

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet. Eckhard Wolf

Angefertigt am
Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm
(Prof. Dr. med. vet. Anita Ignatius)

Einfluss eines schweren Traumas auf die Frakturheilung

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Stefan Recknagel
aus Filderstadt

München 2012

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Wolf
Korreferenten:	Univ.-Prof. Dr. Meyer-Lindenberg
	Univ.-Prof. Dr. Knubben-Schweizer
	Univ.-Prof. Dr. Dr. Erhard
	Priv.-Doz. Dr. Wess

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

Meiner Familie in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1 Pathogenese der systemischen Inflammation nach Mehrfachtrauma	3
2.2 Das Komplementsystem als posttraumatisches Frühwarnsystem.....	5
2.3 Die Frakturheilung	8
2.3.1 Inflammationsphase	9
2.3.2 Reparationsphase.....	10
2.3.3 Remodelingphase	12
2.4 Einfluss der Osteosynthesestabilität auf inflammatorische Prozesse im Frakturheilungsgebiet.....	12
2.5 Einfluss der systemischen Inflammation auf die Frakturheilung.....	13
2.6 Hypothesen.....	14
3 PUBLIKATIONEN.....	16
3.1 Experimental blunt chest trauma impairs fracture healing in rats.....	16
3.2 C5aR-antagonist significantly reduces the deleterious effect of a blunt chest trauma on fracture healing.....	29
4 DISKUSSION.....	42
5 ZUSAMMENFASSUNG	49
6 SUMMARY	50
7 LITERATURVERZEICHNIS	51
8 DANKSAGUNG	59

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATP	Adenosintriphosphat
BMP	Morphogenetisches Knochenprotein (<i>Bone morphogenetic protein</i>)
BS	Knochenoberfläche (<i>Bone surface</i>)
BV	Knochenvolumen (<i>Bone volume</i>)
C5aR	C5a-Rezeptor
C5aR-Ag	C5a-Rezeptor-Antagonist
CAr	Kallusfläche (<i>Callus area</i>)
CCL2	CC Chemokinligand 2
CCR2	CC Chemokinrezeptor 2
Cg	Knorpelgewebe (<i>Cartilage tissue</i>)
Ctrl	Kontrolle (<i>Control</i>)
DAMPS	Gefahrenmoleküle (<i>Danger-associated molecular patterns</i>)
DCO	<i>Damage control orthopedics</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
EI	Biegesteifigkeit (<i>Flexural rigidity</i>)
Fc	<i>Fragment crystalline</i>
FT	Bindegewebe (<i>Fibrous tissue</i>)
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen koloniestimulierender Faktor (<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
IFN- γ	Interferon gamma
IFS	Interfragmentäre Dehnung (<i>Interfragmentary strain</i>)
IL	Interleukin
I _{max}	Maximales Flächenträgheitsmoment (<i>Maximum moment of inertia</i>)
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	Makrophagen koloniestimulierender Faktor (<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>)
MAC	Membranangriffskomplex (<i>Membrane attack complex</i>)
MASP	MBL-assozierte Serinprotease
MBL	Mannose-bindendes Lektin
μ CT	Mikrocomputertomographie
MODS	Multiorganversagen (<i>Multi organ dysfunction syndrome</i>)
PMN	Polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor κB</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor κB ligand</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>Reactive oxygen species</i>)
SIRS	Ganzkörperinflammation (<i>Systemic inflammatory response syndrome</i>)
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor beta (<i>Transforming growth factor beta</i>)
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TOT	Gesamtknochengewebe (<i>Total osseous tissue</i>)
TV	Gesamtkallusvolumen (<i>Total callus volume</i>)
TXT	Stumpfes Thoraxtrauma (<i>Blunt chest trauma</i>)
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)

1 EINLEITUNG

Schwere Traumata stellen die häufigste Todesursache bei Menschen im Alter bis 40 Jahren dar und sind daher von enormer klinischer Relevanz (KEEL & TRENTZ, 2005; DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR UNFALLCHIRURGIE E.V., 2006). Mehrfach verletzte Patienten weisen je nach Lokalisation und Intensität der Gewalteinwirkung ein individuelles Verletzungsmuster auf, wodurch die Behandlung dieser Patienten eine große klinische Herausforderung darstellt. Die häufigste und zugleich kritischste Begleitverletzung polytraumatisierter Patienten ist das Thoraxtrauma (62,5% der polytraumatisierten Patienten) (DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR UNFALLCHIRURGIE E.V., 2010). Es ist einer der stärksten Initiatoren der komplexen posttraumatischen systemischen Inflammation und repräsentiert die Hauptursache des sogenannten späten Traumatods bei mehrfach verletzten Patienten (BARDENHEUER et al., 2000; STRECKER et al., 2002; GIANNOUDIS et al., 2008; VISSER et al., 2011). Sowohl klinisch als auch tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass ein stumpfes Thoraxtrauma zu einer sehr schnellen systemischen Freisetzung von Interleukinen (IL), Chemokinen und Prostanoiden sowie einer starken Aktivierung der Gerinnungs- und Komplementkaskade und schließlich zu einer überschießenden Aktivierung von Inflammationszellen führt (GEBHARD et al., 1997; KNÖFERL et al., 2003; FLIERL et al., 2008; VISSER et al., 2011). Die systemische Inflammation kann mit anderen Organsystemen interagieren, die initial nicht vom Trauma betroffen waren, und somit zu Organdysfunktion, Multiorganschaden (*multi organ dysfunction syndrome*; MODS) oder gar zum Versterben des schwerverletzten Patienten einige Tage nach dem Trauma führen (KEEL & TRENTZ, 2005; PERL et al., 2005; PERL et al., 2006; STENSBALLE et al., 2009).

Es gibt klinische Hinweise, dass die Frakturheilung bei polytraumatisierten Patienten beeinträchtigt ist und ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Pseudarthrosen besteht (KARLADANI et al., 2001; BHANDARI et al., 2003). Eine Ursache könnte die früh nach schwerem Trauma auftretende überschießende posttraumatische systemische Inflammation sein, die sich negativ auf die Knochenheilung auswirkt (BASTIAN et al., 2011). Es ist denkbar, dass die systemische Entzündungsreaktion die lokalen Inflammations- und Regenerationsvorgänge im Frakturkallus nachhaltig stört und dadurch den Frakturheilungsverlauf beeinträchtigt. Allerdings ist trotz der klinischen Relevanz die Kausalität der gestörten Frakturheilung nach schwerem Trauma bislang ungeklärt. Ziel dieser Arbeit war es daher, in einem ersten Schritt den Einfluss eines schweren Traumas (stumpfes Thoraxtrauma) und der konsekutiven posttraumatischen systemischen Inflammation auf die

Knochenheilung zu untersuchen. In einem weiteren Schritt sollte durch entsprechende therapeutische Intervention auf Ebene des immunologischen Frühwarnsystems, des Komplementsystems, die systemische Inflammation moduliert werden, um die negativen Auswirkungen des Thoraxtraumas auf die Knochenheilung aufzuheben.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Pathogenese der systemischen Inflammation nach Mehrfachtrauma

Der Begriff Polytrauma bezeichnet ein Syndrom kombinierter Verletzungen einer definierten Verletzungsschwere mit konsekutiven systemischen Reaktionen, welche zu Dysfunktionen von nachgeschalteten Organen führen können (GEBHARD & HUBER-LANG, 2008). Da sich je nach Art und Dauer der einwirkenden Traumakraft unterschiedlichste Verletzungsschweren in Unfallpatienten ergeben, und somit innerhalb kürzester Zeit individuelles Handeln erforderlich ist, haben sich verschiedene Scoring-Systeme und Algorithmen in der Klinik etabliert, die eine mehr oder weniger exakte Aussage über Status und Prognose und der daraus resultierenden Therapie des schwerverletzten Patienten erlauben (TSCHERNE & REGEL, 1997).

Während es beim frühen Traumatod durch besonders schwerwiegende Verletzungen wie z. B. dem primären Schädel-Hirn-Trauma oder dem hämorrhagischen Schock bereits am Unfallort oder kurze Zeit später zum Versterben des Patienten kommt, wird der Patient beim späten Traumatod zunächst nach dem Unfall durch entsprechende präklinische und klinische Diagnostik und lebenserhaltende Therapien gerettet (KEEL & TRENTZ, 2005). Daraufhin kommt es jedoch, je nach Ausmaß des initialen Traumas (*First hit*) und Immunstatus des Patienten, zu einer tiefgreifenden Auseinandersetzung des Organismus mit endogenen Gefahrenmolekülen (*Danger-associated molecular patterns*; DAMPS), die in eine überschießende systemische Immunantwort mündet (Abbildung 1) (GEBHARD & HUBER-LANG, 2008). Endogene Gefahrenmoleküle entstehen durch die massive Zerstörung des körpereigenen Gewebes. Dadurch werden in überschießender Weise Desoxyribonukleinsäuren (*Desoxyribonucleic acid*; DNA), Ribonukleinsäuren (*Ribonucleic acid*; RNA), Adenosintriphosphate (ATP) oder

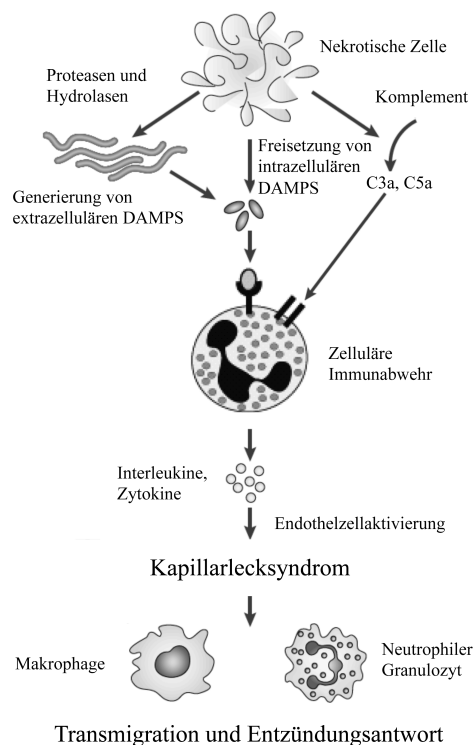


Abbildung 1: Die Trauma-induzierte Freisetzung von endogenen Gefahrenmolekülen führt insbesondere über die Aktivierung des Komplementsystems zu einer komplexen inflammatorischen Kaskade, welche nach Mehrfachtrauma verheerende Folgen für den Gesamtorganismus haben kann. In Anlehnung an KONO & ROCK, 2008.

2 LITERATURÜBERSICHT

Membranfragmente freigesetzt, welche vom Immunsystem als Antigene erkannt werden (Abbildung 1) (LAM et al., 2003; GEBHARD & HUBER-LANG, 2008; KONO & ROCK, 2008; ZHANG et al., 2010).

Die Überflutung des Organismus mit Gefahrenmolekülen wird vom plasmatischen Frühwarnsystem, dem Komplementsystem, erkannt (KÖHL, 2006; GEBHARD & HUBER-LANG, 2008; KONO & ROCK, 2008). Das Komplementsystem übermittelt das Gefahrensignal daraufhin der zellulären Immunabwehr (insbesondere neutrophile Granulozyten), was schließlich einen systemischen Anstieg von Zytokinen, Chemokinen und Komplementspaltprodukten zur Folge hat (GEBHARD et al., 1997; HECKE et al., 1997; GEBHARD et al., 2000). Dies führt zu einer verstärkten Endothelzellaktivierung mit konsekutiver Transmigration aktivierter neutrophiler Granulozyten und Monozyten aus dem Gefäßsystem in periphere Gewebe (KEEL & TRENTZ, 2005; KONO & ROCK, 2008). Ziel dieser komplexen immunologischen Kaskade ist es, Gefahren zu erkennen, zu eliminieren und somit den Organismus vor weiteren Gefährdungen (insbesondere Infektionen) wirksam zu schützen.

Dieser immunologische Schutzmechanismus gerät jedoch nach schwerem Trauma außer Kontrolle und kann sich durch weitere Ereignisse (*Second hits*) noch potenzieren. Hierzu zählen insbesondere zusätzliche iatrogene (operative Traumata) oder mikrobielle (verstärktes Eindringen von Viren oder Bakterien) Herausforderungen (GEBHARD & HUBER-LANG, 2008). Somit kann der ursprünglich sinnvolle Schutzmechanismus verheerende Folgen für den Gesamtorganismus haben. Die überschießende systemische Inflammation führt zu Endothelzellschäden mit konsekutivem Kapillarlecksyndrom und der exzessiven Freisetzung von Proteasen und reaktiven Sauerstoffspezies von aus dem Gefäßsystem ausgetretenen neutrophilen Granulozyten (KEEL & TRENTZ, 2005). Dies führt zu sekundären Parenchymschäden in Organen, die ursprünglich nicht vom initialen Trauma betroffen waren (HIETBRINK et al., 2006). Dadurch entstehen Organdysfunktionen bis hin zum Multiorganversagen, das bei über 20% der schwerverletzten Intensivpatienten beobachtet wird (DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR UNFALLCHIRURGIE E.V., 2010). Ein Überschießen der posttraumatischen Immunantwort wird anhand klinischer Parameter erfasst und als Ganzkörperinflammation (*Systemic inflammatory response syndrome*; SIRS), bei zusätzlichem Nachweis von Bakterien als Sepsis, bezeichnet (KEEL & TRENTZ, 2005).

In diesem Kontext scheint insbesondere das Thoraxtrauma kritisch zu sein (HENSLER et al., 2002; STRECKER et al., 2002). In über 50% der Patienten mit Thoraxtrauma liegen auch Frakturen der Extremitäten vor (SHORR et al., 1987). In solch schwerverletzten Patienten

wird häufig eine Frakturheilungsstörung beobachtet; das Risiko für die Entstehung von Pseudarthrosen steigt deutlich (KARLADANI et al., 2001; BHANDARI et al., 2003). Somit wäre denkbar, dass die posttraumatische systemische Inflammation der Grund für die klinisch beobachtete Frakturheilungsstörung in polytraumatisierten Patienten darstellen könnte. Allerdings gibt es dazu bislang noch keine Untersuchungen.

2.2 Das Komplementsystem als posttraumatisches Frühwarnsystem

Ein wesentlicher Auslöser der posttraumatischen systemischen Inflammation ist das Komplementsystem (FLIERL et al., 2008). Seine Funktion besteht darin, Pathogene zu erkennen, für die zelluläre Immunabwehr zu markieren und schließlich zu eliminieren. Das Komplementsystem ist eine komplexe plasmatische Kaskade aus über 30 Proteinen und kann durch drei Wege aktiviert werden:

Der klassische Weg wird durch Anlagerung von Komplementfaktoren (C1q, C1r, C1s) an den Fc (*Fragment crystalline*)-Anteil von Antigen-Antikörper-Komplexen aktiviert, kann jedoch auch direkt antikörperunabhängig durch Gefahrenmoleküle wie z. B. durch das C-reaktive Protein, durch nekrotisches oder apoptotisches Gewebe oder durch Oberflächenstrukturen gewisser Pathogene aktiviert werden (Abbildung 2).

Der Lektin-Weg ist homolog zum klassischen Aktivierungsweg, wobei die Funktion von C1q durch das Mannose-bindende Lektin (MBL) übernommen

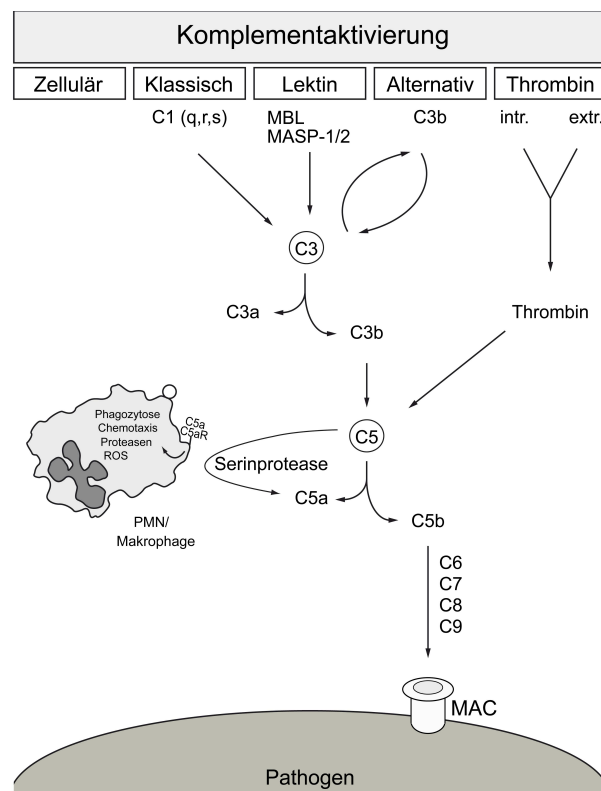


Abbildung 2: Das Komplementsystem kann durch den klassischen, den Lektin- oder den alternativen Weg aktiviert werden. All diese Wege führen über die Bildung einer C3- und C5-Konvertase zur Formierung einer Pore in die Membran der Zielzelle (Membranangriffskomplex (*Membrane attack complex*; MAC)) und somit zur Lyse der Zelle. Durch die Opsonine C3b und C5b können Pathogene markiert und somit für Phagozyten erkennbar gemacht werden. Zudem wurden neue Aktivierungswege beschrieben. Hierbei kann es zur direkten Generierung von Komplementanaphylatoxinen (C3a oder C5a) durch Gerinnungsfaktoren (z. B. Thrombin) oder Phagozyten (polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN), Makrophagen) kommen. C3a und C5a induzieren in Phagozyten eine starke Inflammationsantwort. Diese ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Phagozytose- und Chemotaxisrate sowie einer verstärkten Produktion von Proteasen und reaktiven Sauerstoffspezies (*Reactive oxygen species*; ROS).

wird, während die Serinproteasen C1r und C1s durch die MBL-assoziierte Serinprotease (MASP)-1 bzw. MASP-2 ersetzt werden (Abbildung 2). Die Erkennungsmoleküle des Lektin-Weges binden Mannose-beinhaltende Oberflächenproteine auf Pathogenen.

Anders als der klassische und der Lektin-Weg wird die Aktivierung des alternativen Weges nicht direkt durch die Bindung eines Gefahrenmoleküls an ein Komplementprotein initiiert, sondern findet durch die spontane Hydrolyse des hochreaktiven C3 permanent im Plasma statt, die zur Entstehung von C3b führt (Abbildung 2). C3b bindet daraufhin an Oberflächenmoleküle von Pathogenen oder zerstörtem Gewebe. Aufgrund der konstanten Aktivierung des alternativen Weges wird der Schutz von gesunden Wirtszellen durch die Präsenz von Komplement-regulatorischen Proteinen auf der Zelloberfläche gewährleistet (EHRNTHALLER et al., 2011).

All diese Wege führen letztlich zur Bildung einer zentralen C3-Konvertase, welche C3 in das Anaphylatoxin C3a und in C3b spaltet. Daraufhin wird die C5-Konvertase gebildet, welche C5 in C5a und C5b spaltet. C5b bleibt auf der Zielzelle gebunden und durch weitere Anlagerung von C6, C7, C8 und C9 wird schließlich der Membranangriffskomplex (*Membrane attack complex*; MAC) gebildet, welcher eine Pore in die Membran der markierten Zielzelle formiert, und somit das osmotische Gleichgewicht der Zelle zerstört. Dies führt zur Lyse der Zielzelle (Abbildung 2). Zudem fungieren die Komplementspaltprodukte C3b und C5b als Opsonine, die von Komplementrezeptoren auf Phagozyten erkannt werden können. Somit wird die Phagozytose der nun markierten Zielzelle erleichtert (FLIERL et al., 2006).

Erst kürzlich wurde ein weiterer Aktivierungsweg postuliert, der sogenannte Thrombin-Aktivierungsweg, der eine direkte Verbindung zwischen dem Komplement- und dem phylogenetisch eng verwandten Gerinnungssystem darstellt. Dabei kann es zur direkten Generierung von C3a und C5a durch Thrombin und andere Gerinnungsfaktoren des extrinsischen und intrinsischen Weges der Gerinnungskaskade kommen (Abbildung 2) (HUBER-LANG et al., 2006; AMARA et al., 2010). Dieser Aktivierungsweg könnte insbesondere beim Polytrauma eine große Rolle spielen, da eine sofortige Komplementaktivierung simultan mit der nach dem Trauma regelhaft einsetzenden Gerinnung wahrscheinlich erscheint (GEBHARD & HUBER-LANG, 2008). Einen ebenfalls neu entdeckten Aktivierungsweg stellt der zelluläre Aktivierungsweg dar. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Phagozyten (Makrophagen, neutrophile Granulozyten) mittels einer Serinprotease auf ihrer Zelloberfläche in der Lage sind, C5 direkt in biologisch aktives C5a zu spalten (Abbildung 2) (HUBER-LANG et al., 2002).

2 LITERATURÜBERSICHT

Neben der Erkennung und Eliminierung von Pathogenen führt die aktivierte Komplementkaskade zur Initiierung einer starken Inflammationsreaktion (WARD, 2004). Diese wird hauptsächlich durch die pro-inflammatorischen Anaphylatoxine C3a und C5a vermittelt, von denen C5a inflammatorisch wesentlich potenter ist (RICKLIN et al., 2010). C5a führt nach Bindung an seinen korrespondierenden Rezeptor (C5aR) zur Relaxation der glatten Muskulatur, zur Degranulation von Mastzellen und basophilen Granulozyten und somit zur Freisetzung von vasoaktiven Mediatoren. Zudem ist C5a maßgeblich für die Rekrutierung von Leukozyten und einer damit verbundenen Produktion von Proteasen und reaktiven Sauerstoffspezies verantwortlich (Abbildung 2) (EHRNTHALLER et al., 2011). Daher ist das Komplementsystem in der Lage alle klassischen Anzeichen einer Entzündung hervorzurufen und scheint bei lokalen Entzündungsprozessen die komplexen Interaktionen von Endothelzellen und Inflammationszellen zu steuern, die letztlich für die Wiederherstellung des ursprünglichen Gewebes entscheidend sind. Somit führt die lokale Komplementaktivierung nach Gewebsschädigung zur Eliminierung von Mikroorganismen und trägt zu einer Säuberung des Gewebes von nekrotischem und apoptotischem Gewebe bei (WARD, 2004; RICKLIN et al., 2010; EHRNTHALLER et al., 2011).

Neben den positiven Effekten des Komplementsystems bei lokal begrenzten inflammatorischen Prozessen stellt bereits der systemische Nachweis von Komplementaktivierungsprodukten, insbesondere der Anaphylatoxine C3a und C5a, ein Zeichen für eine außer Kontrolle geratene Komplementaktivierung dar, die verheerende Auswirkungen auf den Gesamtorganismus haben kann (WARD, 2004). Aufgrund seiner starken pro-inflammatorischen Wirkung ist dabei das Anaphylatoxin C5a der gefährlichste Faktor in der aktivierten Komplementkaskade (WARD, 2004). Auch bei polytraumatisierten Patienten stellt das Komplementsystem den wesentlichen Auslöser der posttraumatischen systemischen Inflammation dar. So konnte gezeigt werden, dass das Komplementsystem innerhalb von Minuten nach schwerem Trauma systemisch aktiviert wird und deutlich mit der Verletzungsschwere der Patienten korreliert (HECKE et al., 1997; ALBERS et al., 2006). Erhöhte Plasmakonzentrationen der Komplementanaphylatoxine sind mit einer schlechten Prognose verbunden (HECKE et al., 1997). Analog zur klinischen Beobachtung konnte C5a auch im Thoraxtraumamodell der Ratte als Hauptinitiator der systemischen Inflammation identifiziert werden. Dabei führte das Thoraxtrauma zu einer schnellen und starken Komplementaktivierung, die wiederum einen systemischen Zytokinanstieg, eine Neutrophilie und eine gestörte Neutrophilenfunktion bewirkte. Die neutrophilen Granulozyten zeigten eine erhöhte chemotaktische Aktivität, Phagozytoserate und Produktion von reaktiven

Sauerstoffspezies. Die systemische Behandlung der Ratten mit einem anti-C5a Antikörper unmittelbar nach Thoraxtrauma konnte alle Effekte des Traumas auf die systemische Inflammation aufheben. Die systemische Zytokinfreisetzung wurde inhibiert und die systemische Neutrophilenanzahl wie auch deren Funktion normalisiert, was verdeutlicht, dass eine Komplementinhibition früh nach schwerem Trauma die posttraumatische systemische Inflammation reduzieren kann (FLIERL et al., 2008).

Aufgrund der offensichtlich wichtigen Rolle des Komplementsystems bei der Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen liegt es nahe, dass auch die inflammatorischen Prozesse im Frakturheilungsgebiet von dessen Aktivität abhängig sind, da insbesondere in der frühen inflammatorischen Phase Inflammationszellen in das Frakturheilungsgebiet migrieren und frühe Regenerationsprozesse starten (EINHORN, 2005). Eine Verstärkung und/oder Verlängerung lokaler inflammatorischer Prozesse durch die systemische Komplementaktivierung nach schwerem Trauma könnte somit zu einer gestörten Frakturheilung führen.

Während der Einfluss des Komplementsystems auf Immunzellen weitgehend erforscht ist und damit ein indirekter Zusammenhang mit der Frakturheilung hergestellt werden kann, gibt es bislang nur spärliche Literatur über den Zusammenhang zwischen Komplement und Knochenzellen. Erste Hinweise lassen jedoch vermuten, dass das Komplementsystem auch einen direkten Einfluss auf Knochenzellen während der Frakturheilung haben könnte. So konnte C5aR nicht nur auf Inflammationszellen, sondern auch auf Osteoblasten und Osteoklasten während aller Phasen der Frakturheilung nachgewiesen werden (IGNATIUS et al., 2011a). *In vitro* Arbeiten zeigen, dass C5a die Migration und die Entzündungsantwort in Knochenzellen moduliert und die Osteoklastenbildung positiv beeinflusst (SCHRAUFSTATTER et al., 2009; TU et al., 2010; IGNATIUS et al., 2011b).

Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass nicht nur Inflammationszellen sondern auch Knochenzellen im Frakturgebiet als potentielle Zielzellen für systemisch generiertes Komplement nach schwerem Trauma fungieren. Das Komplementsystem könnte über die Beeinflussung der Anzahl und Funktion von Immunzellen sowie von Knochenzellen die nach schwerem Trauma beobachtete Frakturheilungsstörung wesentlich vermitteln.

2.3 Die Frakturheilung

Die Frakturheilung kann in drei Phasen eingeteilt werden: Inflammationsphase, Reparationsphase und Remodelingphase (CRUESS & DUMONT, 1975). Diese Phasen

überlappen sich teilweise (Abbildung 3) und sollen im Folgenden detaillierter beschrieben werden, mit spezifischem Fokus auf die inflammatorischen Vorgänge während der jeweiligen Phasen.

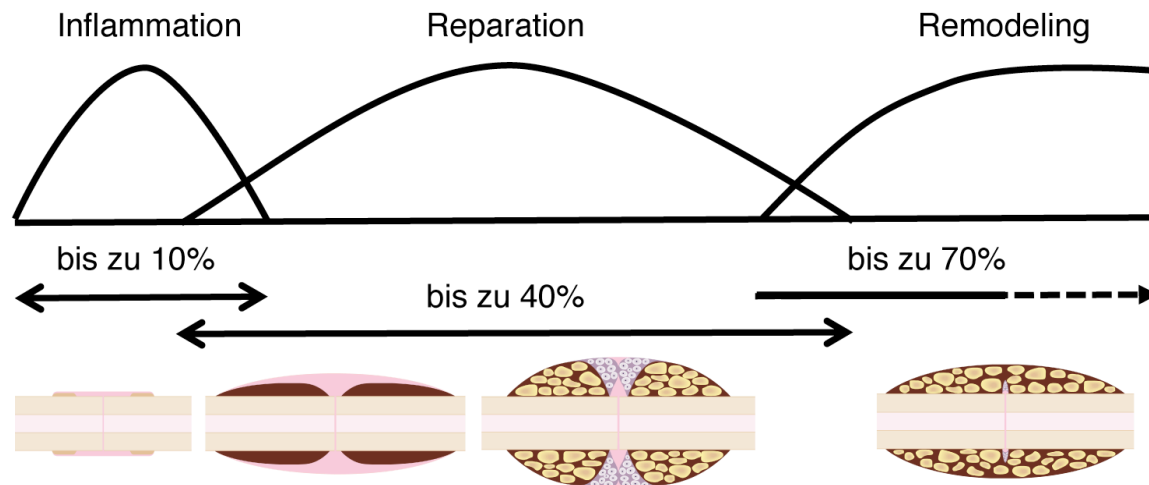


Abbildung 3: Die Phasen der Frakturheilung und deren relative zeitliche Dauer sowie schematisch die korrespondierende Kallusmorphologie. In Anlehnung an CRUESS & DUMONT, 1975.

2.3.1 Inflammationsphase

Die frühe Phase der Frakturheilung ist maßgeblich durch inflammatorische Prozesse im Frakturheilungsgebiet gekennzeichnet (EINHORN, 2005). Durch den Bruch kommt es zur Zerstörung der Blutgefäße innerhalb des Knochens und des umgebenden Weichgewebes. Dadurch wird die Gerinnung eingeleitet. Innerhalb des Frakturspalts bildet sich das Frakturhämatom. Dieses ist charakterisiert durch einen niedrigen pH, einen hohen Gehalt an Laktat und beinhaltet Inflammationszellen aus dem peripheren Blut (Abbildung 4) (KOLAR et al., 2011). Dieses spezielle Mikromilieu ist ein starker Auslöser der Inflammation und daher steigen hier bereits pro-inflammatorische Interleukine auf messbare Werte an (KOLAR et al., 2010). Das frühe Frakturhämatom stellt ein temporäres Gerüst für die Einwanderung weiterer Inflammationszellen dar. Initial migrieren neutrophile Granulozyten in den Frakturkallus (CHUNG et al., 2006). Neutrophile Granulozyten sind sehr kurzlebige Zellen, die verschiedene Chemokine (z. B. CC Chemokinligand 2 (CCL2), IL-6) sekretieren, die wiederum die Migration von Makrophagen induzieren (ANDREW et al., 1994; XING et al., 2010; BASTIAN et al., 2011). Schließlich migrieren Lymphozyten in den Frakturkallus und initiieren die adaptive Immunantwort (Abbildung 4) (ANDREW et al., 1994). Diese komplexen zellulären Reaktionen werden durch eine große Anzahl an pro-inflammatorischen Zytokinen (z. B. IL-1, IL-6, Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α), *Receptor activator of*

nuclear factor kB ligand (RANKL), Makrophagen koloniestimulierender Faktor (*Macrophage colony-stimulating factor*; M-CSF)) sowie von Mitgliedern der transformierenden Wachstumsfaktor beta (*Transforming growth factor beta*; TGF- β) Superfamilie (z. B. Morphogenetisches Knochenprotein (*Bone morphogenetic protein*; BMP)-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6) gesteuert (KON et al., 2001; GERSTENFELD et al., 2003; AI-AQL et al., 2008). Des Weiteren werden bereits sehr früh angiogene Faktoren (z. B. Angiopoetin-1, später auch der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (*Vascular endothelial growth factor*; VEGF)) sezerniert, deren Expression durch die hypoxischen Bedingungen im Frakturheilungsgebiet induziert wird (AI-AQL et al., 2008). Die Wiederherstellung der adäquaten Durchblutung in dieser frühen Phase der Heilung ist sehr wichtig, um normoxische Zustände zu erreichen, Debris abzutransportieren und schließlich die Frakturzone mit Zellen, Nährstoffen und Mediatoren zu versorgen (SCHMIDT-BLEEK et al., 2011). Schließlich migrieren Fibroblasten in die Frakturzone, produzieren Kollagen und es bildet sich ein Granulationsgewebe, das reich an Kollagenfasern und Kapillaren ist (MCKIBBIN, 1978).

Die akute inflammatorische Phase erreicht ihren Höhepunkt in den ersten 24 h nach dem initialen Trauma und dauert in der Ratte ca. sieben Tage (EINHORN, 2005). Die frühe Inflammationsphase mit dem komplexen Wechselspiel zwischen Inflammationszellen und molekularen Faktoren repräsentiert den Startpunkt der Knochenheilung und wird als Initiator der sich anschließenden Reparationsphase angesehen (KON et al., 2001; GERSTENFELD et al., 2003; XING et al., 2010).

2.3.2 Reparationsphase

2.3.2.1 Primäre Frakturheilung

Die primäre Frakturheilung kann lediglich unter absolut rigider Frakturfixation stattfinden (PERREN, 2002). Dies ist in der Regel nur bei der rigiden Stabilisierung des Knochenbruchs mittels einer Plattenosteosynthese unter Kompression der Frakturrenden zueinander der Fall (WILLENEGGER et al., 1971). Hierbei kommt es zur direkten Verzapfung der Osteone. Dies erfolgt zunächst durch Osteoklasten, die Resorptionskanäle zwischen den beiden Frakturrenden „ausbohren“, welche anschließend von Osteoblasten besiedelt werden können, so dass der Defekt überbrückt werden kann (WILLENEGGER et al., 1971; MCKIBBIN, 1978). Eine Sonderform der primären Frakturheilung ist die sogenannte Spaltheilung. Dabei

kommt es bei kleinen Spalten und gleichzeitiger stabiler Osteosynthese zunächst zur Ausfüllung des Spalts mittels Geflechtknochen, welcher zum lamellären Knochen umgestaltet wird (WILLENEGGER et al., 1971; MCKIBBIN, 1978).

Die primäre Frakturheilung wird nur in geringem Maße von inflammatorischen Prozessen begleitet (BASTIAN et al., 2011) und soll daher im Weiteren nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein.

2.3.2.2 Sekundäre Frakturheilung

Die sekundäre Frakturheilung (Kallusheilung) ist die natürliche Form der Knochenheilung. Sie findet bei der Stabilisierung des Knochenbruchs mittels eines Gipses, eines Fixateurs externe oder eines Marknagels statt (PERREN, 2002). Diese Fixationsmethoden sind gekennzeichnet durch das Vorhandensein einer mehr oder weniger ausgeprägten interfragmentären Bewegung zwischen den Frakturrenden (CLAES & ITO, 2005).

Dabei kommt es zunächst frakturspaltfern in Bereichen geringer interfragmentärer Bewegung zur direkten Knochenbildung am Periost durch osteoblastäre Vorläuferzellen (intramembranöse Ossifikation) (CLAES & HEIGELE, 1999; EINHORN, 2005). Im Gegensatz dazu wird in dem dem Frakturspalt direkt angrenzenden Bereich zunächst durch Chondroblasten ein temporäres Knorpelgewebe gebildet (MCKIBBIN, 1978). Dies wird vor allem darauf zurückgeführt, dass in diesen Bereichen die interfragmentäre Bewegung sehr hoch ist, was das Einsprießen von neu gebildeten Kapillaren reduziert und somit zu einer niedrigen Sauerstoffspannung führt (CLAES & HEIGELE, 1999; CLAES et al., 2002). Dies begünstigt die Ausbildung von Knorpelgewebe und inhibiert die Bildung von Knochengewebe. Je flexibler eine Frakturfixation ist und je mehr interfragmentäre Bewegung im Frakturspalt herrscht, desto mehr Knorpel wird gebildet, was verglichen mit einer stabileren Frakturfixation zu einer verzögerten Frakturheilung führt (EPARI et al., 2006). Nachdem der Knorpel den gesamten Frakturspalt überbrückt, sinkt die interfragmentäre Bewegung im Frakturspalt signifikant ab, was nun das Einsprießen von neuen Gefäßen ermöglicht (CLAES et al., 1997; CLAES et al., 2002; CLAES & CUNNINGHAM, 2009). Knorpelzellen werden nun hypertroph, gehen in Apoptose über und der Frakturspalt wird durch rekrutierte mesenchymale Stammzellen, die sich zu knochenbildenden Osteoblasten differenzieren, knöchern überbrückt (enchondrale Ossifikation) (EINHORN, 2005).

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch während der Reparationsphase eine enge Interaktion zwischen Immunzellen und Knochenzellen existiert. So scheinen in der Frühphase

der Frakturheilung einwandernde inflammatorische Makrophagen wichtig zu sein für die Angiogenese und die Knorpel-Knochen-Transformation im Zuge der enchondralen Ossifikation (XING et al., 2010). Im Gegensatz dazu beeinflussen residente Makrophagen, sogenannte Osteomacs, vor allem die intramembranöse Heilung (CHANG et al., 2008; ALEXANDER et al., 2011).

Somit wird auch die Reparatursphase sowohl in Zonen der intramembranösen als auch in Zonen der enchondralen Ossifikation von inflammatorischen Prozessen begleitet (Abbildung 4).

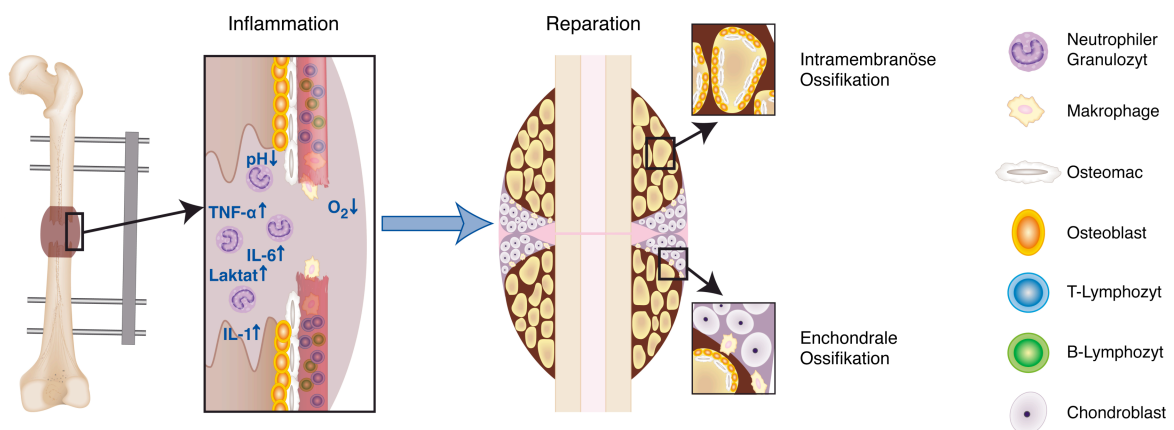


Abbildung 4: Zusammenfassung der inflammatorischen Prozesse während der Frakturheilung: Unmittelbar nach dem Trauma bildet sich das Frakturhämatom. Während der Inflammationsphase migrieren neutrophile Granulozyten in den Frakturspalt, gefolgt von inflammatorischen Makrophagen und Lymphozyten. Während der Reparatursphase sind Osteomacs essentiell für die Knochenbildung in Zonen der intramembranösen Ossifikation, wohingegen inflammatorische Makrophagen insbesondere zur enchondralen Knochenbildung beitragen.

2.3.3 Remodelingphase

Im Zuge der Remodelingphase wird der den Frakturspalt überbrückende Geflechtknochen nach und nach zu lamellärem Knochen umgebaut. Dies erfolgt durch ähnliche Prozesse wie sie auch bei der primären Frakturheilung beschrieben werden (MCKIBBIN, 1978). Die Remodelingphase ist sehr langwierig und dauert beim Menschen bis zu mehreren Jahren. Das Resultat ist ein Knochen in seiner ursprünglichen Form ohne Narbenbildung.

2.4 Einfluss der Osteosynthesestabilität auf inflammatorische Prozesse im Frakturheilungsgebiet

Es gibt Hinweise in der Literatur, dass die lokalen biomechanischen Bedingungen im Frakturheilungsgebiet bereits die frühe Inflammationsphase beeinflussen können. So konnten

Hankemeier et al. unter einer rigiden Frakturfixation initial zwar eine stärkere Immigration von Makrophagen beobachten, die jedoch zeitlich von wesentlich kürzerer Dauer war verglichen mit einer flexibleren Fixation (HANKEMEIER et al., 2001). Zudem konnte in einem Frakturheilungsmodell im Schaf eine verstärkte inflammatorische Phase unter einer flexibleren Frakturfixation beobachtet werden. Das Frakturhämatom und das angrenzende Knochenmark wiesen bei flexibler Fixation eine erhöhte Anzahl an Leukozyten und zytotoxischen T-Zellen auf (SCHMIDT-BLEEK et al., 2011). Somit scheint die lokale inflammatorische Phase unter flexiblerer Fixationssteifigkeit stärker ausgeprägt zu sein. Unklar ist jedoch, ob eine systemische Inflammation mit unterschiedlichen lokalen inflammatorischen Bedingungen (flexibel vs. rigide) auf verschiedene Art und Weise interagiert und in wieweit damit das Ausmaß einer eventuellen Heilungsverzögerung beeinflusst wird.

2.5 Einfluss der systemischen Inflammation auf die Frakturheilung

Die enge Interaktion zwischen Knochen und Immunsystem kann am besten anhand von chronisch inflammatorischen Erkrankungen verdeutlicht werden, wie z. B. der chronisch obstruktiven Bronchitits, dem systemischen Lupus erythematodes oder der rheumatoiden Arthritis. Diese Erkrankungen gehen mit einer systemischen Inflammation einher, die zu Knochenverlust, sekundärer Osteoporose und letztendlich zu einem erhöhten Frakturrisiko für den Patienten führt (HARDY & COOPER, 2009). Dies wird insbesondere darauf zurückgeführt, dass der Großteil der im Rahmen der systemischen Inflammation nachweisbaren pro-inflammatorischen Zytokine (z. B. IL-1, IL-6 und TNF- α) in der Lage ist, die Osteoklastogenese zu induzieren. Dies erfolgt indirekt durch die verstärkte Expression von RANKL durch Osteoblasten oder aktivierte T-Zellen, das an *receptor activator of nuclear factor kB* (RANK) auf der Osteoklastenoberfläche bindet und somit die Osteoklastendifferenzierung induziert (CLOWES et al., 2005; HARDY & COOPER, 2009). Das Ergebnis ist ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau zugunsten des Knochenabbaus, was einen Knochenmasseverlust zur Folge hat.

Während die Rolle von chronisch inflammatorischen Erkrankungen beim Knochenremodeling weitgehend erforscht ist, so gibt es bis dato nur wenige Studien, die den Einfluss einer systemischen Inflammation auf die Frakturheilung untersucht haben. Die Induktion einer akuten systemischen Inflammation in einem experimentellen Sepsismodell in der Ratte,

welche mittels systemischer Gabe von LPS induziert wurde, führte zu einer beträchtlichen Frakturheilungsverzögerung (REIKERAS et al., 2005). Der genaue Pathomechanismus der Heilungsverzögerung blieb jedoch ungeklärt. Die Autoren spekulierten jedoch, dass dies darauf zurückzuführen sei, dass Makrophagen nach Stimulation mit LPS die Eigenschaft verlieren BMP-2 zu sezernieren, was den Knochenanabolismus stören könnte (CHAMPAGNE et al., 2002). Dies steht im Gegensatz zu einer anderen Studie, in der gezeigt werden konnte, dass die systemische Makrophagenaktivierung im Rattenmodell keinen Einfluss auf die Frakturheilung hatte (GRUNDNES & REIKERAAS, 2000). Der Einfluss der Makrophagen bei der Frakturheilung unter systemisch inflammatorischen Bedingungen bleibt daher bislang ungeklärt.

Studien über den Einfluss einer Trauma-induzierten akuten systemischen Inflammation auf die Frakturheilung fehlen gänzlich. Lediglich die isolierte Rolle der neutrophilen Granulozyten, die bei der Pathogenese der systemischen Inflammation nach schwerem Trauma eine Schlüsselrolle einnehmen, wurde bei der Frakturheilung näher charakterisiert: Die systemische Aktivierung neutrophiler Granulozyten führte zu einer verzögerten Frakturheilung, während eine systemisch induzierte Neutropenie die Frakturheilung verbesserte (GROGAARD et al., 1990; GOKTURK et al., 1995). Auch in polytraumatisierten Patienten kommt es früh nach Trauma im Zuge der überschießenden systemischen Inflammation zu einer Neutrophilie, einer verstärkten Extravasation dieser Zellen in periphere Gewebe und einer damit verbundenen Neutrophilendysfunktion, was auch die Hauptursache von Organdysfunktionen in diesen Patienten darstellt (KEEL & TRENTZ, 2005). Somit könnte die erhöhte Anzahl und/oder Aktivität neutrophiler Granulozyten einen entscheidenden Pathomechanismus der gestörten Frakturheilung in polytraumatisierten Patienten darstellen. Da die systemische Anzahl und Aktivität der neutrophilen Granulozyten nach schwerem Trauma insbesondere durch das Komplementanaphylatoxin C5a vermittelt wird (FLIERL et al., 2008), stellt dies einen nachgeschalteten Effekt der aktivierten Komplementkaskade dar.

2.6 Hypothesen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Hypothesen überprüft:

1. Ein schweres Trauma und die dadurch hervorgerufene komplexe systemische Inflammation verzögert die Frakturheilung unter rigider und flexibler Frakturfixation.

2 LITERATURÜBERSICHT

Die Heilungsverzögerung ist unter flexibler Frakturfixation in unterschiedlichem Maße ausgeprägt verglichen mit einer rigideren Frakturfixation.

2. Die Inhibition der posttraumatischen systemischen Inflammation auf Ebene des Komplementsystems hebt die negativen Effekte des schweren Traumas auf und verbessert somit die Frakturheilung.

3 PUBLIKATIONEN

3.1 Experimental blunt chest trauma impairs fracture healing in rats

Stefan Recknagel, Ronny Bindl, Julian Kurz, Tim Wehner, Christian Ehrnthaller, Markus Werner Knöferl, Florian Gebhard, Markus Huber-Lang, Lutz Claes, Anita Ignatius

JOURNAL OF ORTHOPAEDIC RESEARCH 2011; 29(5): 734-739.

Abstract

In poly-traumatic patients a blunt chest trauma is an important trigger of the posttraumatic systemic inflammatory response. There is clinical evidence that fracture healing is delayed in such patients, however, experimental data are lacking. Therefore, we investigated the influence of a thoracic trauma on fracture healing in a rat model.

Male Wistar rats received either a blunt chest trauma combined with a femur osteotomy or an isolated osteotomy. A more rigid or a more flexible external fixator was used for fracture stabilization to analyze whether the thoracic trauma influences regular healing and mechanically induced delayed bone healing differently.

The blunt chest trauma induced a significant increase of IL-6 serum levels after 6 and 24 h, suggesting the induction of a systemic inflammation, whereas the isolated fracture had no effect. Under a more rigid fixation the thoracic trauma considerably impaired fracture healing after 35 days, reflected by a significantly reduced flexural rigidity (three-point-bending test), as well as a significantly diminished callus volume, moment of inertia, and relative bone surface (μ CT analysis).

In confirming the clinical evidence, this study reports for the first time that a blunt chest trauma considerably impaired bone healing, possibly via the interaction of the induced systemic inflammation with local inflammatory processes.

Keywords:

Fracture healing, blunt chest trauma, systemic inflammation, IL-6

Introduction

In multiply injured patients the blunt chest trauma represents one of the most critical injuries and is regarded as an important trigger of the posttraumatic systemic inflammatory response occurring after severe trauma¹⁻³. It was demonstrated that a thoracic trauma induces several systemic effects, such as a rapid release of pro-inflammatory cytokines (e.g., tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6) and prostanoids, as well as an activation of the coagulation and complement systems⁴⁻⁶. The systemic increase of inflammatory mediators was shown to be much higher after a blunt chest trauma in comparison to other injury patterns, indicating its important impact on the systemic inflammatory response in poly-traumatic patients⁷. The severe systemic inflammation can impair the function of cells in tissues not initially directly affected by the trauma. For instance, it was shown in a mouse model of blunt chest trauma that peritoneal- and splenic macrophages as well as splenocytes revealed severe immune dysfunction⁸⁻¹⁰. An excessive inflammatory response can even lead to a multi-organ dysfunction syndrome (MODS)¹¹.

Approximately 50% of patients with a blunt thoracic trauma are additionally affected by fractures of the extremities¹². There is strong clinical evidence that fracture healing is delayed in such patients. Bhandari et al. reported that multiply injured patients suffering from tibial fractures exhibit an approximately three times higher risk of a second surgical intervention compared to patients with an isolated fracture. The main cause of reoperation were non-unions due to disturbed bone healing¹³. The reasons for impaired bone regeneration after severe trauma are unknown, but it can be assumed that the early posttraumatic systemic inflammatory response with the strong increase in pro-inflammatory cytokines could influence the fine local inflammatory balance of the bone healing process. This assumption is supported by the observation that a systemic inflammation induced by the administration of lipopolysaccharide in a rat model of experimental sepsis delayed fracture healing¹⁴. However, despite the clinical relevance, no experimental study has so far investigated the influence of a blunt chest trauma on fracture healing.

It is well known that fracture healing is significantly influenced by local biomechanical factors and that a too flexible fracture fixation leads to delayed union or even a non-union compared to a more rigid fixation¹⁵⁻¹⁷. The biomechanical environment already influences the early stages of bone healing for instance by affecting vascularization¹⁸ or macrophage immigration into the fracture callus during the inflammatory phase of fracture healing¹⁹. It remains to be investigated whether the early posttraumatic systemic inflammation interacts with the local inflammatory processes and differentially influences regular or delayed bone

healing under more rigid or more flexible biomechanical conditions, respectively.

To address these questions we investigated the influence of a blunt chest trauma on fracture healing in a rat osteotomy model under proper or more flexible fixation conditions using an adjustable external fixator. We hypothesized that the systemic inflammatory response induced by the thoracic trauma would delay regular bone healing under proper biomechanical conditions. Furthermore, we postulated that the blunt thoracic trauma would further increase the delay of bone healing induced by mechanical instability.

Methods

Animal experiment

The animal experiment was performed according to international regulations for the care and use of laboratory animals and approved by the local ethical committee (Regierungspräsidium Tübingen, Germany). Thirty-three male Wistar rats (weight 400-450g) were randomly divided into a group receiving a blunt chest trauma and a femur osteotomy, which was stabilized with an external fixator, and a group receiving solely the stabilized osteotomy. Each group was subdivided in a more rigidly or more flexibly fixated group (n = 8-9). Separate animals, which received the flexibly fixated osteotomy with/without thoracic trauma, were used for blood withdrawals in order to measure the early inflammatory response at 0, 6, 24, and 72 h (n = 7-8).

Surgery and blunt chest trauma

Surgery was performed as described previously²⁰. Briefly, the rats were anesthetized with 2% isoflurane (Forene[®], Abbott, Wiesbaden, Germany). To avoid wound infection, the rats received daily subcutaneous injections of clindamycin-2-dihydrogenphosphate (45 mg/kg, Sobelin[®], Pfizer GmbH, Karlsruhe, Germany) until the third postoperative day. A custom-made external fixator was attached to the right femur by four threaded stainless steel pins (Jagel Medizintechnik, Bad Blankenburg, Germany)²¹. An offset of the fixator block of either 6 mm (more rigid) or 12 mm (more flexible) was chosen resulting in an axial stiffness of either 119 N/mm or 31 N/mm, respectively. Subsequently, an osteotomy gap of 1 mm was created between the two inner pins at the mid-shaft of the femur. According to a computational musculoskeletal model²², it can be assumed that the axial component of the internal force in the rat femur could reach up to six times body weight, probably resulting in an interfragmentary strain (IFS) of 21% with the more rigid and 82% with the more flexible fixator. Therefore, callus healing can be expected for both fixation conditions¹⁶. Immediately

after surgery half of the rats received an additional blunt chest trauma under general anesthesia using a blast wave generator as previously described in detail ^{5,6}. This model allows a bilateral, isolated lung contusion by the application of a standardized single blast wave centered on the middle of the thorax. An analgesic (20 mg/kg, Tramal[®], Gruenthal GmbH, Aachen, Germany) was administered subcutaneously during the operation and was diluted in the drinking water (25 mg/L) for the first 3 days following surgery. Each animal was housed in its own cage, given unrestricted access to food and monitored daily for infection and mobility.

Analysis of inflammatory cytokines in the serum

Blood withdrawal was performed under general anesthesia by taking 0.2 ml blood from the lateral tail vein. Blood was collected in serum microvettes (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany). After storing the blood for 1 h at room temperature to accelerate clotting it was centrifuged at 1000g for 10 min. The serum was collected and frozen at -80 °C until further investigation. Numerous ILs (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, and IL-10), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon γ (IFN- γ), and TNF- α were measured using an enzyme linked immunoassay (Bio-Plex Suspension Array System, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) according to the manufacturer's protocols. Levels below the detection limit of the assay were set to zero.

Monitoring of body weight, ground reaction force, and motion

Three days prior to surgery and 2, 7, 14, 21, 28, and 34 days postoperatively, the bodyweight and the ground reaction force of the operated limb of each rat were measured. For measurement of the ground reaction force, the rats were allowed to move freely through an acrylic glass tunnel containing a force plate (HE6x6, Watertown, MA). The peak vertical ground reaction force during normal gait of the operated limb was averaged from five loads for each rat. The postoperative ground reaction forces were related to the preoperative values. On the same days, the activity of each rat was recorded during the 12 h night cycle using an infrared beam detection system fitted to each cage (ActimotMot-System, TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Germany). Movement was quantified by registering counts when a light beam was interrupted. All values were related to preoperative measurements.

Biomechanical testing

After 35 days the rats were sacrificed and the operated and contra-lateral femurs were explanted. The fixators were removed. Because of fractures in regions of the proximal pin, two animals in the more rigidly fixated group without blunt chest trauma had to be excluded.

The flexural rigidity of the femurs was evaluated using a non-destructive, three-point bending test. The femurs were potted with their distal end in cylinders using polymethylmethacrylate (Technovit® 3040, Heraeus Kulzer GmbH, Wertheim, Germany). The cylinder itself was fixed in a hinge joint, serving as the proximal support for the bending test, whereas the head of the femur rested with the major trochanter on the bending support so that a 30 mm free length (l) between the bending supports for the bone remained. A quasistatic load was applied in a three-point bending mode with a materials testing machine (1454, Zwick GmbH, Ulm, Germany) using a 50 N load cell (A. S. T. Angewandte System-Technik GmbH, Dresden, Germany). The bending load F was applied on top of the callus tissue and continuously recorded versus sample deflection up to a maximum force of 10 N at a crosshead speed of 1 mm/min. Flexural rigidity EI was calculated from the slope k of the linear region of the load-deflection curve. Since the callus was not always located at the middle of the supports ($l/2$), the distances between the load vector and the proximal support (a) and the distal support (b), respectively, were considered for calculating the flexural rigidity according to

$$EI = k \frac{a^2 b^2}{3l} \text{ (in Nmm}^2\text{)}.$$

Microcomputed tomography

The femora were scanned using a microcomputed tomography (μ CT) scanning device (Skyscan 1172, Kontich, Belgium) at a resolution of 30 μ m, operating at a peak voltage of 50 kV and 200 μ A. The total volume (TV), bone volume fraction (BV/TV), bone surface/total volume (BS/TV), and the maximum moment of inertia (I_{\max}) were evaluated by segmentation of the former osteotomy gap using the CT analysis software (CTAnalyser, Skyscan, Kontich, Belgium). Global thresholding was performed to distinguish between mineralized and non-mineralized tissue. The gray value corresponding to 25% of X-ray attenuation of the cortical bone of each specimen was taken as the threshold²³.

Statistical analysis

Values of ground reaction force, activity, and serum IL-6 values are shown as mean \pm standard error. Values of bending rigidity and μ CT-values are presented as median and interquartile ranges. The statistics software PASW Statistics 18.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) was used. The time courses of the ground reaction force and the activity were compared using the Russell's error factor²⁴. Flexural rigidity, μ CT parameters and serum IL-6 levels were compared using a one-sided Student's t-test. The level of significance was $p < 0.05$.

Results

Body weight, ground reaction force, and motion

All rats recovered quickly from the operation. The bodyweight did not change significantly during the healing period (results not shown). The activity of the animals was slightly reduced at the second postoperative day and returned to preoperative values after 1 week (Fig. 1A). The application of the blunt chest trauma had no significant influence on the activity nor did the fixation stability. The vertical ground reaction force decreased to approximately 50% of preoperative values after 2 days. Then the ground reaction force steadily increased up to the preoperative values. Again, the groups did not differ significantly (Fig. 1B).

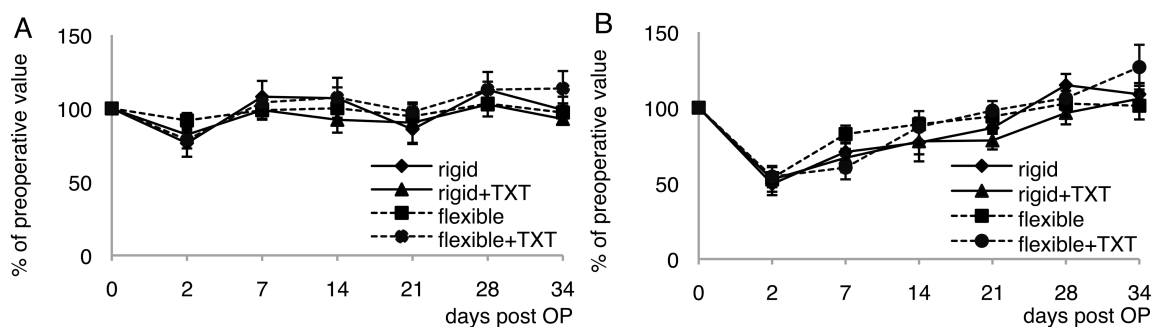


Figure 1: In vivo monitoring of the rats pre-operatively (0) and after surgery. The postoperative values were related to the preoperative data. (A) Activity of the rats measured by an infrared beam detection system. (B) Maximum vertical ground reaction force of the operated limb.

Inflammatory cytokines in the serum

The blunt chest trauma led to a significant, approximately threefold increase of IL-6 in the serum after 6 and 24 h, and to an approximately twofold increase after 72 h, all compared to preoperative values (Fig. 2). In comparison to an isolated fracture, the thoracic trauma increased IL-6 levels significantly after 6 and 24 h, whereas they no longer differed after 72 h. Rats with an isolated fracture did not show significant differences in IL-6 values at any time point compared to preoperative values. IL-10 and INF- γ serum concentration did not reveal any differences between the groups (data not shown). IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, GM-CSF, and TNF- α serum values were below the detection limit of the assay in all groups.

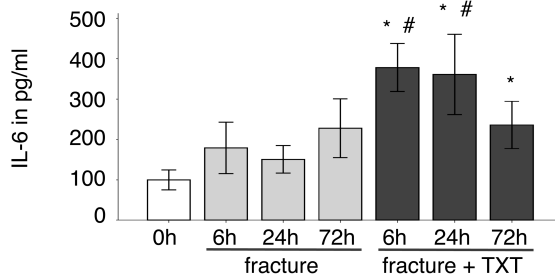


Figure 2: Serum concentrations of IL-6 of rats subjected to blunt chest trauma (TXT) and a flexibly fixated osteotomy or an isolated flexibly fixated osteotomy at 0 (pre-operative value), 6, 24 and 72 h after surgery. * $p < 0.05$ compared to pre-operative values; # $p < 0.05$ compared to animals with isolated fractures.

Biomechanical testing

The blunt chest trauma significantly decreased flexural rigidity in the more rigidly fixated group by 63%, whereas it had no significant influence on the more flexibly fixated group (Fig. 3). In the rats without thoracic trauma, the more flexible fixation significantly decreased flexural rigidity by 53% in comparison to the more rigid fixation.

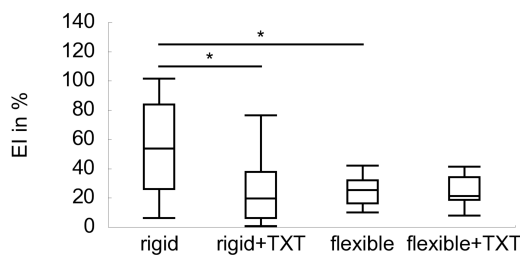


Figure 3: Flexural rigidity (EI) of the fracture callus of rats with or without blunt chest trauma (TXT) and a more rigid or a more flexible fixation of the fracture in comparison to the contra-lateral intact bone. * $p < 0.05$.

Microcomputed tomography

Under the more rigid fixation the blunt chest trauma significantly reduced TV of the callus by 20% (Fig. 4A), BS/TV by 24% (Fig. 4C) and I_{max} by 50% (Fig. 4D). BV/TV was not significantly influenced by the thoracic trauma in the more rigidly fixated group (Fig. 4). Under the more flexible fixation the blunt chest trauma did not significantly influence any of the evaluated parameters. In animals without thoracic trauma, a more flexible fixation increased TV significantly by 34% (Fig. 4A), but decreased BV/TV significantly by 18% in comparison to the more rigid fixation (Fig. 4B).

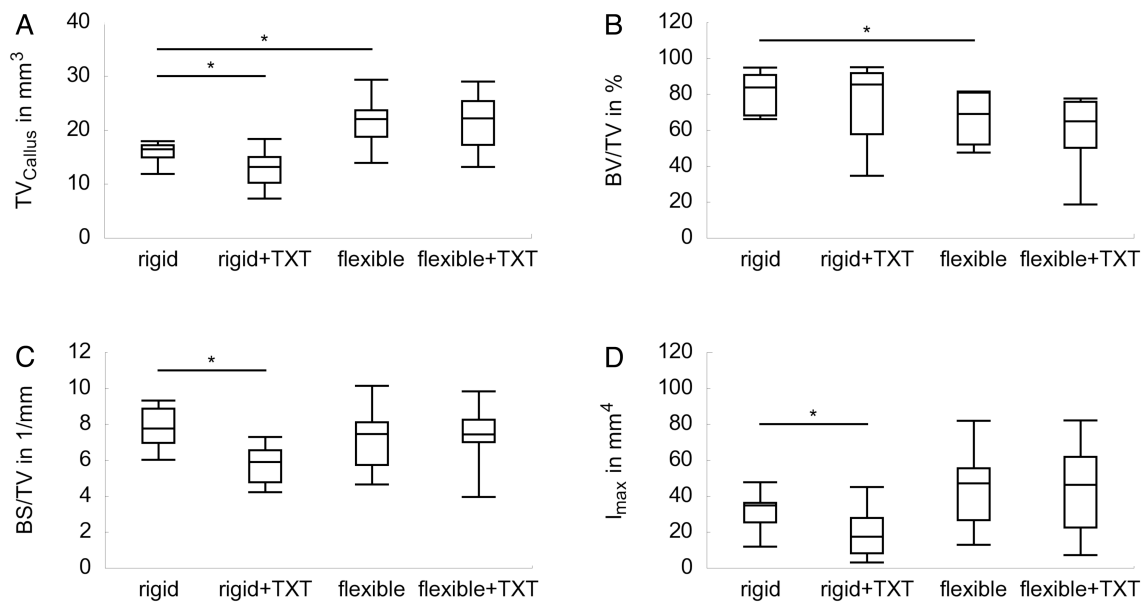


Figure 4: Microcomputed tomography analysis of the calli of rats with or without blunt chest trauma (TXT) and a more rigid or a more flexible fixation of the fracture. (A) TV_{Callus}: total volume of the callus, (B) BV/TV: bone volume/total volume, (C) BS/TV: bone surface/total volume, (D) I_{max}: maximum moment of inertia. *p < 0.05.

Discussion

Confirming the clinical evidence¹³ this study reports for the first time that a blunt chest trauma considerably delayed bone healing in an experimental trauma model. We also investigated the hypothesis, whether a blunt thoracic trauma would further increase the delay of bone healing induced by mechanical instability. As expected, the more flexible fixation impaired healing in comparison to the more rigid fixation, whereas the thoracic trauma had no additional adverse effect under more flexible experimental conditions.

Under the more rigid fixation, the blunt thoracic trauma impaired fracture healing considerably in comparison to rats with an isolated fracture. This was confirmed by a significantly reduced bending stiffness as well as a smaller callus volume, a decreased moment of inertia and a reduced relative bone surface, indicating inferior callus quality. To exclude the observed impairment of fracture healing in the severely injured rats as being a result of lower activity and reduced limb loading²⁵ we monitored animal movement and ground reaction forces during the postoperative period. We could demonstrate that all rats recovered quickly from the thoracic trauma and loaded the operated limb properly with no significant differences to the groups with isolated fractures. Therefore, it can be implied that the observed impairment of fracture healing did not result from different mechanical stimulation of the callus but from the systemic inflammation induced by the blunt chest

trauma.

In this study we used a well-established blunt chest trauma model in rats, inducing a reproducible, bilateral contusion of the lung via a single blast wave on the thorax^{5,6,10}. Confirming former experimental studies^{6,9} the blunt thoracic trauma induced a considerable, rapid, and transient increase of the serum levels of the pro-inflammatory cytokine IL-6 during the first 24 h, whereas the isolated fracture did not significantly influence the serum level of this cytokine. In humans an increased IL-6 level is regarded as an early important marker for the systemic inflammatory response after chest trauma^{2,4}. Furthermore, IL-6 showed the best correlation with injury severity and mortality compared to other cytokines^{11,26}. The levels of other cytokines, which were shown to be increased in humans after severe trauma (e.g., TNF- α and IL-10)¹¹, were not elevated at the investigated time points in our study. However, Flierl et al.⁵ reported a very early increase of IL-10 and TNF- α in the same rat model. The results might differ due to different investigation time points or evaluation procedures. Corresponding to the human situation, Flierl et al.⁵ also demonstrated a rapid and transient activation of the complement system, a crucial part of the innate immunity, in the rat thoracic trauma model. From these data and our own results we propose that the trauma model used induced, similar to the human situation, a complex systemic inflammatory response involving a systemic cytokine increase and complement activation.

The systemic inflammatory response could influence bone healing by multiple potential mechanisms. The rapid but transient increase of inflammatory cytokines, for example, IL-6, IL-10, and TNF- α , are likely to disturb the fine inflammatory balance in the early phase of fracture healing. The initial inflammatory phase of bone healing is mainly characterized by the invasion of macrophages, polymorphonuclear leukocytes, and lymphocytes into the fracture site. These early inflammatory processes are regulated by pro-inflammatory cytokines released by the immune cells, for example, IL-6, IL-1, and TNF- α ^{27,28}. These cytokines have multiple concentration dependent effects and could for example increase extracellular matrix synthesis, stimulate angiogenesis and recruit mesenchymal precursor cells to the injury site, as well as regulate osteoclasts by stimulating their resorption activity and osteoclastogenesis from hematopoietic precursors^{27,29,30}. The posttraumatic systemic increase of cytokines, such as IL-6, IL-10, and TNF- α could possibly influence these finely tuned processes by altering the local recruitment and activation of immune cells, for example, macrophages, enhancing or prolonging the inflammatory reaction at the fracture site and finally resulting in delayed healing. It has already been shown that a local activation of macrophages could induce an immature callus with reduced biomechanical characteristics³¹.

Increased systemic concentrations of pro-inflammatory cytokines could also enhance the number and activity of osteoclasts^{30,32}, which already play an important role in the resorption process during the early phases of fracture healing³³. The blunt thoracic trauma also leads to an activation of the complement cascade⁵. Its function is the opsonization of antigens, the support of phagozytosis and the induction and modulation of the inflammatory reaction of immune cells^{34,35}. There is also evidence that complement might play a role in fracture healing. Recently, we could demonstrate that a key receptor, C5aR, is expressed by inflammatory cells, osteoblasts and chondrocytes in the fracture callus, indicating that these cells are target cells for activated complement during the healing process³⁶.

Even though systemic inflammation was transiently present during the very early phase of fracture healing it was able to disturb the complex fracture repair sequence resulting in impaired healing after 35 days. Which molecular and cellular mechanisms were responsible for the observed impairment of bone regeneration remain to be clarified and need to be further investigated by the evaluation of earlier healing time points.

As expected, the more flexible fixation delayed healing in the present study, which was reflected by a larger but qualitatively inferior callus. This is well known and confirms previous work³⁷. However, under the mechanically induced compromised healing conditions the blunt chest trauma had no additional adverse effect. It has been shown that unstable mechanical conditions already influenced the early inflammatory phase of fracture healing by modulating the immigration and activity of macrophages¹⁹. Possibly, the systemic inflammation did not provoke an additional effect in this already stimulated inflammatory environment. However, a limitation of our study could be that an influence of the systemic inflammation was possibly not detectable in the experimental setup used. The flexible fixator used in the present study decreased healing considerably. After 35 days the flexural rigidity of the more flexibly fixated callus was still rather low, revealing only 25% of the intact bone. It has been previously shown that small differences between treatments can barely be detected at a healing stage with low flexural rigidity³⁸. Possible solutions would be to slightly increase the stiffness of the more flexible fixator or to investigate later healing periods.

In conclusion, our results demonstrate that a blunt thoracic trauma significantly impaired fracture healing. Ongoing studies of our group are focusing on the underlying molecular and cellular mechanisms, and include earlier investigation periods. These findings are of interest for the development of therapeutic strategies for the treatment of poly-traumatic patients.

Acknowledgements

This study was funded by the German Research Foundation (KFO 200). The authors appreciate the technical assistance of Ursula Maile and Marion Tomo. Each author in this manuscript has not and will not receive benefits in any form from a commercial party related directly or indirectly to the content of this manuscript. None of the authors have any conflicts of interest.

References

1. Giannoudis PV, Harwood PJ, Loughenbury P, et al. 2008. Correlation between IL-6 levels and the systemic inflammatory response score: can an IL-6 cutoff predict a SIRS state? *J Trauma* 65:646-652.
2. Strecker W, Gebhard F, Rager J, et al. 2002. Interleukin-6 (IL-6) - An early marker of chest trauma. *Eur J Trauma* 28:75-84.
3. Bardenheuer M, Obertacke U, Waydhas C, Nast-Kolb D. 2000. [Epidemiology of the severely injured patient. A prospective assessment of preclinical and clinical management. AG Polytrauma of DGU]. *Unfallchirurg* 103:355-363.
4. Gebhard F, Kelbel MW, Strecker W, et al. 1997. Chest trauma and its impact on the release of vasoactive mediators. *Shock* 7:313-317.
5. Flierl MA, Perl M, Rittirsch D, et al. 2008. The role of C5a in the innate immune response after experimental blunt chest trauma. *Shock* 29:25-31.
6. Knöferl MW, Liener UC, Seitz DH, et al. 2003. Cardiopulmonary, histological, and inflammatory alterations after lung contusion in a novel mouse model of blunt chest trauma. *Shock* 19:519-525.
7. Hensler T, Sauerland S, Bouillon B, et al. 2002. Association between injury pattern of patients with multiple injuries and circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-6 and interleukin-10, and polymorphonuclear neutrophil elastase. *J Trauma* 52:962-970.
8. Knöferl MW, Liener UC, Perl M, et al. 2004. Blunt chest trauma induces delayed splenic immunosuppression. *Shock* 22:51-56.
9. Perl M, Gebhard F, Braumüller S, et al. 2006. The pulmonary and hepatic immune microenvironment and its contribution to the early systemic inflammation following blunt chest trauma. *Crit Care Med* 34:1152-1159.
10. Seitz DH, Niesler U, Palmer A, et al. 2010. Blunt chest trauma induces mediator-

- dependent monocyte migration to the lung. *Crit Care Med* 38:1852–1859.
11. Stensballe J, Christiansen M, Tonnesen E, et al. 2009. The early IL-6 and IL-10 response in trauma is correlated with injury severity and mortality. *Acta Anaesthesiol Scand* 53:515-521.
 12. Shorr RM, Crittenden M, Indeck M, et al. 1987. Blunt thoracic trauma. Analysis of 515 patients. *Ann Surg* 206:200-205.
 13. Bhandari M, Tornetta P, 3rd, Sprague S, et al. 2003. Predictors of reoperation following operative management of fractures of the tibial shaft. *J Orthop Trauma* 17:353-361.
 14. Reikeras O, Shegarfi H, Wang JE, Utvag SE. 2005. Lipopolysaccharide impairs fracture healing: an experimental study in rats. *Acta Orthop* 76:749-753.
 15. Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, et al. 1998. Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clin Orthop Relat Res* 355 Suppl: S132–S147.
 16. Claes LE, Heigele CA. 1999. Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing. *J Biomech* 32:255-266.
 17. Epari DR, Schell H, Bail HJ, Duda GN. 2006. Instability prolongs the chondral phase during bone healing in sheep. *Bone* 38:864-870.
 18. Lienau J, Schell H, Duda GN, et al. 2005. Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability. *J Orthop Res* 23:639-645.
 19. Hankemeier S, Grassel S, Plenz G, et al. 2001. Alteration of fracture stability influences chondrogenesis, osteogenesis and immigration of macrophages. *J Orthop Res* 19:531-538.
 20. Claes L, Blakytyn R, Göckelmann M, et al. 2009. Early dynamization by reduced fixation stiffness does not improve fracture healing in a rat femoral osteotomy model. *J Orthop Res* 27:22-27.
 21. Willie B, Adkins K, Zheng X, et al. 2009. Mechanical characterization of external fixator stiffness for a rat femoral fracture model. *J Orthop Res* 27:687-693.
 22. Wehner T, Wolfram U, Henzler T, et al. 2010. Internal forces and moments in the femur of the rat during gait. *J Biomech* 43:2473-2479.
 23. Morgan EF, Mason ZD, Chien KB, et al. 2009. Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone* 44:335-344.
 24. Russell DM. 1997. Error measures for comparing transient data: part I: development of a comprehensive error measure. *Proceedings of the 68th Shock and Vibration Symposium*: p 175–184.
 25. Connolly CK, Li G, Bunn JR, et al. 2003. A reliable externally fixated murine femoral

- fracture model that accounts for variation in movement between animals. *J Orthop Res* 21:843-849.
26. Gebhard F, Pfetsch H, Steinbach G, et al. 2000. Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans? *Arch Surg* 135:291-295.
 27. Einhorn TA. 2005. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma* 19:S4-6.
 28. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, et al. 2001. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 16:1004-1014.
 29. Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, et al. 1995. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* 10:1272-1281.
 30. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423:337-342.
 31. Grundnes O, Reikeraas O. 2000. Effects of macrophage activation on bone healing. *J Orthop Sci* 5:243-247.
 32. De Benedetti F, Rucci N, Del Fattore A, et al. 2006. Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: a model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis Rheum* 54:3551-3563.
 33. Schell H, Lienau J, Epari DR, et al. 2006. Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing. *Bone* 38:547-554.
 34. Ganter MT, Brohi K, Cohen MJ, et al. 2007. Role of the alternative pathway in the early complement activation following major trauma. *Shock* 28:29-34.
 35. Flierl MA, Schreiber H, Huber-Lang MS. 2006. The role of complement, C5a and its receptors in sepsis and multiorgan dysfunction syndrome. *J Invest Surg* 19:255-265.
 36. Ignatius A, Ehrnthaller C, Brenner RE, et al. 2010. The anaphylatoxin receptor C5aR is present during fracture healing in rats and mediates osteoblast migration in vitro. *J Trauma* (in press).
 37. Claes L, Augat P, Suger G, Wilke HJ. 1997. Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. *J Orthop Res* 15:577-584.
 38. Richardson JB, Cunningham JL, Goodship AE, et al. 1994. Measuring stiffness can define healing of tibial fractures. *J Bone Joint Surg Br* 76:389-394.

3.2 C5aR-antagonist significantly reduces the deleterious effect of a blunt chest trauma on fracture healing

Stefan Recknagel, Ronny Bindl, Julian Kurz, Tim Wehner, Philipp Schoengraf, Christian Ehrnthaller, Hongchang Qu, Florian Gebhard, Markus Huber-Lang, John D. Lambris, Lutz Claes, Anita Ignatius

JOURNAL OF ORTHOPAEDIC RESEARCH 2012; 30(4): 581-586.

Abstract

Confirming clinical evidence, we recently demonstrated that a blunt chest trauma considerably impaired fracture healing in rats, possibly via the interaction of posttraumatic systemic inflammation with local healing processes, the underlying mechanisms being unknown. An important trigger of systemic inflammation is the complement system, with the potent anaphylatoxin C5a. Therefore, we investigated whether the impairment of fracture healing by a severe trauma resulted from systemically activated complement.

Rats received a blunt chest trauma and a femur osteotomy stabilized with an external fixator. To inhibit the C5a-dependent posttraumatic systemic inflammation, half of the rats received a C5aR-antagonist intravenously immediately and 12 h after the thoracic trauma.

Compared to the controls (control peptide), the treatment with the C5aR-antagonist led to a significantly increased flexural rigidity (three-point-bending test), an improved bony bridging of the fracture gap, and a slightly larger and qualitatively improved callus (μ CT, histomorphometry) after 35 days.

In conclusion, immunomodulation by a C5aR-antagonist could abolish the deleterious effects of a thoracic trauma on fracture healing, possibly by influencing the function of inflammatory and bone cells locally at the fracture site. C5a could possibly represent a target to prevent delayed bone healing in patients with severe trauma.

Keywords:

Fracture healing, blunt chest trauma, complement

Introduction

A severe trauma such as a blunt chest trauma is considered a potent initiator of a systemic inflammatory response, being characterized by a strong systemic activation of the complement and coagulation cascades, and the release of pro-inflammatory cytokines and prostanoids¹⁻³. It was reported that fracture healing was delayed and more non-unions occurred in severely injured patients^{4,5}. In confirming the clinical evidence, we recently demonstrated experimentally in rats that a blunt chest trauma, which induced a posttraumatic systemic inflammation, considerably impaired fracture healing. This suggests that the systemic inflammatory response disturbs the local inflammatory and regeneration processes in bone, the underlying mechanisms, however, remaining unknown⁶.

A powerful trigger of the posttraumatic systemic inflammation is the complement system^{1,7,8}. The complement cascade, consisting of over 30 proteins, is an important component of the innate immunity and can be activated by four pathways, the classical, the lectin, the alternative, and the extrinsic pathways. In all cases the activation pathways lead to the production of the important anaphylatoxin C5a^{9,10}. In trauma victims, systemic C5a immediately increased within minutes and was strongly correlated with injury severity^{11,12}. C5a induces for example the migration of phagocytes, degranulation of mast cells, systemic cytokine release, respiratory burst induction, and the regulation of apoptosis in inflammatory cells, thus acting at the very first line of defense in the posttraumatic systemic inflammatory response¹. The excessive activation of complement¹, however, can also cause harmful effects, for example, immunoparalysis and organ dysfunction^{12,13}. Due to its strong pro-inflammatory character, C5a is regarded as being the most hazardous molecule in the over-activated complement cascade^{1,13,14}. Therefore, the question arises as to whether the posttraumatic systemic activation of C5a contributes to delayed fracture healing observed clinically^{4,5} and experimentally⁶ after severe injury.

This assumption is also strengthened by a recent study by our group demonstrating for the first time that the cellular receptor for C5a, C5aR, was locally expressed in a distinct spatial and temporal pattern in the fracture callus of rats not only by inflammatory cells but also by osteoblasts, chondroblasts, and osteoclasts in zones of intramembranous and enchondral bone formation¹⁵. Furthermore, *in vitro* studies revealed that in osteoblasts C5aR activation could induce cell migration¹⁵ and cytokine release¹⁶, and also modulate osteoclast formation¹⁷. This suggests that the anaphylatoxin C5a could potentially influence the fine local inflammatory balance of the bone healing process by acting on inflammatory cells as well as on osteoblasts and osteoclasts.

Therefore, in this study we addressed the question, whether the impairment of fracture healing by a severe trauma resulted from systemically activated complement. Based on our previous work ⁶ we hypothesized that the systemic administration of a C5aR-antagonist would at least partly abolish the deleterious effect of a blunt chest trauma on bone healing in a rat model. The C5aR-antagonist was applied after the thoracic trauma to prevent the immediate C5a-dependent systemic inflammation. The fracture healing outcome was investigated after 35 days.

Methods

Animal experiment

The animal experiment was performed according to international regulations for the care and use of laboratory animals, and approved by the local ethical committee (Regierungspräsidium Tübingen, Germany). Sixteen male Wistar rats (weight 400-450 g; age 10-12 weeks) received a blunt chest trauma combined with a femur osteotomy that was stabilized with an external fixator. Then the animals received either a C5aR-antagonist (n = 8) or a control peptide (control group, n = 8).

Surgery and blunt chest trauma

Surgery was performed as described previously ^{6,18}. Briefly, a standardized osteotomy gap of 1 mm was created at the mid-shaft of the right femur and fixated with a custom-made external fixator. The offset of the fixator block was 6 mm, resulting in an axial stiffness of 119 N/mm ⁶. Immediately after surgery the rats received an additional blunt chest trauma under general anesthesia using a blast wave generator as previously described in detail ^{1,19}. This model allows a bilateral, isolated lung contusion by the application of a standardized single blast wave centered on the middle of the thorax and induces a reproducible transient systemic inflammation ^{1,6}. An analgesic (20 mg/kg, Tramal[®], Gruenthal GmbH, Aachen, Germany) was administered subcutaneously during the operation and was diluted in the drinking water (25 mg/L) for the first 3 days following surgery. Each animal was individually housed, given unrestricted access to food and monitored daily for infection and mobility.

C5aR-antagonist

Immediately after the blunt chest trauma, one group received a C5aR-antagonist (Ac-F[OPdChaWR]; PMX-53) at a dosage of 1 mg/kg intravenously into the penis vein ^{20,21}. The injection was repeated 12 h after the trauma to prevent the C5a-dependent systemic inflammation, which was detectable during the first 12-24 h after the blunt chest trauma in

rats^{1,6}. Control animals received a peptide (Ac-F[OPdChaAdR]) with two changed amino acids, which does not have antagonistic activity and thus does not develop any biological effect at the same concentration and at the same time points²².

Biomechanical testing

After 35 days the rats were sacrificed and the operated as well as the contralateral intact femora were explanted. Biomechanical testing was performed using a non-destructive, three-point bending test, as described previously⁶. Briefly, after removing the fixators, the distal end of each bone was potted in a cylinder using polymethylmethacrylate (Technovit[®] 3040, Heraeus Kulzer GmbH, Wertheim, Germany) and fixed in a hinge joint whereas the proximal end of the femur rested on the bending support. A quasistatic load was applied in a three-point bending mode with a materials testing machine (1454, Zwick GmbH, Ulm, Germany) using a 500 N load cell (A.S.T. Angewandte System-Technik GmbH, Dresden, Germany) and the flexural rigidity (EI) was calculated from the slope of the force deflection curve. The absolute values of the operated femora were related to the contralateral values of the un-operated femora to eliminate individual differences.

Micro-computed tomography

The femora were scanned using a μ CT scanning device (Skyscan 1172), operating at a peak voltage of 50 kV and 200 μ A at a resolution of 15 μ m. The mineralized callus within the former osteotomy gap was segmented and the total tissue volume and the bone volume fraction (BV/TV) were calculated by global thresholding to distinguish between mineralized and non-mineralized tissue²³. The maximum moment of inertia was calculated based on the tissue area on the transversal slices in the fracture gap. The apparent modulus of elasticity was calculated as the flexural rigidity divided by the maximum moment of inertia²⁴. According to the standard clinical evaluation of X-rays the number of bridged cortices per callus were evaluated in two planes at right angles to one another by using an CT analyzing software (Data viewer, Skyscan, Kontich, Belgium)²⁵. The distal pin hole served as orientation for the exact positioning of the specimens. At least three bridged cortices per callus were considered as a “healed fracture”. Two observers evaluated the cortical bridging independently in a blinded fashion.

Histomorphometry

After fixating the femora in buffered 4% formaldehyde they were dehydrated with ethanol (40-100%) and embedded in methyl methacrylate (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Seventy micrometers longitudinal sections were prepared, which were cut in anterior-

posterior direction of the right femur. The pin holes guaranteed the standardized orientation of the sections. Then the sections were stained with Paragon (Toluidin blue and Fuchsin; both Waldeck GmbH & Co KG, Münster, Germany), which stains fibrous tissue in blue, cartilage tissue in purple and mineralized matrix in white-yellow. In the former osteotomy gap the newly formed tissue was evaluated by using a light microscope (Leica DMI6000B) at a fivefold magnification. The amount of bone, cartilage and fibrous tissue was assessed by circumscribing the corresponding areas with image analysis software (Leica MMAF 1.4.0 Imaging System, Leica, Heerbrugg, Switzerland powered by MetaMorph®).

Statistical analysis

Results are presented as medians and interquartile ranges (IR). For statistical analysis, the software PASW Statistics 18.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) was used. Differences between groups regarding flexural rigidity, μ CT-parameters, and histomorphometrical data were calculated using a Mann-Whitney U-test, whereas differences between groups regarding the number of bridged cortices were calculated using the Fisher exact test. The level of significance was $p < 0.05$.

Results

Biomechanical testing

The treatment of the animals with the C5aR-antagonist after blunt chest trauma significantly increased the flexural rigidity (Ctrl: EI = 46.54% (IR: 27.44); C5aR-Ag: EI = 72.18% (IR: 66.50)) of the callus by about 55% compared to the control group, which received the control peptide (Fig. 1).

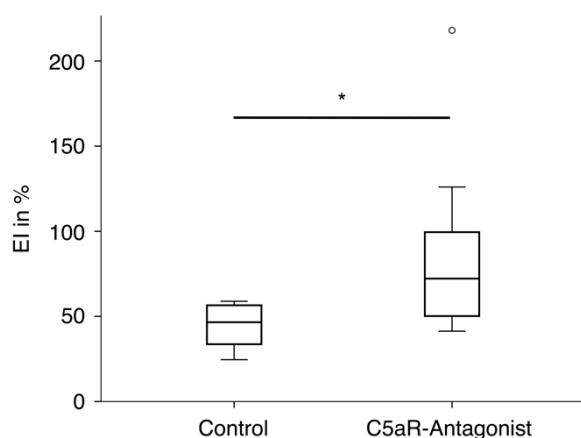


Figure 1: Flexural rigidity (EI) of the fracture callus of rats without (Control) or with treatment with a C5aR-antagonist immediately and 12 h after the blunt chest trauma. * $p < 0.05$

Micro-computed tomography

The application of the C5aR-antagonist led to a tendency for higher total callus volume, maximum moment of inertia, and apparent modulus of elasticity. None of the parameters showed statistical significance compared to the control group (Table 1). The results might indicate a somewhat larger and qualitatively superior callus in the rats treated with the C5aR-antagonist. Furthermore, the fracture callus of rats which received the C5aR-antagonist showed considerably more bridged cortices compared to the control group, even though this was not statistically significant (Table 2).

Table 1: μ -computed tomography analysis of the calli of rats without (Control) or with treatment with a C5aR-antagonist after blunt chest trauma

Measure	Control	C5aR-Antagonist
Total callus volume (mm ³)	15.72 (IR: 6.35)	16.47 (IR: 7.75)
BV/TV (%)	85.55 (IR: 11.15)	82.26 (IR: 21.89)
Maximum moment of inertia (mm ⁴)	33.32 (IR: 26.60)	41.12 (IR: 36.93)
Apparent modulus of elasticity (MPa)	2469.98 (IR: 5357.93)	6214.25 (IR: 6470.93)

Table 2: Number of bridged cortices of the calli evaluated by μ -computed tomography in two planes of rats without (Control) or with treatment with a C5aR-antagonist

Number of bridged cortices						Clinical fracture healing outcome		
Group	0	1	2	3	4	Group	not healed	healed
Control	1	2	0	0	5	Control	3	5
C5aR-antagonist	0	0	0	1	7	C5aR-antagonist	0	8

Histomorphometry

The histomorphometrical results confirmed the results of the μ CT analysis showing a slightly increased callus with more bone in the C5aR-antagonist treated group (Fig. 2).

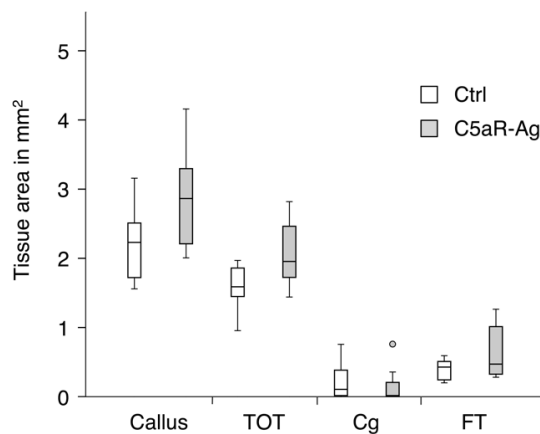


Figure 2: Absolute amounts of osseous tissue (TOT), cartilage tissue (Cg) and fibrous tissue (FT) within the callus of rats without (Ctrl) or with treatment with a C5aR-antagonist.

Discussion

This study demonstrated that systemically activated complement significantly contributes to the impairment of bone healing observed after severe trauma. Our results revealed that the application of a C5aR-antagonist during the initial phase of the posttraumatic inflammatory response abolished the deleterious effect of a blunt chest trauma on fracture healing in a rat model. This was reflected by a considerably improved flexural rigidity of the fracture callus, a higher bony bridging between the fracture fragments and a slightly larger and qualitatively improved callus formation in the rats treated with the C5aR-antagonist.

In a previous study we showed that a blunt chest trauma significantly impaired fracture healing in the same rat model ⁶. The flexural rigidity of the healed femora was reduced by approximately 60% and a smaller callus with an inferior quality was formed compared to the control group, which did not receive a thoracic trauma ⁶. We proposed that the complex systemic inflammatory response induced by the thoracic trauma disturbed fracture healing locally, the underlying mechanisms remaining unknown ⁶. The rat blunt chest trauma model used in the present study is well-established and induces a reproducible and transient systemic inflammatory response ^{1,26}. Reflecting clinical data in polytraumatic patients ^{12,13}, Flierl et al. recently showed that the complement system, especially C5a, triggered the complex systemic inflammatory response in this experimental model by enhancing the systemic cytokine release as well as disturbing the neutrophil function. Neutrophils displayed an enhanced chemotactic activity, phagocytosis, and production of reactive oxygen species followed by prolonged functional defects ¹. Furthermore, the systemic administration of an anti-C5a antibody immediately after the blunt chest trauma decreased the systemic cytokine release as well as

the number of circulating neutrophils, and enhanced neutrophil function. This suggests that antagonizing excessive C5a might improve the outcome of a blunt chest trauma ¹. To investigate whether the systemic C5a increase is also responsible for the deleterious effects of the blunt chest trauma on bone healing we applied a specific C5aR-antagonist ^{20,21}. Blocking of C5aR completely abolished the negative impact of the thoracic trauma on fracture healing, suggesting that C5a was one of the main players in this scenario. The flexural rigidity of the callus increased significantly in the C5aR-antagonist treated group and nearly reached the levels of the intact contralateral femur. The biomechanical results correlated with an improved bony bridging of the fracture gap. Furthermore, the callus of the C5aR-antagonist treated group and the apparent modulus of elasticity, describing the mechanical quality of the newly formed callus ²⁴, were slightly increased. Histomorphometry also indicated a slightly increased amount of newly formed bone in the C5aR-antagonist treated group. The radiological and histological results revealed that the predominant tissue in the fracture callus in both groups was newly formed bone, indicating that the healing process had widely progressed after a period of 35 days. Nevertheless, the differences between the C5aR-antagonist treated and the control group in the biomechanical outcome were still considerable. In ongoing studies earlier investigation time points are included to evaluate differences in callus composition during the course of healing.

At present little is known about the role of C5a in fracture healing. It is well known that complement is locally activated after tissue injury, and is important for an adequate and effective inflammation, for example, by increasing vascular permeability, recruitment of leukocytes, lymphocyte activation, opsonization of pathogens, and clearance of necrotic and apoptotic tissues at the site of injury ^{27,28}. Local activation of complement might, therefore, play an essential role in bone regeneration, especially in the fracture hematoma and the early stages of bone healing where inflammatory cells are predominant ^{29,30}. This was confirmed by a recent study of our group demonstrating that C5aR was abundantly expressed by these cells, but intriguingly also by osteoblasts, chondroblasts, and osteoclasts in zones of intramembranous and enchondral ossification ¹⁵. This suggests that C5a may be essential for regular regeneration processes during all stages of fracture healing.

After a blunt chest trauma systemic C5a is increased very rapidly and transiently ¹. Accordingly, we applied the C5aR-antagonist during the first hours after the blunt chest trauma and were able to significantly improve the fracture healing outcome after 35 days, indicating that C5a triggers determining effects in the very early healing phase. Systemically generated C5a causes a cascade of events, which could interact in several ways with the local

fine-tuned inflammatory balance of bone healing. Because C5a activates the endothelium and enhances cell migration^{1,31,32}, it may increase the number of inflammatory cells, such as macrophages and polymorphnuclear neutrophils in the fracture hematoma. C5a influences the function of leukocytes by inducing cytokine release as well as the production of proteases and reactive oxygen species^{33,34}. This was confirmed by Flierl et al.¹ in their rat model of blunt chest trauma. An increased number and changed activity of neutrophils could, therefore, enhance and/or prolong the inflammatory phase of fracture healing. This was confirmed by studies reporting improved fracture healing after the depletion of neutrophils³⁵ or disturbed healing by the application of zymosan, which stimulates the generation of reactive oxygen species by leukocytes³⁶. C5a can prime macrophages to a more pro-inflammatory phenotype, leading to an increased secretion of cytokines in response to a second inflammatory stimulus³⁴. An increased release of inflammatory cytokines from macrophages has been shown to provoke delayed fracture healing³⁷. Furthermore, C5a could act as a potent inhibitor of angiogenesis by pushing macrophages towards an angiogenesis-inhibitory phenotype²², therefore possibly generating negative effects on bone regeneration. C5a might not only influence inflammatory cells but also osteoblast progenitors and osteoblasts as well as osteoclasts. It is a chemotactic factor for mesenchymal stem cells and osteoblasts, suggesting that it may modulate the recruitment of these cells to the site of injury^{15,38}. It was reported that osteoblast-like osteosarcoma cells (MG-63) expressed functional C5aR and responded to C5a by releasing IL-6¹⁶. C5a appears also to increase osteoclast formation directly by binding to C5aR on osteoclast precursors and indirectly by increasing the expression of receptor activator of nuclear factor-kB (RANKL) and IL-6 in osteoblasts¹⁷, which could in turn stimulate osteoclast formation and activity³⁹. Taken together, systemic C5a could trigger a number of events in inflammatory cells as well as osteoblast and osteoclasts in the early phase of fracture healing, which might lead to a prolonged and/or increased inflammatory phase, and as a consequence to disturbed fracture healing. As outlined before, complement might be essential for regular regeneration processes during all stages of fracture healing. Therefore, it could be speculated that blocking complement during the whole healing period might have negative effects. Currently, further studies are ongoing in our group to prove this hypothesis. In conclusion, our results demonstrate that the increase of C5a during the posttraumatic systemic inflammation considerably accounts for the deleterious effects of a blunt chest trauma on fracture healing and that immunomodulation by a C5aR-antagonist in the acute posttraumatic phase could abolish this effect, possibly via influencing the function of inflammatory and bone cells contributing to the early phase of fracture healing. Therefore,

C5a could possibly represent a target to prevent delayed bone healing in patients with severe trauma^{4,5}.

Acknowledgements

This study was funded by the German Research Foundation (KFO 200) and by National Institutes of Health grants AI068730 (to J.D.L.). The authors appreciate the technical assistance of Uwe Wolfram, Ursula Maile, and Marion Tomo. Each author in this manuscript has not and will not receive benefits in any form from a commercial party related directly or indirectly to the content of this manuscript. None of the authors have any conflicts of interest.

References

1. Flierl MA, Perl M, Rittirsch D, et al. 2008. The role of C5a in the innate immune response after experimental blunt chest trauma. *Shock* 29:25-31.
2. Gebhard F, Pfetsch H, Steinbach G, et al. 2000. Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans? *Arch Surg* 135:291-295.
3. Strecker W, Gebhard F, Rager J, et al. 2002. Interleukin-6 (IL-6) - An early marker of chest trauma. *Eur J Trauma* 28:75-84.
4. Bhandari M, Tornetta P, 3rd, Sprague S, et al. 2003. Predictors of reoperation following operative management of fractures of the tibial shaft. *J Orthop Trauma* 17:353-361.
5. Karladani AH, Granhed H, Karrholm J, Styf J. 2001. The influence of fracture etiology and type on fracture healing: a review of 104 consecutive tibial shaft fractures. *Arch Orthop Trauma Surg* 121:325-328.
6. Recknagel S, Bindl R, Kurz J, et al. 2011. Experimental blunt chest trauma impairs fracture healing in rats. *J Orthop Res* 29:734-739.
7. Donnelly TJ, Meade P, Jagels M, et al. 1994. Cytokine, complement, and endotoxin profiles associated with the development of the adult respiratory distress syndrome after severe injury. *Crit Care Med* 22:768-776.
8. Zilow G, Joka T, Obertacke U, et al. 1992. Generation of anaphylatoxin C3a in plasma and bronchoalveolar lavage fluid in trauma patients at risk for the adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 20:468-473.
9. Ehrnthaller C, Ignatius A, Gebhard F, Huber-Lang M. 2011. New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Mol Med* 17:317-329.

10. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 11:785-797.
11. Albers S, Burk AM, Rittirsch D, et al. 2006. Impairment of the complement function after multiple trauma in humans. *Shock* 26 (Suppl. 1):14.
12. Hecke F, Schmidt U, Kola A, et al. 1997. Circulating complement proteins in multiple trauma patients--correlation with injury severity, development of sepsis, and outcome. *Crit Care Med* 25:2015-2024.
13. Ganter MT, Brohi K, Cohen MJ, et al. 2007. Role of the alternative pathway in the early complement activation following major trauma. *Shock* 28:29-34.
14. Gerard C. 2003. Complement C5a in the sepsis syndrome--too much of a good thing? *N Engl J Med* 348:167-169.
15. Ignatius A, Ehrnthaller C, Brenner RE, et al. 2011. The anaphylatoxin receptor C5aR is present during fracture healing in rats and mediates osteoblast migration in vitro. *J Trauma* (Epub ahead of print).
16. Pobanz JM, Reinhardt RA, Koka S, Sanderson SD. 2000. C5a modulation of interleukin-1 beta-induced interleukin-6 production by human osteoblast-like cells. *J Periodontal Res* 35:137-145.
17. Tu Z, Bu H, Dennis JE, Lin F. 2010. Efficient osteoclast differentiation requires local complement activation. *Blood* 116:4456-4463.
18. Claes L, Blakytyn R, Göckelmann M, et al. 2009. Early dynamization by reduced fixation stiffness does not improve fracture healing in a rat femoral osteotomy model. *J Orthop Res* 27:22-27.
19. Knöferl MW, Liener UC, Seitz DH, et al. 2003. Cardiopulmonary, histological, and inflammatory alterations after lung contusion in a novel mouse model of blunt chest trauma. *Shock* 19:519-525.
20. Crane JW, Buller KM. 2007. Systemic blockade of complement C5a receptors reduces lipopolysaccharide-induced responses in the paraventricular nucleus and the central amygdala. *Neurosci Lett* 424:10-15.
21. Huber-Lang MS, Riedeman NC, Sarma JV, et al. 2002. Protection of innate immunity by C5aR antagonist in septic mice. *FASEB J* 16:1567-1574.
22. Langer HF, Chung KJ, Orlova VV, et al. 2010. Complement-mediated inhibition of neovascularization reveals a point of convergence between innate immunity and angiogenesis. *Blood* 116:4395-4403.

23. Morgan EF, Mason ZD, Chien KB, et al. 2009. Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone* 44:335-344.
24. Claes L, Blakytyn R, Besse J, et al. 2011. Late dynamization by reduced fixation stiffness enhances fracture healing in a rat femoral osteotomy model. *J Orthop Trauma* 25:169-174.
25. Claes LE, Cunningham JL. 2009. Monitoring the mechanical properties of healing bone. *Clin Orthop Relat Res* 467:1964-1971.
26. Seitz DH, Perl M, Liener UC, et al. 2011. Inflammatory alterations in a novel combination model of blunt chest trauma and hemorrhagic shock. *J Trauma* 70:189–196.
27. Ward PA. 2004. The dark side of C5a in sepsis. *Nat Rev Immunol* 4:133-142.
28. Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, et al. 2010. The complement cascade as a mediator of tissue growth and regeneration. *Inflamm Res* 59:897-905.
29. Einhorn TA. 2005. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma* 19:S4-6.
30. Chung R, Cool JC, Scherer MA, et al. 2006. Roles of neutrophil-mediated inflammatory response in the bony repair of injured growth plate cartilage in young rats. *J Leukoc Biol* 80:1272-1280.
31. Marder SR, Chenoweth DE, Goldstein IM, Perez HD. 1985. Chemotactic responses of human peripheral blood monocytes to the complement-derived peptides C5a and C5a des Arg. *J Immunol* 134:3325-3331.
32. Foreman KE, Vaporciyan AA, Bonish BK, et al. 1994. C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J Clin Invest* 94:1147-1155.
33. Sacks T, Moldow CF, Craddock PR, et al. 1978. Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. An in vitro model of immune vascular damage. *J Clin Invest* 61:1161-1167.
34. Riedemann NC, Guo RF, Bernacki KD, et al. 2003. Regulation by C5a of neutrophil activation during sepsis. *Immunity* 19:193-202.
35. Groggaard B, Gerdin B, Reikeras O. 1990. The polymorphonuclear leukocyte: has it a role in fracture healing? *Arch Orthop Trauma Surg* 109:268-271.
36. Gokturk E, Turgut A, Baycu C, et al. 1995. Oxygen-free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 66:473-475.
37. Grundnes O, Reikeraas O. 2000. Effects of macrophage activation on bone healing. *J Orthop Sci* 5:243-247.

38. Schraufstatter IU, Discipio RG, Zhao M, Khaldoyanidi SK. 2009. C3a and C5a are chemotactic factors for human mesenchymal stem cells, which cause prolonged ERK1/2 phosphorylation. *J Immunol* 182:3827-3836.
39. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423:337-342.

4 DISKUSSION

Das stumpfe Thoraxtrauma verursacht eine systemische Inflammation und beeinträchtigt die Frakturheilung.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass ein schweres Trauma und die resultierende posttraumatische systemische Inflammation die Frakturheilung signifikant beeinträchtigen.

Als Traumamodell zur Induktion einer systemischen Inflammation wurde in dieser Arbeit das stumpfe Thoraxtrauma gewählt. Klinisch konnte gezeigt werden, dass das Thoraxtrauma eines der häufigsten und schwerwiegendsten Begleitverletzungen bei polytraumatisierten Patienten darstellt, da es ein starker Initiator der posttraumatischen systemischen Inflammation ist (BARDENHEUER et al., 2000; STRECKER et al., 2002; GIANNOUDIS et al., 2008). So führt ein Thoraxtrauma zu einer schnelleren und stärkeren Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren verglichen zu anderen Verletzungsmustern wie z. B. dem Schädel-Hirn-Trauma (HENSLER et al., 2002) und wird daher auch als „Achillesferse des Mehrfachverletzten“ bezeichnet (SCHWEIBERER, 1998).

Analog zur klinischen Situation konnte im gut etablierten stumpfen Thoraxtraumamodell der Ratte in vorhergehenden Studien eine frühe Komplementaktivierung, eine systemische Freisetzung von inflammatorischen Chemokinen und Zytokinen (LIENER et al., 2003; FLIERL et al., 2008) sowie die bei Schwerverletzten typischerweise auftretende Neutrophilie gezeigt werden (FLIERL et al., 2008). Diese komplexe systemische Inflammation führte zu Dysfunktionen nachgeschalteter Organe, die ursprünglich nicht vom Trauma betroffen waren (KNÖFERL et al., 2004; PERL et al., 2006). Somit spiegelt das stumpfe Thoraxtrauma in der Ratte die klinische Situation wider (VISSER et al., 2011) und ist als Modell zur Untersuchung der Interaktion der systemischen Inflammation mit verschiedenen Organsystemen geeignet.

Zur Bestätigung der vorangegangenen Studien wurde in der vorliegenden Arbeit nach dem Thoraxtrauma die systemische Inflammation anhand des IL-6-Serumspiegels überprüft. Das Thoraxtrauma führte zu einem signifikanten Anstieg von IL-6 innerhalb der ersten 24 h, verglichen zu Tieren mit isolierter Femurfraktur. Verglichen mit präoperativen Werten wurde durch das Thoraxtrauma ein signifikanter Anstieg von IL-6 über einen Zeitraum von 72 h beobachtet, während Tiere mit isolierter Femurfraktur zu keinem Beobachtungszeitpunkt signifikant erhöhte IL-6-Serumwerte aufwiesen.

IL-6 zeigt klinisch die beste Korrelation mit der Verletzungsschwere des Thoraxtraumas und hat sich als wichtigster Traumamarker in der Klinik etabliert (GEBHARD et al., 2000;

STRECKER et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß des systemischen IL-6 Anstiegs in polytraumatisierten Patienten mit der Verletzungsschwere, dem Auftreten einer Ganzkörperinflammation und schließlich der Mortalitätsrate korreliert (GEBHARD et al., 2000; STENSBALLE et al., 2009).

Der negative Einfluss dieser komplexen systemischen Inflammation auf die Frakturheilung konnte in der vorliegenden Arbeit anhand einer signifikanten Verschlechterung der Biegesteifigkeit, dem wichtigsten funktionellen Parameter für die Bewertung der Frakturheilung, in Tieren mit rigider Frakturfixation gezeigt werden. Die Ursache dieser schlechteren Biegesteifigkeit lieferten die Mikrocomputertomographie (μ CT) Ergebnisse: Das Thoraxtrauma führte zu einem signifikant kleineren Kallus in Kombination mit einer schlechteren Knochenstruktur. Die histomorphometrischen Analysen bestätigten die μ CT Ergebnisse. Es fand sich signifikant weniger neu gebildeter Knochen im Frakturspalt.

Um sicherzustellen, dass die verschlechterte Frakturheilung der traumatisierten Ratten nicht aufgrund einer eventuellen niedrigeren Aktivität der Tiere oder einer geringeren Belastung der operierten Gliedmaße zurückzuführen ist, wurden die Tiere im Rahmen eines *in vivo* Monitorings vor der Operation, zwei Tage nach der Operation und im Folgenden wöchentlich über Nacht einer Aktivitätsmessung sowie einer Messung der Bodenreaktionskräfte der operierten Gliedmaße mittels einer Kraftmessplattform unterzogen. Dabei konnte bei beiden Zielgrößen zu keinem Zeitpunkt der Heilung ein Einfluss des Thoraxtraumas gemessen werden, sodass die Verschlechterung der Knochenheilung auf das Thoraxtrauma und nicht auf eine etwaige unterschiedliche mechanische Stimulation des Frakturkallus zurückzuführen ist.

Als Frakturmodell wurde in dieser Arbeit eine Osteotomie des rechten Femurs gewählt, die mittels eines Fixateurs externe stabilisiert wurde. Die Wahl eines Fixateurs bietet sich zum einen wegen der guten biomechanischen Standardisierbarkeit dieser Methode und zum anderen aus folgendem Grund insbesondere in dieser Studie an: Zur Vermeidung eines *second hits* werden Frakturen bei schwer verletzten Patienten nach dem *damage control orthopedics* (DCO) Prinzip initial nach Möglichkeit minimalinvasiv (z. B. mit einem Fixateur externe) behandelt, da die primäre Marknagelung von Frakturen bei polytraumatisierten Patienten mit erhöhten Letalitätsraten verbunden ist (NAST-KOLB et al., 2005). Somit wäre eine primäre Marknagelstabilisierung der Fraktur in diesem Experiment wenig sinnvoll gewesen.

Das Fixateur externe Modell wurde in vorhergehenden Studien charakterisiert und erlaubt die Untersuchung der Frakturheilung unter mechanisch kontrollierter rigider oder flexibler Fixierung (CLAES et al., 2009; WILLIE et al., 2009). Die Frakturheilung ist neben biologischen Faktoren in starkem Ausmaß auch von biomechanischen Faktoren und somit

von der Steifigkeit der Osteosynthese abhängig. So führt eine flexiblere Frakturfixation aufgrund der höheren mechanischen Belastung (Gewebedehnung) zu einer verzögerten Frakturheilung verglichen mit einer stabileren Fixation (CLAES et al., 1997), was seit langem bekannt ist und in dieser Arbeit erwartungsgemäß bestätigt wurde.

Zudem ist bekannt, dass unter einer flexibleren Frakturfixation, verglichen mit einer rigideren Fixation, die inflammatorischen Prozesse im Frakturheilungsgebiet unterschiedlich ausgeprägt sind (HANKEMEIER et al., 2001; SCHMIDT-BLEEK et al., 2011). Somit stellte sich in dieser Arbeit die Frage, ob die systemische Inflammation mit der lokalen Inflammation der adäquaten (rigide Fixation) oder der verzögerten (flexible Fixation) Frakturheilung in unterschiedlichem Maße interagiert und in der Folge zu unterschiedlichen Heilungsverzögerungen führt. Allerdings konnte unter einer flexiblen Frakturfixation, entgegen der ursprünglichen Hypothese, kein negativer Effekt des stumpfen Thoraxtraumas auf die Frakturheilung nachgewiesen werden. Es ist denkbar, dass die systemische Inflammation aufgrund der bereits durch die Flexibilisierung hervorgerufenen verstärkten lokalen inflammatorischen Prozesse (SCHMIDT-BLEEK et al., 2011) keinen zusätzlichen negativen Effekt entfalten kann. Allerdings führte die flexible Frakturstabilisierung in der Gruppe ohne Thoraxtrauma bereits zu einer starken Verzögerung der Frakturheilung, die anhand einer Biegesteifigkeit von lediglich ca. 20% des kontralateralen Femurs ersichtlich war. Es konnte gezeigt werden, dass in diesem frühen Stadium der Frakturheilung Gruppenunterschiede nur sehr schlecht detektiert werden können (RICHARDSON et al., 1994) und daher auch ein methodisches Problem vorliegen könnte. Um die Frage zu klären, ob das Thoraxtrauma bei flexibler Frakturstabilisation die Frakturheilung in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusst als unter stabilen Bedingungen, sollte daher in weiteren Untersuchungen die Heilungszeit um einige Tage verlängert werden, um somit eventuelle Gruppenunterschiede sicher detektieren zu können.

Dementsprechend kann in dieser Arbeit die Frage, ob die systemische Inflammation die Frakturheilung unter flexiblen Fixationsbedingungen in unterschiedlichem Ausmaß negativ beeinflusst verglichen mit einer rigiden Fixation, nicht endgültig beantwortet werden.

Eine mögliche Ursache für die beobachtete Störung der Frakturheilung nach schwerem Trauma, könnte die transiente posttraumatische systemische Inflammation darstellen, die sich negativ auf frühe Inflammations- und Regenerationsprozesse im Frakturheilungsgebiet auswirkt und dadurch zu einem schlechten Heilungsergebnis führt. Diese Annahme wird gestützt durch die Tatsache, dass Störungen in der frühen Phase der Frakturheilung sich nachhaltig auf regenerative Prozesse auswirken können und somit zu einer verzögerten

Frakturheilung führen. So führte eine Stimulation reaktiver Sauerstoffspezies aus neutrophilen Granulozyten mittels Zymosan während der frühen inflammatorischen Phase der Frakturheilung zu einer beträchtlichen Frakturheilungsverzögerung (GOKTURK et al., 1995). Eine Neutrophilendepletion während der ersten drei Tage nach Fraktur konnte die Frakturheilung sogar verbessern (GROGAARD et al., 1990).

Der Effekt einer verminderten Immigration von inflammatorischen Makrophagen in das Frakturheilungsgebiet konnte an Mäusen demonstriert werden, denen der essentielle Makrophagenrekrutierungsrezeptor CC Chemokinrezeptor 2 (CCR2) fehlt. Diese Mäuse zeigen annähernd keine Rekrutierung inflammatorischer Makrophagen in das Frakturheilungsgebiet. Die verminderte Makrophagenrekrutierung führte im Zuge der enchondralen Ossifikation zu einer gestörten Knorpelreifung und folglich zu weniger neu gebildetem Knochen. Zudem wiesen diese Tiere signifikant weniger Gefäße im Frakturheilungsgebiet auf, was ein Hinweis dafür ist, dass inflammatorische Makrophagen entscheidend zur Revaskularisierung nach Fraktur beitragen (XING et al., 2010).

Somit kann spekuliert werden, dass das Thoraxtrauma und die posttraumatische systemische Inflammation, die frühe Immigration und/oder Aktivität von Inflammationszellen lokal im Frakturheilungsgebiet stört und dadurch der Grund für die beobachtete Frakturheilungsverzögerung darstellen könnte. In der Tat weisen bisher unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe darauf hin, dass die frühe inflammatorische Phase der Frakturheilung durch das Thoraxtrauma stark gestört wurde: So führte das Thoraxtrauma zu einer frühen annähernd vierfachen Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, einer stärkeren Expression von Interleukin-6 in Zonen der intramembranösen Heilung, sowie einer verminderten Anzahl an Makrophagen lokal im Frakturheilungsgebiet.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass ein schweres Trauma zu einer beträchtlichen Frakturheilungsverzögerung geführt hat. Ausschlaggebend für die Verzögerung könnte die früh nach dem Trauma einsetzende komplexe posttraumatische systemische Inflammation sein, welche sich lokal negativ auf das inflammatorische Gleichgewicht der frühen Frakturheilung auswirkt.

Die Inhibition der systemischen Inflammation auf Ebene des Komplementsystems hebt die negativen Effekte des stumpfen Thoraxtraumas auf die Frakturheilung auf.

Ziel des zweiten Abschnitts dieser Arbeit war es, einen therapeutischen Ansatz zu entwickeln, um die sowohl klinisch (KARLADANI et al., 2001; BHANDARI et al., 2003) als auch in der

eigenen Arbeit tierexperimentell beobachtete Frakturheilungsverzögerung nach schwerem Trauma anhand der Modulation der systemischen Inflammation zu beeinflussen.

Die Modulation auf Ebene des Komplementsystems schien ein vielversprechender Ansatz, da das Komplementsystem früh nach dem Thoraxtrauma aktiviert wird und zahlreiche systemische wie auch lokale Effekte des angeborenen Immunsystems als „Master-Alarm-System“ auslöst (FLIERL et al., 2008). Somit könnten eventuelle Störungen früher inflammatorischer Prozesse im Frakturheilungsgebiet als nachgeschaltete Effekte der systemischen Komplementaktivierung nach schwerem Trauma verstanden werden. Daher wurde den Ratten unmittelbar und 12 h nach Osteotomie und Thoraxtrauma ein spezifischer C5aR-Antagonist injiziert, um die C5a-vermittelte systemische Inflammation nach Thoraxtrauma zu inhibieren. Die frakturierten Knochen wurden 35 Tage postoperativ biomechanisch, mikrocomputertomographisch und histomorphometrisch untersucht.

Es zeigte sich, dass die systemische Behandlung der Ratten mit dem C5aR-Antagonisten zu einer signifikant verbesserten Biegesteifigkeit führte und nahezu die Steifigkeit des kontralateralen intakten Femurs erreichte. Im μ CT fand sich ein tendenziell höheres Flächenträgheitsmoment (ein Maß für die Kallusgröße), sowie ein höherer apparenter Elastizitätsmodul (ein Maß für die Knochenqualität). Da sich die Biegesteifigkeit aus dem Produkt des Flächenträgheitsmoments und des Elastizitätsmoduls berechnet, kann die signifikant verbesserte Biegesteifigkeit in der C5aR-Antagonisten behandelten Gruppe auf einen etwas größeren Kallus in Kombination mit einer verbesserten Kallusqualität zurückgeführt werden. Dieser Befund konnte in den histomorphometrischen Auswertungen bestätigt werden: Die Behandlung der Tiere mit dem C5aR-Antagonisten führte zu mehr neu gebildetem Knochen im Frakturspalt.

Diese Ergebnisse belegen, dass systemisch generiertes C5a und seine nachgeschalteten Effekte auf die systemische Inflammation maßgeblich zu der Frakturheilungsverzögerung nach Thoraxtrauma beitragen. Dies bestätigt die Studie von Flierl et al., in der gezeigt werden konnte, dass die systemische Blockade von C5a die Effekte des Thoraxtraumas auf die systemische Inflammation (systemischer Zytokinanstieg, Neutrophilie, Neutrophilendysfunktion) aufheben konnte (FLIERL et al., 2008). Somit kann angenommen werden, dass auch eventuelle Störungen inflammatorischer Prozesse im frühen Frakturkallus nach Thoraxtrauma durch die Applikation des C5aR-Antagonisten aufgehoben und folglich die Frakturheilung verbessert werden konnte.

Insbesondere die Anwesenheit des Anaphylatoxinrezeptors C5aR auf Knochenzellen während aller Phasen der Frakturheilung in Zonen der intramembranösen und enchondralen

Ossifikation (IGNATIUS et al., 2011a) lässt vermuten, dass das Komplementsystem nicht nur inflammatorische Prozesse im Frakturkallus moduliert, sondern auch einen direkten Einfluss auf Knochenzellen haben könnte.

So konnten ältere immunhistologische Studien zeigen, dass das Komplementsystem bereits während der Knochenentwicklung von Bedeutung sein könnte (SAKIYAMA et al., 1994; ANDRADES et al., 1996; SAKIYAMA et al., 1997). C3, C5, C9 und Faktor B konnten immunhistologisch in der Wachstumsfuge nachgewiesen werden (ANDRADES et al., 1996). Die Autoren postulierten daher eine mögliche Beteiligung bei der Knochen-Knorpel-Transformation. C1s, die initiale Serinprotease des klassischen Aktivierungsweges, wurde in hypertrophen Chondrozyten im primären und sekundären Ossifikationszentrum während der Knochenentwicklung gefunden. Da C1s Kollagen Typ I und II degradieren kann, scheint es für den bei der enchondralen Ossifikation stattfindenden Matrixabbau und Zelluntergang eine Rolle zu spielen (SAKIYAMA et al., 1994; SAKIYAMA et al., 1997).

In vitro Studien konnten funktionell zahlreiche Eigenschaften von C5a auf knochenspezifische Zellen identifizieren, die allesamt eine wichtige Rolle während der Knochenheilung spielen. So konnte gezeigt werden, dass C5a die Migration von osteoblastären Vorläuferzellen und Osteoblasten spezifisch über C5aR vermittelt und somit zur Rekrutierung dieser Zellen im Frakturheilungsgebiet beitragen könnte (IGNATIUS et al., 2011a). Zudem führte die Behandlung von primären Osteoblasten mit C3a und C5a in Synergismus mit dem pro-inflammatorischen Zytokin IL-1 β zu einer signifikanten Induktion von inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und IL-8 sowie zu einer verstärkten Expression von RANKL und Osteoprotegerin (IGNATIUS et al., 2011b). Aktiviertes Komplement könnte also die Entzündungsantwort von Osteoblasten im pro-inflammatorischen Milieu des Frakturkallus steigern und ihre Interaktion mit Osteoklasten modulieren. Des Weiteren konnte erstmalig gezeigt werden, dass C3a und C5a direkt - auch in Abwesenheit von RANKL und M-CSF - die Osteoklastenformation aus peripheren Blutmonozyten induzieren und dass sowohl Osteoblasten und in noch in stärkerem Maße Osteoklasten in der Lage sind, selbst aktiv C5 in biologisch funktionelles C5a zu spalten (IGNATIUS et al., 2011b). Daher wäre es durchaus denkbar, dass das Komplementsystem generell wichtig für die ungestörte Frakturheilung ist, da es offensichtlich eine regulatorische Funktion besitzt und lediglich die systemisch überschießende Komplementaktivierung nach schwerem Trauma negative Effekte auf die Knochenheilung entfaltet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die negativen Effekte des stumpfen Thoraxtraumas auf die Frakturheilung mittels eines C5aR-Antagonisten aufgehoben werden konnte,

möglicherweise durch die Normalisierung der Anzahl und/oder Funktion von Immun- und Knochenzellen lokal im Frakturheilungsgebiet. Daher könnte die Behandlung polytraumatisierter Patienten mit einem spezifischen C5aR-Antagonisten nicht nur die überschießende systemische Inflammation modulieren, sondern auch die Frakturheilung wesentlich verbessern. C5a stellt somit ein therapeutisches Ziel zur Vermeidung von Frakturheilungsstörungen polytraumatisierter Patienten dar.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Es gibt klinische Hinweise, dass die Frakturheilung bei polytraumatisierten Patienten gestört ist. Eine der Ursachen könnte die posttraumatische systemische Inflammation darstellen. Das Thoraxtrauma ist eines der häufigsten und zugleich kritischsten Begleitverletzungen, da es verglichen mit anderen Verletzungen zu einer stärkeren systemischen Inflammation führt. Diese systemische Inflammation ist gekennzeichnet durch die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen, einer starken Aktivierung der Komplementkaskade und einer dadurch hervorgerufenen Überaktivierung von Immunzellen, was zu einer Schädigung von Organen führt, die initial nicht vom Trauma betroffen waren. Daher stellte sich in dieser Arbeit die Frage, ob die posttraumatische systemische Inflammation der Grund für die klinisch beobachtete Frakturheilungsverzögerung bei polytraumatisierten Patienten darstellt. Des Weiteren wurde der therapeutische Ansatz verfolgt, die Frakturheilungsstörung nach schwerem Trauma durch die Immunmodulation der systemischen Inflammation mittels eines spezifischen C5aR-Antagonisten aufzuheben.

In Ratten wurde eine Femurosteotomie erzeugt und mittels eines Fixateurs externe stabilisiert. Die Hälfte der Tiere erhielt ein stumpfes Thoraxtrauma. Den Tieren wurde postoperativ Blut entnommen, um die systemische Inflammation nachzuweisen. Um die Frakturheilung nach Thoraxtrauma zu untersuchen, wurden die Kalli nach einer Heilungszeit von 35 Tagen biomechanisch sowie strukturell durch mikrocomputertomographische Messungen und Histomorphometrie analysiert. Um die C5a-vermittelte systemische Inflammation zu inhibieren und somit die Frakturheilung zu verbessern, erhielt eine weitere Tiergruppe unmittelbar und 12 h nach dem Thoraxtrauma einen spezifischen C5aR-Antagonisten.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass das stumpfe Thoraxtrauma und die resultierende systemische Inflammation zu einer drastischen Frakturheilungsverzögerung führte, was durch eine signifikant verminderte Biegesteifigkeit in Verbindung mit einem signifikant kleineren Kallus mit schlechterer Knochenstruktur und weniger neugebildetem Knochen im Frakturspalt gezeigt werden konnte. Die Immunmodulation mittels eines C5aR-Antagonisten konnte den negativen Effekt des stumpfen Thoraxtraumas auf die Frakturheilung vollständig aufheben, möglicherweise durch die Normalisierung der Anzahl und/oder Funktion von Immun- und Knochenzellen lokal im Frakturheilungsgebiet. C5a stellt daher ein therapeutisches Ziel zur Vermeidung von Frakturheilungsstörungen polytraumatisierter Patienten dar.

6 SUMMARY

There is clinical evidence, that fracture healing is impaired in polytraumatic patients. One reason might be the complex posttraumatic systemic inflammatory response. In this context the blunt chest trauma represents one of the most common and most critical injuries because it leads to a stronger systemic inflammation compared to other injury patterns. This systemic inflammation is characterized by the release of pro-inflammatory cytokines, a massive activation of the complement system and the resulting over-activation of inflammatory cells, together frequently leading to secondary tissue and organ damage after severe trauma. Therefore, the question arose, whether the posttraumatic systemic inflammation might be the reason for the delayed fracture healing observed clinically in polytraumatic patients. Furthermore it was investigated whether the impairment of fracture healing after a severe trauma could be abolished by the immunomodulation of the systemic inflammation with a specific C5aR-antagonist.

Rats received a femur osteotomy, which was stabilized with an external fixator. Half of the animals underwent an additional blunt chest trauma. Blood was taken from the animals postoperatively in order to evaluate the early systemic inflammatory response. For evaluating the fracture healing outcome, the fracture calli were tested mechanically as well as structurally by micro-computed tomography measurements and by histomorphometry after a healing period of 35 days. To inhibit the C5a-dependent posttraumatic systemic inflammation and therefore to enhance the fracture healing outcome, a further group received a C5aR-antagonist intravenously immediately and 12 h after the blunt chest trauma.

This study showed that the blunt chest trauma and the resulting systemic inflammation led to considerably delayed fracture healing, as shown by a significantly reduced flexural rigidity in combination with a significantly diminished callus volume, moment of inertia and relative bone surface as well as decreased amounts of newly formed bone in fracture calli of animals subjected to a blunt chest trauma. Furthermore the immunomodulation by a C5aR-antagonist completely abolished the deleterious effects of a blunt chest trauma on fracture healing, possibly by normalizing the amount and/or function of inflammatory and bone cells locally at the fracture site. C5a therefore represents a potential therapeutic target to prevent delayed bone healing in patients with severe trauma.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res* 2008; 87: 107-18.

Albers S, Burk AM, Rittirsch D, Amara U, Helm M, Lampl L, Bruckner UB, Beck A, Gebhard F, Huber-Lang M. Impairment of the Complement Function After Multiple Trauma in Humans. *Shock* 2006; 26 (Suppl. 1): 14.

Alexander KA, Chang MK, Maylin ER, Kohler T, Muller R, Wu AC, Van Rooijen N, Sweet MJ, Hume DA, Raggatt LJ, Pettit AR. Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model. *J Bone Miner Res* 2011; 26: 1517-32.

Amara U, Flierl MA, Rittirsch D, Klos A, Chen H, Acker B, Bruckner UB, Nilsson B, Gebhard F, Lambris JD, Huber-Lang M. Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *J Immunol* 2010; 185: 5628-36.

Andrades JA, Nimni ME, Becerra J, Eisenstein R, Davis M, Sorgente N. Complement proteins are present in developing endochondral bone and may mediate cartilage cell death and vascularization. *Exp Cell Res* 1996; 227: 208-13.

Andrew JG, Andrew SM, Freemont AJ, Marsh DR. Inflammatory cells in normal human fracture healing. *Acta Orthop Scand* 1994; 65: 462-6.

Bardenheuer M, Obertacke U, Waydhas C, Nast-Kolb D. [Epidemiology of the severely injured patient. A prospective assessment of preclinical and clinical management. AG Polytrauma of DGU]. *Unfallchirurg* 2000; 103: 355-63.

Bastian O, Pillay J, Alblas J, Leenen L, Koenderman L, Blokhuis T. Systemic inflammation and fracture healing. *J Leukoc Biol* 2011; 89: 669-73.

Bhandari M, Tornetta P, 3rd, Sprague S, Najibi S, Petrisor B, Griffith L, Guyatt GH. Predictors of reoperation following operative management of fractures of the tibial shaft. *J Orthop Trauma* 2003; 17: 353-61.

Champagne CM, Takebe J, Offenbacher S, Cooper LF. Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2. *Bone* 2002; 30: 26-31.

Chang MK, Raggatt LJ, Alexander KA, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Schroder K, Maylin ER, Ripoll VM, Hume DA, Pettit AR. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. *J Immunol* 2008; 181: 1232-44.

Chung R, Cool JC, Scherer MA, Foster BK, Xian CJ. Roles of neutrophil-mediated inflammatory response in the bony repair of injured growth plate cartilage in young rats. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 1272-80.

Claes L, Augat P, Suger G, Wilke HJ. Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. *J Orthop Res* 1997; 15: 577-84.

Claes L, Eckert-Hubner K, Augat P. The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J Orthop Res* 2002; 20: 1099-105.

Claes L, Blakytyn R, Göckelmann M, Schoen M, Ignatius A, Willie B. Early dynamization by reduced fixation stiffness does not improve fracture healing in a rat femoral osteotomy model. *J Orthop Res* 2009; 27: 22-7.

Claes LE, Heigele CA. Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing. *J Biomech* 1999; 32: 255-66.

Claes LE, Ito K. Biomechanics of Fracture Fixation and Fracture Healing. In: Basic Orthopaedic Biomechanics and Mechano-Biology. Mow VC, Huiskes R. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2005.

Claes LE, Cunningham JL. Monitoring the mechanical properties of healing bone. *Clin Orthop Relat Res* 2009; 467: 1964-71.

Clowes JA, Riggs BL, Khosla S. The role of the immune system in the pathophysiology of osteoporosis. *Immunol Rev* 2005; 208: 207-27.

Cruess RL, Dumont J. Healing of bone, tendon, and ligament. In: Fractures. Rockwood CA, Green DP. Philadelphia: JB Lippincott 1975.

Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie e.V. (2006) Weißbuch Schwerverletzten-Versorgung. Druckerei Gottlob Hartmann GmbH, Stuttgart.

Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie e.V. (2010) Jahresbericht des Traumaregisters der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie. Sektion NIS der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU).

Ehrnthaller C, Ignatius A, Gebhard F, Huber-Lang M. New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Mol Med* 2011; 17: 317-29.

Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma* 2005; 19: S4-6.

Epari DR, Schell H, Bail HJ, Duda GN. Instability prolongs the chondral phase during bone healing in sheep. *Bone* 2006; 38: 864-70.

Flierl MA, Schreiber H, Huber-Lang MS. The role of complement, C5a and its receptors in sepsis and multiorgan dysfunction syndrome. *J Invest Surg* 2006; 19: 255-65.

Flierl MA, Perl M, Rittirsch D, Bartl C, Schreiber H, Fleig V, Schlaf G, Liener U, Brueckner UB, Gebhard F, Huber-Lang MS. The role of C5a in the innate immune response after experimental blunt chest trauma. *Shock* 2008; 29: 25-31.

Gebhard F, Kelbel MW, Strecker W, Kinzl L, Bruckner UB. Chest trauma and its impact on the release of vasoactive mediators. *Shock* 1997; 7: 313-7.

Gebhard F, Pfetsch H, Steinbach G, Strecker W, Kinzl L, Bruckner UB. Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans? *Arch Surg* 2000; 135: 291-5.

Gebhard F, Huber-Lang M. Polytrauma--pathophysiology and management principles. *Langenbecks Arch Surg* 2008; 393: 825-31.

Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 2003; 88: 873-84.

Giannoudis PV, Harwood PJ, Loughenbury P, Van Griensven M, Krettek C, Pape HC. Correlation between IL-6 levels and the systemic inflammatory response score: can an IL-6 cutoff predict a SIRS state? *J Trauma* 2008; 65: 646-52.

Gokturk E, Turgut A, Baycu C, Gunal I, Seber S, Gulbas Z. Oxygen-free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 1995; 66: 473-5.

Grogaard B, Gerdin B, Reikeras O. The polymorphonuclear leukocyte: has it a role in fracture healing? *Arch Orthop Trauma Surg* 1990; 109: 268-71.

Grundnes O, Reikeraas O. Effects of macrophage activation on bone healing. *J Orthop Sci* 2000; 5: 243-7.

Hankemeier S, Grassel S, Plenz G, Spiegel HU, Bruckner P, Probst A. Alteration of fracture stability influences chondrogenesis, osteogenesis and immigration of macrophages. *J Orthop Res* 2001; 19: 531-8.

Hardy R, Cooper MS. Bone loss in inflammatory disorders. *J Endocrinol* 2009; 201: 309-20.

Hecke F, Schmidt U, Kola A, Bautsch W, Klos A, Köhl J. Circulating complement proteins in multiple trauma patients--correlation with injury severity, development of sepsis, and outcome. *Crit Care Med* 1997; 25: 2015-24.

Hensler T, Sauerland S, Bouillon B, Raum M, Rixen D, Helling HJ, Andermahr J, Neugebauer EA. Association between injury pattern of patients with multiple injuries and circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-6 and interleukin-10, and polymorphonuclear neutrophil elastase. *J Trauma* 2002; 52: 962-70.

Hietbrink F, Koenderman L, Rijkers G, Leenen L. Trauma: the role of the innate immune system. *World J Emerg Surg* 2006; 1: 15.

Huber-Lang M, Younkin EM, Sarma JV, Riedemann N, McGuire SR, Lu KT, Kunkel R, Younger JG, Zetoune FS, Ward PA. Generation of C5a by phagocytic cells. *Am J Pathol* 2002; 161: 1849-59.

Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, Lambris JD, Warner RL, Flierl MA, Hoesel LM, Gebhard F, Younger JG, Drouin SM, Wetsel RA, Ward PA. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med* 2006; 12: 682-7.

Ignatius A, Ehrnthaller C, Brenner RE, Kreja L, Schoengraf P, Lisson P, Blakytyn R, Recknagel S, Claes L, Gebhard F, Lambris JD, Huber-Lang M. The anaphylatoxin receptor C5aR is present during fracture healing in rats and mediates osteoblast migration in vitro. *J Trauma* 2011a; 71: 952-60.

Ignatius A, Schoengraf P, Kreja L, Liedert A, Recknagel S, Kandert S, Brenner RE, Schneider M, Lambris JD, Huber-Lang M. Complement C3a and C5a modulate osteoclast formation and inflammatory response of osteoblasts in synergism with IL-1beta. *J Cell Biochem* 2011b; 112: 2594-605.

Karladani AH, Granhed H, Karrholm J, Styf J. The influence of fracture etiology and type on fracture healing: a review of 104 consecutive tibial shaft fractures. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001; 121: 325-8.

Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. *Injury* 2005; 36: 691-709.

Knöferl MW, Liener UC, Seitz DH, Perl M, Bruckner UB, Kinzl L, Gebhard F. Cardiopulmonary, histological, and inflammatory alterations after lung contusion in a novel mouse model of blunt chest trauma. *Shock* 2003; 19: 519-25.

Knöferl MW, Liener UC, Perl M, Bruckner UB, Kinzl L, Gebhard F. Blunt chest trauma induces delayed splenic immunosuppression. *Shock* 2004; 22: 51-6.

Köhl J. The role of complement in danger sensing and transmission. *Immunol Res* 2006; 34: 157-76.

Kolar P, Schmidt-Bleek K, Schell H, Gaber T, Toben D, Schmidmaier G, Perka C, Buttgerit F, Duda GN. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue Eng Part B Rev* 2010; 16: 427-34.

Kolar P, Gaber T, Perka C, Duda GN, Buttgerit F. Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia. *Clin Orthop Relat Res* 2011; 469: 3118-26.

Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 1004-14.

Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 279-89.

Lam NY, Rainer TH, Chan LY, Joynt GM, Lo YM. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients. *Clin Chem* 2003; 49: 1286-91.

Liener UC, Knöferl MW, Strater J, Barth TF, Pauser EM, Nussler AK, Kinzl L, Bruckner UB, Gebhard F. Induction of apoptosis following blunt chest trauma. *Shock* 2003; 20: 511-6.

McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 1978; 60-B: 150-62.

Nast-Kolb D, Ruchholtz S, Waydhas C, Schmidt B, Taeger G. [Damage control orthopedics]. *Unfallchirurg* 2005; 108: 804, 6-11.

Perl M, Gebhard F, Bruckner UB, Ayala A, Braumüller S, Buttner C, Kinzl L, Knöferl MW. Pulmonary contusion causes impairment of macrophage and lymphocyte immune functions and increases mortality associated with a subsequent septic challenge. *Crit Care Med* 2005; 33: 1351-8.

Perl M, Gebhard F, Braumüller S, Tauchmann B, Bruckner UB, Kinzl L, Knöferl MW. The pulmonary and hepatic immune microenvironment and its contribution to the early systemic inflammation following blunt chest trauma. *Crit Care Med* 2006; 34: 1152-9.

Perren SM. Evolution of the internal fixation of long bone fractures. The scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology. *J Bone Joint Surg Br* 2002; 84: 1093-110.

Reikeras O, Shegarfi H, Wang JE, Utvag SE. Lipopolysaccharide impairs fracture healing: an experimental study in rats. *Acta Orthop* 2005; 76: 749-53.

Richardson JB, Cunningham JL, Goodship AE, O'Connor BT, Kenwright J. Measuring stiffness can define healing of tibial fractures. *J Bone Joint Surg Br* 1994; 76: 389-94.

Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010; 11: 785-97.

Sakiyama H, Inaba N, Toyoguchi T, Okada Y, Matsumoto M, Moriya H, Ohtsu H. Immunolocalization of complement C1s and matrix metalloproteinase 9 (92kDa gelatinase/type IV collagenase) in the primary ossification center of the human femur. *Cell Tissue Res* 1994; 277: 239-45.

Sakiyama H, Nakagawa K, Kuriwa K, Imai K, Okada Y, Tsuchida T, Moriya H, Imajoh-Ohmi S. Complement C1s, a classical enzyme with novel functions at the endochondral ossification center: immunohistochemical staining of activated C1s with a neoantigen-specific antibody. *Cell Tissue Res* 1997; 288: 557-65.

Schmidt-Bleek K, Schell H, Schulz N, Hoff P, Perka C, Buttgerit F, Volk HD, Lienau J, Duda GN. Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. *Cell Tissue Res* 2011; doi: 10.1007/s00441-011-1205-7, [Epub ahead of print].

Schraufstatter IU, Discipio RG, Zhao M, Khaldoyanidi SK. C3a and C5a are chemotactic factors for human mesenchymal stem cells, which cause prolonged ERK1/2 phosphorylation. *J Immunol* 2009; 182: 3827-36.

Schweiberer L. [Thoracic trauma--the Achilles heel of the multiple trauma patient]. *Unfallchirurg* 1998; 101: 243.

Shorr RM, Crittenden M, Indeck M, Hartunian SL, Rodriguez A. Blunt thoracic trauma. Analysis of 515 patients. *Ann Surg* 1987; 206: 200-5.

Stensballe J, Christiansen M, Tonnesen E, Espersen K, Lippert FK, Rasmussen LS. The early IL-6 and IL-10 response in trauma is correlated with injury severity and mortality. *Acta Anaesthesiol Scand* 2009; 53: 515-21.

Strecker W, Gebhard F, Rager J, Steinbach G, Ring C, Perl M, Kinzl L, Beck A. Interleukin-6 (IL-6) - An early marker of chest trauma. *Eur J Trauma* 2002; 28: 75-84.

Tscherne H, Regel G. Die Gesamtversorgung des polytraumatisierten Patienten. In: *Unfallchirurgie in Deutschland - Bilanz und Perspektive*. Oestern HJ, Probst J. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag 1997.

Tu Z, Bu H, Dennis JE, Lin F. Efficient osteoclast differentiation requires local complement activation. *Blood* 2010; 116: 4456-63.

Visser T, Hietbrink F, Groeneveld KM, Koenderman L, Leenen LP. Isolated blunt chest injury leads to transient activation of circulating neutrophils. *Eur J Trauma Emerg Surg* 2011; 37: 177-84.

Ward PA. The dark side of C5a in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 133-42.

Willenegger H, Perren SM, Schenk R. [Primary and secondary healing of bone fractures]. *Chirurg* 1971; 42: 241-52.

Willie B, Adkins K, Zheng X, Simon U, Claes L. Mechanical characterization of external fixator stiffness for a rat femoral fracture model. *J Orthop Res* 2009; 27: 687-93.

Xing Z, Lu C, Hu D, Yu YY, Wang X, Colnot C, Nakamura M, Wu Y, Mclau T, Marcucio RS. Multiple roles for CCR2 during fracture healing. *Dis Model Mech* 2010; 3: 451-8.

Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010; 464: 104-7.

8 DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Anita Ignatius und Herrn Prof. Dr. Lutz Claes für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik bedanken. Dabei ist vor allem die großzügige Förderung meiner wissenschaftlichen Laufbahn und die Unterstützung in allen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Anliegen zu betonen.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Eckhard Wolf für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Herrn Prof. Dr. Florian Gebhard, Herrn Prof. Dr. Markus Huber-Lang, Herrn Prof. Dr. Markus Knöferl, Herrn Prof. Dr. Dr. Peter Radermacher und Herrn Prof. Dr. Rolf Brenner möchte ich für die fruchtbare Zusammenarbeit im Rahmen der klinischen Forschergruppe (KFO200) danken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Ronny Bindl. Seine unermüdliche Unterstützung bei der Versuchsplanung, -durchführung und -auswertung, sowie seine grenzenlose Geduld in unzähligen Gesprächen hinsichtlich aller wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Fragen und Probleme halfen wesentlich bei der Entstehung dieser Dissertation bei.

Frau Uschi Maile, Frau Marion Tomo und Frau Sevil Essig danke ich für die große Hilfe bei den Operationen und der Anfertigung der histologischen Präparate. Frau Patricia Horny danke ich für die Hilfe bei der biomechanischen Prüfung und Herrn Herbert Schmitt für seine geniale technische Unterstützung.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Petra Kirsch und Herrn Dr. Andreas Wortmann des Tierforschungszentrums Oberberghof in Ulm für die angenehme Zusammenarbeit. Bei Herrn Wilhelm Gebel bedanke ich mich besonders für die liebevolle und zuverlässige Versorgung der Versuchstiere.

Allen Mitarbeitern des Instituts möchte ich für die nette und kollegiale Zeit in ihrer Mitte danken, allen voran Dr. Tim Wehner, Malte Steiner, Tobias Rosigkeit, Katharina Gruchenberg, Nicolas Graf, Dr. Frank Heuer und Philipp Schoengraf, die mich mit viel Geduld und Ratschlägen durch meine wissenschaftliche Laufbahn begleitet haben.

Ein ganz großer Dank gilt meiner gesamten Familie, die immer an mich geglaubt hat. Danke für die unendliche Unterstützung und Förderung. Frau Dr. Christine Bausewein danke ich für den allseits motivierenden Beistand.