

Aus der orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität
Direktor: Prof. Dr. med. H-J. Refior

Osteoneogenese und Innervation des interfragmentären Raumes durch
neuropeptidpositive Fasern am Beispiel des Distanzosteosynthesemodells
der Kaninchentibia

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Isabel Rösch
aus
München
2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med habil. Dr. Ing. W. Plitz

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. R. Baumgart

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. K. Wolf

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2002

In Liebe meinen Eltern

Osteoneogenese und Innervation des interfragmentären Raumes durch
neuropeptidpositive Fasern am Beispiel des Distanzosteosynthesemodells
der Kaninchentibia

1.	Einleitung und Problematik	7
1.1	Allgemeine Aspekte der Knochenheilung	7
1.2	Distanzosteosynthesemodell und Innervation	8
1.3	Calcitonin gene-related peptide (CGRP)	8
2.	Material und Methode	10
2.1	Tiermaterial und Versuchsanordnung	10
2.1.1	Präoperatives Vorgehen	10
2.1.2	Narkose	10
2.1.3	Operatives Vorgehen	11
2.1.4	Postoperativer Zeitraum	12
2.1.4.1	Histologische Methode zur Darstellung der Morphologie	17
2.1.5	Fixierungsalgorithmus zur Herstellung immunocytochemischer Präparate	17
2.1.6	Immunhistochemie der Neuropeptide im interfragmentären Spalt	18
2.1.7	Nervenmorphometrie und Overlaptechnik	21
2.1.8	Längenberechnung der Nervenfasern	22

3	Ergebnisse	23
3.1	Distanzosteosynthesemodell	23
3.2	Morphologie der Osteoneogenese	23
3.2.1	Standardhistologie am 5. postoperativen Tag	25
3.2.2	Standardhistologie am 10. postoperativen Tag	28
3.2.3	Standardhistologie am 15. postoperativen Tag	31
3.3	Innervation	34
3.3.1	Nervenmorphometrie - 5. postoperativer Tag	34
3.3.2	Nervenmorphometrie - 10. postoperativer Tag	36
3.3.3	Nervenmorphometrie am - 15. Postoperativer Tag	37
3.3.4	Kontrolle	39
3.3.5	Längenberechnung von Nervenfasern (nach Underwood)	40
3.4	Vorkommen und Lokalisation von CGRP – aktuelle Literatur	41
4	Diskussion	43
4.1	Distanzosteosynthesemodell	43
4.2	Osteoneogenese	46
4.2.1	Interfragmentärer Raum und kortikales Fragment	46
4.2.2	Faktoren der Osteoneogenese	50
4.2.3	Biomechanik als Regelmechanismus der Osteoneogenese	56
4.3	Innervation	58
4.3.1	Imunocytochemischer Nachweis der Nervenfasern im interfragmentären Raum	58
4.4	CGRP in der internationalen Literatur	59

5.	Ausblick	69
6.	Zusammenfassung	73
7.	Literaturverzeichnis	76
8.	Abkürzungsverzeichnis	85
9.	Anhang	88
9.1	Danksagung	88
9.2	Curriculum vitae	89

1. Einleitung und Problematik

1.1 Allgemeine Aspekte der Knochenheilung

Die Frakturheilung wird unmittelbar posttraumatisch durch eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen initiiert, die durch detaillierte Feedbackprozesse reguliert und u. U. zusätzlich durch Begleitverletzungen modifiziert werden. Beim Heilungsprozess sind physikalische, biochemische und biomechanische Kräfte in einem Netzwerk koordinierter Interaktionen und überlappender Phasen vereinigt (Wornom et al. 1991).

Negativeinflüsse des verletzten Knochens können das sensible Gleichgewicht der Knochenheilung stören und sie verzögern. Die Verletzungen an der Frakturstelle sind vielfältig. Das umgebende Weichgewebe mit Muskulatur, Bändern und Sehnen ist nicht mehr intakt, die Kontinuität von Periost und kortikalem Knochen ist durchbrochen, Kapillaren und Nervenfasern sind durchtrennt. An der Frakturstelle finden sich Knochenfragmente und nekrotisches Knochenmark.

Ziel der Frakturheilung ist die knöcherne Konsolidierung des Defektes und die innere Strukturangleichung. Im Zuge der Knochenheilung wird die Region, die die Fraktur umgibt, revaskularisiert; neu gebildetes Granulationsgewebe füllt den Frakturspalt aus. Der Kallus benötigt bis zu seiner vollständigen Ausbildung etwa einen Monat. Er stützt und stabilisiert die Frakturregion und dient als wichtiges Verbindungsglied zwischen den anfangs noch losen Fraktarenden. Er bildet sich sowohl entlang dem Knochenschaft wie auch im Bereich der Markhöhle. So entsteht nach und nach eine immer stabilere interne Fixation, die vor erneuten Verletzungen schützt. Durch Mineralisation des weichen Kallus entsteht harter Kallus. Kortikaler Kallus wird durch dichten Kompaktknochen ersetzt, die Integrität der Markhöhle wiederhergestellt und der verletzte Knochen so seinem Zustand vor der Fraktur weitgehend angeglichen. Je nach mechanischer Beanspruchung des Knochens und der einwirkenden Kräfte wird die Architektur der

Knochen trabekel so ausgerichtet, daß eine optimale Tragekraft bei möglichst geringem Eigengewicht gewährleistet werden kann.

1.2 Distanzosteosynthesemodell und Innervation

Besonderheiten der Osteoneogenese und Innervation wurden an unterschiedlichen tierexperimentellen Modellen untersucht. In der Literatur findet sich bisher aber keine standardisierte Methode, mit der ausreichend interfragmentäres Gewebenvolumen für die histologische, biochemische oder immunocytochemische Analyse in der Frühphase der Knochenbildung zur Verfügung steht. So ist z.B. bei den Modellen von Hukkanen et al. (1993), Aro et al. (1985) und Wolff et al. (1988) aufgrund eines engen interfragmentären Spalts wenig Gewebe verfügbar. Obwohl sich alternativ zum Tiermodell auch Untersuchungsverfahren in einer Gewebekultur anbieten, gibt es dennoch Fragestellungen, die die Reaktionseinheit des Röhrenknochens bei in-vivo-Versuchen erfordern. Dies war Anlaß, die Aussagefähigkeit eines entsprechend variierten Modells zu untersuchen, bei dem ausreichend Gewebe für eine differenzierte Analyse anfällt.

1.3 Calcitonin gene-related peptide (CGRP)

Unsere tierexperimentellen Untersuchungen konzentrierten sich auf den qualitativen und quantitativen Nachweis unterschiedlicher Zellen im interfragmentären Raum zu verschiedenen Zeitpunkten der Frakturheilung. Insbesondere galt unser Interesse neuropeptidpositiven Nervenfasern, vor allem dem Calcitonin gene-related peptide.

Der Calcitonin-Genkomplex kodiert für eine kleine Gruppe von Peptiden - die Calcitoninfamilie - bestehend aus dem Calcitonin selbst, dem Katalcalcin und dem Calcitonin gene-related peptide (CGRP). CGRP ist das wichtigste neben den bekannten Neuropeptiden Substance P (SP), Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP) und Neuropeptid Y (NPY) im Knochen. Der CGRP-Genkomplex umfaßt mindestens 2 Gene, die als alpha- und beta-Gen bezeichnet werden.

Das alpha-CGRP-Gen befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosom 11, zwischen dem Katalase- und dem PTH-Gen (Kittur et al. 1985). Es besteht aus 6 Exons, erstreckt sich über 6,5 Kilobasenpaare und wird vollkommen transkribiert.

Das beta-CGRP-Gen, ebenfalls auf dem kurzen Arm des Chromosom 11 lokalisiert, scheint durch Genduplikation entstanden zu sein (Steenbergh et al. 1985; Amara et al. 1985; Alevizaki et al. 1986).

CGRP wird als großer Präkursor synthetisiert, intrazellulär gespalten und in seiner aktiven Form freigesetzt (Goodman et al. 1979; Amara et al. 1982). Die ersten 25 Aminosäuren dienen als Signalpeptid für die Sekretion. Das aktive Neuropeptid besteht aus 37 Aminosäuren (Walter et al. 1985).

Beim Menschen unterscheiden sich die alpha- und beta-CGRP-Sequenzen durch drei Aminosäuren, bei der Ratte durch eine. Bis auf minimale Differenzen zeigen diese vier CGRP-Sequenzen gleiche physiologische Wirkungen (Zaidi et al. 1987).

Neben den experimentellen Untersuchungen befaßten wir uns mit dem in der internationalen Literatur dokumentierten aktuellen Stand der Daten und Fakten über Vorkommen, Verteilung, Struktur, Sequenz und Biochemie von Calcitonin gene-related peptide.

2. Material und Methode

2.1 Tiermaterial und Versuchsanordnung

Im experimentellen Modell wurde an der Kaninchentibia ein definierter zylinderförmiger interfragmentärer Raum durch zwei Osteotomien und die Entnahme eines 3 mm dicken Segments geschaffen. In dieser Defektzone konnte zu definierten Zeitpunkten der Heilungsprozeß histologisch und immuno-cytochemisch untersucht werden. Bei den Tieren handelte es sich um weibliche Kaninchen (Chbb: CH, Art. Nr. 106625, Fa. Thomae GmbH) im Alter von 3,5 bis 4 Monaten. Das Durchschnittsgewicht der Tiere betrug 3,9 +/- 0,4 kg.

2.1.1 Präoperatives Vorgehen

Die Tiere wurden mindestens eine Woche präoperativ bis zum Abschluß des Versuchs in Einzelkäfigen gehalten. Abhängig von der vorgesehenen Überlebenszeit der Kaninchen (5, 10 und 15 Tage) gab es drei Studiengruppen. In einem standardisierten Überwachungsprotokoll wurden Allgemeinzustand, Nahrungsaufnahme und Bewegungen dokumentiert.

2.1.2 Narkose

Nach der Prämedikation mit einer intraglutealen Mischinjektion von Ketavet® (Ketaminhydrochlorid; 40mg/kg KG) und Rompun® (Dihydro-Thiazinhydrochlorid und Methylhydroxybenzoat; 5,0mg/kg KG) wurde eine periphere Verweilkanüle

(G 22/24) in die Ohrvene der Tiere plaziert. Die Narkose wurde mit Narcoren® (Dihydroxyidinothiazinhydrochlorid; Initialdosis 16mg, Nachinjektionen titriert von bis zur 7-fachen Initialdosis) aufrechterhalten.

2.1.3 Operatives Vorgehen

Die Distanzosteosynthese unter aseptischen Bedingungen dauerte durchschnittlich 50 Minuten. In einer lateral der Tuberositas tibiae beginnenden Verbindungslinie zum Malleolus lateralis erfolgte der Hautschnitt. Die Fascia cruris wurde zunächst scharf durchtrennt, Musculi tibialis anterior, extensor digitorum longus, peroneus longus und brevis wurden mit der Pinzette abgeschoben. Unter sorgfältiger Schonung von Nerven- und Gefäßstrukturen wurde dann eine 7-Loch-DC-Kieferplatte (AO, Art.245.46) an der ventrolateralen Tibia zunächst anmodelliert.

Nach Bohren von jeweils drei proximalen und distalen Schraubenlöchern und anschließendem Gewindeschneiden folgten im Abstand von drei Millimetern (Abb. 2.1.3 a, Abb. 2.1.3 b) die zwei Osteotomien mit der oszillierenden Säge (unter ständigem Spülen mit physiologischer Kochsalzlösung) senkrecht zur Tibiaachse in Unterschenkelmitte. Nach Reposition des Unterschenkels und Einbringen eines standardisierten Platzhalters (Abb. 2.1.3 c) wurde dann die Platte endgültig befestigt, der Platzhalter entfernt (Abb. 2.1.3 d) und die entstandene Muskellücke sorgfältig über dem Knochen geschlossen; die Wunde wurde mit Rückstichnaht versorgt und verbunden.

Das standardisierte operative Verfahren war in allen Fällen problemlos durchführbar. Röntgenkontrollen zeigten bei allen Tieren einen regelrechten Implantat-sitz bei achsengerechter Stellung der osteotomierten Tibia (Abb. 2.1.3 e).

2.1.4 Postoperativer Zeitraum

Unmittelbar postoperativ wurden die Tiere engmaschig von geschultem Tierpflegepersonal überwacht, Analgetika wurden appliziert. Die Tiere erholten sich im allgemeinen rasch von dem operativen Eingriff, sichtbar an regelrechter Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme bereits am zweiten postoperativen Tag. Es gab keine Hinweise auf das Vorliegen einer Infektion.

Nach Ablauf des vorgesehenen Beobachtungszeitraumes von 5, 10 oder 15 Tagen fand eine erneute Röntgenkontrolle statt; die Tötung der Tiere erfolgte vor Entnahme des jeweiligen Präparates mit einer letalen Dosis Narcoren® (31,25mg/kg KG).

Nach Freilegen der Osteosynthese und Entfernen des Osteosynthesematerials war der interfragmentäre Raum in allen Fällen vollständig mit solidem, vitalen Gewebe ausgefüllt (Abb. 2.1.4 a). Der aus dem Defektareal entnommene Zylinder wurde in Zambonifixativ aufbewahrt. Zwei unterschiedliche Gewebeproben - osteotomienah und osteotomiefern - wurden zusätzlich aus dem Markraum der Tibia gewonnen und ebenfalls in geeigneter Lösung fixiert.



Abb. 2.1.3 a
Osteotomie in Höhe der Synostose von Fibula und Tibia

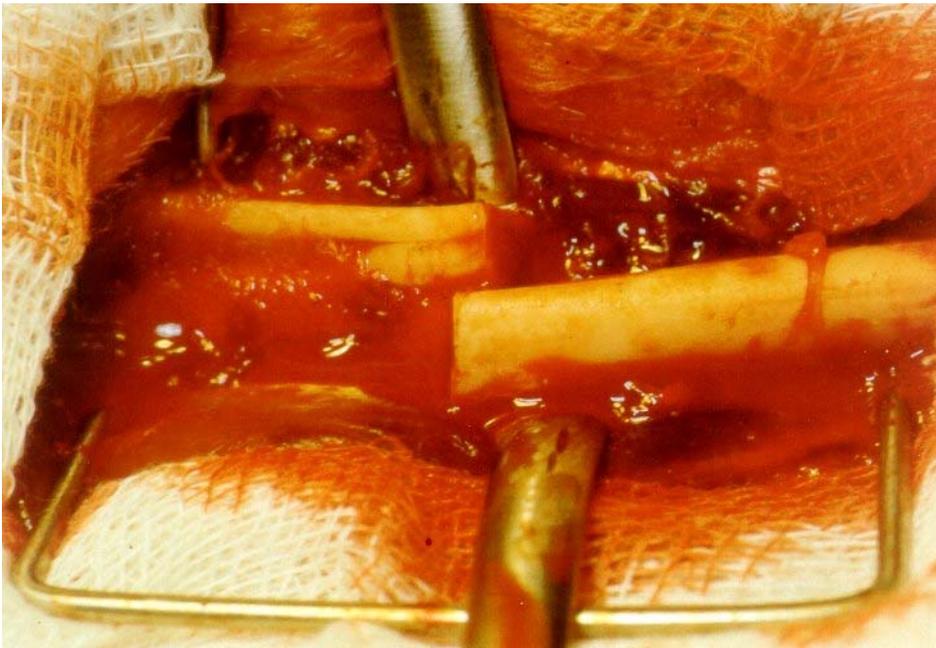


Abb. 2.1.3 b
Osteotomierte Tibia, Synostose sichtbar



Abb. 2.1.3 c

Distanzosteosynthese mit Hilfe des standardisierten Platzhalters

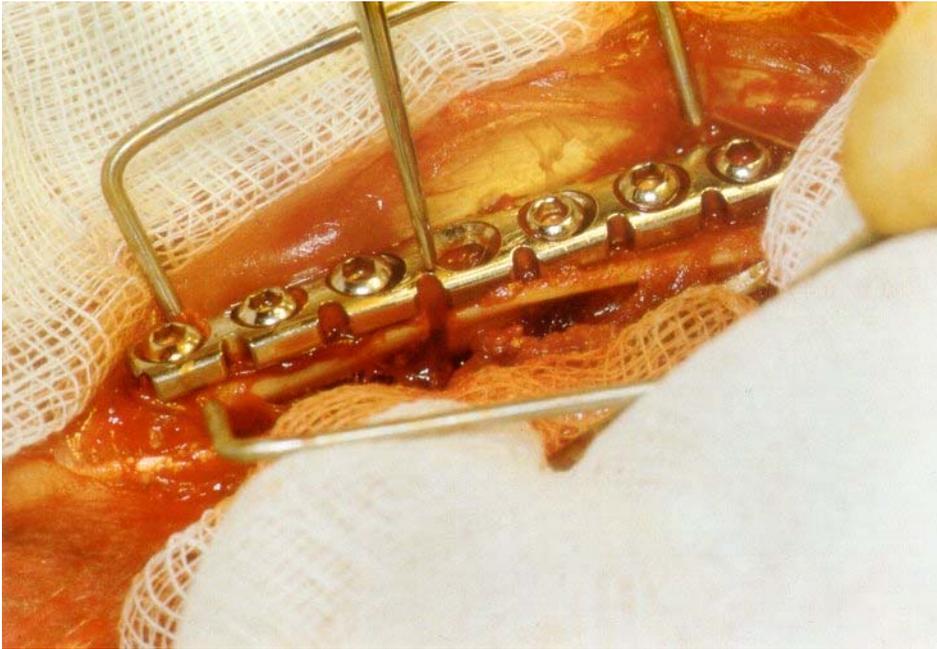


Abb. 2.1.3 d
Angebrachte Platte, Platzhalter entfernt

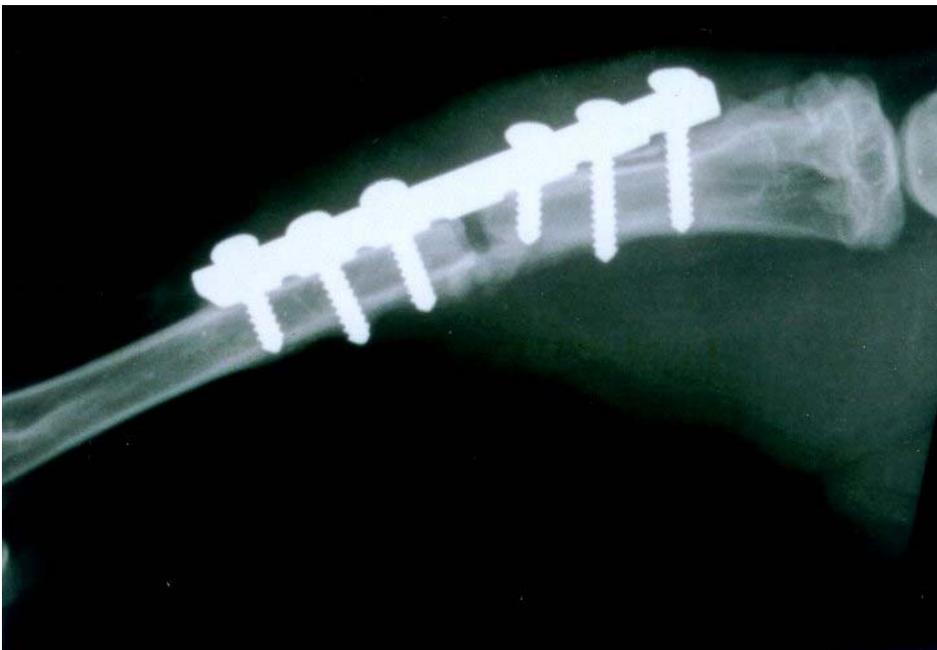


Abb. 2.1.3 e
Postoperative Röntgenkontrolle



Abb. 2.1.4 a

Materialentnahme, Plattenentfernung, durchbauter interfragmentärer Spalt

2.2 Histologische Methoden zur Darstellung der Morphologie

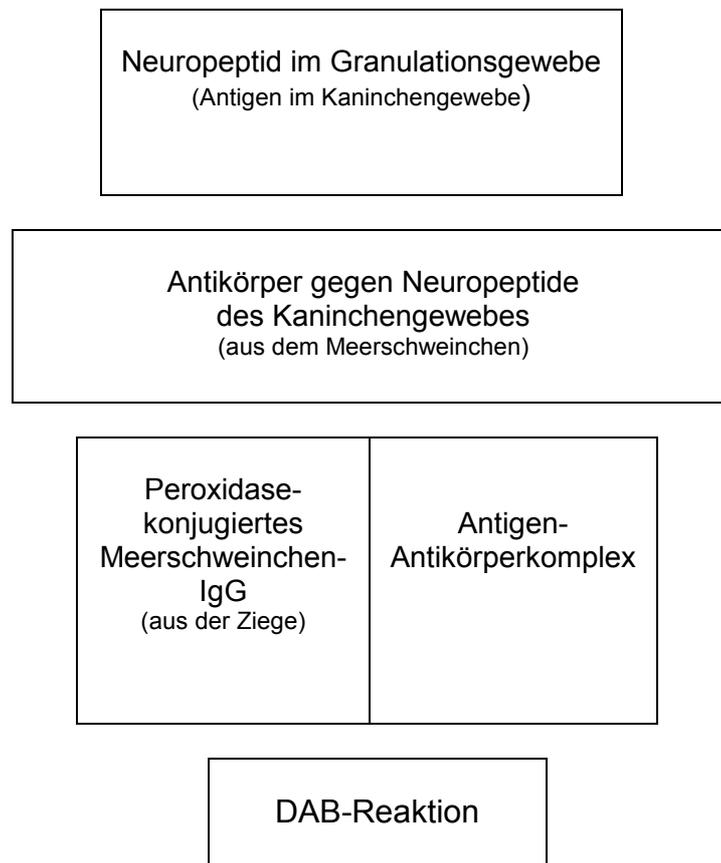
2.2.1 Fixierungsalgorithmus zur Herstellung immunocytochemischer Präparate

Fixierung in Zambonilösung	48 Stunden
Spülen in PBS	ca. 1 Minute
Einlegen in DMSO	3x10 Minuten
Einlegen in PBS	3x10 Minuten
Einlegen in 10% ige Saccharoselösung	24 Stunden
Spülen in Aqua dest. (bei mineralisierten Präparaten erfolgt anschließend die Demineralisierung in EDTA)	
Aufsteigende Alkoholreihe (je drei Tage /Alkoholverdünnung)	70% - 96% - 100%
Paraffineinbettung	mehrere Tage
Anfertigen von Schnitten (10 µm)	

2.2.2 Immunhistochemie der Neuropeptide im interfragmentären Spalt

Die Neuropeptide wurden mit einer indirekten immunhistochemischen Technik dargestellt (Luppa et al. 1986); es werden hierbei zunächst primäre polyklonale Antikörper gegen Calcitonin gene-related peptide getestet. Als sekundäre Antikörper dienten Peroxidase-konjugierte Antikörper unterschiedlicher Herkunft.

Im folgenden ist die indirekte immunhistochemische Reaktion am Beispiel des Neuropeptids CGRP dargestellt:



Zusätzlich zur angewandten Hintergrunds- und Kernfärbung mit Hämalaun als histologische Standardtechnik wurden PAS und Elastica-v.-Giesonfärbung verwendet.

Für die immunocytochemische Auswertung modifizierten wir den Fixier- und Bearbeitungsmodus nach Bjurholm (Bjurholm et al. 1988). Nach initialer Fixation in Zambonilösung für einen Zeitraum von 48 Stunden wurden die Proben zunächst in Phosphatpuffer gespült, anschließend in Saccharoselösung 24 Std. aufbewahrt. Bis zur Einbettung in Paraffin durchliefen die Präparate die Alkoholreihe, bis die endgültigen histologischen Schnitte mit einer Dicke von 8-10 µm gefertigt werden konnten. Für die Immunocytochemie wurden polyklonale Antikörper verwendet. (Die Anwendung eines Brückenantigens ist beim Kaninchen notwendig.) Die aufgetragenen Antikörper wurden für 12 Stunden inkubiert, dann mit PBS gespült.

Die angewandte Färbetechnik besteht aus drei wesentlichen Schritten:

1. Vorbereitung für die immunocytochemische Aufarbeitung:

Aufbewahrung im Wärmeschrank	30 Min.
Entparaffinieren in Xylol, absteigende Alkoholreihe	je 30 Min.
Einlegen in 30 %igem Alkohol und 3 %igem H ₂ O ₂	20 Min.
Spülen in Aqua dest.	
Spülen in PBS	ca. 1 Min.
Auftragen von Normalserum (Ziege) 1:1 mit PBS oder Normalserum (Esel) 1:10 mit PBS verdünnt	30 Min. 60 Min.

2. Antikörperinkubation:

1. Antikörperinkubation (24 Std.)	2. Antikörper-Peroxidase wechselnd Antikörperinkubation (je 20 Min.) und Spülen mit PBS (je 10 Min.)
Firma Biotrend: NPY (Ziege) (1:2000) CGRP (Schaf) (1:500) SP (Ratte) (1:200)	Firma Biotrend: Anti-Ziege-IgG (Esel) (1:4000) Anti-Schaf-IgG (Esel) (1:4000) Anti-Ratte-IgG (Ziege) (1:8000)
Firma Medac: VIP (Meerschwein) (1:10)	Firma Sigma: Anti-Meerschwein-IgG

3. Nachfärbung und Gegenfärbung:

Spülen in PBS	10 Min.
Nachfärben mit Diaminobenzidinlösung	10 Min.
Spülen in PBS	20 Min.
Spülen in Aqua dest.	10 Min.
Gegenfärben in Hämalun	2 Min.
Bläuen in Leitungswasser	10 Min.
Einlegen in Alkohol (aufsteigende Reihe)	10 Min.
Einlegen in Xylol	10 Min.
Einschluß mit DePe X (Kleber für Deckgläser)	

2.2.3 Nervenmorphometrie und Overlapptechnik

Die Gewebeproben wurden mit Hilfe unterschiedlicher Färbemethoden und immunocytochemischer Verfahren bearbeitet, um Aussagen über Morphologie und Quantität neuropeptidpositiver Nervenfasern zu unterschiedlichen Zeitpunkten machen zu können. Die mikroskopische Analyse erfolgte an einem Leitz-Mikroskop (Firma Leitz, Wetzlar). Mit Hilfe der Overlapptechnik nach Agnati (1991) lässt sich lichtmikroskopisch die Anzahl neuropeptidpositiver Nervenfasern pro Zählfeld bestimmen: Modifiziert angewendet, erfolgte das Zählen der Nervenfasern nicht mittels Bildanalysegerätes wie bei Agnati, sondern mit Hilfe eines Okularzählfeldes mit 10 x 10 Feldern (10 x 10 μm) bei 1000-facher Vergrößerung. Hier ist das Gefäß im Zentrum des Zählnetzes und die Summe positiver Ergebnisse von 7 Tieren wurde auf ein Rasterblatt übertragen.

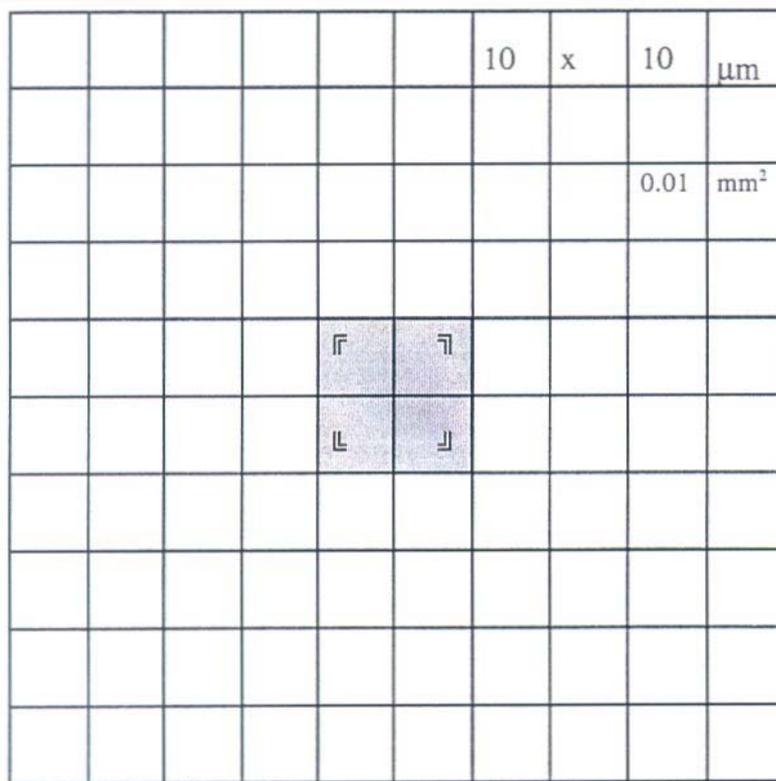


Abb. 2.2.3

Okularzählfeld, 10 x 10 Felder, Overlapptechnik nach Agnati

2.2.4 Längenberechnung der Nervenfasern

Zur Nervenlängenberechnung pro Volumen diente die von Underwood (1969) entwickelte Gleichung, welche die Länge von Linien im Raum beschreibt:

$$L_v = 2 PA \text{ mm/mm}^3$$

L_v = Länge der Linien im Raum eines definierten Volumens

PA = Treffpunkte (P) in einem definierten Areal (A)

Das System kann aus geraden oder gebogenen, unterbrochenen oder ununterbrochenen Linien in einem definierten Volumen bestehen. Die Formel besagt, daß die totale Länge von zufälligen Linien pro Volumeneinheit der doppelten Anzahl von Schnittpunkten entspricht. Bereits 1953 hatten Smith und Guttman diese Gleichung in modifizierter Form angewandt.

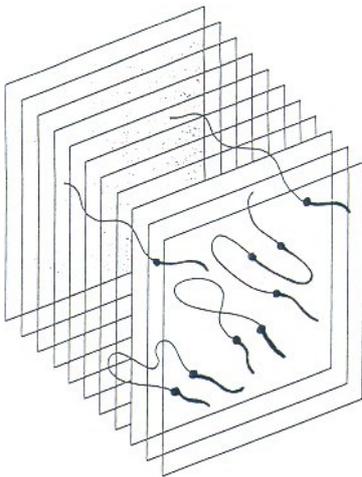


Abb. 2.2.4

„Length of line per unit-volume“ nach Underwood (1969)

3. Ergebnisse

3.1 Distanzosteosynthesemodell

Ziel unserer experimentellen Arbeit war zunächst die Ausarbeitung eines neuen operativen Verfahrens und seine Standardisierung im Modell. Mit diesem Distanzosteosynthesemodell konnte ein großer interfragmentärer Spalt geschaffen werden, der

- ausreichend Gewebevolumen bietet,
- zum Studium zytologischer Details der Osteogenese im postoperativen Verlauf geeignet ist und
- eine immunocytochemische Analyse der Innervation zulässt.

3.2 Morphologie der Osteoneogenese

Nach der Läsion dauert die Entzündungsphase an der Frakturstelle wenige Tage. Gewebetrümmer werden zunächst durch polymorphkernige Leukozyten und Makrophagen phagozytiert. Nach Kapillarneubildung unterstützen großflächige resorptive Vorgänge diesen Abbau. Neu eingewanderte Zellen im Frakturhämatom lassen sich als polymorphkernige Leukozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten und vaskuläre Endothelzellen identifizieren.

Fibroblasten fallen in ihrem aktiven Zustand im Frakturhämatom durch einen lichtmikroskopisch sichtbaren, prominenten Kern auf. Am 10.-15. Tag nach der Osteotomie beginnen eingewanderte Fibroblasten mit der Kollagenbildung. Einem Netzwerk ähnlich, dient früh während der Hämatombildung freigesetztes Fibrin als „Klettergerüst“. Erst nach der Kapillarneubildung löst sich das Fibrinnetz auf.

Der zunehmende Sauerstoffbedarf des ausheilenden Frakturbereichs wird durch Kapillarneubildung gedeckt. Impulse hierzu stammen von Nervenfasern, Makrophagen und Thrombozyten. Es werden neue Sinusoide und Kapillaren im reparativen Gewebe gebildet, die dann an das Kapillarnetz des vitalen Knochens angeschlossen werden. In unmittelbarer Nähe der Gefäßendothelien sind neuropeptidpositive Nervenfasern sichtbar.

Mit unserem Distanzosteosynthesemodell ist es gelungen, zahlreiche der oben genannten morphologischen Fakten zu visualisieren.

3.2.1 Standardhistologie am 5. postoperativen Tag

In der Gruppe der `5-Tages-Tiere` fanden sich in den untersuchten Präparaten vor allem ein konsolidiertes Frakturhämatom mit vereinzelt Granulozyten und Erythrozyten im Stadium des scholligen Zerfalls (Abb. 3.2.1 a). Ein feines Fibrinnetz (Abb. 3.2.1 b) und Fettzellareale (Abb. 3.2.1 c) waren in den Randgebieten des interfragmentären Raumes zu sehen; Gefäßlakunen, Kapillaren und Mineralisationsinseln waren nicht erkennbar.

Erfassung der Gewebekomponenten im interfragmentären Spalt:

Morphologie	5. Tag
Schollig zerfallene Erythrozytenfragmente	+++
Fibrinnetz mit Septierung	+++
Fettzellen	++
Precursorzelleinwanderung	–
Bindegewebsbildung	–
Gefäßlakunen/ Kapillaren	–
Mineralisationsinseln	–
Perivaskuläre Nervenfasern	–

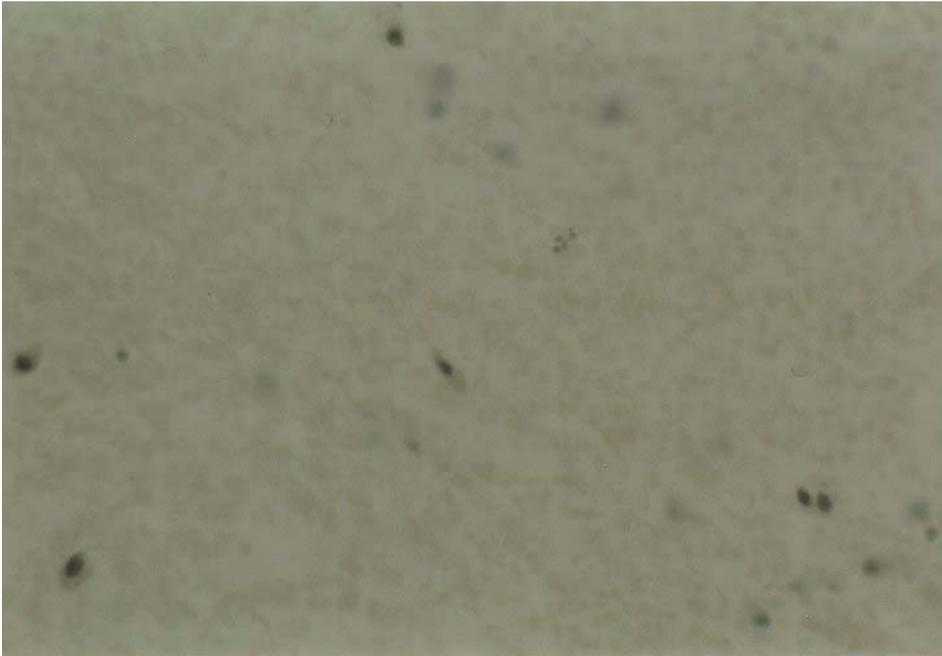


Abb. 3.2.1 a
Schollig zerfallenes Erythrozytenmaterial
(1000-fache Vergrößerung, Hämalaunfärbung)

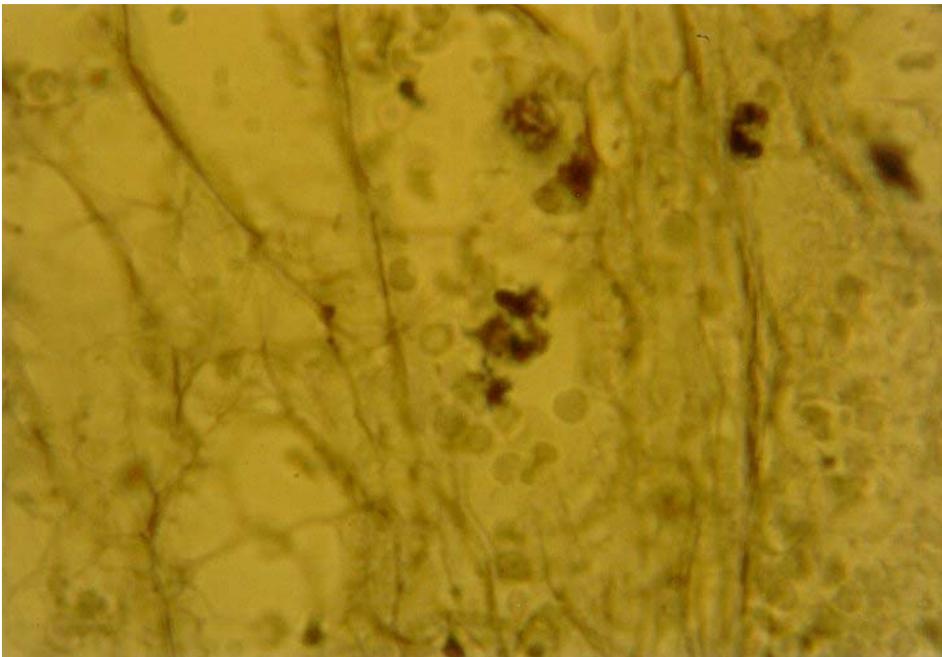


Abb. 3.2.1 b
Fibrinnetz (1000-fache Vergrößerung, Hämalaunfärbung)

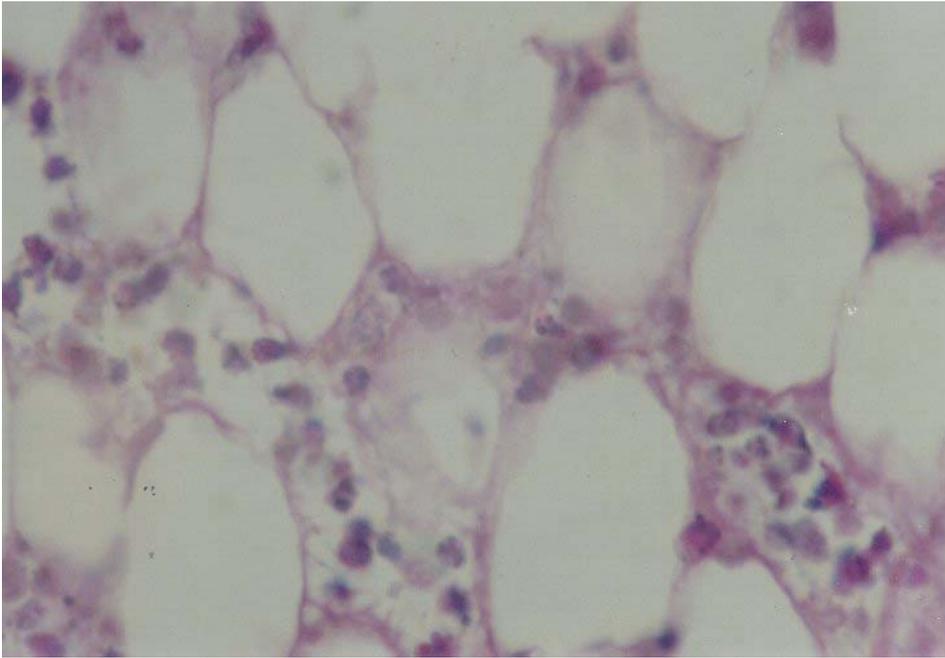


Abb. 3.2.1 c

Fettzellen (1000-fache Vergrößerung, Hämalaunfärbung)

3.2.2 Standardhistologie am 10. postoperativen Tag

Der Abbau schollig zerfallener Erythrozyten durch Phagozyten war jetzt weiter vorangeschritten, kleine Lakunen wurden sichtbar (Abb. 3.2.2 a, 3.2.2 c). Der Zellgehalt verringerte sich insgesamt zugunsten einer beginnenden Faserbildung.

Das Fibrinnetz nahm weiter zu und zeigte vereinzelt Septen; auch Kompartimente waren deutlich sichtbar. Mononukleäre Zellen (Precursorzellen) wanderten wellenförmig in das Hämatom ein (Abb. 3.2.2 b), wobei sie zu diesem Zeitpunkt noch nicht differenziert erschienen.

Erfassung der Gewebebestandteile im interfragmentären Spalt:

Morphologie	10.Tag
Schollig zerfallene Erythrozytenfragmente	++
Fibrinnetz mit Septierung	+
Fettzellen	+
Precursorzelleinwanderung	+++
Bindegewebsbildung	–
Gefäßlakunen/ Kapillaren	++
Mineralisationsinseln	–
Perivaskuläre Nervenfasern	–

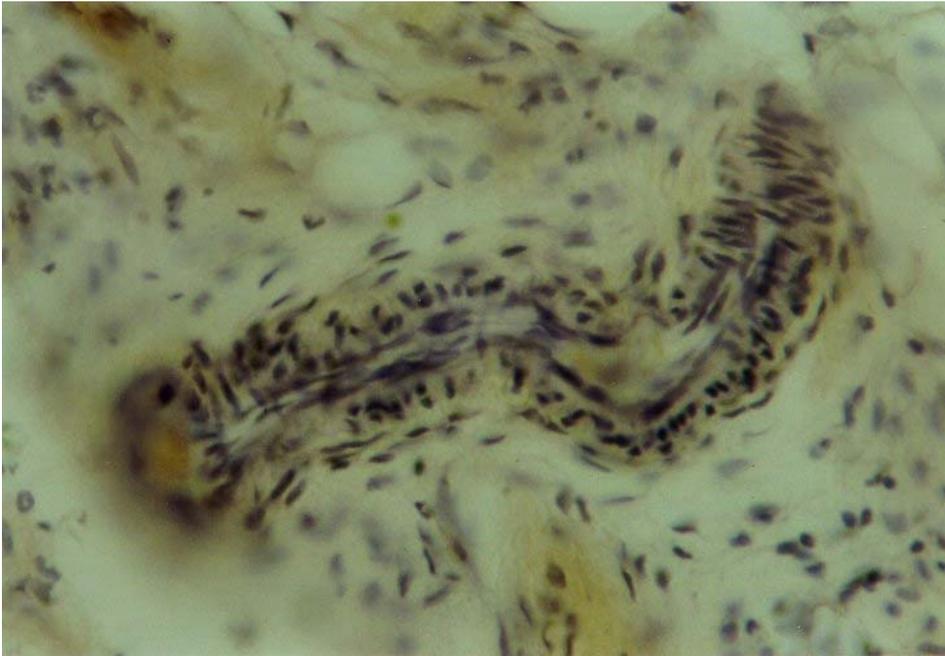


Abb. 3.2.2 a

Kapillarneubildung im interfragmentären Spalt am 10. Tag
(400-fache Vergrößerung, Hämalaunfärbung)

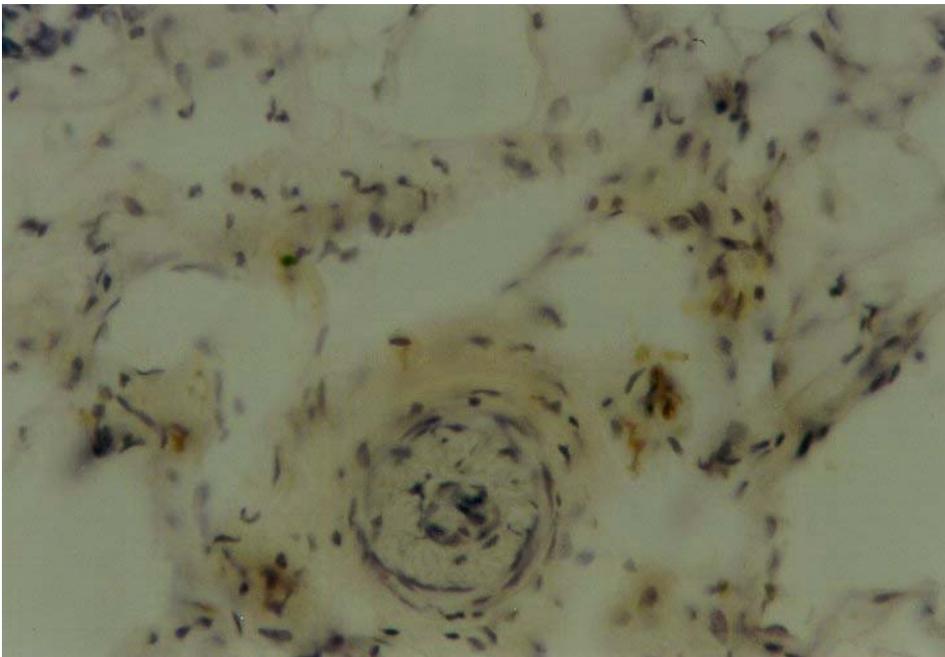


Abb. 3.2.2 b

Precursorzellansammlung in unmittelbarer Gefäßnähe am 10. Tag
(400-fache Vergrößerung, Hämalaunfärbung)

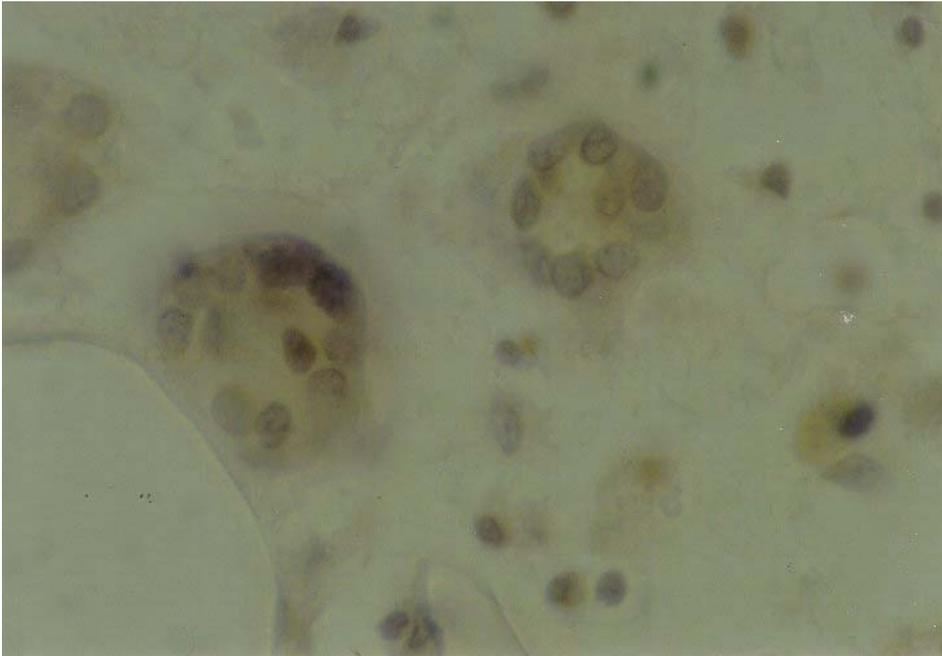


Abb. 3.2.2 c

Kapillarbildung durch Angioblasten und Pericyten am 10. Tag
(400-fache Vergrößerung, Hämalaunfärbung)

3.2.3 Standardhistologie am 15. postoperativen Tag

Inzwischen war das Fibrinnetz nicht mehr erkennbar, stattdessen neu entstandenes Bindegewebe (Abb. 3.2.3 a) zu sehen. Areale mit schollig zerfallenen Erythrozytenfragmenten waren vollständig aufgelöst. Neben gut erkennbaren Gefäßstrukturen fanden sich vereinzelt Mineralisationsinseln. Frühestens am 10. und spätestens am 15. Tag nach der Osteotomie ließen sich mit Hilfe immunocytochemischer Verfahren neuropeptidpositive Fasern nachweisen (Abb. 3.2.3 b). Zeitgleich konnte polarisationsmikroskopisch kollagenfaserhaltiges Gewebe bestimmt werden. Ebenso zeigten sich neuropeptidpositive Fasern perivaskulär (Abb. 3.2.3 c), an den Gefäßsinusoiden und begleitend zu Precursorzellansammlungen.

Erfassung der Gewebebestandteile im interfragmentären Spalt:

Morphologie	15.Tag
Schollig zerfallene Erythrozytenfragmente	–
Fibrinnetz mit Septierung	–
Fettzellen	+
Precursorzelleinwanderung	++
Bindegewebsbildung	+++
Gefäßlakunen/ Kapillaren	+++
Mineralisationsinseln	++

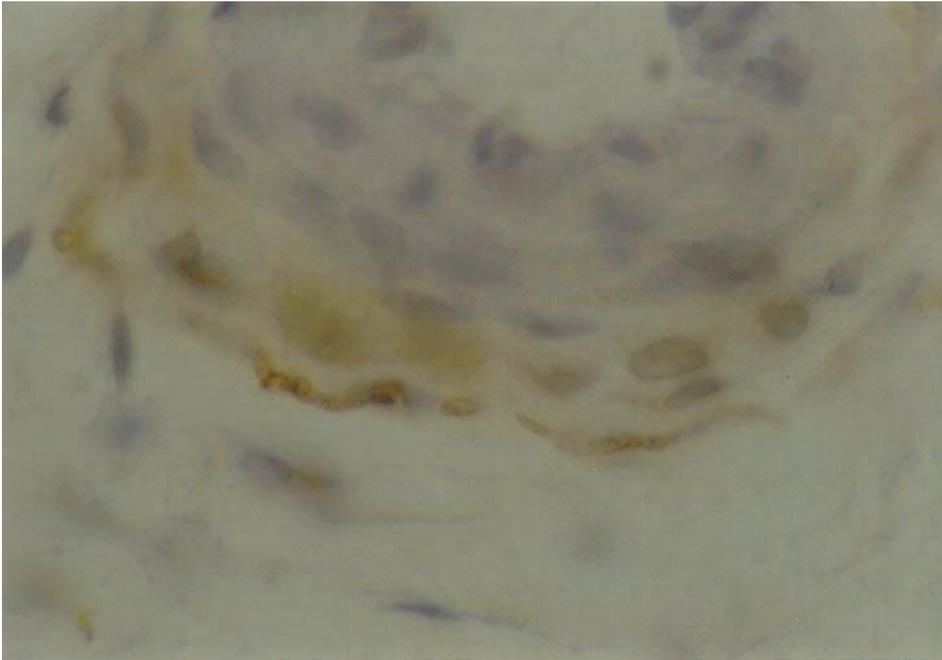


Abb. 3.2.3 a
Neuentstandenes Knochengewebe
(630-fache Vergrößerung, Nativpräparat, DAB-PAP)

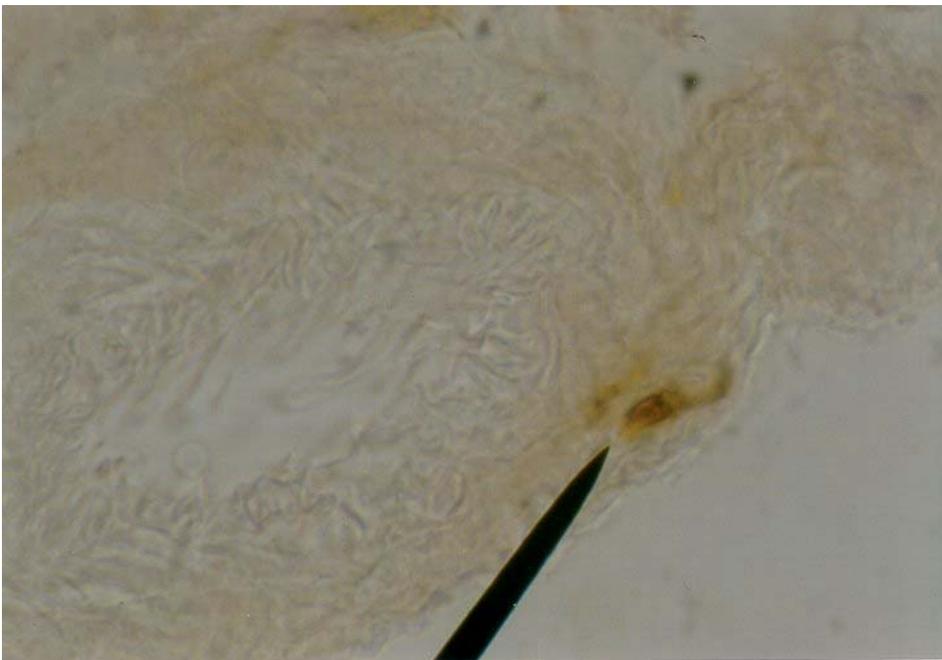


Abb. 3.2.3 b
CGRP-immunoreaktive Fasern am Gefäßrand
(630-fache Vergrößerung, Nativpräparat, DAB-PAP)

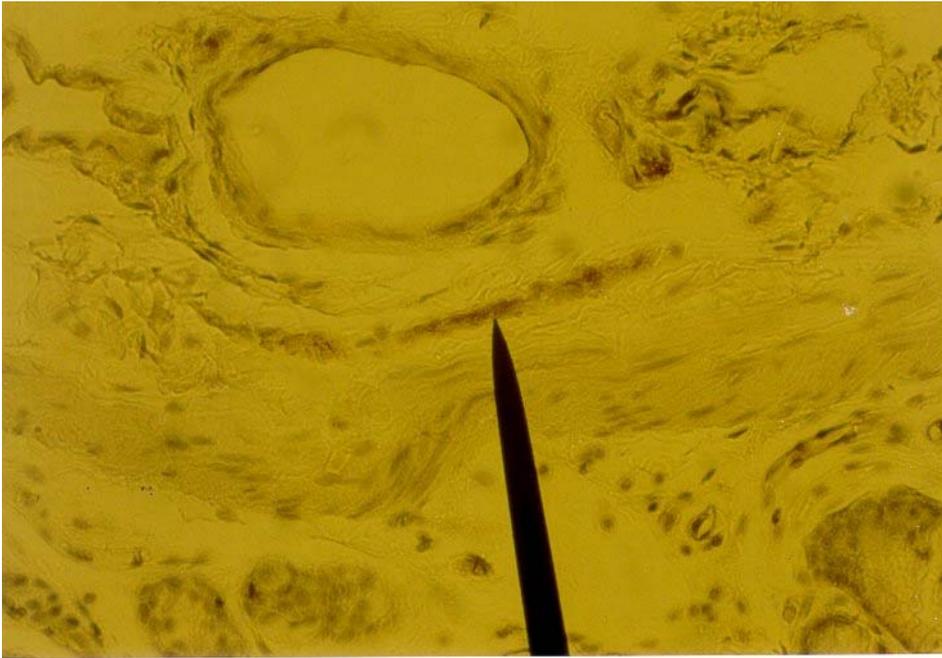


Abb. 3.2.3 c
Neuropeptidpositive Fasern perivaskulär
(1000-fache Vergrößerung, Hämalaunfärbung)

3.3 Innervation

Zahlreiche Fragen der Osteoneogenese lassen sich anhand des Distanzosteosynthesemodells beantworten. Speziell im Rahmen dieser Arbeit wurde neben der konventionellen Histologie mit Kern- und Hintergrundfärbung auch eine immunocytochemische Technik angewendet. Qualität und Quantität des vorhandenen Gewebematerials ermöglichen die Dokumentation des Auftretens neuropeptidpositiver Fasern zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe der Antikörpertechnik.

3.3.1 Nervenmorphometrie - 5. postoperativer Tag

Immunoreaktivität war in nervalen Strukturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten qualitativ und quantitativ erfaßbar. Die quantitative Analyse gelang mikroskopisch mit Hilfe der Overlaptechnik nach Agnati (1991); die Ergebnisse der so ermittelten Anzahl vorhandener Neuropeptidhormone im interfragmentären Spalt und im Markraum wird im Folgenden dargestellt.

CGRP-immunoreaktive Fasern im interfragmentären Spalt:

Bei den Präparaten der `5-Tages-Tiere` ließ sich auf der standardisierten Fläche von 0,01 mm² im interfragmentären Spalt noch keine Immunoreaktivität nachweisen.

CGRP-immunoreaktive Fasern im Markraum:

Folgende Densitymap zeigt das Ergebnis der 5-Tages-Präparate aus dem der Osteotomie nahegelegenen Markraum; nach Addition der Meßfläche von insgesamt 7 Tieren fanden sich lediglich 4 neuropeptidpositive Fasern.

0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0			0	0	0	0
0	0	0	0			0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Abb. 3.3.1

Densitymap für CGRP-positive Nervenfasern am 5. postop. Tag,
Kantenlänge eines Feldes 10 µm, Zählung bei 1000-facher Vergrößerung

3.3.2 Nervenmorphometrie - 10. postoperativer Tag

CGRP-immunoreaktive Fasern im interfragmentären Spalt:

Auch bei den 10-Tages-Präparaten ließ sich im interfragmentären Spalt noch keine Immunreaktivität nachweisen.

CGRP-immunoreaktive Fasern im Markraum:

In der Gruppe der 10-Tages-Präparate ergab unsere Messung nach Addition der Meßfläche von 7 Tieren insgesamt 13 neuropeptidpositive Fasern.

0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0			0	0	1	0
0	1	0	0			0	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	1	1	0	0	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	0	0	0	1	0	0	0

Abb 3.3.2

Densitymap für CGRP-positive Nervenfasern am 10. postop. Tag,
Kantenlänge eines Feldes 10 µm, Zählung bei 1000-facher Vergrößerung

3.3.3 Nervenmorphometrie - 15. postoperativer Tag

CGRP-immunoreaktive Fasern im interfragmentären Spalt:

Bei den Präparaten der `15-Tages-Tiere` waren im interfragmentären Spalt CGRP - positive Nervenfasern sichtbar.

0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1	0	0	0			0	1	0	1
0	0	0	0			0	0	0	0
0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	2	0	1	1	0	0	0	0

Abb 3.3.3 a

Densitymap für CGRP-positive Nervenfasern am 15. postop. Tag,
Kantenlänge eines Feldes 10 µm, Zählung bei 1000-facher Vergrößerung

CGRP-immunoreaktive Fasern im Markraum:

Eine deutlich größere Anzahl an CGRP-positiven Nervenfasern konnte nach Addition der Meßfläche von 7 Tieren nachgewiesen werden. Auf einer Fläche von 0,01 mm² fanden sich 44 neuropeptidpositive Fasern.

0	0	1	2	1	1	2	1	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
0	0	1	1			0	0	0	2
0	2	0	1			0	0	1	0
0	2	2	0	0	0	0	2	0	1
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	3	0	1	0	2	0	0
1	1	0	1	0	0	0	1	0	0

Abb. 3.3.3 b

Densitymap für CGRP-positive Nervenfasern am 15. postop. Tag,
Kantenlänge eines Feldes 10 µm, Zählung bei 1000-facher Vergrößerung

3.3.4 Kontrolle

In der Kontrollgruppe (Markraum) fanden sich lediglich drei CGRP-positive Nervenfasern:

0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
0	1	0	0			0	0	0	0
0	0	0	0		1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Abb. 3.3.4

Densitymap für CGRP-positive Nervenfasern am Tag der Operation,
Kantenlänge eines Feldes 10 μm , Zählung bei 1000-facher Vergrößerung

3.3.5 Längenberechnung von Nervenfasern (nach Underwood):

CGRP und neuropeptidpositive Nervenfasern	Markraum	Interfragmentärer Spalt
Tag 5	11 mm/mm ³	
Tag 10	19 mm/mm ³	
Tag 15	126 mm/mm ³	54 mm/mm ³
Kontrolle	4,3 mm/mm ³	

3.4 Vorkommen und Lokalisation von CGRP – aktuelle Literatur

Ergebnisse der Literaturrecherche über Vorkommen und Verteilung von CGRP-positiven Nervenfasern - in unterschiedlichen Spezies und verschiedenen Geweben - sind im Folgenden tabellarisch zusammengefaßt:

Gewebe	Spezies	Zellen/ Nerven	Rezeptoren/ Interaktionen Wirkung/ Konzentration	Literatur
Knochen	Ratte	Nervenfasern	Vorkommen in jeder Region des Knochens und im umliegenden Weichgewebe, größte Konzentration in der Epiphysenregion, Fasern sensorischen Ursprungs	Bjurholm et al., 1988, 1991 Hukkanen et al., 1993
Knochen	Ratte (in vitro)		Dosisabhängige Osteogenesestimulation durch CGRP	Bernard et al., 1990
Knochen	Ratte (fetal, in vitro)		Reversible und dosisabhängige Inhibition einer PTH- und Vit.D ₃ -stimulierten Calciummobilisation	D'Souza et al. 1986
Knochen	Kaninchen, Ratte, Mensch (in vivo und in vitro)	Osteoklasten	Hemmung der osteoklastischen Knochenresorption, dadurch Senkung des Plasmacalciumspiegels (Hypocalcämie); die wesentlich höheren Dosen, die für diesen Effekt im Vergleich zu CT aufgewendet werden müssen, lassen sich evtl. durch eine Wirkung des CGRP über den CT-Rezeptor erklären.	Zaidi et al., 1987 D'Souza et al., 1986
Knochen	Kaninchen, Schwein	Osteoklasten	In sehr hohen Dosen erzeugt CGRP eine Hypercalcämie; wahrscheinlich ist dieser PTH-ähnliche Effekt auf eine gesteigerte Osteoblastenaktivität zurückzuführen, die wiederum die osteoklastische Knochen-resorption moduliert.	Zaidi et al., 1987

Gewebe	Spezies	Zellen/ Nerven	Rezeptoren/ Interaktionen Wirkung/ Konzentration	Literatur
Knochen	Neu- geborenes Huhn, Ratte	Osteoblasten	Stimulierung der cAMP-Produktion durch das Peptid	Michelangeli et al., 1989
Tumor, Osteosarkom	Ratte	Osteoblasten(in vitro)	Spezifischer CGRP-Rezeptor, an die Adenylatcyclase gekoppelt, unabhängig von Calcitonin	Zaidi et al., 1990
Tumor, Osteosarkom	Ratte	Osteoblasten(in vitro)	Spezifischer CGRP-Rezeptor; Stimulierung der cAMP-Produktion durch das Peptid	Bjurholm et al., 1992
Tumor des Schädel- knochens	Maus	Osteoblasten (in vitro)	Spezifischer CGRP-Rezeptor; Stimulierung der cAMP-Produktion durch das Peptid	Bjurholm et al., 1992
Periost nach Fraktur	Ratte	Sensorische Nervenfasern	Die Anzahl CGRP-haltiger Nerven nimmt die ersten drei Wochen nach der Fraktur kontinuierlich zu.	Hukkanen et al., 1993
Kallusgewebe nach Fraktur	Ratte	Sensorische Nervenfasern	Nur in der ersten Woche nach der Fraktur finden sich im mittleren Kallusbereich CGRP-haltige Fasern.	Hukkanen et al., 1993
Heterotoper Knochen	Ratte	Nervenfasern	CGRP-Fasern, reichliches Vorkom-men v.a. um chondroblastische Zellen	Bjurholm et al., 1991

4. Diskussion

4.1 Distanzosteosynthesemodell

Fragestellungen zur Pathophysiologie der Wachstumsdynamik sind häufig Inhalt von Studien zur Frakturheilung. Mittels Distanzosteosynthesemodellen können grundlegende Prozesse der Osteoneogenese weiter erforscht werden. Entsprechende Analysen hierzu erfordern allerdings ein ausreichend großes interfragmentäres Gewebavolumen. Im Rahmen dieser Arbeit wird ein Distanzosteosynthesemodell beschrieben und anhand analytischer Daten seine Bedeutung als weiterführende Alternative demonstriert: im Gegensatz zu bisher verwendeten Tiermodellen liefert dieses Modell erstmals ausreichend interfragmentäres Gewebe für die histologische, biochemische und immunocytochemische Analyse.

Unsere experimentellen Untersuchungen am Distanzosteosynthesemodell der Kaninchentibia umfassten:

- Mikroskopische Analyse der Morphologie von Hämatom, Fibringerüst, Granulationsgewebe während unterschiedlicher Phasen der Frakturheilung
- Immunocytochemische Darstellung neuropeptidpositiver Fasern
- Mikroskopische qualitative und quantitative Analyse der Morphologie neuropeptidpositiver Fasern.

Die Arbeitsgruppen von Aro und Hukkanen, die immunocytochemische Phänomene im interfragmentären Spalt untersuchten, arbeiteten vorwiegend an Rattenmodellen. Über eine Inzision am Ligamentum patellae führte man intramedullär Pindrähle oder Kanülen ein und frakturierte dann die so geschiente Rattentibia. Aus diesem Vorgehen resultierte allerdings, daß die nachgewiesenen Phänomene sich weniger auf den interfragmentären Raum, als vielmehr auf angrenzende Gewebe bezogen. Generell ließ sich an solchen Modellen der Rattentibia also nur sehr wenig interfragmentärer Raum

analysieren. Dadurch war z.B. die Ausbildung von Mineralisations- oder Bindegewebszentren nur schwer nachweisbar (Aro et al. 1985, Hukkanen et al. 1993, 1995).

Der relativ weite Osteotomiespalt unseres Versuchsmodells hingegen erlaubt eine detaillierte mikroskopische Analyse in unterschiedlichen Bereichen des Gewebes. Mit guter Vaskularität, hohen Knochenappositionsraten sowie schneller Zellproliferation und -differenzierung ist der Kaninchenknochen darüberhinaus vor allem für kurze Untersuchungszeiträume und für Fragestellungen, welche die Frühphase der Knochenheilung betreffen, prädestiniert. Das Distanz-osteosynthesemodell der Kaninchentibia kann Basis sein für weitere Untersuchungen auf dem Gebiet von Licht- und Elektronenmikroskopie, Immunocytochemie, Biomechanik und Mikrozirkulation im Frakturspalt. Vorteilhaft ist auch die Möglichkeit einer guten Beurteilbarkeit des Markraumes als Produktionsstätte der Precursorzellen. Auch Zelldifferenzierung und neue zellspezifische Funktionen (z.B. Kapillarneubildung und Osteoidproduktion) sind besser erkennbar. In unseren Untersuchungen ist es gelungen, mit dem neuen Modell unterschiedliche Zellarten zu verschiedenen Zeitpunkten darzustellen, d.h. insbesondere deren Proliferation und Differenzierung. Außerdem konnten wir die Ausbildung von Gewebestrukturen im Frakturhämatom und im Granulationsgewebe im zeitlichen Verlauf zeigen.

Die erhaltenen analytischen Daten erlaubten die Definition einzelner Phasen in der Frakturheilung:

Zerfallsphase	<ul style="list-style-type: none"> • Schollig zerfallende Erythrozyten mit vereinzelt Leukozyten mit oder ohne Einwanderung von Phagen • Beginn der Fibrinnetzbildung
Immigrationsphase	<ul style="list-style-type: none"> • Immigration von Precursorzellen • Verstärkung der Fibrinseptierung • Mitosen, Apoptosen • Fettzellen im Randbereich
Differenzierungsphase	<ul style="list-style-type: none"> • Immigration von Precursorzellen • Differenzierung von Precursorzellen zu Fettzellen • Zelldifferenzierung zu Fibroblasten, Angioblasten, Osteoblasten, Chondroblasten, Perizyten • Beginn der Bindegewebsneubildung • Erste Kapillarbildungen
Produktionsphase	<ul style="list-style-type: none"> • Rückgang der Immigration von Precursorzellen • Vermehrung der Grundsubstanz • Weitere Zelldifferenzierung • Entstehung von Ossifikationszentren

4.2 Osteoneogenese

Das Distanzosteosynthesemodell der Kaninchentibia schafft eine neue Basis für morphologische Untersuchungen der Osteoneogenese. In den Gewebeblöcken, die uns durch das Kaninchenmodell zur Verfügung standen, zeigten sich in den verschiedenen postoperativen Phasen (Abstand jeweils fünf Tage) eine Fülle histologisch-morphologischer Erscheinungsbilder von bisher nicht beschriebenen Phänomenen der Osteoneogenese.

4.2.1 Interfragmentärer Raum und kortikales Fragment

Interfragmentärer Raum am 5. postoperativen Tag:

Das Anfangsstadium des interfragmentären Hämatoms zeigt uns in den histologischen Bildern entweder eine gleichmäßige, eine diffus unterschiedliche oder eine bereits netzförmige Ansammlung von Erythrozyten. Gehen wir davon aus, daß Wundheilungsstörungen, wie sie in anderen Gewebearten in dieser Phase bereits beschrieben wurden (Sedlarik 1993), auch bei der Heilung des Knochengewebes in dieser Frühphase der Osteoneogenese auftreten können, so ist hier sicherlich ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen vorhanden.

Die Morphologie des unterschiedlichen Verteilungsmusters der Erythrozyten bis zur Netzbildung interpretieren wir als Fibrinwirkung auf schollig zerfallende Erythrozyten und der daraus resultierenden Retraktion. Fibrinnetze fixieren die Erythrozyten und lassen weitere kräftigere Netzstrukturen entstehen. In den Zwischenräumen befindet sich fibrinfreies Plasma. Zu diskutieren ist, ob ein gestörter Retraktionsvorgang – infolge Veränderungen der Kaskade der Blutgerinnung - nicht bereits einen „Grundstein“ für eine pathologische Veränderung der Osteoneogenese darstellt, die erst später als verzögerte Frakturheilung oder Pseudarthrosenbildung imponiert. Die beobachtete Anisotropie der Fibrinnetze (ovaläre Netzstrukturen) wäre ein weiterer

Diskussionspunkt. Möglicherweise ist die Ausbildung von Fibrinnetzen durch Bewegungen getriggert (Sedlarik 1993).

Weiterhin ist zu überlegen, ob die in unseren Bildern sichtbaren Fibrinsäulen nicht sogar Wege und Richtung der Immigration von Precursorzellen bestimmen. Auch hier kann ein gestörter Ablauf u.U. zur veränderten Osteoneogenese führen. Später einwandernde Precursorzellen könnten während ihrer Immigration durch unterschiedliche Reize am Fibrinnetz zur anschließenden Zelldifferenzierung angeregt werden. Osteoklasten, Angioblasten, Fibroblasten, Myofibroblasten, oder Perizyten könnten so entstehen.

Kortikaler Fragmentbereich am 5. postoperativen Tag:

In dem an den Frakturspalt angrenzenden Knochenfragment führt die Unterbrechung der Blutzufuhr zu Ischämie und Zelltod. Das Ausmaß korreliert mit der Anzahl ischämischer Areale, die aus dem Sistieren der intrakortikalen Blutversorgung und der Zerstörung des medullären und periostalen Kapillarsystems resultieren. Das Gewebe ist hypoxisch, es kommt zur zunehmenden Exsudation von Blutflüssigkeit. Mediatoren und vasoaktive Substanzen werden freigesetzt, die auf hämatogene und histiogene Zellen wirken; Mastzellen degranulieren. Durch den Untergang einzelner Osteozyten werden lysosomale Enzyme frei, die kollagene und nichtkollagene Matrix zerstören. Der Abbau von Proteoglykanen und Fasereiweiß beginnt.

Interfragmentärer Raum am 10. postoperativen Tag:

Bereits ab dem fünften und vermehrt am 10. postoperativen Tag sind einwandernde Precursorzellen sichtbar. Vereinzelt lassen sich Gefäßsinusoide feststellen. Wir nehmen an, daß die ab dem fünften Tag beobachtete Abnahme phagozytischer Zellen zugunsten einer beginnenden Fibroblasten-differenzierung geschieht. Das Fibrinnetz

verfestigt sich vermehrt zu Fibrinsäulen und erlaubt die Immigration weiterer Precursorzellen aus dem Endost und aus der Kambiumschicht des Periosts. Nach Beufu et al. (1979) besteht die Zellpopulation der frühen inflammatorischen Phase neben Makrophagen, Leukozyten und Mastzellen aus Osteoklasten. Die Entwicklung eines neuen Kapillarsystems wird durch ringförmige Gruppierung von Angioblasten und ausgebildete Sinusoide sichtbar. Dies kann Impuls sein für ein afferentes und efferentes, arterielles und venöses Gefäßsystem des Knochens. Möglicherweise ist dieser Regelmechanismus nur in hypoxämischen Arealen auslösbar.

Obwohl die ernährende Arterie normalerweise den diaphysären Kortex und das Knochenmark langer Röhrenknochen versorgt, können bei Bedarf periostale und metaphysäre Arterien ersatzweise einen suffizienten kollateralen Blutkreislauf aufrechterhalten und somit die Funktion des eigentlichen Gefäßes übernehmen (Brookes und William 1998). Der venöse Abfluß des Markraums geschieht hauptsächlich durch den Zusammenfluß zahlreicher kleinerer Sinusoide in den zentralen Sinus des diaphysären Markraums. Die venösen Sinus kommunizieren direkt mit extraossären Venen. Die kortikalen Kapillaren hingegen stehen in Verbindung mit Kapillaren des Periosts, und die venöse Drainage findet somit Anschluß an periostale und intramuskuläre Venen.

Interessant erscheinen uns die Ergebnisse der Ischämieversuche von Brookes und Revell (1998) im Markraum der Diaphyse von Femur und Tibia, die mit unseren Beobachtungen korrelieren. Die sich der Ischämie oder dem Trauma anschließende reaktive Phase zeigte dilatierte Gefäße im Markraum und zahlreiche aktive zelluläre Elemente, diffus verteilt. Als Reaktion auf das stattgefunden Trauma waren Myelozyten, Fibroblasten und mehrkernige Riesenzellen vermehrt vorhanden. Mit Beginn der reparativen Phase entstanden vermehrt Sinusoide.

Kortikaler Fragmentbereich am 10. postoperativen Tag:

Das Internal Remodeling stellt im angrenzenden kortikalen Knochen des interfragmentären Spaltes das Haverssche System wieder her. Während der

Frakturheilung bietet ein verdicktes Periost zusammen mit dem Weichgewebe-mantel, der die verletzte Stelle umgibt, einen Schutz vor zu großer Bewegung. Ein Zerreißen von Fibrinstrukturen und kleineren Gefäßneubildungen wird dadurch vermieden. Aktivierte Osteone, bestehend aus Osteoklasten mit Osteoblasten-mantel, produzieren zelluläre Matrix. Haverssches System und Volkmannsche Kanäle entstehen daraus in neuer Form.

Interfragmentärer Raum am 15. postoperativen Tag:

In den histologischen Schnitten vom 15. postoperativen Tag finden sich alle Phänomene der Osteoinduktion. Osteoinduktion bezeichnet die Proliferation und die Differenzierung pluripotenter, mesenchymaler Zellen (z.B. Precursorzellen) zu spezifischen Zellen im Knochen (z.B. Osteoblasten, Chondroblasten, Fibroblasten, Angioblasten). Dies ist einem Regelmechanismus lokaler Faktoren unterworfen (Urist et al. 1965, 1983). Polymorphkernige und mononukleäre Zellen, Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Thrombozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen produzieren Wachstumsfaktoren (Sevitt 1981, Schweiberer und Wolf 1992).

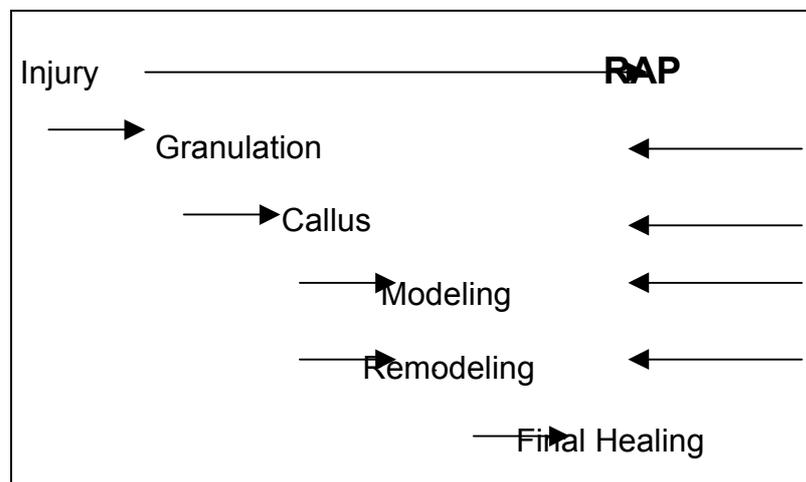
Kortikaler Fragmentbereich am 15. postoperativen Tag:

In dem konduktiven Knochenareal ließen sich am 15. postoperativen Tag mit Hilfe der immunocytochemischen Technik neuropeptidpositive Nervenfasern darstellen. In den Randgebieten kortikaler Fragmente unseres Distanzosteosynthesemodells ist die Morphologie der Osteokonduktion dargestellt. Osteokonduktion ist definiert als die Auffüllung eines interfragmentären Raumes durch Knochen- und Grundsubstanz, ausgehend von vitalen Knochenoberflächen.

4.2.2 Faktoren der Osteoneogenese

Die Frakturheilung wird durch Aktivierung oder Induktion lokaler und blutgebundener Zellen gestartet, die im Verlauf proliferieren und interagieren. Die Theorie des RAP (Regional Acceleratory Phenomenon) wurde zur Erklärung des komplexen Netzwerks regulativer Kontrollmechanismen der Frakturheilung entwickelt. Sie besagt, daß Knochenheilung durch eine Abfolge von untereinander vergesellschafteten zellulären Ereignissen stattfindet, welche durch orts-gebundene und blutgebundene Proteine gesteuert werden.

Frost stellte dies in Form einer Kaskade dar:



(Theorie des Regionalen Accelerations Phänomen, Frost 1988)

Osteogenine sind Proteine oder Proteinkomplexe, die aus demineralisierten Knochen isoliert werden. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe induktiver Faktoren ist das Bone morphogenetic protein (BMP). Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, daß BMP möglicherweise ortsständige Zellen aktivieren und so die Frakturheilung beschleunigen kann. Eine intramuskuläre Implantation BMP-reicher Matrix hat zur de-novo-Knochensynthese im Weichgewebe in Abwesenheit von Knochenmaterial geführt. BMP wurde aus demineralisierten Knochen von Kaninchen, Rindern und Menschen

isoliert. Ein aus BMP isoliertes Peptid mit einem vergleichsweise niedrigen Molekulargewicht besitzt ebenfalls osteoinduktive Eigenschaften (Sampath et al. 1987).

Zellkulturuntersuchungen zeigten, daß BMP die DNA-Synthese und Zellerneuerung in fetalen Fibroblasten der Ratte stimuliert. Diese Beobachtung trifft jedoch lediglich auf periostale Knochenanteile zu, da hier undifferenzierte Zellpopulationen ruhen (Canalis et al. 1985). Lokale, systemisch-mitogenetische, chemotaktische und sekretorische Effekte auf bereits an der verletzten Stelle vorhandene Zellen werden Proteinkomplexen zugeschrieben.

Osteoinduktion beinhaltet die Transformation pluripotenter mesenchymaler Zellen in knochenbildende Zellen mit Hilfe von chemischen, humoralen und physikalischen Signalen. Im Gegensatz dazu bezieht sich Osteokonduktion auf das Einsprossen von kapillären Gefäßen und die Einwanderung von Osteoprogenitorzellen in den Frakturspalt, ausgehend vom umgebenden Knochengewebe.

In folgender Übersicht (Simmons 1985) sind mögliche Funktionen von Proteinen und Wachstumsfaktoren bei der Frakturheilung dargestellt; besonders berücksichtigt sind Vaskularität, Kallus- und Knochenformation.

Vaskularität

- Plasmafibronektin
- Macrophage-derived growth factor
- Kollagenformation
- Mitosestimulation von Osteozyten

Kallusformation

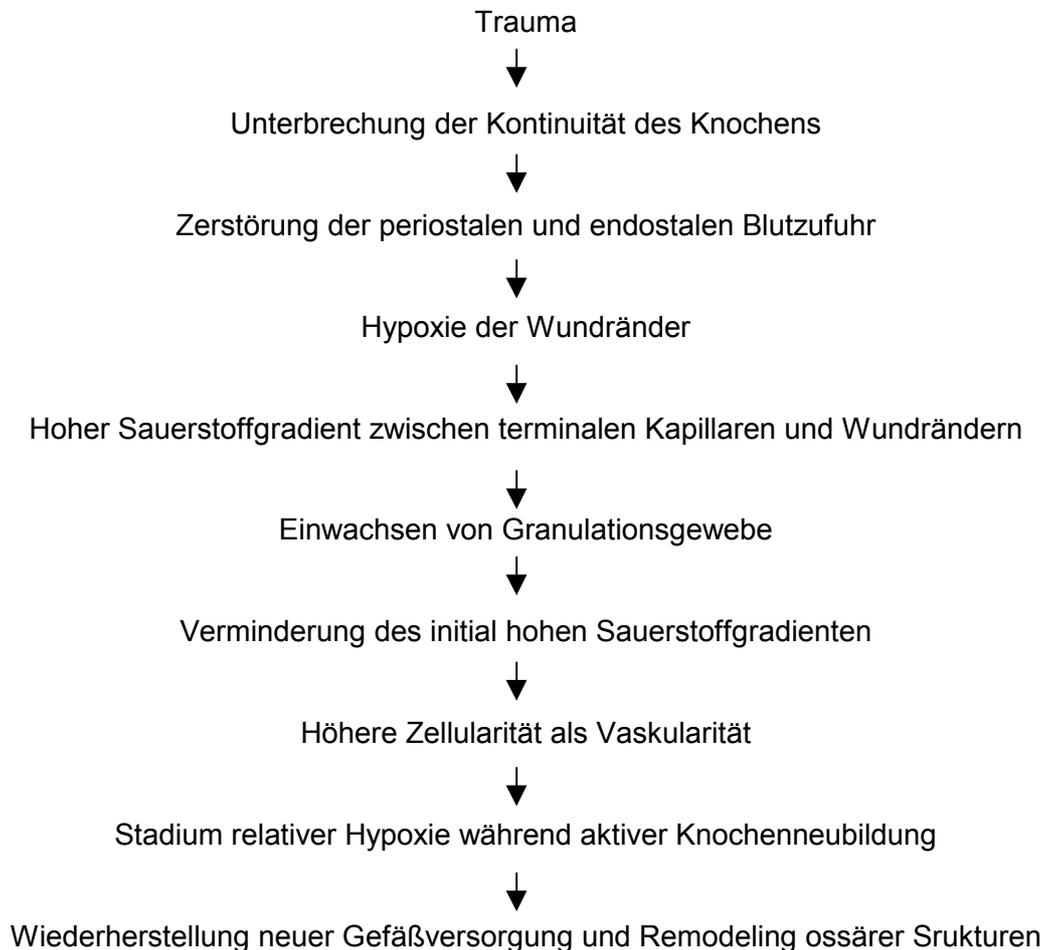
- Platelet-derived growth factor
- Epidermalcell growth factor
- Insulin-like growth factor
- Transforming growth factor β
- Cartilage growth factor I
- Bone growth factors I, II, III
- Osteoclast activating factor
- Aktiviert Monozyten und unterstützt die Knochenresorption
- Verhindert Typ I-Kollagensynthese
- Fördert Chondrozytenproliferation, chondrozytäre Proteoglycansynthese
- Wirkt mitogenetisch auf Knochenzellen
- Wirkt mitosestimulierend auf Knorpelzellen im Kallus
- Stimulieren Typ I-Kollagensynthese
- Stimuliert die Entwicklung resorptiver Ultrastrukturen in Osteoklasten

Knochenformation

- Epidermalcell growth factor
- Fibroblast growth factor
- Insulin
- Interleukin I
- Fördert die Knochenresorption
- Unterstützt in hohen Dosen die Knochenresorption
- Wirkt synergistisch mit Bone growth protein
- Fördert die Fibroblastenproliferation, die Kollagenase- und Prostaglandinproduktion

Auch die biophysikalischen Elemente Sauerstoffspannung und bioelektrische Potentiale sind wichtige Faktoren der Knochenheilung. Eine hypothetische Folge von Ereignissen

im Rahmen der Frakturheilung in Bezug auf die Sauerstoff-versorgung ist im Folgenden dargestellt (Heppenstall et al. 1975):



Das Frakturhämatom hat einen niedrigeren pH als das Serum, die Laktat-produktion nimmt konstant zu und findet ihren vorläufigen Höhepunkt während der metabolisch aktiven Phase der Bildung des weichen Kallus (Brighton 1984). Knochen- und Knorpelzellen folgen einem vornehmlich anaeroben metabolischen Weg. Studien zufolge setzen hypertrophierte Chondrozyten gespeichertes Calcium aus den Mitochondrien frei, wenn das gesamte für den anaeroben Stoffwechsel verfügbare Glycogen aufgebraucht ist. Freigesetztes Calcium hilft bei der Nucleation und Mineralisation der umgebenden Matrix. Trotz des gesteigerten Blutflusses ist die

Sauerstoffspannung im Frakturhämatom eher niedrig (Heppenstall et al. 1975). Gesteigerter Blutfluß, gleichbleibender Sauerstoffverbrauch und niedriger Sauerstoffpartialdruck widersprechen sich bei erster Betrachtung. Wenn man aber berücksichtigt, daß die Zunahme von Zellen durch Proliferation und Neubildung im Hämatom die Zahl neugebildeter Kapillaren und Blutgefäße übersteigt, ist eine relative Hypoxie die Folge.

Wolffs Gesetz - bereits Ende des 19. Jahrhunderts veröffentlicht - besagt, daß der Knochen mechanische Beanspruchungen durch Strukturumbau reflektiert (Wolff et al. 1892). Im Experiment können veränderte bioelektrische Potentiale im Knochen die Osteoneogenese beeinflussen und so möglicherweise Zellaktivitäten steuern (Friedenberg et al. 1966). Studien zufolge findet sich in elektropositiven Regionen vor allem osteoklastische Aktivität, während Elektronegativität mit vermehrt osteoblastischer Tätigkeit verbunden ist. Bei einer frischen Faktur werden im Kallus zunächst negative Potentiale abgeleitet, die sich im Laufe der Knochenheilung ausgleichen. Diese Beobachtungen konnten experimentell reproduziert werden und unterstützen die These, daß aktiver Knochenumbau und Knochenheilung vorwiegend elektronegative Prozesse sind. Klinische Relevanz haben diese Ergebnisse unter anderem bei der Behandlung von Pseudarthrosen.

Zugkraft, Scherkraft und Torsion stellen die wesentlichen Beanspruchungen dar, denen der gesunde Knochen standhalten muß. Während des Heilungsprozesses regeneriert sich der verletzte Knochen stetig und erlangt so die nötige Stärke und Festigkeit, um zunächst kleineren und später größeren mechanischen Anforderungen standzuhalten (Davy et al. 1982).

In den beiden folgenden Tabellen sind Faktoren dargestellt, die bei der Bildung von Pseudarthrosen Bedeutung haben (aus: Cohen et al.: Wound Healing. Biochemical and Clinical Aspects, Saunders, 1992).

Systemische Faktoren, die Knochenheilung negativ beeinflussen:

Kortikosteroide
Vitamin A (hochdosiert)
Vitamin D (hochdosiert)
Anämie
Rachitis
Denervierung
Antikoagulanzen

Lokale Faktoren, die zu verzögerter Knochenheilung führen:

Lokalisation
Weichgewebeverletzung
Knochenverlust
Unzureichende Ruhigstellung
Infektion
Bestrahlung
Pathologische Frakturen
Gestörte Vaskularität an der
Frakturstelle

Knochenzellen werden indirekt von unterschiedlichen systemischen regulativen Faktoren kontrolliert. Sie werden aber auch direkt von Wachstumsfaktoren und Zytokinen der Knochenmatrix beeinflusst, die das Maß an Knochenresorption und Knochenneubildung regulieren. Veränderungen in übergeordneten Kontrollzentren haben meist weitreichende Folgen.

4.2.3 Biomechanik als Regelmechanismus der Osteoneogenese

Wo die Umsetzung biomechanischer Beanspruchung stattfindet sind CGRP-haltige Nervenfasern präsent; sie kommen in jeder Region des Knochens und des umliegenden Weichgewebes vor. Für eine Reaktion des Knochengewebes auf mechanische Beanspruchung ist die Größe der einwirkenden Kraft maßgebend. Die Knochenappositionsrate steht in direktem Verhältnis zur einwirkenden Spannung. Höhere Beanspruchung hat eine Verfestigung von Knochengewebe zur Folge. Wird der obere Grenzwert der applizierten Kraft überschritten, überwiegt der Knochenabbau. Dies bedeutet für unsere experimentellen Überlegungen, daß der Umfang der Knochenapposition Spiegelbild der Spannungsgrößen ist.

Mediatoren, die aufgrund von mechanischen Reizen entstehen, lassen sich meßtechnisch erfassen. Die direkte Umsetzung biomechanischer Impulse führt zur Freisetzung von Mediatoren und damit zur Osteoneogenese (Brighton 1996).

Pauwels (1973) stellte zwei unterschiedliche Qualitäten mechanischer Reize dar, die einen spezifischen Einfluß auf die Differenzierung pluripotenter Mutterzellen im Stützgewebe haben: die Gestaltsverzerrung und die Volumenänderung. Hierbei handelt es sich um die Umsetzung eines extrazellulären mechanischen Signals in eine intrazelluläre Antwort.

Voraussetzung für die Bildung von Granulationsgewebe in der frühen Phase der Frakturheilung und verantwortlich für das Einwachsen von Gefäßen und Nervenfasern sind folgende Beobachtungen von Pauwels:

Dehnung stellt einen mechanischen Reiz für die Bildung von kollagenen Fibrillen d.h. von Bindegewebe dar, gleichgültig ob sie durch Druck oder Schubbeanspruchung bedingt ist. Voraussetzung ist dabei ein Körper aus elastischem Material, dessen kleinste Elementarteilchen im unbelasteten Zustand kugelförmig sind. Unter Druckbeanspruchung werden diese zu Ellipsoiden verformt, und ihr Durchmesser

in der zum Druck senkrechten Ebene vergrößert. Bei Zug erfolgt eine Dehnung in Zugrichtung, bei Schub senkrecht dazu.

Für die Innervation und die Ausbildung neuropeptidpositiver Fasern im neugebildeten Granulationsgewebe bedeutet dies, daß Dehnung die Fibroblasten zur Kollagenbildung veranlaßt und so Leitschienen entstehen für einwachsende Nervenfasern.

Knochengewebe kann sich aus entsprechend befähigten Zellen nur an Stellen bilden, die ein ruhigstehendes präformiertes Gerüst aus Fibrillen oder verkalkten Knorpelgrundsubstanzbälkchen vor intermittierender Verzerrung schützt. Für die Bildung von Knochengewebe gibt es keinen spezifisch mechanischen Reiz. Von praktischer Bedeutung ist die Tatsache, daß bei gleicher Krafteinwirkung die Dehnung durch Schub etwa 30 % größer ist als die Dehnung durch Zug.

4.3 Innervation

4.3.1 Immunocytochemischer Nachweis der Nervenfasern im interfragmentären Raum

Die Frage nach der Existenz von neuropeptidpositiven Fasern in der Frühphase der Osteoneogenese im interfragmentären Spalt läßt sich in unseren Untersuchungen bereits am 15. postoperativen Tag durch einen positiven Befund eindeutig beantworten. Die Nervenfasern sind ausnahmslos um Blutgefäße gelagert, so daß das Zentrum des im Versuch angewandten Meßrasters in das Gefäßzentrum plaziert werden kann. Die morphometrische Methode der Addition der Trefferpunkte in ein Gesamt-Meßraster erweist sich als empfehlenswert, da sie einer Addition von Farbflächen – z.B. mit Hilfe eines Bildanalyzesystems - in jedem Falle überlegen scheint. Neben einer CGRP-Wirkung über Zellrezeptoren des Osteoblasten bleibt zu diskutieren, ob nicht auch ein CGRP-Regelmechanismus für Precursorzellen besteht, der diese Zellen zur Proliferation und Differenzierung anregt.

Wichtig erscheint uns auch die Beobachtung, daß der einsprossende Nerv immer in Nachbarschaft zu einem Gefäß liegt. Damit läßt sich belegen, daß er einem konduktiven Weg im interfragmentären Raum und dem Gefäßverlauf folgt.

Die in den unterschiedlichen Zeitphasen - gemäß der stereologischen Berechnung nach Underwood - beobachtete Verlängerung der Nervenfasern läßt sich als regionales Accellerationsphänomen deuten. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang auch die rasche Zunahme der Nervenfasernlänge im interfragmentären Raum, die jedoch die Werte des Markraumes nicht erreicht. Dies betrifft - möglicherweise als Regelmechanismus - Precursorzellen, Osteoblasten und Angioblasten gleichermaßen.

4.4 CGRP in der internationalen Literatur

In der Literatur ist die Wirkung von CGRP mittlerweile vielfältig dokumentiert. Aus dem umfangreichen Material sind im Folgenden Daten und Fakten aufgeführt, die im Zusammenhang mit der von uns bearbeiteten Thematik von besonderem Interesse sind.

Der prägnanteste und am häufigsten beschriebene Effekt des CGRP ist die potente vasodilatatorische Wirkung (Brain et al. 1985). Perivaskuläre afferente CGRP-positive Nervenfasern finden sich in allen Bereichen des Körpers in Intima und Media der Gefäßwand. Insbesondere die dilatierende Wirkung auf Koronargefäße und auf die cerebrale Blutversorgung scheint erwähnenswert. Eine CGRP-Injektion im Femtomolbereich löst eine stundenlange Dilatation hautnaher Kapillaren aus und führt infolge der Gefäßdilatation zu Hypotension. An isolierten Knochenarterien konnten Lundgaard et al. (1997) zeigen, daß CGRP konzentrationsabhängig vasorelaxierend wirkt. Auch bei wiederholter Stimulation der Arterien fand sich keine verminderte CGRP-vermittelte Wirkung. Die Beobachtung, daß selbst nach Entfernen der Endothelschicht der Gefäße immer noch eine signifikante Vasodilatation durch CGRP erfolgt, läßt auf eine endothelunabhängige Wirkweise des Neuropeptids schließen.

Die Modulation des Gefäßwiderstandes ist nur ein Teilaspekt der umfangreichen Bedeutung von Neuropeptiden im Knochen. Wie aus früheren Studien von Bjurholm et al. (1988) hervorgeht, sind Neuropeptide dort zahlreich vorhanden, wo hohe Knochenstoffwechselraten zu verzeichnen sind. Außerdem sind sie häufig in unmittelbarer Nähe von Blutgefäßen konzentriert.

Madsen et al. (1996, 2000) haben an Ratten das Einwachsen von Nervenfasern in ein Spantransplantat gezeigt. Das insgesamt abgeschlossene und nur an bestimmten Stellen offene Knochenkammermodell diente der Arbeitsgruppe als Basis für immunocytochemische und histologische Untersuchungen. Nach 6 Wochen wurden die Versuchstiere anaesthetisiert, in vivo fixiert und die Verteilungsmuster von CGRP, Substance P und Neuropeptide Y ermittelt. Es fand sich quantitativ keine Korrelation

zwischen der Dichte der eingewachsenen Nervenfasern und der Menge an neugebildetem Knochen.

CGRP hat einen proliferativen Effekt auf menschliche Endothelzellen und spielt deshalb eine wesentliche Rolle bei der Formation neuer Blutgefäße, bei der Wundheilung und bei Entzündungen (Haegerstrand et al. 1990). CGRP beeinflusst die Regulation von lokalem Blutfluß, Muskelspannung und sekretorischer Drüsenfunktion. Gleichzeitig kann es die Freisetzung zahlreicher Hormone hemmen.

Onuoha et al. (2000) konnten in einer Patientenstudie über Hüftkopffrakturen nachweisen, daß die laborchemisch vor Beginn der Therapie gemessenen CGRP-Konzentrationen im Blut initial signifikant erhöht waren und auch noch 24 Stunden später im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erhöht blieben. CGRP potenziert möglicherweise die Freisetzung von SP aus afferenten Nervenendigungen und vermittelt so die Übertragung nozizeptiver Informationen als Antwort auf externe Schmerzreize.

In einer experimentellen Studie an Ratten konnten Hukkanen et al. (1995) erst nach 4 bis 8 Wochen einzelne Nervenfasern in der Nähe des neugebildeten Knochens nachweisen. Bei dem verwendeten Modell wurde eine in die proximale Tibia implantierte Titankammer mit Hämatom aufgefüllt. Das Periost hat hierbei keinen Kontakt mit neugebildetem Knochen; deshalb kann man annehmen, daß alle einwachsenden Nervenendigungen von kortikalem Knochen, Endost oder Knochenmark stammen. Verschiedene Autoren konnten in unterschiedlichen experimentellen Untersuchungen Neuropeptide bereits zu einem früheren Zeitpunkt der Frakturheilung nachweisen; dies läßt vermuten, daß das Einsprossen von einzelnen Nervenfasern von intaktem Periost abhängig ist (Madsen et al. 2000).

Shih et al. (1997) haben bei in-vitro-Applikation von CGRP in Zellkulturen einen osteogenesestimulierenden Effekt gezeigt, der vermutlich durch Stimulation der Stammzellmitoserate oder gesteigerte Osteoprogenitorzellendifferenzierung zustande kommt. Die Autoren bezweifeln allerdings, daß zirkulierendes CGRP in ausreichend

hoher Konzentration zum Wirkort gelangen kann. Vielmehr wird vermutet, daß es in begrenzten Arealen der Frakturregion ausreichend konzentriert vorhanden ist und so die postulierte lokale Modulation von Stammzellmitoseraten oder Knochenzellfunktionen bewirkt.

Bernard et al. (1990) untersuchten zum einen die Wirkung unterschiedlicher lokaler Dosen von CGRP auf die Knochenkolonieformation, zum anderen den möglichen osteogenese-stimulierenden Effekt einer intravenösen CGRP-Injektion. Es fand sich mit steigenden Dosen CGRP eine signifikante Zunahme sowohl der Anzahl wie auch der Größe der Knochenkolonien. Auch die intravenöse CGRP-Gabe hatte dies zur Folge. Die Zunahme der Kolonienzahl ist wahrscheinlich auf eine Stimulation der Stammzellmitoserate zurückzuführen, die Größenzunahme auf gesteigerte Osteoprogenitorzellendifferenzierung oder höhere Osteoblasten-aktivität.

Die Innervation des Knochens repräsentiert ein hochentwickeltes regulatorisches Element, das sowohl lokale Anforderungen registriert wie auch durch Freisetzung aktiver Neuropeptide den gesamten Knochenstoffwechsel unmittelbar beeinflusst (Bjurholm 1991, Hill et al. 1991, Hukkanen et al. 1995).

Peptiderge periostale Nerven verzweigen sich an der Knochenoberfläche zu Netzwerken. Zahlreicher als im mittleren Teil der Diaphyse sind sie im Bereich der Epiphyse zu finden. Einzelne Fasern und kleinere Äste periostaler Nerven sprossen in den kortikalen Knochen ein und verlaufen mit Blutgefäßen der Volkmanschen Kanäle oder des Harversschen Systems. CGRP-positive Nervenfasern sind in allen 4 Schichten des Periosts nachweisbar (Hukkanen et al. 1992, Hill et al. 1991).

Hukkanen et al. (1993) untersuchten Histologie und Immunocytochemie während der Frakturheilung an 16 Ratten, denen nach Marknagelinsertion experimentell Frakturen zugefügt worden waren. Nach 3 Wochen fanden sich zahlreiche CGRP-positive Nervenfasern im Periost, und zwar sowohl in der Umgebung der Blutgefäße wie auch als freie Nervenendigungen. Zu diesem Zeitpunkt ließen sich keinerlei Neuropeptide in umgebendem Weichgewebe, Kallus oder angrenzendem Markraum nachweisen.

Um die Rolle der nervalen Versorgung in der Frühphase der Frakturheilung genauer zu definieren, haben Aoki et al. (199) an 60 Ratten ossäre Defekte an der Tibia untersucht. Histologisch zeigten sich am 3. Tag nach der Operation im Bereich der Läsion Blutkoagel und spärlich vaskularisiertes fibröses Gewebe, bereits sechs Tage später neugebildeter Knochen und Granulationsgewebe; jetzt waren auch gute vaskuläre Verhältnisse in Periostnähe nachweisbar. Bis zum 15. Tag postop. nahm das Granulationsgewebe an Volumen ab, neuer Knochen hingegen zu. Nach 30 Tagen war die Integrität des neugebildeten Knochens wiederhergestellt. Immunocytochemisch konnten am 6. Tag bereits CGRP- und SP-positive Nervenfasern in Periost und neugebildetem Granulationsgewebe nachgewiesen werden. Nach weiteren 8 Tagen nahm die Zahl der neuropeptidpositiven Fasern im fibrösen Gewebe wieder ab; im Periost - vor allem in der Nähe von Blutgefäßen- waren sie immer noch zahlreich vorhanden.

Die Beobachtung, daß CGRP während der frühen Frakturheilung hauptsächlich in der Nähe von Blutgefäßen zu finden ist, legt den Schluß nahe, daß es durch seine bekannten vasodilatierenden Eigenschaften den Blutfluß in die verletzte Region verstärkt und so die Knochenheilung unterstützt (Aoki et al. 1994).

CGRP reduziert den im Blut gelösten Calcium-Anteil und inhibiert die Knochenresorption. CGRP vermindert die Umwandlung von Makrophagen in osteoklastenähnliche Zellen (Owan und Ibaraki 1994).

Zahlreiche experimentelle Untersuchungen zeigen, daß Neuropeptide neurale Einflüsse auf den Knochen vermitteln. Wie alle regulativen Proteine und Faktoren agieren Neuropeptide über Second-messenger-Systeme und können auch in niedrigen Konzentrationen das Remodeling beeinflussen. Neuropeptide sind in der Lage, die Lücke zwischen systemischen und primär lokalen regulativen Elementen zu füllen (Konttinen et al. 1996).

Der Zyklus des Knochenremodelings beim Menschen dauert Jahre. Er erfordert die Präsenz und sequentielle Aktivierung unterschiedlicher Faktoren und beginnt mit der Differenzierung von Osteoklasten, vermittelt und initiiert von Faktoren, die ihrerseits von Osteoblasten sezerniert werden. Die darauffolgende resorptive Phase dauert etwa 15 Tage. Osteoblasten füllen den entstandenen Defekt mit neuer Matrix. Knochenabbau und -aufbau befinden sich in einer ausgeglichenen Balance.

Wachstumsfaktoren und Zytokine werden von Knochenzellen und Zellen hämatopoetischen Ursprungs sezerniert. Einige dieser Zellen, wie z.B. Insulin-like growth factor und transforming growth factor β , sind in der Knochenmatrix gelagert und werden in ihrer aktiven Form während der osteoklastenvermittelten Knochenresorption sezerniert. Sie stimulieren die Proliferation von Osteoblasten und nehmen am physiologischen Remodeling teil. Insulin-like growth factor I wird von Osteoblasten im Knochengewebe produziert und zeigt anabole Aktivität (de Vernejoul 1996).

Zytokine und Wachstumsfaktoren im Knochengewebe:

Effektor	Knochenresorption	
	Differenzierung	Aktivität
Interleukin 1	+	0
Tumornekrosefaktor α	+	0
Interleukin 6	+	0
γ -Interferon	-	0
Transforming growth factor β	-	0
Bone morphogenetic proteins	+	0
Insulin-like growth factor I	+	0

Effektor	Knochenformation	
	Proliferation	Matrixsynthese
Interleukin 1	+	-
Tumornekrosefaktor α	+	-
Interleukin 6	0	0
γ -Interferon	0	0
Transforming growth factor β	+	+
Bone morphogenetic proteins	+	+
Insulin-like growth factor I	+	+

+ Stimulation - Inhibition 0 Kein Effekt
 (aus: Dynamics of bone remodeling, de Venejoul 1996)

Die Wirkungen von CGRP werden über unterschiedliche Rezeptoren gesteuert. Die Bindung von CGRP an einen Rezeptor führt adenylylacyclasevermittelt zu einem cytoplasmatischen cAMP-Anstieg und so zur Proteinkinaseaktivierung (Roos et al. 1986).

CGRP scheint zusätzlich zur Adenylylacyclase ATP-empfindliche Kalium-Kanäle zu aktivieren, was zu einer Membranhyperpolarisation führt. Die daraus resultierende Inhibierung der Calciumaufnahme - die Funktion der Calcium-Kanäle ist spannungsabhängig - könnte deshalb von zentraler Bedeutung für die beobachtete Muskelzellrelaxation sein (Standen et al. 1989).

Hukkanen et al. (1995) untersuchten an Ratten Effekte der Ischiadicus-durchtrennung, insbesondere den Einfluß auf die Kallusformation. In der Gruppe mit intaktem Nerv war das den Kallus bedeckende proliferierende Periost dicht mit perivaskulären und freien Nervenendigungen durchsetzt. Man geht allgemein davon aus, daß der periostale Kallus aus umgebendem Weichgewebe und Muskulatur kapillar versorgt wird, und eine Unterbrechung dieser Blutzufuhr eine Pseudarthrose zur Folge hat. Deshalb schien es erstaunlich, daß es nach Durchtrennung des N.ischiadicus zu einer ausgeprägten Kallusbildung gekommen war. Eine immunocytochemische Evaluation des nervalen Verteilungsmusters zeigte keine freien CGRP-positiven Nervenendigungen.

In früheren Untersuchungen von Aro et al. (1985) wurde im Gegensatz zu den oben genannten Ergebnissen eine Nervendurchtrennung mit verminderter Kallusformation gleichgesetzt. Wie Hukkanen et al. (1995) zeigen konnten, fanden sich zusätzlich zum N.ischiadicus dicke Nervenstränge, die wahrscheinlich vom N.saphenus stammten. Damit wird deutlich, daß eine Ischiadicusdurchtrennung alleine nicht zur kompletten Denervierung im betroffenen Gebiet führt.

Buma et al. (1995) fanden nach Einbringen eines Implantates in die Tibia von Ziegen Veränderungen in Knochenremodeling und Innervation. Nach initialer Degeneration der endostalen Innervation des Knochens konnten zunehmend proliferierende CGRP-positive Nervenfasern nachgewiesen werden. Vermutlich hängt die Innervation langer Röhrenknochen stark von der zugehörigen Vaskularität ab. Eine endostale Devaskularisation ist immer auch mit zugrundegehender nervaler Versorgung verbunden.

CGRP, SP, VIP und NPY ließen sich bei Ratten aus dem Kniegelenk isolieren. Studien hatten gezeigt, daß die synoviale Membran die Struktur mit dem größten Anteil an neuropeptidpositiven Fasern ist. CGRP- und SP-positive Fasern waren kolokalisiert häufig vor allem in der Epiphyse nachweisbar, außerdem im Knochenmark der Patella, in ligamentären Strukturen und im Periost. Die Annahme, daß Neuropeptide in die Physiologie des Knochens involviert sind, stützt sich auch auf die Beobachtung, daß sie vornehmlich in Regionen mit hoher Knochenstoffwechselrate auftreten (Bjurholm et al. 1991).

Mit Hilfe des Radioimmunessay (RIA) haben Ahmed et al. (1994) versucht, Neuropeptide zu quantifizieren. Durch Immunhistochemie alleine sind bisher nur semiquantitative Aussagen zur Konzentration von Neuropeptiden möglich. Da die Immunhistochemie das morphologische Korrelat zum Radioimmunessay (Ahmed et al. 1994) bietet, wäre eine Kombination der beiden oben genannten Verfahren möglicherweise gut geeignet, um Verteilungsmuster neuropeptidpositiver Nervenfasern unter unterschiedlichen Bedingungen besser beurteilen zu können. In einer Folgestudie extrahierten Ahmed et al. (1994) Knochen, Periost und Knochenmark von insgesamt 30 Ratten. Anschließend wurden für eine Analyse mittels RIA die Probenanteile von jeweils 10 Ratten gepoolt. Meßbare Konzentrationen von CGRP, SP, NPY und VIP fanden sich in allen untersuchten Geweben, generell in Mark und Gewebe die höchsten, im Knochen selbst die geringsten. CGRP war in Periost und Knochenmark ungefähr 6-fach höher konzentriert als im Knochen.

Sensorische und autonome Neuropeptide sind vermutlich an der Regulation des Knochenstoffwechsels beteiligt. Möglicherweise gibt es einen Zusammenhang zwischen einzelnen Krankheitsbildern des Knochens - z.B. degenerative Veränderungen, diabetische Osteopathie, Paget's Disease - und quantifizierbaren Veränderungen der Neuropeptidkonzentrationen. Für die Gruppe sensorischer Neuropeptide nimmt man eine Beteiligung an entzündlichen und immunogenen Mechanismen an. Eine mögliche funktionelle Mittlerfunktion der Neuropeptide zwischen Nervensystem und Immunsystem muß in weiterführenden experimentellen Untersuchungen geklärt werden. CGRP wird eine sensorische Transmitterfunktion bei der Schmerzvermittlung in C- und δ -Fasern zum Schutz der Frakturstelle vor exzessiven Bewegungen zugeschrieben. Es ist unwahrscheinlich, daß im Blut zirkulierendes CGRP in den gemessenen niedrigen Dosen signifikanten Einfluß auf den Knochenstoffwechsel hat; vielmehr wird dies der lokalen Konzentration zuzuschreiben sein, die in bestimmten Frakturregionen vermutlich wesentlich höher ist (Hukkanen et al. 1993).

Die häufig kolokalisierten Neuropeptide CGRP und Substance P werden in sensorischen Neuronen des Hinterstrangs gebildet und nach schnellem axonalen Transport in peripheres Gewebe und Rückenmark transportiert. Hier haben diese regulativen Peptide u.a. vielseitige parakrine Effekte auf ortsständige und Entzündungszellen und sind in die Nozizeption involviert (Gibson et al. 1984).

Zaidi et al. (1990) konnten experimentell bestätigen, daß CGRP nur als komplettes Molekül sein volles Wirkspektrum erreicht und dabei vor allem wohl das N-terminale Ende des Peptids für die Rezeptorinteraktion verantwortlich ist.

Bjurholm et al. (1990) untersuchten das Auftreten neuropeptidpositiver Nervenfasern im Rahmen der Neubildung heterotoper Knochensubstanz und konnten CGRP, SP, VIP und NPY in den Knocheninseln nachweisen. Bereits eine Woche nach Implantation allogener Matrix zeigten sich CGRP-haltige Fasern im fibrösen Gewebe, das die Implantate umgab. Die Anzahl der Nervenfasern nahm im Verlauf der darauffolgenden zwei Wochen stetig zu.

CGRP-haltige Neurone finden sich im Zentralnervensystem vor allem im Hirnstamm, in den Hirnnervenkernen, im Hypothalamus und seinen Projektionsbahnen, in den Basalganglien, in Regionen des limbischen Systems sowie im Cerebellum. Die Lokalisation von CGRP läßt auf bestimmte Wirkungen als Modulator autonomer und visceraler Funktionen, der unwillkürlichen Motorik und des Verhaltens schließen. Spezifische CGRP-Rezeptoren wurden in den Arterien von Cerebrum, Herz, Pia mater, Milz, Leber und Pankreas nachgewiesen. Ebenso fanden sich Rezeptoren auf Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems, auf Osteoblasten und verschiedenen Tumorzelllinien (Bjurholm et al. 1992).

Die intrazelluläre Wirkung des CGRP entfaltet sich über die Adenylatcyclasekaskade. CGRP besitzt einen spezifischen Rezeptor auf Osteoblasten, der an die Adenylatcyclasekaskade gekoppelt ist, und kann die cAMP-Produktion um das 30- bis 50fache steigern (Zaidi et al. 1990).

In der Peripherie erscheint das Peptid einerseits breit gefächert im vegetativen Nervensystem, andererseits in afferenten Nervenfasern an unterschiedlichen Stellen, die teilweise dem vegetativen Nervensystem zuzurechnen sind. So bilden CGRP-positive Fasern die dehnungssensitiven Nervengeflechte im Oesophagus, die gesamte sensible Innervation des Gefäßsystems und das erste Neuron der Schmerzbahn. In sensiblen Ganglien (Rückenmark, Ganglion trigeminale u.a.) enthalten etwa 40% der Neurone den Neurotransmitter CGRP.

5. Ausblick

Ziel der Frakturheilung ist die vollständige Konsolidierung des Defekts, d.h. das Angleichen der inneren und äußeren Struktur des neugebildeten Knochens an unverletzte Knochenabschnitte. Essentiell hierfür ist das geordnete Zusammenspiel multipler Ereignisse und Abläufe - sowohl auf zellulärer wie auch auf biomechanischer und physikalischer Ebene.

Unabhängig von der Art des Knochens und davon, wie der Defekt entstanden ist; folgt die Knochenheilung im allgemeinen immer den gleichen Regeln.

Im Mittelpunkt der frühen Knochenheilung steht der Defektverschluß. Hier spielen Thrombozyten eine wichtige Rolle, da sie den primären Wundverschluß sichern und im zerstörten Gewebe die Entzündungs- und Immunreaktionen durch Freisetzen von Wachstumsfaktoren und Zytokinen kontrollieren.

Die zweite Phase dient der Wiederherstellung biologischer Funktionen; der Zustand des Knochens vor der Verletzung soll erreicht werden. Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Fibroblasten und Angiogenesezellen sind hier von entscheidender Bedeutung. Aus unreifem Geflechtknochen wird reifer lamellärer Knochen.

Ziel des zellulären Umbaus in der letzten Phase der Knochenheilung ist die Adaption an wechselnde biomechanische Beanspruchungen. Diese Adaption findet auch in gesundem unverletzten Knochen kontinuierlich statt. Es besteht eine fortdauernde Interaktion zwischen knochenabbauenden Osteoklasten und knochenaufbauenden Osteoblasten. Die Knochentrabekel arrangieren sich entlang imaginärer Kraftlinien, um den jeweiligen mechanischen Beanspruchungen optimal standhalten zu können.

Grundsätzlich ist die Selbstheilung des Knochens durch die Größe des Defekts limitiert. Meist sind chirurgische Interventionen nötig und die unterschiedlichsten Maßnahmen

unumgänglich. V.a. Knochenersatzmaterialien gewinnen dabei zunehmend an Bedeutung.

Dem Knochenersatz dienen synthetische und teilsynthetische Materialien. Im Gegensatz zu heute eingesetzten bioresorbierbaren Materialien wurden noch vor wenigen Jahren vor allem langzeitstabiles Hydroxyapatit verwendet. Wichtigster Vertreter der derzeit gebräuchlichen resorbierbaren Biokeramiken ist das Tricalciumphosphat (TCP). Vor allem β -TCP scheint geeignet, da es im Gegensatz zu α -TCP vollständig resorbiert wird und so den natürlichen Ablauf der Knochenheilung nicht beeinträchtigt (Foitzik et al. 1999, Merten et al. 2000).

Das beschriebene Distanzosteosynthesemodell dient nicht nur der weiteren differenzierten Analyse der verschiedenen Zellstrukturen bzw. ihrer Funktionen in der Frühphase der Frakturheilung. Unmittelbar im interfragmentären Raum könnten auch orientierende Versuche zu neuen Knochenersatzmaterialien durchgeführt werden.

In jeder Phase der Knochenheilung sollen Knochenersatzmaterialien vielfältigen Anforderungen gerecht werden, insbesondere die Frakturheilung bei der Überbrückung größerer Knochendefekte unterstützen:

Regenerationsphasen	Anforderungen
Frühe Knochenheilung	<ul style="list-style-type: none"> • Biokompatibilität • Osteokonduktivität • Hämostase • Angiogenesestimulation • Porosität • Physikalische Stabilität • Keine Immunstimulation • Keine unphysiologisch hohe Konzentration chemischer Stoffe
Biologische Knochenheilung	<ul style="list-style-type: none"> • Zeitgleiche Resorption • Keine unphysiologischen pH-Werte • Physiologischer Zusatz von Wachstumsfaktoren • Osteoinduktivität
Biologisches Remodeling	<ul style="list-style-type: none"> • Vollständige Resorption • Kein störender Einfluß auf das Remodeling

(aus: "Bone Regeneration", Prospect CERASORB®, Firma Curasan)

β -TCP erfüllt weitgehend oben genannte Kriterien, besitzt jedoch nur Osteokonduktivität, keine Osteoinduktivität, d.h. es kann Knochenneubildung erleichtern, aber nicht initiieren. Osteokonduktion beschreibt einen dreidimensionalen Prozeß, der bei Implantation von porösem Material in den jeweiligen Defektbereich beobachtet werden kann. Kapillaren, perivaskuläres Gewebe und Osteoprogenitorzellen wandern in präformierte Zwischenräume im Knochenersatzmaterial und füllen sie mit

neugebildeten Knochenzellen. Zunächst wächst hier fibrovaskuläres Gewebe, später Knochen (Cornell 1999).

Die schnellere Regeneration des Knochendefekts gewinnt zunehmend an Bedeutung und wird schon jetzt durch die Kombination von β -TCP mit patienteneigenem Thrombozytenkonzentrat (PRP, platelet-rich plasma) - als Quelle von Wachstumsfaktoren - ermöglicht. Die kurzlebigen Wachstumsfaktoren werden erst nach Kontakt des Knochenersatzmaterials mit PRP freigesetzt und können so vor allem die frühe Knochenheilung stimulieren. Verstärkte Angiogenese und zellreiches Gewebe bilden die Basis für eine effektivere Knochenregeneration (Coerper und Köveker 1993).

Grundsätzlich müssen sich die Materialeigenschaften des Knochenersatzmaterials möglichst vollständig mit denjenigen des natürlichen Knochens decken. Materialgefüge, Porosität, Phasenreinheit und entsprechendes Löslichkeitsverhalten sollen bestimmte Anforderungen erfüllen; erst die ideale Kombination dieser Eigenschaften führt zu optimalem Knochenersatzmaterial.

Die Zukunft von Knochenersatzmaterialien liegt in der Entwicklung osteoinduktiver Materialien, die die Knochenneubildung im Defektbereich unabhängig von angrenzenden intakten Knochenabschnitten ermöglichen sollen.

Unser Modell ist geeignet, auch zukünftige Knochenersatzmaterialien auf ihre Validität zu untersuchen.

6. Zusammenfassung

Bisher wird in der Literatur keine standardisierte tierexperimentelle Methode beschrieben, mit der in der Frühphase der Knochenheilung ausreichend interfragmentäres Gewebevolumen für die histologische, biochemische oder immunocytochemische Analyse gewonnen werden kann.

Es wird ein entsprechend variiertes Distanzosteosynthesemodell vorgestellt, das aus dem Frakturbereich der Kaninchentibia ausreichend Gewebe für differenzierte Analysen liefert. Mit guter Vaskularität, hoher Knochenappositionsrate sowie schneller Zellproliferation und –differenzierung scheint der Kaninchenknochen für relativ begrenzte Untersuchungszeiträume und für Fragestellungen zur Frühphase der Knochenheilung besonders geeignet.

Untersuchungen an diesem Modell zum qualitativen und quantitativen Nachweis unterschiedlicher Zellen im interfragmentären Raum zu verschiedenen Zeitpunkten der Frakturheilung werden beschrieben, besonders berücksichtigt dabei neuropeptidpositive Nervenfasern, vor allem das Calcitonin gene-related peptide (CGRP).

Daten und Fakten zu Vorkommen, Verteilung, Struktur, Sequenz und Biochemie des Peptids, wie sie die aktuelle internationale Literatur dokumentiert, ergänzen den experimentellen Teil der Arbeit.

An der Tibia von insgesamt 30 Tieren wurde – in einem standardisierten operativen Verfahren – ein definierter interfragmentärer Raum geschaffen. Nach Ablauf des vorgesehenen Beobachtungszeitraumes erfolgte die Tötung der Tiere vor Entnahme des jeweiligen Präparates. Nach Freilegen der Osteosynthese wurde im interfragmentären Raum ein definiertes 3mm dickes zylinderförmiges Segment entnommen und fixiert; außerdem wurden jeweils osteotomienah und –fern zwei weitere Gewebeproben aus dem Markraum der Tibia isoliert. Die anschließenden

Untersuchungen im gewonnenen Material umfaßten mikroskopische Analysen der Morphologie von Hämatom, Fibringerüst, Granulationsgewebe während unterschiedlicher Phasen der Frakturheilung, die immunocytochemische Darstellung neuropeptidpositiver Fasern und mikroskopische qualitative und quantitative Analysen neuropeptidpositiver Fasern zu den gewählten Zeitpunkten.

Bei den nach 5 Tagen getöteten Tieren fanden sich in den untersuchten Präparaten vor allem ein konsolidiertes Frakturhämatom. Ein feines Fibrinnetz war in den Randgebieten des interfragmentären Raumes zu sehen. Gefäßlakunen, Kapillaren und Mineralisationsinseln waren nicht erkennbar.

In der zweiten Tiergruppe konnte gezeigt werden, daß nach 10 Tagen der Abbau schollig zerfallener Erythrozyten durch Phagozyten weiter vorangeschritten war; Der Zellgehalt verringerte sich insgesamt zugunsten einer beginnenden Faserbildung. Das Fibrinnetz hatte weiter zugenommen und zeigte vereinzelt Septen;

Am 15. Tag postop. war das Fibrinnetz nicht mehr erkennbar, stattdessen neu entstandenes Bindegewebe, Gefäßstrukturen und vereinzelte Mineralisations-inseln.

Perivaskulär, an den Gefäßsinusoiden und begleitend zu Precursorzell-ansammlungen ließen sich frühestens am 10. und spätestens am 15. Tag nach der Osteotomie mit Hilfe immunocytochemischer Verfahren neuropeptidpositive Fasern nachweisen.

In diesen Untersuchungen konnte CGRP im Gegensatz zu bisher durchgeführten Versuchen unterschiedlicher Autoren erstmals schon in der Frühphase der Frakturheilung nachweisen werden. Dies ist von besonderer Bedeutung, da die Innervation des Knochens ein hochentwickeltes regulatorisches Element repräsentiert, das sowohl lokale Anforderungen registriert wie auch durch Freisetzung aktiver Neuropeptide den gesamten Knochenstoffwechsel unmittelbar beeinflusst.

Wie aus früheren Studien hervorgeht, sind Neuropeptide dort zahlreich vorhanden, wo hohe Knochenstoffwechselraten zu verzeichnen sind. Außerdem sind sie häufig in unmittelbarer Nähe von Blutgefäßen konzentriert. Die Beobachtung, daß CGRP während der frühen Frakturheilung hauptsächlich in der Nähe von Blutgefäßen auftritt, legt den Schluß nahe, daß es durch seine bekannten vasodilatierenden Eigenschaften den Blutfluß in die verletzte Region verstärkt und so die Knochenheilung unterstützt.

Experimentelle Untersuchungen zeigen, daß neurale Einflüsse auf den Knochen von Neuropeptiden vermittelt werden. Wie alle regulativen Proteine und Faktoren agieren Neuropeptide über Second-messenger-Systeme und können auch in niedrigen Konzentrationen das Remodeling beeinflussen. Durch ihre sensorische Funktion nehmen Nervenfasern mechanische Ansprüche wahr und setzen im weiteren Verlauf Neuropeptide frei. Sie sind in der Lage, die Lücke zwischen systemischen und primär lokalen regulativen Elementen zu füllen.

Grundsätzlich ist die Selbstheilung des Knochens durch die Größe des Defekts limitiert. Meist sind chirurgische Interventionen nötig und die unterschiedlichsten Hilfsmittel unumgänglich. In jüngster Zeit sind v.a. Knochenersatzmaterialien von zunehmender Bedeutung.

Ihre Zukunft scheint in der Entwicklung osteoinduktiver Implantate zu liegen. Auch unter diesem Aspekt gewinnt unser Distanzosteosynthesemodell besondere Bedeutung. Der große interfragmentäre Raum bietet optimale Bedingungen für gezielte Untersuchungen, die zur Weiterentwicklung von Knochenersatzmaterialien führen können.

7. Literaturverzeichnis

Agnati LF, Fuxe K, Janson AM et al.: Quantitative analysis: Computer assisted morphometry and microdensitometry applied to immunostained neurones
Immunochemistry: 205-223, 1991

Ahmet M, Strinivasan GR, Theodorsson E: Extraction and quantification of neuropeptides in bone by radioimmunoassay
Regul Pept 51 (3): 179-188, 1994

Alevizaki M, Shirashi A, Rassool FV et al.: The Calcitonin-like sequence of β -CGRP gene
FEBS Lett 206 (1): 47-52, 1986

Amara SG, Arriza JL, Leff SE et al.: Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to Calcitonin- gene -related peptide
Nature 229 (4718): 1094-1097, 1985

Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG et al.: Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNA encoding different polypeptide products
Nature 298: 240-244, 1982

Aoki M, Tamai K, Saotome K: Substance P- and Calcitonin gene-related peptide - immunofluorescent nerves in the repair of experimental bone defects
Int Orthop 18 (5): 317-324, 1994

Arnett TR: Physiology of the skeleton
In: Osteoporosis, Update Postgraduate Centre Series
Guildford: Reed Healthcare Communications, 10-13, 1991

Aro H, Earola E, Aho Aj et al.: Development of nonunions in the rat fibula after removal of periosteal neural mechanoreceptors
Clin Orthop 199: 292-299, 1985

Aro H: Effect of nerve injury on fracture healing. Callus formation studied in the rat
Acta Orthop Scand 56 (3): 233-237, 1985

Ashhurst DE: The influence of mechanical conditions on the healing of experimental fractures in the rabbit
Trans R Soc Lond B 313: 271-302, 1986

Bernard CW, Chung Shih: The osteogenic stimulating effect of neuroactive Calcitonin gene-related peptide
Peptides 11: 625-632, 1990

Beufu C: Ultra structure investigation of experimental fracture healing
Chin Med J 92: 530-535, 1979

Bjurholm A, Kreicbergs A, Brodin E: Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone
Peptides 9: 165-171, 1988

Bjurholm A, Kreicbergs A, Schultzberg M et al.: Fixation and Demineralisation of bone tissue for immunohistochemical staining of neuropeptides
Calcif Tissue Int 45 (4): 227-231, 1989

Bjurholm A, Kreicbergs A, Schultzberg M et al.: Neuroendocrine regulation of cyclic AMP formation in osteoblastic cell lines (UMR-106.01)
J Bone and Mineral Research 7(9):1011-1019, 1992

Bjurholm A: Neuroendocrine peptides in bone
Orthop 15 (4):325-329, 1991

Bovenberg RA, Baas PD, van de Meerendonk WP et al.: Model for alternative RNA processing in human Calcitonin gene expression
Nucleic Acids Res 14 (22): 8785-8803, 1986

Brain SD, Tippins JR, Morris HR et al. : Potent vasodilator activity of Calcitonin gene-related peptide in human skin
J Invest Dermatol 87 (4): 533-536, 1985

Brain SD, Tippins JR, Morris HR et al.: Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator
Nature 313: 54-55, 1985

Breimer LH, McIntyre I, Zaidi M:
Peptides from the calcitonin genes, molecular genetics, structure and function
J Biochem 255 (2): 377-390, 1988

Brighton CT, Fisher JR, Levine SE et al.: The biochemical pathway mediating the proliferative response of bone cells to a mechanical stimulus
J Bone Joint Surg US 78 (9): 1337-1347, 1996

Brighton CT: Principles of fracture healing.
In Murry JA (ed): Instructural Course lectures. St. Louis, CV Mosby,
pp 60-82, 1984

Brighton CT: The semi-invasive method of treating non-union with direct current
Orth Clin N Am 15: 33-45, 1984

Brookes M, Revell WJ: Blood Supply of Bone- Scientific Aspects

Springer, London, 1998

Brookes M: The blood supply of bone
London, Butterworth, 1971

Buma P, Elmans L, Oestreicher AB: Changes in innervation of long bones after insertion of an implant: immunocytochemical study in goats with antibodies to Calcitonin gene-related peptide and B-50/GAP-43
J Orthop Res 13 (4): 570-577, 1995

Burholm A, Kreicbergs A, Dahlberg L et al.: The occurrence of neuropeptides at different stages of DBM-induced heterotopic bone formation
Bone Miner 10 (2): 95-107, 1990

Canalis E, Centrella M, Urist MR et al.: Effect of partially purified bone morphogenetic protein on DNA synthesis and cell replication in calvarial and fibroblast cultures
Clin Orthop 198: 289-296, 1985

Canalis E: Effect of growth factors on bone cell replication and differentiation
Clin Orthop 193: 246-263, 1985

Claes L, Hoellen I, Ignatius A: Resorbierbare Knochenzemente
Orthopäde 26: 459-462, 1997

Coerper S, Köveker GB: Stimulation der Wundheilung durch thrombozytäre Wachstumsfaktoren. In: Sedlarik, KM: Wundheilung
Gustav Fischer Verlag, 1993

Cohen IK, Diegelmann RF, Lindblatt WJ: Woundhealing – Biochemical and Clinical aspects
W. B. Saunders Company, 1992

Cornell CN : Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts
Bone Grafting and Bone Graft Substitutes 30, 591-598, 1999

Crenshaw EB, Russo AF, Swanson LW et al.: Neuron-specific alternative RNA-processing in transgenic mice expressing a metallothionin-calcitonin fusion gene
Cell 49 (3): 389-398, 1987

Davis TR, Wood MB: The effects of acidosis and alkalosis on long bone vascular resistance
J Orthop Res 11: 834-839

Davy DT, Connolly JF: The biochemical behavior of healing canine radii and ribs
J Biomech 15: 235-247, 1982

De Souza EB, Van Loon GR: Brain serotonin and catecholamine responses to repeated stress in rats
Brain Res 367 (1-2): 77-86, 1986

De Vernejoul MC: Dynamics of bone remodeling: Biochemical and pathophysiological basis
Eur J Clin Chem Clin Biochem 34 (9): 729-734, 1996

Evans EJ: Toxicity of hydroxyapatite in vitro: The effect of particle size
Biomaterials 12: 574-576, 1991

Foitzik C, Merten HA: Restitutio ad integrum. Vom Knochenersatz zum Knochenaufbau
Spitta Verlag, Balingen, 1999

Friedenberg ZB, Brighton CT: Bioelectric potentials in bone
J Bone Joint Surg 48 (A): 915-923, 1966

Frost HM: The biology of fracture healing
J Clin Orthop and Rel Res: 283-293, 1988

Frost HM: The biology of fracture healing. An overview for clinicians.
Clin Orthop 248: 283-293, 1989

Gibson SJ, Polak JM, Bloom SR et al.: Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species
J Neurosci 4 (12): 3101-3111, 1984

Goodmann RH, Jacobs JW, Habener JF et al.: Cell-free translation of messenger RNA coding for a precursor of human calcitonin
Biochem Biophys Res Commun 91 (3): 932-938, 1979

Haegerstrand A, Dalsgaard CJ, Jonsson B et al.: Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of human endothelial cells
Proc Natl Acad Sci USA 87: 3299-3303, 1990

Haegerstrand A, Dalsgaard CJ, Jonzon B et al.: Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of human endothelial cells
Proc Natl Acad Sci USA 87 (9): 3299-3303, 1990

Heise U, Osborn JF, Duwe F: Hydroxyapatite ceramic as a bone substitute
Int Orthop 14: 329-338, 1990

Heppenstall RB: Tissue gas tensions and oxygen consumption and healing of bone defects

Clin Orthop 106: 357-365, 1975

Hill EL, Elde R: Distribution of CGRP-, VIP-, SP-, and NPY-immunoreactive nerves in the periosteum of the rat
Cell Tissue Res 264 (3): 469-480, 1991

Hukkanen M, Konttinen YT, Rees RG et al.: Distribution of nerve endings and sensory neuropeptides in rat synovium, meniscus and bone
Int J Tissue React 14 (1): 1-10, 1992

Hukkanen M, Konttinen YT, Santavirta S et al.: Effect of sciatic nerve section on neural ingrowth into the rat tibial fracture callus
Clin Orthop 311: 247-257, 1995

Hukkanen M, Konttinen YT, Santavirta S et al.: Rapid proliferation of Calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerves during healing of rat tibial fractures suggests neural involvement in bone growth and remodeling
Neuroscience 54 (4): 969-979, 1993

Jacobs JW, Potts JT Jr, Bell NH et al.: Calcitonin precursor identified by cell-free Translation of mRNA
J Biol Chem 254 (21): 10600-10603, 1979

Kawase T, Howard GA, Roos BA et al.: Calcitonin- gene-related peptide rapidly inhibits calcium uptake in osteoblastic cell lines via activation of adenosine triphosphate-sensitive potassium
Endocrinology 137 (3): 984-90, 1996

Kittur SD, Hoppener JW, Antonarakis SE et al.: Linkage map of the short arm of human chromosome 11: location of the genes for catalase, calcitonin, and insulin-like growth factor II
Proc Natl Acad Sci USA 82 (15): 5064-5067, 1985

Konttinen Yt, Imai S, Suda A: Neuropeptides and the puzzle of bone remodeling. State of the art
Acta Othop Scand 67 (6): 632-639, 1996

Lasmoles F, Julienne A, Desplan C et al.: Structure of chicken calcitonin predicted by partial nucleotide sequence of its precursor
FFBS Lett 180 (1): 113-116, 1985

Laurencon CT, Lane JM: Poly lactat acid and poly glycolic acid: orthopaedic surgery applications In: Bone formation and repair.
American Academy of Orthopedic Surgeons Symposium, Park Ridge II, pp 325-339, 1994

Lundquard A, Aalkjaer C, Bjurholm A et al.: Vasorelaxation in isolated bone arteries.

Vasoactive intestinal peptide, substance P, calcitonin gene-related peptide, and bradikinin studies in pigs

Acta Orthop Scand 68 (5): 481-489, 1997

Luppa H, Ambrosius H, Storch SW: Handbuch der Histochemie
Georg Thieme, Stuttgart, 1986

Madsen JE, Hukkanen M, Aspenberg P et al.: Time-dependent sensory nerve ingrowth into a bone conduction chamber

Acta Orthop Scand 71 (1): 74-79, 2000

Madsen JE, Wang JS, Hukkanen M et al.: Sensory nerve ingrowth during bone graft incorporation in the rat

Acta Orthop Scand 67 (3): 217-220, 1996

Merten HA, Wiltfang J, Hönig JF et al.: Intraindividuelle Vergleich von α - und β - TCP-Keramik im Tierexperiment

Mund Kiefer Gesichts Chir 4 (Suppl. 2), 509-515, 2000

Miller TA : The induction of bone by an osteogenic factor and the conduction of bone by porous hydroxyapatite

Abstr Am Assoc Plast Surg: 61-62, 1989

Nade S, Armstrong L, Mc Cartney ER et al.: Osteogenesis after bone and bone marrow transplantation: the ability of ceramic materials to sustain osteogenesis from transplanted bone marrow cells

Clin Orthop 181: 217-225, 1983

Nasr HF : Bone and bone substitutes

Periodontology 19, 74-86, 1999

Nelson MT, Huang Y, Brayden JE et al: Arterial dilatations in response to Calcitonin gene-related peptide involve activation of Kalium-channels

Nature 344 (6268): 770-773, 1990

Nemeth GG: Growth factors and their role in wound and fracture healing.

Biological and Clinical Implications. New York, Alan R. Liss, pp 1-17, 1989

Nordsletten L, Madsen JE, Almaas R et al.: The neuronal regulation of fracture healing. Effects of sciatic nerve section in rat tibia

Acta Orthop Scand 65 (3): 299-304, 1994

Onua GN, Alpar EK: Elevation of plasma CGRP and SP levels in orthopedic patients with fracture neck of femur

Neuropeptides 34 (2): 116-120, 2000

Osborn JF: Implantatwerkstoff Hydroxylapatitkeramik – Grundlagen und klinische Anwendung.

Quintessenz Verlag Berlin, 1985

Owan I, Ibaraki K: The role of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in macrophages: the presence of functional receptors and effects on proliferation and differentiation into osteoclast-like cells

Bone Miner 24 (2): 151-164, 1994

Pauwels F: Atlas zur Biomechanik der gesunden und kranken Hüfte; Prinzipien, Technik und Resultate einer kausalen Therapie

Springer, Berlin, 1973

Petermann JB, Born W, Chang JY et al.: Identification in the human central nervous system, pituitary, and thyroid of a novel calcitonin gene-related peptide, and partial amino acid sequence in the spinal cord

J Biol Chem 262 (2): 542-545, 1987

Roos BA, Fischer JA, Pignat W et al.: Evaluation of the *in vivo* and *in vitro* calcium-regulating actions of non-calcitonin peptides produced via calcitonin gene expression

Endocrinology 118 (1): 46-51, 1986

Sampath TK, Muthukumar N, Reddi AH: Isolation of osteogenin and extracellular matrix associated bone inductive protein by heparin affinity chromatography

Proc Natl Acad Sci USA 84: 7109-7113, 1987

Schenk RK: die Histologie der primären Knochenheilung im Lichte neuer Konzeptionen über den Knochenumbau

Unfallheilkunde 81:219-227, 1978

Schweiberer L, Wolf K: Die Pathophysiologie der Knochenheilung

In: Hefte zur Unfallheilkunde

Springer, Heidelberg, 1992

Sevitt S: Control of bone repair. In: Sevitt S ed. Bone Repair and fracture Healing in Man

Churchill Livingstone: 41-51, 1981

Shih C, Bernard GW: Calcitonin gene-related peptide enhances bone colony development *in vitro*

Clin Orthop 334: 335-344, 1997

Shimizu SI: Subcutaneous tissue responses in rats to injection of fine particles of synthetic hydroxyapatite ceramic

Biomedical Res 9, 95-111, 1988

Simmons DJ: Fracture healing perspectives

Clin Orthop 200: 100-113, 1985

Standen NB, Quayhe JM, Davies NW et al.: Hyperpolarising vasodilators activate ATP-sensitive K-channels in arterial smooth muscle
Science 245 (4914): 177-180, 1989

Tippins JR: CGRP: a novel neuropeptide from the Calcitonin gene is the most potent vasodilator known
J Hypertens Suppl 4(5): 102-105, 1986

Trueta J: Studies on the etiopathology of osteoarthritis of the hip
Clin Orthop 31: 7-19, 1963

Uam AW: A histologic study of the early phases of bone repair.
J Bone Joint Surg 12: 827-844, 1930

Underwood EE: Quantitative Stereology. Reading-assachusetts Menlo Park-CA
London Don Mills-Otario: Addison-Wesley, 1969

Urist MR: Bone cell differentiation and growth factors
Science 220: 680-686, 1983

Urist MR: Bone formation by autoinduction
Science 150: 893-899, 1965

Walter M, Müller JM, Keller HW et al.: Ossification of the collagen implant
Aktuelle Traumatol 15 (6): 254-259, 1985

Wolf K, Rösch I, Trudrung P et al.: Innervation im Granulationsgewebe in der frühen Phase der Frakturheilung
Osteol 4 (Suppl.1): 3, 1995

Wolf K, Stock W, Saleh M et al.: In: Hefte zu der Unfallchirurgie. Einsatz visueller und bildanalytischer Verfahren für die Auswertung histologischer Knochenpräparate
Springerv Verlag 230 (b), Berlin, 1993

Wolff J et al.: Das Gesetz der Transformation der Knochen.
Berlin, Hirschwald, 1892

Wolff R: Knochenstabilität nach Kontakt und Spaltheilung. Eine tierexperimentelle Studie. In: Hefte zur Unfallheilkunde
Springer Verlag, 30-31, Heidelberg, 1988

Wornom IL 3rd, Neifeld JP, Merhof AI Jr et al.: Closure of craniofacial defects after cancer resection
Am J Surg 162 (4): 408-411, 1991

Zaidi M, Brain SD, Tippins JR et al.: Structure - activity relationship of human Calcitonin gene-related peptide
Biochem J 269: 775-780, 1990

Zaidi M, Breimer LH, McIntyre et al.: Biology of Peptides from the Calcitonin Genes
Quart J Exp Physiol 72: 371-408, 1987

Zajac JD, Phillips PE: Pagets disease of bone: clinical features and treatment
Clin Exp Rheumatol 3 (1): 75-88, 1985

8. Abkürzungsverzeichnis:

AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
BMP	Bone morphogenetic protein
cAMP	Cyclisches Adenribosinmonophosphat
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CT	Calcitonin
DAB	Dimethyl-aminoazobenzol
DePeX	Eigenname des Klebstoffs für Deckgläser
DMSO	Dimethyl-sulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylene Diamine Tetra-Acetate
IgG	Immunglobulin G
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
NPY	Neuropeptide Y
PAS	Periodic Acid Schiff reaction
PBS	Phosphate buffer solution
PRP	Platelet-rich plasma
PTH	Parathormon
RAP	Regional Acceleratory Phenomenon
RIA	Radioimmunesay
SP	Substance P
VIP	Vasointestinales peptid

9. Anhang

9.1 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Plitz für die Übernahme dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Wolf für die Betreuung der Arbeit.

Die medizinisch-technischen Assistentin Frau Maier hat mit Erstellung histologischer Schnitte wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Die Untersuchungen wurden von der Wilhelm Sander Stiftung, Neustadt a.d. Donau, unterstützt.

9.2 Curriculum vitae

Name	Isabel Rösch
Geburtsdatum	30.10.1970
Geburtsort	München
Eltern	Herbert Rösch Heidi Rösch
09/77 – 06/90	Samberger Grundschule München Thomas-Mann-Gymnasium München Allgemeine Hochschulreife
08/90 – 03/91	Sprachkurs mit Abschlußexamen, University of Cambridge, England
05/91	Beginn des Studiums der Humanmedizin, LMU München
08/93 – 08/96	Famulaturen im In- und Ausland
08/94	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/96	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/96 – 01/97	Praktisches Jahr: Chirurgie, Chirurgische Klinik und Poliklinik, LMU München
02/97 – 05/97	Praktisches Jahr: Innere Medizin, Städtisches Krankenhaus Neuperlach, Akademisches Lehrkrankenhaus, LMU München
06/97 – 09/97	Praktisches Jahr: Anästhesie, Klinik für Anästhesiologie, LMU München
11/97	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12/97 – 06/99	Arzt im Praktikum: Anästhesie, Klinik für Anästhesiologie, LMU München
seit 07/99	Assistenzärztin, Anästhesie, Klinik für Anästhesiologie, LMU München

Publikationen

Wolf K, Rösch I, Trudrung P et al.: Innervation im Granulationsgewebe in der frühen Phase der Frakturheilung
10. Jahrestagung für Osteologie, München, 1995

Wolf K, Gürtner I, Rösch I et al.: Die frühe Phase der Frakturheilung – Innervation, Vaskularität und Granulationsgewebe
60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, Berlin, 1996

Wolf K, Hamar J, Rösch I et al.: Die Distanz-osteosynthese der Kaninchentibia. Ein Beitrag zur Untersuchung der Osteogenese im interfragmentären Spalt
Osteologie, Band 6, Heft 4: 161-169, 1997