

Aus der Klinik und Poliklinik für
Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie
der Universität Würzburg
- Direktor: Professor Dr. med. R. H. Meffert -

**Der Einfluss des cysteinreichen Proteins 61 auf
die Muskelregeneration nach
akuter Beinverkürzung und anschließender Verlängerung**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Berrin Yorulmazel
aus Marktheidenfeld

Würzburg, Juli 2021

Referent: Prof. Dr. med. Rainer H. Meffert

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Schütze

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15. November 2021

Die Promovendin ist Ärztin.

Für Haluk

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die schwere Unterschenkelfraktur mit Weichteilschaden.....	1
1.1.1 Klinische Relevanz.....	1
1.1.2 Klassifikationen.....	3
1.1.3 Komplikationen.....	6
1.1.4 Histologie des Muskels.....	7
1.1.5 Wundheilung der Muskulatur.....	9
1.1.6 Beeinträchtigung der Mikrozirkulation.....	11
1.1.7 Therapiestandard.....	12
1.2 Die akute Beinverkürzung mit nachfolgender Distraktionsosteogenese	15
1.3 Unterstützung der Muskelregeneration	17
1.3.1 Grundlagen der Angiogenese.....	18
1.3.2 Das cysteinreiche Protein 61.....	20
1.4 Traumamodell.....	22
1.5 Fragestellungen.....	24
2. Material und Methoden.....	26
2.1 Versuchstiere.....	26
2.2 Präoperative Vorbereitungen und Anästhesie.....	26
2.3 Kompartimentdruckmessung und Kontusionstrauma.....	27
2.4 Kollagenmatrix und rCYR61-Fc.....	29
2.5 Operatives Vorgehen und Kallusdistraktion.....	30
2.6 Muskelkraftmessung.....	33
2.7 Weitere apparative Diagnostika.....	35
2.8 Klinisches Monitoring und Euthanasie.....	36
2.9 Postmortale Untersuchungen.....	37
2.9.1 Histologie.....	37
2.9.1.1 Probenentnahme.....	37
2.9.1.2 Fixierung.....	38
2.9.1.3 Einbettung.....	38

2.9.1.4 Schnittanfertigung.....	39
2.9.1.5 Hämalaun-Eosin-Färbung.....	39
2.9.1.6 Azan-Färbung nach Heidenhain.....	41
2.9.1.7 Lichtmikroskopische Auswertungen.....	44
2.9.1.7.1 Histomorphometrie.....	44
2.9.1.7.2 Histometrie und deskriptive Gewebeanalyse...	46
2.9.2 Immunhistochemie.....	47
2.9.2.1 Färbung mit anti-smooth-muscle-actin (anti-SMA).....	48
2.9.2.2 Auszählung der Gefäße	52
2.9.3 Freisetzungskinetik des CYR61.....	53
2.10 Statistik.....	55
3. Ergebnisse.....	57
3.1 Traumamodell.....	57
3.2 Senkung des Kompartimentdruckes durch Tibiaschaftverkürzung.....	57
3.3 Weitere apparative Untersuchungen.....	58
3.4 Muskelkraftregeneration und Korrelation zum Bindegewebsanteil.....	60
3.5 Histologische Untersuchungen.....	63
3.6 Gefäßauszählung.....	67
3.7 Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.....	69
3.8 Freisetzungskinetik des CYR61	74
4. Diskussion.....	77
4.1 Versuchsaufbau.....	77
4.2 Muskelkraftregeneration.....	81
4.3 Histologische Veränderungen.....	83
4.4 CYR61: Transfer, Wirkung und Kinetik.....	86
4.5 Aussichten.....	94
5. Zusammenfassung.....	96
6. Literaturverzeichnis.....	98

7. Abkürzungen.....	112
8. Abbildungsverzeichnis.....	115
9. Tabellenverzeichnis.....	116
10. Diagrammverzeichnis.....	116
11. Materialienliste.....	118
12. Danksagung	
13. Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1 Die schwere Unterschenkelfraktur mit Weichteilschaden

Die schwere Unterschenkelfraktur mit akutem Weichteiltrauma stellt in der chirurgischen Klinik eine komplikationsträchtige Herausforderung dar. Eine schwere Unterschenkelfraktur umfasst die Fraktur von Tibia und Fibula sowie Begleitverletzungen der Weichteile. Aufgrund des gering ausgeprägten Weichteilmantels am anteromedialen Tibiaschaft und ihren distalen Anteilen ist diese Region prädisponiert für posttraumatische Knochen- und Weichteilinfektionen mit Defektheilung im Rahmen einer kritischen Minderperfusion (Märdian et al. 2015).

1.1.1 Klinische Relevanz

Der Entstehungsmechanismus ist vielfältig und schließt die Einwirkung von direkter und indirekter Gewalt ein. Vor allem im Rahmen von Verkehrsunfällen führen Hochrasanz- oder Polytraumata zu erheblichen Verletzungen der langen Röhrenknochen der unteren Extremität, verbunden mit Weichteilschädigungen, welche von Kontusionen über Décollementes bis hin zur Durchspießung des schützenden Weichteilmantels durch Knochenfragmente reichen können. Weitere häufige Ursachen sind Sportunfälle und einfache Stolperstürze, seltener Treppenstürze und Stürze aus großer Höhe (Court-Brown et McBirnie 1995).

Nach Howard und Court-Brown betreffen 40% aller offenen Frakturen die untere Extremität, wobei diaphysäre Verletzungen überwiegen (Howard et Court-Brown 1997).

In einer epidemiologischen Studie von Court-Brown und McBirnie waren die Tibiafrakturen in 44% der Fälle im mittleren Drittel, in 37,8% distal und in 6,9% proximal lokalisiert (Court-Brown et McBirnie 1995). Etwa 25% der Tibiaschaftfrakturen sind offene Frakturen (Stannard et al. 2011).

Aus dem Jahresbericht 2014 des Traumaregisters der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie geht hervor, dass 48% der in den Jahren 2011-2013 erfassten Patienten eine schwere Verletzung mit einem ISS (Injury Severity Score) ≥ 16 Punkten aufwiesen, hiervon 28,5% mit einer Verletzung der unteren Extremität. Eine relevante Verletzung in diesem Bereich, d. h. Patienten mit einem AIS (Abbreviated Injury Scale) ≥ 3 Punkten, erlitten 29,8% der Patienten (Sektion NIS der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU) / AUC - Akademie der Unfallchirurgie GmbH 2014). Banerjee et al. analysierten die Daten des TraumaRegister DGU® zwischen 2002 und 2009 und zeigten auf, dass die häufigsten Frakturen bei Schwerverletzten unter anderem Femur (16,5%) und Tibia (12,6%) betrafen. So seien Extremitätenverletzungen in dieser Gruppe auch mit einem schlechteren Outcome, wie häufigeren Operationen, Bluttransfusionen sowie längerer Krankenhausverweildauer, verbunden (Banerjee et al. 2013).

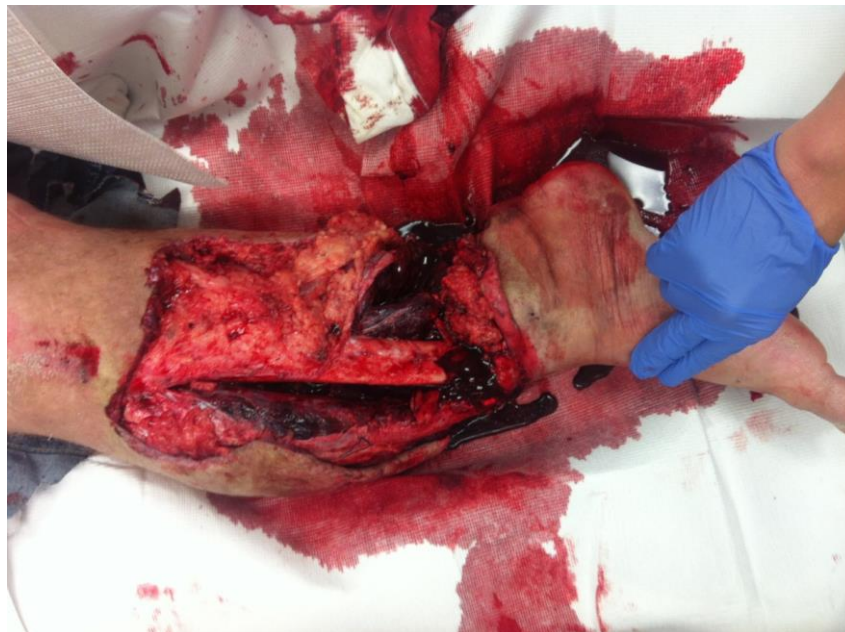


Abb. 1: offene Unterschenkelfraktur (Typ III c nach Gustilo und Anderson) mit hochgradigem Weichteildefekt (O 3 nach Tscherne und Oestern), (Quelle: Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie der Universitätsklinik Würzburg, Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. R. H. Meffert und Herrn Prof. Dr. S. Frey)

1.1.2 Klassifikationen

Das Eruiieren des genauen Unfallmechanismus, die initiale Einschätzung des Frakturmusters, des Weichteilschadens, möglicher Begleitverletzungen und der Ausschluss eines Kompartmentsyndromes sind wichtige Kriterien bei der Erstuntersuchung des Verletzten (Märdian et al. 2015).

Für die weitere Therapie und zur Prognoseabschätzung ist die korrekte Klassifikation der Fraktur von Bedeutung (Südkamp 2000).

Tibiaschaftfrakturen werden nach der AO-Klassifikation wie folgt eingeteilt (Müller et al. 1990):

Die Kodierung 42-A entspricht einer einfachen Tibiaschaftfraktur mit der Unterteilung in eine Spiralfaktur (42-A1), eine Schrägfraktur $\geq 30^\circ$ (42-A2) und eine Querfraktur $< 30^\circ$ (42-A3). Der Typ 42-B ist eine Keilfraktur des Tibiaschaftes mit folgender Unterteilung: Spiralkeil (42-B1), Biegungskeil (42-B2) und fragmentierter Keil (42-B3). Die Kodierung 42-C bezeichnet eine komplexe Tibiaschaftfraktur mit der Unterteilung in eine Spiralfaktur (42-C1), eine Etagenfraktur (42-C2) und eine irreguläre Fraktur (42-C3) (AO-Foundation Switzerland 2014).

1982 publizierten Tscherne und Oestern eine Einteilung des Weichteilschadens bei offenen und geschlossenen Frakturen, wobei diese vornehmlich zur Beurteilung geschlossener Frakturen herangezogen wird (Tscherne et Oestern 1982).

Tab. 1: Klassifikation des Weichteilschadens nach Tscherne und Oestern (1982), (G: geschlossen, O: offen)

Geschlossene Frakturen (Grad 0-3):	
G 0	fehlende oder unbedeutende Weichteilverletzung indirekte Gewalteinwirkung einfache Frakturform
G 1	oberflächliche Schürfung oder Kontusion durch Fragmentdruck von innen einfache bis mittelschwere Frakturformen
G 2	tiefe kontaminierte Schürfung oder Kontusion durch direkte Gewalteinwirkung drohendes Kompartmentsyndrom mittelschwere bis schwere Frakturform
G 3	ausgedehnte Hautkontusion, -quetschung oder Zerstörung der Muskulatur subkutanes Décollement manifestes Kompartmentsyndrom Verletzung eines Hauptgefäßes schwere Frakturform
Offene Frakturen (Grad 1-4):	
O 1	Durchspießung der Haut unbedeutende Kontamination einfache Frakturformen
O 2	Durchtrennung der Haut, umschriebene Haut- und Weichteilkontusion mittelschwere Kontamination alle Frakturformen
O 3	Ausgedehnte Weichteilverletzung häufig Gefäß- und Nervenverletzungen starke Wundkontamination ausgedehnte Knochenzertrümmerung
O 4	Totale und subtotale Amputation Durchtrennung der wichtigsten anatomischen Strukturen vollständige Ischämie

Zur Einschätzung des Schweregrades offener Frakturen bedient man sich der Klassifikation nach Gustilo und Anderson, welche im Jahre 1976 beschrieben wurde. In Abhängigkeit vom Weichteilschaden teilen die Autoren Frakturen langer Knochen in die Klassen I, II und III ein (Gustilo et Anderson 1976). Die große Bandbreite drittgradig offener Frakturen, welche mit einer wesentlich höheren Infektionsrate und einer größeren Gefahr der Wundsepsis in Verbindung stehen, machte es notwendig,

diese Frakturklasse in die Subtypen A, B und C zu gliedern, die zugleich Aussagen über die Prognose der jeweiligen Fraktur erlauben (Gustilo et al. 1984). Nach Court-Brown und McBirnie entsprechen etwa 60% aller offenen Frakturen einer Typ III Fraktur nach Gustilo und Anderson (Court-Brown et McBirnie 1995). Laut Gustilo et al. (1984) liegt die Infektionsrate bei Typ IIIa Frakturen bei 4%, bei Typ IIIb Frakturen bei 52% und bei Typ IIIc Frakturen bei 42%. In ihrer retrospektiven Untersuchung von 1984 erlitten zwei von 87 Patienten eine Osteomyelitis. Die Amputationsrate läge jeweils bei 0% (Typ IIIa), 16% (Typ IIIb) und 42% (Typ IIIc).

Tab. 2: Klassifikation offener Frakturen nach Gustilo et Anderson (1976)

	Kriterien
Typ I	Hautläsion \leq 1 cm mit unbedeutender Kontamination Einfache Frakturformen
Typ II	Hautläsion $>$ 1 cm geringe bis mäßige Weichteilquetschung
Typ III	ausgedehnter Weichteilschaden unter Einbeziehung von Haut, Muskulatur und neurovaskulären Strukturen, oft Hochrasanztraumata speziell: Schussverletzungen, landwirtschaftliche Unfälle
Typ III a	Ausgedehnter Weichteilschaden mit noch adäquater Weichteildeckung
Typ III b	Ausgedehnter Weichteilschaden mit Deperiostierung freiliegender Knochen, massive Kontamination
Typ III c	Rekonstruktionspflichtige Gefäßverletzung

Von besonderer klinischer Relevanz ist allerdings der Einfluss des Weichteiltraumas auf die Knochenheilung. Die rasche Wiederherstellung des Weichteilmantels ist daher oberstes Ziel in der Wundversorgung komplizierter Unterschenkelfrakturen.

1.1.3 Komplikationen

Das Ausmaß der Beeinträchtigung des umgebenden Gewebes muss nicht auf den ersten Blick erkennbar sein, wie es bei den wesentlich häufigeren geschlossenen Unterschenkelfrakturen der Fall ist. Das größte Problem stellen die Beurteilung der Skelettmuskelvitalität und die anschließende Verhinderung einer progredienten Nekrose initial vitaler Gewebeabschnitte dar. Das Auftreten von Komplikationen ist dynamisch und zeitabhängig, weshalb eine rasche und adäquate therapeutische Intervention wichtig ist.

Besonders komplikationsträchtig ist die Entwicklung eines Kompartmentsyndroms, welches sowohl nach geschlossenen als auch offenen Frakturen und nach therapeutischer Behandlung entstehen kann. Nach Blick et al. liegt die Inzidenz bei offenen Tibiaschaftfrakturen bei 9,1%, hauptsächlich im Rahmen von Typ III offenen Frakturen (Blick et al. 1986).

Das Kompartmentsyndrom ist definiert als ein Zustand, in dem die Zirkulation und Funktion des Gewebes in einer geschlossenen Faszienloge durch einen erhöhten Druck in diesem Raum beeinträchtigt sind (Matsen 1975). Die Entstehung beruht auf einer Ischämie des Gewebes durch Einblutung und Ödembildung nach Weichteilschaden mit Gefäßverletzung. Hierdurch entsteht vor allem in der engen Tibialis anterior-Loge ein erhöhter Gewebedruck. Dies behindert den kapillären Blutfluss, welches eine weitere Gewebhypoxie mit Nekrosen fördert (Shadgan et al. 2010). Aus einem drohenden Kompartmentsyndrom entsteht ein manifestes Kompartmentsyndrom, wenn der muskuläre Perfusionsdruck (= Differenz aus dem mittleren arteriellen Blutdruck und dem Logendruck (Normwert < 10 mmHg)) einen Schwellenwert von 30-40 mmHg unterschreitet (Märdian et al. 2015). Sichere klinische Zeichen wie Schmerzen, Schwellung und Sensibilitätsstörungen im Versorgungsgebiet des Nervus fibularis profundus können beim bewusstseinsgestörten Patienten fehlen. Eine objektive Messung erfolgt mit Hilfe von subfaszialen Drucksonden (Gerngroß et al. 1992). Nach einer aktuellen Studie kann ein Druckmonitoring bei einer Sensitivität von 94% und einer Spezifität von 98% ein nützliches Diagnostikum sein (McQueen et al. 2013). Das

Kompartmentsyndrom ist jedoch eine klinische Diagnose, wobei bereits der Verdacht eine engmaschige klinische Verlaufsbeobachtung erfordert.

Bei Unterschreiten des Cut-off-Wertes erfolgt eine notfallmäßige Dermatofasziotomie aller Kompartimente (Sellei et al. 2014).

Die Ischämietoleranz des Muskels beträgt ca. 3 bis 4 Stunden, die der Nerven ca. 8 Stunden und die des Knochens ca. 4 Tage (Blaisdell 2002; Vaillancourt et al. 2004). Um also irreversible Schäden vor allem der Muskulatur zu vermeiden, sind die Diagnosestellung und sofortige Therapie wichtig.

Weitere Akutkomplikationen von schweren Unterschenkelfrakturen sind tiefe Beinvenenthrombosen. Subakut sind Wundinfektionen, die Myositis ossificans und eine Rhabdomyolyse mit akutem Nierenversagen (Crush-Syndrom). Die Spätfolgen umfassen Wundheilungsstörungen, ischämische Kontrakturen und Muskeldefekte mit Funktionseinbußen infolge einer Fibrose und Verfettung des Gewebes (Alessandrino et Balconi 2013).

1.1.4 Histologie des Muskels

Der quergestreifte Skelettmuskel *M. tibialis anterior* ist von einer straffen Faszie und vom bindegewebigen Epimysium umgeben. Mehrere Muskelfasern, auch Sekundär- und Primärbündel genannt, werden vom Perimysium, jede einzelne Muskelfaser ist vom Endomysium aus Kollagenfasern umfasst. Das Perimysium führt Blutgefäße, Lymphgefäße und Nerven, welche sich im Endomysium verzweigen und an die Muskelfaser herantreten. Vor allem das Endomysium bestimmt die Reißfestigkeit eines Muskels (ca. 100 N/cm²). Jede Faser ist wiederum von einem kontinuierlichen Basalmembranschlauch (Basallamina und retikuläre Fasern des Endomysiums) umgeben und ist ein Synzytium aus in der Embryonalperiode fusionierten Myoblasten und demnach mehrkernig (Benninghoff et Drenckhahn 2003).

Die kontraktile Myofibrille der Muskelfaser, bestehend aus Aktin und Myosin, sind über Aktinfilament-bindende Proteine (Vinculin, Talin, Dystrophin, Spectrin) an Integrine und Dystroglycan der Plasmamembran verhaftet, welche wiederum über Laminin-2 an der Basallamina verankert sind. Integrine sind transmembranäre Adhäsionsmoleküle zur Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion. Sie spielen eine große Rolle in vielen biologischen Vorgängen wie Signalübermittlung, Geweberegeneration und Wachstum. Die myotendinösen Verbindungen an den Muskel-Sehnen-Übergängen erfolgen über spezielle Integrine in der Plasmamembran für Proteine der extrazellulären Matrix wie Laminin-4, Fibronectin und Kollagen. Die Muskelfasern sind entweder über kurze Zwischensehnen innerhalb des Endomysiums oder durch direkte myomyale Kontakte miteinander verbunden (Benninghoff et Drenckhahn 2003).

Zwischen Basallamina und Zelloberfläche ruhen rundliche bis spindelförmige Satellitenzellen (ca. 4% der Zellkerne einer Faser). Sie wurden erstmals von Mauro beschrieben (Mauro 1961).

Diese ruhenden Myoblasten sind teilungsfähig und maßgeblich für die Regeneration des Muskels verantwortlich. Sie können durch eine Verletzung, durch Einfrieren, Denervierung oder Devaskularisierung aktiviert werden. Es wird angenommen, dass ein Großteil dieser Satellitenzellen (ca. 80%) nach Aktivierung rasch proliferieren und sich zu Myoblasten differenzieren kann. Die restlichen Satellitenzellen teilen sich vermutlich langsam und ersetzen den Satellitenzell-Pool (Chargé et Rudnicki 2004).

Daneben existieren im Muskel weitere Stammzellen. Es werden jene beschrieben, welche sich in entsprechendem Milieu zu mesenchymalen, neuronalen oder endothelialen Zellen entwickeln können (Shefer et al. 2004; Qu-Petersen et al. 2002). Dreyfus et al. erfassten Muskelstammzellen außerhalb der Basallamina im benachbarten Bindegewebe des Muskels (Dreyfus et al. 2004). Weiterhin können sich Stammzellen aus dem Knochenmark, Fettgewebe, den Haarfollikeln, der Plazenta und Nabelschnur zu Muskelzellen differenzieren (Sicari et al. 2014). Crisan et al. wiesen multipotente, perivaskuläre Vorläuferzellen im menschlichen Skelettmuskel nach (Crisan et al. 2008). Dellavalle et al. erhielten Hinweise darauf, dass auch Perizyten mit Muskelfasern fusionieren können (Dellavalle et al. 2007 und 2011). Interessant ist auch, dass adulte

Satellitenzellen sowohl muskelspezifische als auch endotheliale Marker wie CD34 zu exprimieren scheinen (Beauchamp et al. 2000). Tamaki et al. entdeckten wiederum CD34⁺-Vorläuferzellen außerhalb der Basallamina im Interstitium des Skelettmuskels, welche myo-endotheliale Marker besitzen (Tamaki et al. 2002).

Nach Fusion mehrerer Myoblasten entstehen dünne Myotuben, welche innerhalb des alten Basallaminaschlauches liegen. Diese vereinigen sich mit dem intakten Abschnitt einer bestehenden Muskelfaser (Benninghoff et Drenckhahn 2003). Somit sind Muskelzellen regenerationsfähig.

1.1.5 Wundheilung der Muskulatur

Die Funktion eines Muskels ist abhängig von der Integrität des kontraktilen Apparates, der motorischen Einheit, der kapillären Blutversorgung und des extrazellulären Bindegewebes (Chargé et Rudnicki 2004).

Im Rahmen eines Kontusionstraumas führen die wirkenden Scherkräfte zu einer lokalen Ruptur der Muskelfasern mit Basallamina, Endomysium und angrenzenden Kapillaren. Der folgende Prozess kann kurz in drei Punkte gegliedert werden (Järvinen et al. 2005 und 2014):

1. Zerstörung: Das geschädigte Areal der Muskelfaser wird nekrotisch. Das entstehende Hämatom führt zur Aktivierung des inflammatorischen Systems. Der Einstrom von Calcium und die Aktivierung von Proteasen führen zu weiterem Zellschaden (Chargé et Rudnicki 2004). Ein sogenanntes Kontraktionsband wird geformt und die intakten Enden der gerissenen Faser werden durch ein neues Sarkolemm verschlossen und der Schaden wird so begrenzt.
2. Reparatur: Einwandernde Makrophagen phagozytieren das nekrotische Zellmaterial und aktivieren Fibroblasten. Innerhalb des intakten

Basalmembranschauches proliferieren Satellitenzellen und differenzieren zu Myoblasten. Myotuben entstehen innerhalb weniger Tage, fusionieren mit der Muskelfaser und durchdringen die bindegewebige Umbauzone. Die ersten Kapillaren zeigen sich 3 Tage post trauma.

3. Remodeling: In dieser Phase bildet die Muskelfaser ihren kontraktilen Apparat und myotendinöse Verbindungen zu Kollagenfasern des Narbengewebes aus. Die Narbe entsteht durch Fibroblasten, welche sich zu Myofibroblasten differenzieren, sodass die Narbe durch Kontraktion dieser auf ein gewisses Maß schrumpft. Die fibröse Narbe enthält Fibronectin und Tenascin-C, beides Glykoproteine mit elastischen Eigenschaften.

Der Aufbau der Muskelfasern und die Bildung der fibrösen Narbe sind parallel ablaufende, kompetitive Prozesse, welche aufgrund eines komplexen, jedoch ausgeglichenen Zusammenspiels verschiedener Zellen und Faktoren in Abhängigkeit vom Weichteilschaden zu einer erfolgreichen Wiederherstellung der ursprünglichen Muskelfunktion führen können.

Auf humoraler Ebene wandern aufgrund der Gefäßverletzungen und gestörten Kapillarpermeabilität neutrophile Granulozyten direkt in die Wunde ein. Das Komplementsystem wird aktiviert. Thrombozyten und Leukozyten setzen den PDGF (platelet-derived growth factor), Interleukine, Leukotriene und Prostaglandine frei und stimulieren die Einwanderung von Makrophagen (Benninghoff et Drenckhahn 2003). Zudem werden diese chemotaktisch durch Satellitenzellen und das Nekroseareal angelockt (Chazaud et al. 2003). Makrophagen und Fibroblasten bilden weitere Wachstumsfaktoren und pro-/antiinflammatorische Zytokine, senden proliferative Signale an Satelliten- und Endothelzellen und regen so die Angiogenese an (Benninghoff et Drenckhahn 2003; Chargé et Rudnicki 2004).

Des Weiteren existieren inaktivierte, an die extrazelluläre Matrix gebundene Wachstumsfaktoren, welche bei Störung der Zellintegrität aktiviert und freigesetzt werden können. Zu den Wachstumsfaktoren, welche in der Muskelregeneration eine Rolle spielen, gehören unter anderem TNF- α (tumor necrosis factor- α), FGF (fibroblast

growth factor), IGF (insulin-like growth factor), TGF- β (transforming growth factor- β), HGF (hepatocyte growth factor), IL-1 β (Interleukin-1 β), IL-6 (Interleukin-6), PDGF (platelet-derived growth factor), NGF (nerve growth factor) und Stickstoffmonoxid (NO), welche wiederum eine Vielzahl von Zellen beeinflussen können und so weitere Signalwege in Gang setzen (Kasemkijwattana et al. 1998; Chargé et Rudnicki 2004; Järvinen et al. 2005). Allen et al. zeigten in vitro, dass Satellitenzellen durch HGF stimuliert werden können (Allen et al. 1995). Des Weiteren scheinen IGF-I und IGF-II die Satellitenzellproliferation und –differenzierung zu fördern (Chargé et Rudnicki 2004). TGF- β 1 ist dagegen profibrotisch, indem es chemotaktisch auf Makrophagen und Leukozyten wirkt, welche wiederum über mitogene Faktoren wie FGF Fibroblasten aktivieren (Philippou et al. 2008). Das Interleukin 6 scheint in geringeren Mengen die Aktivierung von Satellitenzellen und die Muskelfaserregeneration zu unterstützen, wohingegen chronisch erhöhte Spiegel mit Muskelschwund in Verbindung stehen (Belizário et al. 2016). In dem komplexen Zusammenspiel von De- und Regeneration der Muskulatur während des Heilungsprozesses sind die konkreten Signalwege jedoch nicht vollständig geklärt.

1.1.6 Beeinträchtigung der Mikrozirkulation

Der Muskel ist ein sehr gut perfundiertes Organ. Das Muskelgewebe kann sich jedoch nur regenerieren, wenn die nutritive und metabolische Versorgung über eine funktionierende Mikrozirkulation gewährleistet ist.

Auf vaskulärer Ebene führt die direkte Schädigung der Gefäße zu einer mikrovaskulären Dysregulation mit Stase in und Kollaps von Kapillaren sowie verminderter Oxygenierung aller beteiligten Gewebe. Die Freilegung subendothelialen Kollagens aktiviert Leukozyten in den postkapillären Venolen. Diese bilden freie Radikale. Die Zellintegrität wird gestört mit konsekutiver Permeabilitätserhöhung, Elektrolytverschiebungen und weiterer Gewebeazidose (Schaser et al. 1999). Dieser Prozess kann dann postischämisch zu einem gefürchteten Reperfusionsschaden führen (Blaisdell 2002).

Utvag konnte 1998 aufzeigen, dass eine experimentelle, mechanische Trennung der Muskulatur vom Periost zu einer schlechteren Kallusformation führte - dies zum Beispiel durch Verhinderung einer Kapillareinsprossung und Einwanderung von pluripotenten, mesenchymalen Zellen aus der Muskulatur in den Knochen (Utvag et al. 1998). Es ist nachgewiesen, dass Muskel und Knochen eine kollaterale Blutversorgung aufweisen, unter anderem über periostale Kollateralen (Byrd et al. 1981; Richards et Schemitsch 1989; Whiteside et Lesker 1978a und 1978b).

Zhang et al. konnten die Beeinträchtigung der Mikrozirkulation nach einer geschlossenen Tibiafraktur im Rattenmodell darstellen (Zhang et al. 2003). Die Ergebnisse zeigten unmittelbar nach dem Trauma eine heterogene Perfusion des traumatisierten Muskels mit schwerer mikrovaskulärer Dysfunktion und im Folgenden die Ausbildung eines Muskelödems. Auch ein isolierter Weichteilschaden führt zu ähnlicher Beeinträchtigung der periostalen Durchblutung, wie Schaser et al. 2003 mittels intravitaler Mikroskopie zeigen konnten (Schaser et al. 2003).

1.1.7 Therapiestandard

Die Wahl der Therapie ist abhängig von der Frakturform und zusätzlichen Komplikationen wie Weichteilverlusten, Gefäß- und Nervenverletzungen und die Beteiligung weiterer Organe, z. B. bei einem Polytrauma. Allgemeine Ziele sind hierbei die Wiederherstellung der Funktion, knöchernen Stabilität, achsengerechten Stellung sowie die Weichteilkonsolidierung und Vermeidung von Pseudarthrosen. Dabei scheint die suffiziente Weichteildeckung mit einer zügigen Frakturheilung zu korrelieren (Sarmiento et al. 1989). Das Ausmaß der Weichteilschädigung ist somit primär entscheidend für das Frakturmanagement.

Eine konservative Therapie sollte nur bei stabilen, nicht-dislozierten Brüchen und bei Kontraindikationen gegen eine Operation erwogen werden. Sie ist selten indiziert und wird oft nur bei Kindern angewandt. In diesem Fall erfolgt eine Ruhigstellung im

Oberschenkelgipsverband, anschließend kann eine funktionelle Behandlung mittels Brace erfolgen (Stürmer 1999).

Es sollte die frühzeitige, primäre Versorgung angestrebt werden. Absolute OP-Indikation besteht bei offenen Frakturen, bei starker Dislokation, bei Gefäß-/Nervenverletzungen, bei einem Kompartmentsyndrom und bei Polytraumata (Märdian et al. 2015).

Der Einsatz eines Fixateur externe als winkelstabiles Instrument ist klinisch erprobt, einfach zu handhaben und universell einsetzbar. Aufgrund verbesserter Möglichkeiten der temporären Weichteildeckung mit synthetischem Hautersatz (EPIGARD®) oder durch Unterdruck-Wundtherapie (V.A.C.®) können heute selbst Frakturen vom Typ IIIb primär intramedullär stabilisiert werden, wenn eine zügige Weichteildeckung absehbar ist. Prioritätengerecht ist beim polytraumatisierten Patienten die Erstversorgung mittels Fixateur externe Mittel der Wahl mit folgendem zweizeitigem Verfahrenswechsel. Ebenso werden infizierte Frakturen und ausgedehnte Weichteilschäden primär extern fixiert (Märdian et al. 2015).

Die intramedulläre Stabilisierung ist heute eine bevorzugte Methode. Neue Nägel erlauben auch die Versorgung von metaphysären Frakturen, welche zusätzlich durch eine Repositionsplattenosteosynthese unterstützt werden können. Kontrovers diskutiert wird hier die aufgebohrte versus unaufgebohrte Marknagelung, wobei die aufgebohrte Technik zu einer größeren Frakturstabilisierung beiträgt, jedoch die enossale Durchblutung beeinträchtigt und zu Fettembolien führen kann (Märdian et al. 2015). Einige Autoren sehen ein besseres Outcome bei letzterer Methode, andere Untersuchungen können wiederum keinen signifikanten Vorteil für das Outcome feststellen (Li et al. 2013; Deleanu et al. 2014). Bhandari et al. zeigten einen klaren Vorteil der unaufgebohrten Marknagelung im Vergleich zum Fixateur externe auf (Bhandari et al. 2001). Obwohl Untersuchungen nahelegen, dass die Marknagelung die Inzidenz eines Kompartmentsyndroms nicht erhöht, ist eine Druckerhöhung im Kompartiment nicht auszuschließen, sodass das endgültige Vorgehen letztlich im Ermessen des Operateurs liegt (McQueen et al. 1990).

Die Therapie schwerer, offener Frakturen (Typ IIIb/c) folgt einem klaren Algorithmus (Märdian et al. 2015): Auf ein radikales Débridement folgt bei einem ausgeprägten Weichteilverlust oder Gefäßverletzungen eine primäre Resektion der Fraktur. Nach erfolgreicher Revaskularisierung kann eine externe Fixation erfolgen und hiernach gegebenenfalls ein Re-Débridement und 2nd-/3rd-Look-Operationen. Ist der Wundgrund granulationsfähig, können ein wundokklusiver Vakuumverband und ein Spalthauttransplantat (Meshgraft) den Weichteildefekt überbrücken. Andernfalls muss eine lokale oder freie, mikrochirurgische Lappenplastik erfolgen. Zur Wiederherstellung eines segmentalen Knochendefektes kann eine Distraction mit Segmenttransport in Betracht gezogen werden (siehe Kapitel 1.2). Im Verlauf kann eine Spongiosaplastik erforderlich werden. Ohne Knochenverlust kann eine definitive Osteosynthese erfolgen - ausgenommen Typ IIIb und IIIc Frakturen nach Gustilo und Anderson (siehe Kapitel 1.1.2).

Die Versorgungszeitpunkte werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Dies betrifft den Zeitpunkt des Débridements, des Wundverschlusses bzw. Lappentransfers und der endgültigen Fixierung (Fulkerson et Egol 2009).

Die Weichteilkonsolidierung ist abhängig von der Perfusion, der Innervation und der knöchernen Stabilisierung. Umgekehrt scheint ein intakter Weichteilmantel eine Barriere gegen Wundinfektionen zu sein und somit die Frakturheilung zu begünstigen. Unter anderem zeigten Cole et al., dass eine unverzügliche fasziokutane Lappenplastik mit verzögerter unaufgebohrter Marknagelung gute Ergebnisse bezüglich Heilungs-, Infektionsrate und Folgeoperationen erzielte (Cole et al. 1995). Verschiedene Studien legen nahe, dass Frakturen vom Typ I – IIIa vom verzögerten Wundverschluss profitieren, wohingegen Typ IIIb/c-Frakturen eine zügige Weichteilrekonstruktion erfordern (Giannoudis et al. 2006). So auch die Ergebnisse von Gopal et al.: Bei Typ IIIb/c-Frakturen wurden die besten Ergebnisse nach radikalem Débridement, interner Frakturstabilisierung und unmittelbarer Weichteildeckung mittels Lappenplastik erzielt (Gopal et al. 2000).

Auch Lappenplastiken zeigen nur einen Erfolg, wenn sie adäquat durchblutet sind, unabhängig davon, ob es eine gestielte oder freie Lappenplastik ist (Utvag et al. 2002).

Bei offenen Frakturen sollte eine kalkulierte antibiotische Therapie so früh wie möglich begonnen und gezielt antibiogrammgerecht fortgesetzt werden (Gustilo et al. 1976). Nosokomiale Infektionen werden nach Patzakis und Wilkins mit 44% angegeben (Patzakis et Wilkins 1989).

1.2 Die akute Beinverkürzung mit nachfolgender Distraktionsosteogenese

Ein adäquates Débridement von Weichteilen und Knochen und eine minimal invasive Fixationstechnik steigern die lokale Gewebepfusion, reduzieren Infektionen und unterstützen die Knochenheilung (Meffert et al. 2000a). Nach einer schweren Unterschenkelfraktur mit Weichteilschaden oder nach ausgedehntem Débridement kann die akute Resektion des deperiostierten, avitalen Bereiches der Tibia eine bessere Weichteildeckung durch Reduktion der muskulären Vordehnung ermöglichen (Meffert et al. 2007). Dieses Vorgehen wird allerdings limitiert durch eine ungenügende lokale Weichteildeckung und die eingeschränkte Resektionslänge, da es bei einer Tibiaverkürzung um mehr als zehn Prozent zu einem Abknicken von Gefäßen und zu einer venösen und lymphatischen Stase kommen kann (Möllenhoff 1997). Je nach Größe und Schwere des Weichteildefektes könnte jedoch in bestimmten Fällen auf Lappenplastiken mit ihren Sekundärkomplikationen, wie Defekten am Entnahmeort oder Durchblutungsproblemen, verzichtet werden.

Hierbei wird nach einer Osteotomie die natürliche Fähigkeit des Knochengewebes genutzt, sich durch Zug und Mikrobewegungen unter Kallusbildung zu regenerieren. So können langstreckige Knochendefekte oder auch eine Beinverkürzung ausgeglichen werden.

Eine grundlegende apparative Erfindung ist der Orthofix® von De Bastiani et al., ein unilateraler Fixateur mit der Möglichkeit der axialen Dynamisierung zur Kompression, Distraction oder zur Stellungskorrektur (De Bastiani et al. 1986). Ein weiterer Meilenstein ist die Anwendung eines Ringfixateurs zur Distraktionsosteogenese durch Ilizarov (Ilizarov 1989). In einer vergleichenden Untersuchung von Price und Mann scheint die Knochenbildung mit beiden Stabilisierungssystemen vergleichbar zu sein

(Price et Mann 1991). Welches Instrument zum Einsatz kommt, wird individuell je nach Ausgangssituation und Behandlungsziel des Patienten entschieden (Hankemeier et al. 2004).

Die Distractionsosteogenese kann monofokal oder bifokal mit zwei Osteo- oder Kortikotomien mit Segmenttransport erfolgen. Für gewöhnlich wird nach primärer Resektion eine sekundäre Osteotomie an der proximalen Tibia zur Kallusdistraction erzielt. Bei der monofokalen Technik können unter Umständen die posttraumatische Durchblutungssituation des lokal umgebenden Weichteilmantels, die Menge und Qualität des periostalen Kallus und die venöse und lymphatische Stase distal der Osteo- bzw. Kortikotomie Probleme bereiten. Diese Methode könnte jedoch zusätzliche Operationen und Gewebeschädigungen verhindern (Meffert et al. 2000a).

Instrumentell kann die Kallusdistraction mittels externer Fixateure (Ring-, Hybrid-, Hexapod-Fixateur), nach dem Monorail-Verfahren (Fixateur externe und Marknagel) oder speziellen intramedullären Verlängerungsnägeln (z. B. Distraction durch Rotationsbewegungen) erfolgen. Die Distraction wird nach einer Latenzzeit von durchschnittlich zehn Tagen begonnen, um eine Organisation des Frakturhämatoms, eine Revaskularisierung und Periostregeneration zu ermöglichen (Hankemeier et al. 2004).

Die primäre Verkürzung einer Extremität ist eine Sonderform des Débridement zur besseren Weichteildeckung und Reduktion des Kompartimentdruckes bei schweren Unterschenkelfrakturen (Muhr et Möllenhoff 1998). Möllenhoff untersuchte in diesem Rahmen die Auswirkungen unterschiedlicher Resektionslängen bei offenen Frakturen mit schwerem Weichteilschaden in einem Kaninchenmodell. Als optimale Resektionslänge eruierte er 10% der Tibiaausgangslänge. Hierunter konnte eine dauerhafte Kompartimentdrucksenkung beobachtet werden, nachdem ein standardisiertes Trauma mit Tibiafraktur, 30-minütiger Kontusion und 90-minütiger Ischämie gesetzt wurde. Bei kürzeren Resektaten fiel der Kompartimentdruck nicht in den Normbereich ab. Längere Resektionssegmente führen am ehesten zu einer Kompression der Gefäße und Lymphwege sowie zu einer Stauchung der Muskulatur und erhöhen die Gefahr für ein Kompartimentsyndrom (Möllenhoff 1997).

Meffert et al. verglichen im Jahre 2000 die monofokale Distraktionsosteogenese nach Extremitätenverkürzung mit der einfachen Kallusdistraktion im Kaninchenmodell (Meffert et al. 2000b). Die Testgruppe wurde einer diaphysären Tibiaverkürzung um 10% der Ausgangslänge und einer monofokalen Distraktion mit einem Fixateur externe unterzogen. Die Kontrollgruppe erhielt eine Osteotomie ohne Verkürzung mit folgender Kallusdistraktion. Biomechanisch ergaben sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Das Kallusregenerat hatte in der Testgruppe jedoch einen signifikant größeren Durchmesser bei verzögertem Remodeling. Ferner zeigten sich im gleichen Tiermodell die monofokale und bifokale Distraktionsosteogenese nach akuter Beinverkürzung bezüglich Biomechanik und Kallusdichte gleichermaßen effektiv (Meffert et al. 2000a). 2007 untersuchten Meffert et al. den Einfluss eines zusätzlichen Weichteiltraumas auf die Frakturkonsolidierung nach Tibiaresektion und monofokaler Distraktionsosteogenese (Meffert et al. 2007). Die Testgruppe wurde, wie auch vorliegender Arbeit zugrundeliegend, mit einem Kontusionstrauma und begleitender Ischämie behandelt (Möllenhoff 1997; Frey 2005). Danach erfolgte eine Resektion von 10% der Tibialänge in der Test- und Kontrollgruppe. Die Kontrollgruppe wurde jedoch nicht traumatisiert und erhielt eine Kompartimentdruckmessung, wobei hier der normale Logendruck durch eine alleinige Extremitätenverkürzung nicht beeinflusst wurde. Beide Gruppen zeigten eine knöcherne Konsolidierung. Die Testgruppe wies jedoch aufgrund der Weichteilverletzung eine geringere Torsionskraft (46% versus 64%), ein niedrigeres Kallusvolumen und einen geringeren Kallusdurchmesser auf.

Diese Versuche legen nahe, dass eine monofokale Distraktionsosteogenese nach akuter Beinverkürzung eine effektive Alternative in der Behandlung schwerer Unterschenkelfrakturen sein kann, da das Verfahren Folgeoperationen vermeiden und Weichteile schonen kann.

1.3 Unterstützung der Muskelregeneration

Auf dem Gebiet des „Tissue Engineering“ wird seit vielen Jahren hinsichtlich der Verbesserung der Muskelregeneration geforscht, beispielsweise zu Therapieansätzen für

angeborene Muskelkrankheiten wie der Muskeldystrophie Duchenne. Diese Ergebnisse bringen einen enormen Wissenszuwachs.

Ein großes Gebiet neben der Gentherapie ist die Stammzelltherapie. Hier werden experimentell myogene Vorläuferzellen direkt in den Muskel injiziert oder mit Hilfe eines Trägermaterials eingebracht. Eine weitere Möglichkeit besteht in dem Einbringen des azellulären Trägermaterials, welches abgebaut wird und durch Zytokinausschüttung zu einer Aktivierung myogener Vorläuferzellen führt (Sicari et al. 2014).

Problematisch ist unter anderem, dass die Zellen nur kurze Distanzen migrieren können, eine systemische Applikation zu einer Infiltration von anderen Organen führen kann sowie die geringe Verfügbarkeit frischer Spenderzellen. Es gibt Hinweise, dass eine in vitro Kultivierung die Funktionalität der Zellen beeinträchtigen kann. Das größte Problem ist der Transfer in den Empfänger. Forscher gehen jedoch davon aus, dass nicht die transferierten Zellen für eine verbesserte Geweberegeneration verantwortlich sind, sondern die parakrinen Einflüsse und Zytokine dieser auf das Empfängergewebe. Viele Vorläuferzellen können durch Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die die Angiogenese stiumulieren, immunmodulativ wirken (Sicari et al. 2014).

1.3.1 Grundlagen der Angiogenese

Die Vaskulogenese beschreibt die Neuformation von Gefäßen in der Embryonalphase aus mesodermalen Angioblasten. Die Angiogenese benennt wiederum die Ausbildung eines Gefäßnetzwerkes aus bestehenden Gefäßen (Potente et al. 2011).

Es existieren verschiedene Formen der Gefäßneuformation (Carmeliet et Jain 2011):

- „Sprouting“ Angiogenese
- Postnatale Vaskulogenese: durch Rekrutierung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark oder endothelialen Vorläuferzellen aus der Gefäßwand
- Intussuszeption: eine Form der Gefäßaufspaltung
- Speziell für Tumorzellen: das Kooptieren von bestehenden Gefäßen, vaskuläre Mimikry, endotheliale Differenzierung von Tumorstammzellen

Endothelzellen kleiden alle Gefäße aus und bilden eine einzellige Lage. Kontraktile Perizyten umschließen Endothelzellen und regulieren über Faktoren wie den vascular endothelial growth factor (VEGF) und Angiopoietin-1 (ANG-1) deren Proliferation. Des Weiteren besitzen Endothelzellen O₂-Sensoren und Transkriptionsfaktoren wie den hypoxie-induzierten Faktor-2 α (HIF-2 α), über welche der Blutfluss reguliert werden kann. Endothelzellen und Perizyten bilden eine gemeinsame Basalmembran (Carmeliet et Jain 2011; Birbrair 2015).

Die Mehrzahl der Gefäße wird durch die Aussprossung („sprouting“) gebildet. Hypoxie, Inflammation oder mechanischer Stress führen zu einer Freisetzung angiogener Faktoren wie VEGF, ANG-2 (Angiopoietin-2), FGF (fibroblast growth factor). Diese wirken auf die Endothelzelle. Sie setzt Matrix-Metalloproteasen frei, welche die Basalmembran proteolytisch abbauen und sowohl die Perizyten als auch extrazellulär gebundene Faktoren wie VEGF und FGF freisetzen. Die Zellverbindungen werden gelöst und das Gefäß dilatiert. Die Endothelzelle bildet Filopodien aus und wird motil. Aufgrund der Permeabilitätserhöhung bilden Plasmaproteine eine provisorische extrazelluläre Matrix. Die Endothelzelle wird zur Leitzelle („tip-cell“) berufen und folgt dem angiogenen Signal, wohingegen benachbarte Zellen („stalk-cells“) proliferieren und so einen Endothelschlauch mit Lumen formen (unter anderem über Faktoren wie NOTCH, CD34 und VEGF). Das Konstrukt kann mit anderen Kollateralen anastomosieren. Während ihrer weiteren Reifung werden die Endothelzellen durch Perizyten stabilisiert (Carmeliet et Jain 2011; Martino et al. 2015). Spezielle Signale führen zu einer arteriellen oder venösen Differenzierung mit intramuraler Differenzierung von glatten Muskelzellen. Die Rolle vieler Chemokine, Integrine und Transkriptionsfaktoren ist in dem komplexen Zusammenspiel noch nicht hinreichend geklärt (Potente et al. 2011).

Järvinen hat 1976 die Kapillareinsprossung im Rattenmodell mikroangiographisch untersucht. Hier sprossen die neuen Gefäße aus den verletzten Stümpfen direkt in das Wundareal ein (Järvinen 1976). Ohne Vaskularisierung endet der Regenerationsprozess auf der Stufe der Myotuben, welche aufgrund geringer Mitochondrienzahl vornehmlich

einen anaeroben Stoffwechsel aufzeigen. Gleiches gilt für die Innervation der Muskelfasern (Järvinen et al. 2005).

1.3.2 Das cysteinreiche Protein 61

Das cysteinreiche Protein 61 gehört zur CCN-Proteinfamilie, welche aus sechs Mitgliedern besteht (Brigstock et al. 2003):

- CYR61 (cysteine-rich 61, CCN1)
- CTGF (connective tissue growth factor, CCN2)
- NOV (nephroblastoma overexpressed, CCN3)
- CCN4 (WISP1)
- CCN5 (WISP2)
- CCN6 (WISP3)

Die Erstbeschreibung erfolgte 1985 durch Lau und Nathans als Serum-induzierbares immediate-early-gene (Lau et Nathans 1985). Das humane CYR61 wird auf dem kurzen Arm des Chromosoms 1 kodiert (Jay et al. 1997).

Die Mitglieder haben eine homologe Proteinstruktur mit einem N-terminalen sekretorischen Peptid, gefolgt von vier konservierten Domänen mit Sequenzhomologien zum insulin like growth factor-bindenden Protein (IGFBP), von-Willebrand-Faktor TypC, Thrombospondin Typ1 und eine cysteinreiche Domäne am C-terminalen Ende. Die Proteine besitzen 38 hochkonservierte Cysteinreste (ca. 10%). Die Domänen interagieren mit verschiedenen Faktoren und Proteinen (Bork 1993; Chen et Lau 2009).

CYR61 wird unter anderem in Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Osteoblasten und mesenchymalen Stammzellen gebildet, sezerniert und nicht-kovalent an die extrazelluläre Matrix und die Zelloberfläche gebunden (Lechner et al. 2000; Lau 2011; Estrada et al. 2009). Es wird als matrizelluläres Protein bezeichnet, da es in der extrazellulären Matrix (EZM) keine strukturelle Aufgabe erfüllt, sondern als EZM-assoziiertes Zell-Adhäsions-Molekül fungiert (Bornstein et Sage 2002).

Nach Stimulation der Zelle durch Wachstumsfaktoren unterstützt CYR61 die Zelladhäsion durch Bindung an Integrine. Zu diesen Faktoren gehören unter anderem TGF- β 1, IL-1, TNF α , PDGF, FGF2, GH, Hypoxie und HIF1 α , Vitamin D3, UV-Licht und mechanischer Stress. Das Protein spielt in gegensätzlichen, biologischen Prozessen eine Rolle. CYR61 fördert zum einen die Zellproliferation und das Zellüberleben. Andererseits kann es durch die Unterstützung von TNF α die Apoptose und eine Zellalterung über Integrin $\alpha_6\beta_1$ induzieren sowie das Tumorwachstum hemmen oder unterstützen. Die Funktion ist abhängig vom jeweiligen Integrin-Typ der Zelle und dem Heparansulfat-Proteoglykan. Zielzellen können wiederum Fibroblasten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen und Nervenzellen sein (Lau 2011; Brigstock 2003).

Der Wachstumsfaktor spielt eine wichtige Rolle in der plazentaren und fetalen Entwicklung, wobei CYR61-knock-out-Mäuse aufgrund einer vaskulären Insuffizienz und Beeinträchtigung der Gefäßintegrität versterben (Mo et al. 2002).

Neben der Funktion in der Vaskulogenese während der Embryonalperiode zeigt CYR61 auf folgenden Gebieten eine wichtige modulatorische Wirkung (Lau 2011):

- *Wundheilung und Fibrose:* Durch gesteigerte CYR61-Expression von Myofibroblasten während der Remodeling-Phase wird deren Zellalterung induziert, wodurch die Fibrosierung sich selbst limitiert (siehe auch Kapitel 1.1.5).
- *Angiogenese:* Durch Bindung an Integrin $\alpha_v\beta_3$ von Endothelzellen werden Zelladhäsion, -migration und -proliferation angeregt. Zudem können CD34⁺-Vorläuferzellen zu Endothelzellen rekrutiert und die Expression von VEGF-A und VEGF-C reguliert werden (Grote et al. 2007; Yu et al. 2008).
- *Inflammation:* TNF α , IL-1, bakterielle und virale Infekte können die Expression von CYR61 induzieren. Dieses wirkt wiederum modulatorisch auf die Zytokine.

- *Osteo- und Chondrogenese*: Die Differenzierung von Osteoblasten kann stimuliert und die der Osteoklasten gehemmt werden. Weiterhin ist CYR61 *in vitro* in der chondrogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen hochreguliert.

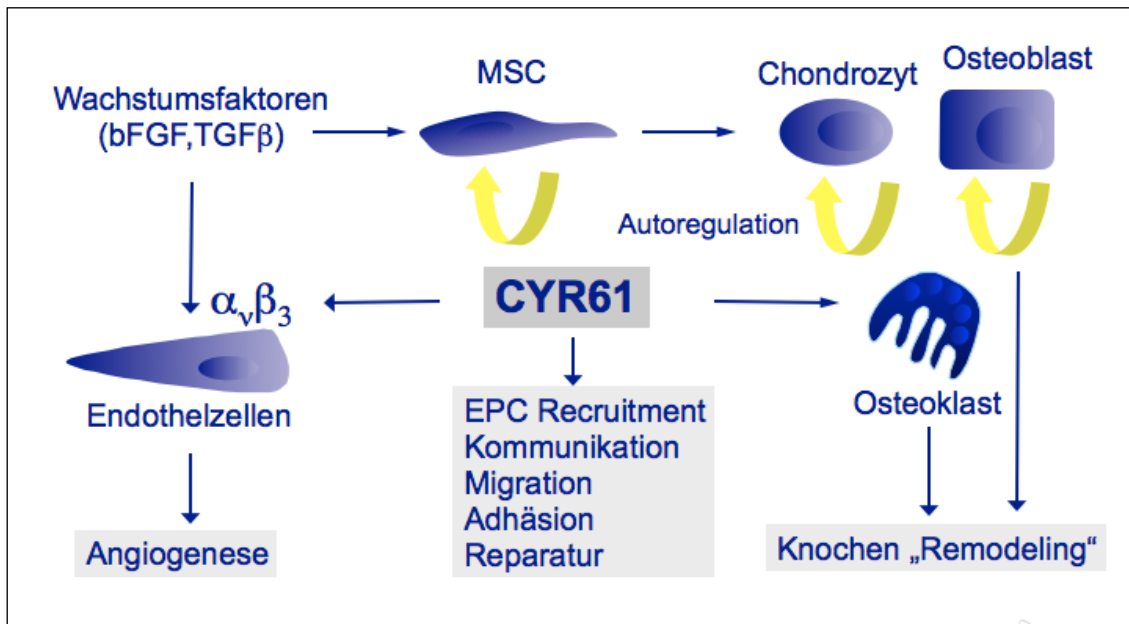


Abb. 2: Modell der CYR61-Wirkung; MSC: mesenchymale Stammzellen, EPC: endotheliale Progenitorzellen (Quelle: Schütze et Jakob, Orthopädisches Zentrum für muskuloskeletale Forschung in Würzburg, Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Norbert Schütze)

1.4 Traumamodell

Basierend auf den Experimenten von Möllenhoff, Meffert und Frey (siehe Punkt 1.2), erfolgten die Untersuchungen an einer Gruppe skelettreifer, männlicher Kaninchen der Rasse „Weiße Neuseeländer“ (Möllenhoff 1997; Meffert et al. 2000a; Frey 2005; Meffert et al. 2007; Meffert et al. 2008).

Der vorliegende Versuch baut auf dem Experiment von Frey (2005) auf. Nach demselben Verfahren wird ein standardisiertes Trauma erzeugt und es folgen eine Kompartimentdruckmessung und die reproduzierbare, nicht-invasive Quantifizierung der

Muskelkraft im Kaninchenmodell. Erstmals wird hier jedoch der angiogene Wachstumsfaktor CYR61 lokal appliziert und dessen Auswirkungen auf die Muskelkraftregeneration untersucht. Die nicht mit CYR61 behandelte, so genannte „unbehandelte“ Kontrollgruppe von Frey (2005) mit einer Gruppengröße von 11 Tieren dient als Vergleichsgruppe.

Seitenalternierend wurde ein Bein operiert, die unbehandelte Gegenseite diente jeweils als Kontrolle.

Nach präoperativer Vorbereitung und Lagerung der Tiere, wurde durch Erzeugen einer Ischämie und mittels einer standardisierten Traumatisierung des M. tibialis anterior eine akute Kompartimentdruckerhöhung in der Tibialis-anterior-Loge hervorgerufen. Der Logendruck wurde präoperativ vor und nach Ischämie mit Kontusionstrauma, nach Beinverkürzung sowie 8 h, 24 h und 48 h postoperativ mit einem piezoelektrischen Druckaufnehmer (Sonde: MIPM GmbH, Hattendorf, Deutschland; komplette Messeinheit „Kodiag“: Braun-Dexon GmbH, Spangenberg, Deutschland) gemessen. Durch Verkürzung des Tibiaschaftes um 10 mm (entspricht 10% der Tibiagesamtlänge; vgl. Möllenhoff 1997, Habilitationsschrift Ruhr-Universität Bochum) unter Schonung des umgebenden Weichteilmantels erfolgte die Senkung des Logendruckes. Mit Hilfe eines Fixateur externe (ORTHOFIX® M-103, Orthofix SRL, Verona, Italy) wurde der entstandene Knochendefekt unter kompressionsfreier Annäherung der Fraktarenden stabilisiert. Es folgte die zirkumferente Einlage eines 0,5 cm² (ca. 0,25 cm³) großen, mit CYR61 imprägnierten Kollagenträgers um den Frakturspalt und innerhalb des intakten Weichteilmantels. Der Kallus wurde ab dem 11. postoperativen Tag mit einer Geschwindigkeit von 0,5 mm/12 h über zehn Tage distrahiert bis die ursprüngliche Länge wiederhergestellt war. Der arterielle Blutdruck wurde prä- und perioperativ über die Arteria auricularis invasiv gemessen und mit einer Powerlab-Messeinheit (PowerLab 2/20, ADInstruments, WissTech GmbH, Spechbach) dokumentiert. Zur Beurteilung der lokalen Mikrozirkulation im M. tibialis anterior wurde das O₂C („oxygen to see“, LEA Medizintechnik GmbH) prä-, intra- und direkt postoperativ herangezogen.

Die Muskelkraft wurde nicht-invasiv präoperativ, direkt postoperativ und bis zum 35. postoperativen Tag im Abstand von 5 Tagen gemessen. Dies geschah bilateral in vivo mit Hilfe einer eigens konstruierten Messeinheit, bestehend aus einem speziell gefertigten Messstuhl und einem Handdynamometer (Frey 2005; Meffert et al. 2008). Die transkutane elektrische Stimulation des N. peroneus communis über eine bipolare Elektrode hatte eine isometrische Kontraktion des M. tibialis anterior zur Folge (Amplitude = 5.1 mA, Dauer = 2.56 ms, Intervall = 50 ms). Über einen Kraftabnehmer (Handdynamometer, MLT003, ADInstruments, WissTech GmbH, Spechbach), welcher standardisiert auf dem Vorfuß installiert war, wurde die erzeugte Muskelkraft als elektrischer Wert (transducer) in Echtzeit gemessen und von der Powerlab-Messeinheit (2-Kanal-Aufnahmegerät, PowerLab 2/20, ADInstruments, WissTech GmbH, Spechbach) erfasst. Jede Messeinheit bestand aus 100 Einzelmessungen.

Postmortale histologische Untersuchungen umfassten vorrangig die Quantifizierung von Muskel- und Bindegewebe sowie eine Gefäßauszählung. Eine Bildgebung der Extremitäten mittels MRT sollte Hinweise auf Ödeme und Vernarbungen liefern.

1.5 Fragestellungen

Analog zu den Voruntersuchungen von Frey (2005) soll im vorliegenden Experiment der Effekt einer lokalen Applikation des angiogenen Wachstumsfaktors CYR61 auf die Muskelkraftregeneration untersucht werden. Hieraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Führt der Einsatz des CYR61 zu einer funktionellen Regeneration der Muskulatur mit Wiederherstellung der Muskelkraft?
2. Ist die Muskelkraftregeneration unter CYR61 besser als in der unbehandelten Kontrollgruppe von Frey (Frey 2005)?
3. Kann eine Reduktion der Fibrosierung unter CYR61 im Vergleich zur Kontrollgruppe erreicht werden?

4. Ist die angiogene Wirkung von CYR61 objektivierbar im Sinne einer vermehrten Gefäßbildung?
5. Wie ist die Freisetzungskinetik des CYR61 aus dem Kollagenträger?

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Betreuung der Tiere erfolgte im ZEMM Würzburg (Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin, Würzburg). Es handelte sich um ein IZKF-Projekt mit der Genehmigungsnummer „22/08 IZKF Projekt Dr. Frey 3/3“ für den Untersuchungszeitraum vom 16.08.2008 bis zum 15.08.2010.

Zur Untersuchung wurden 14 skelettreife, männliche Kaninchen der Rasse „Weiße Neuseeländer“ herangezogen. Diese wiesen ein durchschnittliches Körpergewicht von 3,8 kg auf. Die Auswahl der Versuchstiere minimierte somit mögliche Schwankungen der Messdaten durch Körpergröße, Geschlecht und Reifegrad der Tiere.

Auf eine Randomisierung konnte aufgrund der Homogenität der Gruppe bezüglich Rasse, Geschlecht, Größe und Gewicht der Tiere verzichtet werden. So erhielten die Tiere jeweils eine Kennzeichnung in alphabetischer Reihenfolge. Seitenalternierend erfolgte eine Definition des zu behandelnden Beines und dessen Markierung. Beginnend mit den Tieren A und B folgten nun täglich Operationen von je zwei Tieren durch dieselben Operateure wie in der Kontrollgruppe von Frey (Frey 2005).

2.2 Präoperative Vorbereitungen und Anästhesie

Zur Analgesie und Sedierung der Tiere wurde eine Mischspritze mit 2,6 mg/kgKG Xylazin und 40 mg/kgKG Ketamin in die Paravertebralmuskulatur appliziert. Nach ca. 5 Minuten tritt eine suffiziente Anästhesie und Narkose für eine Periode von ca. 30 Minuten ein. In dieser Zeit wurde die zu operierende Extremität zirkulär vom oberen Sprunggelenk bis 2 cm oberhalb des Kniegelenkes rasiert. Hier erfolgten auch die präoperativen Röntgenaufnahmen in zwei Ebenen.

Zur Laborabnahme und Ableitung des arteriellen Blutdruckes über die entsprechende Leitung wurde ein Venenverweilkatheter (Vasofix™ Braunüle, 20 G 1 ¼, 1,1 x 33 mm

bzw. BD Venflon™ Pro, 20 GA 1,26 IN, 1,1 x 32 mm) in die Arteria auricularis media eingeführt. Dieser wurde mit Hilfe von Klebebändern (Leukoplast® 2,5 cm x 5 m, BSN medical GmbH & Co KG) an der Ohrmuschel befestigt. Nach kurzer Wartezeit und Anstauen des Gefäßes mit einem von außen temporär angebrachten mikrochirurgischen Gefäßclip ließ sich ein weiterer Venenverweilkatheter (Vasofix™ Braunüle, 22 G1, 0,9 x 25 mm bzw. BD Venflon™ Pro, 22 GA 0,98 IN, 0,9 x 25 mm) perkutan in die V. auricularis lateralis vorschieben und mit Leukoplast® befestigen.

Die Überwachung der Vitalparameter erfolgte mit Hilfe des PowerLab (PowerLab 2/20, ADInstruments, WissTech GmbH, Spechbach) und richtete sich nach publizierten Wachwerten beim Kaninchen (Wolfensohn et Lloyd 2003).

Die Narkoseeinleitung und -erhaltung erfolgten mit einem Gemisch aus O₂ und N₂O im Verhältnis 2:1 mit 1-2%igem Isofluran über eine Mund-Nasenmaske und einem PEEP von 5. Postoperativ und nach Bedarf wurde zur Schmerzstillung der Tiere eine Kombination aus einem Analgetikum (Buprenorphin, 40 µg/kgKG) und einem Sedativum (Acepromazin, 1,3 mg/kgKG) in einem Depot (20 ml NaCl 0,9%) subkutan appliziert. Alternativ wurde den Tieren Carprofen s.c. 4 mg/kgKG einmal täglich (oral: 1,5 mg/kgKG alle 12 h) verabreicht.

Eine ausreichende Schmerzreduktion der Tiere ist ebenfalls unerlässlich für eine korrekte Bestimmung der elektrisch stimulierten, unwillkürlich erzeugten Muskelkraft. Daher erhielten die Tiere auch vor den Muskelkraftmessungen eine Mischspritze aus Xylazin (2,6 mg/kgKG) und Ketamin (40 mg/kgKG) intramuskulär.

2.3 Kompartimentdruckmessung und Kontusionstrauma

Die Messung des Kompartimentdruckes wurde präoperativ vor und nach Ischämie mit Kontusionstrauma, direkt postoperativ nach Beinverkürzung sowie 8 h, 24 h und 48 h postoperativ durchgeführt. Sie erfolgte invasiv, indem die Drucksonde direkt in die Muskelloge eingeführt wurde.

Zur initialen, präoperativen Messung des Kompartimentdruckes wurde das analgosedierte Versuchstier in neutraler Gelenkposition gelagert und das operierte Bein durch Sprühdesinfektion (Cutasept®, Bode Chemie, Hamburg) sterilisiert.

Nun folgten nach einer Hautinzision von ca. 3 mm das Einführen einer 14 G Venüle (orange) exakt 2 cm distal des M.-tibialis-anterior-Ursprunges, das Entfernen der Metallkanüle und das problemlose Vorführen der durch Alkohol desinfizierten 4F Drucksonde mit dem Druckaufnehmer (Sonde: MIPM GmbH, Hattendorf, Deutschland; komplette Messeinheit „Kodiag“: Braun-Dexon GmbH, Spangenberg, Deutschland) um 1-2 cm tief in die Tibialis-anterior-Muskelloge. Die Plastikvenüle wurde entfernt und die Drucksonde soweit zurückgezogen, bis eine widerstandsfreie Position 1,5 bis 2 cm distal der Inzisionsstelle gefunden war.

Für die Reproduzierbarkeit der Druckwerte sind die Lagerung der Extremität in Neutralposition und die exakte Platzierung der Drucksonde von entscheidender Bedeutung (Meffert et al. 2000a). Die Sensitivität und Genauigkeit des KODIAG-Gerätes wurden in Langzeitmessungen vom Hersteller getestet und durch Willy et al. (1999) experimentell und klinisch aufgezeigt.



Abb. 3: Kontusionstrauma (Quelle: Frey 2005, Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. R. H. Meffert und Herrn Prof. Dr. S. Frey)

Anschließend wurde das Tier für die Operation in Rückenlagerung positioniert und über eine Mund-Nasenmaske mit einem Gemisch aus O₂ und N₂O im Verhältnis 2:1 mit 1-2%igem Isofluran und einem PEEP von 5 narkotisiert.

Die Druckwerte mussten nach Manipulation der Gelenkstellung und äußerem Druck auf die gleiche Höhe zurückfallen. Die gemessenen Logendrucke wurden dokumentiert und bei konstantem Kompartimentdruck über mindestens 5 Sekunden konnte die Blutsperre unsteril ca. 2 cm oberhalb des Kniegelenkes angelegt werden. Die Ischämiezeit in Blutsperre betrug insgesamt 90 Minuten. Nach Anlage der Blutsperre mittels Tourniquet konnte die Kontusionsklemme (Biomechanik der Universitätsklinik Münster) mit 7 N (=10 N auf 1 cm² nach Hebelkorrektur = 100 kPa) auf 1 cm² mit der Druckplatte exakt distal der Einstichstelle der Kompartimentdrucksonde für genau 30 min angesetzt werden. Die Klemme musste exakt auf der Kontusionsstelle manuell gehalten werden.

Sobald die 90-minütige Ischämiezeit abgelaufen war, wurde die Blutsperre geöffnet und eine erneute Kompartimentdruck-Messung konnte initiiert werden.

Bei einem unmittelbar postoperativen Kompartimentdruck von über 20 mmHg erfolgte eine erneute Messung nach 1 Stunde. Im Falle eines 8 h postoperativ gemessenen Kompartimentdruckes von über 20 mmHg war eine Faszienpaltung vorgesehen, jedoch in unseren Versuchen nicht notwendig gewesen.

2.4 Kollagenmatrix und rCYR61-Fc

In der Testgruppe wurde eine Kollagenmatrix (RESORBA[®], PARASORB[®] HD, 1 cm² enthält 5,6 mg equine, native Kollagenfibrillen) in einer einheitlichen Größe von 1 cm x 0,5 cm x 0,5 cm mit 25 µg/ml CYR61 versetzt und zirkumferent um den Frakturspalt gelegt, sodass der Träger innen der Fraktur und außen der Muskulatur der Tibialis-anterior-Loge anlag. Die Matrices wurden mittels Stahllineal und einem Skalpell zugeschnitten.

Das matrizelluläre Protein CYR61 wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Schütze aus dem Orthopädischen Zentrum für muskuloskelettale Forschung im König-

Ludwig-Haus Würzburg zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um ein rekombinantes Fusionsprotein (Schütze et al. 2005). Die RNA des hCYR61 wurde vormals aus TNF α -stimulierten humanen Osteoblasten (hFOB-Zellen) extrahiert (Schütze et al. 1998). Es wurde ein Baculovirus-Transfervektor erstellt, in welchen die Sequenzen für CYR61 und die Fc-Domäne von humanem IgG kloniert wurden (Schütze et al. 2005). Nach Transfektion des viralen Vektors in SF-21-Insektenzellen konnte das synthetisierte Fusionsprotein aus dem Zellkulturüberstand gewonnen werden. Dabei diente der sogenannte Fc-tag der Aufreinigung und Auftrennung in einer Affinitätschromatographie. Im gewonnenen Eluat wurde der Proteingehalt nach Bradford bestimmt. Die Reinheit des Proteins wurde in einer Silbergefärbung und einem Western Blot kontrolliert.

Die Wahl der Proteinkonzentration erfolgte orientierend an der applizierten VEGF-Dosis in einer parallelen Untersuchung am selben Traumamodell (Frey et al. 2012). Hier lag die Proteinkonzentration bei 12 μ g bei intrazellulärer Wirkung des VEGF. Da CYR61 einen extrazellulären Angriffspunkt besitzt, wurde hier eine doppelt so hohe Konzentration gewählt (Lechner et al. 2000).

Die Proben wurden nach Empfehlung von Prof. Dr. rer. nat. Schütze mit PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) aufgefüllt und zuvor in 1,5 ml tubes auf Eis gelagert. In Anlehnung an die klinische Handhabung der BMPs (bone morphogenic proteins) wurde das Vlies ca. 15-20 Minuten vor der Implantation mit 1 ml der Lösung mit 25 μ g/ml rCYR61-Fc über eine Spritze beträufelt. Eine längere Inkubation auf dem Vlies entfiel.

2.5 Operatives Vorgehen und Kallusdistraction

Die Operation wurde analog zur Voruntersuchung durch Frey durchgeführt (Frey 2005). Nach OP-Standard wurde der OP-Tisch steril gedeckt und das Operationsfeld desinfiziert. Die Haut wurde anteromedial ca. 5 cm längs inzidiert und die Weichteile wurden unter Belassung des Periostmantels vom Tibiaschaft gelöst. Es folgte das Anlegen eines monolateralen Distraktors (Typ Orthofix M-103) von anterior in einem Winkel von ca. 20° nach medial an die Tibia (vgl. Meffert et al. 1999). Zum Einbringen

der konischen Pins (2.0 - 2.5 mm) wurde mit 2 mm vorgebohrt. Die Osteotomie, welche im mittleren Diaphysendrittel direkt unterhalb der Verschmelzung von Tibia und Fibula beim Kaninchen gesetzt wurde, wurde mit Hilfe einer wassergekühlten oszillierenden Säge (Howmedica) durchgeführt. Ein Knochenblock von 10 mm (entspricht 10% der Tibiagesamtlänge) wurde mitsamt dem darüber gelegenen Periost reseziert. Durch kompressionsfreie Verkürzung konnte der entstandene Knochendefekt unter zirkumferentem Einbringen des CYR61-Kollagenträgers geschlossen werden. Um Interponate und lokale Druck- sowie Knickbildungen zu verhindern, wurde der umgebende Weichteilmantel schonend retrahiert. Es wurde darauf geachtet, das Tibialis-anterior-Kompartiment nicht zu eröffnen. Abschließend folgten die Hautnaht, ein Sprühpflasterverband und eine postoperative Röntgenkontrolle in zwei Ebenen.

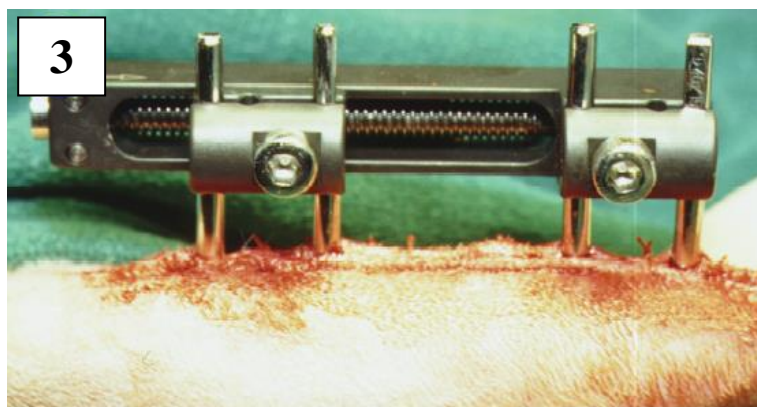
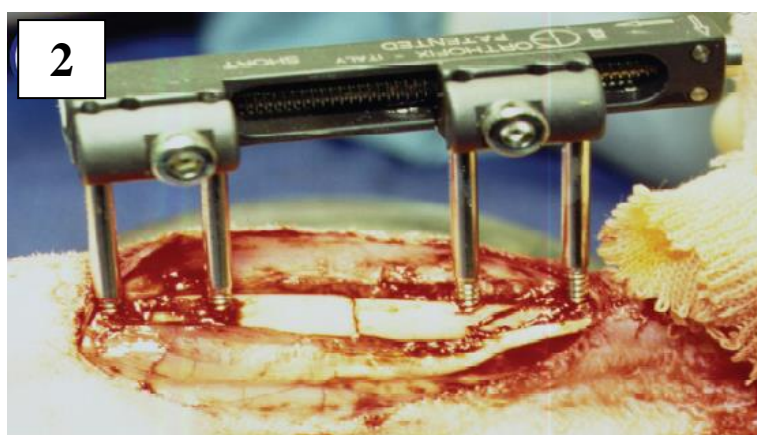
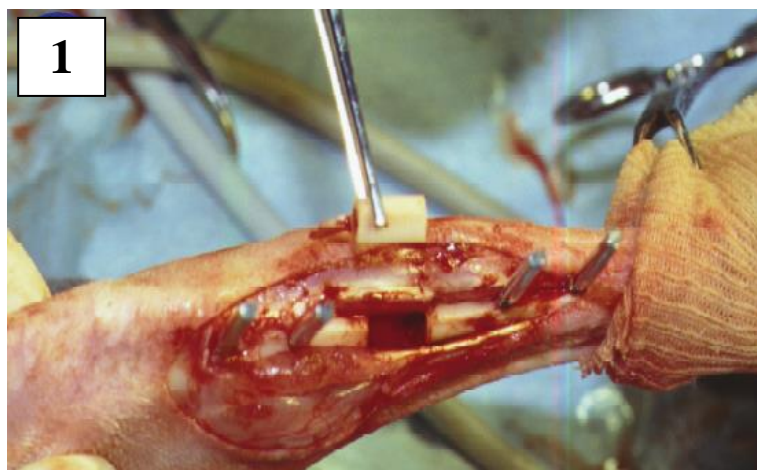


Abb. 4: Resektion der Tibia um 10% der Ausgangslänge (1), Verkürzung (2),
 Distraction 0,5 mm/12 h (3)
 (Quelle: Frey 2005, Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof.
 Dr. S. Frey)

Nach Beinverkürzung wurde eine Messung des Kompartimentdruckes in Narkose durchgeführt. Hier wurde auch eine erneute Laborentnahme vollzogen.

Die Kallusdistraction wurde am 11. postoperativen Tag begonnen und mit einer Geschwindigkeit von 0,5 mm/12 h bis einschließlich dem 20. postoperativen Tag ausgeführt, so dass hieraus eine Wiederherstellung der ursprünglichen Tibialänge resultierte. Dies ist erforderlich für eine maximale Kraftentwicklung bei isometrischer Kontraktion des M. tibialis anterior.

2.6 Muskelkraftmessung

Die Muskelkraft wurde präoperativ und ab dem fünften postoperativen Tag folgend alle 5 Tage im Messstuhl gemessen.

Voraussetzungen für die Erfassung der Muskelkraft und die Reproduzierbarkeit der Daten sind eine suffiziente Anästhesie und die winkelgerechte Lagerung der Tiere. So erhielten die Kaninchen eine halbe Stunde vor Messung eine Mischspritze aus Xylazin (2,6 mg/kgKG) und Ketamin (40 mg/kgKG). Die Tiere wurden auf einer speziellen Konstruktion, einem Stuhl mit einem 90°-Winkel femoro-tibial und tibio-talar, positioniert und fixiert (Frey 2005).

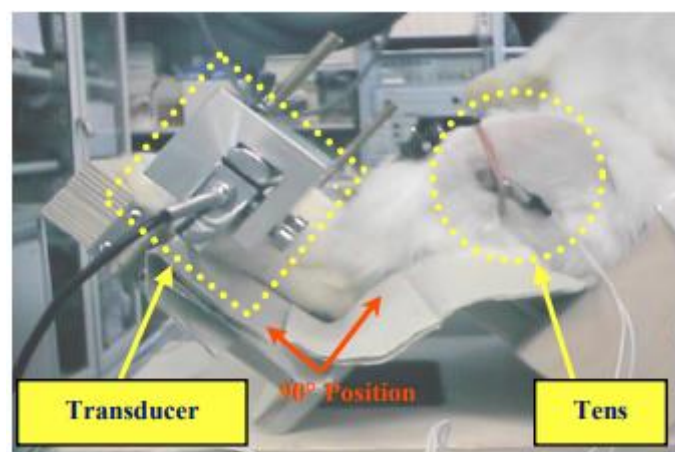


Abb. 5: Messstuhl mit Transducer (Druckaufnehmer) und TENs (transkutane elektrische Nervenstimulation); (Quelle: Frey 2005 und Meffert et al. 2008, Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. R. H. Meffert und Herrn Prof. Dr. S. Frey; Copyright © 2008 Orthopaedic Research Society. Veröffentlicht durch Wiley Periodicals, Inc.)

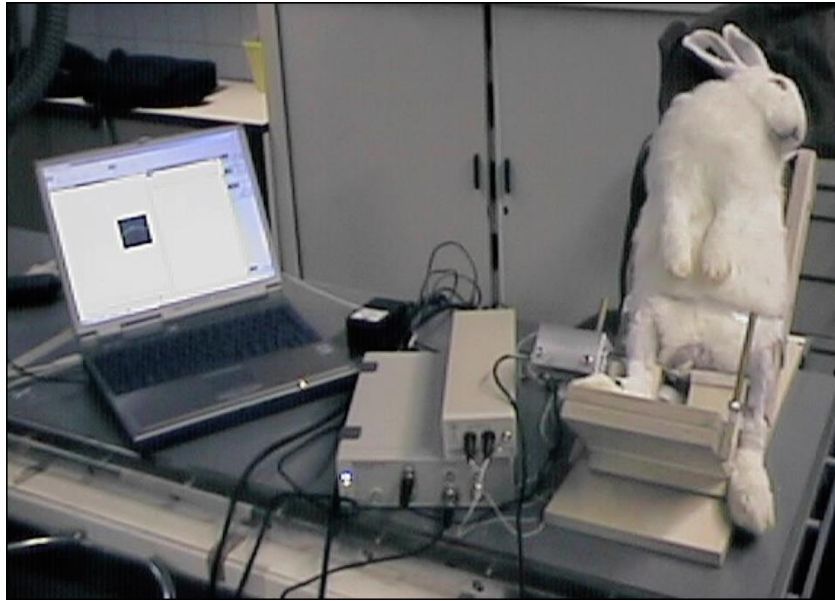


Abb. 6: Powerlab-Messeinheit (Quelle: Frey 2005 und Meffert et al. 2008, Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. R. H. Meffert und Herrn Prof. Dr. S. Frey; Copyright © 2008 Orthopaedic Research Society. Veröffentlicht durch Wiley Periodicals, Inc.)

Nach Anbringen des Druckaufnehmers (Hand-Dynamometer MLT003, ADInstruments) auf dem vorderen Drittel des Fußes wurde exakt über dem N. fibularis auf rasierter Fläche eine eigenkonstruierte, bipolare Elektrode mit einem Kontaktabstand von 7,5 mm aufgebracht (vgl. Frey 2005). Der elektrische Reiz (Amplitude = 5.1 mA, Dauer = 2.56 ms, Intervall = 50 ms) wurde mit einem Niedrigstromverstärker (GSR Amp, Galvanic Skin Response, ADInstruments) erzeugt. Eine optimale transkutane Stimulation löste anschließend eine isometrische Kontraktion der streckseitigen Muskulatur und eine Vorfußflexion aus, welche von der Powerlab-Messeinheit (Powerlab 2/20 und Analysesoftware Scope v.3.6 von ADInstruments) erfasst wurde. Aus fünf Messreihen mit je 20 Stimuli (entspricht jeweils 100 Einzelmesswerten) wurde ein Mittelwert errechnet.

2.7 Weitere apparative Diagnostika

Das O2C („oxygen to see“, LEA Medizintechnik GmbH) ist ein Diagnostikum, welches - basierend auf der Weißlicht-Spektroskopie und dem Laser-Doppler-Verfahren – zur nicht-invasiven Beurteilung der lokalen Mikrozirkulation in verschiedenen Geweben herangezogen werden kann. Über eine Sonde können mit Hilfe des O2C transkutan und tiefenselektiv (oberflächlich oder tief) laut Hersteller folgende Parameter erhoben werden:

- die kapillär-venöse Sauerstoffsättigung, also v.a. nach O₂-Extraktion
- die relative Hämoglobinmenge als Maß für die Gefäßdichte
- der relative Blutfluss als Indikator für eine Ischämie bzw. Hyperämie
- die Blutflussgeschwindigkeit

Die Anwendung erlaubt somit eine Aussage über die lokale Perfusion und die Sauerstoffausschöpfung in der Endstrombahn des Muskelgewebes. Gleichzeitig kann aus der Konstellation der vier Messparameter auf die mögliche Ursache hypoxischer Zustände geschlossen werden (LEA Medizintechnik GmbH). Da das Licht von Gefäßen, welche größer als ca. 100 µm sind, komplett absorbiert wird, wird nur die Remission (bzw. die Sauerstoffsättigung anhand der Hämoglobinfarbe) aus kapillär-venösen Gefäßen gemessen, wobei sich 85% des Blutes im kapillär-venösen System befinden (Gandjbakhche et al. 1999; Burton 1965).

Die Messungen der lokalen Mikrozirkulation erfolgten präoperativ und postoperativ sowie nach 6 h und nach 24 h. Als Referenzwerte dienten die Messwerte des Kontrollbeins und die präoperativen Messdaten. In unserem Versuch wurde eine Flachsonde auf dem Muskelbauch des M. tibialis anterior direkt über der Kontusionsstelle platziert. Nach Angaben des Herstellers ist die Messtiefe unter anderem stark abhängig von den optischen Eigenschaften des Gewebes und von der Blutmenge. Diese variere laut Studien zwischen einigen Millimetern und zwei Zentimeter. Differenziert werden sollten laut Hersteller eine oberflächliche (z. B. Hautdurchblutung) und eine tiefe Messung (z. B. Muskeldurchblutung) (LEA Medizintechnik GmbH). Die Daten wurden mittels O2C (LEA Medizintechnik GmbH)

ausgewertet. Mögliche Fehlerquellen wie Bewegungsartefakte oder zusätzlicher Anpressdruck auf die Messsonde wurden minimiert.

Postmortem wurden die Beine explantiert und es wurden MRT-Aufnahmen der Extremitäten an der Universitätsklinik Würzburg angefertigt. Diese sollten in T2 und T1 Wichtungen Hinweise auf mögliche radiologische Korrelate einer Bindegewebsvermehrung bzw. Hinweise auf Ödeme liefern.

2.8 Klinisches Monitoring und Euthanasie

Die Tiere wurden postoperativ beobachtet und nach der Aufwachphase erfolgte die schmerzadaptierte Belastung der behandelten Extremität. Aus vorausgegangen Experimenten (Frey 2005) hatte es sich als günstig erwiesen, postoperativ und nach Bedarf für die folgenden 3-4 Tage eine Kombination aus einem Analgetikum (Buprenorphin, 40 µg/kgKG) und einem Sedativum (Acepromazin, 1,3 mg/kgKG) in einem Depot (20 ml NaCl 0,9%) subkutan zu applizieren. Alternativ erhielten die Tiere zur Schmerzstillung Carprofen s.c. 4 mg/kgKG einmal täglich (oral: 1,5 mg/kgKG alle 12 h). In einem schmerz- und stressfreien Zustand der Kaninchen konnten regelmäßig Wundkontrollen durchgeführt werden, mit besonderem Augenmerk auf Durchblutung, Ödembildung, Fixateursitz, Pininfektion des operierten Beines. Beobachtet wurden auch die Flüssigkeits- und Nahrungszufuhr sowie die Ausscheidung der Tiere. Auffälligkeiten wurden stets zu Protokoll gegeben.

Die Kaninchen wurden nach Beendigung der Versuche am 40. postoperativen Tag unter Sedierung und Analgesie durch intrakardiale Injektion von 2 ml Tötungsmittel (T 61™) eingeschläfert.

2.9 Postmortale Untersuchungen

2.9.1 Histologie

Die histologischen Untersuchungen umfassen die Quantifizierung des Muskel- und Bindegewebeanteils mit Hilfe einer Phasenanalyse in der Histomorphometrie, das (semiquantitative) Ausmessen der Breite von Bindegewebssepten in der Histometrie sowie die rein deskriptive Beurteilung der histomorphologischen Regenerationsprozesse im M. tibialis anterior.

Die histologischen Färbungen wurden an Paraffinschnitten der Versuchsgruppe durchgeführt.

2.9.1.1 Probenentnahme

Nach der Tötung der Tiere erfolgte die sofortige Probengewinnung. Hierzu wurden die Kaninchen in Rückenlage gelagert und es erfolgte eine Hautinzision am lateralen Kniegelenk. Der Hautschnitt wurde vorsichtig unter Schonung der Logenmuskulatur nach distal erweitert. Nun ließ sich der M. tibialis anterior von der Tibiavorderkante ohne Verletzung des Periostes ablösen. Hierbei waren Quetschungen des Gewebes zu vermeiden. Daraufhin konnte der Muskel proximal knapp unterhalb des Ursprunges am Condylus lateralis tibiae und distal am sehnigen Ansatz auf Höhe des oberen Sprunggelenkes mit dem Skalpell abgetrennt werden. Die Entnahme des Muskels erfolgte an beiden Hinterläufen, jeweils am Kontroll- und am operierten Bein.

Um die Autolyse des Gewebes zu meiden, wurde der Muskel sofort in einen Probenbehälter mit 4%iger Formalin-Lösung überführt.

Der Versuchsreihe wurde vorausgesetzt, dass jegliche eingesetzte Narkotika, Sedativa, Analgetika wie auch das Tötungsmittel (T 61TM) keinen primären Effekt auf die Weichteildurchblutung im Unterschenkel haben.

Die Probenentnahme erfolgte nicht in Blutleere. So betrug die warme Ischämiezeit, d.h. die Zeit ab Kreislaufstillstand ohne Durchblutung des Muskels bei Körpertemperatur, maximal 10 – 20 Minuten.

2.9.1.2 Fixierung

Die sofortige Fixierung des Muskelgewebes erfolgte in 4%iger Formalin-Lösung (Fa. Otto Fischer GmbH & Co. KG; Saarbrücken) für mindestens 24 h bei Raumtemperatur. Danach wurde der Muskel im oberen Drittel in Höhe des Kontusionstraumas mit einem Skalpell halbiert. Es entstanden jeweils ein proximaler und ein distaler Gewebblock. Diese wurden sodann in perforierten, siebartigen Einbettkassetten (RotilaboTM, Fa. Roth, Karlsruhe) platziert und blieben bis zur Gewebeeinbettung in Formalin fixiert. Nach Faustregel durchdringt das Formalin das Gewebe mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/h. Durch Ausbildung von Methylenbrücken wirkt es hierbei proteinvernetzend und stabilisierend (Burck 1988).

2.9.1.3 Einbettung

Um das Gewebe zu 5 µm dünne Schnittpräparate verarbeiten zu können, muss das Wasser im Gewebe und in den Zellen durch Paraffin ersetzt werden.

Das Entwässern, Einbetten und Gießen der Gewebelöcke wurde im Pathologischen Labor der Universitätsklinik Würzburg in einem Einbettautomaten vollzogen. Hierzu wurden die Einbettkassetten in ein Gel gestellt, welches erstarrt und hitzebeständig ist, um die Kapseln während des automatischen Einbettungsprozesses festzuhalten. Zur Entwässerung des Gewebes durchliefen die Blöcke im Automaten eine aufsteigende Alkoholreihe (mit 70-, 80-, 96- und 100-prozentigem Alkohol).

Anschließend wurde der Alkohol in einem Zwischenschritt durch ein Intermedium (Xylol der Fa. Merck, Darmstadt) verdrängt und daraufhin das Gewebe mit heißem, flüssigem Paraffin versetzt. Dieser Prozess dauerte mehrere Stunden und wurde maschinell über Nacht durchgeführt.

Zuletzt wurde das Gewebe in speziellen Gießförmchen (Fa. Leica, D-Nußloch) mit Paraffin umgossen und eingebettet. Nach Erkalten wiesen die Paraffinblöcke eine ausreichende Härte und homogene Stabilität auf, um geschnitten werden zu können.

2.9.1.4 Schnitthanfertigung

Vor der Herstellung der Paraffinschnitte wurden die Blöcke für ca. 20 Minuten auf einer Kühlplatte bei -12°C gekühlt. Von den jeweiligen proximalen und distalen Gewebelöcken wurden nachfolgend am Schlittenmikrotom $5\ \mu\text{m}$ dicke Serienschnitte erstellt. Mit Hilfe von zwei Pinseln wurden die Schnitte zunächst in ein Kaltwasserbad zur Glättung grober Falten eingebracht und nachfolgend in ein Warmwasser-Streckbad von 40°C überführt. Das Aufziehen der Schnitte erfolgte auf adhäsiv-beschichtete (silanisierte) Objektträger, die die Haftung der Schnitte deutlich verbessert. Abschließend wurden die Präparate über Nacht in einem Wärmeschrank bei 37°C getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung in Objektträgerkästen gelagert.

2.9.1.5 Hämalaun-Eosin-Färbung

Zur Beurteilung der Zellkerne erfolgte eine H.E.-Färbung der proximalen und distalen Paraffinschnitte. Hier färbt das Hämalaun (= Hämatoxylinlösung mit Aluminiumionen) als basischer Farbstoff die negativ geladenen Phosphatgruppen des Chromatins der Zellkerne blau, das Muskelzytoplasma und die Kollagenfasern erscheinen durch den anionischen Farbstoff Eosin rot, elastische Fasern wiederum blassrot oder ungefärbt (Lüllmann-Rauch 2003). Diese Färbung ist als Übersichtsfärbung für die Darstellung von Muskelzellkernen und entzündlichen Infiltraten geeignet.

Hierzu wurden die Muskelschnitte in Xylol I und II für jeweils 10 Minuten entparaffiniert. In einer absteigenden Alkoholreihe (100% I, II und III je 5 Minuten, 80%, 70% 50% jeweils über 5 Minuten) und durch kurzes Schwenken in Aqua destillata wurde rehydriert. Zur Kernfärbung wurden die Schnitte anschließend in wässrigem

Hämalaun nach Mayer für 15 Minuten belassen. Hiernach erscheinen die Zellkerne rötlich-braun. Die pH-Erhöhung durch das Bläuen unter fließendem, kaltem Leitungswasser für 10 Minuten bewirkt ein Umschlagen des Farbtons in das charakteristische blau-violett. Es folgte ein kurzes Spülen in Aqua destillata und die Gegenfärbung mit wässrigem, 1%-igem Eosin (Fa. Sigma-Aldrich) über 5 Minuten. Nach Spülen in Aqua destillata wurden die Präparate durch eine schnelle Methode in einer 100 %-igen Alkoholreihe (I, II und III für jeweils 1 Minute und anschließend in IV für 5 Min) dehydriert. Der Alkohol wurde durch Xylol I und II (jeweils 10 Minuten) verdrängt. Das Eindecken erfolgte mit Entellan® als Schnelleindeckmittel.

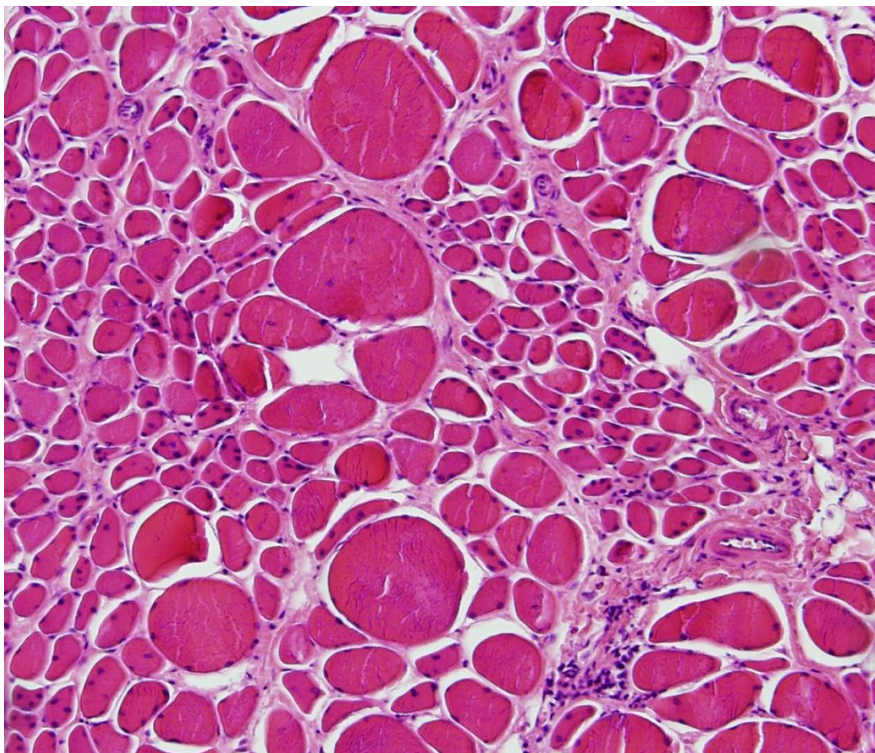


Abb. 7: Paraffinschnitt, H.E.-Färbung, 100-fache Vergrößerung (Tier F, operiertes Bein distal zentral)

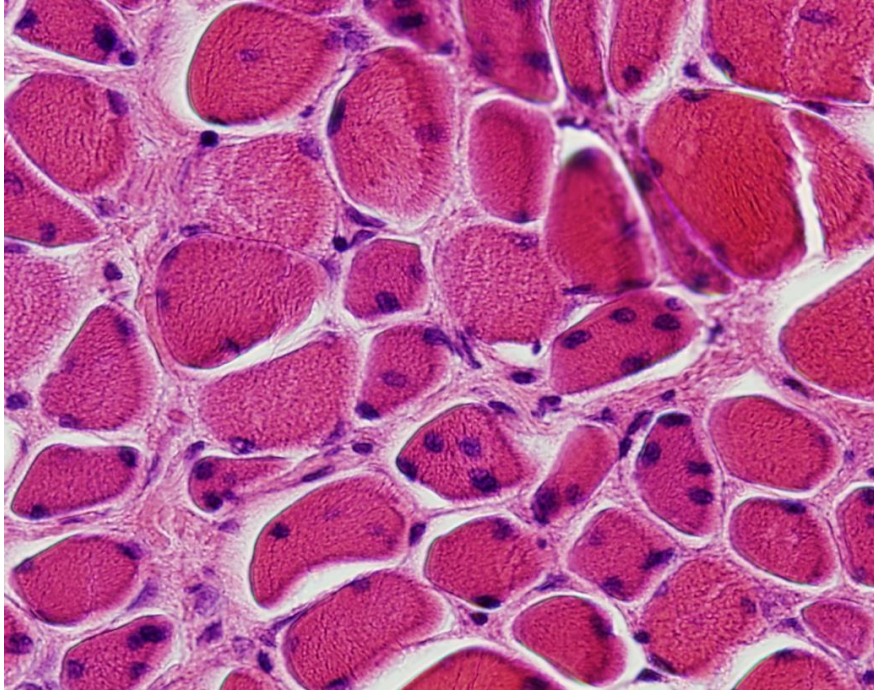


Abb. 8: Paraffinschnitt, H.E.-Färbung, 200-fache Vergrößerung (Tier F, operiertes Bein distal zentral)

2.9.1.6 Azan-Färbung nach Heidenhain

Zur Quantifizierung von Muskel- und Bindegewebe wurden die Schnitte in Azan nach Heidenhain gefärbt. Nach dieser histologischen „Mehrfachfärbung“ (auch Trichromfärbung) erscheinen Zellkerne wie auch das Zytoplasma einschließlich der Muskulatur und Erythrozyten rot bis orange (Anfärbung durch Azokarmin), Kollagenfasern des Bindegewebes werden hingegen blau und elastische Fasern blassblau oder ungefärbt (Anfärbung durch Anilinblau) dargestellt (Benninghoff et Drenckhahn 2003; Lüllmann-Rauch 2003).

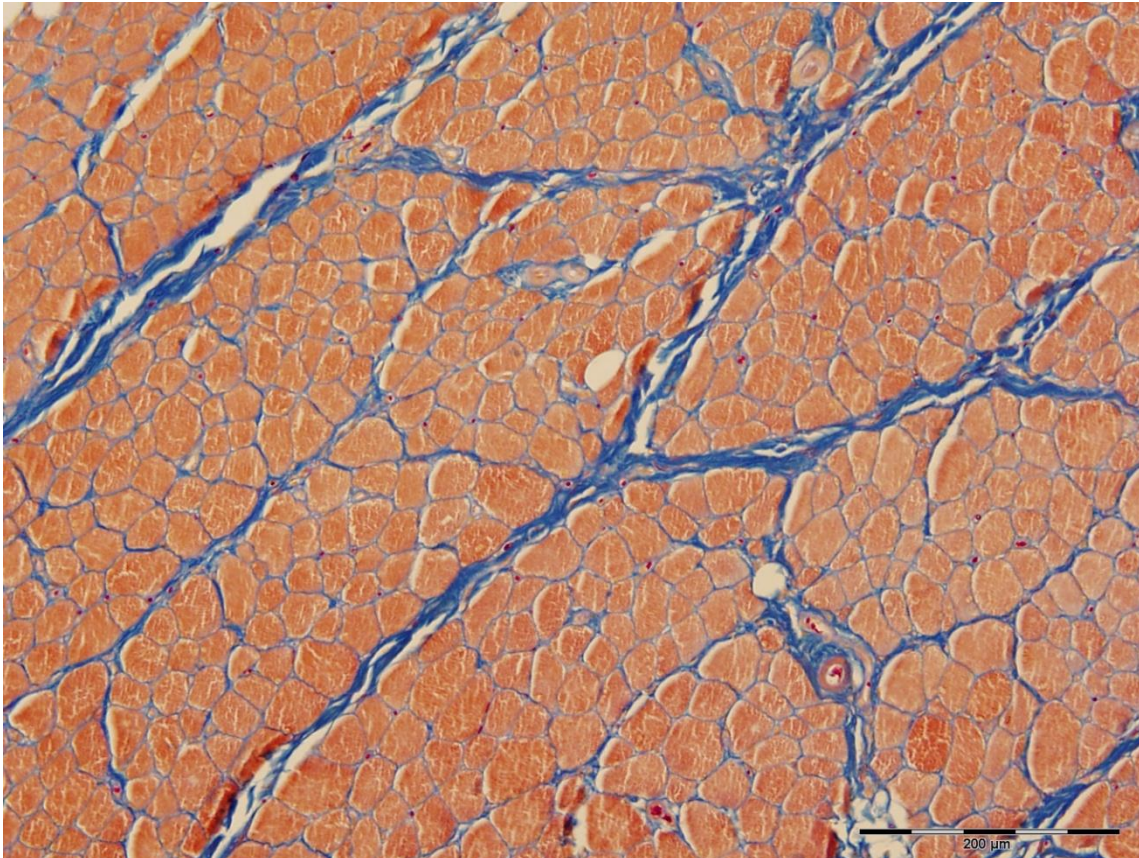


Abb. 9: Paraffinschnitt, Azan nach Heidenhain, 100-fache Vergrößerung (Tier F, operiertes Bein proximal)

Die Färbung der proximalen Präparate erfolgte durch freundliche Unterstützung im Anatomischen Institut der Universität Würzburg (Lehrstuhl für Anatomie II, Frau Prof. Asan) nach folgendem Protokoll:

Tab. 3: Färbeprotokoll Azan nach Heidenhain für proximale Paraffinschnitte

1. Entparaffinieren in Xylol I und II	je 10 Min.
2. Hydrieren in absteigender Alkoholreihe	
100% I und II	je 2 Min.
96%	2 Min.
80%	2 Min.

70%	2 Min.
50%	2 Min.
Aqua dest.	2 Min.
3. Azan nach Heidenhain	
Azocarmin-Inkubation bei 56°C (vorgewärmt)	15 Min.
Aqua dest.	
Anilin-Alkohol	ca. 13 Min.
Essigsäure-Alkohol	30 Sek.
Wolframatophosphorsäure 5%ig	60 Min.
Aqua dest.	
Anilinblau-Orange G, konz. Lösung	2 Min.
96% Alkohol I und II	je 1 Min.
4. Dehydrieren in absolutem Alkohol	
100% I und II	je 2 Min.
5. Xylol I und II	
	je 5 Min.
6. Eindecken mit Entellan®	

Die Paraffinschnitte wurden zunächst in Küvetten mit Xylol I und II über jeweils 10 Minuten entparaffiniert. Um das Gewebe färben zu können, musste es in einer absteigenden Alkoholreihe (100% I und II, 96%, 80%, 70%, 50% jeweils für 2 Minuten) und in aqua destillata (für 2 Minuten) hydriert werden. Danach wurden die Muskelpräparate über 15 Minuten einer Kernfärbung in vorgewärmtem Azokarmin (56°C) unterzogen. Dieses wurde kurz in aqua destillata ausgepült. Es folgte eine Differenzierung der Kernfärbung in Anilin-Alkohol, bis die Zellkerne gut vom Zytoplasma zu unterscheiden waren. Dieser Vorgang wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und dauerte ca. 13 Minuten. Die Differenzierung wurde durch ein kurzes Bad in Essigsäure-Alkohol (30 Sekunden) unterbrochen. Durch 5%-ige

Wolframatophosphorsäure wurde das Bindegewebe in den Muskelpräparaten über eine Stunde gebeizt und entfärbt. Nach kurzem Spülen in aqua destillata erfolgte die Gegenfärbung von Muskel- und Kollagenfasern in einer konzentrierten Lösung Anilinblau-Orange G über 2 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte zur Dehydrierung zweimal in 96%-igem Alkohol für jeweils eine Minute und zweimal in 100%-igem Alkohol für jeweils 2 Minuten belassen. Der Alkohol wurde in Xylol I und II über jeweils 5 Minuten verdrängt. Abschließend konnten die Azan-Präparate mit Entellan® (Kombination aus Kunstharzen, Eindeckmittel) eingedeckt und mit Deckgläschen eingeschlossen werden.

Das Färben der distalen Präparate erfolgte mit Hilfe eines Färbekits (Azan-Trichrom-Kit nach Heidenhain, Azan tricromica, sec. Heidenhain modificata, Bio-Optica, Mailand, Italien).

2.9.1.7 Lichtmikroskopische Auswertungen

Alle mikroskopischen Untersuchungen wurden an einem aufrechten Durchlichtmikroskop der Firma Olympus (Olympus Hamburg, Modell BX51) und mit Hilfe der Digitalkamera Olympus DP71 durchgeführt. Vor jeder begonnen Untersuchung wurde die Köhlersche Beleuchtung eingestellt, um eine optimale Ausleuchtung und Lichtführung durch die Präparate zu garantieren.

Die Aufnahme der Panoramabilder (MIA, multiple image alignment), die Phasenanalyse und die Auswertung der mikroskopischen Bilder erfolgten mit der Software Cell[^]F des Bildverarbeitungssystems analySIS® der Firma Olympus Soft Imaging Solutions (Fa. Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Hamburg).

2.9.1.7.1 Histomorphometrie

Der Begriff Histomorphometrie beschreibt die Computer-gestützte, quantitative Analyse der Gewebezusammensetzung eines mikroskopisch dargestellten

Schnittpräparates. Diese Untersuchung basiert auf einer möglichst differenzierten Darstellung der zu beurteilenden Gewebekomponenten durch eine geeignete histologische Färbemethode, damit diese von der Software erkannt und unterschieden werden können (Lang 2006).

Hierzu mussten die Präparate zunächst manuell unter Anwendung des 4er Objektivs (40fache Vergrößerung, kalibriert) digitalisiert und im TIF-Format gespeichert werden. Ein großes, lichtmikroskopisch dargestelltes Muskelpräparat konnte mittels Software als Mosaik aus mehreren Einzelbildern, welche durch das Sichtfeld begrenzt wurden, zusammengefügt werden (MIA, multiple image alignment). Größere Präparate bestanden aus maximal zwei Teilbildern, deren Werte verrechnet wurden. Hier war bei der manuellen Aufnahme darauf zu achten, dass das zweite Teilbild am ersten Teilbild anschluss – unter Beibehaltung der Position des Objektisches und der Belichtung.

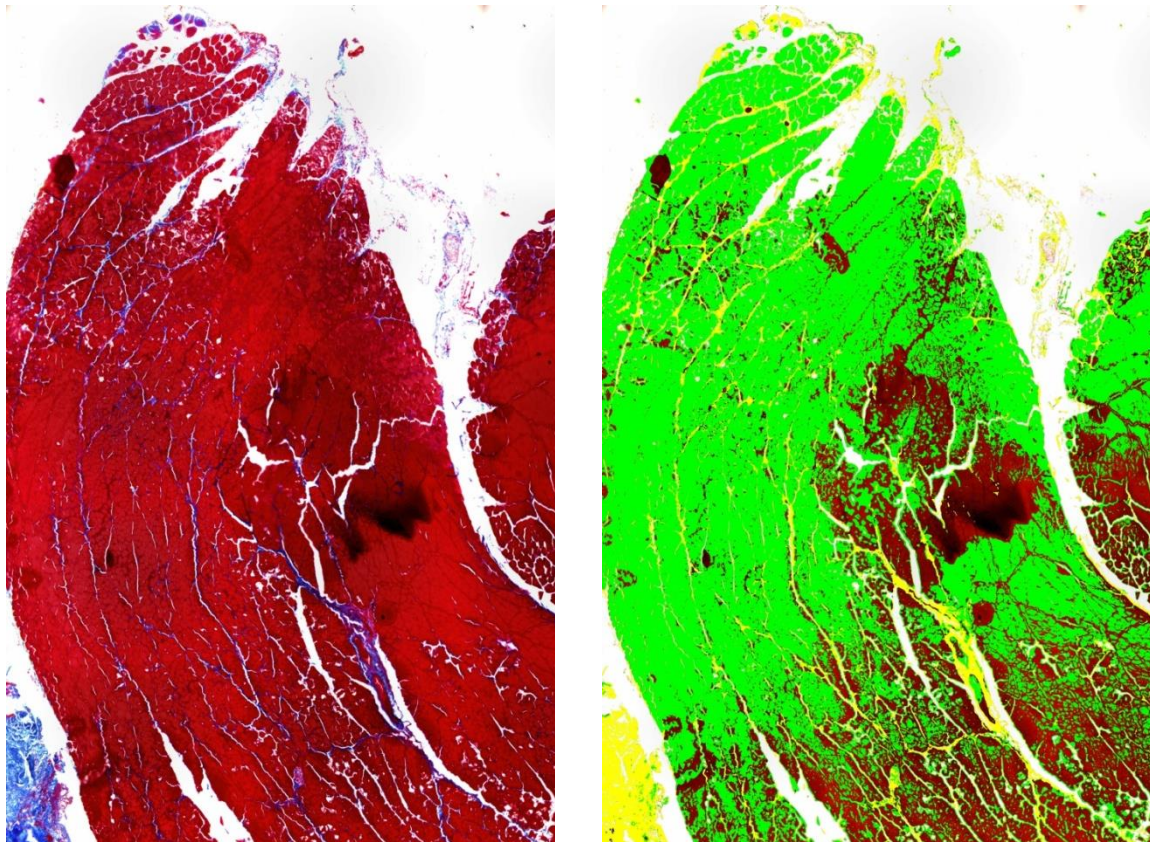


Abb. 10: Phasenanalyse des MIA in der Azan-Färbung eines M. tibialis anterior, Übersicht in 40-facher Vergrößerung (Tier D)

Unter der Darbietung des gesamten Querschnittes des M. tibialis anterior wurden die Bilder nun mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms editiert. Störende Gewebereste, Narben durch die Kompartimentdrucksonde, straffes Bindegewebe der Sehnenübergänge, das Epimysium wie auch Reste der Kompartiment-Muskulatur (M. extensor digitorum longus, M. extensor hallucis longus, Septum intermusculare) wurden übermalt. Ebenso wurde mit größeren Nerven-Gefäß-Straßen mit umgebendem Bindegewebe verfahren. Ziel war es, die Muskulatur sowie das Endomysium um die einzelnen Muskelfasern und das Perimysium, welches die Muskelbündel umgibt, zu quantifizieren.

Um gleichzeitig Flächen messen zu können, wurde vor der eigentlichen Phasenanalyse eine Maske definiert, gespeichert und das Bild auf 75% vergrößert. Nun konnten die Farbschwellenwerte in dem Farbraum HSI (spezifiziert Pixel durch Farbton (hue), Sättigung (saturation), Lichtintensität (intensity), Konvertierung in RGB (rot, grün, blau) möglich) jeweils für die Muskulatur und für das Bindegewebe gesetzt werden, um unterschiedliche Rot- und Blaunuanen des Präparates zu erfassen. Daraufhin wurde das entsprechende Gewebe farbkodiert, wobei der Muskel grün (Phase 1) und das Bindegewebe gelb (Phase 2) koloriert wurden. In diesem Modus erfolgte die Phasenanalyse mit automatischer Ausgabe der gemessenen Flächen in μm^2 und % und Übertragung der Daten in eine Excel-Tabelle.

Für das Muskel- und Bindegewebe in größeren Präparaten, welche aus max. 2 Teilbildern bestanden, wurden nach Fläche gewichtete Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

Die Phasenanalyse wurde zweimal durchgeführt, hieraus wurden die Mittelwerte gebildet. Zur Ermittlung des prä- und postoperativen Bindegewebeanteils pro Tier wurden die Mittelwerte der proximalen und distalen Schnittpräparate berechnet.

2.9.1.7.2 Histometrie und deskriptive Gewebeanalyse

Da nach Durchsicht aller Präparate erhebliche Unterschiede in der Breite der Bindegewebssepten auffielen, wurden diese vermessen.

Hierzu konnten die zuvor digitalisierten Aufnahmen der Muskelquerschnitte in der Azanfärbung (40fache Vergrößerung) mit der Software Cell^F geladen werden. In jedem Präparat wurde ein Messraster mit einer Gesamtgröße von 1000 x 1000 µm, bestehend aus 4 x 4 Feldern mit je einer Größe von 250 x 250 µm, gesetzt. Es wurden jeweils ein 1 mm² großes Raster in der Peripherie des M. tibialis anterior und im Zentrum des Schnittes festgelegt. Die Peripherie des Präparates ist im Querschnitt als konvexer Rand mit darüberliegenden Faszienanteilen zu erkennen, wohingegen der zentrale Bereich als ein der Membrana interossea zugewandtes Areal definiert wurde. Das Bild wurde zur genaueren Darstellung auf 73- 200% vergrößert. Nun erfolgte in jedem Feld jeweils eine Messung des breitesten Bindegewebesepiums als kürzeste Distanz zwischen zwei Messpunkten. Es wurde ausschließlich das perimysiale Bindegewebe berücksichtigt und darauf geachtet, dass keine größeren Gefäße in das Bindegewebe eingebettet waren und dass korrespondierende Areale im Trauma-Schnitt und Kontroll-Präparat zur Auswertung herangezogen wurden. Nach Erzeugen einer Messtabelle wurden die Daten in ein Excel-Formular übertragen. Für die nachfolgenden Vergleiche wurden die Mittelwerte der je 16 Messungen berechnet.

Die Übersichtsfärbung in H.E. eignet sich vor allem zur Beurteilung der Zellkerne der Myozyten. Des Weiteren wurde nach degenerativ-regenerativen Zeichen in den Azan-gefärbten Schnitten gesucht.

2.9.2 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen dienten der Darstellung der Vaskularisierung und der Auszählung von Gefäßen. Hierzu kam ein humanspezifischer Antikörper zum Einsatz, der antigenspezifisch mit der glatten Muskulatur von Gefäßen reagiert (anti-smooth muscle actin, anti-SMA) und bis zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht an Kaninchengewebe etabliert worden war. Der monoklonale Antikörper ist laut Hersteller zur Identifizierung von zytoplasmatischem, glattmuskulärem α -Aktin geeignet, welches sich unter anderem in den glatten Muskelzellen von Blutgefäßen, in Myofibroblasten und Myoepithelzellen findet (vgl. Infoblatt des Herstellers Dako Denmark).

Tab. 4: Übersicht der verwendeten Antikörper

	Primär-Antikörper Anti Smooth Muscle Actin	Sekundär-Antikörper anti-mouse IgG (H+L), HRP konjugiert
Klon	1A4	---
Code	M0851	PI-2000
Hersteller	Dako	Vector Laboratories
Typ	monoklonal	---
Isotyp	IgG2a, kappa	---
Wirt	Maus	Pferd
Reaktivitäten laut Hersteller	Mensch	Maus-IgG; Kreuzreaktivitäten: Maus-IgM 25%, Kaninchen-IgG und -IgM < 1%

2.9.2.1 Färbung mit anti-smooth-muscle-actin (anti-SMA)

Die in Gliederungspunkt 2.9.1 hergestellten proximalen und distalen Paraffinschnitte der CYR61-Versuchsgruppe wurden zur immunhistochemischen Färbung genutzt.

Hier kam die indirekte Methode der Immunfärbung zum Einsatz, bei welcher zunächst der Primärantikörper antigenspezifisch an seine Epitope bindet. Im nächsten Schritt wird der Enzym-konjugierte (Meerrettichperoxidase) Sekundärantikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, aufgetragen. Unter Zugabe eines Substrates (Wasserstoffperoxid) wird das Chromogen (DAB, Diaminobenzidintetrahydrochlorid) oxidiert und die Antigen-Antikörper-Reaktion in Form eines braunen Endproduktes visualisiert (Büttner et Thomas 2003).

Nachdem in Vorversuchen die optimalen Verdünnungen der Antikörper ermittelt wurden, konnte für anti-SMA folgendes Protokoll etabliert werden:

Tab. 5: Immunhistochemisches Färbeprotokoll für anti-SMA

1. Entparaffinieren in	
Xylol I	15 Min.
Xylol II	10 Min.
2. Hydrieren in absteigender Alkoholreihe	
100% I und II	je 5 Min.
80%	5 Min.
70%	5 Min.
50%	5 Min.
Aqua dest.	5 Min.
3 x Spülen in TRIS pH 7.40 +/- 0.02	je 5 Min.
3. Blocken der endogenen Peroxidase mit 3% H ₂ O ₂ -PBS pH 7.4 in der Feuchtkammer, 100 µl/Schnitt	
10 Min.	
3 x Spülen in TRIS pH 7.40 +/- 0.02	je 5 Min.
4. Inkubation mit Primärantikörper bei RT in Feuchtkammer	
60 Min.	
Verdünnung von anti-SMA 1:50	
Negativkontrolle: Negative Control mouse IgG2a in 1:50 bzw. Eindecken mit 100 µl Dako Antibody Diluent	
Verdünnungsmedium: Dako Antibody Diluent	
100 µl/Schnitt	
3 x Spülen in TRIS pH 7.40 +/- 0.02	je 5 Min.
5. Inkubation mit Sekundärantikörper bei RT in Feuchtkammer	
60 Min.	
Verdünnung von anti-mouse IgG 1:200	
+ 5% Kaninchenserum	
Verdünnungsmedium: Dako Antibody Diluent	

100 µl/Schnitt	
3 x Spülen in TRIS pH 7.40 +/- 0.02	je 5 Min.
6. Substratlösung DAB-Kit	ca. 3 Min.
2-3 Tropfen/Schnitt	
3 x Spülen in TRIS pH 7.40 +/- 0.02	je 5 Min.
Kurzes Spülen in aqua dest.	
7. Gegenfärbung mit Hämalaun	15-30 Sek.
(Meyers Hämalaun 1:1 verdünnt mit aqua dest.)	
Bläuen unter fließendem kaltem Leitungswasser	10 Min.
8. Dehydrieren in 4 x absolutem Alkohol	je 1 Min.
9. Roti®-Histol I und II	je 5 Min.
10. Eindecken mit Roti®-Histokitt	

Nach dem Entparaffinieren der Muskelpräparate in Xylol I und II (15 Min. und 10 Min.) wurden diese in einer absteigenden Alkoholreihe (100% I und II, 80%, 70%, 50%) und in aqua destillata über jeweils 5 Minuten hydriert. Es folgte das Spülen mit dem Waschpuffer TRIS-NaCl in drei verschiedenen Küvetten für je 5 Minuten. Der Waschpuffer enthielt 40.5 g NaCl und 3.0 g TRIS. Der pH-Wert von 7.4 +/- 0.02 wurde mit HCl und NaOH eingestellt und der Puffer auf 5 Liter mit aqua destillata aufgefüllt. Die Objektträger wurden nun einzeln aus dem Puffer geholt, die Ränder mit einem Tuch von überschüssigem TRIS-NaCl befreit und sorgfältig in der Feuchtkammer platziert.

Es wurde darauf geachtet, dass die Schnitte während der Färbeprozedur nicht austrocknen.

Aufgrund der endogenen Peroxidase-Aktivität in bluthaltigem Muskelgewebe (Hämoglobin, Myoglobin) wurde diese durch Auftragen von jeweils 100 µl 3%-iger H₂O₂-PBS-Lösung, pH 7.4, über 10 Minuten geblockt. Hierbei wird die natürlicherweise im Gewebe vorkommende Peroxidase durch einen Überschuss an Substrat inhibiert. Die Schnitte wurden 3 x für jeweils 5 Minuten in TRIS-NaCl gespült und die Ränder der Objektträger abgewischt. Im nächsten Schritt wurde der Primärantikörper anti-SMA in einer Verdünnung von 1:50 im Verdünnungsmedium Dako Antibody Diluent aufgetragen (100µl/Schnitt). Die Präparate wurden über 60 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert und anschließend 3 x 5 Minuten im Waschpuffer gespült.

Da eine Reaktivität des Sekundärantikörpers anti-mouse-IgG mit dem Kaninchengewebe nicht gänzlich auszuschließen ist, wurde dieser in einer Verdünnung von 1:200 mit 5% Kaninchenserum (aus der Anästhesie der Universitätsklinik Würzburg, Serum Nr. 1221, 30 min Hitzeinaktivierung bei 56°C) versetzt (Verdünnungsmedium: Dako Antibody Diluent) und aufgetragen (Inkubationszeit 60 Min.). Nach 3-maligem Spülen im Waschpuffer (jeweils 5 Min.) wurden die Schnitte mit je 2-3 Tropfen der Chromogen-Substrat-Lösung (DAB-Substratkit) versetzt und unter mikroskopischer Kontrolle ca. 3 Minuten gefärbt. Durch das Einstellen in TRIS-NaCl wurde die Reaktion beendet.

Nach kurzem Spülen in aqua destillata folgte die Gegenfärbung mit Hämalan (Mayers Hämalan, 1:1 verdünnt mit aqua destillata) über max. 30 Sekunden. Unter fließendem, kaltem Leitungswasser wurden die Schnitte über 10 Minuten gebläut. Abschließend konnten diese in 4 x absolutem Alkohol (je 1 Min.) dehydriert werden. Der Alkohol wurde durch Roti®-Histol I und II (je 5 Min.) verdrängt und das Gewebe mit dem Einschlussmittel Roti®-Histokitt eingedeckt.

Die mitgeführten Negativkontrollen (unbehandeltes Kaninchenmuskelgewebe, M. tibialis anterior aus dem Forschungslabor der Anästhesie der Universitätsklinik Würzburg) wurden mit einem monoklonalen Maus-Antikörper (Dako Negative Control mouse IgG2a, X0943, in 1:50 im Verdünnungsmedium Dako Antibody Diluent) bzw.

mit 100µl Dako Antibody Diluent statt dem Primärantikörper eingedeckt und letztlich mit dem Sekundärantikörper inkubiert.

2.9.2.2 Auszählung der Gefäße

Zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurden die Präparate digitalisiert. Von jedem Schnitt wurden bei einer 100-fachen Vergrößerung jeweils eine periphere und eine zentrale Aufnahme gemacht. In jedes dieser Bilder wurde eine ROI (region of interest) von 1000 x 1000 µm gesetzt. Aufgrund unterschiedlicher Färbungen (Azan versus anti-SMA) entsprachen diese ROI nicht exakt den peripheren und zentralen Arealen aus der Septenmessung (Gliederungspunkt 2.9.1.7.2), sollten jedoch ebenso die unterschiedlichen Regenerationszonen repräsentieren. Nun wurden die Bilder auf 200% vergrößert und alle im jeweiligen ROI befindlichen Gefäße ausgezählt und manuell mit Hilfe der Software mit ihrem größten äußeren Durchmesser erfasst.

Hierbei ist zu erwähnen, dass es sich bei dem Diameter ausschließlich um die DAB-positive Media der Gefäße handelt und somit die Adventitia nicht mitgemessen wurde. Es wurden auch jene Gefäße gewertet, welche die ROI kreuzten. Ein Gefäßlumen war nicht obligatorisch darzustellen, jedoch sollten alle positiv gefärbten Strukturen den Hinweis auf ein auskleidendes Endothel liefern.

Die Gefäße wurden nach ihrem Durchmesser wie folgt eingeteilt:

- 5-10 µm
- 10-50 µm
- 50-100 µm
- >100 µm

Diese Einteilung richtet sich nach den Segmenten der Endstrombahn. Laut Literatur entsprechen Gefäße mit einem Durchmesser zwischen 10 und 100 µm am ehesten Arteriolen, größere Gefäße entsprechen kleinen Arterien und jene < 10 µm Kapillaren (vgl. Benninghoff et Drenckhahn 2004; Lüllmann-Rauch 2003).

2.9.3 Freisetzungskinetik des CYR61

Die Versuche erfolgten im Labor des Orthopädischen Zentrums für muskuloskelettale Forschung in der Orthopädischen Klinik im König-Ludwig-Haus Würzburg. Das matrizzelluläre Protein CYR61 wurde hier freundlicherweise durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Norbert Schütze zur Verfügung gestellt.

Aufgrund der prospektiven Nachweisgrenze von 500 ng CYR61/30 µl im Western Blot musste ein möglichst geringes Volumen für die Pufferlösung des Proteins verwendet werden. In einem Vorversuch wurde die Nachweisbarkeit von 25 µg CYR61 pro 500 µl im Western Blot belegt. Zudem wurden unterschiedliche Nachweisgrenzen (200 ng, 500 ng, 800 ng) ausgetestet, zwei verschiedene Puffersysteme (TRIS-Glycin und PBS) verglichen und Negativkontrollen mitgeführt. Da die Verdünnung in PBS möglicherweise zu Proteinverlusten führte, wurden im Folgenden alle Proben in TRIS-Glycin-Puffer (pH 7 bis 7,5; 0.1 M Glycin (pH ursprünglich 2,2) + 3 M TRIS pH 9,0) gelöst.

Die Kollagenmatrix (PARASORB HD, 1 cm² enthält 5,6 mg equine, native Kollagenfibrillen, RESORBA Wundversorgung GmbH + Co. KG, D-Nürnberg) wurde, wie auch bei Implantation verwendet, mit einer Klinge in 1 cm x 0,5 cm x 0,5 cm große Schwämme zerlegt.

Für die Versuche wurden unterschiedliche, bereits hergestellte, eingefrorene CYR61-Präparationen verwendet. Das rCYR61-Fc wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und musste direkt verarbeitet werden, um Proteinverluste zu meiden. Hiernach erfolgte die Proteinbestimmung nach Bradford mittels Bio-Photometer (Eppendorf) nach laborinternem Standard.

Aus dem Ansatz wurden 25 µg CYR61 entnommen und mit TRIS-Glycin-Puffer auf 500 µl aufgefüllt. Die Mischung wurde in nicht-konische cups mit flachem Boden (Probenbehälter 2,5 ml aus PE) pipettiert und danach der trockene Kollagenschwamm eingelegt. Als Negativkontrolle dienten Schwämme, welche in 500 µl Puffer inkubierten. Die Schwämme waren im vollgesogenen Zustand vollständig von der Flüssigkeit umschlossen.

Über 20 h wurden die Proben bei niedriger Geschwindigkeit und bei Raumtemperatur auf einem Bakterienschüttler kontinuierlich in Bewegung gehalten und wurden inkubiert. Danach konnten die Vliese entnommen und in ca. 320 µl frischen Puffer, dessen Volumen dem Überstand nach dem Aufsaugen des Schwammes entsprach, überführt werden. Aus diesem Überstand wurden jeweils 60 µl (entspricht 2 Western-Blot-Ansätzen) in 1,5 ml Eppendorf tubes pipettiert, mit 20 µl SDS-Puffer (Laemmli-Puffer (4x) + beta-Mercaptoethanol) versetzt und bei -20°C eingefroren. Ebenso wurde mit den Überständen verfahren, nachdem die Vliese nach 5 Sekunden (instant release), 5 Minuten, 30 Minuten, 2 und 4 Stunden aus den Puffern entfernt wurden. Das Hinzufügen des SDS-Puffers war notwendig, da ansonsten das CYR61 beim Einfrieren ausfällt und beim Blotten nicht in das Gel übergehen kann.

Zum Austesten der Nachweisgrenzen wurden kurz vor dem Blotten aus einer frisch präparierten CYR61-Reihe Ansätze mit 100 bis 600 ng CYR61 hergestellt und mit 10 µl Laemmli-Puffer und TRIS-Glycin-Puffer auf 40 µl aufgefüllt. Es erfolgte keine Messung des Zerfalls des freien CYR zur Kontrolle.

Die eingefrorenen und frischen Ansätze werden bei 78°C aufgeköcht, so über 5 Minuten denaturiert und auf Eis gestellt. Es wurden 1,5 mm dicke SDS-PAGE-Gele (Trenngel 10%, Sammelgel 5%, nach laborinternem Protokoll) gegossen, welche nun eingespannt und mit Upper- und Lower-Puffer nach laborinternem Protokoll eingedeckt werden konnten. Die Proben wurden zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus, J. Thieme Labortechnik GmbH) und je 40 µl in je eine Tasche pipettiert. Ein Marker-Gemisch (5 µl einer Fertiglösung, RainbowTM Marker, GE Healthcare) wurde mitgeführt. Es wurde eine Spannung von 150 V (Biometra, Power Pack P25) angelegt und die Proteine über eine Stunde elektrophoretisch aufgetrennt.

Zum Blotten des Gels wurde befeuchtetes Whatman-paper (1,3 mm Dicke, Hartenstein) im Transferpuffer geschichtet, das Gel auf eine feuchte Nitrocellulose-Membran (0.45 µm, Optitan BA-S 85, Reinforced NC, Fa. Schleicher-Schuell) abgezogen und auf das Whatman-paper aufgelegt. An die Blotting-Kammer wurden 150 mA Strom pro Gel für 2 Stunden angelegt.

Danach konnte die Nitrocellulosemembran in einer Küvette mit 50 ml einer Lösung aus BSA (2,5%, 4°C), Magermilchpulver (2,5%, Raumtemperatur), Pferdeserum (2%, 4°C) und 0,1% PBS-Tween20 über 2 h bei Raumtemperatur schwenkend geblockt werden (Zusammensetzung nach laborinternem Protokoll). Darauf folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, welcher sich gegen den Fc-tag des CYR61 richtet (durch das wissenschaftliche Labor des König-Ludwig-Hauses in Auftrag gegeben). Die Membran wurde hierzu in 5 ml einer Lösung aus BSA (1%, 4°C), Magermilchpulver (1%, RT), Pferdeserum (1%, 4°C), 0,1% PBS-Tween20 und dem Primärantikörper MCyR in einer Verdünnung von 1:5000 über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert.

Am Folgetag wurde die Membran 3 x über 15 Minuten und 1 x über 20 Minuten schwenkend auf dem Schüttler in der frisch angesetzten Lösung I, bestehend aus BSA (1%, 4°C), Magermilchpulver (1%, Raumtemperatur), Pferdeserum (1%, 4°C) und der Waschlösung I (nach laborinternem Protokoll), gewaschen. Anschließend konnte die Membran mit 10 ml einer Lösung aus BSA (1%, 4°C), Magermilchpulver (1%, Raumtemperatur), Pferdeserum (1%, 4°C), 0,1% PBS-Tween20 und dem Sekundärantikörper Anti-rabbit-IgG/POD (A0545, Sigma) in einer Verdünnung von 1:2000 über 1 h bei Raumtemperatur inkubiert werden. Danach folgte ein zweiter Waschschrift über 3 x 15 Minuten und 1 x 20 Minuten mit der Waschlösung II (nach laborinternem Protokoll) auf dem Bakterienschüttler.

Abschließend konnten die Banden detektiert werden. Dazu wurde direkt vor dem Filmauflegen die Detektionslösung mit einem ECL-Kit (4°C, GE Healthcare, Amersham TM) hergestellt. Die Membran wurde für 1 Minute mit der Detektionslösung bedeckt. Danach wurde die Membran mit Frischhaltefolie umwickelt und mit dem Film in eine Kassette (Hypercassette TM, RPN 11642, 18x24 cm, Amersham, Life Science) gelegt und in der Dunkelkammer der Film entwickelt.

2.10 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 2007, SPSS für Windows (SPSS 19.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)), Power Analysis (Anova Designs)

und R 2.13.1 (R Development Core Team (2011); R: A language and environment for statistical computing; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Mit Power Analysis wurde eine Mindestgruppengröße von 8 Tieren ermittelt. Unter Voraussetzung einer Normalverteilung der Zuchttiere wurde für die Vergleiche der t-Test (für paarige Stichproben bzw. unverbundene Stichproben) gewählt. Bei fehlender Normalverteilung wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Der Lageparameter war das arithmetische Mittel, als Streumaß diente die Standardabweichung (SD). Ein p-Wert $< 0,05$ (z. T. mit Bonferroni-Holm-Korrektur bei multiplen Testen bzgl. der Septenbreite) galt als signifikant. Für Korrelationsangaben wurden Scatterplots erstellt und der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Traumamodell

Der Versuchsaufbau von Meffert und Frey wurde im vorliegenden Experiment um die Implantation eines CYR61-beschichteten Kollagenträgers erweitert (Frey 2005; Meffert et al. 2007; Meffert et al. 2008). Die Kompartimentdruckmessung, das standardisierte Kontusionstrauma, das operative Vorgehen und die Kallusdistraction wie auch die nicht-invasive Muskelkraftmessung erfolgten mit identischen Installationen und nach dem gleichen Procedere. Unter diesen Umständen werden im Folgenden beide Untersuchungen direkt miteinander verglichen.

Vier Tiere sind im Zuge der Isofluran-Narkose eingegangen (Tiere B, C, E und K). Die Gruppengröße umfasste demnach 10 Tiere. Zwei weitere Tiere (Tiere A und D) mussten ca. eine Woche postoperativ aufgrund einer Fraktur jeweils auf Höhe des proximalsten Pins eingeschläfert werden, sodass letztlich 8 Tiere für die Auswertungen dienten. Dies entspricht einer drop-out-Rate von 20%. Anzumerken ist, dass Tier J postoperativ eine Pseudarthrose entwickelte, alle übrigen Tiere wiesen radiologisch eine achsengerechte Stellung nach Konsolidierung auf. Makroskopisch war die Muskulatur bei jedem Tier eutroph.

3.2 Senkung des Kompartimentdruckes durch Tibiaschaftverkürzung

Der Kompartimentdruck in der Tibialis-anterior-Loge wurde präoperativ vor und nach Ischämie mit Kontusionstrauma, direkt postoperativ nach Beinverkürzung sowie 8 h, 24 h und 48 h postoperativ gemessen. Auch hier konnte gezeigt werden, dass der Kompartimentdruck post contusio und nach Ischämie von $5,7 \pm 1,4$ mmHg ansteigt auf Werte bis $33,8 \pm 4,0$ mmHg und sich unmittelbar nach erfolgter Tibiaschaftkürzung um 10% der Ausgangslänge auf physiologische Werte von $12,4 \pm 2,1$ mmHg senken lässt. Die Logendrücke im beobachteten postoperativen Zeitraum von 8, 24 und 48 Stunden

lagen durchgehend im physiologischen Bereich, sodass bei keinem der Tiere eine notfallmäßige Fasziotomie indiziert war.

3.3 Weitere apparative Untersuchungen

Das O₂C (oxygen to see) lieferte präoperativ und postoperativ sowie nach 6 und 24 h Daten über die lokale Mikrozirkulation des traumatisierten M. tibialis anterior. Die muskuläre Perfusion war nach Ischämie mit Kontusion im Vergleich zum präoperativen Wert bzw. im Vergleich zum Kontrollbein nachweislich beeinträchtigt. Postoperativ - also nach Senkung des Logendruckes - zeigte sich, analog zum Kompartimentdruckverlauf, eine Verbesserung der Durchblutung im kapillär-venösen Bereich.

Um eine neurogene Schädigung als Ursache einer fehlenden Muskelkraftregeneration auszuschließen, erfolgte die Messung der Nervenleitungsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt der Muskelkraftmessungen. Diese war bei allen Tieren unauffällig.

Die magnetresonanztomographische Untersuchung der explantierten Beine sollte Hinweise auf mögliche radiologische Korrelate einer fibrösen Degeneration bzw. Hinweise auf muskuläre Ödeme liefern. Die Bilder zeigten jedoch bei Betrachtung keine Auffälligkeiten. Der Resektionsbereich ist definierbar (siehe Abb. 11 mit Kallusregenerat von lateral), aber aufgrund der zu geringen Auflösung sind keine Rückschlüsse auf die histologischen Veränderungen der Muskulatur möglich.

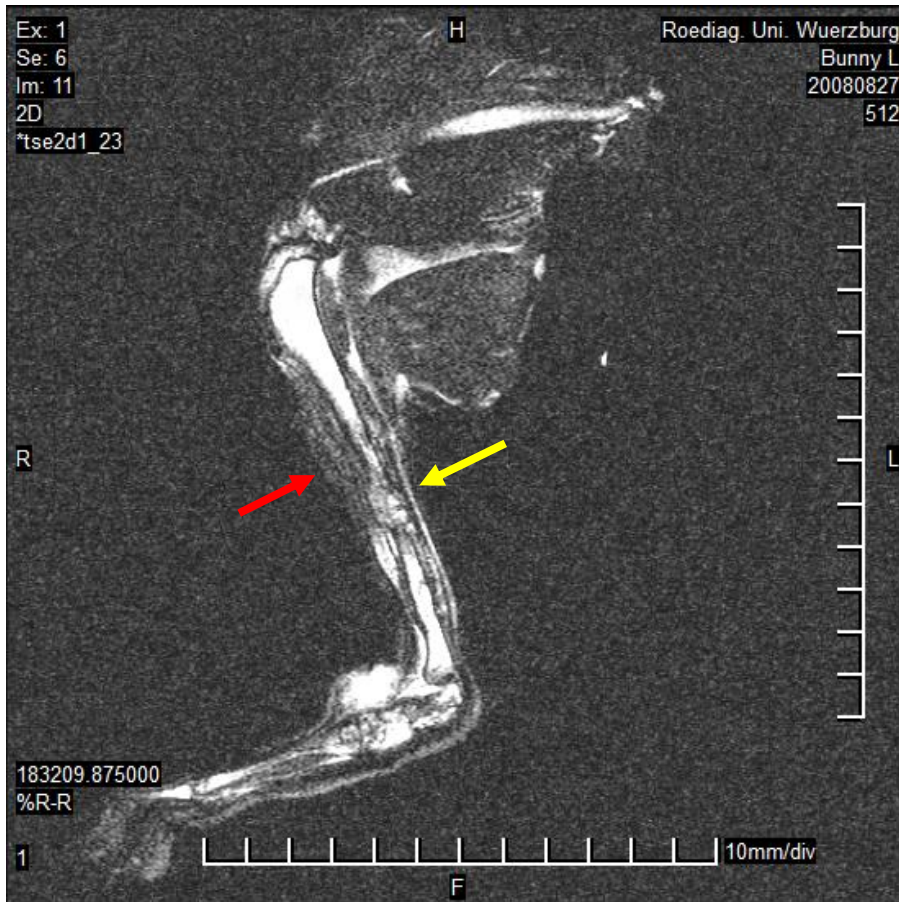


Abb. 11: MRT des operierten Beines mit Kallusregenerat (gelber Pfeil), der rote Pfeil markiert den Bereich des Kontusionstraumas des Musculus tibialis anterior, Sagittalschnitt, Tier L

(Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. med. Th. Bley aus dem Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie des Universitätsklinikums Würzburg)



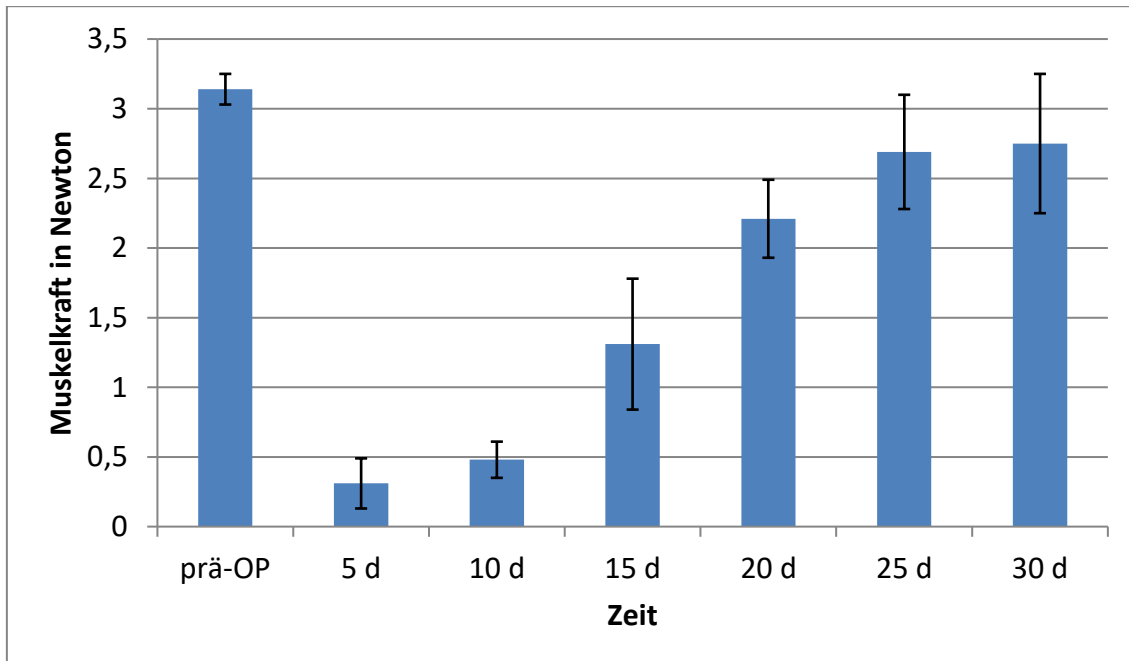
Abb. 12: MRT des operierten Beines mit Kallusregenerat (gelber Pfeil), der rote Pfeil markiert den Bereich des Kontusionstraumas des Musculus tibialis anterior, Koronarschnitte, Tier F
 (Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. med. Th. Bley aus dem Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie des Universitätsklinikums Würzburg)

3.4 Muskelkraftregeneration und Korrelation zum Bindegewebsanteil

Die quantitative Messung der Muskelkraft erfolgte bilateral präoperativ und postoperativ alle fünf Tage. Aus jeweils 100 Einzelmesswerten pro Bein und Messzeitpunkt wurde ein Mittelwert gebildet. Der präoperative Kraftwert diente hierbei als Vergleichswert und entsprach 100%.

Präoperativ zeigten sich keine Unterschiede in der Muskelkraftmessung zwischen dem operierten Bein und dem Kontrollbein ($p = 0,05$). Postoperativ war die Muskelkraft im behandelten Bein aller Tiere im Vergleich zum Kontrollbein signifikant gemindert ($p < 0,001$). Dieser Unterschied in der Muskelkraftmessung war auch nach Beendigung der Distraction sichtbar ($p = 0,12$) (siehe Diagr. 1).

Bis zum 30. postoperativen Tag erreichten alle Tiere im Durchschnitt 88% (2,75 N) ihrer präoperativen Muskelkraft wieder. Die gesamte Testgruppe regenerierte mehr als 80% ihrer Muskelkraft, wobei drei Tiere mehr als 90% (maximal 93%) ihrer Ausgangskraft erlangten.



Diagr. 1: Muskelkraftregeneration des CYR61 behandelten Beines (Versuchsgruppe) als Mittelwerte aller Tiere mit Standardabweichung im zeitlichen Verlauf

Wie bereits in der Untersuchung der Kontrollgruppe durch Frey (2005) beschrieben, erkennt man auch in der CYR61-behandelten Testgruppe eine deutliche Zunahme der Muskelkraft ab dem 10. Tag post operationem. In dem Zeitraum der Kallusdistraktion (10.-20. postoperativer Tag) steigt die Muskelkraft am steilsten an. Mit dem Erreichen der ursprünglichen Tibialänge ist ab dem 20. postoperativen Tag die maximale Kraftentwicklung bei isometrischer Kontraktion des M. tibialis anterior erst möglich. Dies entsprach an Tag 20 durchschnittlich 70% der präoperativen Muskelkraft. Diese ließ sich bis zum 25. Tag noch deutlich steigern und erreichte am Versuchsende

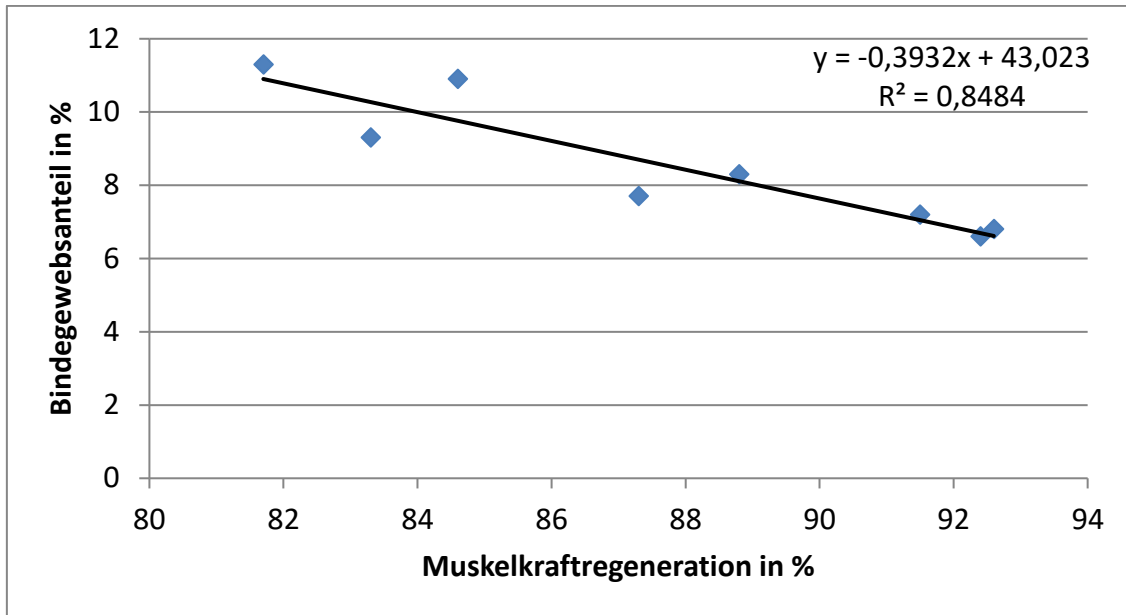
durchschnittlich 88% der Ausgangskraft. Nach Traumatisierung wurde die ursprüngliche Muskelkraft (100%) nicht erreicht.

Tab. 6: Muskelkraftregeneration und Bindegewebsanteil in % je Tier (vergleiche Frey et al. 2019)

Tier CYR61- Gruppe	Muskelkraft in % (Tag 30) des präoperativen Wertes	Bindegewebsanteil in % mit Trauma (ohne Trauma)
F	83,3	9,3 (2,7)
G	88,8	8,3 (3,2)
H	92,6	6,8 (5,6)
I	84,6	10,9 (4,4)
J	91,5	7,2 (3,4)
L	87,3	7,7 (6,1)
M	92,4	6,6 (3,7)
N	81,7	11,3 (2,7)
Mittelwert +/- SD	87,8 +/- 4,3	8,5 +/- 1,8 (4,0 +/- 1,3)

Histomorphometrisch wurden die Bindegewebsanteile im operierten Bein und im Kontrollbein erfasst. Die in Tabelle 6 (siehe oben) angeführten Werte für die Bindegewebsanteile entsprechen Mittelwerten aus proximalen und distalen Schnittpräparaten.

Hierbei wird ersichtlich, dass die Tiere mit einer Muskelkraftregeneration zwischen 80% und 90% einen durchschnittlichen Bindegewebsanteil von 9,5% ($\pm 1,6\%$), jene mit einer Muskelkraft $> 90\%$ einen Bindegewebsanteil von durchschnittlich 6,9% ($\pm 0,3\%$) aufweisen.



Diagr. 2: Korrelation von Muskelkraft und Bindegewebsanteil in %

Es zeigt sich weiterhin ein starker linearer Zusammenhang zwischen den beiden Variablen Muskelkraft und Bindegewebe ($p = 0,01$) (siehe Diagr. 2). Der Korrelationskoeffizient R beträgt $-0,92$, das Bestimmtheitsmaß R^2 beträgt $0,85$.

3.5 Histologische Untersuchungen

In den Azan-gefärbten Präparaten wurden die Bindegewebssepten, also das Perimysium, ausgemessen. Im Vergleich zu den Kontrollschnitten fiel auf, dass sich vor allem diese Bindegewebssepten nach Trauma deutlich verbreitert hatten. Auf diese Weise sollte die Bindegewebsvermehrung nochmals objektiviert werden.

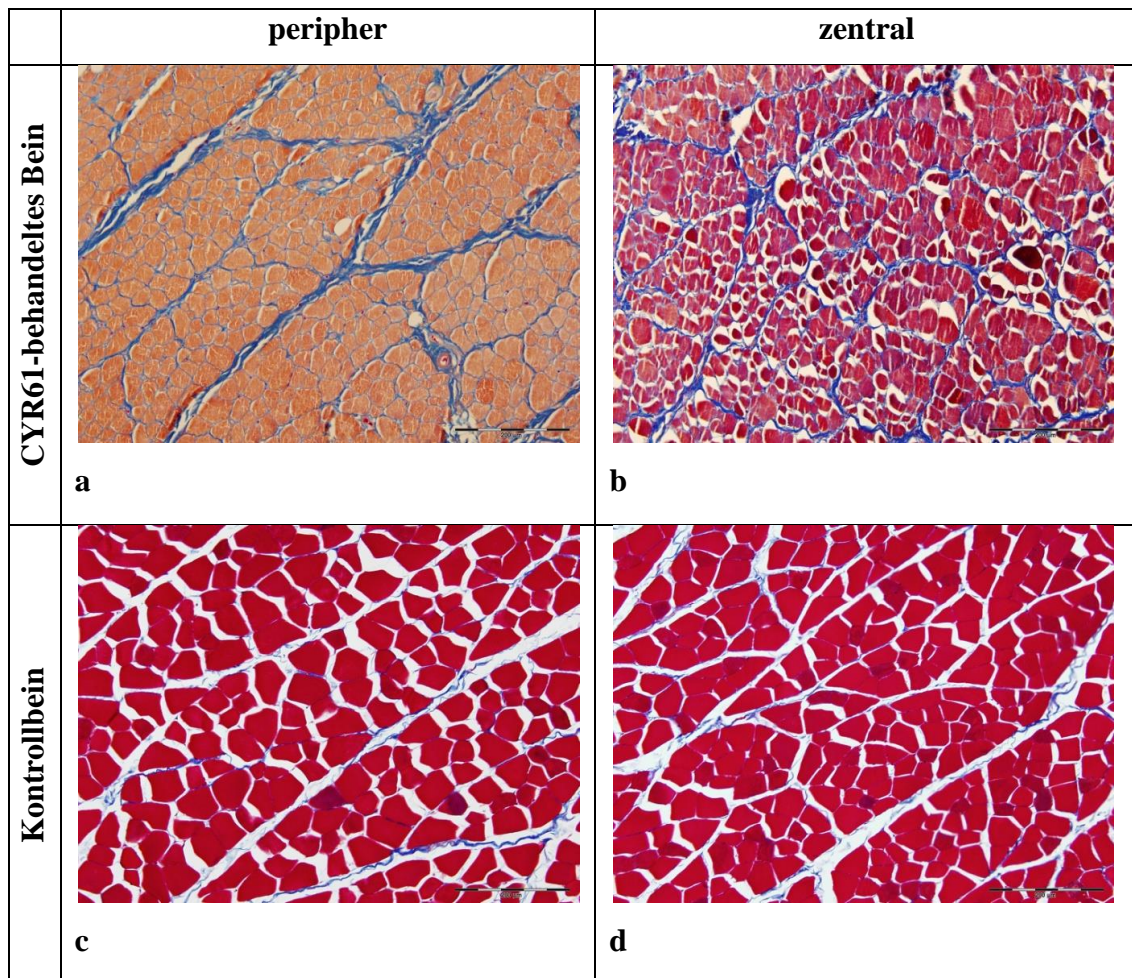
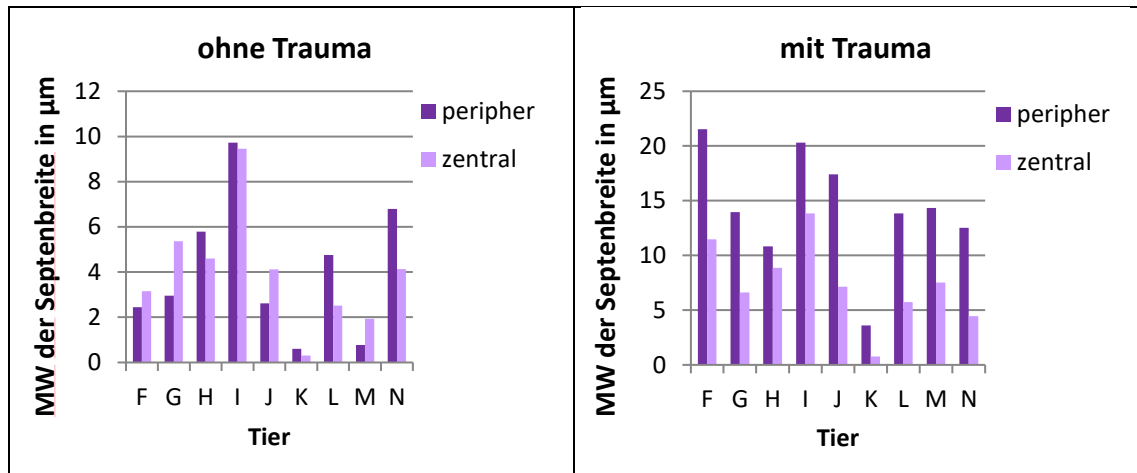


Abb. 13: Darstellung der Bindegewebssepten, Azan n. Heidenhain, 100-fache Vergrößerung (Tier F)

Im nicht-traumatisierten Muskel besteht in 87,5% der Fälle kein Unterschied in der peripheren und zentralen Septenbreite ($p = 0,43$), d. h. im unbehandelten Bein ist das Bindegewebe in diesen Fällen peripher und zentral gleichmäßig verteilt (vgl. Abb. 13 c und d und Diagr. 3). Mit einem $p < 0,05$ mit Bonferroni-Holm-Korrektur ist bei einem Großteil der traumatisierten Beine (in 62,5% der Fälle) von einer signifikanten Zunahme der peripheren Septenbreite im Vergleich zur zentralen Zone auszugehen (vgl. Abb. 13 a und b und Diagr. 3).



Diagr. 3: Vergleich der peripheren Septenbreite mit der zentralen Septenbreite im Kontroll- und operierten Bein in den proximalen Präparaten (MW: Mittelwerte)

Es zeigt sich in 93,8% der Fälle eine signifikante Zunahme der Septenbreite peripher nach Trauma (sowohl proximal als auch distal) im Vergleich zum peripheren Anteil im Kontrollbein mit einem p-Wert von $< 0,05$ mit Bonferroni-Holm-Korrektur. In den zentralen Anteilen der Präparate ist der Unterschied mit einem p-Wert $< 0,05$ in 56,3% der Fälle aufzuzeigen.

In Abbildung 13 sieht man zudem die unterschiedliche Färbbarkeit des traumatisierten Muskels im Vergleich zum Kontrollmuskel, ebenso die unterschiedliche Färbung von Zentrum und Peripherie im operierten Bein. In diesen Präparaten sind viele Retraktionsartefakte, v.a. zentral im "aufgelockerten" Bereich zu sehen. Die Retraktionsartefakte sind vornehmlich um die farbintensiven Myozyten zu finden. Sehr vereinzelt sind in den Schnitten entzündliche Infiltrate zu erkennen.

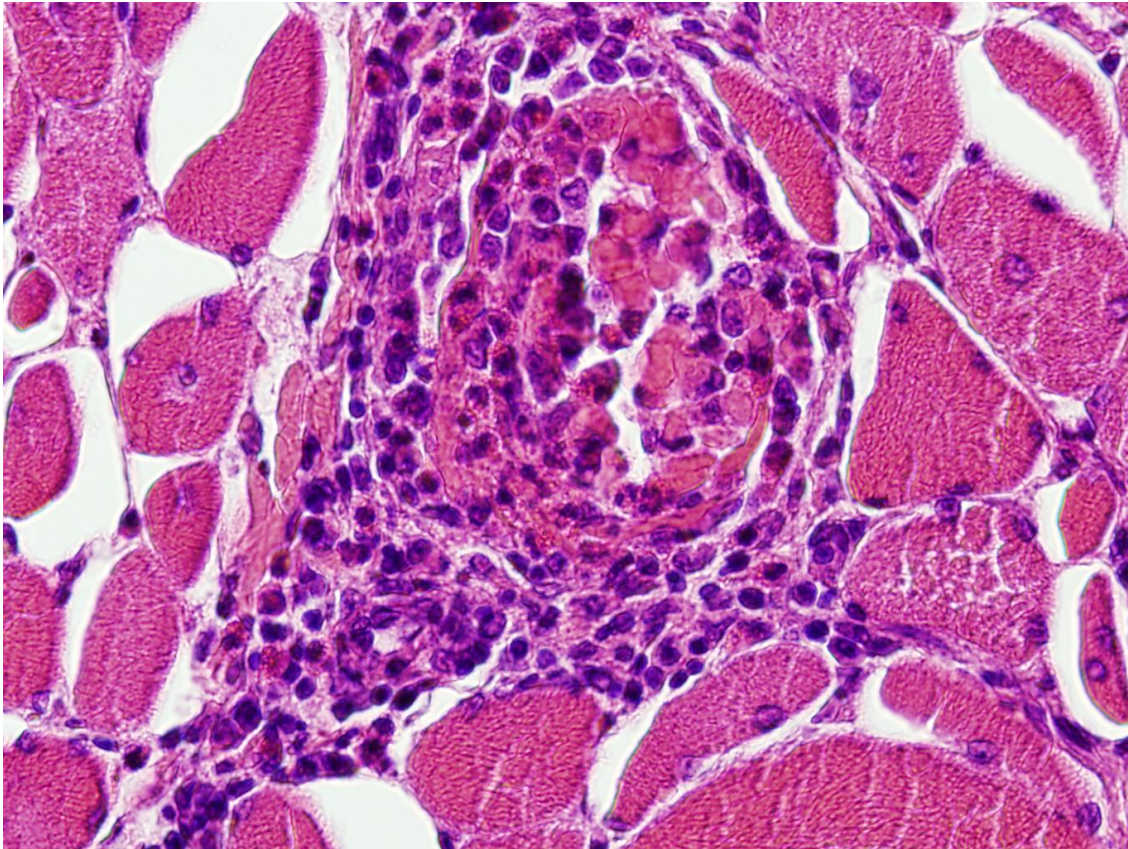


Abb. 14: entzündliches Infiltrat, H.E.-Färbung, 400-fache Vergrößerung (Tier G, operiertes Bein proximal)

Sowohl peripher als auch zentral sind in den H.E.-Färbungen regelmäßig Vorstufen zu "myogenen, mehrkernigen Riesenzellen" mit verschobener Kern-Zytoplasma-Relation und zentral erscheinenden Kernen im fibrosierten Gewebe zu erkennen (nach Begutachtung durch Kollegen des Pathologischen Institutes der Universitätsklinik Würzburg). Nekrosen und Entzündungen sind nicht nachweisbar.

Weitere degenerativ-regenerative Zeichen sind Kalibervariationen der Muskelfasern, entsprechend den Regenerationszonen von peripher nach zentral mit zunehmendem Faserdurchmesser. Die Einstichstellen der Kompartmentsonde sind an lokalisierten Bindegewebsnarben zu erkennen. In den Regeneraten finden sich gelegentlich Muskelspindeln. Histologische Hinweise für eine neurogene Degeneration finden sich nicht.

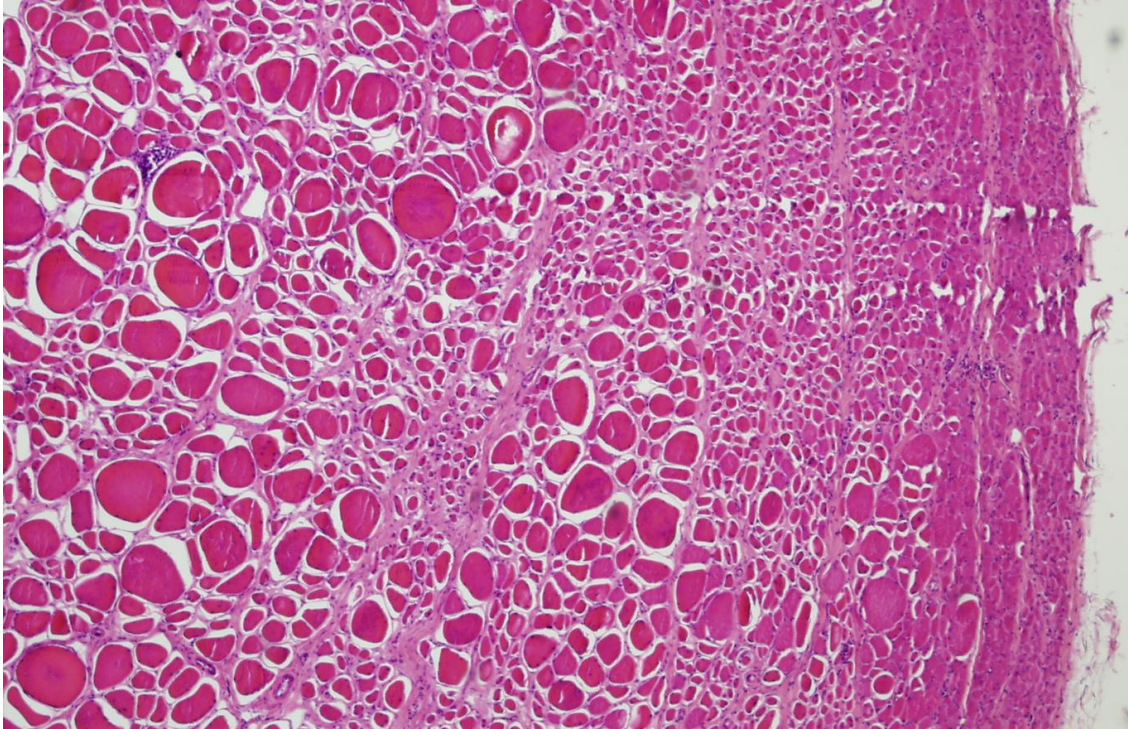


Abb. 15: Kaliberschwankungen, H.E.-Färbung, 40-fache Vergrößerung (Tier F, operiertes Bein, distal peripher)

3.6 Gefäßauszählung

Zur Objektivierung der angiogenen Wirkung von CYR61 erfolgte die Auszählung der Gefäße nach Färbung von Paraffinschnitten mit einem Antikörper, welcher antigenspezifisch an das glattmuskuläre Aktin bindet. Die Gefäße wurden in definierten ROI nach Anzahl und Durchmesser erfasst und in zwei Gruppen zusammengefasst: 10-50 μm bzw. 10-100 μm Durchmesser.

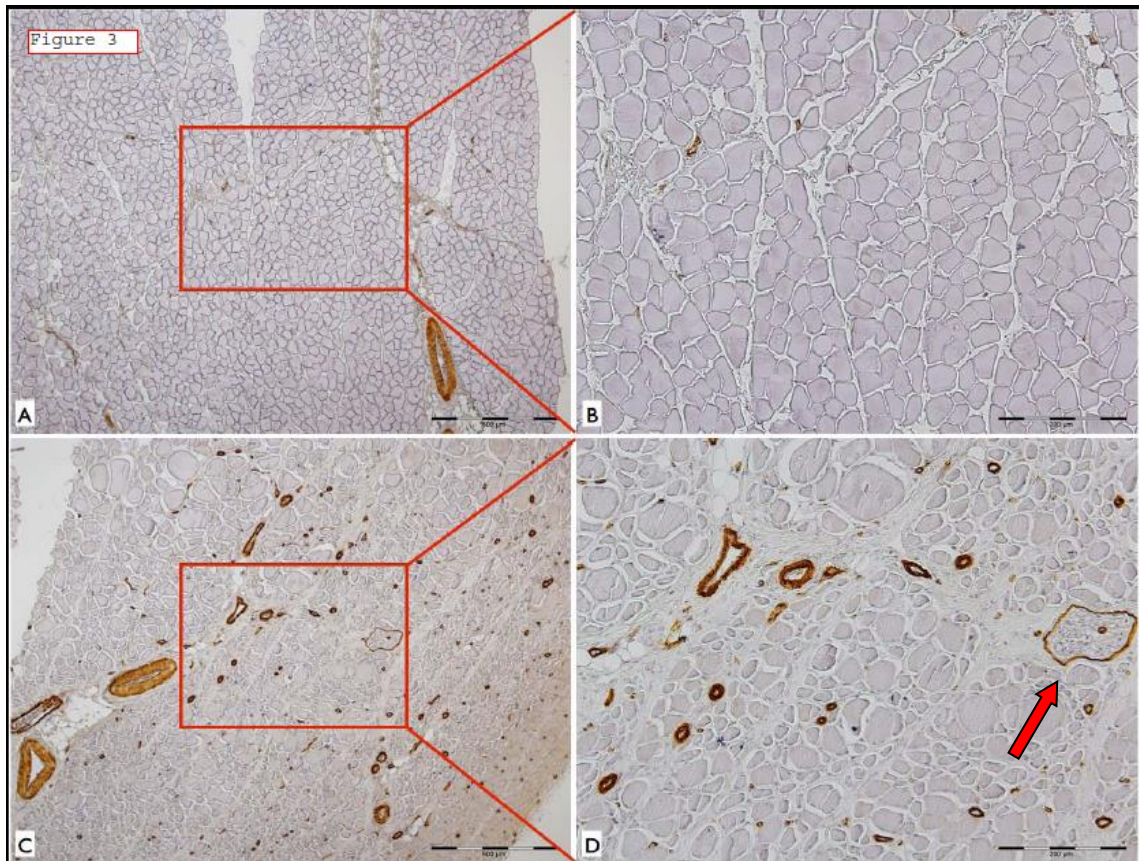


Abb. 16: anti-SMA am Kontrollbein (A und B); anti-SMA am operierten Bein (C und D); Bild A und C in 40-facher Vergrößerung; Bild B und D in 100-facher Vergrößerung (Tier I); Beachte: Färbung des Epineuriums eines größeren peripheren Nerven durch anti-SMA (roter Pfeil)
 (Abdruck aus „CYR61 improves muscle force recreation in a rabbit trauma model“, Frey et al. 2019, Technology and Health Care – 1 (2019), 1-12, mit freundlicher Genehmigung von IOS Press. Die Publikation ist verfügbar über IOS Press: DOI: 10.3233/THC-191635)

Es zeigt sich eine signifikant höhere Gefäßanzahl im operierten Bein im Vergleich zum Kontrollbein, am deutlichsten in der Gruppe distal und peripher (n = 8):

- Gefäßdurchmesser von 10-50 μm :
 $38,75 \pm 27,45$ pro mm^2 im CYR61-behandelten Bein versus $9,13 \pm 6,08$ pro mm^2 im Kontrollbein ($p = 0,016$)

- Gefäßdurchmesser von 10-100 μm :
41,50 \pm 29,34 pro mm^2 im CYR61-behandelten Bein versus 9,88 \pm 6,90 pro mm^2 im Kontrollbein ($p = 0,021$)

Der Unterschied ist lediglich in der Gruppe distal-zentral nicht signifikant.

3.7 Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe

Die Erholung der Muskelkraft und die Bindegewebsverteilung in der CYR61-behandelten Gruppe wurden mit der unbehandelten Kontrollgruppe mit einer Gruppengröße von 11 Tieren ($n=11$) verglichen (Frey 2005).

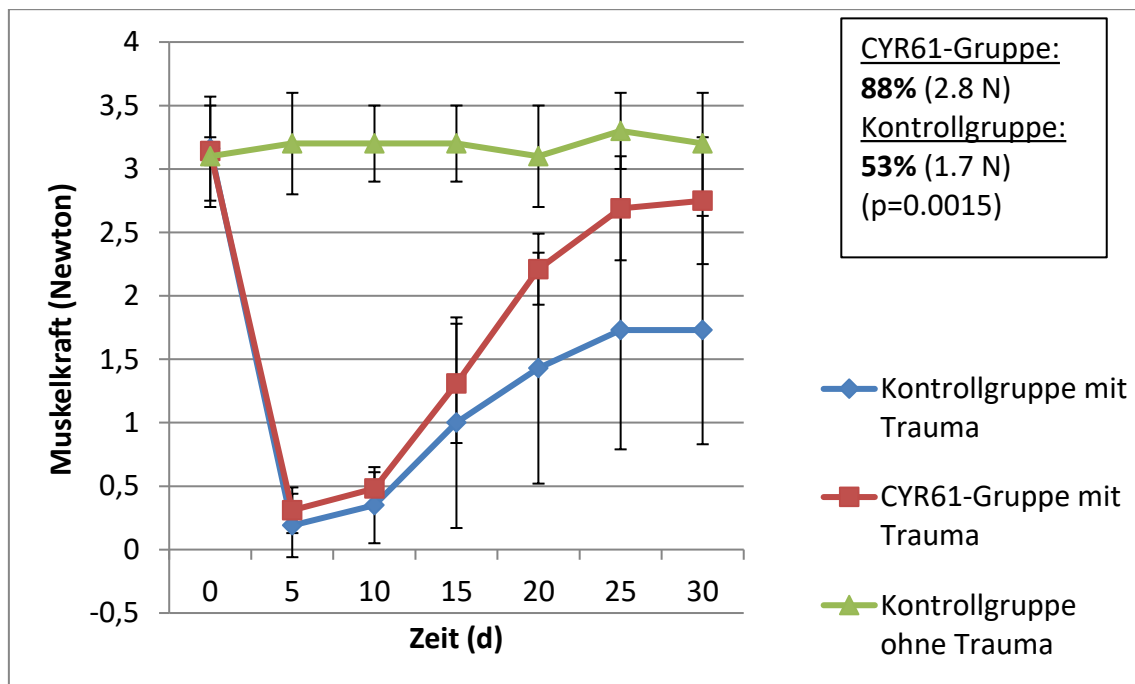
Tab. 7: Mittelwerte der Muskelkraftmessung (in Newton) aller Tiere aus der Kontroll- und CYR61-Gruppe mit Standardabweichung (SD) im zeitlichen Verlauf (Quelle: Frey 2005; Frey et al. 2013; Frey et al. 2019)

Tag	Operiertes Bein der Kontrollgruppe (in Newton, n=11)	SD	Operiertes Bein der CYR61-Gruppe (in Newton, n=8)	SD
0	3,16	0,41	3,14	0,11
5	0,19	0,25	0,31	0,18
10	0,35	0,3	0,48	0,13
15	1,00	0,83	1,31	0,47
20	1,43	0,91	2,21	0,28
25	1,73	0,94	2,69	0,41
30	1,73	0,9	2,75	0,5

In der unbehandelten Kontrollgruppe beträgt die Muskelkraftregeneration 53% (1,73 Newton) im Vergleich zu 88% (2,75 Newton) in der CYR61-behandelten Testgruppe. Der Unterschied ist signifikant mit einem p-Wert von 0,0015. Diagramm 4 veranschaulicht den Vergleich. Auch hier wird erneut deutlich, dass die

Muskelkraftentwicklung von der Knochenlänge und somit von der Muskelvorspannung abhängig ist (vgl. Frey 2005, Meffert et al. 2007).

Die zeitliche Muskelkraftzunahme der Kontrollbeine der CYR61-Gruppe entspricht nahezu dem zeitlichen Verlauf der Kontrollgruppe ohne Trauma.



Diagr. 4: Ergebnisse der Kraftmessung (CYR61-Versuchsgruppe mit Trauma) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe mit und ohne Trauma (nach Frey et al., ASAMI 2005; Meffert et al. 2007)

Tab. 8: Muskelkraftregeneration und Bindegewebsanteile im Vergleich zur Kontrollgruppe, $Rho=0.86$, $p=0.01$ (Daten zur Kontrollgruppe siehe Frey 2005; Frey et al. 2013; Frey et al. 2019)

Tier Kontroll- gruppe (Frey 2005)	Muskel- kraft in %	Bindegewebsanteil in % mit Trauma (ohne Trauma)	Tier CYR61- Gruppe	Muskel- kraft in %	Bindegewebsanteil in % mit Trauma (ohne Trauma)
j	3,8	3,7 (4,1)	F	83,3	9,3 (2,7)
a	67,0	6,4 (3,2)	G	88,8	8,3 (3,2)
b	85,0	14,5 (2,4)	H	92,6	6,8 (5,6)
c	32,0	14,7 (1,8)	I	84,6	10,9 (4,4)
d	40,0	11,3 (4,0)	J	91,5	7,2 (3,4)
e	51,5	17,4 (2,3)	L	87,3	7,7 (6,1)
h	23,0	15,8 (2,6)	M	92,4	6,6 (3,7)
k	60,0	6,0 (1,7)	N	81,7	11,3 (2,7)
l	78,1	6,5 (1,4)	---		
m	87,5	9,0 (2,4)	---		
n	57,6	3,3 (1,6)	---		
Mittel- wert	53,2	9,9 (2,5)	Mittel- wert	87,8	8,5 (4,0)

In der Kontrollgruppe regenerierten mehr als die Hälfte der Tiere eine Muskelkraft von weniger als 60%, wohingegen alle Tiere in der CYR61-Gruppe eine Muskelkraftregeneration von mehr als 80% erzielten.

Unter dem Einfluss des CYR61 zeigt sich eine nur moderate absolute Bindegewebsverminderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ($p = 0,9$). Die Differenz liegt bei 1,4% ($8,5\% \pm 1,8\%$ in der Versuchsgruppe versus $9,9\% \pm 5,4\%$ in der Kontrollgruppe). Der Bindegewebsanteil im Kontrollbein der CYR61-Gruppe ist

jedoch signifikant höher als der Bindegewebsanteil im Kontrollbein der unbehandelten Kontrollgruppe ($4,0\% \pm 1,3\%$ versus $2,5\% \pm 0,9\%$, $p = 0,009$). Somit liegt in der Kontrollgruppe posttraumatisch eine Bindegewebsvermehrung um 7,4% und in der CYR61-Gruppe lediglich eine Zunahme des fibrösen Anteils um 4,5% vor. Unter Berücksichtigung dieser Zahlen ist sogar eine Differenz von 2,9% in der Bindegewebszunahme zu verzeichnen.

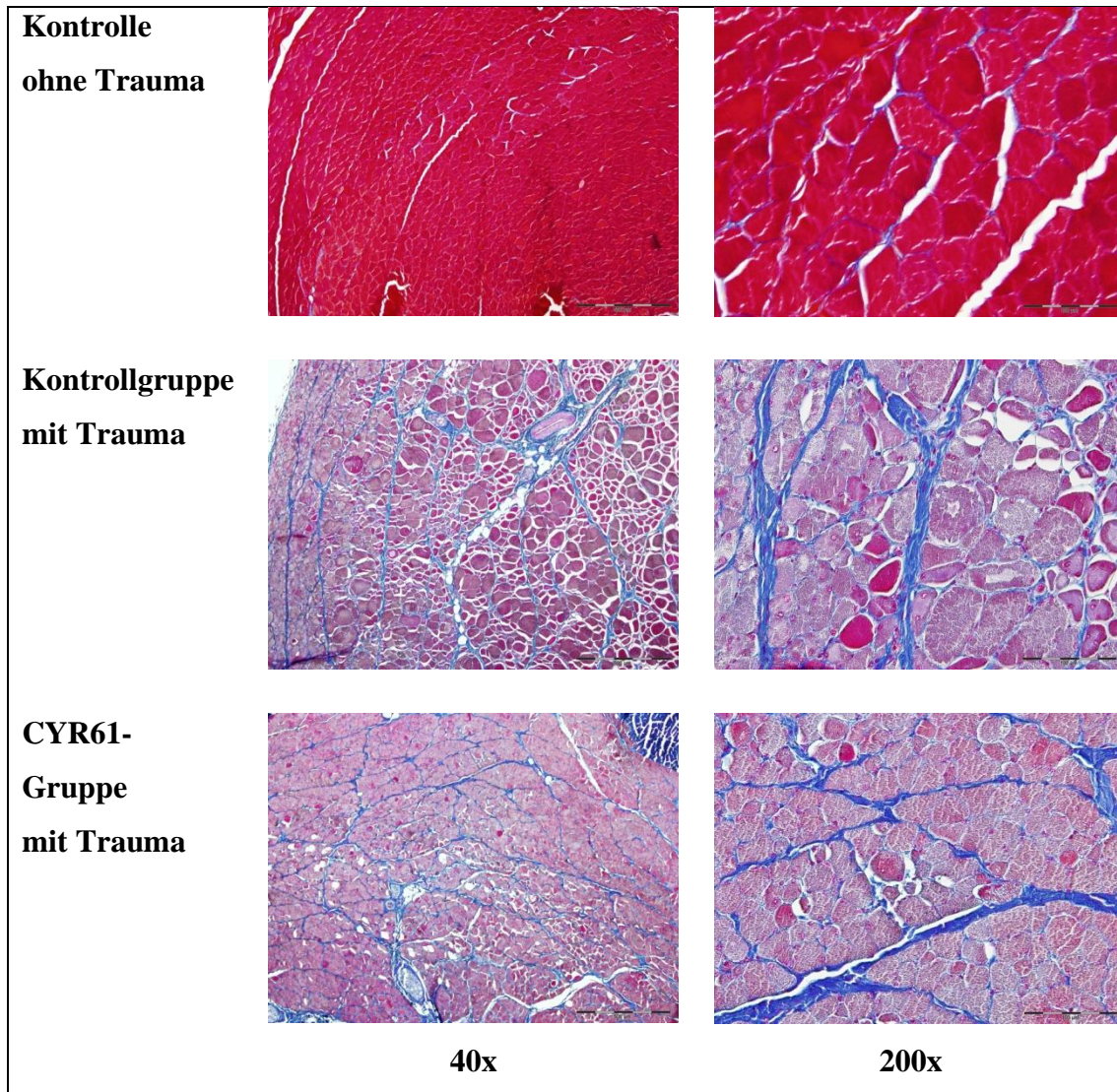


Abb. 17: Histologischer Vergleich der beiden traumatisierten Gruppen (Tier a und Tier F) mit einem gesunden Kontrollbein (Tier K), Azan n. Heidenhain, Vergrößerungen 40-fach und 200-fach (Abdruck aus „CYR61 improves muscle force recreation in a rabbit trauma model“, Frey et al. 2019, Technology and Health Care – 1 (2019), 1-12, mit freundlicher Genehmigung von IOS Press. Die Publikation ist verfügbar über IOS Press: DOI: 10.3233/THC-191635)

3.8 Freisetzungskinetik des CYR61

Der ca. 0,25 cm³ große Kollagenschwamm saugte knapp 180 µl Testlösung auf. Nach Inkubation des Schwammes mit 25 µg CYR61/500 µl über ca. 20 h ist das Protein in 30 µl des Überstandes in einer Menge von 200 ng bis 500 ng nachweisbar (siehe Bande „Inkubationspuffer“ in Abb. 18). Das Molekulargewicht des Fusionsproteins beträgt 73 kDa (Schütze et al. 2005). Die Nachweisgrenze von 100 ng konnte im Western Blot nicht mehr nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass mehr als 20 µg des eingesetzten Proteins im Kollagenschwamm gebunden bzw. komplexiert wurden – vorausgesetzt das Protein wurde während der Inkubationszeit nicht zerstört oder abgebaut.

Im „instant release“ aus dem Schwamm (nach 5 Sekunden) lässt sich noch eine diskrete Bande nachweisen. Nach jeweils 5 Minuten, 30 Minuten, 2 und 4 Stunden sind keine Banden nachweisbar im Sinne einer nicht messbaren Freisetzung.

Die störende Hintergrundfärbung konnte nicht vollständig eliminiert werden. Die Aussagekraft ist zudem eingeschränkt, da kein freies CYR61 parallel zu den Versuchen gemessen wurde. Eine densitometrische Auswertung des Western Blots war aufgrund der Hintergrundfärbung und dem fehlenden Nachweis von Banden nicht durchführbar.

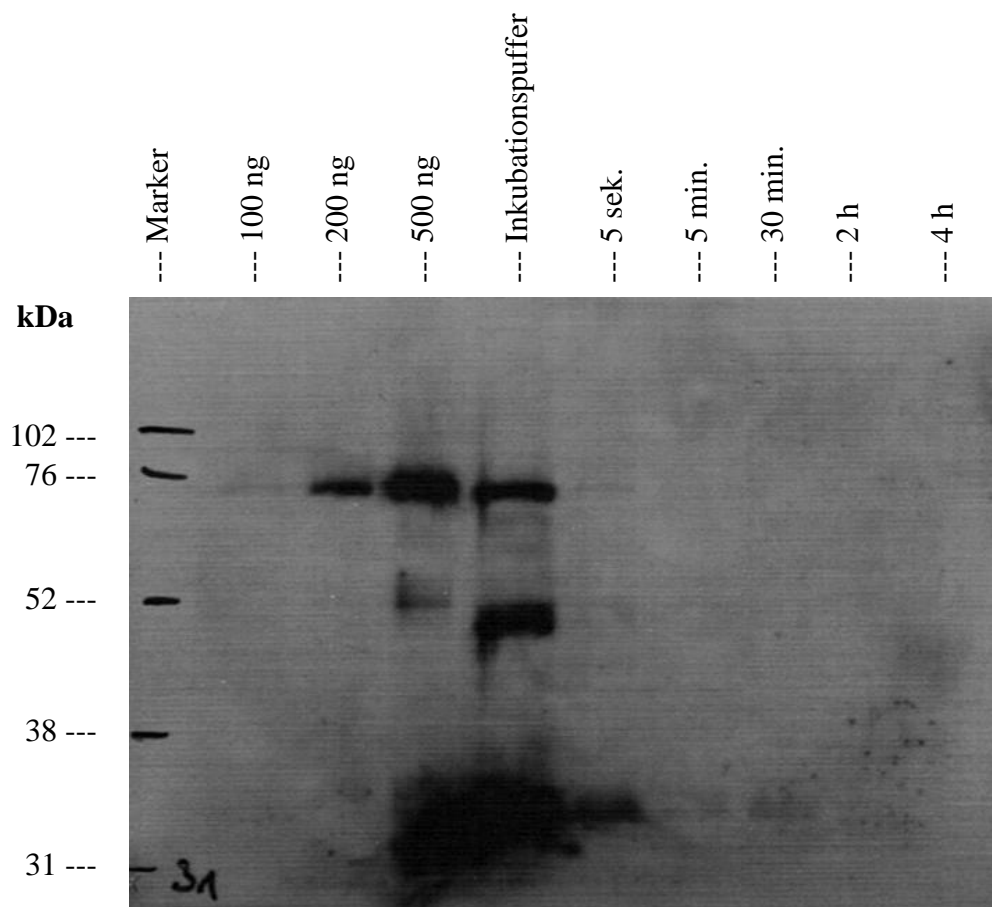


Abb. 18: Western Blot 1 zur Freisetzungskinetik des CYR61 (Molekulargewicht des rekombinanten Fusionsproteins CYR61 mit Fc-tag: 73 kDa)

In einem weiteren Versuch konnte das CYR61 ebenfalls im Überstand und nach Freisetzung aus dem Schwamm nach 5 Sekunden im frischen Puffer nachgewiesen werden. Die Negativkontrolle war unauffällig. Zu weiteren Zeitpunkten konnten keine nachweisbaren Proteinmengen aus dem Schwamm freigesetzt werden. Auch im Western Blot 2 ist erneut die störende, unspezifische Hintergrundfärbung mit Bildung von schwarzen Punkten zu sehen.

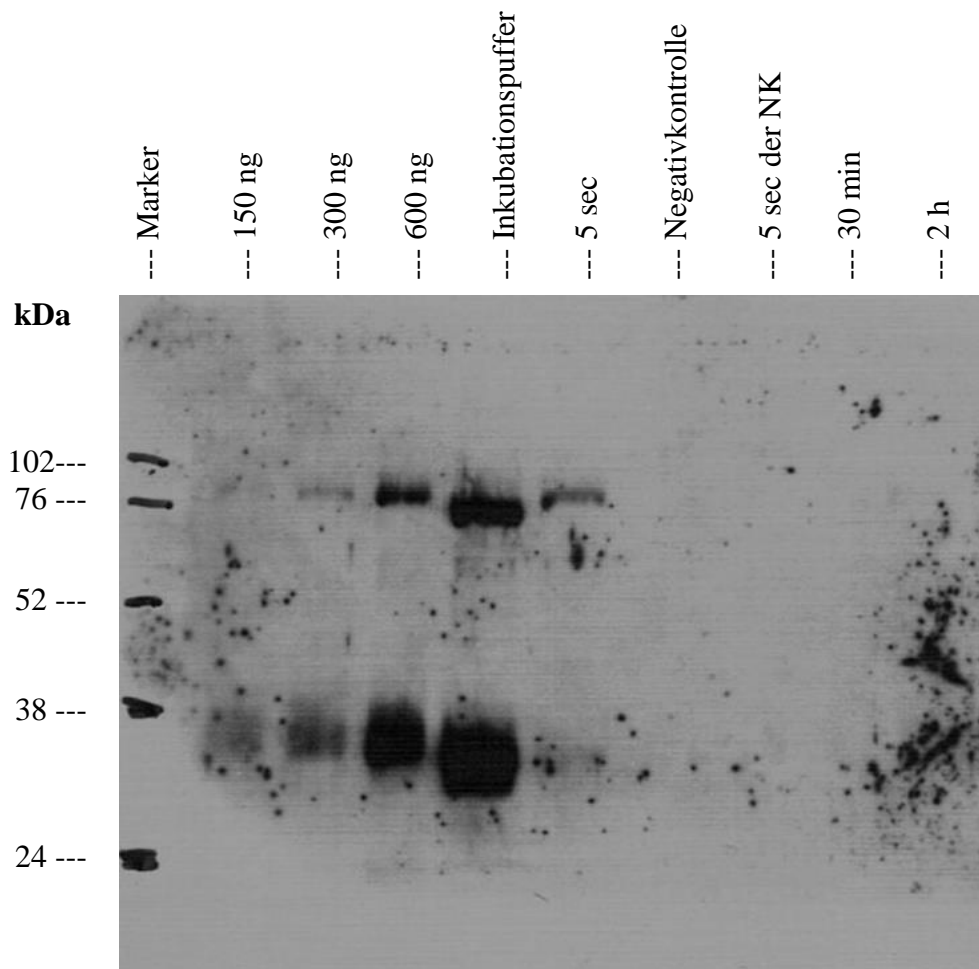


Abb. 19: Western Blot 2 zur Freisetzungskinetik des CYR61, NK: Negativkontrolle (Molekulargewicht des rekombinanten Fusionsproteins CYR61 mit Fc-tag: 73 kDa)

4. Diskussion

Im Rahmen des radikalen Débridement, der Wundlavage und –drainage werden Wachstumsfaktoren und Zytokine, die bei der Wundheilung eine Rolle spielen, lokal ausgespült. Beispielsweise konnten Street et al. eine 15-fach höhere VEGF-Konzentration im frühen Frakturhämatom im Vergleich zu peripher gemessenen Blutspiegeln nachweisen (Street et al. 2000). In den Experimenten von Hadjiargyrou et al. waren zwischen dem siebten und zehnten postoperativen Tag (Phase der Chondrogenese) 10-fach höhere mRNA-Spiegel des CYR61 im Frakturkallus im Vergleich zum intakten Femur nachweisbar (Hadjiargyrou et al. 2000). Daher könnte auch der Muskel von einer lokalen Substitution eines angiogenen Wachstumsfaktors profitieren. Dies ist die Überlegung für den Einsatz des CYR61 in vorliegendem Experiment.

Zur Verbesserung der Muskelheilung wurden bereits Wachstumsfaktoren wie b-FGF und IGF-1 untersucht (Menetrey et al. 2000). Nach Lazerationstrauma im Mäusemodell konnten Menetrey et al. nach lokaler Injektion dieser Faktoren eine beschleunigte histologische Regeneration und verbesserte kontraktile Eigenschaften im Vergleich zum unbehandelten Kontrollbein feststellen. In der Literatur existieren jedoch kaum vergleichbare Untersuchungen zur Muskelregeneration bei gleichzeitiger operativer Versorgung des Knochens und dem Einsatz eines Wachstumsfaktors.

Eine weitere Vergleichsgruppe, die auf demselben Experiment nach Frey (Frey 2005) beruht, ist die von Ochman et al. untersuchte Gruppe (n=11), in der nach identischem Prinzip ein VEGF-getränkter Kollagenschwamm eingebracht wurde (Ochman et al. 2011; Frey et al. 2012).

4.1 Versuchsaufbau

Das Experiment wurde mit der gleichen technischen Ausstattung und durch dieselben Operateure wie bei Frey (2005) durchgeführt. Bezüglich der technischen Besonderheiten und Herausforderungen des Versuchsaufbaus sei auf die

Voruntersuchungen von Frey (2005) verwiesen. Sie bot erstmals die Grundlage für eine nicht-invasive Quantifizierung der Muskelkraft im Kaninchen-Traumamodell.

Da die Klemme manuell exakt an der ausgemessenen Kontusionsstelle gehalten werden musste und diese wie auch das Tourniquet verrutschen konnten, sind unterschiedliche Traumatisierungsgrade möglich. Dies könnte wiederum Ausdruck in abweichenden Muskelkraftwerten der Tiere finden. Dennoch konnte mittels O₂C (oxygen to see) und der Kompartimentdruckmessung objektiviert werden, dass die Muskulatur einer bedeutenden Schädigung mit Beeinträchtigung der Mikrozirkulation unterzogen wurde. Mit posttraumatisch erhöhtem Logendruck bis auf $33,8 \pm 4,0$ mmHg zeigte sich die kapilläre Perfusion zu diesem Zeitpunkt am deutlichsten reduziert und erholte sich im zeitlichen Verlauf analog zur Senkung des Logendruckes auf physiologische Werte. Einen ähnlichen Kompartimentdruckverlauf konnten auch Frey und Ochman in ihren Experimenten beobachten (Frey 2005; Ochman et al. 2011; Frey et al. 2012). Dies unterstützt die Reproduzierbarkeit des Traumas.

Die O₂C-Messung (oxygen to see) kann nach unseren Ergebnissen durchaus als akzessorisches Mittel zur Beurteilung der Blut- und Sauerstoffversorgung im traumatisierten Muskel herangezogen werden. Doch bleibt die Einschätzung der Muskelvitalität und des Schweregrades der Verletzung eingeschränkt, da die mittels O₂C erhobenen Werte interindividuell verschieden waren. Ähnliche Erfahrungen konnten auch Rotter et al. machen, die die Mikrozirkulation im Rattenunterschenkel nach geschlossenem Weichteiltrauma mittels O₂C beurteilten und – zumindest experimentell – eine wesentlich genauere Auswertung mittels Intravitalmikroskopie erreichten (Rotter et al. 2012). Interessant wäre eine Beurteilung der Mikrozirkulation mittels O₂C im Verlauf bis zum 40. postoperativen Tag gewesen, um die Angiogenese zeitlich zu verfolgen.

Eine medikamentöse Beeinträchtigung der Mikrozirkulation durch verabreichte Narkotika und Analgosedativa wie Ketaminhydrochlorid, Xylazinhydrochlorid oder Isofluran kann nicht ausgeschlossen werden. Dieser Aspekt wurde in unserem

Experiment nicht berücksichtigt. Die Kontrollgruppe erhielt jedoch die gleiche Medikation.

Anästhetika bewirken eine Änderung des Gefäßdurchmessers von kleineren Arteriolen (ca. 20 µm) und beeinflussen die Antwort von glatten Muskelzellen auf vasoaktive Substanzen wie Epinephrin oder Norepinephrin (Longnecker et Harris 1980).

Brookes et al. studierten die unmittelbare Wirkung von Ketamin auf die Mikrozirkulation der quergestreiften Muskulatur im Rattenmodell (Brookes et al. 2000). Sie nutzten eine implantierte Kammer zur in vivo Fluoreszenzmikroskopie und zur Beurteilung der Gefäßdurchmesser. Sowohl bei Narkoseeinleitung als auch während der Narkose wurde eine Konstriktion insbesondere der kleinen Arteriolen beobachtet. Lübbe et al. zeigten in einem Rattenmodell, dass verschiedene Anästhetika die Mikrozirkulation der Skelettmuskulatur im Rahmen einer Sepsis beeinflussen (Lübbe et al. 1998). Hier führte der Einsatz der Kombination von Ketamin und Xylazin bei den Tieren zu einer verminderten Reaktivität der kleineren Arteriolen auf den Stress. Andere Untersuchungen zeigten unter Ketamin eine Vasodilatation (Longnecker et al. 1974). Es wird eine Dosis- und Spezies-abhängige Wirkung vermutet (Brookes et al. 2000; Lübbe et al. 1998).

Aufgrund der systemischen Wirkung der Medikamente auf die Makrozirkulation und die muskuläre Mikrozirkulation können Effekte mit Auswirkung auf Ergebnisse von Kompartimentdruck, O₂C und der CYR61-Wirkung nicht ausgeschlossen werden.

Auch kann eine anaphylaktische Reaktion auf das applizierte, rekombinante, humane CYR61 als Ursache für die während der Narkose verstorbenen Tiere nicht definitiv ausgeschlossen werden, es gab jedoch keinen Hinweis auf Zwischenreaktionen.

Es existiert kein absoluter Druckwert, welcher das Muskelgewebe auf prädiagnostische Art und Weise schädigt. Auch ohne manifestes Kompartimentsyndrom kann eine kurzfristige Druckerhöhung im Kompartiment zu einer mittelfristigen Einschränkung der Funktionalität führen - sofern die Druckerhöhung nicht durch einen adäquaten arteriellen Druck kompensiert wird (siehe Kapitel 1.1.3). Müller et al. zeigten diesbezüglich, dass Patienten mit einem erniedrigten muskulären Perfusionsdruck in der Frühphase, d. h. 24 h nach operativer Versorgung einer isolierten Tibiafraktur, ein

schlechteres funktionelles Outcome 4 Wochen postoperativ aufwiesen. 12 Wochen postoperativ bestand keine signifikante Korrelation mehr (Müller et al. 2008). Auch in unserem Experiment lässt sich nicht ausschließen, dass nach einer ausreichenden Rekonvaleszenz und nach adäquatem Training die ursprüngliche Muskelkraft wiederhergestellt wird.

Die monofokale Distractionsosteogenese mit primärer Verkürzung der Fraktur gilt nicht als klinisches Standardverfahren. Es ist aufwendig und komplikationsreich. Einige Autoren befürchten unter diesem Prozedere ein insuffizientes knöchernes Regenerat, Re-Frakturen oder eine verzögerte Frakturheilung mit Fehlstellungen (Meffert et al. 2007). Umso wichtiger ist bei dieser Methode ein gut vaskularisierter umgebender Weichteilmantel zur Bereitstellung myogener und osteogener Vorläuferzellen und zum Aufbau des neuen Knochengewebes.

Grundsätzlich scheint eine stabile knöcherne Fixation entscheidend für eine adäquate Konsolidierung des Knochens: Lienau et al. konnten nach Osteotomie der Tibia unter einer rigiden externen Fixierung eine höhere CYR61-Expression und eine gesteigerte Vaskularisierung des Kallus beobachten. Die Kontrollgruppe wies eine verzögerte Heilung auf (Lienau et al. 2006). In unserem Experiment entwickelte lediglich ein Tier eine hypertrophe Pseudarthrose als mechanische Komplikation durch den Fixateur externe. Alle anderen wiesen radiologisch eine achsengerechte knöcherne Konsolidierung auf, sodass die drop-out-Rate bei 20% lag. Diese betrug zum Vergleich bei Frey (2005) 21%.

Das MRT ist ein Standarddiagnostikum bei Weichteilverletzungen und kann geringe Flüssigkeitsverschiebungen und Vernarbungen darstellen (Küllmer et al. 1995). Sievers et al. sahen bei Patienten nach abgelaufenem manifesten Kompartmentsyndrom und Fasziotomie eine signifikante Reduktion des Flüssigkeitsgehaltes der Muskulatur als Hinweis auf eine Bindegewebsvermehrung (Sievers et al. 1995). Bei Patienten mit drohendem Kompartmentsyndrom und Fasziotomie konnte im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe keine relevante Veränderung im Flüssigkeitsgehalt nachgewiesen werden. Die Autoren stufen hier die Magnetresonanztomographie als ein geeignetes Diagnostikum zur Beurteilung von abgelaufenen Weichteilschäden ein.

In unserem Versuch entwickelten die Tiere jedoch kein manifestes Kompartmentsyndrom. Des Weiteren war die Auflösung des MRT zu gering, als dass detaillierte Veränderungen erkannt werden konnten.

Küllmer et al. untersuchten beispielsweise das kernspintomographische Signalverhalten des Kaninchenmuskels nach standardisierter Stichinzision in den Musculus supraspinatus (Küllmer et al. 1995). Vom zweiten bis zum 64. Tag nach Trauma wurden MRT-Bilder in beiden Gewichtungen betrachtet, wobei im Vergleich zu gesunder Muskulatur nur minimale Unterschiede zu erkennen waren. Rechnerisch ergaben sich jedoch charakteristische Verlaufskurven der kalkulierten T2-Zeiten als Nachweis von geringen Flüssigkeitsverschiebungen in der verletzten Muskulatur. Die größten Differenzen der T2-Zeiten im Vergleich zur gesunden Muskulatur konnten zwischen dem fünften und elften Tag nachgewiesen werden und zeigten nach vier bis fünf Wochen annähernd normale Werte. Eine rechnerische Auswertung der T2-Zeiten zur Detektion von Flüssigkeitsverschiebungen wurde in unserem Versuch nicht durchgeführt.

4.2 Muskelkraftregeneration

Nach einer zeitlichen Latenz von 10 Tagen begannen wir die Distraction mit einer Geschwindigkeit von 0,5 mm/12 h und führten diese bis zum 20. postoperativen Tag aus. In dieser Phase zeigte sich die steilste Steigung der Muskelkraftkurve. Mit Wiederherstellung der ursprünglichen Tibialänge und Zunahme der muskulären Vordehnung war die volle physiologische Kraftentwicklung bei isometrischer Kontraktion erst möglich. Bis zum 30. postoperativen Tag war eine Steigerung der Muskelkraft bis 88% zu verzeichnen. Hiernach konnte keine weitere Steigerung bis zum 40. postoperativen Tag erfasst werden. Die Kurve der CYR61-Testgruppe verläuft parallel zur Kraftkurve der unbehandelten Kontrollgruppe von Frey (2005), zeigt jedoch durchgehend höhere Kraftwerte auf. Als mögliche Ursache ist die erhöhte Vordehnung des M. tibialis anterior durch zirkuläre Implantation des wenige Millimeter dicken Kollagenschwammes am benachbarten Tibiaschaft zu nennen. Dies erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, da die Dicke des Kollagenschwammes bei Applikation von

Flüssigkeit direkt auf ein Minimum abnimmt und dieser zudem innerhalb einiger Tage vollständig resorbiert wird.

Ohne Einsatz eines Wachstumsfaktors erreichte die Testgruppe von Frey (2005) eine Muskelkraftregeneration von 53% bei einem durchschnittlichen Bindegewebsanteil von 9,9%. Die VEGF-Testgruppe regenerierte 75% ihrer Muskelkraft bei einem fibrösen Anteil von 2,5% (Frey et al. 2012). Die CYR61-Testgruppe zeigte hingegen eine signifikant höhere Muskelkraftregeneration von 88% bei einem Bindegewebsanteil von 8,5%. Die Ausgangs-Kraftwerte in der unbehandelten und der CYR61-Testgruppe waren nahezu identisch ($3,16 \pm 0,41$ N vs. $3,14 \pm 0,11$ N). Diese Zahlen legen nahe, dass eine bessere Muskelkraftregeneration nicht mit einem kleineren, absoluten Bindegewebeanteil korreliert, sondern vielmehr mit der relativen Bindegewebsvermehrung im Vergleich zum Ausgangswert. Denn in der Kontrollgruppe lag der Bindegewebsanteil des nicht-traumatisierten Beines bei 2,5% als Ausgangswert bei einem Bindegewebsanteil von 9,9% im traumatisierten Bein (Zunahme um 7,4%). Im Gegensatz hierzu war der Bindegewebsanteil des Kontrollbeines in der CYR61-behandelten Gruppe etwas höher mit 4,0%, wohingegen das operierte Bein einen Bindegewebsanteil von 8,5% aufwies (Zunahme um 4,5%). Interessanterweise fand man in der VEGF-Gruppe eine sehr geringe, posttraumatische Bindegewebszunahme um 1,0% ($2,5\% \pm 0,9\%$ im operierten Bein versus $1,5\% \pm 0,5\%$ im unbehandelten Bein). Dabei zeigen alle drei Experimente eine starke negative Korrelation zwischen der Muskelkraft und dem Bindegewebsanteil (Gorschlüter 2010).

Der unterschiedlich hohe Bindegewebeanteil in den Kontrollbeinen kann in interindividuellen, histologischen Variationen bei den Zuchttieren oder in der Methodik der Phasenanalyse begründet sein. In beiden Arbeiten wurden unterschiedliche Software und Methoden, welche untersucherabhängig sind, verwendet. Um einen systemischen Fehler zu minimieren, wurde die Kontrollgruppe von Frey (2005) nochmals mit der aktuellen Software ausgewertet und verglichen. Die Mittelwerte finden sich in Tabelle 8.

Nach Vergleich der Untersuchungen lässt sich also festhalten, dass der histomorphometrisch erfasste Bindegewebsanteil keinen direkten Rückschluss auf die Muskelkraftregeneration ziehen lässt. Jedoch ist die nicht-invasive Muskelkraftquantifizierung ein geeignetes Mittel zur Einschätzung der funktionellen Regeneration der Muskulatur.

4.3 Histologische Veränderungen

In den histologischen Untersuchungen konnte eine schlechte Fixierung der Proben zu Problemen bei der Auswertung führen. Beispielsweise konnten Falten in den Schnittpräparaten zu einer verminderten Gewebemenge beitragen. Zum Teil waren durch die histologische Aufbereitung größere Gefäße herausgelöst oder das Gewebe aufgelockert auf den Objektträger übertragen. Bei zwei Teilbildern eines Muskels wurde streng darauf geachtet, dass das zweite Bild an das erste anschloss, jedoch sind auch hier minimale Abweichungen von der tatsächlichen Größe nicht auszuschließen. In dickeren Präparaten erschien das Muskelgewebe dunkelrot bis schwarz und erschwerte in sehr seltenen Fällen die Differenzierung vom Bindegewebe in der Phasenanalyse. Die Bindegewebssepten wurden nicht im gesamten Präparat, sondern in vom Benutzer definierten ROI ausgemessen. Diese Methodik könnte zu Abweichungen in der Reproduzierbarkeit führen.

Die Aufteilung der Muskelproben in proximale und distale Anteile zeigte nach Durchsicht der Präparate bezüglich der Nähe zum Implantationsort des Kollagenschwammes, der Nähe zum Resektionsbereich und der Nähe zur Distractionstelle keine Unterschiede in der Bindegewebs- und Gefäßverteilung. So können muskuläre Perfusionsstörungen der distalen Muskelanteile auch in Zusammenhang mit der Resektion und Distraction weitestgehend ausgeschlossen werden.

Wie durch Carlson und Gutmann 1975 in einem Experiment mit ischämischen freien und denervierten Lappenplastiken beschrieben, fanden sich auch in unseren Muskelpräparaten deutlich abgrenzbare Regenerationszonen (Carlson et Gutmann

1975). Das Kontusionstrauma führt primär zu einer direkten Zerreißung des Sarkolemmes der peripheren Muskelfasern, wohingegen der zentrale Anteil des Muskels, der dem Knochen anliegt, einer ischämischen Schädigung durch den Gegendruck des Knochens unterliegt. Dies führt wahrscheinlich zu einer Formation von dicken Bindegewebssepten in der peripheren Zone mit dicht gepackten, regenerierten Muskelfaser-„Clustern“ mit geringem Durchmesser, wie in der Septenmessung objektiviert. Diese Zone breitet sich zentripetal mit langsamer Reorganisation des Zentrums aus.

Myoblasten mit zentralen Kernen sind im reifen Muskel nicht nachweisbar. Möglich wäre die Darstellung von Myotuben, also reiferen Stadien, gewesen. Die Muskelzellen in den Regeneraten sind jedoch am ehesten "atrophisch". Am 40. postoperativen Tag fanden wir zentral viele Retraktionsartefakte mit fraglichen myogenen Riesenzellen, deren Ausgang unklar blieb. Eine Hypertrophie von Fasern bis hin zum „fibre splitting“ im Rahmen eines schweren Trainings/Distraktion/Stress wie von Gonyea et al. beschrieben, hat sich nicht gezeigt. Dies würde wahrscheinlich einer schlechten regenerativen Kapazität entsprechen (Gonyea et al. 1977). Eine Bindegewebsverfettung war in diesem Stadium nicht zu erwarten; diese zeigt sich erst Monate nach Trauma und Fibrosierung des Muskels.

Nach Carlson und Gutmann (1975) erscheinen die untersuchten denervierten Muskelfasern nach 112 Tagen histologisch unauffällig. In unseren Präparaten schien die Regeneration histologisch nicht vollendet, sodass sich die Frage ergibt, ob die verstärkte Gefäßneubildung unter CYR61 zu einer verzögerten Heilung durch eine prolongierte Entzündungsphase führt. Grazioli et al. postulieren diesbezüglich – entgegen des viel beschriebenen antifibrotischen und protektiven Effektes in verschiedenen Geweben - eine proinflammatorische Wirkung des CYR61 im Lungengewebe (Grazioli et al. 2015; Jun et al. 2010; Lai et al. 2014). In ihren Untersuchungen führte die Überexpression von CYR61 zu einer Lungenschädigung.

CYR61 wirkt nicht nur proangiogen, es reguliert auch dosisabhängig die Expression von Genen, welche für die Inflammation, das Remodeling in der Wundheilung und die Zell-Matrix-Interaktion verantwortlich sind (Chen et al. 2001). Ferner belegen

Untersuchungen eine immunmodulatorische Wirkung des CYR61: Studien von Rother et al. zeigen, dass eine systemische Überexpression von CYR61 zu einer Abmilderung der experimentellen autoimmunen Kardiomyopathie führt. Dies wird am ehesten durch eine direkte Suppression der Immunzellmigration erklärt (Rother et al. 2010). Löbel et al. beobachteten, dass auch immunkompetente Zellen CYR61 produzieren und die Ausschüttung durch proinflammatorische Stimuli reguliert wird (Löbel et al. 2012). So seien bei Patienten mit einer akuten Entzündung erhöhte CYR61-Spiegel im Serum vorzufinden.

In unseren Präparaten waren am 40. postoperativen Tag dementsprechend nur vereinzelt entzündliche Infiltrate zu erkennen, wobei nicht definierbar war, ob diese perivaskulär im Sinne einer Vaskulitis erscheinen oder ob es sich um vereinzelte nekrotische Muskelzellen handelt, welche im Begriff sind abgeräumt zu werden.

Auch ist unklar, ob die breiten peripheren Bindegewebssepten traumatisch bedingt sind oder auf einer Wirkung des CYR61 beruhen. Todorovic et al. zeigten, dass die Zellinteraktion mit dem matrizellulärem Protein CYR61 in Abhängigkeit vom Zelltyp die Zellapoptose im Falle von Fibroblasten induzieren und bei Endothelzellen supprimieren kann (Todorovic et al. 2005). Eine systemische Überexpression von CYR61 zeigte in den Experimenten von Raissadati et al. zur Bronchiolitis obliterans eine erhöhte, unerwünschte fibroproliferative Wirkung (Raissadati et al. 2015). In unserem Experiment wurde das CYR61 jedoch lokal appliziert und zeigte im unbehandelten Kontrollbein eine signifikant geringere Bindegewebsmenge im Vergleich zum operierten Bein.

Eine direkte „profibrotische“ Wirkung des CYR61, welche die Entstehung der ausgeprägten Bindegewebssepten in unserem Versuch erklären könnte, ist nach Durchsicht der Literatur nicht beschrieben.

4.4 CYR61: Transfer, Wirkung und Kinetik

Transfer

Eine 0,5 cm² große Kollagenmatrix wurde ca. 20 Minuten vor Implantation mit 25 µg/ml CYR61 versetzt. Der Schwamm saugte ca. 180 µl der Lösung auf. Analog zur klinischen Anwendung muss diese Inkubationszeit zur Komplexierung des Wachstumsfaktors mit der Kollagenmatrix ausreichen. Die Implantation erfolgte zirkumferent um den Frakturspalt. Die Faszie des M. tibialis anterior wurde hierbei nicht eröffnet, sodass das ca. 73 kDa große, rekombinante Protein über Diffusion bzw. über die kollaterale Blutversorgung zum Wirkungsort gelangen musste. Ob benachbarte Muskelgruppen durch das CYR61 beeinflusst wurden, wurde nicht untersucht. Eine Wirkung über den systemischen Kreislauf ist aufgrund der differenten Ergebnisse, insbesondere die Bindegewebssepten betreffend ($p < 0,05$) im Vergleich zum Kontrollbein im vorliegenden Versuch unwahrscheinlich.

Die Konfiguration des Trägermaterials entscheidet über die Komplexierung des Wachstumsfaktors mit diesem. Hiervon abhängig sind wiederum die Stabilität und die Freisetzungsdauer des Stoffes, um vor allem in der klinischen Anwendung einen therapeutischen Spiegel über einen bestimmten Zeitraum aufrecht zu erhalten (Lee et Shin 2007).

Der Wirkstoffträger (RESORBA[®], PARASORB[®] HD) besteht hier laut Hersteller aus nativen, equinen Kollagenfibrillen. Kollagen wird als Trägermaterial häufig in der klinischen Anwendung eingesetzt, da es ebenso günstig wie einfach zu verarbeiten ist und eine hohe Biokompatibilität aufweist (Ceccarelli et al. 2017). Es wurde in unserem Versuch nicht vorbehandelt, sodass sich das CYR61 durch physiko-chemische Bindung mit dem Träger komplexierte. Dies zum einen durch die Cystein-Reste des adhäsiven Proteins, zum anderen ist Kollagen natürlicherweise Bestandteil der extrazellulären Matrix. Da das Kollagen einer raschen Degradation unterliegt und mechanisch schwach ist, könnte eine Vorbehandlung zur besseren Bindung des Wachstumsfaktors sinnvoll sein (Lee et Shin 2007). Beispielsweise wurden für Heparin-bindende

Wachstumsfaktoren wie das BMP-2 (bone morphogenic protein-2) Heparin-konjugierte Träger entwickelt, um die Freisetzungskinetik zu kontrollieren und den Wachstumsfaktor vor einer Denaturierung oder einer proteolytischen Inaktivierung zu schützen (Lee et Shin 2007). Auch das CYR61 ist ein Heparin-bindendes Protein, welches durch solch eine Präparation einer kontrollierten Freisetzung unterliegen könnte.

Es gibt diverse Biomaterialien als Träger im Bereich des muskulären *Tissue Engineering* wie zum Beispiel Alginate, Hyaluronan, Hydroxyapatite und Polyethylenglycol (Rossi et al. 2010). Jedoch scheint in vorliegendem Versuchsaufbau das Kollagen Typ I am geeignetsten zu sein, da es eine geringe Immunogenität besitzt und eine Zelladhäsion von Osteoblasten und Endothelzellen ermöglicht (Babczyk et al. 2014).

Wirkung

Durch Bindung des CYR61 an Integrin $\alpha_v\beta_3$ von Endothelzellen werden Zelladhäsion, -migration und -proliferation angeregt (Yu et al. 2008). Die proangiogene Wirkung des rekombinanten CYR61 wurde im CAM-Assay bestätigt. Aufgrund der Cystein-Reste ist es ein adhäsives Protein. Der IgG-Fc-tag verbessert die Löslichkeit des CYR61 und erleichtert die experimentelle Identifikation von Bindungspartnern. Trotz allem kann eine veränderte Proteinwirkung aufgrund des Fc-tag im Vergleich zum nativen Protein nicht ausgeschlossen werden, da es bisher nicht gelungen ist, dieses in nativer Form zu gewinnen (Schütze et al. 2005).

Die potente angiogene Wirkung des CYR61 wurde durch eine immunhistochemische Färbung mit anti- α SMA (α -smooth-muscle-actin) und eine Gefäßauszählung objektiviert. Es wurden jedoch nicht alle im Präparat befindlichen Gefäße ausgezählt, sondern periphere und zentrale ROIs mit einer Größe von je 1 mm². Auch wurden durch die Färbung nur Gefäße mit glatten Muskelzellen, also am ehesten kleine Arteriolen, erfasst. Bis zum 40. postoperativen Tag waren vor allem Gefäße mit einem

Durchmesser von 10-100 μm entstanden. Kapillaren ($<10 \mu\text{m}$ Durchmesser) fanden hingegen keine Berücksichtigung. Interessanterweise färbten sich mit dem anti-SMA-Antikörper auch Strukturen, die weniger als 10 μm durchmessend waren. Zwar exprimieren auch Perizyten der Prä- und Postkapillaren αSMA , jedoch beträgt deren Verteilung im Skelettmuskel nur 1:100 Endothelzellen (Birbrair et al. 2015; Herman et D'Amore 1985). Im vorliegenden Versuch ist jedoch aufgrund der Spezifität des eingesetzten Antikörpers davon auszugehen, dass es sich bei den gefärbten Strukturen kleiner 10 μm ebenso um arterielle Gefäße handelt.

Eine Austestung weiterer Antikörper am Kaninchengewebe gestaltete sich schwierig und war nicht zielführend, da viele Antikörper im Kaninchen als Wirt entwickelt werden.

Wir konnten im operierten Bein sowohl in den zentralen als auch in den peripheren Regionen eine signifikant höhere Gefäßanzahl als im Kontrollbein nachweisen. Im Gegensatz hierzu fand sich in der VEGF-Gruppe trotz einer Muskelkraftregeneration von 75% keine signifikante Gefäßmehrung (Frey et al. 2012).

Ähnliche Beobachtungen haben Fataccioli et al. 2002 in ihren Untersuchungen gemacht: 30 Tage nach Gentransfer von CYR61 und VEGF₁₆₅ mit Hilfe eines Adenovirus-Vektors in den ischämischen Kaninchenhinterlauf wurde eine deutlich höhere Gefäßdichte und ein verbesserter Blutfluss in der CYR61-behandelten Testgruppe im Vergleich zur VEGF-Gruppe dargestellt. Hierbei scheint das CYR61 vor allem die Kollateralenbildung zu steigern (Fataccioli et al. 2002). Es ist nachgewiesen, dass CYR61 im Rahmen der Wundheilung die Expression der proangiogenen Faktoren VEGF-A und VEGF-C in Fibroblasten hochreguliert (Chen et al. 2001). Somit wirkt es nicht nur gefäßbildend auf Endothelzellen, es verstärkt die Angiogenese zusätzlich durch Ausschüttung von VEGF. Hierdurch könnte das CYR61 im vorliegenden Versuchsaufbau im Vergleich zum VEGF zu einer verstärkten Gefäßneubildung geführt haben.

CYR61 wird durch diverse Zytokine und Faktoren aktiviert, so dass mehrere Signalwege in der Wirkung beteiligt sein können (Lau 2011). You et al. erhielten durch ihre Versuche zur proliferativen diabetischen Retinopathie Hinweise für eine synergistische Wirkung von CYR61 und VEGF, vermutlich durch die Aktivierung

beider Proteine über den Transkriptionsfaktor HIF α , welcher unter Hypoxie induziert wird. Zudem könne CYR61 die VEGF-Expression nicht nur in Fibroblasten und glatten Muskelzellen, sondern auch in Endothelzellen erhöhen (You et al. 2009; Zhou 2005). Ein immunhistochemischer Nachweis von CYR61 und VEGF wurde in vorliegendem Versuch nicht unternommen, da keine Antikörper für das Kaninchenmodell verfügbar waren.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der Gefäßzählung in vorliegendem Traumamodell könnte auch sein, dass sich die Gefäße in der VEGF-Gruppe bis zum 40. postoperativen Tag bereits zurückgebildet haben. In der CYR61-Gruppe könnte die erhöhte Vaskularisierung durch Pooling von Zellen und Zytokinen zu einer verlängerten Regenerationsphase führen. Lokale Stimuli des geschädigten Gewebes könnten wiederum dazu beitragen, dass die Gefäßbildung aufrechterhalten wird. Chen et al. zeigten in ihrem Experiment zur CYR61-vermittelten Genexpression in der Wundheilung der Haut, dass die Wirkung des CYR61 analog zu den Stadien der Wundheilung mindestens 5 Tage anhält (Chen et al. 2001). In einer Analyse von Winkler et al. erscheinen inflammatorische Zellen direkt nach einer experimentellen muskulären Quetschung und zeigen ein Maximum zwischen dem zweiten und vierten Tag nach Trauma (Winkler et al. 2011). Die Inflammation ist bis zum Ende der ersten Woche noch sichtbar und nach 4 Wochen nicht zu detektieren. Eine Gefäßeinsprossung in die Wundregion ist am vierten Tag nach Trauma zu sehen. Diese Beobachtungen unterstützen weiterhin unsere Ergebnisse, nach denen die vermehrte Gefäßbildung 40 Tage post operationem nicht im Rahmen der natürlichen Wundheilung des Muskels zu erklären ist, sondern am ehesten auf einer proangiogenen Wirkung des CYR61 beruht.

Eine weitere Ursache für die divergenten Ergebnisse in der Gefäßzählung könnte in der technischen Durchführung der Immunhistochemie liegen: In beiden Versuchsgruppen wurde zur Gefäßdarstellung ein monoklonaler Primär-Antikörper, spezifisch gegen menschliches, glatt-muskuläres Aktin gerichtet, an Paraffinschnitten angewandt. Jedoch unterscheiden sich die Antikörperverdünnungen und die Färbeprotokolle. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen war dieser humanspezifische Antikörper nicht am Kaninchengewebe etabliert, sodass die Färbungen in unserem Versuch durch eine

Kreuzreaktivität mit dem glatt-muskulären Aktin des Kaninchens zu erklären sind und abhängig vom Färbeprotokoll variieren können.

Hilfreich wäre eine longitudinale Messung und Untersuchung der Präparate zu verschiedenen Zeitpunkten gewesen, um die Gefäßbildung und den Wiederaufbau der strukturellen Integrität des Muskels parallel darzustellen. Vielleicht hätte man so auch eine Möglichkeit, medikamentös einzugreifen und die Wirkung des Faktors zu blocken. Dies war in unserem Versuchsaufbau aufgrund der Gruppengröße nicht realisierbar.

In der CYR61-Testgruppe hat das Bindegewebe im operierten Bein im Vergleich zum nicht operierten Bein um 4,5% zugenommen. Im Vergleich hierzu hat der fibröse Anteil in der unbehandelten Kontrollgruppe von Frey (2005) um 7,4% zugenommen. Wie in Kapitel 1.3.2 dargestellt, kann das cysteinreiche Protein limitierend auf die Fibrose in der Wundheilung wirken. Der transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) nimmt eine zentrale Stellung in der Bindegewebsneubildung ein und zeigt eine pro-fibrotische Wirkung in der Wundheilung (Li et al. 2004). Eine Studie von Borkham-Kamphorst et al. veranschaulicht die antifibrotische Wirkung des CYR61 an portalen Myofibroblasten der Leber. Die Untersucher zeigten eine Abschwächung der TGF- β -Wirkung durch physikalische Bindung an CYR61. Im Ratten-Modell nahm die CYR61-Expression mit zunehmender hepatischer Fibrosierung ab (Borkham-Kamphorst et al. 2014).

Die bessere Muskelkraftregeneration (88% versus 75%) trotz höherem Bindegewebsanteil (8,5% versus 2,5%) in der CYR61-Gruppe im Vergleich zur VEGF-Gruppe (Frey et al. 2012) könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Protein weitere Signalwege oder Mechanismen nutzt, die zum Zeitpunkt unklar sind. Beide Proteine wirken proangiogen und mitogen auf Endothelzellen (Shibuya 2013).

In der Literatur existieren nur wenige Untersuchungen darüber, wie das CYR61 auf myogene Zellen wirkt. O'Conner et al. zeigten in ihren Experimenten, dass CYR61 während allen Stadien der Myogenese in vitro und in vivo im Skelettmuskel exprimiert wird (O'Conner et al. 2006). Zudem konnten sie in der Zellkultur nachweisen, dass CYR61 ein Zielgen des Transkriptionsfaktors NFAT5 (nuclear factor of activated T cells-5) ist, welcher die Migration und Differenzierung von Myoblasten fördern soll.

Die Studie unterscheidet nicht zwischen einer direkten und einer indirekten Regulation der CYR61-Expression durch NFAT5. Die Autoren diskutieren die Funktion des CYR61 als Liganden für Integrin-Rezeptoren, über welche im Folgenden die Migration von Myoblasten induziert wird. Eine weitere Hypothese ist, dass CYR61 als matrizelluläres Protein über seine Proteindomänen verschiedene Wachstumsfaktoren und Zellen, welche bei der Muskelregeneration eine Rolle spielen, zusammenführt. Der Wachstumsfaktor könnte aber auch Matrixmetalloproteinasen aktivieren, die Extrazellulärmatrix modifizieren und so die Migration von myogenen Zellen erlauben (O'Conner et al. 2007; Fataccioli 2002).

Du et al. wiesen weitere Effekte des CYR61 auf die Muskulatur nach (Du et al. 2014): Im mRNA-Microarray zeigte sich eine erhöhte Konzentration des Proteins in der Muskulatur alternder Tiere. Des Weiteren neigten muskuläre Vorläuferzellen in der Zellkultur in Gegenwart von CYR61 zur Zellalterung. CYR61 ist ein direktes Zielgen des Wnt-Signalweges (Chen et Lau 2009). Nach Du et al. könnten erhöhte Wnt-3a-Spiegel im Serum der alternden Muskulatur über eine Aktivierung des CYR61 zur Zellalterung führen. Die Autoren haben verschiedene Indizien dafür, dass CYR61 die Alterung in Muskelzellen induziert. Unter anderem waren in ihren Experimenten unter Zugabe von CYR61 der Seneszenz-Marker SA- β -gal (Senescence-associated β -galactosidase) erhöht, die Proliferationsrate der muskulären Vorläuferzellen und der Proliferationsmarker Ki-67 erniedrigt und der Tumorsuppressor p53 erhöht. Interessanterweise beeinträchtigt CYR61 in diesen Untersuchungen die Proliferation, jedoch nicht die Differenzierung der muskulären Vorläuferzellen. Eine vorzeitige Differenzierung führe allerdings zu einer Alterung der Muskulatur und zu einer verminderten regenerativen Kapazität. Vielleicht ist dies unter anderem ein Grund dafür, dass in unserem Versuch unter Einsatz des CYR61 nicht höhere Werte für die Muskelkraft erzielt wurden. Dennoch lassen sich diese Untersuchungsergebnisse nur beschränkt auf unser Traumamodell übertragen, da das Protein in vivo andere - spekulativ auch gegenteilige - Funktionen zeigen kann. In dem komplexen Prozess der Weichteilregeneration ist das CYR61 multifunktional und wirkt regulierend auf Signalwege. Wie in Kapitel 1.3.2 erwähnt, ist die Wirkung des CYR61 abhängig vom Milieu und von Komponenten der Extrazellulärmatrix.

Kinetik

Es gibt wesentliche Nachteile von Kollagenträgern zur Applikation von Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel dem BMP-2 bei knöchernen Defekten: das Fehlen einer kontinuierlichen Freisetzungskinetik, ein hoher „burst release“ und eine Retention von weniger als 5% des Proteins nach zwei Wochen (Vo et al. 2012).

Die Freisetzungskinetik des CYR61 aus dem Kollagenträger wurde in einem Western Blot untersucht. Nachteilig war hierbei die relativ hohe Nachweisgrenze von ca. 200 ng. Retrospektiv wurden ca. 20 µg der eingesetzten 25 µg/500 µl CYR61 im Kollagenschwamm komplexiert – wenn davon ausgegangen wird, dass das Fusionsprotein nicht zerstört oder abgebaut wurde. Nachweisbar war das Protein lediglich im Inkubationspuffer und nach 5 Sekunden als „instant release“, welcher als sehr schwache Bande dargestellt wurde. Eine densitometrische Auswertung war in diesem Fall nicht sinnvoll. Der freie Zerfall des Proteins wurde nicht getestet.

Eine bessere Methode zur Untersuchung der Freisetzungskinetik wäre ein ELISA. Dieser war jedoch zum Zeitpunkt nicht verfügbar. Da die Freisetzungskinetik essenziell für die Abgrenzung von biologischen Effekten, zur Dosisfindung und Ebnung zur klinischen Anwendung ist, sollte diese näher untersucht werden.

Analog untersuchten Ochman et al. die Freisetzungskinetik des VEGF aus der Kollagenmatrix im ELISA. Sie sahen eine hohe Freisetzung von ca. 40% in den ersten 2 h. Danach wurde der Wachstumsfaktor konstant über 24 h abgegeben (Ochman et al. 2011). Eine ähnliche Kinetik zeigte sich im Kreislaufmodell von Kleinheinz et al.: die Freisetzung des VEGF aus einem Kollagenträger ist biphasisch mit initial schneller Diffusion und folgender Plateauphase nach ca. 12 h (Kleinheinz et al. 2010).

Eine Methode zur Reduktion des „burst release“ und zur Kontrolle des angiogenen Effektes von Wachstumsfaktoren könnte die Kombination von pro- und anti-angiogenem Faktor sein, wie die Studie von Yuen et al. zeigte: Durch simultane Freisetzung von räumlich getrenntem VEGF und anti-VEGF aus einem synthetischen Polymer konnte der initial hohe „burst release“ reduziert und somit eine kontinuierliche Abgabe des VEGF erzielt werden. Trotz Einsatz des Inhibitors waren die Effekte auf die

Gefäßdichte und die Perfusion vergleichbar mit dem Effekt durch alleinigen Einsatz des VEGF (Yuen et al. 2010).

Zusammenfassend können die unter Punkt 1.5 genannten Fragestellungen wie folgt beantwortet werden:

1. Unter lokaler Anwendung des angiogenen Wachstumsfaktors CYR61 ist eine funktionelle Regeneration der Muskulatur, messbar an der Muskelkraft, zu beobachten. Im Versuchszeitraum konnte eine durchschnittliche Muskelkraftregeneration von 88% verzeichnet werden. Eine volle Wiederherstellung der ursprünglichen Muskelkraft war nicht zu beobachten.
2. Der Einsatz von CYR61 führt im Tiermodell zu einer signifikant besseren Muskelkraftregeneration im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe von Frey (2005) ($p = 0,0015$). Die Muskelkraft wurde nicht-invasiv quantifiziert und beträgt 88% (2,75 N) der ursprünglichen Kraft in der CYR61-Gruppe. Die unbehandelte Kontrollgruppe konnte lediglich 53% (1,73 N) ihrer ursprünglichen Muskelkraft wiedererlangen.
3. Wie in den Versuchen von Frey (2005) korreliert auch in diesem Experiment eine hohe Muskelkraftentwicklung signifikant mit einem geringen histologischen Bindegewebsanteil ($R = -0,92$, $R^2 = 0,85$, $p = 0,01$). Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die posttraumatische Fibrosierung in der CYR61-behandelten Gruppe um 1,4% geringer ($9,9\% \pm 5,4\%$ versus $8,5\% \pm 1,83\%$, $p = 0,9$). Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant.
4. Es gelang eine immunhistochemische Färbung der Gefäße in der Kaninchenmuskulatur mit einem Antikörper gegen α -SMA. Die Anzahl der Gefäße mit einem Durchmesser von 10-50 μm war im CYR61-behandelten Bein signifikant höher als im nicht traumatisierten Kontrollbein ($p = 0,016$). Diese Beobachtung legt nahe, dass der Wachstumsfaktor CYR61 einen lokalen proangiogenen Effekt hatte.

5. Die Freisetzungskinetik des CYR61 aus dem Kollagenschwamm wurde mittels Western Blot untersucht. Deskriptiv ist lediglich ein initial hoher „burst release“ innerhalb weniger Sekunden nachweisbar.

4.5 Aussichten

Als matrizelluläres Protein ist das CYR61 ein neuer und als implantierter Wachstumsfaktor im Traumamodell bislang nicht untersuchter Kandidat auf dem Gebiet der regenerativen muskuloskelettalen Medizin. Es ist multifunktional und an vielen Signalwegen wie der Embryonalentwicklung und dem Entzündungs- und Heilungsprozess beteiligt (Chen et Lau 2009).

Interessant ist der Einsatz von synergistischen Wachstumsfaktoren wie IGF-1 (insulin-like growth factor-1) und einem TGF- β -Antagonisten oder von IGF-1 und VEGF zur Verbesserung der Muskelregeneration (Sato et al. 2003; Borselli et al. 2010). Willoughby et al. injizierten in den Musculus rectus superior des Kaninchens sequentiell HGF (hepatocyte growth factor) und IGF-1 mit folgendem synergistischem Effekt und Möglichkeiten der Dosisersparung (Willoughby et al. 2012). Durch kombinierten Gentransfer von FGF2 (fibroblast growth factor-2) und CYR61 in den ischämischen M. tibialis anterior der Maus konnte durch Rayssac et al. (2009) eine effektivere Durchblutung im Vergleich zum Transfer von nur einem dieser Faktoren dargestellt werden. Der kombinierte Vektor führte zu einer geringeren Expression der Proteine bei größerer Effektivität. In Zukunft wäre die Applikation von kombinierten Wachstumsfaktoren und Stammzellen denkbar, welche koordiniert zum richtigen Zeitpunkt freigesetzt werden und so den Heilungsprozess optimal unterstützen (Almubarak et al. 2016).

Vielleicht ist auch das Remodeling in der Wundheilung dosisabhängig, sodass Zellaktivierung und –suppression in Balance sind. Eine effektive Dosisreduktion ist im Falle des proangiogenen Faktors CYR61 essenziell, da unter alleiniger CYR61-Expression in höheren Dosen eine beschleunigte Tumorprogression beobachtet wurde

(Rayssac et al. 2009). So soll eine erhöhte Expression von CYR61 mit dem Ovarial-, Endometrium-, Prostata- und dem kolorektalen Karzinom sowie mit Gliomen, der Vaskularisierung und Metastasierung bei Mammakarzinomen assoziiert sein (Li et al. 2015). CYR61 kann jedoch auch die Apoptose und Zellalterung induzieren. So zeigen andere Studien gegenteilige Ergebnisse, wobei beispielsweise die CYR61-Expression in fortgeschrittenen Tumoren vermindert sein könne (Li et al. 2015).

Für den zukünftigen klinischen Einsatz muss neben einer effektiven Dosis auch eine optimale Applikationsform für den Wachstumsfaktor etabliert werden. Ferner wurde das CYR61 bisher nicht im humanen muskuloskelettalen Trauma eingesetzt. Es existieren viele *in vitro* Studien – die *in vivo* Effekte sind unklar und abhängig von multiplen Faktoren. Limitierend sind in dieser Arbeit der spezielle Versuchsaufbau und die Austestung am Kaninchengewebe. Eine Aussage zum Effekt des CYR61 auf den Muskel mit fehlender knöcherner Begleitverletzung und Resektion des Knochens kann nicht getroffen werden. Zudem ist die Übertragung der Ergebnisse auf den Einsatz am Menschen nicht möglich.

Durch eine erhaltene Perfusion werden Infektionen vermindert und die Wundheilung gefördert. Ziel ist es, ein Gleichgewicht zwischen Inflammation, Angiogenese, Bindegewebsformation und muskulärer Regeneration herzustellen. Dies geschieht durch die Auswahl einer geeigneten Proteinkonzentration, um letztlich eine verlängerte Regenerationsphase – bedingt durch eine mögliche Hypervaskularisierung und Ödeme sowie eine prolongierte Entzündungsphase – zu verhindern. Das cysteinreiche Protein 61 hat Einfluss auf elementare Signalwege. Daher sind weitere Untersuchungen, unter anderem zur Dosis, Kinetik, Nebenwirkungen und Optimierung des Trägermaterials, notwendig. Nur so kann auch ein Patient in Zukunft vom Einsatz des CYR61 profitieren.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss des proangiogenen, cysteinreichen Proteins 61 (CYR61) auf die Muskelregeneration nach akuter Beinverkürzung und nachfolgender Distraktionsosteogenese untersucht.

Die Experimente erfolgten an 8 skelettreifen Kaninchen der Rasse „Weiße Neuseeländer“. Nach standardisierter Ischämie (90 Minuten) mit Kontusionstrauma (10 N/cm² über 30 Minuten) des M. tibialis anterior wurde die Tibia um 10% der Ausgangslänge (entsprechend 1 cm) reseziert. Anschließend wurde zirkumferent um den Frakturspalt ein mit CYR61 (25 µg/ml) getränkter Kollagenschwamm (ca. 0,25 cm³) eingelegt. Die Kallusdistraktion wurde am 11. postoperativen Tag begonnen und mit einer Geschwindigkeit von 0,5 mm/12 h bis einschließlich dem 20. postoperativen Tag ausgeführt, so dass hieraus eine Wiederherstellung der ursprünglichen Tibialänge resultierte. Der Kompartimentdruck wurde jeweils präoperativ, unmittelbar nach Beinverkürzung und nach acht Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden post operationem gemessen. Nach Meffert et al. (2008) erfolgte die Muskelkraftquantifizierung nach transkutaner elektrischer Stimulation des Nervus fibularis, welche zu einer isometrischen Kontraktion des M. tibialis anterior führte. Eine speziell angefertigte Messeinheit erfasste die Muskelkraft präoperativ sowie postoperativ im Abstand von fünf Tagen bis zum 40. postoperativen Tag.

Der Kompartimentdruck stieg nach Traumatisierung von 5.7 mmHg bis 33.8 mmHg an und ließ sich unmittelbar nach erfolgter Tibiaschaftverkürzung auf physiologische Werte senken. In der CYR61-behandelten Gruppe konnten durchschnittlich 88% (versus 53% in der Kontrollgruppe von Frey 2005) der ursprünglichen Muskelkraft wiederhergestellt werden. Der fibrotische Anteil nach Trauma verdoppelte sich lediglich im Vergleich zu einer vierfachen Bindegewebszunahme in der Kontrollgruppe ohne Wachstumsfaktor, wobei eine nur moderate Verringerung des absoluten Bindegewebeanteils unter CYR61 beobachtet wurde (8,5% versus 9,9%). Unter dem Einfluss von CYR61 konnte eine signifikant gesteigerte Vaskularisierung nachgewiesen werden.

Durch den Einsatz des CYR61 im Traumamodell mit akuter Beinverkürzung und Distractionsosteogenese wurde die Muskelkraftregeneration verbessert. Dieser Benefit könnte auf einer anti-fibrotischen Wirkung oder auch auf einer protektiven Wirkung des Proteins auf den Muskel durch die Verhinderung progredienter Muskelnekrosen aufgrund einer gesteigerten Vaskularisierung beruhen.

6. Literaturverzeichnis

1. Alessandrino F, Balconi G (2013) *Complications of muscle injuries*. J Ultrasound. 2013 Mar 2; 16(4):215-22.
2. Allen RE, Sheehan SM, Taylor RG, Kendall TL, Rice GM (1995) *Hepatocyte growth factor activates quiescent skeletal muscle satellite cells in vitro*. J Cell Physiol. 1995 Nov; 165(2):307-12.
3. Almubarak S, Nethercott H, Freeberg M, Beaudon C, Jha A, Jackson W, Marcucio R, Miclau T, Healy K, Bahney C (2016) *Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration*. Bone. 2016 Feb; 83:197-209.
4. AO-Foundation Switzerland (2014) *AO/OTA Fracture and Dislocation Classification* (Faltblatt, zitiert am 30.08.2015) <https://aotrauma.aofoundation.org/Structure/education/self-directed-learning/reference-materials/classifications/Documents/AO-OTA-Fracture-and-Dislocation-Classification.pdf>
5. Babczyk P, Conzendorf C, Klose J, Schulze M, Harre K, Tobiasch E (2014) *Stem Cells on Biomaterials for Synthetic Grafts to Promote Vascular Healing*. J Clin Med. 2014 Jan 15; 3(1):39-87.
6. Banerjee M, Bouillon B, Shafizadeh S, Paffrath T, Lefering R, Wafaisade A; German Trauma Registry Group (2013) *Epidemiology of extremity injuries in multiple trauma patients*. Injury. 2013 Aug; 44(8):1015-21.
7. Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS (2000) *Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells*. J Cell Biol. 2000 Dec 11; 151(6):1221-34.
8. Belizário JE, Fontes-Oliveira CC, Borges JP, Kashiabara JA, Vannier E (2016) *Skeletal muscle wasting and renewal: a pivotal role of myokine IL-6*. Springerplus. 2016 May 13; 5:619.
9. Benninghoff A, Drenckhahn D (2003) *Anatomie Band 1*. In: Drenckhahn D (Hrsg.) Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. 16. Auflage, 2003, München: Urban & Fischer.
10. Benninghoff A, Drenckhahn D (2004) *Anatomie Band 2*. In: Drenckhahn D (Hrsg.) Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. 16. Auflage, 2004, München: Urban & Fischer.
11. Bhandari M, Guyatt GH, Swiontkowski MF, Schemitsch EH (2001) *Treatment of open fractures of the shaft of the tibia*. J Bone Joint Surg Br.

2001 Jan; 83(1):62-8.

12. Birbrair A, Zhang T, Wang ZM, Messi ML, Mintz A, Delbono O (2015) *Pericytes at the intersection between tissue regeneration and pathology*. Clin Sci (Lond). 2015 Jan; 128(2):81-93.
13. Blaisdell FW (2002) *The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review*. Cardiovasc Surg. 2002 Dec; 10(6):620-30.
14. Blick SS, Brumback RJ, Poka A, Burgess AR, Ebraheim NA (1986) *Compartment syndrome in open tibial fractures*. J Bone Joint Surg Am. 1986 Dec; 68(9):1348-53.
15. Bork P (1993) *The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor*. FEBS Lett. 1993 Jul 26; 327(2):125-30.
16. Borkham-Kamphorst E, Schaffrath C, Van de Leur E, Haas U, Tihaa L, Meurer SK, Nevzorova YA, Liedtke C, Weiskirchen R (2014) *The anti-fibrotic effects of CCN1/CYR61 in primary portal myofibroblasts are mediated through induction of reactive oxygen species resulting in cellular senescence, apoptosis and attenuated TGF- β signaling*. Biochim Biophys Acta. 2014 May; 1843(5):902-14.
17. Bornstein P, Sage EH (2002) *Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function*. Curr Opin Cell Biol. 2002 Oct; 14(5):608-16.
18. Borselli C, Storrie H, Benesch-Lee F, Shvartsman D, Cezar C, Lichtman JW, Vandenburg HH, Mooney DJ (2010) *Functional muscle regeneration with combined delivery of angiogenesis and myogenesis factors*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Feb 23; 107(8):3287-92.
19. Brigstock DR (2003) *The CCN family: a new stimulus package*. J Endocrinol. 2003 Aug; 178(2):169-75.
20. Brigstock DR, Goldschmeding R, Katsube KI, Lam SC, Lau LF, Lyons K, Naus C, Perbal B, Riser B, Takigawa M, Yeger H (2003) *Proposal for a unified CCN nomenclature*. Mol Pathol. 2003 Apr; 56(2):127-8.
21. Brookes ZL, Brown NJ, Reilly CS (2000) *Intravenous anaesthesia and the rat microcirculation: the dorsal microcirculatory chamber*. Br J Anaesth. 2000 Dec; 85(6):901-3.
22. Burck HC (1988) *Histologische Technik*. Stuttgart: Thieme.
23. Burton AC (1965) *The vascular bed*. In: Physiology and biophysics of the circulation. 1965, Chicago, IL: Year Book Medical.

24. Büttner R, Thomas C (2003) *Allgemeine Pathologie*. Thomas C (Hrsg.). 3. Auflage 2003, S. 12. Stuttgart: Schattauer.
25. Byrd HS, Cierny G 3rd, Tebbetts JB (1981) *The management of open tibial fractures with associated soft tissue loss: external pin fixation with early flap coverage*. *Plast Reconstr Surg*. 1981 Jul; 68(1):73-82.
26. Carlson BM, Gutmann E (1975) *Regeneration in free grafts of normal and denervated muscles in the rat: morphology and histochemistry*. *Anat Rec*. 1975 Sep; 183(1):47-62.
27. Carmeliet P, Jain RK (2011) *Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis*. *Nature*. 2011 May 19; 473(7347):298-307.
28. Ceccarelli G, Presta R, Benedetti L, Cusella De Angelis MG, Lupi SM, Rodriguez Y Baena R (2017) *Emerging perspectives in scaffold for tissue engineering in oral surgery*. *Stem Cells Int*. 2017; 2017:4585401.
29. Chargé SB, Rudnicki MA (2004) *Cellular and molecular regulation of muscle regeneration*. *Physiol Rev*. 2004 Jan; 84(1):209-38.
30. Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, Authier FJ, Dreyfus PA, Gherardi RK (2003) *Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth*. *J Cell Biol*. 2003 Dec 8; 163(5):1133-43.
31. Chen CC, Lau LF (2009) *Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins*. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Apr; 41(4):771-83.
32. Chen CC, Mo FE, Lau LF (2001) *The Angiogenic Factor Cyr61 Activates a Genetic Program for Wound Healing in Human Skin Fibroblasts*. *J Biol Chem*. 2001 Dec 14; 276(50):47329-37.
33. Cole JD, Ansel LJ, Schwartzberg R (1995) *A sequential protocol for management of severe open tibial fractures*. *Clin Orthop Relat Res*. 1995 Jun; (315):84-103.
34. Court-Brown CM, McBirnie J (1995) *The epidemiology of tibial fractures*. *J Bone Joint Surg Br*. 1995 May; 77(3):417-21.
35. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Jacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B (2008) *A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs*. *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):301-13.
36. Dako Denmark A/S. *Infoblatt des Herstellers (103467-003). M0851/EFG/KRM/2008.09.30*.

37. De Bastiani G, Aldegheri R, Renzi Brivio L (1986) *Dynamic axial fixation: A rational alternative for the external fixation of fractures*. Int Orthop. 1986 Jun; 10(2):95-99.
38. Deleanu B, Prejbeanu R, Poenaru D, Vermesan D, Haragus H (2014) *Reamed versus unreamed intramedullary locked nailing in tibial fractures*. Eur J Orthop Surg Traumatol. 2014 Dec; 24(8):1597-601.
39. Dellavalle A, Maroli G, Covarello D, Azzoni E, Innocenzi A, Perani L, Antonini S, Sambasivan R, Brunelli S, Tajbakhsh S, Cossu G (2011) *Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells*. Nat Commun. 2011 Oct 11; 2:499.
40. Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, Perani L, Innocenzi A, Galvez BG, Messina G, Morosetti R, Li S, Belicchi M, Peretti G, Chamberlain JS, Wright WE, Torrente Y, Ferrari S, Bianco P, Cossu G (2007) *Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells*. Nat Cell Biol. 2007 Mar; 9(3):255-67.
41. Dreyfus PA, Chretien F, Chazaud B, Kirova Y, Caramelle P, Garcia L, Butler-Browne G, Gherardi RK (2004) *Adult bone marrow-derived stem cells in muscle connective tissue and satellite cell niches*. Am J Pathol. 2004 Mar; 164(3):773-9.
42. Du J, Klein JD, Hassounah F, Zhang J, Zhang C, Wang XH (2014) *Aging increases CCN1 expression leading to muscle senescence*. Am J Physiol Cell Physiol. 2014 Jan 1; 306(1):C28-36.
43. Estrada R, Li N, Sarojini H, An J, Lee MJ, Wang E (2009) *Secretome from mesenchymal stem cells induces angiogenesis via CYR61*. J Cell Physiol. 2009 Jun; 219(3):563-71.
44. Fataccioli V, Abergel V, Wingertsman L, Neuville P, Spitz E, Adnot S, Calenda V, Teiger E (2002) *Stimulation of angiogenesis by CYR61 gene: a new therapeutic candidate*. Hum Gene Ther. 2002 Aug 10; 13(12):1461-70.
45. Frey SP (2005) *Der Einfluss des Weichteiltraumas auf die Muskulatur nach akuter Beinverkürzung und anschließender Verlängerung* (Medizinische Dissertationsschrift). Münster: Westfälische Wilhelms-Universität.
46. Frey SP, Jansen H, Raschke MJ, Meffert RH, Ochman S (2012) *VEGF Improves Skeletal Muscle Regeneration After Acute Trauma and Reconstruction of the Limb in a Rabbit Model*. Clin Orthop Relat Res. 2012 Dec; 470(12):3607-14.
47. Frey SP, Midik B, Eden L, Jansen H, Doht S, Blunk T, Schuetze N, Meffert RH (2013) *CYR61 improves muscle force recreation in a rabbit trauma model* (Abstract). J Tissue Sci Eng. 2013 Aug; 4:2; ISSN: 2157-7552.

48. Frey SP, Yorumazel B, Hölscher-Doht S, Eden L, Schütze N, Meffert RH, Jansen H (2019) *CYR61 improves muscle force recreation in a rabbit trauma model*. Technol Health Care. 2019 Mar 14. DOI: 10.3233/THC-191635. Epub ahead of print. PMID: 30909257.
49. Fulkerson EW, Egol KA (2009) *Timing issues in fracture management: a review of current concepts*. Bull NYU Hosp Jt Dis. 2009; 67(1):58-67.
50. Gandjbakhche AH, Bonner RF, Arai AE, Balaban RS (1999) *Visible-light photon migration through myocardium in vivo*. Am J Physiol. 1999 Aug; 277(2 Pt 2):H698-704.
51. Gerngroß H, Rosenheimer M, Becker H, Welter HF, Scherer MA (1992) *Kompartiment-Druckmessung auf piezoresistiver Basis*. Ungeheuer E. (Hrsg.) Fortschritte in der Chirurgie im letzten Jahrzehnt. Kongreßband, Vol 1992. Berlin: Springer.
52. Giannoudis PV, Papakostidis C, Roberts C (2006) *A review of the management of open fractures of the tibia and femur*. J Bone Joint Surg Br. 2006 Mar; 88(3):281-9.
53. Gonyea W, Ericson GC, Bonde-Petersen F (1977) *Skeletal muscle fiber splitting induced by weight-lifting exercise in cats*. Acta Physiol Scand. 1977 Jan; 99(1):105-9.
54. Gopal S, Majumder S, Batchelor AG, Knight SL, De Boer P, Smith RM (2000) *Fix and flap: the radical orthopaedic and plastic treatment of severe open fractures of the tibia*. J Bone Joint Surg Br. 2000 Sep; 82(7):959-66.
55. Gorschlüter M (2010) *Der Einfluss vom Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) auf die Muskelregeneration im Traumamodell mit Beinverkürzung und -distraction* (Medizinische Dissertationsschrift). Münster: Westfälische Wilhelms-Universität.
56. Grazioli S, Gil S, An D, Kajikawa O, Farnand AW, Hanson JF, Birkland T, Chen P, Duffield J, Schnapp LM, Altemeier WA, Matute-Bello G (2015) *CYR61 (CCN1) overexpression induces lung injury in mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2015 Apr 15; 308(8):L759-65.
57. Grote K, Salguero G, Ballmaier M, Dangers M, Drexler H, Schieffer B (2007) *The angiogenic factor CCN1 promotes adhesion and migration of circulating CD34⁺ progenitor cells: potential role in angiogenesis and endothelial regeneration*. Blood. 2007 Aug 1; 110(3):877-85.
58. Gustilo RB, Anderson JT (1976) *Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty five open fractures of long bones: retrospective and prospective analyses*. J Bone Joint Surg Am. 1976 Jun; 58(4):453-8.

59. Gustilo RB, Mendoza RM, Williams DN (1984) *Problems in the management of Type III (severe) open fractures: A new classification of Type III open fractures*. J Trauma. 1984 Aug; 24(8):742-6.
60. Hadjiargyrou M, Ahrens W, Rubin CT (2000) *Temporal expression of the chondrogenic and angiogenic growth factor CYR61 during fracture repair*. J Bone Miner Res. 2000 Jun; 15(6):1014-23.
61. Hankemeier S, Bastian L, Gosling T, Krettek C (2004) *Prinzipien der Kallusdistraction*. Unfallchirurg. 2004 Oct; 107: 945.
62. Herman IM, D'Amore PA (1985) *Microvascular pericytes contain muscle and nonmuscle actins*. J Cell Biol. 1985 Jul; 101(1):43-52.
63. Howard M, Court-Brown CM (1997) *Epidemiology and management of open fractures of the lower limb*. Br J Hosp Med. 1997 Jun; 4-17;57(11):582-7.
64. Ilizarov GA (1989) *The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation*. Clin Orthop Relat Res. 1989 Jan; (238):249-81.
65. Järvinen M (1976) *Healing of a crush injury in rat striated muscle. 4. Effect of early mobilization and immobilization on the tensile properties of gastrocnemius muscle*. Acta Chir Scand. 1976; 142(1):47-56.
66. Järvinen TA, Järvinen M, Kalimo H (2014) *Regeneration of injured skeletal muscle after the injury*. Muscles Ligaments Tendons J. 2014 Feb 24; 3(4):337-45.
67. Järvinen TA, Järvinen TL, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M (2005) *Muscle Injuries, Biology and Treatment*. Am J Sports Med. 2005 May; 33(5):745-64.
68. Jay P, Bergé-Lefranc JL, Marsollier C, Méjean C, Taviaux S, Berta P (1997) *The human growth factor-inducible immediate early gene, CYR61, maps to chromosome 1p*. Oncogene. 1997 Apr 10; 14(14):1753-7.
69. Jun JI, Lau LF (2010) *Cellular senescence controls fibrosis in wound healing*. Aging (Albany NY). 2010 Sep; 2(9):627-31.
70. Kasemkijwattana C, Menetrey J, Somogyi G, Moreland MS, Fu FH, Buranapanitkit B, Watkins SC, Huard J (1998) *Development of approaches to improve the healing following muscle contusion*. Cell Transplant. 1998 Nov-Dec; 7(6):585-98.
71. Kleinheinz J, Jung S, Wermker K, Fischer C, Joos U (2010) *Release kinetics of VEGF₁₆₅ from a collagen matrix and structural matrix changes in a circulation model*. Head Face Med. 2010 Jul 19; 6:17.

72. Küllmer K, Harland U, Sievers KW, Kock HJ, Schmit-Neuerburg KP (1995) *MRT-Ergebnisse bei experimentellen Muskelverletzungen*. Unfallchirurgie. 1995 March; 21: 59-63.
73. Lai CF, Lin SL, Chiang WC, Chen YM, Wu VC, Young GH, Ko WJ, Kuo ML, Tsai TJ, Wu KD (2014) *Blockade of cysteine-rich protein 61 attenuates renal inflammation and fibrosis after ischemic kidney injury*. Am J Physiol Renal Physiol. 2014 Sep 1; 307(5):F581-92.
74. Lang G (2006) *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2006, S. 80. Wien: Springer.
75. Lau LF (2011) *CCN1/CYR61: The very model of a modern matricellular protein*. Cell Mol Life Sci. 2011 Oct; 68(19):3149-63.
76. Lau LF, Nathans D (1985) *Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells*. EMBO J. 1985 Dec 1; 4(12):3145-51.
77. LEA Medizintechnik GmbH, Giessen-Germany. *FAQs* (zitiert im April 2015), <http://www.lea.de/deu/indexd.html>, FAQ.
78. LEA Medizintechnik GmbH, Giessen-Germany. *O2C: Eine kurze Übersicht der Anwendungsgebiete, Handhabung und Interpretation der Messwerte* (zitiert im April 2015) GermanyDatei: 050614_HowToProceed_deu.doc.
79. Lechner A, Schütze N, Siggelkow H, Seufert J, Jakob F (2000) *The immediate early gene product hCYR61 localizes to the secretory pathway in human osteoblasts*. Bone. 2000 Jul; 27(1):53-60.
80. Lee SH, Shin H (2007) *Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering*. Adv Drug Deliv Rev. 2007 May 30; 59(4-5):339-59.
81. Li CX, Zhao HJ, Zhao WQ, Xu YQ (2013) *System evaluation on reamed and non-reamed intramedullary nailing in the treatment of closed tibial fracture*. Acta Cir Bras. 2013 Oct; 28(10):744-50.
82. Li J, Ye L, Owen S, Weeks HP, Zhang Z, Jiang WG (2015) *Emerging role of CCN family proteins in tumorigenesis and cancer metastasis (Review)*. Int J Mol Med. 2015 Dec; 36(6):1451-63.
83. Li Y, Foster W, Deasy BM, Chan Y, Prisk V, Tang Y, Cummins J, Huard J (2004) *Transforming growth factor- β 1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis*. Am J Pathol. 2004 Mar; 164(3):1007-19.
84. Lienau J, Schell H, Epari DR, Schütze N, Jakob F, Duda GN, Bail HJ (2006)

- CYR61 (CCN1) protein expression during fracture healing in an ovine tibial model and its relation to the mechanical fixation stability.* J Orthop Res. 2006 Feb; 24(2):254-62.
85. Löbel M, Bauer S, Meisel C, Eisenreich A, Kudernatsch R, Tank J, Rauch U, Köhl U, Schultheiss HP, Volk HD, Poller W, Scheibenbogen C (2012) *CCN1: a novel inflammation-regulated biphasic immune cell migration modulator.* Cell Mol Life Sci. 2012 Sep; 69(18):3101-13.
 86. Longnecker DE, Harris PD (1980) *Microcirculatory actions of general anesthetics.* Fed Proc. 1980 Apr; 39(5):1580-3.
 87. Longnecker DE, Miller FN, Harris PD (1974) *Small artery and vein response to ketamine HCl in the bat wing.* Anesth Analg. 1974 Jan-Feb; 53(1):64-8.
 88. Luebke AS, Harris PD, Garrison RN (1998) *E. Coli bacteremia-induced changes in the skeletal muscle microcirculation vary with anesthetics.* Croat Med J. 1998 Dec; 39(4):392-400.
 89. Lüllmann-Rauch R (2003) *Histologie.* 1. Auflage, 2003. Stuttgart: Thieme.
 90. Märdian S, Schwabe P, Schaser KD (2015) *Tibiaschaftfrakturen.* Z Orthop Unfall 2015; 153(1): 99-119.
 91. Martino MM, Brkic S, Bovo E, Burger M, Schaefer DJ, Wolff T, Gürke L, Briquez PS, Larsson HM, Gianni-Barrera R, Hubbell JA, Banfi A (2015) *Extracellular matrix and growth factor engineering for controlled angiogenesis in regenerative medicine.* Front Bioeng Biotechnol. 2015 Apr 1; 3:45.
 92. Matsen FA (1975) *Compartmental syndrome – An unified concept.* Clin Orthop Relat Res. 1975 Nov-Dec; (113):8-14.
 93. Mauro A (1961) *Satellite cell of skeletal muscle fibers.* J Biophys Biochem Cytol. 1961 Feb; 9:493-5.
 94. McQueen MM, Christie J, Court-Brown CM (1990) *Compartment pressures after intramedullary nailing of the tibia.* J Bone Joint Surg Br. 1990 May; 72(3):395-7.
 95. McQueen MM, Duckworth AD, Aitken SA, Court-Brown CM (2013) *The estimated sensitivity and specificity of compartment pressure monitoring for acute compartment syndrome.* J Bone Joint Surg Am. 2013 Apr 17;95(8):673-7.
 96. Meffert RH, Frey SP, Jansen H, Ochman S, Raschke MJ, Langer M (2008) *Muscle strength quantification in small animals: a new transcutaneous technique in rabbits.* J Orthop Res. 2008 Nov; 26(11):1526-32.

97. Meffert RH, Inoue N, Tis JE, Brug E, Chao EY (2000a) *Distraction osteogenesis after acute limb-shortening for segmental tibial defects. Comparison of a monofocal and a bifocal technique in rabbits.* J Bone Joint Surg Am. 2000 Jun; 82(6):799-808.
98. Meffert RH, Jansen H, Frey SP, Raschke MJ, Langer M (2007) *The influence of soft tissue trauma on bone regeneration after acute limb shortening.* Clin Orthop Relat Res. 2007 Jul; 460:202-9.
99. Meffert RH, Tis JE, Inoue N, McCarthy EF, Brug E, Chao EY (2000b) *Primary resective shortening followed by distraction osteogenesis for limb reconstruction: a comparison with simple lengthening.* J Orthop Res. 2000 Jul; 18(4):629-36.
100. Meffert RH, Tis JE, Lounici S, Rogers JS, Inoue N, Chao EY (1999) *Comparison of two systems for tibial external fixation in rabbits.* Lab Anim Sci. 1999 Dec; 49(6):650-4.
101. Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Vogt M, Fu FH, Moreland MS, Huard J (2000) *Growth factors improve muscle healing in vivo.* J Bone Joint Surg Br. 2000 Jan; 82(1):131-7.
102. Mo FE, Muntean AG, Chen CC, Stolz DB, Watkins SC, Lau LF (2002) *CYR61 (CCN1) is essential for placental development and vascular integrity.* Mol Cell Biol. 2002 Dec; 22(24):8709-20.
103. Möllenhoff G (1997) *Wirkung unterschiedlicher Verkürzung eines traumatisierten Extremitätenabschnitts auf die Weichteil-Knochen-Durchblutung am Beispiel des Unterschenkelschaftes* (Medizinische Habilitationsschrift). Bochum: Ruhr-Universität.
104. Muhr G, Möllenhoff G (1998) *Temporäre Verkürzung komplizierter Frakturen zur Behandlung des Kompartmentsyndroms.* Hefte zu Der Unfallchirurg. 1998; 267:174–176
105. Müller M, Disch AC, Zabel N, Haas NP, Schaser KD (2008) *Initial intramuscular perfusion pressure predicts early skeletal muscle function following isolated tibial fractures.* J Orthop Surg Res. 2008 Apr 17;3:14.
106. Müller ME, Koch P, Nazarian S, Schatzker J (1990) *The comprehensive classification of fractures of long bones* (E-Book). Berlin: Springer. Online-ISBN 978-3-642-61261-9.
107. Ochman S, Frey S, Raschke MJ, Deventer JN, Meffert RH (2011) *Local application of VEGF compensates callus deficiency after acute soft tissue trauma - results using a limb-shortening distraction procedure in rabbit tibia.* J Orthop Res. 2011 Jul; 29(7):1093-8.

108. O'Connor RS, Mills ST, Jones KA, Ho SN, Pavlath GK (2007) *A combinatorial role for NFAT5 in both myoblast migration and differentiation during skeletal muscle myogenesis*. J Cell Sci. 2007 Jan 1; 120(Pt 1):149-59.
109. Patzakis MJ, Wilkins J (1989) *Factors influencing infection rate in open fracture wounds*. Clin Orthop Relat Res. 1989 Jun; (243):36-40.
110. Philippou A, Maridaki M, Koutsilieris M (2008) *The role of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and transforming growth factor beta 1 (TGFbeta1) in muscle regeneration*. In Vivo. 2008 Nov-Dec; 22(6):735-50.
111. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P (2011) *Basic and therapeutic aspects of angiogenesis*. Cell. 2011 Sep 16; 146(6):873-87.
112. Price CT, Mann JW (1991) *Experience with the Orthofix device for limb lengthening*. Orthop Clin North Am. 1991 Oct; 22(4):651-61.
113. Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R, Mytinger J, Cao B, Gates C, Wernig A, Huard J (2002) *Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration*. J Cell Biol. 2002 May 27; 157(5):851-64.
114. Raissadati A, Nykänen AI, Tuuminen R, Syrjälä SO, Krebs R, Arnaudova R, Rouvinen E, Wang X, Poller W, Lemström KB (2015) *Systemic overexpression of matricellular protein CCN1 exacerbates obliterative bronchiolitis in mouse tracheal allografts*. Transpl Int. 2015 Dec; 28(12):1416-25.
115. Rayssac A, Neveu C, Pucelle M, Van den Berghe L, Prado-Lourenco L, Arnal JF, Chaufour X, Prats AC (2009) *IRES-based vector coexpressing FGF2 and CYR61 provides synergistic and safe therapeutics of lower limb ischemia*. Mol Ther. 2009 Dec; 17(12):2010-9.
116. Richards RR, Schemitsch EH (1989) *Effect of muscle flap coverage on the repair of devascularized tibia: an experimental investigation in dog*. J Orthop Res. 1989; 7(4):550-8.
117. Rossi CA, Pozzobon M, De Coppi P (2010) *Advances in musculoskeletal tissue engineering: moving towards therapy*. Organogenesis. 2010 Jul-Sep; 6(3):167-72.
118. Rother M, Krohn S, Kania G, Vanhoutte D, Eisenreich A, Wang X, Westermann D, Savvatis K, Dannemann N, Skurk C, Hilfiker-Kleiner D, Cathomen T, Fehner H, Rauch U, Schultheiss HP, Heymans S, Eriksson U, Scheibenbogen C, Poller W (2010) *Matricellular signaling molecule CCN1 attenuates experimental autoimmune Myocarditis by acting as a novel immune cell migration modulator*. Circulation. 2010 Dec 21; 122(25):2688-98.

119. Rotter R, Kraemer R, Stratos I, Vogt P, Vollmar B, Mittlmeier T, Knobloch K (2012) *Compartmental and muscular response to closed soft tissue injury in rats investigated by oxygen-to-see and intravital fluorescence microscopy*. J Trauma Acute Care Surg. 2012 Jul; 73(1):73-9.
120. Sarmiento A, Gersten LM, Sobol PA, Shankwiler JA, Vangsness CT (1989) *Tibial shaft fractures treated with functional braces. Experience with 780 fractures*. J Bone Joint Surg Br. 1989 Aug; 71(4):602-9.
121. Sato K, Li Y, Foster W, Fukushima K, Badlani N, Adachi N, Usas A, Fu FH, Huard J (2003) *Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis*. Muscle Nerve. 2003 Sep; 28(3):365-72.
122. Schaser KD, Vollmar B, Menger MD, Schewior L, Kroppenstedt SN, Raschke M, Lübke AS, Haas NP, Mittlmeier T (1999) *In vivo analysis of microcirculation following closed soft-tissue injury*. J Orthop Res. 1999 Sep; 17(5):678-85.
123. Schaser KD, Zhang L, Haas NP, Mittlmeier T, Duda G, Bail HJ (2003) *Temporal profile of microvascular disturbances in rat tibial periosteum following closed soft tissue trauma*. Langenbecks Arch Surg. 2003 Oct; 388(5):323-30.
124. Schütze N, Kunzi-Rapp K, Wagemanns R, Nöth U, Jatzke S, Jakob F (2005) *Expression, purification and functional testing of recombinant CYR61/CCN1*. Protein Expr Purif. 2005 Jul; 42(1):219-25.
125. Schütze N, Lechner A, Groll C, Siggelkow H, Hüfner M, Köhrle J, Jakob F (1998) *The human analog of murine cystein rich protein 61 [correction of 16] is a 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 responsive immediate early gene in human fetal osteoblasts: regulation by cytokines, growth factors, and serum*. Endocrinology. 1998 Apr; 139(4):1761-70.
126. Sektion NIS der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU) / AUC - Akademie der Unfallchirurgie GmbH (2014) *TraumaRegister DGU®, Jahresbericht 2014* (zitiert am 14.05.2017). http://www.dgu-online.de/fileadmin/published_content/5.Qualitaet_und_Sicherheit/PDF/2014_TR_DGU_Jahresbericht.pdf.
127. Sellei RM, Hildebrand F, Pape HC (2014) *Das akute Kompartmentsyndrom der Extremitäten: Diagnostik und Behandlungsmanagement*. Unfallchirurg 2014 July; 117: 633.
128. Shadgan B, Menon M, Sanders D, Berry G, Martin C Jr, Duffy P, Stephen D, O'Brien PJ (2010) *Current thinking about acute compartment syndrome of the lower extremity*. Can J Surg. 2010 Oct; 53(5):329-34.

129. Shefer G, Wleklinski-Lee M, Yablonka-Reuveni Z (2004) *Skeletal muscle satellite cells can spontaneously enter an alternative mesenchymal pathway*. J Cell Sci. 2004 Oct 15;117(Pt 22):5393-404.
130. Shibuya M (2013) *Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases*. J Biochem. 2013 Jan; 153(1):13-9.
131. Sicari BM, Dearth CL, Badylak SF (2014) *Tissue engineering and regenerative medicine approaches to enhance the functional response to skeletal muscle injury*. Anat Rec (Hoboken). 2014 Jan; 297(1):51-64.
132. Sievers KW, Högerle S, Olivier LC, Küllmer K, Kisters U (1995) *Magnetresonanztomographische Beurteilung des Unterschenkels bei Zustand nach Kompartmentsyndrom*. Unfallchirurgie 1995 March; 21: 64.
133. Stannard JP, Schmidt AH, Kregor PJ, Wentzensen A, Gebhard F, Grützner PA, Ruchholtz S, Stöckle U (2011) *Spezielle Unfallchirurgie*. Stuttgart: Thieme. 1. Aufl. 2011; S. 801.
134. Street J, Winter D, Wang JH, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP (2000) *Is human fracture hematoma inherently angiogenic?* Clin Orthop Relat Res. 2000 Sep; (378):224-37.
135. Stürmer KM (1999) *Leitlinien Unfallchirurgie*. Stürmer KM (Hrsg.) 2. Auflage, 1999, S. 184-196. Stuttgart: Thieme.
136. Südkamp NP (2000) *Soft-tissue injury: pathophysiology and its influence on fracture management-evaluation/classification of closed and open injuries*. AO principles of fracture management. Stuttgart: Thieme. 2000: 72–75.
137. Tamaki T, Akatsuka A, Ando K, Nakamura Y, Matsuzawa H, Hotta T, Roy RR, Edgerton VR (2002) *Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle*. J Cell Biol. 2002 May 13; 157(4):571-7.
138. Todorovic V, Chen CC, Hay N, Lau LF (2005) *The matrix protein CCN1 (CYR61) induces apoptosis in fibroblasts*. J Cell Biol. 2005 Nov 7; 171(3):559-68.
139. Tscherne H, Oestern H-J (1982) *Die Klassifizierung des Weichteilschadens bei offenen und geschlossenen Frakturen*. Unfallheilkunde 85, 111-115.
140. Utvåg SE, Grundnes O, Reikerås O (1998) *Effects of lesion between bone, periosteum and muscle on fracture healing in rats*. Acta Orthop Scand. 1998 Apr; 69(2):177-80.
141. Utvåg SE, Iversen KB, Grundnes O, Reikerås O (2002) *Poor muscle coverage*

- delays fracture healing in rats. Acta Orthop Scand. 2002 Aug; 73(4):471-4.*
142. Vaillancourt C, Shrier I, Vandal A, Falk M, Rossignol M, Vernec A, Somogyi D (2004) *Acute compartment syndrome: how long before muscle necrosis occurs?* CJEM. 2004 May; 6(3):147-54.
 143. Vo TN, Kasper FK, Mikos AG (2012) *Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration.* Adv Drug Deliv Rev. 2012 Sep; 64(12):1292-309.
 144. Whiteside LA, Lesker PA (1978a) *The effects of extraperiosteal and subperiosteal dissection. I. On blood flow in muscle.* J Bone Joint Surg Am. 1978 Jan; 60(1):23-6.
 145. Whiteside LA, Lesker PA (1978b) *The effects of extraperiosteal and subperiosteal dissection. II. On fracture healing.* J Bone Joint Surg Am. 1978 Jan; 60(1):26-30.
 146. Willoughby CL, Ralles S, Christiansen SP, McLoon LK (2012) *Effects of sequential injections of hepatocyte growth factor and insulin-like growth factor-I on adult rabbit extraocular muscle.* J AAPOS. 2012 Aug; 16(4):354-60.
 147. Willy C, Gerngross H, Sterk J (1999) *Measurement of intracompartmental pressure with use of a new electronic transducer-tipped catheter system.* J Bone Joint Surg Am 1999; 81-A:158-68.
 148. Winkler T, von Roth P, Matziolis G, Schumann MR, Hahn S, Strube P, Stoltenburg-Didinger G, Perka C, Duda GN, Tohtz SV (2011) *Time course of skeletal muscle regeneration after severe trauma.* Acta Orthop. 2011 Feb; 82(1):102-11.
 149. Wolfensohn S, Lloyd M (2003) *Handbook of Laboratory Animal - Management and Welfare*, 3. Auflage, 2003, Blackwell Publishing.
 150. You JJ, Yang CH, Chen MS, Yang CM (2009) *Cysteine-rich 61, a member of the CCN family, as a factor involved in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009 Jul; 50(7):3447-55.
 151. Yu Y, Gao Y, Wang H, Huang L, Qin J, Guo R, Song M, Yu S, Chen J, Cui B, Gao P (2008) *The matrix protein CCN1 (CYR61) promotes proliferation, migration and tube formation of endothelial progenitor cells.* Exp Cell Res. 2008 Oct 15; 314(17):3198-208.
 152. Yuen WW, Du NR, Chan CH, Silva EA, Mooney DJ (2010) *Mimicking nature by codelivery of stimulant and inhibitor to create temporally stable and spatially restricted angiogenic zones.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Oct 19; 107(42):17933-8.

153. Zhang L, Bail H, Mittlmeier T, Haas NP, Schaser KD (2003) *Immediate microcirculatory derangements in skeletal muscle and periosteum after closed tibial fracture*. J Trauma. 2003 May; 54(5):979-85.
154. Zhou D, Herrick DJ, Rosenbloom J, Chaour B (2005) *Cyr61 mediates the expression of VEGF, α_v -integrin, and α -actin genes through cytoskeletally based mechanotransduction mechanisms in bladder smooth muscle cells*. J Appl Physiol (1985). 2005 Jun; 98(6):2344-54.

7. Abkürzungen

ANG	Angiopoietin
AO	Arbeitsgemeinschaft Osteosynthese
Aqua dest.	Aqua destillata
ASAMI	Association for the Study & Application of the Method of Ilizarov
AUC	Akademie der Unfallchirurgie GmbH
BMP	bone morphogenic protein
BSA	bovine serum albumin
CTGF	connective tissue growth factor
CYR61	cysteine-rich protein 61
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DGU	Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie
ECL	enhanced chemiluminescence
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EZM	extrazelluläre Matrix
Fc	Fragment, easily crystallizable
FGF	fibroblast growth factor
GH	growth hormone
H.E.	Hämalaun-Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hCYR61	humanes CYR61
hFOB	humane fetale Osteoblasten
HGF	hepatocyte growth factor
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HSI	hue, saturation, intensity
Ig	Immunglobulin
IGF	insulin-like growth factor
IGFBP	insulin-like growth factor-bindendes Protein
IL	Interleukin
ISS	Injury Severity Score
IZKF	<i>Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung</i>

kDa	Kilo-Dalton
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
kPa	Kilopascal
M.	Musculus
mA	Milliampere
MIA	multiple image alignment
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
N	Newton
NaCl	Kochsalz
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NGF	nerve growth factor
NIS	Notfall-, Intensivmedizin und Schwerverletztenversorgung
NK	Negativkontrolle
NO	Stickstoffmonoxid
NOV	nephroblastoma overexpressed gene
O2C [®]	„oxygen to see“
OP	Operation
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	platelet-derived growth factor
rCYR61-Fc	rekombinantes Fusionsprotein CYR61 mit Fc-tag
RGB	rot, grün, blau
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	region of interest
RT	Raumtemperatur
SA- β -gal	Senescence-associated β -galactosidase
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SF-21	Spodoptera frugiperda-21
SMA	smooth muscle actin
TGF	transforming growth factor

TIFF	Tagged Image File Format
TNF	tumor necrosis factor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V.A.C. [®]	Vacuum Assisted Closure-Therapy
VEGF	vascular endothelial growth factor
WISP	Wnt1-inducible signaling pathway protein
Wnt	Wingless-related integration site
ZEMM	Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	offene Unterschenkelfraktur mit hochgradigem Weichteildefekt.....	2
Abb. 2:	Modell der CYR61-Wirkung.....	22
Abb. 3:	Kontusionstrauma.....	28
Abb. 4:	Resektion der Tibia um 10% der Ausgangslänge (1), Verkürzung (2), Distraction 0,5 mm/12 h (3).....	32
Abb. 5:	Messstuhl mit Transducer (Druckaufnehmer) und TENs (transkutane elektrische Nervenstimulation).....	33
Abb. 6:	Powerlab-Messeinheit.....	34
Abb. 7:	Paraffinschnitt, H.E.-Färbung, 100-fache Vergrößerung (Tier F, operiertes Bein distal zentral).....	40
Abb. 8:	Paraffinschnitt, H.E.-Färbung, 200-fache Vergrößerung (Tier F, operiertes Bein distal zentral).....	41
Abb. 9:	Paraffinschnitt, Azan nach Heidenhain, 100-fache Vergrößerung (Tier F, operiertes Bein proximal).....	42
Abb. 10:	Phasenanalyse des MIA in der Azan-Färbung eines M. tibialis anterior, Übersicht in 40-facher Vergrößerung (Tier D).....	45
Abb. 11:	MRT des operierten Beines mit Kallusregenerat (gelber Pfeil), der rote Pfeil markiert den Bereich des Kontusionstraumas des Musculus tibialis anterior, Sagittalschnitt, Tier L.....	59
Abb. 12:	MRT des operierten Beines mit Kallusregenerat (gelber Pfeil), der rote Pfeil markiert den Bereich des Kontusionstraumas des Musculus tibialis anterior, Koronarschnitte, Tier F.....	60
Abb. 13:	Darstellung der Bindegewebssepten, Azan n. Heidenhain, 100- fache Vergrößerung (Tier F).....	64
Abb. 14:	entzündliches Infiltrat, H.E.-Färbung, 400-fache Vergrößerung (Tier G, operiertes Bein proximal).....	66
Abb. 15:	Kaliberschwankungen, H.E.-Färbung, 40-fache Vergrößerung (Tier F, operiertes Bein, distal peripher).....	67
Abb. 16:	anti-SMA am Kontrollbein (A und B); anti-SMA am operierten Bein (C und D); Bild A und C in 40-facher Vergrößerung;	

	Bild B und D in 100-facher Vergrößerung (Tier I).....	68
Abb. 17:	Histologischer Vergleich der beiden traumatisierten Gruppen (Tier a und Tier F) mit einem gesunden Kontrollbein (Tier K), Azan n. Heidenhain, Vergrößerungen 40-fach und 200-fach.....	73
Abb. 18:	Western Blot 1 zur Freisetzungskinetik des CYR61 (Molekulargewicht des CYR61: 73 kDa).....	75
Abb. 19:	Western Blot 2 zur Freisetzungskinetik des CYR61 (Molekulargewicht des CYR61: 73 kDa).....	76

9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Klassifikation des Weichteilschadens nach Tscherne und Oestern.....	4
Tab. 2:	Klassifikation offener Frakturen nach Gustilo et Anderson.....	5
Tab. 3:	Färbeprotokoll Azan nach Heidenhain für proximale Paraffinschnitte...	42
Tab. 4:	Übersicht der verwendeten Antikörper.....	48
Tab. 5:	Immunhistochemisches Färbeprotokoll für anti-SMA.....	49
Tab. 6:	Muskelkraftregeneration und Bindegewebsanteil in % je Tier.....	62
Tab. 7:	Mittelwerte der Muskelkraftmessung (in Newton) aller Tiere aus der Kontroll- und CYR61-Gruppe mit Standardabweichung (SD) im zeitlichen Verlauf.....	69
Tab. 8:	Muskelkraftregeneration und Bindegewebsanteile im Vergleich zur Kontrollgruppe	71

10. Diagrammverzeichnis

Diagr. 1:	Muskelkraftregeneration des CYR61-behandelten Beines als Mittelwerte aller Tiere mit Standardabweichung im zeitlichen Verlauf.....	61
Diagr. 2:	Korrelation von Muskelkraft und Bindegewebsanteil in %.....	63
Diagr. 3:	Vergleich der peripheren Septenbreite mit der zentralen	

	Septenbreite im Kontroll- und operierten Bein in den proximalen Präparaten.....	65
Diagr. 4:	Ergebnisse der Kraftmessung (CYR61-Versuchsgruppe mit Trauma) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe mit und ohne Trauma (nach Frey et al., ASAMI 2005; Meffert et al. 2007).....	70

11. Materialienliste

Medikamente	Firma
Acetylpromazin	Hoechst, D-Frankfurt
Buprenorphin	Hoechst, D-Frankfurt
Isofluran	Hoechst, D-Frankfurt
Ketaminhydrochlorid	Hoechst, D-Frankfurt
N2O	Hoechst, D-Frankfurt
rCYR61	Prof. Dr. rer. nat. N. Schütze, Orthopädisches Zentrum für muskuloskelettale Forschung in der Orthopädischen Klinik König-Ludwig- Haus Würzburg
Sauerstoff	Hoechst, D-Frankfurt
T 61™, Tötungsmittel	Grünthal, D-Aachen
Xylazinhydrochlorid	Hoechst, D-Frankfurt

Operationsinstrumente und – materialien	Firma
BD Venflon™ Pro, 20 GA und 22 GA	Becton, Dickinson and Company, USA - New Jersey
Cutasept®, Sprühdeseinfektion	Bode Chemie, D-Hamburg
Desinfektionsmittel	1l Alkohol gefärbt im OP
Kollagenmatrix PARASORB® HD, 7x3 cm	RESORBA Wundversorgung GmbH + Co. KG, D-Nürnberg
Kontusionsklemme	Biomechanik Universitätsklinik Münster
Leukoplast®	BSN medical GmbH & Co KG
ORTHOFIX® M-103, Fixateur externe/Distraktor	Orthofix SRL, Italien-Verona
Oszillierende Säge	Howmedica/Stryker GmbH & Co. KG,

	D-Duisburg
Vasofix™ Braunüle 20 G und 22 G	B. Braun Melsungen AG, D-Melsungen

Chemikalien & Reagenzien	Firma
70%-iger Alkohol	Apotheke des Univers.-Klinikums Würzburg
Absoluter Alkohol	Apotheke des Univers.-Klinikums Würzburg
Aqua destillata	Apotheke des Univers.-Klinikums Würzburg
Dako Antibody Diluent, S0809	Dako Deutschland GmbH, D-Hamburg
Entellan®, Schnelleindeckmittel	Merck KgaA, D-Darmstadt
Eosin 1%ig	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- Sinsheim
Formalin-Lösung 4%ig	Otto Fischer GmbH & Co. KG, D- Saarbrücken
Gibco® DPBS, #14190-094	Invitrogen Corporation, USA-Grand Island, NY
H2O2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- Sinsheim
Hämalaun nach Mayer, #1.09249.2500	Merck KgaA, D-Darmstadt
HCl, Rotipuran >= 32%, p.a., ISO, #P074.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, D- Karlsruhe
NaCl, Sodium Chloride puriss. P.a., 1 kg, Reag. ACS, Reag. ISO, Reag. Ph. Eur., Natriumchlorid, #31434	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- Sinsheim
NaOH, min. 10% (1,11) z.A., M = 40 g/mol, 1 l = 1,11 kg, #50017351	Merck KgaA, D-Darmstadt
PBS-Tabletten, Dulbecco A, #BR0014G	Oxoid Limited, UK-Basingstoke, Hampshire

Rainbow-Marker RPN 800E	GE Healthcare, UK-Little Chalfont
Roti®-Histokitt, Einschlussmittel, #6638.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
Roti®-Histol, Lösungsmittel, #6640.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
TRIS, Pufferan >= 99,9%, p.a. 500g, #4855.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
Xylol	Merck KgaA, D-Darmstadt

Kommerzielle Testkits	Firma
Azan tricromica, sec. Heidenhain modificata	Bio-Optica, I-Mailand
DAB-Substratkit, Liquid DAB Substrate Pack, #HK130-5KE	Bio Genex Laboratories, USA-San Ramon, CA
ECL-Kit, ECL Plus Western Blot Detection System, RPN2132	GE Healthcare, <i>Amersham</i> Biosciences Europe GmbH, D-Freiburg

Antikörper & Seren	Firma
Anti-rabbit IgG/POD, A0545	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Sinsheim
Horse anti-mouse IgG, PI-2000	Vector Laboratories, USA-Burlingame, CA
Horse-Serum, sc-2483	Santa Cruz Biotechnology, D-Heidelberg
Kaninchen-Serum	Forschungslabor der Abteilung für Anästhesie des Univers.-Klinikums Würzburg
MCyr	Laborintern durch das wissenschaftliche Labor des König-Ludwig-Hauses Würzburg in Auftrag gegeben

Negative Control mouse IgG2a, X0943	Dako Deutschland GmbH, D-Hamburg
Smooth Muscle Actin, 1A4, M0851	Dako Deutschland GmbH, D-Hamburg

Verbrauchsmaterial	Firma
Deckgläser	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, D-Lauda Königshofen
Einbettkassetten Rotilabo™	Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
Filterpapier	A. Hartenstein GmbH, D-Würzburg
Kryo-Cups	Fa. Brand GmbH, D-Wertheim
Nitrocellulose-Membran, 0.45 µm, Optitan BA-S 85, Reinforced NC	Fa. Schleicher+Schuell <i>BioScience GmbH, Whatman Group</i> , D-Dassel
Objekträger HistoBond®	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, D-Lauda Königshofen
Präparatekasten	A. Hartenstein GmbH, D-Würzburg
Probenbehälter 2,5 ml	A. Hartenstein GmbH, D-Würzburg
Probenbehälter, nicht-konisch, PRO2, 2,5 ml	A. Hartenstein GmbH, D-Würzburg
Reinigungstücher, #9786	Ambion®, Life Technologies GmbH, D-Darmstadt
Rührspatel 120mm	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., D-Nümbrecht
Skalpelle	Feather Safety Razor CO., LTD., Japan-Osaka
Whatman-Paper GB 40	A. Hartenstein GmbH, D-Würzburg

Geräte	Firma
Bakteriensüttler	A. Hartenstein GmbH, D-Würzburg
Digitalkamera Olympus DP71	Olympus GmbH, D-Hamburg
Druckaufnehmer, MLT003 Hand	ADInstruments, WissTech GmbH, D-

Dynamometer	Spechbach
Einbettautomat mit Gießformen	Leica Instruments GmbH, D-Nußloch
Kompartimentdruck-Messeinheit Kodiag	Braun-Dexon GmbH, D-Spangenberg
Kompartiment-Drucksonde	MIPM GmbH, D-Hattendorf
Kryotom CM3050S	Leica GmbH, D-Wetzlar
Kühlplatte TESPA PEC 3001	DiaTec, D-Hallstadt
Meßstuhl & bipolare Elektrode	Konstruktion und Bau, S. Frey, Münster
Mikroskop Olympus BX51	Olympus GmbH, D-Hamburg
Mikrotom Leica, Mod. Histoslide 2000 R	Leica Instruments GmbH, D-Nußloch
Niedrigstromverstärker, GSR (Galvanic Skin Response) Amp	ADInstruments, WissTech GmbH, D-Spechbach
O2C Modell:	LEA Medizintechnik GmbH, D-Gießen
O2C-Sonde Modell	LEA Medizintechnik GmbH, D-Gießen
pH-Elektrode, Mettler Toledo Five-Easy	A. Hartenstein GmbH, D-Würzburg
Photometer	Eppendorf
PowerLab 2/20	ADInstruments, WissTech GmbH, D-Spechbach
Rüttelplatte, Hotplate Stirrer, Model L-81	A. Hartenstein GmbH, D-Würzburg
Stahlkugeln, Durchmesser 5 mm, #69989	QIAGEN GmbH, D-Hilden
Wärmeschrank, Memmert Elektronik	A. Hartenstein GmbH, D-Würzburg
Wasserbad, Typ 24900	MEDAX Nagel GmbH, D-Kiel
Zentrifuge, Heraeus Biofuge pico	J. Thieme Labortechnik GmbH

Software	Firma
Cell^F	Olympus GmbH, D-Hamburg
Excel 2007	Microsoft Corporation, USA-Redmond
Power Analysis	Anova Designs
R 2.13.1	R Development Core Team (2011); R: A language and environment for statistical computing; R Foundation for Statistical

	Computing, A-Wien
Scope v.3.6	ADInstruments, WissTech GmbH, D-Spechbach
SPSS	SPSS Inc, USA-Chicago

Danksagung

Mein spezieller Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Rainer H. Meffert für die Überlassung der Doktorarbeit. Ich danke Prof. Dr. med. Sönke Frey für die große Chance, an diesem Projekt mitzuwirken, wie auch für seine unermüdliche Geduld, die Hilfestellungen, die kreativen Ratschläge und die kompetente Betreuung der Arbeit.

Für die fachliche und praktische Unterstützung bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Torsten Blunk, Herrn Dr. Lars Eden, bei Frau Dr. Irina Chodnevskaja und Frau Sabine Müller aus dem Forschungslabor der Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Würzburg, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Norbert Schütze und Frau Susanne Wiesner aus dem Zentrum für Muskuloskelettale Forschung des König-Ludwig-Hauses Würzburg, welche mir ebenso jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Ebenso danke ich den Mitarbeitern des Anatomischen Institutes der Universität Würzburg, des Institutes für Pathologie der Universität Würzburg und des Forschungslabors für Anästhesie des Universitätsklinikums Würzburg, denen ich während meiner Forschungen begegnet bin. Mein weiterer Dank gilt Judith Ahlborn von der Studentischen Statistischen Beratung der Universität Würzburg sowie Daniela Keller für die Hilfe bei den statistischen Auswertungen.

In Liebe möchte ich diese Arbeit meinem Bruder und meinen Eltern widmen, die mir die Kraft gaben, diesen Weg zu gehen. In Liebe danke ich auch meinem Mann Zafer für die moralische Unterstützung. Herzlichst danke ich meinen Freunden und Kollegen für ihren fortwährenden Zuspruch.