. Endocrinology 141: 2075- 2083 (2000)

134. Scalia PS, Pearlman S, Campell B, Lefer AM: Time course of endothelial dysfunction and neutrophil adherence and infiltration during traumatic shock. Shock 6: 177- 182 (1996)

135. Schaser KD, Vollmar B, Menger MD, Schewior L, Kroppenstedt SN, Raschke M, Lübbe AS, Haas NP, Mittlmeier T: In vivo analysis of microcirculation following closed soft- tissued injury. J Orthop Res 17: 678-685 (1999)

136. Schenk R: Fracture repair- overview. Calcified tissue minth European Symposium. Wien: Hegemann (1973)

137. Schenk R, Perren S: Biology and biomechanics of fracture healing in long bones as a basis for osteosynthesis. Hefte Unfallheilkd S. 29- 41 (1977)

138. Schenk R: Histophysiology of bone remodelling and bone repair. In: Lin OC, Chao EYS (Hrsg) Perspectives on Biomaterials, Aufl, Elsevier Science, Amsterdam, S. 75-94 (1986)

139. Schoppmann SF, Birner P, Stöckl J, Kalt R, Ulrich R, Caucig C, Kriehuber E, Nagy K, Alitalo K, Kerjaschki D: Tumorassociated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. Am J Pathol 161: 947- 956 (2002)

140. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science 219: 983- 985 (1983)

141. Shimokado K, Raines EW, Madtes DK, Barrett TB, Benditt EP, Ross R: A significant part of marcrophage- derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. Cell 43: 277- 286 (1985)

142. Spector JA, Mehrara BJ, Greenwald JA, Saadeh PB, Steinbrech DS, Bouletreau PJ, Smith LP, Longaker MT: Osteoblast expression of vascular endothelial growth factor is modulated by the extracellular microenvironment. Am J Physiol Cell Physiol 280: 72- 80 (2001)

143. Stadnyk AW: Cytokine production by epithelial cells. FASEB J 8: 1041- 1047 (1994)

144. Starr AJ, Welch RD, Eastridge BJ, Pierce W, Zhang H: The effect of hemorrhagic shock in a caprine tibial fracture model. J Orthop Trauma 16: 250- 256 (2002)

145. Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saadeh PB, Chin G, Dudziak ME, Gerrets RP, Gittes GK, Longaker MT :Hypoxia regulates VEGF expression and cellular proliferation by osteoblasts in vitro. Plast Reconstr Surg 104: 738-747 (1999)

146. Steinbrech DS Mehrara BJ, Saadeh PB, Greenwald JA, Spector JA, Gittes GK, Longaker MT: VEGF expression in an osteoblast- like cell line is regulated by a hypoxia response mechanism. Am J Physiol Cell Physiol 278: 853- 860 (2000)

147. Stevens DA, Williams GR: Hormone regulationof chondrocyte differentation and endochondral bone formation. Mol Cell Endocrinol 151: 195- 204 (1999)

148. Stoner HB: Metabolism after trauma and in sepsis. Circ Shock 19: 75- 87 (1986)

149. Street J, Winter D, Wang JH, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP: Is human fracture hematoma inherently angiogenic? Clin Orthop 378: 224- 237 (2000)

150. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV Jr, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. Proc Natl Acad Sci USA 82: 177- 182 (2002)

151. Stürmer KM, Schuchardt W: Neue Aspekte der gedeckten Marknagelung und des Aufbohrens der Markhöhle am Tierexperiment. I. Die Schafstibia als Tiermodell für die Marknagelung. Unfallheilkunde 83: 341- 345 (1980)

152. Svindland AD, Nordsletten L, Reikeras O, Skjeldal S: Periosteal response to transient ischemia. Histological studies on the rat tibia. Acta Orthop Scand 66: 468- 472 (1995)

153. Takahashi T, Shirasawa T, Miyake K, Yahagi Y, Maruyama N, Kasahara N, Kawamura T, Matsumura O, Mitarai T, Sakai O: Protein tyrosine kinases expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: FLT- 1 and VEGF expression in renal mesangial cells. Biochem Biophys Res Commun 209: 218- 226 (1995)

154. Tang K, Breen EC, Gerber HP, Ferrara NM, Wagner PD: Capillary regression in vascular endothelial growth factor- degicient skeletal muscle. Physiol Genomics 18: 63- 69 (2004)

155. Tarkka T, Sipola A, Jamsa T, Soini Y, Yla- Herttuala S, Tuukkanen J, Hautala T: Adenoviral VEGF-A gene transfer induces angiogenesis and promotes bone formation in healing osseous tissues. J Gene Med 5: 560- 566 (2003)

156. Tatsuyama K, Maezawa Y, Baba H, Imamura Y, Fukuda M : Expression of various growth factors for cell proliferation and cytodifferentation during fracture repair of bone. Eur J Histochem 44: 269- 278 (2000)

157. Terman BI, Dougher- Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P: Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for the vascular endothelial cell growth factor. Biochem Biophys Res Commun 187: 1579- 1586 (1992)

158. Thakral KK, Goodson WH, Hunt TK: Stimulation of wound blood vessel growth by wound macrophages. J Surg Res 26: 430- 436 (1979)

159. Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling G, Lau K, Crisp T, Fiddes JC, Abraham JA: Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet- derived growth factor gene family. Biochem Biophys Res Commun 165: 1198- 1206 (1989)

160. Torry DS, Holt VJ, Keenan JA, Harris G, Caudle MR, Torry RJ: Vascular endothelial growth factor expression in cycling human endometrium. Fertil Steril 66: 72- 80 (1996)

161. Trippel S, Coutts R, Einhorn TA, Mundy G, Rosenfeld R: Instructional course lecture, American Acadamy of Orthopaedic Surgeions. Growth factors as therapeutic agents. J Bone Joint Surg Am 78: 1272- 1286 (1996)

162. Utvag SE, Grundnes O, Reikeras O: Early muscle- periosteal lesion fracture healing in rats. Acta Orthop Scand 70: 62- 66 (1999)

163. Utvag SE, Grudnes O, Rindal DB, Reikeras O: Influence of Extensive Muscle Injury on Fracture Healing in Rat Tibia. J Orthop Trauma 17: 430- 435 (2003)

164. Vaisman N, Gospodarowicz D, Neufeld C: Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. J Biol Chem 265: 19461- 19466 (1990)

165. Vollmar B, Lang G, Post S, Menger MD, Messmer K: Mircocirculation of the liver in hemorrhagic shock in the rat and its significance for energy metabolism and function. Zentralbl Chir 118: 218- 225 (1993)

166. Vollmar B, Lang G, Menger MD, Messmer K: Hxpertonic hydroxyethyl starch restores hepatic microvascular perfusion in hermorrhagic shock. Am J Physiol 226: 1927- 1934 (1994)

167. Weindel K, Marmé D, Weich HA: AIDS- Associated Kaposi´s Sarcoma Cells in Culture Express Vascular Endothelial Growth Factor. Biochem Biophys Res Commun 183: 1167- 1174 (1992)

168. West CM et al.: Tumor vascularity: a histological measure of angiogenesis and hypoxia. Cancer Res 61: 2907- 2910 (2001)

169. Wichmann MW, Arnoczky SP, DeMaso CM, Ayala A, Chaudry IH: Depressed osteoblast activity and increased osteocyte necrosis after closed bone fracture and hemorrhagic shock. J Trauma 41: 628- 633 (1996)

170. Wichmann MW, Remmers D, Ayala A, Chaudry IH: Der Beitrag von Weichteiltrauma und/ oder Knochenfraktur zur Immundepression nach hämorrhagischen Schock im Tierexperiment. Unfallchirurg 101: 37- 41 (1998)

171. Willenegger H, Perren S, Schenk R: Primäre und sekundäre Knochenheilung. Chirurg 42: 241- 252 (1971)

172. Wissing H, Stürmer KM: Untersuchungen zur Knochenregeneration nach Unterbrechung der medullären oder periostalen Strombahn bei verschiedenen Versuchtier- Species. Hefte zur Unfallheilkunde 181: 225- 228 (1986)

173. Yang XJ, Cepko CL: Flk- 1, a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF), is expressed by retinal progenitor cells. J Neurosci 16: 6089- 6099 (1996)

174. Yang XJ, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, Ross J, Jin A: Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. J Cardiovasc Pharmacol 27: 838- 844 (1996)

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Lutz Claes für die Bereitstellung des Themas und für die Möglichkeit, an seinem Institut promovieren zu dürfen. Es war mir möglich, jederzeit in einer angenehmen Atmosphäre zu arbeiten.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Peter Augat für seine kompetente Beratung, stetigem Interesse, Geduld und aufmunternden Worte. Seine schnelle Durchsicht, Korrektur und Tätigkeit als Gutachter waren letztendlich Voraussetzung für das Gelingen dieser Arbeit.

Herrn Dr. Henke sowie Herrn Dr. Bumann- Melnyk danke ich für die Durchführung sämtlicher operativen Eingriffe und Planung des Projektes. Vor allem Mark stand zur Beantwortung aller anfallenden Fragen immer gerne zur Verfügung.

Herzlichen Dank der Chirurgischen Abteilung des Bundeswehrkrankenhauses in Ulm für die Freistellung des Operateurs sowie der Bereitstellung vieler Materialien.

Vielen Dank Frau Tomo, Frau Maile und vor allem Frau Müller-Molenar für die Herstellung der histologischen Schnitte und die kompetente Beratung in histologischen Fragen. Ohne das Engagement, Wissen und Durchhaltevermögen von Frau Müller-Molenar wäre die immunhistologische Arbeit nicht möglich gewesen.

Die regelmäßigen Doktorandenseminare im Institut halfen mir bei der Betrachtungsweise vieler Fragestellungen durch kritisches Nachfragen sowie Denkanstöße der Teilnehmer und motivierten zur Fortführung der Arbeit. Danke!

Ferner möchte ich allen Mitarbeitern des Institutes für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm für die stete Hilfsbereitschaft und freundliche Art danken.