

Aus dem Siegfried-Weller-Institut für Unfallmedizinische Forschung
der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen

Retro- und prospektive Analyse von Patienten mit
Pseudarthrosen:
Identifikation von Markern zur Knochenregeneration

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Hägele, Leonie Tatjana

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. K. Nüssler

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Henes

Datum der Disputation: 26.01.2021

Inhalt

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1. Einleitung	1
1.1 Fragestellung.....	1
1.2 Theoretische Grundlagen.....	3
1.2.1 Aufbau eines Knochens.....	3
1.2.2 Frakturen: Klassifizierung und Einteilung	6
1.2.3 Intramembranöse und enchondrale Frakturheilung	9
1.2.4 Pseudarthrosen und ihre Klassifikationen	11
1.2.4.1 Klassifikation nach Weber und Cech.....	11
1.2.4.2 Pseudarthroseneinteilung nach Paley.....	12
1.2.4.3 Pseudarthroseneinteilung nach RUST	13
1.2.4.4 Non union Scoring System (NUSS).....	13
1.2.5 Operative Behandlung von Pseudarthrosen	17
1.2.6 Biologische Wachstumsfaktoren sowie Einfluss auf die Knochenheilung... 20	
1.2.6.1 Angiogenetische Wachstumsfaktoren	20
1.2.6.2 Osteoblastäre Wachstumsfaktoren.....	22
1.2.6.3 Osteoklastäre Wachstumsfaktoren.....	25
2. Material und Methoden	28
2.1 Retrospektives Patientenkollektiv.....	28
2.1.1 Retrospektive klinische Datenanalyse.....	29
2.2 Prospektive molekularbiologische Datenanalyse	33
2.3 Prospektives Patientenkollektiv	34
2.4 Housekeeper	37
2.5 RNA-Isolation	38
2.5.1 Trifast-Protokoll.....	38
2.5.2 RNA Isolation	39
2.6 Quantitative Nukleinsäureanalyse.....	40
2.7 PCR.....	41
2.8 cDNA-Synthese.....	42
2.9 q-rt PCR.....	43
2.10 Primerauflistung	44
2.11 Agarose-Gelelektrophorese	46

2.12	Statistische Auswertung und Programme.....	47
2.13	Materialien, Chemikalien und Verbrauchsgegenstände	49
3.	Ergebnisse	51
3.1	Retrospektive Ergebnisse.....	51
3.1.1	Einfluss des Geschlechts auf die Heilung.....	52
3.1.2	Einfluss der Vor-Operationen auf die Heilung.....	53
3.1.3	Einfluss der OP-Technik auf die Ausheilung.....	54
3.1.4	Einfluss eines septischen Verlaufs auf die Heilung.....	55
3.1.5	Einfluss des American Society of Anesthesiologists (ASA) - Wertes auf die Heilung	56
3.1.6	Einfluss der Invasivität der Versorgung nach NUSS auf die Heilung	57
3.1.7	Anzahl der Weichteil-Operationen und deren Einfluss auf die Heilung	58
3.1.8	Gesamtübersicht der erhobenen Faktoren der Datenerhebung	59
3.1.9	Tübinger NUSS-Score vs. Tübinger Procedere.....	64
3.1.10	Risikogruppenverteilung bezogen auf die Ausheilung.....	65
3.1.11	Analyisierte Parameter des modifizierten Tübinger NUSS-Scores	66
3.2	Prospektive Ergebnisse	71
3.2.1	Angiogenetische Wachstumsfaktoren	71
3.2.1.1	VEGF.....	71
3.2.1.2	VEGF-R1	72
3.2.1.3	VEGF-R2	73
3.2.2	Osteoblastäre Wachstumsfaktoren.....	75
3.2.2.1	BMP2.....	75
3.2.2.2	BMP7.....	75
3.2.2.3	TGF- β 1.....	76
3.2.2.4	SOST.....	77
3.2.2.5	Osteocalcin.....	78
3.2.3	Osteoklastäre Wachstumsfaktoren.....	79
3.2.3.1	BAMBI	79
4.	Diskussion.....	80
4.1	Retrospektive Datenanalyse	80
4.1.1	Patientenzahlen in unserer Studie vs. in der Literatur	81
4.1.2	Kritische Beurteilung unserer Studie	82
4.1.3	Die Anpassung des NUSS-Scores	83
4.1.4	Tübinger Procedere vs. modifizierter Tübinger NUSS – Score.....	85

4.2 Prospektive Datenanalyse.....	88
4.2.1 Angiogenetische Wachstumsfaktoren.....	89
4.2.2 Osteoblastäre Wachstumsfaktoren.....	90
4.2.3 Osteoklastäre Wachstumsfaktoren.....	92
5. Fazit	94
Literaturverzeichnis.....	97
Erklärung zum Eigenanteil	103
Danksagung	104

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: AMBOSS GMBH, ABSCHNITTE EINES RÖHRENKNOCHENS, KAPITEL KNOCHENGEWEBE [ZULETZT AKTUALISIERT AM 15.05.2020, ZITIERT AM 06.07.2020] HTTPS://NEXT.AMBOSS.COM/DE/ARTICLE/200TYS. MIT FREUNDLICHER GENEHMIGUNG DER AMBOSS GMBH.	4
ABBILDUNG 2: AMBOSS GMBH, AUFBAU EINES LAMELLENKNOCHENS, KAPITEL KNOCHENGEWEBE [KAPITEL ZULETZT AKTUALISIERT AM 15.05.2020; KAPITEL ZITIERT AM 03.02.2020] HTTPS://NEXT.AMBOSS.COM/DE/ARTICLE/200TYS. MIT FREUNDLICHER GENEHMIGUNG DER AMBOSS GMBH.	6
ABBILDUNG 3: AMBOSS GMBH, EINTEILUNG NACH AO-KLASSIFIKATION, KAPITEL: ALLGEMEINE FRAKTURLEHRE [KAPITEL ZULETZT AKTUALISIERT AM 11.03.2020; KAPITEL ZITIERT AM 03.02.2020]. HTTPS://WWW.AMBOSS.COM/DE/LIBRARY#XID=T3063F&TERM=AO MIT FREUNDLICHER GENEHMIGUNG DER AMBOSS GMBH.	9
ABBILDUNG 4: „THE LADDER STRATEGY“. ABBILDUNG NACH CALORI <i>ET AL.</i> [5], VALIDATION OF THE NON-UNION SCORING SYSTEM IN 300 LONG BONE NON-UNIONS.....	17
ABBILDUNG 5: „DIAMOND CONCEPT“ MIT DEN VIER SÄULEN DER FRAKTURHEILUNG. NACH GIANNOUDIS P. ET AL. [26] FRACTURE HEALING: THE DIAMOND CONCEPT.	18
ABBILDUNG 6: VEGF REZEPTOREN UND IHRE LIGANDEN. QUELLE: HTTPS://UPLOAD.WIKIMEDIA.ORG/WIKIPEDIA/COMMONS/C/C8/VEGF_RECEPTORS.PNG. ABGERUFEN AM 02.03.2020	22
ABBILDUNG 7: GENERIERUNG DES RETROSPEKTIVEN PATIENTENKOLLEKTIVES.....	28
ABBILDUNG 8: ÜBERSICHT ÜBER DIE AUSWERTUNGEN DER GETESTETEN WACHSTUMSFAKTOREN. ANGEZEIGT WIRD DAS RANKING; JE GERINGER DIE ZAHL, DESTO WENIGER REGULIERT IST DER ENTSPRECHENDE WACHSTUMSFAKTOR.	37
ABBILDUNG 9: cDNA-SYNTHESE, ALLGEMEINE VORLAGE	43
ABBILDUNG 10: ERGEBNISSE DER RETROSPEKTIVEN DATENAUSWERTUNG. VERÖFFENTLICHT IM OKTOBER 2019 AUF DER DKOU. DIE PATIENTEN WURDEN, WIE OBEN IM ABSCHNITT 2.1 RETROSPEKTIVES PATIENTENKOLLEKTIV BESCHRIEBEN, ANALYSIERT.....	51
ABBILDUNG 11: EINFLUSS DES GESCHLECHTS AUF DIE HEILUNG	52
ABBILDUNG 12: ANZAHL DER VOR-OPERATIONEN BEZOGEN AUF DIE HEILUNG. AUF DER Y-ACHSE ABGEBILDET IST DIE ANZAHL DER PATIENTEN IN ABSOLUTEN ZAHLEN.	53
ABBILDUNG 13: DIE UNTERSCHIEDLICHEN PSEUDARTHROSEOPERATIONSTECHNIKEN BEZOGEN AUF DIE AUSHEILUNG.....	54
ABBILDUNG 14: DIE VERTEILUNG ZWISCHEN SEPTISCHEN UND NICHT SEPTISCHEN VERLÄUFEN IN DEN GRUPPEN DER AUSGEHEILTEN UND DER NICHT AUSGEHEILTEN PATIENTEN.	55
ABBILDUNG 15: DIE UNTERSCHIEDLICHE VERTEILUNG DES ASA-SCORES ZWISCHEN AUSGEHEILTEN UND NICHT AUSGEHEILTEN PATIENTEN.....	56
ABBILDUNG 16: DIE UNTERSCHIEDLICHE VERTEILUNG DER INVASIVITÄT DER BEHANDLUNG BEZOGEN AUF AUSHEILUNG UND NICHT-AUSHEILUNG. ABGEBILDET SIND DIE NACH DEM TÜBINGER NUSS-SCORE UNTERTEILTEN RISIKOGRUPPEN.	57
ABBILDUNG 17: VERTEILUNG DER ANZAHL DER WEICHTEILOPERATIONEN ZWISCHEN AUSGEHEILTEN UND NICHT AUSGEHEILTEN PATIENTEN.....	58
ABBILDUNG 18: ZU SEHEN IST DIE UNTERSCHIEDLICHE EINTEILUNG DER PATIENTEN NACH AUFNAHME DES TÜBINGER, DEM MODIFIZIERTEN, NUSS-SCORES UND ALLEIN NACH ERFOLGTER OPERATIVER THERAPIE. DIE BLAUEN BALKEN ENTSPRECHEN DER RISIKOGRUPPENVERTEILUNG NACH DEM TÜBINGER NUSS-SCORE, DIE ORANGENEN BALKEN DER RISIKOGRUPPENVERTEILUNG NACH DEM TÜBINGER PROCEDERE.....	64
ABBILDUNG 19: DARGESTELLT SIND DIE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN RISIKOGRUPPEN NACH PUNKTEWERT DES MODIFIZIERTEN TÜBINGER NUSS-SCORES UND, VOR ERHEBUNG EINES	

NUSS-SCORES, ALLEIN NACH DER OPERATIV ERFOLGTEN THERAPIE. DIES WURDE NOCH NACH AUSGEHEILTEN UND NICHT AUSGEHEILTEN PATIENTEN AUFGEGLIEDERT.....	65
ABBILDUNG 20: (A) VEGF-EXPRESSION IN ALLEN GRUPPEN. (B) DIE VEGF-EXPRESSION ISOLIERT BETRACHTET IN DEN PSEUDARTHROSEGRUPPEN. (C) DIE VEGF-EXPRESSION IN DEN SPONGIOSAGRUPPEN UND DER KONTROLLGRUPPE	71
ABBILDUNG 21: (A) VEGF-R1-EXPRESSION IN ALLEN GRUPPEN. (B) DIE VEGF-R1-EXPRESSION ISOLIERT BETRACHTET IN DEN PSEUDARTHROSEGRUPPEN. (C) DIE VEGF-R1-EXPRESSION IN DEN SPONGIOSAGRUPPEN UND DER KONTROLLGRUPPE.....	72
ABBILDUNG 22: (A) VEGF-R2-EXPRESSION IN ALLEN GRUPPEN. (B) DIE VEGF-R2-EXPRESSION ISOLIERT BETRACHTET IN DEN PSEUDARTHROSEGRUPPEN. (C) DIE VEGF-R2-EXPRESSION IN DEN SPONGIOSAGRUPPEN UND DER KONTROLLGRUPPE.....	73
ABBILDUNG 23: (A) BMP2-EXPRESSION IN ALLEN GRUPPEN. (B) DIE BMP2-EXPRESSION ISOLIERT BETRACHTET IN DEN PSEUDARTHROSEGRUPPEN. (C) DIE BMP2-EXPRESSION IN DEN SPONGIOSAGRUPPEN UND DER KONTROLLGRUPPE.	75
ABBILDUNG 24: (A) BMP7-EXPRESSION IN ALLEN GRUPPEN. (B) DIE BMP7-EXPRESSION ISOLIERT BETRACHTET IN DEN PSEUDARTHROSEGRUPPEN. (C) DIE BMP7-EXPRESSION IN DEN SPONGIOSAGRUPPEN UND DER KONTROLLGRUPPE.	75
ABBILDUNG 25: (A) TGF-B1 -EXPRESSION IN ALLEN GRUPPEN. (B) DIE TGF-B1 -EXPRESSION ISOLIERT BETRACHTET IN DEN PSEUDARTHROSEGRUPPEN. (C) DIE TGF-B1 -EXPRESSION IN DEN SPONGIOSAGRUPPEN UND DER KONTROLLGRUPPE.	76
ABBILDUNG 26: (A) SOST -EXPRESSION IN ALLEN GRUPPEN. (B) DIE SOST -EXPRESSION ISOLIERT BETRACHTET IN DEN PSEUDARTHROSEGRUPPEN. (C) DIE SOST -EXPRESSION IN DEN SPONGIOSAGRUPPEN UND DER KONTROLLGRUPPE.	77
ABBILDUNG 27: (A) OSTEOCALCIN -EXPRESSION IN ALLEN GRUPPEN. (B) DIE OSTEOCALCIN -EXPRESSION ISOLIERT BETRACHTET IN DEN PSEUDARTHROSEGRUPPEN. (C) DIE OSTEOCALCIN -EXPRESSION IN DEN SPONGIOSAGRUPPEN UND DER KONTROLLGRUPPE.....	78
ABBILDUNG 28: (A) BAMBI -EXPRESSION IN ALLEN GRUPPEN. (B) DIE BAMBI -EXPRESSION ISOLIERT BETRACHTET IN DEN PSEUDARTHROSEGRUPPEN. (C) DIE BAMBI -EXPRESSION IN DEN SPONGIOSAGRUPPEN UND DER KONTROLLGRUPPE.	79

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: RISIKOFAKTOREN FÜR EINE PSEUDARTHROSENENTWICKLUNG. TABELLE NACH STEINHAUSEN, E., ET AL. [17], PSEUDARTHROSEN. 2013. 116(7) : P. 633-649.	14
TABELLE 2: PARAMETER DES NUSS-SCORES NACH CALORI ET AL. [3] CLASSIFICATION OF NON-UNION: NEED FOR A NEW SCORING SYSTEM?	15
TABELLE 3: ERHOBENE PARAMETER IN DER RETROSPEKTIVEN DATENANALYSE	33
TABELLE 4: EIGENSCHAFTEN DER ARTHRODESEN-GRUPPE. SG STEHT FÜR SPRUNGGELENK.....	34
TABELLE 5: EIGENSCHAFTEN DER GELENKNAHEN SCHAFTFRAKTUR-GRUPPE	35
TABELLE 6: EIGENSCHAFTEN DER SCHAFTFRAKTUREN-GRUPPE	36
TABELLE 7: LISTE DER VERWENDETEN BIOLOGISCHEN WACHSTUMSFAKTOREN UND IHRER PRIMER.....	46
TABELLE 8: LISTE DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN.....	49
TABELLE 9: LISTE DER VERWENDETEN LÖSUNGEN UND PUFFER.....	50
TABELLE 10: LISTE DER VERWENDETEN MATERIALIEN.....	50
TABELLE 11: RETROSPEKTIV ERHOBENE UND ANALYSIERTE FAKTOREN. IN SPALTE 1 STEHT DER JEWEILS ANALYSIERTE PARAMETER IN DER ZWEITEN SPALTE IST DIE ANZAHL DER PATIENTEN, FÜR DIE EIN WERT IM JEWEILS BETRACHTETEN PUNKT VORHANDEN WAR, GELISTET. IN DER DRITTEN UND VIERTEN SPALTE FINDEN SICH JEWEILS DER ABSOLUTE UND PROZENTUALE WERT DER PATIENTEN, DIE AUS DER UNTERGRUPPE DES ANALYSIERTEN WERTES ‚AUSGEHEILT‘ ODER ‚NICHT AUSGEHEILT SIND. SPALTE 5 ZEIGT DEN P-WERT UND GIBT DAMIT DIE SIGNIFIKANZ DES UNTERSCHIEDES ZWISCHEN HEILUNG UND KEINER HEILUNG AN. $P < 0,05$ GILT ALS SIGNIFIKANT... 63	
TABELLE 12: ALLE ERHOBENEN PARAMETER DES MODIFIZIERTEN NUSS - SCORES IN TABELLARISCHER ÜBERSICHT. IN DER ERSTEN SPALTE DIE ERHOBENEN PARAMETER, IN DER ZWEITEN SPALTE DIE ANZAHL DER JEWEILS AUSGEWERTETEN PATIENTEN. IN DER DRITTEN SPALTE FINDEN SICH DIE ZAHLEN DER AUSGEHEILTEN PATIENTEN, IN DER VIERTEN SPALTE DIE ZAHLEN DER NICHT AUSGEHEILTEN PATIENTEN. IN SPALTE FÜNF STEHEN DIE P-WERTE DIE DEN UNTERSCHIED ZWISCHEN AUSHEILUNG UND KEINER HEILUNG ANGEBEN. SIGNIFIKANZNIVEAU WAR $P < 0,05$	68

Abkürzungsverzeichnis

INR	International normalized ratio
PSA	Pseudarthrose
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
SD	Standard deviation
RUST	radiographic union scale for tibial fractures
NUSS	Non Union Scoring System
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
rhBMPs	rekombinante humane Bone Morphogenetic Proteins
RIA	reamer irrigator aspirator
BMAC	bone marrow aspirate concentrate
BMP	Bone morphogenetic protein
VEGF	vascular endothelial growth factor
FDA	Food and Drug Administration
TGF- β 1	Transforming growth factor beta 1
BGLAP	bone γ -carboxyglutamic acid-containing protein
BAMBI	BMP und activin membrane-bound inhibitor
RANK	Receptor activator of nuclear factor kappa-B
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
ASA	American Society of Anesthesiologists
RNA	Ribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Hb	Hämoglobin
RT	Raumtemperatur
PCR	polymerase chain reaction
cDNA	Complementary desoxyribonukleinsäure
q-rt PCR	quantitative real-time PCR
min	Minuten
sec	Sekunden
h	Stunden
CP	Crossing Point
Tü RG	Tübinger Risikogruppen
p/m	Plus/minus
RG	Risikogruppe
GA/P	Arthrodesen-Pseudarthrosengruppe
GA/S	Arthrodesen-Spongiosagruppe
GG/P	Gelenknahe Pseudarthrosengruppe
GG/S	Gelenknahe Spongiosagruppe
GS/P	Schaftnahe Pseudarthrosengruppe
CO	Kontrollgruppe
ASA	American Society of Anesthesiologists
SG	Sprunggelenk

1. Einleitung

1.1 Fragestellung

Die Medizin lebt vom Fortschritt in Forschung, Behandlungsstrategien und Operationstechniken. Jean-Paul Sartre, französischer Philosoph aus dem 20. Jahrhundert, sagte: „Fortschritt ist das Werk der Unzufriedenen“. Demzufolge sollten vor allem in der Unfallchirurgie, wo Patienten oftmals lange Leidenswege erdulden, und medizinisches Personal sie dabei über Jahre hinweg begleitet, viele Fortschritte geschehen. Dennoch ist das bisher verwendete Klassifikationssystem für Pseudarthrosen von Weber und Cech aus dem Jahr 1976, und damit weder aktuell noch zeitgemäß.

Betrachtet man alle Frakturen der langen Röhrenknochen, so kommt es in 10% der Fälle zu einer verzögerten oder ausbleibenden Knochenbruchheilung. In diesem Fall spricht man von einer Pseudarthrose [1]. Die Pseudarthrosenrate steigt auf bis zu 30%, wenn der Patient eine Prädisposition mitbringt, welche ihn zum Risikopatienten macht. Ein großes Problem stellen neben der langen Heilungszeit für den Patienten auch die daraus entstehenden, hohen volkswirtschaftlichen Kosten dar. Die rezidivierenden stationären Aufenthalte, Revisionsoperationen und intensivierete Behandlung des Patienten tragen zu diesen Kosten bei, ebenso wie die verlängerte Arbeitsunfähigkeit und die Produktivitätsminderung für den entsprechenden Zeitraum der verzögerten oder ausbleibenden knöchernen Ausheilung. Antonova *et al.* beschrieben eine Kostenzunahme von 11.686 US-Dollar auf 25.556 US-Dollar, wenn eine Tibiafraktur nicht innerhalb von 24 Monaten ausgeheilte [2].

Da zum aktuellen Zeitpunkt keine verlässliche Therapieoption für Pseudarthrosen bekannt ist, ergibt sich der alternative Ansatz, mögliche Risikofaktoren für die Entstehung einer Pseudarthrose zu identifizieren, um die entsprechenden Patienten frühzeitig zu erkennen und durch eine Anpassung des therapeutischen Ansatzes eben jenen Risikofaktoren entgegenzuwirken.

Dafür muss zuerst jedoch die Klassifizierung der Pseudarthrosen vereinheitlicht werden. Calori *et al.* [3] haben die Idee aufgebracht, dass von 1976 stammende

Modell von Weber und Cech, die Einteilung der Pseudarthrosen in atroph, hypertroph und oligotroph, zu modernisieren. Ein Versuch einer ganzheitlichen Herangehensweise ist der NUSS-Score (Non Union Scoring System). Dieser bezieht patientenbezogene Risikofaktoren in die Risikogruppenbildung ein und leitet daraus einen Therapieansatz ab. Dass der NUSS-Score ein gutes Instrument ist, um Heilungsverläufe einzuschätzen und optimieren zu können, zeigten Abumunaser *et al.* [4] und Calori *et al.* [5]. Dass der NUSS-Score jedoch im klinischen Alltag an seine Grenzen stößt, zeigten van Basten Batenburg *et al.* [6]. Sie evaluierten die Notwendigkeit einer Anpassung des NUSS-Scores an alltägliche Faktoren und klinische Umsetzbarkeit. Diesen Ansatz wollen wir nun anhand unserer in der BG Unfallklinik Tübingen behandelten Patienten überprüfen und verifizieren.

Obwohl genetische Prädispositionen für Pseudarthrosen bereits identifiziert werden konnten [7, 8], fehlt bisher innerhalb des wissenschaftlichen Diskurses eine genaue Untersuchung des pseudarthrotischen Knochens. Aus dem Gedanken, biologische Wachstumsfaktoren könnten im Pseudarthrosegebiet anders exprimiert sein als dies in gesunden Knochen der Fall ist, ergibt sich eine Herangehensweise mit Blick auf die Ätiologie der Pseudarthrosenentstehung. Hierfür muss jedoch RNA aus humanen Knochen isoliert werden, was bisher, trotz hohem Kostendruck für das Gesundheitssystem und großem Leidensdruck für die Patienten, noch nicht geschehen ist. Diese Arbeit soll daher zeigen, inwiefern die RNA-Isolation aus humanem Knochen möglich ist, und darauf aufbauend, ob eine unterschiedliche Expression biologischer Wachstumsfaktoren zwischen gesundem und pseudarthrotischem Knochen besteht.

In Summer ergeben sich daher die folgenden Ziele dieser Dissertation:

1. Den gesamten Krankheitsverlauf von Patienten mit Pseudarthrose retrospektiv zu analysieren und zu vergleichen. Dabei sollen Gemeinsamkeiten entdeckt und Risikofaktoren identifiziert werden.
2. Prospektiv bei Patienten mit Pseudarthrose das Expressionsprofil einzelner Wachstumsfaktoren im Vergleich zu Kontrollen zu bestimmen.

1.2 Theoretische Grundlagen

1.2.1 Aufbau eines Knochens

Grundsätzlich unterscheidet man die Knochen in zwei verschiedene Knochenarten, den Geflechtknochen und den Lamellenknochen. Der Geflechtknochen tritt in Phasen von viel Knochensubstanzbildung auf, während der embryonalen Entwicklung und der Frakturheilung. Er zeichnet sich durch ungeordnet verlaufende Kollagenfasern aus, sowie durch eine hohe Zelldichte. Im Gegensatz dazu ist der Lamellenknochen deutlich stärker organisiert. Lamellenknochen entsteht durch Umbau aus dem Geflechtknochen und besteht aus zwei Gewebsformen, der Substantia spongiosa und der Substantia corticalis. Die Kollagenfasern sind nicht mehr ungeordnet, sondern verlaufen entlang der wirkenden Kraft [9].

Exemplarisch sollen hier der Aufbau und die Grundstruktur eines Knochens anhand eines langen Röhrenknochens dargestellt werden (Abb.1), da dieser in dieser Arbeit die größte Rolle spielt. Außer den langen Röhrenknochen gibt es noch kurze Röhrenknochen (*Ossa metacarpi*, *Ossa digitorum manus*, *Ossa metatarsi*, *Ossa digitorum pedis*) sowie platte (*Scapula*, *Os coxae* und die Schädelknochen), kurze (*Ossa carpi* und *Ossa tarsi*) und unregelmäßige Knochen (z.B. Wirbelknochen) [9].

Die langen Röhrenknochen, zu welchen Humerus, Ulna und Radius, Femur, Tibia und Fibula zählen, bestehen aus zwei Knochenenden, den so genannten Epiphysen, und dem langen Zwischenstück, der Diaphyse. Den Übergang zwischen Epi- und Diaphyse bezeichnet man als Metaphyse (Abb.1).

In der untenstehenden Abbildung ist das Innere eines Knochens abgebildet. Es lässt sich in verschiedene Gewebe unterteilen. An der Außenfläche des Knochens unterscheidet man die Substantia corticalis von der im Inneren gelegenen Substantia spongiosa. Die Substantia spongiosa besteht aus einer Anordnung feiner Knochenbälkchen, den sogenannten Trabekeln, die je nachdem wie sie angeordnet sind, auf Druck oder Zug ausgerichtet sind. In der

Diaphyse der Röhrenknochen befindet sich außerdem die Markhöhle, *Cavitas medullaris*, in welcher sich, ebenso wie in den Zwischenräumen der Trabekel, Knochenmark befindet. Zu Anfang des Lebens befindet sich in der Markhöhle rotes Knochenmark, das seinen Namen auf Grund seiner Fähigkeit zur Blutbildung trägt. Während des Alterungsprozesses wird das rote Knochenmark zunehmend durch gelbes, fettreiches Knochenmark ersetzt. Rotes Knochenmark bleibt nur in wenigen Knochen, wie zum Beispiel den Rippen und dem Becken, erhalten [9].

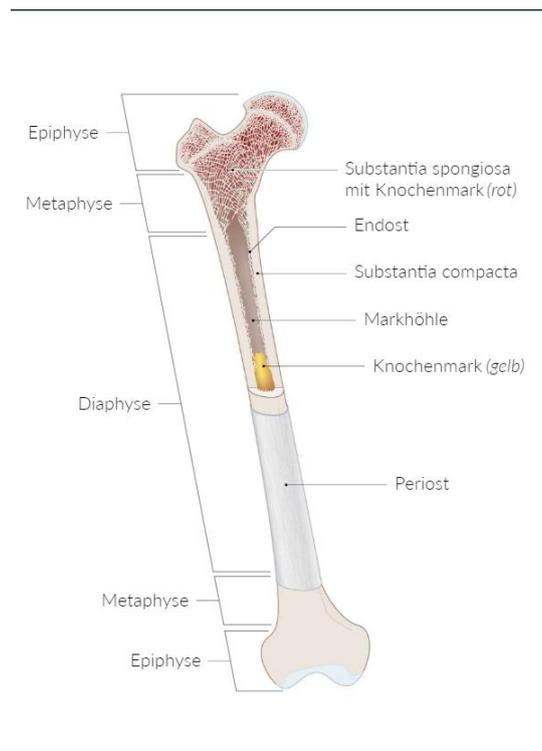


Abbildung 1: AMBOSS GmbH, Abschnitte eines Röhrenknochens, Kapitel Knochengewebe [zuletzt aktualisiert am 15.05.2020, zitiert am 06.07.2020] <https://next.amboss.com/de/article/2o0TYS>. Mit freundlicher Genehmigung der AMBOSS GmbH.

Der Knochen wird auf seiner gesamten Länge von einem straffen Bindegewebe, dem Periost, bedeckt. Dies ist eine nerven- und gefäßreiche Schicht. Nur an den knorpelüberzogenen Gelenkflächen ist das Periost unterbrochen. Alle inneren Zwischenräume, auch innerhalb der Trabekel, sind von Endost überzogen, der inneren Knochenhaut [9].

Das Knochengewebe besteht aus dicht verflochtenen Knochenzellen, den Osteozyten. Diese sind in eine Extrazellulärsubstanz eingebettet und liegen in

kleinen Knochenhöhlen, den so genannten Lacunae osseae. Die Osteozyten stehen miteinander über Knochenkanälchen, Canaliculi osseoae, in Verbindung. Blutgefäße versorgen die Knochenzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen. Je ein Blutgefäß mit darum angeordneten Osteozyten bezeichnet man als Osteon, dies stellt die ‚funktionelle Einheit‘ des Knochens dar. In der nachfolgenden Abbildung ist dieser Aufbau gut sichtbar dargestellt (Abb. 2).

Außer den Osteozyten, die dem Erhalt der Knochenmatrix dienen, existieren im Knochen noch zwei weitere Zellarten. Die Osteoblasten sind die Vorläuferzellen der Osteozyten. Osteoblasten entwickeln sich aus undifferenzierten Mesenchymzellen, welche embryonale Bindegewebszellen sind. Sie produzieren das Osteoid, die Grundsubstanz des Knochens. Damit dienen sie dem Auf- und Umbauprozess im Knochen. Ebenso steuern sie die Mineralisierung des Knochens. Osteoblasten zeigen eine ausgeprägte Basophilie in der Histologie, da sie eine hohe Proteinsyntheserate aufweisen. Ist ein Osteoblast komplett von der von ihm produzierten Knochenmatrix eingeschlossen, bezeichnet man dies als eine reife Zelle, einen Osteozyten [10].

Osteoklasten stellen die dritte Zellart dar. Sie sind vielkernige Riesenzellen und sind für den Knochenabbau verantwortlich. Die Osteoklasten entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Sie bilden Resorptionszonen, in denen der Knochen gerade abgebaut wird: diese Zonen bezeichnet man auch als Howship-Lakunen [9].

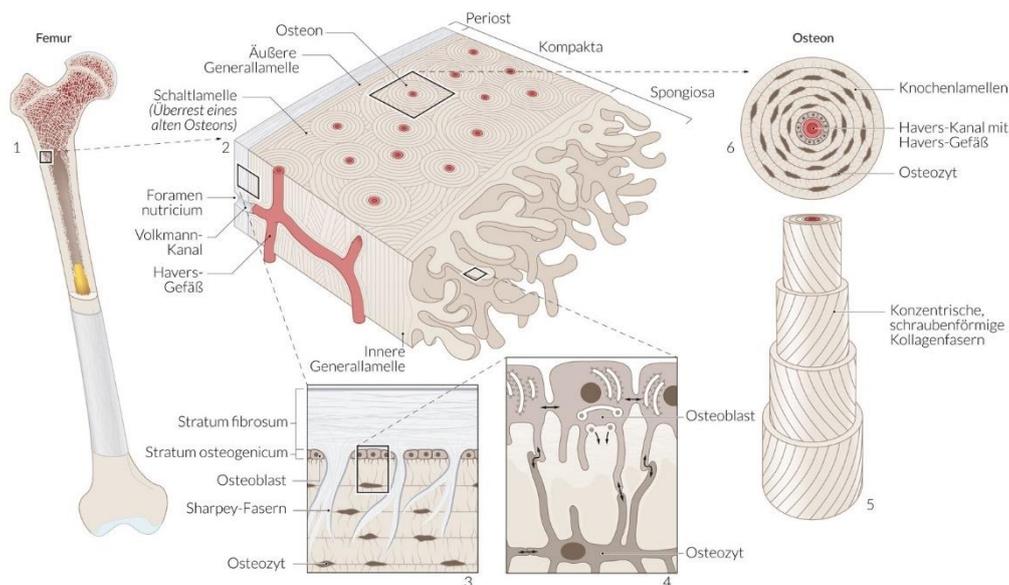


Abbildung 2: AMBOSS GmbH, Aufbau eines Lamellenknochens, Kapitel Knochengewebe [Kapitel zuletzt aktualisiert am 15.05.2020; Kapitel zitiert am 03.02.2020] <https://next.amboss.com/de/article/2o0TYS>. Mit freundlicher Genehmigung der AMBOSS GmbH.

Ein Osteoklast baut zehnmal mehr Knochensubstanz ab, als ein Osteoblast aufbauen kann. Um ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Auf- und Abbau zu erhalten, müssen wesentlich mehr Osteoblasten als Osteoklasten im Gewebe vorliegen. Da es sich bei beiden Zellarten um entwicklungsbiologisch unterschiedliche Systeme handelt, ist das Zusammenspiel beider Zellarten sehr komplex und bis heute noch nicht vollständig verstanden [10].

1.2.2 Frakturen: Klassifizierung und Einteilung

Eine Fraktur bezeichnet einen Knochen, dessen Kontinuität unter Bildung von zwei oder mehreren Fragmenten unterbrochen ist. Dies kann aus einer direkten oder indirekten Gewalteinwirkung resultieren, wenn dabei die Elastizität und Festigkeit des Knochens überschritten wird und dieser letztendlich bricht. Abzugrenzen von der Fraktur, der vollständigen Durchtrennung des Knochens, sind die Fissur und die Infraktion. Bei einer Fissur handelt es sich um einen Knochenriss ohne Kontinuitätsdurchtrennung und bei der Infraktion um einen Spaltbruch des Knochens [9, 11].

Frakturen lassen sich nach ihren Entstehungsformen einteilen. Hier wird unterteilt in die traumatischen Frakturen, die durch eine einmalige, plötzlich direkt oder indirekt auf den Knochen wirkende Gewalt hervorgerufen werden. Dabei kann es

sich um einen Stoß, einen Schlag, eine Biegung, eine Stauchung oder eine Torsion handeln. Pathologische Frakturen hingegen entstehen ohne adäquate Gewalteinwirkung. Die Fraktur ist nur deshalb möglich, da die Knochenstruktur bereits vor dem Ereignis nicht mehr komplett intakt war. So kann eine Fraktur durch eine entzündliche Erkrankung, benigne oder maligne Erkrankungen oder generalisierte Knochenerkrankungen entstehen. Die dritte Klasse der Frakturen bilden die Ermüdungsfrakturen. Diese treten ohne äußere Gewalteinwirkungen als Folge rezidivierender Mikrotraumen auf chronisch geschwächtes Knochengewebe auf. Als typische Beispiele lassen sich Frakturen der Metatarsalia bei Joggern oder Wanderern nennen [9, 11].

Da die in dieser Arbeit verwendeten Daten ausschließlich auf traumatischen Frakturen basieren, soll auf deren weitere Klassifikation noch genauer eingegangen werden.

Die traumatischen Frakturen werden nach der Art der Gewalteinwirkung unterschieden. So gibt es Biegungsfrakturen, bei denen auf der Konvexseite des Knochens die Elastizität durch Zug und auf der Konkavseite durch Druck überschritten wird. Es kommt zum Bruch des Knochens mit Abspaltung eines Biegungskeils auf der Konkavseite.

Die Torsionsfraktur ist die typische Skifahrer-Verletzung. Wird der an einer Seite fixierte Knochen einer Drehung in die entgegengesetzte Richtung ausgesetzt, resultiert daraus eine spiralförmige Frakturlinie.

Infolge direkter Gewalteinwirkungen auf den Knochen kommt es meistens zu einem Querbruch. Dieser wird Schub- oder Abscherfraktur genannt. Auch die Knorpel-Knochen-Abspaltung bei einer Luxation ist eine Abscherfraktur [9].

Abrissfrakturen entstehen infolge von Zugkräften, die zum Abriss und der Dislokation eines Knochenfragmentes über den Zug durch eine Sehne oder ein Band führen.

Stauchungsfrakturen resultieren aus der Stauchung in der Längsachse. Dies kann bei Wirbelkörpern zu Kompressionsfrakturen führen.

Bei einer auf breiter Fläche und schnell eintretender Gewalteinwirkung kann es zu Mehrfragment- und Trümmerfrakturen kommen. Die Mehrfragmentfraktur besteht aus vier bis sechs Knochenfragmenten, die Trümmerfraktur aus mehr als sechs größeren Bruchstücken [9].

Nach der Hautintaktheit unterscheidet man zudem in offene oder geschlossene Frakturen. Bei der geschlossenen Fraktur ist die Haut unbeschädigt, bei der offenen Fraktur hat ein Frakturfragment die Haut durchtrennt. Offene Frakturen werden dabei nach Gustilo und Anderson klassifiziert. Grad 1 ist dabei eine Durchspießung der Haut kleiner als ein Zentimeter mit unbedeutender Verschmutzung und einer einfachen Frakturform. Grad 2 ist eine Hautdurchtrennung größer als ein Zentimeter mit Weichteilquetschungen und mittlerer Kontamination. Bei Grad 3 besteht eine ausgedehnte Weichteilverletzung mit breiter Eröffnung des Frakturareals. Bei Tibia-Frakturen des Gustilo-Anderson Typ 2 kam es in 16% der Fälle zu Pseudarthrosen, bei Gustilo-Anderson Typ 3A in 60% und bei Gustilo-Anderson Typ 3B in 80% der Fälle [12].

Typischerweise werden die Frakturen nach der AO-Klassifikation zur Beschreibung der Lokalisation und Beschaffenheit eingeteilt[13]. AO steht dabei für „Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen“. Die Klassifikation benutzt dabei einen fünfstelligen Code, der mit den ersten beiden Zahlen Aussagen zur Lokalisation gibt. Das Schema ist in Abbildung 3 dargestellt. Die für diese Arbeit wichtigsten Codes sollen hier genannt werden: die erste Zahl bezieht sich auf die Körperregion. 1 steht für Humerus, 2 für Radius und Ulna, 3 für Femur und Patella und 4 für Tibia und Fibula. Die zweite Zahl gibt den näheren Frakturort innerhalb der Körperregion an. Hier steht 1 für proximal, 2 für diaphysär und 3 für distal. Auf das erste Zahlenpaar folgt ein Großbuchstabe, der die Schwere der Fraktur angibt. A bedeutet hierbei einfache oder extraartikuläre Fraktur, B Keilfraktur oder partielle Gelenkbeteiligung und C komplexe Fraktur oder vollständige Gelenkfraktur. An die jeweiligen Großbuchstaben schließen sich nochmals Zahlen an, die die Schwere der Fraktur weiter charakterisieren, von 1 bis 3 zunehmend. Da diese Arbeit sich hauptsächlich mit Tibiafrakturen beschäftigt,

zeigt das untenstehende Bild in Abbildung 3 die Lokalisationen von Tibiafrakturen anhand der AO Klassifikation.

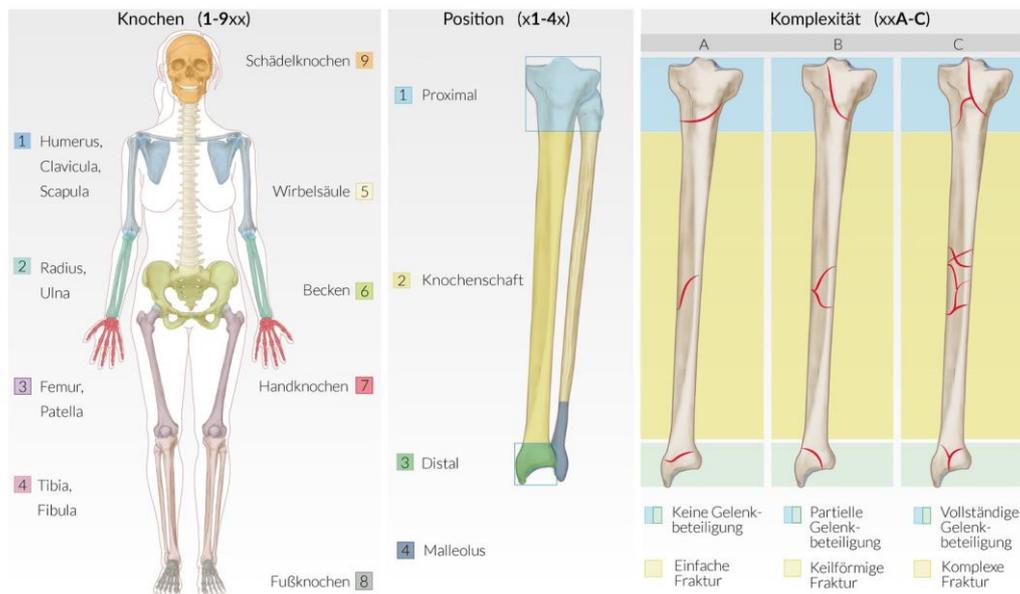


Abbildung 3: AMBOSS GmbH, Einteilung nach AO-Klassifikation, Kapitel: Allgemeine Frakturlehre [Kapitel zuletzt aktualisiert am 11.03.2020; Kapitel zitiert am 03.02.2020]. <https://www.amboss.com/de/library#xid=T3063f&term=AO> Mit freundlicher Genehmigung der AMBOSS GmbH.

1.2.3 Intramembranöse und enchondrale Frakturheilung

Unter Frakturheilung versteht man den Heilungsprozess, den ein Knochendefekt durchläuft, um seine vollständige Kontinuität wiederzuerlangen.

Knochenbrüche können auf zwei verschiedene Arten heilen, entweder intramembranös oder enchondral, auch als ‚direkte‘ oder ‚indirekte Knochenbruchheilung bezeichnet, oder auch ‚primäre‘ oder ‚sekundäre Frakturheilung‘ genannt [14].

Die intramembranöse *primäre Knochenheilung* kann dann stattfinden, wenn die Fraktur ohne Zerstörung des Periosts erfolgt ist. Sie läuft ohne sichtbare Kallusbildung ab. Wenn der Frakturspalt kleiner als ein Millimeter ist, wächst zunächst kapillarreiches Bindegewebe in den Frakturspalt ein. Um diese Strukturen herum lagern sich Osteoprogenitorzellen aus End- und Periost an. So bildet sich im Bereich der Markhöhle ein Übergangsgewebe aus Knochenbälkchen. Ist der Bruch chirurgisch gut versorgt, können die Osteone der beiden Bruchenden aufeinander zuwachsen und sich direkt verbinden.

Aufgrund der anfangs geringeren Belastbarkeit wird eine Schonung in den ersten acht Wochen empfohlen. Ab der achten Woche wird der Knochen durch Osteoklasten abgebaut und druck- und zugstabiler umgebaut. Letztendlich findet bei der primären Frakturheilung eine direkte knöcherne Heilung auf Basis von Knochenbildung durch Osteoblasten statt [14].

Sind die Frakturrenden weniger gut adaptiert oder liegen mehrere Frakturstücke vor, kommt es zur enchondrale *sekundären Frakturheilung*. Diese lässt sich in mehrere spezifische Phasen einteilen [14] und findet in immer gleichbleibender Reihenfolge statt:

In der frühen Frakturphase bildet sich im Frakturareal zuerst ein Hämatom, mit diesem gelangen Zellen in die Frakturgegend. Diese Zellen sind für die Synthese von proinflammatorischen Faktoren (acidic fibroblast growth factor (aFGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), platelet derived growth factor (PDGF) und transforming growth factor beta (TGF- β) verantwortlich [15]. Die Entzündungskaskade wird durch diese Faktoren aktiviert und führt zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Das Hämatom wird abgebaut und durch fibroblasten-ähnliche Zellen ersetzt. Diese differenzieren zu hypertrophen Chondrozyten und bilden als Übergangsknochen den Kallus im ehemaligen Frakturareal. In der Folge wird der Kallus durch aktivierte Osteoblasten knöchern umgebaut. Das Frakturareal imponiert in Röntgenbildern oder bei der klinischen Untersuchung verdickt, da die gebildete Kallusmanschette wesentlich dicker ist als der Knochen. Die sekundäre Frakturheilung endet damit, dass der Knochen noch einmal umgebaut wird (Remodeling). Dabei wird der Kallus von Osteoklasten abgebaut und der Knochen durch Osteoblasten stabil erneuert. Die vollständige Ausheilung des Knochens hängt dabei von der Verletzungsart und dem Areal ab und dauert beim Menschen meist etwa vier bis sechs Monate [14].

Ein weiterer wichtiger Schritt der Frakturheilung ist die Angiogenese. Diese kommt bereits in der frühen Phase der Frakturheilung vor. Die durch den Bruch bedingte Hypoxie aktiviert die Freisetzung von HIF1alpha, einem initialen Transkriptionsfaktor, der anschließend die Freisetzung von VEGF stimuliert und

so die Angiogenese anregt [16]. Wichtig sind die Einsprossung und Neubildung von Gefäßen, in der Frakturregion.

1.2.4 Pseudarthrosen und ihre Klassifikationen

Wenn eine Fraktur nach vier Monaten noch nicht geheilt ist, spricht man von einer *verzögerten Frakturheilung*. Dauert der Heilungsprozess mehr als sechs Monate, handelt es sich um eine *Pseudarthrose*. Am häufigsten kommen Pseudarthrosen an langen Röhrenknochen vor [17]. Symptome, die durch eine Pseudarthrose hervorgerufen werden, sind Schmerzen, eine abnorme Beweglichkeit oder eine dauerhafte Funktionseinschränkung. Radiologisch imponiert ein weiterhin sichtbarer Frakturspalt. Das Wort ‚Pseudarthrose‘ leitet sich aus dem Griechischen ab, *pseudes* – falsch und *arthros* – Gelenk. Das Gelenk ist deshalb ein ‚Falschgelenk‘, da es zwar Bewegung erlaubt, allerdings keinerlei andere Kriterien für ein Gelenk erfüllt. So besitzt es keine Kapsel, Gelenkflüssigkeit oder einen stützenden Bandapparat.

Nicht nur infolge einer Fraktur kann es zu einer Pseudarthrose kommen. Auch nach Operationen zur Versteifung eines Gelenks (sog. Arthrodesen), die in der Folge nicht zeitgerecht ausheilen, kann eine Pseudarthrose entstehen. Indikationen für Arthrodesen können chronische Gelenkinstabilitäten, schwere Fehlstellungen oder eine fortgeschrittene Arthrose sein [14].

1.2.4.1 Klassifikation nach Weber und Cech

Pseudarthrosen lassen sich nach ihrem radiographischen Bild in drei verschiedene Arten, nach der gleichnamigen von Weber und Cech 1976 [18] festgelegten Klassifikation, einteilen: atrophe, hypertrophe und oligotrophe Pseudarthrosen.

Die sogenannten *atropen Pseudarthrosen* sind durch das Ausbleiben von Kallusbildung gekennzeichnet. Es werden hierbei anhand des Röntgenbilds Rückschlüsse auf die ausbleibenden biologischen Prozesse gezogen wie z.B. eine mögliche verminderte Durchblutung. Dass die Durchblutung nicht komplett fehlt, konnte in einigen Studien inzwischen gezeigt werden [19-21]. Oftmals finden sich Frakturfragmente, die keinen Anschluss an den Rest der Fraktur gefunden haben. Diese sklerosierten Knochen hindern den Knochen an der

Revaskularisierung. Bei dieser Pseudarthrosenart ist im Röntgenbild kein Knochenwachstum zu finden und der Frakturspalt verbleibt mit abgerundeten Knochenenden klar sichtbar. Bei atrophen Pseudarthrosen existiert die Theorie der zu starren operativen Versorgung, so dass die Biologie der Frakturheilung nicht in Kraft treten kann und der Knochen keinen Wachstumsreiz erhält. Dies ist häufig der Fall, wenn die Knochenenden zu stark durch eine Plattenosteosynthese fixiert sind und der Patient dazu keinerlei Belastung und Bewegung in das Frakturgebiet bringt.

Hypertrophe Pseudarthrosen zeichnen sich durch eine vermehrte Kallusbildung aus [17]. Im Knochen existiert eine gute Revaskularisierung und es formt sich viel Faserknorpel. Radiologisch sieht man eine vermehrte, allerdings weder zielgerichtete noch stabile, Kallusbildung. Hierbei geht man von einer überschießenden Biologie aus. Möglicherweise bedingt durch eine nicht ausreichend biomechanisch stabil versorgte Osteosynthese entsteht in diesem Fall im ehemaligen Frakturareal zu viel Beweglichkeit oder der Patient belastet zu viel [17, 22]. Dadurch kann der Knochen keine feste Verbindung herstellen und der Bruch heilt nicht stabil aus. Im Extremfall lassen sich radiographisch Elefantenfuß- artige Veränderungen an beiden Knochenbruchenden darstellen, die große Kallusformationen bilden, die aber keinen Anschluss aneinander finden.

Häufig kommen gemischte Formen atrophen und hypertrophen Typs im ehemaligen Frakturareal vor: so heilt eine Fraktur an der vorderen Bruchkante mit vermehrter Kallusbildung, also hypertroph, während sich im dahinterliegenden Frakturareal keine Kallusbildung, also ein atrophes Geschehen, zeigt. Stehen beide Anteile etwa im Gleichgewicht zueinander, wird die Pseudarthrose als *oligotroph* bezeichnet.

1.2.4.2 Pseudarthroseneinteilung nach Paley

Die Einteilung ist prinzipiell auf alle Knochen übertragbar. An der Tibia unterscheidet man zwischen Typ A, Knochendefekt <1cm und Typ B >1cm mit weiteren Untergruppen [17, 23]. Weiter unterteilt wird dabei bei Typ A ob eine

Verformung vorliegt oder nicht, bei Typ B in B1: Knochendefekt ohne Verkürzung, B2: Verkürzung ohne Frakturlücke und B3: Verkürzung und Frakturlücke [23].

1.2.4.3 Pseudarthroseneinteilung nach RUST

Der radiographic union scale for tibial fractures, kurz RUST, beurteilt die Fraktur anhand der Frakturlinien und Kallusbildung aller vier Kortizes auf je zwei Röntgenbildern. Es konnte ein betrachterunabhängiger Vorteil gegenüber anderen konventionellen Verfahren zur Beurteilung der Frakturdurchbauung nachgewiesen werden. Jedoch kann bisher keine Aussage zum funktionellen Outcome der Patienten getroffen werden [17, 24]. Außerdem ist der RUST nur auf die Pseudarthrosen der Tibia anwendbar und kann an keinem anderen Frakturareal genutzt werden.

1.2.4.4 Non union Scoring System (NUSS)

Mehrere Autoren haben daraufhin gewiesen, dass die Weber/Cech Klassifizierung heute nicht mehr ausreichend ist, da diverse Risikofaktoren [25], die am Entstehungsprozess einer Pseudarthrose beteiligt sein können, hier nicht berücksichtigt werden. Risikofaktoren, die mit der Bildung einer Pseudarthrose assoziiert sind, sind in Tabelle 1 dargestellt.

Lokale Faktoren	Lokalisation der Fraktur
	Offene Fraktur
	Grad des Weichteilschadens
	Vaskularisierung
	Infektion
	Weichteilinterposition
	Frakturzustand (Frakturspalt, Kontakt der Fragmente)
	Operationsergebnis (Qualität, Stabilität)
Systemische Faktoren	Alter des Patienten
	Geschlecht
	Ernährungszustand
	Nikotin
	Medikamenteneinnahme
	Alkoholabusus

	Vorerkrankungen (z.B Diabetes mellitus, pAVK)
	Bestrahlung
	Knochenqualität (Osteoporose)
	Vitamin – D – Mangel

Tabelle 1: Risikofaktoren für eine Pseudarthrosenentwicklung. Tabelle nach Steinhausen, E., *et al.* [17], Pseudarthrosen. 2013. 116(7): p. 633-649.

2008 wurde daraufhin der NUSS-Score entwickelt, um Pseudarthrosen besser klassifizieren und untereinander vergleichen zu können. Außerdem schließt sich an die entsprechende Klassifizierung ein Behandlungsregime an, die sogenannte Ladder- Strategy [3]. Bisher ist der NUSS-Score jedoch hauptsächlich in der Theorie genutzt und wird klinisch kaum angewendet. Mehrere Autoren, wie Abumunaser *et al.* [4] und Calori *et al.* [5], haben anhand eigener retrospektiver Daten den NUSS-Score verglichen mit den erfolgten Behandlungen der Patienten. Sie konnten an jeweils kleinen Patientenkollektiven zwischen 40 und 156 Patienten mit Pseudarthrose der Tibia zeigen, dass der NUSS – Score ein valider Score ist und Beachtung im klinischen Alltag verdient. Van Basten Batenburg *et al.* [6] schlug eine Anpassung der erhobenen Parameter im NUSS – Score vor, setzte diese jedoch noch nicht um.

Die nachfolgende Tabelle 2 zeigt alle berücksichtigten Faktoren des NUSS-Scores.

Parameter des NUSS-Scores			
Der Patient		Punkte	Maximale Punktezahl
Diabetes	Nein	0	2
	Ja – gut eingestellt	1	
	Ja – schlecht eingestellt	2	
Nikotin	Nein	0	5
	Ja	5	
ASA	1 oder 2	0	1
	3 oder 4	1	
Blutergebnisse: Leukozytenzahl, Blutsenkung, CRP	Leukozyten > 12 /nl	1	3
	Blutsenkung > 20 mm/h	1	
	CRP > 20 mg/l	1	
Infektion	Keine	0	4
	Verdacht auf Infektion	1	
	Septisch	4	

Medikamente	Steroide NSAID	1 1	2
Der Knochen		Punkte	Maximale Punktezahl
Primärfraktur	Geschlossen	0	5
	Offen Grad I	1	
	Offen Grad II-III A	3	
	Offen IIIB und IIIC	5	
Knochenqualität	Gut	0	3
	Mittelmäßig	1	
	Schlecht	2	
	Sehr schlecht	3	
Größe des Knochendefektes	0,5-1 cm	2	5
	1-3 cm	3	
	>3 cm	5	
Anzahl der vorherigen Eingriffe am Knochen	Keiner	1	4
	<2	2	
	2-4	3	
	>4	4	
Weber und Cech Klassifikation	Hypertroph	1	5
	Oligotroph	3	
	Atroph	5	
Invasivität des vorangegangenen Eingriffs	Minimal – geschlossen chirurgisch	0	3
	Intramedullärer Nagel	1	
	Extramedullärer Nagel	2	
	Osteosynthese inklusive Knochenersatz	3	
Knochenausrichtung	Nicht anatomisch	0	1
	Anatomisch	1	
Stabilität der initialen Frakturversorgung	Inadäquate Stabilität	0	1
	Adäquate Stabilität	1	
Weichteile		Punkte	Maximale Punktezahl
Weichteilstatus	Intakt	0	6
	Mit kleinen Verletzungen	2	
	Vorangegangene Versorgung des Weichteildefektes	3	
	Vorangegangener freier Lappen	4	
	Schlechte Durchblutung	5	
	Vorhandener Hautdefekt	6	

Tabelle 2: Parameter des NUSS-Scores nach Calori *et al.* [3] Classification of non-union: Need for a new scoring system?

Ein weiterer wichtiger Bestandteil des NUSS-Scores ist die aus den Punktwerten generierte “Ladder strategy”, siehe Abbildung 4. Die “Ladder strategy” zeigt Behandlungsstrategien, je nach erreichtem Punktwert des Patienten. Für geringe Probleme soll ein einfacher Lösungsansatz gewählt werden, für komplexere Probleme ein weiterreichender Lösungsansatz [5].

Im NUSS-Score werden vier Patientengruppen unterschieden [5], je nach dem erreichten Punkterang:

- Punktwert 0 bis 25; das Problem in der Pseudarthrose wird als mechanisch angesehen, mit verbesserter Stabilität im Pseudarthrosengebiet wird von einer unkomplizierten Heilung ausgegangen.
- Punktwert 26 bis 50; diese Patientengruppe braucht eine erweiterte Behandlung, da das Problem sowohl mechanisch als auch biologisch vermutet wird. Zusätzlich zu einer verbesserten Stabilisierung braucht es einen biologischen Anreiz zur Ausheilung der Pseudarthrose. Dieser kann aus einer Ultraschalltherapie, dem Einbringen von mesenchymalen Stammzellen oder Wachstumsfaktoren bestehen.
- Punktwert 51 bis 75; die Pseudarthrose wird als komplex angenommen und bedarf einer komplexen Behandlung. Das Pseudarthrosenareal muss reseziert werden und der daraus entstandene Knochendefekt durch zum Beispiel einen Knochentransport behandelt werden. Dies kann entweder über einen externen Fixateur oder eine Spongiosatransplantation erfolgen. Zusätzlich werden entweder Zellen eingebracht oder Wachstumsfaktoren, die lose oder bereits auf einem Trägergerüst integriert sind.
- Punktwert 76 bis 100; in dieser Patientengruppe muss, je nach Lokalisation der Pseudarthrose, häufig einer fortgeschrittenen Infektpseudarthrose, unter Berücksichtigung des Gesamtzustandes des Patienten und Größe des Knochendefekts eine Amputation in Betracht gezogen werden. Alternativ wird eine Arthrodesen- oder Prothesenversorgung vorgeschlagen.

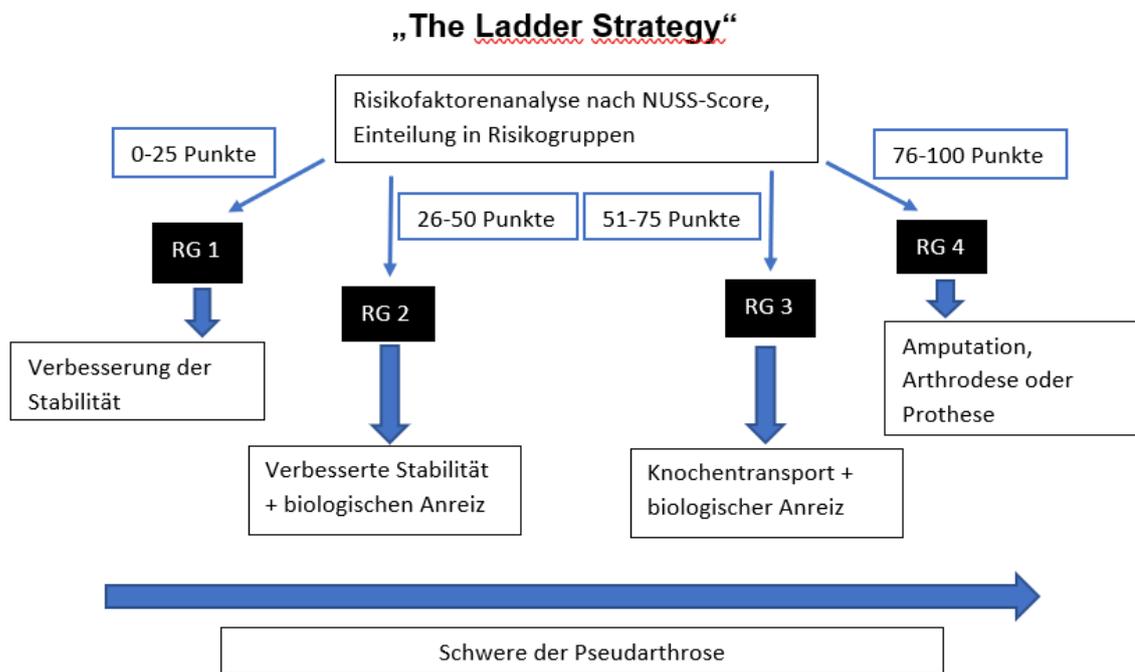


Abbildung 4: „The Ladder Strategy“. Abbildung nach Calori *et al.* [5], Validation of the Non-Union Scoring System in 300 long bone non-unions.

1.2.5 Operative Behandlung von Pseudarthrosen

Die operative Behandlung von Pseudarthrose orientiert sich an dem Diamond concept [26], siehe auch Abbildung 5.

In der Regel kommt es bei einer Pseudarthrose zu einer Revisionsoperation, in der das Osteosynthesematerial überprüft, gewechselt oder ergänzt wird. Häufig ist eine individuelle Therapie unter Berücksichtigung der Pseudarthrosenart, der Begleiterkrankungen und des Zustandes des Patienten notwendig.

Das „Diamond concept“ (siehe Abb. 5) beschreibt den Ansatz, die Knochenheilung als von mehreren Faktoren abhängig anzusehen. Es stützt sich auf vier Säulen: die mechanische Stabilität, die Osteogenese mit Vorhandensein von vitalen Zellen, die Osteoinduktion durch Wachstumsfaktoren und die Osteokonduktion als Wachstumsgerüst [17, 26]. Ebenfalls als wichtig angesehen wird die Vaskularität [17].

Es wird davon ausgegangen, dass für die Knochenheilung alle Säulen gleich wichtig sind und entsprechend optimiert werden müssen [17].



Abbildung 5: „Diamond concept“ mit den vier Säulen der Frakturheilung. Nach Giannoudis P. *et al.* [26]
Fracture healing: the diamond concept.

Da bei atropen Pseudarthrosen häufig ein sklerotisches Knochenstück die Regeneration verzögert und die fehlende Biologie die Lücke nicht schließt, wird operativ das bindegewebige Frakturareal debridiert und die Frakturrenden werden angefrischt [14]. Ein autologes Knochenstück, ein Spongiosaspan, häufig vom Beckenkammknochen (Spongiosaspan/block/chips) oder Tibiakopf (Spongiosachips), wird eingesetzt, um den Defekt zu füllen. Diese Spongiosaspäne, die am häufigsten vom vorderen (oder hinteren) Beckenkamm entnommen werden, sollen das Wachstum der Frakturrenden anregen und Wachstumsreize (Osteoinduktion) senden. Man geht davon aus, dass die Spongiosaspäne die oben erklärte Frakturheilung anstoßen können, da sie ein sehr zellreiches Gewebe sind und im besten Fall noch mesenchymale Stammzellen enthalten, die das Knochenwachstum begünstigen [17]. Zudem fungieren die Spongiosaspäne als knöcherne Gerüststruktur, die das Potential mit sich bringt, eine teilweise Integrität der Frakturrenden wiederherzustellen. Da die Transplantate aus dem Beckenkamm hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität die besten Eigenschaften zeigen, werden diese am häufigsten verwendet [27].

Teilweise werden zusätzlich intraoperativ rekombinante humane Bone Morphogenetic Proteins (rhBMPs) eingesetzt. rhBMP2 ist derzeit auf dem Markt, allerdings ist die Anwendung nicht unumstritten. Die Bone morphogenetic proteins (BMPs) sind Wachstumsfaktoren, welche eine Schlüsselrolle im Umbau von mesenchymalem Gewebe zu Knochen und Knorpel spielen. rhBMP7 wurde vor einigen Jahren verwendet, dann allerdings wieder vom Markt genommen, da es zu einer hohen Rate von non-respondern kam und mitunter zu schweren Nebenwirkungen rh [28, 29] . BMP2 weist ebenso wie rhBMP7 non-responder Raten von bis zu 36 % auf [30, 31] und führt unter anderem zu überschießendem und unkontrolliertem Wachstum an der Transplantatlokalisierung. Beispielsweise hatten sich beim Einsatz an Wirbelsäulenfrakturen Knochenspäne gebildet, die das Rückenmark komprimiert und so zu schweren Komplikationen geführt hatten [30]. Deshalb wird momentan weitestgehend auf den Einsatz von rhBMPs verzichtet.

Weitere additive Verfahren sind: RIA (reamer irrigator aspirator) - Da die Spongiosagewinnung am Beckenkamm limitiert ist und zugleich zahlreiche Komplikationen auftreten können [32], wurde das RIA-System entwickelt. Es ermöglicht die Gewinnung großer, flüssiger Knochenmarkvolumina (20-75 ml) aus einem intramedullären Kanal, meist am Femur [33].

BMAC (bone marrow aspirate concentrate) ist eine neuartige Methode, um mesenchymale Stammzellen, Progenitorzellen und Wachstumsfaktoren aus dem Beckenkamm zu gewinnen. Verschiedene Studien haben eine gute Wirkung auf die Schmerzsymptomatik der Patienten nachgewiesen, allerdings ist noch umstritten, wie oft die Zellen appliziert werden sollten [34].

Bei hypertrophen Pseudarthrosen geht man von einer biomechanischen Instabilität aus. Deshalb werden sie behandelt, indem man dem ehemaligen Frakturareal Bewegungsmöglichkeiten nimmt. Wurde die Fraktur beispielsweise initial mit einem Marknagel versorgt, so kann nun der Nagel ausgetauscht und durch einen größeren Marknagel mit einhergehender Aufbohrung des Markraums ersetzt werden [35, 36]. Alternativ kann eine additive Plattenosteosynthese angebracht werden [37]. Ebenfalls möglich ist ein kompletter Osteosynthese -

Verfahrenswechsel, bei dem der Marknagel entfernt und anstatt diesem eine Plattenosteosynthese durchgeführt wird. War die initiale Frakturversorgung bereits eine Plattenosteosynthese, kann ebenfalls eine additive Platte angebracht werden oder, was jedoch eher selten passiert, das Verfahren auf einen Marknagel gewechselt werden. So wird die Beweglichkeit im Defektareal des Knochens im richtigen Maß reguliert und die Chance der Frakturheilung ist erheblich verbessert [38].

1.2.6 Biologische Wachstumsfaktoren sowie Einfluss auf die Knochenheilung

Wie oben unter 1.2.3 „enchondrale und intramembranöse Frakturheilung“ bereits beschrieben, spielen biologische Wachstumsfaktoren in der Knochenregeneration nach einer Fraktur eine entscheidende Rolle. Gliedert man die Wachstumsfaktoren in drei Gruppen, so lassen sich am ehesten die angiogenetischen Wachstumsfaktoren, die osteoblastären Wachstumsfaktoren und die osteoklastären Wachstumsfaktoren unterscheiden. Die angiogenetischen Wachstumsfaktoren spielen in der Revaskularisierung des Knochens und der Versorgung mit Mineralien und Baustoffen die wichtigste Rolle. Osteoblastär aktive Wachstumsfaktoren sind an der ersten Stabilisierung des Frakturareals beteiligt, während osteoklastäre Wachstumsfaktoren im späteren Heilungsverlauf für die abschließende Remodellierung des Knochens zuständig sind.

1.2.6.1 Angiogenetische Wachstumsfaktoren

1.2.6.1.1 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) gehört zu einer Familie von Signalmolekülen, welche eine wichtige Rolle in der Vaskulogenese und Angiogenese spielen. Aufgrund der herausragenden Bedeutung in der Stimulation von Blutgefäßen wurden große Erwartungen an die Verwendung hinsichtlich kardioprotektiver Ereignisse gerichtet. Diese haben sich in kontrollierten randomisierten Studien bisher nicht erfüllen lassen [39, 40]. Präklinische Studien zeigen jedoch, dass VEGF-A, ein vor allem für die vaskuläre Homöostase wichtiges Molekül [39], in Störungen der Endothelfunktionen eine

wichtige Rolle spielt. Ebenso wird VEGF ein großer Anteil an der Angiogenese nach einer Fraktur zugeschrieben [41]. Die Einsprossung der Gefäße ist ein wichtiger Prozess während der Frakturheilung. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass es bei einer Blockade der VEGF-Rezeptoren zu einer Unterbrechung im Heilungsprozess kommt [42]. Wird VEGF überexprimiert, wird der Heilungsprozess jedoch sogar gefördert [41, 43].

Zusätzlich zu ihrer wichtigen Rolle in kardiovaskulären Ereignissen wird der VEGF-Familie auch ein großer Anteil an der Tumorgenese zugeschrieben [44]. Sie ermöglichen die bestmögliche Versorgung von Tumorzellen mit Blut, in dem die Tumorzellen VEGFs überexprimieren [39]. In Mausstudien zeigte sich zudem die Wichtigkeit des VEGF-A, indem nachgewiesen werden konnte, dass bei dem Verlust eines VEGF-A Allels, Embryonen am elften oder zwölften Tag der Entwicklung versterben, da es zu keiner funktionierenden Vaskularisierung kommt [45].

1.2.6.1.2 VEGFR-1 und -2

VEGFR-1 und -2 sind Rezeptoren für oben beschriebenes VEGF – A bzw AA. Es sind bisher drei verschiedene Rezeptoren bekannt, jedoch bindet VEGF – A nur an VEGFR-1 und -2 [45] wie in Abbildung 6 dargestellt, weshalb diese zwei für die hier vorliegende Arbeit verwendet wurden. Die Rezeptoren sind Tyrosin-Kinasen und werden durch extrazelluläre Bindung eines Liganden aktiviert. Dies führt zu einer Homo- oder Heterodimerisierung des Rezeptors und einer Phosphorylierung des Rezeptors [45]. VEGFR-1 reguliert die Bildung von hämatopoetischen Stammzellen und die Migrationen von Monozyten und Makrophagen. VEGFR-2 reguliert wichtige Signalwege für Endothelfunktionen wie Proliferation, Migration und vermehrte oder verminderte Permeabilität [46].

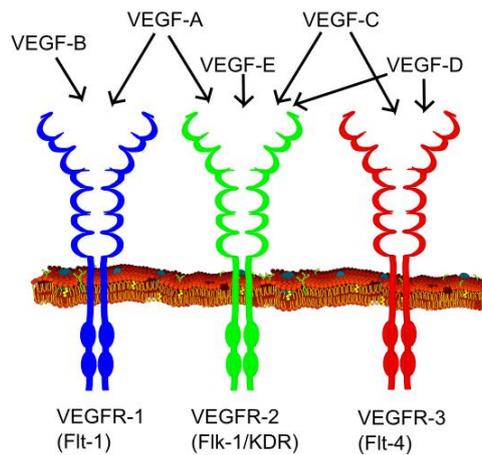


Abbildung 6: VEGF Rezeptoren und ihre Liganden. Quelle:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c8/VEGF_receptors.png. Abgerufen am 02.03.2020

1.2.6.2 Osteoblastäre Wachstumsfaktoren

1.2.6.2.1 Bone morphogenetic proteins (BMP)

Bone morphogenetic proteins, kurz BMPs, wurden 1965 von Marshall Urist entdeckt [47] und gehören zur Familie der TGF- β – Moleküle (transforming growth factor- β). BMPs spielen, wie in vielen Studien bereits erforscht wurde, als Wachstumsfaktoren in embryonalen und adulten humanen und murinen Organismen eine Rolle [48-50]. In Studien mit knock-out Mäusen und Menschen, die diese Gene nicht exprimieren, konnte gezeigt werden, dass nur BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 und BMP-9 in der Entwicklung von Knochen und Knorpel einen deutlichen Effekt zeigen [47]. Bestimmte Faktoren der BMP-Familie, wie BMP-2 und BMP-7, wurden bereits klinisch eingesetzt, um Knochendefekte, Pseudarthrosen und Osteoporose zu therapieren [51, 52]. rh BMP-2 zeigte jedoch eine breitere klinische Einsetzbarkeit als rhBMP-7, da rhBMP-2 das Knochenwachstum erheblich stärker stimuliert als alle anderen bisher getesteten rhBMPs. In der Klinik wurde rhBMP-2 sehr gut angenommen und in vielen Wirbelsäulen- Operationen eingesetzt, meist als off-label-use, da somit auf die Entnahme von Knochenmark aus dem Hüftknochen verzichtet werden konnte [47]. Von der FDA wurde rhBMP-2 nur zur Benutzung bei anterioren Lendenwirbelkörperversteifungen mit Benutzung eines Titaniumgestells zugelassen [47, 53]. Beinahe 85 % der Eingriffe mit Benutzung von rhBMP-2 waren jedoch zervikale Wirbelkörperversteifungen oder posteriore

Lendenwirbelkörperversteifungen [47]. Somit erhoffte man sich die Komplikationsrate, vor allem Probleme an der Entnahmestelle des Knochenmarkes, zu reduzieren. Neuere Ergebnisse haben jedoch gezeigt, dass die Komplikationsraten bei rhBMP-2-Nutzung erheblich sind und die Folgen nur schwer vorherzusagen, wenn rhBMP-2 off-label benutzt wird [54]. Es konnte auch nicht gezeigt werden, dass rhBMP-2 der iliakalen Spongiosaentnahme (ICBG- iliac crest bone graft) überlegen ist. In den Kontrollgruppen mit ICBG kam es weder zu einer erhöhten Anzahl von Eingriffen, noch zu einer höheren Komplikationsrate aufgrund der Spongiosaentnahme, als wenn rhBMP-2 zur anterioren Lendenwirbelkörperversteifung benutzt wurde. Da der Blutverlust bei einer Spongiosaentnahme jedoch wesentlich höher sein kann und es mitunter auch zu Schmerzen an der Entnahmestelle kommen kann, muss die Erfahrung des Chirurgen genutzt werden, um zu entscheiden, welches Verfahren für den jeweiligen Patienten besser geeignet ist [47].

BMP-2 spielt weiterhin eine große Rolle in der Expression von Osteocalcin [55] und ist wichtig um die Knochenbildung zu induzieren [56]. Dazu stimuliert BMP-2 den Wnt/ β -catenin-Signalweg und induziert somit die osteoblastäre Differenzierung [57].

BMP-7 war als zweites Mitglied der BMP-Familie für die klinische Verwendung zugelassen. Auf kollagen Trägern aufgebracht, zeigt BMP-7 eine Aktivierung der Knochenbildung durch die Aktivierung verschiedener Wachstumsfaktoren der Osteogenese [58] und Reparatur von Knochendefekten in vielen verschiedenen Tierarten. In den entsprechenden Tierstudien zeigte sich ebenfalls eine gute Sicherheit für die Anwendung von BMP-7 [59]. Aktuell wird es auf Grund unzureichend bewiesener Wirksamkeit nur sehr zurückhaltend in der Klinik genutzt [60].

BMP-9 ist ein starker Aktivator der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu osteoblastären Zellen, sowohl in vitro als auch in vivo [61].

Es hat sich gezeigt, dass der individuelle Nutzen der rhBMP Anwendung stark mit dem individuellen Genexpressionsprofil zusammenhängt [62].

1.2.6.2.2 Smad4

Smad-Proteine leiten extrazelluläre Signale aus dem TGF- β -Signalweg in den Zellkern weiter um dort die Transkription bestimmter Gene aktivieren [63].

Der Verlust von Smad4 führt zu Wachstumsstörungen und einer erhöhten Zahl von Spontanfrakturen [64]. Fehlt Zellen Smad4, konnte nachgewiesen werden, dass der Matrix-Mineralisierungseffekt des Wnt-Signalweges ohne Wirkung bleibt [64]. Deshalb wird angenommen, dass Smad4 einen wesentlichen Anteil an der Wirkung und Integrität des β -catenin und Wnt-Signalweges hat [65]. In weiteren Signalwegen, die die Knochenmasse und -dichte beeinflussen, wird Smad4 eine Funktion zugeschrieben [64]. Smad7 interagiert mit BAMBI in der Inhibition des TGF- β -Signalwegs [66, 67].

1.2.6.2.3 Transforming growth factor beta 1 (TGF- β -1)

TGF- β steht für Transforming growth factor beta. Dieses gehört als Zytokin zur Superfamilie der Transforming growth Faktoren. In dieser unterscheidet man zwei Hauptgruppen, die TGF- α - sowie die TGF- β - Superfamilie. Die TGF- α Familie wurde bisher hauptsächlich in Tumorzellen und anderen veränderten Zellarten nachgewiesen [68]. Die TGF- β - Superfamilie spielt eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung, Zelladhäsion und Wundheilung. Bisher sind drei Isoformen bekannt, TGF- β 1 bis TGF- β 3 [69]. Außerdem spielt TGF- β eine wichtige Rolle in der Genexpression von osteoblastären Genen. Dazu bindet TGF- β zuerst an Rezeptoren vom Typ 1 (R-I) und Typ 2 (R-II), um dann Smad 2/3 zur Komplexbildung mit Smad4 zu aktivieren. Der aktivierte Komplex gelangt in den Nucleus und interagiert dort mit anderen Transkriptionsfaktoren, um die Genexpression zu induzieren [65].

1.2.6.2.4 Sost

Sost ist ein Gen, das für das Protein Sclerostin kodiert. Sclerostin, so wurde in neueren Studien nachgewiesen, bindet an den Rezeptor LRP5/6 und inhibiert mit diesem gemeinsam den Wnt-/ β -catenin-Signalweg [70]. Über den Wnt-Signalweg nimmt Sclerostin indirekt Wirkung auf die Knochenmineralisierung und beeinflusst diese, die genauen Wirkmechanismen dabei sind bisher nicht geklärt [71]. Sclerostin wird hauptsächlich von Osteozyten exprimiert [70]. In etlichen

Veröffentlichungen konnte bereits gezeigt werden, dass die quantitative Messung von Sclerostin bei Osteoporose oder in onkologischen Krankheiten den Rückschluss auf den Krankheitsverlauf erlaubt [72-74].

1.2.6.2.5 Osteocalcin

Osteocalcin ist ein Peptidhormon, das der extrazellulären Matrix des Knochens angehört. Es wird ebenfalls bone γ -carboxyglutamic acid-containing protein (BGLAP) genannt. Hauptsächlich wird Osteocalcin von Osteoblasten gebildet. Zusammen mit Osteopontin spielt Osteocalcin eine wichtige Rolle in biologischen und mechanischen Knochenfunktionen [75]. Außerdem sind sie an der Knochenmasse und der Knochenmineralisierung beteiligt. Die γ -Carboxyglutamid Säurereste von Osteocalcin sind wichtig für die Calcium- und Hydroxylapatit-Bindung und sorgen somit für das Vorhandensein von Osteocalcin in der mineralisierten extrazellulären Matrix [75, 76].

1.2.6.3 Osteoklastäre Wachstumsfaktoren

1.2.6.3.1 BMP und activin membrane-bound inhibitor (BAMBI)

BAMBI, kurz für „BMP und activin membrane-bound inhibitor“, ähnelt den extrazellulären Rezeptoren der TGF- β Familie. Es ist 260 Basenpaare lang und gehört zu den transmembranären Glykoproteinen [77]. Die nachgewiesene, kleine, intrazelluläre Komponente kann den Wnt-Signalweg aktivieren. Bisher ist bekannt, dass BAMBI die Signalaktivität von TGF- β , Activin und BMP negativ reguliert [67]. Neue Studien haben eine aktivierende Funktion mit Wnt ebenfalls nachgewiesen [67]. Somit wirkt BAMBI in der Zellstimulation als Positivregulator des Wnt/ β -catenin-Wegs. Der Wnt/ β -catenin-Signalweg ist in einigen Krebserkrankungen vermehrt aktiviert, sowie in der embryologischen und adulten Homöostase beteiligt [77]

BAMBI konnte bisher ebenfalls als Inhibitor der TGF- β , BMP und Activin-Signalwege nachgewiesen werden [67].

1.2.6.3.2 Noggin

Noggin, welches vom Gen NOG kodiert wird, ist ein Glykoprotein, von dem bekannt ist, dass es an der Regulation der bone morphogenic proteins beteiligt ist [78]. Das Noggin-Dimer lagert sich um das BMP und bedeckt die Oberfläche

des Wachstumsfaktors, so dass die Bindung mit den BMP-Rezeptoren verhindert wird [78]. Noggin zeigt Varianzen in der Bindeeffizienz an verschiedene BMPs, BMP-2, -4, -5, -7, -13 und -14 werden in ihrer Funktion inhibiert, während Noggin an BMP-3, -6, -9, -10 und -15 zwar bindet, die Signaltransduktion jedoch nicht beeinflusst [79]. Noggin spielt in der frühen embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle, ist jedoch auch im adulten Organismus aktiv. In der embryonalen Entwicklung ist Noggin an der Entwicklung des Ectoderms beteiligt, indem es mit BMP-4 interagiert und so die Zahnentwicklung und die Entwicklung der Neuralleiste beeinflusst [80]. Bei der Chondrogenese und der Osteogenese aus dem Mesoderm ist Noggin ebenfalls beteiligt. An Knock-out Mäusen ließ sich nachweisen, dass eine Überexpression von Noggin eine Abnahme der Knochendichte zur Folge hatte und die Knochenform beeinflusste [80]. An heterozygoten Missense-Mutationsträgern für NOG konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Expression Effekte auf die Gelenkbildung hat. Eine Überexpression führt zu Knochendeformitäten [78].

Zielsetzung dieser Arbeit:

Pseudarthrosen stellen für die betroffenen Patienten ein einschneidendes und belastendes Erlebnis dar, sowie für die Gesellschaft einen erheblichen sozioökonomischen Aufwand [2]. Unterschieden werden die Pseudarthrosen bisher meistens in atroph, hypertroph und oligotroph. Da die Therapieentscheidungen bei Pseudarthrosen bisher meistens individuell gefällt werden und meistens aus Pseudarthrosenresektion, Debridement und autologer Spongiosaplastik [17], sowie mechanischer Stabilisierung bestehen, liegt der Gedanke nahe, dass es einer einheitlichen Therapieempfehlung bedarf. Bisher bietet dies alleine der NUSS-Score, der außer der Frakturart auch weitere Risikofaktoren der Patienten berücksichtigt [3]. Bisher wurde der NUSS-Score bereits von Abumunaser *et al.* [4], Calori *et al.* [5] und van Basten Batenburg *et al.* [6] validiert und auf seine Reliabilität geprüft. Diese Arbeit soll eine Validierung des NUSS-Scores an einem deutlich größeren Patientengut darstellen, sowie die alltägliche Nutzung zeigen und vereinfachen.

Außerdem soll, da bisher die molekularen Mechanismen unklar sind, diese Arbeit angiogenetische, osteoblastäre und osteoklastäre Wachstumsfaktoren in ihrer Expression, hinsichtlich Unterschieden zwischen pseudarthrotischem und gesundem Knochen untersuchen und darstellen. Dies soll helfen, möglicherweise in Zukunft die Prädisposition einzelner Patienten für Pseudarthrosen vorherzusagen und möglicherweise irgendwann zu beeinflussen.

Somit verfolgt diese Arbeit zwei übergeordnete Ziele:

1. Validierung des NUSS Score und der ladder strategy von Calori *et al.* [5] anhand einer eigenen retrospektiven Datenanalyse von Patienten mit Pseudarthrose der unteren Extremität (Tibia, Fibula und Sprunggelenk)
2. Etablierung der RNA Analyse aus humanem Knochenmaterial mit Genexpressionsanalyse spezifischer Wachstumsfaktoren aus humanen Knochenproben aus pseudarthrotischem Gewebe und gesundem Kontrollknochen (Beckenkammspongiosa und Osteotomien).

2. Material und Methoden

Die Arbeit ist in zwei Teil- Projekte untergliedert und beschäftigt sich darin mit unterschiedlichen Aspekten der Pseudarthrosen. Im retrospektiven Teil der Arbeit wurden Patienten mit bereits bestehenden und diagnostizierten Pseudarthrosen einzeln aufgelistet und unter Berücksichtigung vieler einzelner klinischer Variablen Risikofaktoren analysiert.

Im prospektiven Teil wurden Knochenproben von Patienten mit bekannter Pseudarthrose, zusammen mit gesundem Knochen derselben Patienten und mit gesundem Knochen von freiwilligen Spendern laborchemisch untersucht und auf verschiedene biologische Wachstumsfaktoren untersucht.

2.1 Retrospektives Patientenkollektiv

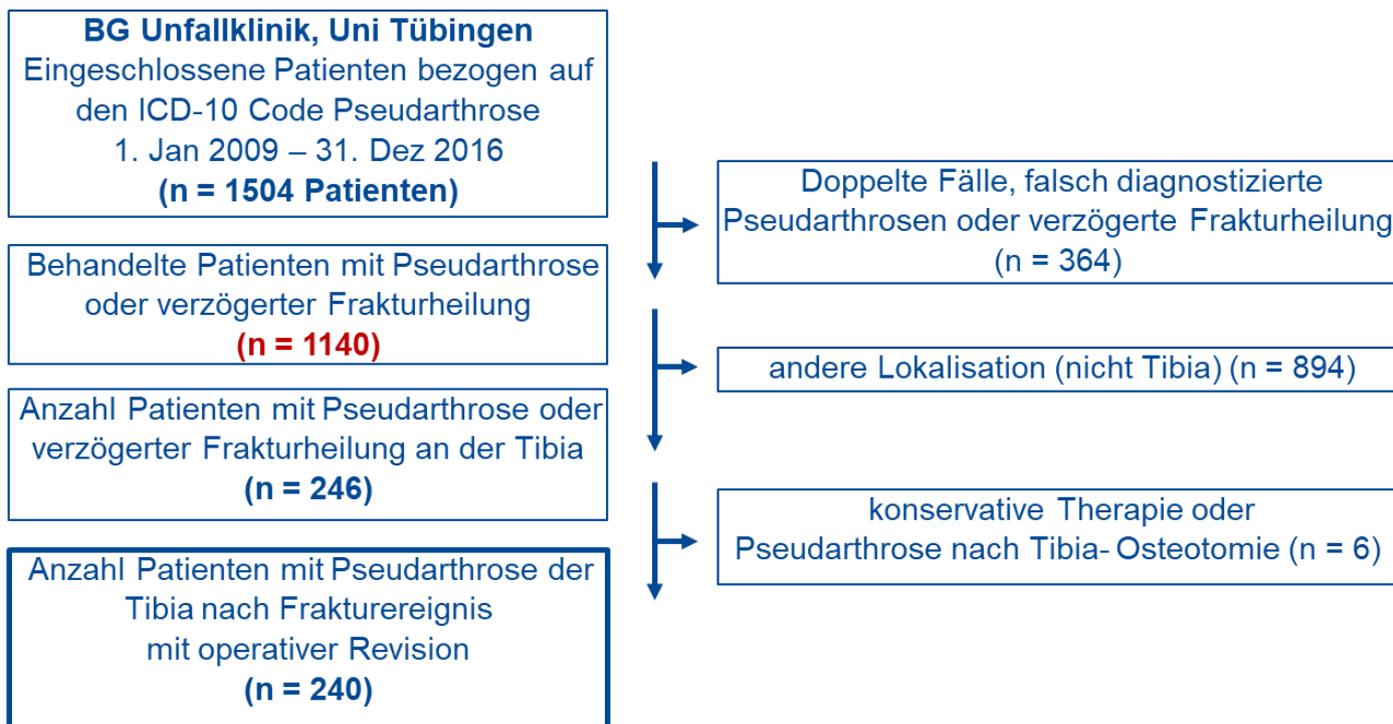


Abbildung 7: Generierung des retrospektiven Patientenkollektives

Wie im Flowchart der Abbildung 7 zu sehen ist, wurde eine Datenabfrage nach ICD Code für die Jahre 2009 bis 2016 durchgeführt. Hierbei wurden alle Patienten erfasst, die eine im ICD-10 codierte Pseudarthrose aufwiesen. Anschließend wurden doppelte oder falsch codierte Fälle herausgenommen. Die so verbliebenen 1140 Patienten wurden in einer Gesamt-Datenbank angelegt.

Diese Arbeit beschäftigt sich führend mit den Pseudarthrosen des Unterschenkels (der Tibia und Fibula), was nach detaillierter Analyse der Datenbank ein Patientenkollektiv von 246 Patienten ergab, von denen 240 Patienten mindestens eine operative Revision erhielten.

Der für die Arbeit gestellte Ethikantrag erhielt die Nummer: 540/2016/BO2.

2.1.1 Retrospektive klinische Datenanalyse

Die 1140 Patienten wurden in einer Exceltabelle hinsichtlich Alter, Geschlecht, Unfallhergang, Verletzung nach AO-Klassifikation, initialer operativer Versorgung, Revisionseingriffen, Ausheilung und Amputationsereignissen erfasst (siehe Tabelle 3). Ebenso wurden Begleiterkrankungen aufgenommen wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, koronare Herzkrankheiten und Asthma bronchiale. Auch wenn der Patient in der Vorgeschichte bereits wegen einer Pseudarthrose behandelt wurde, wurde dies dokumentiert. Ebenso wurden auch das Rauchverhalten und der BMI aufgeführt. Von den Patienten eingenommene Medikamente, zum Beispiel Statine, Antihypertensiva, Diuretika und Gerinnungsmedikamente, wurden zusätzlich hinterlegt. Ebenfalls wurden Laborwerte erfasst wie Erythrozytenzahl, Hämoglobinwert, Quick, INR, alkalische Phosphatase und CRP. Alle Informationen wurden, soweit in der Patientenakte auffindbar, aus Operationsberichten oder Arztbriefen früherer Behandlungen oder Klinikaufenthalte übernommen. Da sich dies teilweise jedoch als sehr schwierig gestaltete und oftmals die Dokumentation lückenhaft war, ließen sich einige Werte nicht immer ermitteln.

Wenn die AO-Klassifikation der Fraktur nicht im Arztbrief vorhanden war oder um die Pseudarthrosenart zu bestimmen, wurden die Röntgenbilder und/oder CT-Bilder mit Dr. Marie Reumann zusammen gesichtet und entsprechend befundet, waren die radiologischen Befunde vorhanden wurden diese übernommen.

Alter Mittelwert (SD)
Geschlecht männlich n (%) weiblich n (%)
Körpergröße Mittelwert (SD)
Körpergewicht Mittelwert (SD)
BMI Mittelwert (SD)
Anzahl Knochen-OPs Primärversorgung 0 n (%) 1 n (%) 2 n (%) >=3 n (%)
Initiale Fraktur im Rahmen eines Polytrauma Ja n (%) Nein n (%)
Schädel-Hirn-Trauma Ja n (%) Nein n (%)
Gustillon-Klassifikation 0 1 2 3
Weichteil-OPs median p25-75
Weichteil-OP = 0 n (%)
Art der Pseudarthrose atroph n (%) hypertroph n (%) oligotroph n (%)

Art der Versorgung bei der ersten Pseudarthrosen-OP Plattenosteosynthese n (%) Fixateur externe n (%) Dekortikation n (%) Metallentfernung (%) Intramedullärer Nagel n (%) Additive Plattenosteosynthese n (%) Dynamisierung n (%) Isolierte Schraubenosteosynthese n (%) Konservativ n (%) Spacereinsatz n (%) Zuggurtung n (%)
Septischer Verlauf Ja n (%) Nein n (%)
Spongiosaerhalt Eigene Spongiosa von anderem Entnahmeort n (%) nein n (%) lokale Spongiosa n (%) Fremdspongiosa n (%)
Spong Ort keine erhalten n (%) Beckenkamm n (%) Tibia n (%) Femur n (%)
NUSS score Mittelwert (SD)
ASA-Score 1 n (%) 2 n (%) 3 n (%) 4 n (%)
Rauchen Ja n (%) Nein n (%)

Heparin Ja n (%) Nein n (%)
Marcumar Ja n (%) Nein n (%)
Faktor X Inhibitor Ja n (%) Nein n (%)
ASS Ja n (%) Nein n (%)
Thrombozytenaggregationshemmer Ja n (%) Nein n (%)
Blutdruck Medikamente Ja n (%) Nein n (%)
Steroide Ja n (%) Nein n (%)
Diuretika Ja n (%) Nein n (%)
Osteoporose Medikamente Ja n (%) Nein n (%)
Bekannte PSA in der Vergangenheit Ja n (%) Nein n (%)
Kardiovaskuläre Erkrankungen Ja n (%) Nein n (%)
Diabetes Mellitus Ja n (%)

Nein n (%)
Rheumaerkrankung Ja n (%) Nein n (%)
Psychische Erkrankung Ja n (%) Nein n (%)
Neurologische Erkrankung Ja n (%) Nein n (%)
Lungenerkrankung Ja n (%) Nein n (%)
Nierenerkrankung Ja n (%) Nein n (%)
Carcinome in der Vorgeschichte Ja n (%) Nein n (%)
INR physiologisch 1 n (%) 2 n (%)
PTT physiologisch 1 n (%) 2 n (%)
Erythrozyten Mittelwert (SD)
Hb Mittelwert (SD)

Tabelle 3: Erhobene Parameter in der retrospektiven Datenanalyse

2.2 Prospektive molekularbiologische Datenanalyse

Im prospektiven Teil dieser Arbeit wurden Patienten in der BG Unfallklinik Tübingen mit bekannter Pseudarthrose und geplantem Operationstermin akquiriert und um ihre Teilnahme an der Studie gebeten. Dies wurde jeweils durch einen Arzt im Rahmen einer ausführlichen Aufklärung vorgenommen und, entsprechend den Vorgaben der lokalen Ethikkommission Tübingen, die

schriftliche Einverständniserklärung des Patienten zur Studie eingeholt. Während der Operation wurden aus dem Pseudarthroseareal das debridierte Gewebe entnommen, sowie Gewebe, das bei der Spongiosaentnahme gewonnen wurde. Wie in der retrospektiven Analyse wurden auch prospektiv alle klinischen Daten erhoben. Das intraoperativ gewonnene Gewebe wurde direkt nach Entnahme bei -80 °C tiefgefroren konserviert, für die folgende weitere molekularbiologische Aufbereitung zur RNA-Isolation und Genexpressionsanalyse.

2.3 Prospektives Patientenkollektiv

Die eingeschlossenen 35 Patienten wurden für die vorgenommenen Versuche in drei Gruppen unterteilt. Im Folgenden sind die Kriterien der einzelnen Gruppen detailliert aufgelistet.

Eine Gruppe mit sieben Patienten wurde gebildet, die initial allesamt mittels einer Arthrodesen versorgt worden waren, siehe Tabelle 4. Die Versteifung der Gelenke erfolgte in vier Fällen im unteren Sprunggelenk, in einem Fall im Lisfranc-Gelenk, in einem weiteren im Naviculargelenk und ein Patient erhielt eine Lapidus-Arthrodesen. Im Mittel waren die Patienten 56 Jahre alt, mit einer Streubreite von 46 Jahren bis 71 Jahren. Keiner der eingeschlossenen Patienten wurde im Verlauf seiner Frakturbehandlung septisch. Ebenso hatte kein Patient initial ein Polytrauma erlitten. Zwei der sieben Frakturen waren jedoch offene Frakturen. Da alle sieben Patienten atrophe Pseudarthrosen hatten, wurde alle mit Spongiosaanlagerungen versorgt.

	Arthrodesen	Lokalisation	Septisch	Polytrauma	Offene Fraktur	PSA-Art	Spongiosa
1	ja	Lisfranc	nein	nein	nein	atroph	ja
2	ja	Navicular	nein	nein	nein	atroph	ja
3	ja	Unteres SG	nein	nein	ja	atroph	ja
4	ja	Unteres SG	nein	nein	ja	atroph	ja
5	ja	Unteres SG	nein	nein	nein	atroph	ja
6	ja	Unteres SG	nein	nein	nein	atroph	ja
7	ja	Lapidus-Arthrodesen	nein	nein	nein	atroph	ja

Tabelle 4: Eigenschaften der Arthrodesen-Gruppe. SG steht für Sprunggelenk

Eine weitere große Gruppe bildeten die Patienten mit einer Pseudarthrose an langen Röhrenknochenfrakturen, siehe untenstehende Tabelle 5. Wir unterteilten diese in gelenknahe- und Schaft-Pseudarthrosen, da wir untersuchen wollten, ob sich Pseudarthrosen im gelenknahen Bereich von Pseudarthrosen im Schaftbereich unterscheiden. Dabei umfasste die Gruppe der gelenknahen Pseudarthrosen sechs Patienten; diese waren im Durchschnitt 54 Jahre und hatten ein Altersspektrum von 31 bis 75 Jahren. Nur ein Patient hatte eine offene Fraktur, jedoch erlitten vier Patienten der Gruppe ein Polytrauma. Fünf Pseudarthrosen wurden als atroph diagnostiziert, eine als oligotroph. Eine intraoperative Spongiosaanlagerung erhielten alle Patienten.

	Gelenknah	Septisch	Polytrauma	Offene Fraktur	PSA-Art	Spongiosa
1	ja	nein	ja	ja	atroph	ja
2	ja	nein	ja	nein	atroph	ja
3	ja	nein	ja	nein	atroph	ja
4	ja	nein	ja	nein	atroph	ja
5	ja	nein	nein	nein	atroph	ja
6	ja	nein	nein	nein	oligotroph	ja

Tabelle 5: Eigenschaften der gelenknahen Schaftfraktur-Gruppe

Die dritte Gruppe, siehe Tabelle 6, umfasste die Schaftpseudarthrosen der langen Röhrenknochen. In diese Gruppe konnten wir acht Patienten einschließen. Diese waren im Mittel 49,63 Jahre alt, die Streubreite lag zwischen 31 und 65 Jahren. Zwei Patienten hatten initial eine offene Fraktur erlitten, wovon eine zweitgradig und die andere erstgradig offen war. Ein Patient hatte initial eine Polytraumaverletzung erlitten, keiner ein Schädel-Hirn-Trauma. Im weiteren Verlauf wurde kein Patient septisch. Bei einem Patienten wurde eine hypertrophe Pseudarthrose diagnostiziert, bei den sieben anderen eine atrophe Pseudarthrose. Sechs Patienten bekamen eine Spongiosaanlagerung.

	Schaftfraktur	Septisch	Polytrauma	Offene Fraktur	PSA-Art	Spongiosa
1	ja	nein	ja	ja	atroph	ja
2	ja	nein	nein	ja	atroph	ja
3	ja	nein	nein	nein	atroph	ja
4	ja	nein	nein	nein	atroph	ja
5	ja	nein	nein	nein	atroph	ja
6	ja	nein	nein	nein	atroph	ja
7	ja	nein	nein	nein	atroph	nein
8	ja	nein	nein	nein	hypertroph	nein

Tabelle 6: Eigenschaften der Schaftfrakturen-Gruppe

Um eine einheitliche Probe zu bekommen mit der wir alle Wachstumsfaktoren analysieren konnten, wurden die Patientenproben je Gruppe gepoolt. Hierzu wurde jeweils die gleiche Menge RNA pro Patient für die weitere Analyse benutzt.

In den folgenden Abbildungen werden die Patientengruppen abgekürzt. GA steht für Gruppe der Pseudarthrose bedingt durch eine Arthrodesse. Wurde Knochen aus dem Areal der Pseudarthrose der Arthrodesse gewonnen, wird dies im Folgenden mit ‚GA/P‘ bezeichnet. Wurde beim gleichen Patienten Spongiosaknochen entnommen, ist die im Folgenden beschriebene Bezeichnung ‚GA/S‘.

Die Bezeichnung ‚GG‘ steht für Gruppe der gelenknahen Pseudarthrose. Bezieht sich die Beschriftung auf den Knochen, der aus dem Pseudarthroseareal gewonnen werden konnten, wird dies im Folgenden mit ‚GG/P‘ bezeichnet. Für diese Gruppe entfiel die Entnahme von Knochen aus Spongiosa.

‚GS‘ bezeichnet die Gruppe der schaftnahen Pseudarthrosen. Auch hier steht ‚GS/P‘ für die Pseudarthroseknochenprobe und ‚GS/S‘ für die Spongiosaknochenprobe dieser Gruppe.

‚CO‘ bezeichnet die Kontrollgruppe. Diese wurde aus drei Patienten gebildet, bei denen keine Pseudarthrose vorlag, Hier wurden die Patienten aufgrund einer Osteotomie operiert und gesundes Knochenmaterial konnten hier als Kontrolle gewonnen werden.

2.4 Housekeeper

Bereits in den ersten Versuchsreihen zeigte sich, dass der von uns verwendete Housekeeper, GAPDH [81], in allen Versuchen mitreguliert war und somit nicht als alleinige Referenz dienen konnte. Um einen passenden Housekeeper zu finden, testeten wir die nachfolgend genannten weiteren Housekeeper: B2M [82], RPL13a [83], RP2, EF1 α , 18s [81] und HPRT1 [82].

Ebenso testeten wir unsere verwendeten Wachstumsfaktoren auf deren Regulation. Da sich in der qPCR einige Wachstumsfaktoren, sowie alle Housekeeper, bis auf RPL13a, mitreguliert zeigten, untersuchten wir diese genauer.

Die Wachstumsfaktoren wurden mit den Programmen NormFinder [84], geNorm [81] und Δ Ct [82] untersucht und wie bei Vigano *et al.* [83] ausgewertet, siehe Abbildung 8.

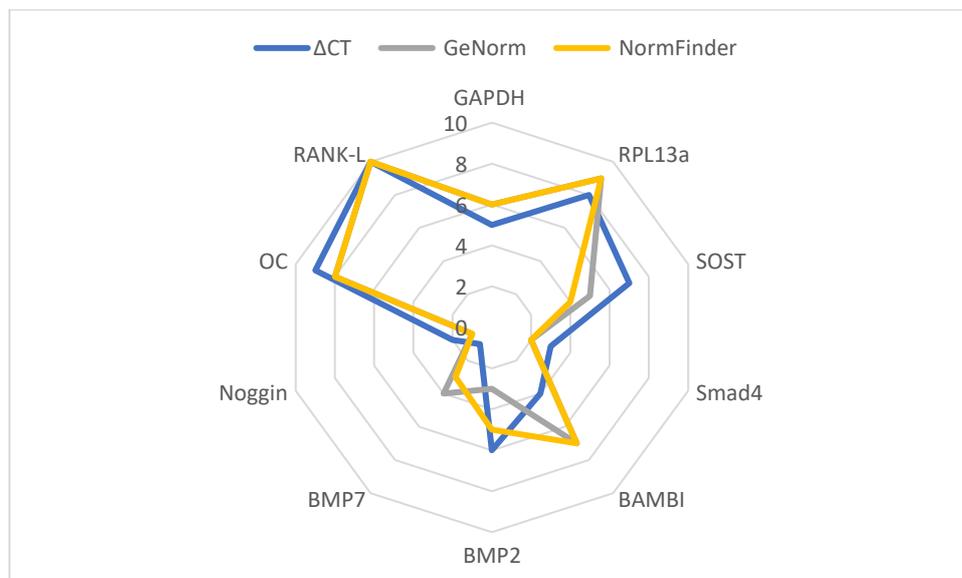


Abbildung 8: Übersicht über die Auswertungen der getesteten Wachstumsfaktoren. Angezeigt wird das Ranking; je geringer die Zahl, desto weniger reguliert ist der entsprechende Wachstumsfaktor.

Als stabilste Wachstumsfaktoren zeigten sich Noggin und Smad4, so dass wir aus diesen beiden das geometrische Mittel bildeten und damit alle Auswertungen als Housekeeper berechneten [84].

2.5 RNA-Isolation

2.5.1 Trifast-Protokoll

Sämtliches Gewebe, sowohl aus Spongiosa als auch als dem Pseudarthrosenareal, wurde nach dem gleichen Protokoll aufgearbeitet:

Das jeweilige aufzuarbeitende Gewebe wurde aus -80 °C entnommen und auf Eis für die weiteren Versuche gelagert. Primär erfolgte die Zerkleinerung der Gewebestücke, z.B. mittels Mörser. In einem mit Flüssigstickstoff geeisten Mörser wurde das Knochenstück in Flüssigstickstoff mit dem Mörser zerkleinert. Wenn nur noch Knochenstaub übrig war, wurden 1000 µl Trichlor TriFast (Peqlab, Erlangen) hinzugegeben. Mit der 1 ml Pipette wurde der flüssige Überstand in ein Eppendorfgefäß abpipettiert und dann 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Pro 500 µl TriFast wurden 100 µl Chloroform (Carl Roth, Karlsruhe) hinzugegeben, und das Gemisch wurde vorsichtig unter Kippen vermischt. Erneut wurde bei RT 5 - 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Eppendorfgefäße bei 4 °C für 10 min und 14 000 G zentrifugiert. Der flüssige, klare Überstand wurde sorgfältig abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß gegeben. Hinzugefügt wurden pro 500 µl TriFast je 250 µl Isopropanol (Apotheke Universitätsklinikum, Tübingen). Das Gemisch wurde ebenfalls vorsichtig vermischt und dann bei -20 bis -80 °C für mindestens 1 h erneut tiefgefroren, um die RNA-Ausfällung zu erhöhen.

Ab hier wurde mit dem RNeasy Micro Kit-Protokoll von Qiagen (Qiagen, Venlo) weitergearbeitet.

Nach dem Ablauf einer Stunde konnten die Proben weiterverarbeitet werden. Nachdem die Proben aus dem -80 °C Gefrierschrank geholt wurden, wurden sie 10 min auf Eis getaut, anschließend wieder in der Zentrifuge bei 14 000 G, 4 °C für 10 min zentrifugiert. Anschließend fand sich am Boden des Eppendorfs ein, manchmal auch nicht sichtbares, RNA-Pellet. Das Isopropanol wurde herunter pipettiert und anschließend wurde die Probe mit 1 ml 70 % Isopropanol gewaschen. Dazu wurde erneut zentrifugiert. Danach erfolgte erneut eine Waschung mit 70 % Isopropanol. Da sich bei den ersten Proben gezeigt hatte, dass das Ergebnis der RNA Qualität und Quantität sich durch erneutes Einfrieren

verbessert hat, wurden die Proben erneut für mindestens eine Stunde tiefgefroren und noch zweimal mit 70 % Isopropanol gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde der flüssige Überstand abpipettiert und das Eppendorfgefäß offen hingestellt, um ein Verflüchtigen des Ethanols zu ermöglichen. Dies erfolgte für eine Zeitdauer von circa 10 min. Es musste jedoch darauf geachtet werden, dass das RNA-Pellet nicht komplett austrocknet, da ansonsten die Rehydratation sehr schwierig wurde auf Grund des Eintrocknens der RNA. Die Rehydratation erfolgte mit 20 µl DEEPC-H₂O. Durch mehrmaliges Aufziehen des Volumens mit der Pipette wurde eine bestmögliche Vermischung erzielt. Um das Ergebnis der RNA-Isolation zu ermitteln wurde die quantitative Nukleinsäureanalyse verwendet. Damit wurden Reinheit und Quantität ermittelt.

2.5.2 RNA Isolation

Die Knochenstücke wurden in flüssigem Stickstoff im Mörser zerkleinert bis nur noch Knochenstaub übrig war. Dieser wurde mit 1 ml TriFast bedeckt und konnte nach anschließender Aufnahme in ein Eppendorfgefäß tiefgefroren werden. Auf diese Weise konnte die anschließende RNA-Isolation mit mehreren Proben zeitgleich durchgeführt werden.

Dazu wurden die Proben aus dem -80 °C Gefrierfach geholt und bei RT aufgetaut. Nun wurden, wie im TriFast-Protokoll, 200 µl Chloroform hinzugegeben und nach kurzem Vortexen für 5 – 10 min bei RT inkubiert.

Anschließend wurde zu 500 µl 70 % Ethanol (Apotheke Universitätsklinikum, Tübingen) der klare Überstand hinzugefügt. Ab diesem Schritt wurde nach dem RNeasy Micro Kit-Protokoll (Qiagen, Venlo) verfahren.

Da im Eppendorfgefäß mehr Inhalt war als bei einer Füllung auf die RNeasy Micro Kit Säule passte, wurde der Vorgang zweifach durchgeführt. Es wurde die Flüssigkeit auf die Säulen pipettiert und diese bei 8000 G und RT für 15 sec zentrifugiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit aus dem Auffanggefäß der Säule entfernt und erneut von der Probe oben auf die Säule gegeben. Nach erneutem Zentrifugieren und Entfernen der Flüssigkeit wurden 350 µl der Pufferlösung RWT (Qiagen, Venlo) in die Säule gegeben und bei oben genannten Bedingungen erneut zentrifugiert.

Nachdem erneut die Flüssigkeit entfernt wurde, wurden je 10 µl DNase-Lösung (Qiagen, Venlo) pro Probe mit 70 µl des Puffers RDD (Qiagen, Venlo) gemischt. Dieses Gemisch wurde direkt auf die Membran der Säule gegeben und dann bei RT 15 min inkubiert.

Im Anschluss wurden erneut 350 µl des Puffers RWT in die Säule gegeben und wieder bei 8000 G für 15 sec zentrifugiert. Das Auffanggefäß der Säule wurde gegen ein neues getauscht und in die Säule wurden 500 µl RPE (Qiagen, Venlo) Puffer gegeben. Nach erneutem Zentrifugieren bei 8000 G für 15 sec und Verwerfen der Flüssigkeit wurden in die Säule 500 µl 80 % Ethanol (Apotheke Universitätsklinikum, Tübingen) pipettiert. Die Säule wurde bei 8000 G für 2 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Flüssigkeit und das Auffanggefäß verworfen.

In einem neuen Gefäß wurde die Säule bei voller Leistung für 5 min zentrifugiert, um die Membran mit der RNA zu trocknen.

Im Anschluss wurde die RNA bei uns mit 20 µl DEPC-H₂O gelöst. Dazu wurde nach Hinzufügen des Wassers die Säule in einem neuen Auffanggefäß bei voller Leistung für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurden Quantität und Reinheit mit Hilfe der quantitativen Nukleinsäureanalyse gemessen.

Alle Pufferlösungen wurden als Konzentrat geliefert und deshalb vor der ersten Anwendung mit Ethanol, wie im Handbuch RNeasy Micro Kit von Qiagen beschrieben, gelöst.

2.6 Quantitative Nukleinsäureanalyse

Die Quantität und Reinheit der RNA wurde photometrisch mit einer LVis-Platte (BMG Labtech, Offenburg) durchgeführt. Vor der Messung wurde die Platte mit destilliertem H₂O gewaschen und mit dem anschließenden DNA dust check-Programm auf Staubpartikel oder Unreinheiten untersucht. War die Platte sauber, wurden je 2 µl der isolierten RNA entnommen und auf ein Testfeld aufgebracht. Ausgehend von dem Absorptionsquotienten von 260 nm zu 280 nm konnte auf die Quantität und Reinheit geschlossen werden.

2.7 PCR

Die PCR, polymerase chain reaction, ist eine der am häufigsten eingesetzten Techniken in der Molekularforschung. Erstmals beschrieben wurde sie 1986 von Mullis *et al.* [85]. Mit Hilfe der PCR können definierte DNA-Sequenzen exponentiell amplifiziert werden. Circa 20 - 30 Basenpaare lange, künstlich hergestellte Oligonukleotide, sogenannte Primer, binden an die komplementären Sequenzen des DNA-Abschnittes. Die Primer enthalten an ihrem 3'-Ende eine Hydroxylgruppe, welche Startbedingung für die DNA-Polymerase ist. Unabdingbar für die PCR ist das ideale Reaktionsmilieu, welches durch die entsprechende Pufferlösung gegeben ist. Außerdem werden dem Ansatz Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dTTP, dGTP und dCTP) hinzugefügt, um die Synthese des komplementären DNA-Strangs zu ermöglichen. Eine thermostabile Polymerase, die Temperaturen bis 95 °C toleriert und bei etwa 72 °C ihr Funktionsoptimum hat, ist eine notwendige Voraussetzung für eine PCR. In drei Schritten erfolgt die Vervielfältigung des definierten DNA-Abschnittes [86].

Zuerst erfolgt die Denaturierung: dabei werden bei hohen Temperaturen (bei 95 °C) die DNA-Einzelstränge auseinandergelöst. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem DNA-Doppelstrang zerfallen und die DNA liegt als Einzelstrang vor. Ist der Anteil der Basen Guanin und Cytosin im Zielprodukt sehr hoch, kann die Denaturierungszeit verlängert werden, um ein vollständiges Auseinanderlösen der Einzelstränge zu gewährleisten. Dies ist nötig, da Guanin und Cytosin in der DNA mit drei Wasserstoffbrücken binden und deshalb eine höhere Energie benötigt wird um diese zu lösen. Adenin und Thymin binden im Gegensatz dazu mit nur zwei Wasserstoffbrücken und lösen sich leichter voneinander [86].

Der zweite Schritt umfasst die Primerhybridisierung: dabei wird eine, für jedes Primerpaar spezifische, Temperatur erreicht, die den Primern das Anlagern an den gewünschten DNA-Abschnitt erlaubt. Wegweisend für die richtige Temperatur ist die Länge und Sequenz der Primer. Meist liegt die ideale Temperatur zwischen 55 und 65 °C und damit ungefähr 5 - 10 °C unter dem Schmelzpunkt der Primer.

Im dritten Schritt, der Elongation, füllt die DNA-Polymerase, ausgehend von den Primern, die leeren Stellen mit Nukleotiden auf [87]. Normalerweise liegt die Temperatur unter der die Polymerasen optimal arbeiten können zwischen 68 und 72 °C, jedoch hat jeder unterschiedliche DNA-Polymerase-Typ ein eigenes Temperaturoptimum. Die DNA-Polymerase beginnt am 3'Ende des DNA-Strangs und folgt dann dem Einzelstrang.

Die so entstehenden Einzelstränge dienen im nächsten Zyklus als Matrizen für die weitere DNA-Synthese. So ergibt sich nach einer Anzahl n der Zyklen eine exponentielle Zunahme 2^n des DNA-Abschnittes.

Die Amplifizierung endet, wenn keine Reagenzien mehr vorhanden sind, dies ist jedoch kein abrupter Stillstand, sondern entspricht einem sigmoidalen Verlauf [86].

2.8 cDNA-Synthese

Die cDNA, englisch für complementary DNA, wird durch das Enzym Reverse Transkriptase aus RNA synthetisiert [37, 88]. Kurz, das Enzym Reverse Transkriptase ist eine spezifische, RNA-abhängige DNA-Polymerase. Sie benötigt, ebenso wie andere DNA-Polymerasen, einen Primer, der an die RNA bindet. Standardmäßig wird ein Oligo-dT-Nukleotid eingesetzt, das komplementär zum Poly-A-Schwanz der RNA ist. Alternativ kann ein random hexamer-Oligonukleotid eingesetzt werden, welches aus sechs zufälligen Nukleotiden besteht. Soll ein bestimmtes Transkript isoliert werden, werden spezifische Primer eingesetzt. Als Produkt der Reversen Transkriptase liegt ein cDNA-Strang vor der mit einem RNA-Strang hybridisiert ist. Der RNA-Strang wird mittels einer RNase abgebaut und der komplementäre DNA-Strang wird durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase synthetisiert. Da die cDNA ausgehend von einer prozessierten RNA synthetisiert wurde, enthält sie keine Introns mehr [88].

Exemplarisch soll hier das Versuchsprotokoll einer cDNA-Synthese gezeigt werden:

per sample	amount in μL	mastermix	amount in μL	per tube	programme
RNA template	11,00	RNA template	individual		
Primer oligo(dT)	1,00	Primer oligo(dT)	37,80		
random hexamer primer	1,00	random hexamer primer	37,80	2,00	5 min 65°C
5x Reaction Buffer	4,00	5x Reaction Buffer	151,20		chill on ice (4°C) and ad
RNAse inhibitor	1,00	RNAse inhibitor	37,80		5 min 25°C
dNTPs (10mM)	2,00	dNTPs (10mM)	75,60		60 min 37°C
Reverse transcriptase	2,00	Reverse transcriptase	75,60	9,00	5 min 70°C
total	20 μL	total	415,80		

Abbildung 9: cDNA-Synthese, allgemeine Vorlage

2.9 q-rt PCR

Der Nachweis und die Quantifizierung des multiplizierten Abschnittes erfolgt im Anschluss an die PCR mit Hilfe von Gelelektrophoresen und Bildauswertungen.

Im Gegensatz dazu erfolgt bei der quantitative real-time PCR (q-rt PCR) eine Messung der Produktmenge in Echtzeit [89]. In der real-time quantitative PCR wird dem Reaktionsgemisch ein fluoreszierender Farbstoff beigemischt. Dieser ermöglicht die quantitative Bestimmung des DNA-Abschnittes. Als Farbstoffe können Ethidiumbromid oder SYBR Green I benutzt werden. Diese interkalieren in die doppelsträngige DNA [90].

Da der Verlauf der Messungen bildlich dargestellt wird, können Nutzer die exakte Menge des Produkts zum Anfangszeitpunkt der Messung sehr genau bestimmen. In dieser Arbeit wurde mit dem Qiagen-Kit (Qiagen, Venlo) gearbeitet: dies enthält den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, der an doppelsträngige DNA und RNA bindet. Der entstehende DNA oder RNA/SYBR Green I Komplex zeigt ein Absorptionsmaximum bei 497 nm und ein Emissionsmaximum bei 520 nm. Da SYBR Green I auch an kurzkettige DNA-Fragmente bindet, zum Beispiel an sogenannte Primerdimere, die aus unspezifischen Primerreaktionen entstehen, muss die Spezifität der Bindung überprüft werden. Dazu eignet sich die Erstellung einer Schmelzkurve. Für die Schmelzkurve wird in einem Temperaturbereich von 50°C bis 95°C die Fluoreszenz gemessen. Wird im Laufe der Temperaturzunahme der produktspezifische Schmelzpunkt erreicht, definiert durch die Nukleotidzusammensetzung und Länge des Produkts, wird der Farbstoff freigesetzt. Da während des Programms bei jedem Temperaturschritt die

Fluoreszenz photometrisch dokumentiert wird, wird die durch die Farbstofffreisetzung bedingte Abnahme registriert. Im idealen Fall weist die Schmelzkurve einen Peak auf, der den Schmelzpunkt des amplifizierten PCR-Produktes darstellt. Zeigen sich mehrere Peaks, kann auf unspezifische Primerreaktionen oder Verunreinigungen der Probe geschlossen werden [91].

Um auf den Ursprungsgehalt des amplifizierten DNA-Abschnittes rückschließen zu können, betrachtet man den Crossing Point (CP). Dieser bezeichnet die PCR-Zyklen, die benötigt werden, um eine vordefinierte Menge an PCR-Produkten zu amplifizieren. Der CP zeigt einen definierten Schwellenwert, bei dem der Anstieg der Fluoreszenz signifikant über der Hintergrundfluoreszenz liegt. Am CP findet sich in allen Reaktionsansätzen die exakt gleiche Menge an amplifizierter DNA. Verdoppelt sich die DNA mit jedem Zyklus, spricht man von einer 100% effektiven PCR [89].

2.10 Primerauflistung

Die verwendeten Primer wurden, so weit möglich, aus Literaturquellen übernommen. Dazu wurden Paper mit verschiedenen Versuchsansätzen auf Primersequenzen für qPCR-Primer durchsucht. Wurden diese gefunden, wurde das Primerpaar mithilfe der Website „PrimerBlast“ optimiert. Unser Bestreben war es, dass die Zielgene nicht mehr als 130 Basenpaare aufwiesen und möglichst auf zwei getrennten Exons lagen, so dass die Primer mit größerer Spezifität binden können.

Nachfolgend finden sich die verwendeten Primer mit Namen, Basenpaarlänge, Annealingtemperatur und die Reihenfolge der Basen für forward und reverse Primer.

Abbreviation	Amplicon	Forward Primer	length	Reverse Primer	length	Tm	Annealing
GAPDH	87	TGCACCACC AACTGCTTA GC		GGCATGGAC TGTGGTCAT GAG			59
VEGF	109	CTACCTCCA CCATGCCAA GT	20	GCAGTAGCT GCGCTGATA GA	20	59.5	58

VEGFR 1	106	TCTCACACAT CGACAAACC AATACA	25	GGTAGCAGT ACAATTGAG GACAAGA	25	60.5	55, 56°C
VEGFR 2	91	CAGGGGACA GAGGGACTT G	19	GAGGCCATC GCTGCACTC A	19	60	56°C
BMP 2	107	CACTGTGCG CAGCTTCC	17	CCTCCGTGG GGATAGAAC TT	20	58.7	54-58
BMP 7	124	GGCAGGACT GGATCATCG	18	AAGTGGACC AGCGTCTGC	18	58	56- 58°C
BMP 9	101	CGCCGCAGT ACATGATTG AC	20	GATGGCATC TTCCATGCT GA	20	59	
TGF-β- 1	84	GGACATCAA CGGGTTCAC TA	20	GCCATGAGA AGCAGGAAA G	19	56,5	51- 53°C
RANK- L	110	CCTCACACT CCTCGCCCT AT	20	GCTTGGACA CAAAGGCTG CAC	21	61	59
OC	101	ACATATCGTT GGATCACAG CACAT	24	CAAAAGGCT GAGCTTCAA GCTT	22	60,3	59
Noggin	121	TGTGCAAGC CGTCCAAGT	18	GAGCACTTG CACTCGGAA AT	20	59	58
SOST	71	ACCACCCCT TTGAGACCA AAG	21	GGTCACGTA GCGGGTGAA GT	20	61	58
BAMBI	106	TGCACGATG TTCTCTCTCC T	20	GAAGTCAGC TCCTGCACC TT	20	59	55- 56°C
Smad4	71	TGGCCCAGG ATCAGTAGG T	19	CATCAACAC CAATTCCAG CA	20	58	55,56° C

RPL13a		AAGTACCAG GCAGTGACA G	19	CCTGTTTCC GTAGCCTCA	20	58	56
18S		GGACAGGAT TGACAGATT GAT	21	AGTCTCGTT CGTTATCGG AAT	21	55,9	
HPRT1	137	CCTGGCGTC GTGATTAGT GA	19	CGAGCAAGA CGTTCAGTC CT	19		
EF1 α		CCCCGACAC AGTAGCATTT G	20	TGACTTTCCA TCCCTTGAA CC	21	58,6	56
B2M	105	AGATGAGTA TGCCTGCCG TG	19	GCGGCATCT TCAAACCTC CA	19		
RPII		GCACCACGT CCAATGACA T	19	GTGCGGCTG CTTCCATAA	18	56,3	

Tabelle 7: Liste der verwendeten biologischen Wachstumsfaktoren und ihrer Primer

2.11 Agarose-Gelelektrophorese

Um die Ergebnisse der PCR darstellen zu können, wurde die Agarose-Gelelektrophorese (Bio-Rad Laboratories, Hercules) benutzt. Mit Hilfe der Gelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente nach ihrer Länge aufspalten und darstellen. Dazu wurde ein Elektrophoresepuffer, bei uns ein TBE-Puffer, benutzt, bestehend aus 540 g TRIS (Carl Roth, Karlsruhe), 275 g Borsäure und 37,3 g EDTA in 5 l DEPC-Wasser gelöst und auf einem pH-Wert von 8,3 eingestellt. In 100 ml dieser Lösung wurden 1,8 g Agarosepulver (Peqlab, Erlangen) gelöst. Dies wurde durch kurzes Erhitzen in der Mikrowelle erreicht. Anschließend wurden 7 μ l Ethidiumbromid (Sigma Aldrich, München) hinzugefügt. Durch kurzes Schwenken wurde das Ethidiumbromid mit dem TBE-Puffer vermischt. Das noch flüssige Gel wurde in eine Gelkammer gegossen, in der je nach Bedarf ein Kamm mit 12-24 Feldern steckte. Nachdem das Gel geliert war, ergaben die Aussparungen des Kamms die Ladekammern für die DNA-

Proben. In diese Kammern wurden je 10 µl Probe mit einer Pipette geladen. In den äußersten Taschen wurden 3 – 5 µl DNA-Größenmarker geladen. Anhand dieses Größenmarkers konnte später gezeigt werden, ob die erwarteten Banden in der spezifischen Länge auftraten. An die mit ausreichend TBE-Puffer gefüllte Kammer wurde eine Spannung angelegt. Die negativ geladene DNA wanderte im Gel vom Minus-Pol zum Plus-Pol und trennte sich dabei anhand der verschiedenen Größen auf. Kleinere DNA-Fragmente wandern im elektrischen Feld schneller durch das Gel, während längere Fragmente abgebremst werden [92].

Durch das hinzugegebene Ethidiumbromid konnten die DNA-Banden später unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Das Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und verändert durch Bindung an diese sein Absorptionsspektrum, damit kommt es zur Steigerung der Fluoreszenz-Intensität. Mit der Software ImageJ wurden Bilder der Gele angefertigt und ausgewertet, indem die Intensität der Banden gemessen und miteinander verglichen wird [93, 94].

2.12 Statistische Auswertung und Programme

Die statistische Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie (Lina Maria Serna Higuera) durchgeführt. Verwendet wurden dabei folgende Tests: der T-Test für zwei unabhängige Stichproben, der Chi-Quadrat-Test, der Exakte Fisher-Test und der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test.

Der T-Test für zwei unabhängige Stichproben prüft anhand der Mittelwerte dieser beiden unabhängigen Stichproben, ob die Mittelwerte gleich oder unterschiedlich voneinander sind [95].

Der Chi-Quadrat-Test prüft, ob sich bei bestimmten Daten ein Zusammenhang erkennen lässt. Die Stichproben müssen dafür eine bestimmte Häufigkeit haben [96].

Der Exakte Fisher-Test ist unabhängig von Stichprobengrößen. Er prüft, ob Stichproben signifikant unabhängig sind in Häufigkeitstabellen [95].

Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wird dann verwendet, wenn die Daten ordinalskaliert sind. Er testet, wie wahrscheinlich es ist, bei Betrachtung zweier Gruppen, dass ein zufällig aus einer Gruppe gewählter Wert größer oder kleiner ist als der ebenfalls zufällig gewählte Wert der anderen Gruppe [96].

2.13 Materialien, Chemikalien und Verbrauchsgegenstände

Nachfolgende Tabellen zeigen eine Übersicht über alle verwendeten Chemikalien, Lösungen, Puffer und deren Konzentrationen sowie die Antikörper der ELISAs und die Primer für die Q-PCR. Ebenfalls aufgeführt sind die verwendeten Geräte, die Software und die Verbrauchsmaterialien.

Chemikalien	Hersteller
Agarose	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Bromphenolblau	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Chloroform	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Desoxycholsäure (DOC)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Essigsäure (≥ 99 %)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol (70 %, 99 %)	Apotheke Universitätsklinikum (Tübingen, Deutschland)
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich (München, Deutschland)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Folin's Reagenz	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Glycerol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
H ₂ O ₂ -Lösung (30 %)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanol	Apotheke Universitätsklinikum (Tübingen, Deutschland)
Magnesiumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Mastermix	Genaxxon (Ulm, Deutschland)
Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
peqGOLD TriFast	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Taq DNA-Polymerase	Axon (Kaierslautern, Deutschland)
TRIS-Base	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trypsin/EDTA	PAA Lab. (Pasching, Österreich)

Tabelle 8: Liste der verwendeten Chemikalien

Liste der verwendeten Lösungen und Puffer:

DEPC 1 ml DEPC 1 L ddH ₂ O 1 h Inkubation bei 37 °C, Autoklavieren und abkühlen lassen bis auf RT	H₂O	Cfinal 0,1 %
ELEKTROPHORESE-PUFFER (5x) 72 g Glycin 15 g TRIS 5 g SDS Mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen		Cfinal 1 M 125 mM 0,5 %
ESSIGSÄURELÖSUNG 1 ml Essigsäure (100 %) Mit ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen		Cfinal 1 %

Tabelle 9: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer

Materialien	Hersteller
Cellstar Falcon (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts)
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen blau (100 - 1000 µl)	Ratiolab (Dreieich, Deutschland)
Pipettenspitzen gelb (2 - 200 µl)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen weiß (0,1 - 10 µl)	Sorensen Bio Science
QuantiTect SYBR® Green RT-PCR Kit	Qiagen (Venlo, Niederlande)
RNeasy UCP Micro Kit	Qiagen (Venlo, Niederlande)
Safe-Lock Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Trypsin/EDTA	PAA Lab. (Pasching, Österreich)

Tabelle 10: Liste der verwendeten Materialien

3. Ergebnisse

3.1 Retrospektive Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der retrospektiven Datenerhebung von Patienten, die mit einer Pseudarthrose an Tibia, Fibula und Sprunggelenk der unteren Extremität an der BG Unfallklinik behandelt wurden, gezeigt. Alle Daten vergleichen ausgeheilte mit nicht ausgeheilten Patienten. Anschließend werden sämtliche Unterpunkte ausgewertet. Die absoluten und die Prozentzahlen (in Klammern) beziehen sich jeweils auf die entsprechenden Säulengruppen.

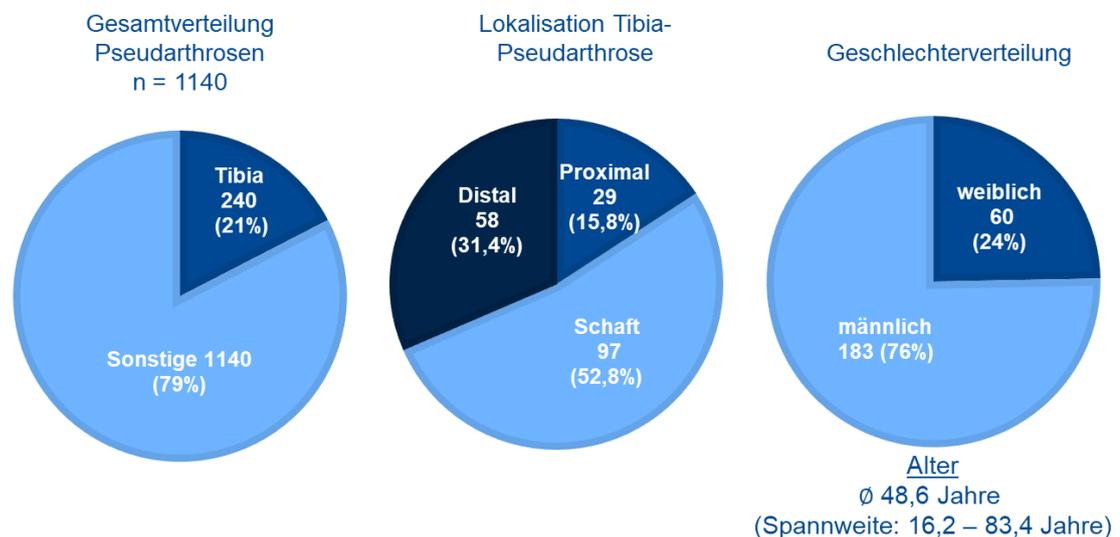


Abbildung 10: Ergebnisse der retrospektiven Datenauswertung. Veröffentlicht im Oktober 2019 auf der DKOU. Die Patienten wurden, wie oben im Abschnitt 2.1 Retrospektives Patientenkollektiv beschrieben, analysiert.

In Abbildung 10 zu sehen sind die Daten wie sie bereits auf der DKOU 2019 veröffentlicht wurden. Im ersten Tortendiagramm ist die Gesamtverteilung der Pseudarthrosen mit dem prozentualen und absoluten Anteil der Tibiapseudarthrosen zu sehen. Im zweiten Tortendiagramm ist die genau aufgeschlüsselte Lokalisation der Tibiapseudarthrosen dargestellt und im dritten Diagramm die Geschlechterverteilung bei den Pseudarthrosepatienten unserer Studie.

3.1.1 Einfluss des Geschlechts auf die Heilung

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Geschlechterverteilung zwischen ausgeheilten und nicht ausgeheilten Patienten gezeigt. Ausgeheilt ist dabei, wer bis zum Ende der Datenerhebung ausgeheilt war. Die Patienten berichten von keinerlei Problemen im Bereich der Frakturzone und radiologisch stellt sich eine komplette oder zumindest ausreichend stabile Durchbauung dar. Nicht ausgeheilt bedeutet, die Pseudarthrose ist auch nach mehreren Revisionseingriffen über Jahre hinweg nicht ausgeheilt. Hier dauert die Versorgung entweder noch an oder ist mit einer Amputation oder Gelenkversteifung (Arthrodesen) als letzte Maßnahme beendet.

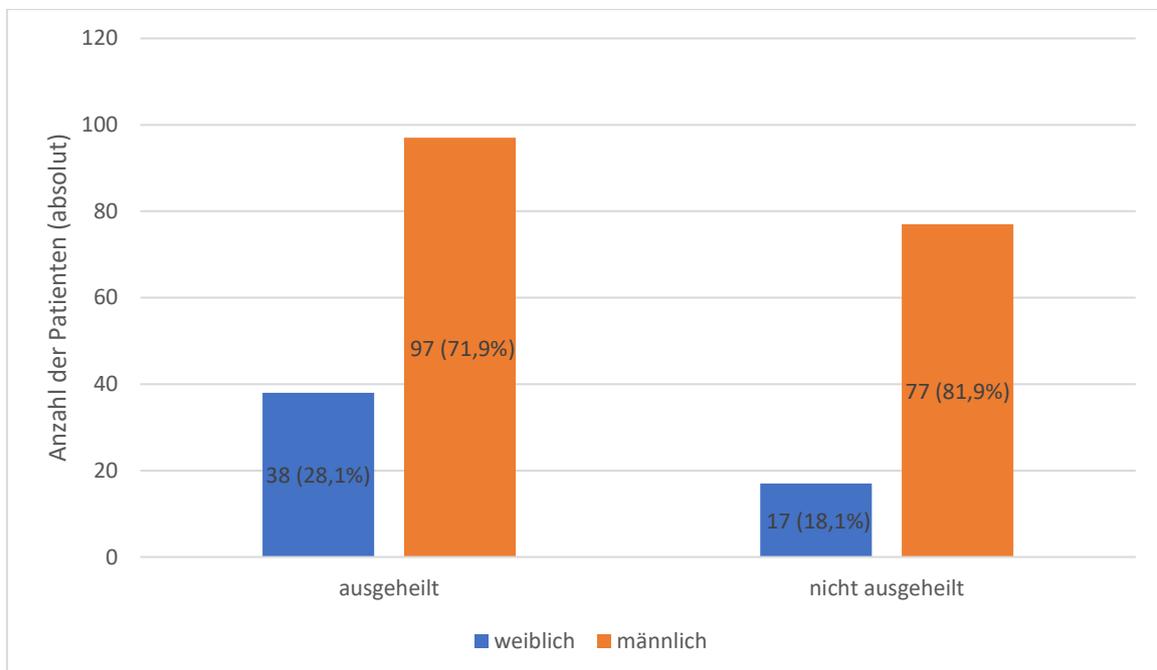


Abbildung 11: Einfluss des Geschlechts auf die Heilung

In der Darstellung der Geschlechterverteilung in Abbildung 11 bei ausgeheilten und nicht ausgeheilten Patienten sahen wir, dass 97 (71,9 %) der Patienten, deren Pseudarthrose nach dem ersten Eingriff ausheilte, männlich waren. 38 (28,1 %) der ausgeheilten Patienten waren weiblich. Bei der Gruppe der nicht ausgeheilten Patienten lag der Anteil der männlichen Patienten bei 77 (81,9 %) und der weiblichen Patienten bei 17 (18,1 %). Der Unterschied, den das Geschlecht als Einfluss auf die Ausheilung hatte, war in unserer Analyse signifikant mit $p = 0,09$.

3.1.2 Einfluss der Vor-Operationen auf die Heilung

In untenstehender Abbildung 12 sind die Voroperationen, die vor dem Pseudarthroseneingriff stattfanden, in Bezug auf die Ausheilungstendenz der Patienten gezeigt. Eingeschlossen in den Begriff ‚Voroperationen‘ sind dabei alle Eingriffe am Knochen und nicht rein weichteilbezogene Operationen wie VAC-Wechsel, die vor der ersten Pseudarthrosenoperation stattfanden.

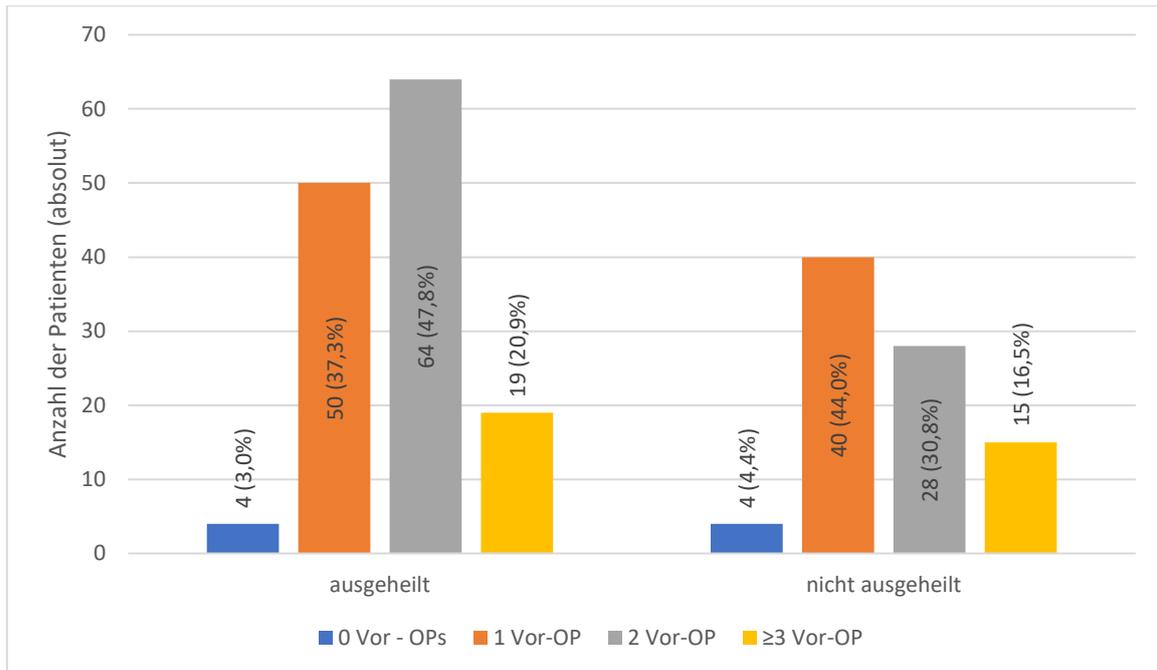


Abbildung 12: Anzahl der Vor-Operationen bezogen auf die Heilung. Auf der y-Achse abgebildet ist die Anzahl der Patienten in absoluten Zahlen.

Hier zeigt sich, dass 4 (3%) der ausgeheilten Patienten keine Voroperation, 50 (37,3 %) Patienten eine Voroperation, 64 (47,8 %) zwei und 19 (20,9 %) Patienten drei oder mehr Voroperationen hatten.

Bei den nicht ausgeheilten Patienten waren es 4 (4,4 %) ohne Voroperation, 40 (44,0 %) mit einer, 28 (30,8 %) mit zwei und 15 (16,5 %) mit drei oder mehr Voroperationen. Der Unterschied, den die Anzahl der Voroperationen auf die Ausheilung zeigte, war nicht signifikant mit $p = 0,06$. Es konnte nur gezeigt werden, dass ein Unterschied zwischen der ausgeheilten und der nicht ausgeheilten Patientengruppe bestand, dieser konnte nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Anzahl der Voroperationen gesetzt werden.

3.1.3 Einfluss der OP-Technik auf die Ausheilung

In der Abbildung 13 sieht man die operative Pseudarthrosenversorgung nach unterschiedlicher Art aufgeschlüsselt und deren Einfluss auf die Ausheilung.

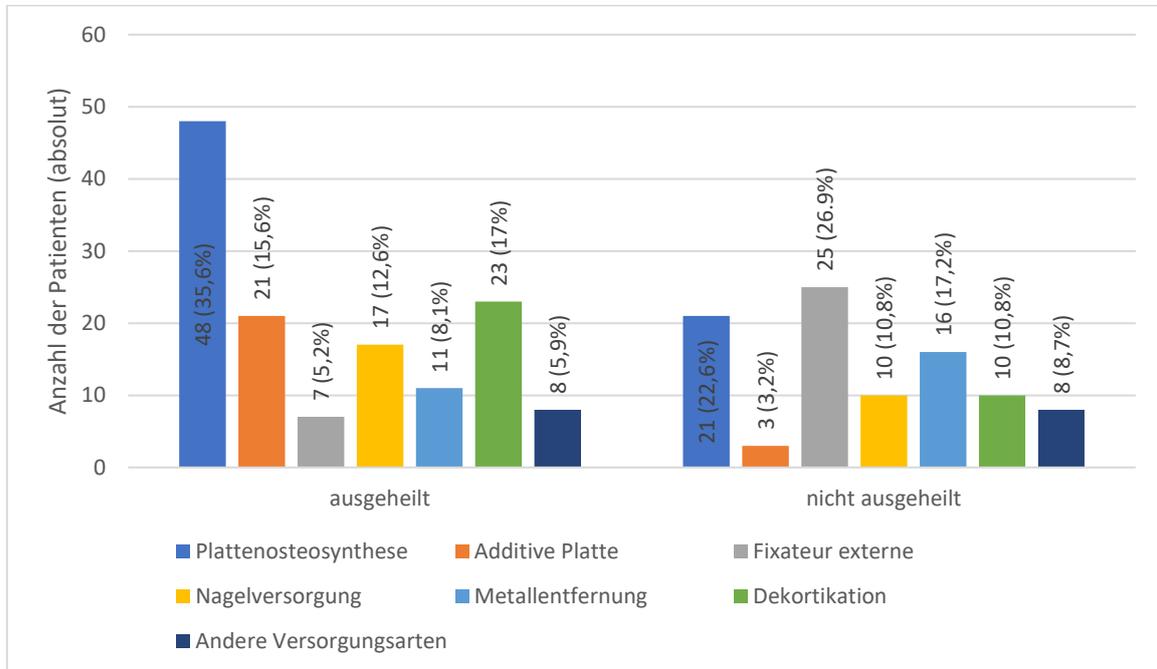


Abbildung 13: Die unterschiedlichen Pseudarthroseoperationstechniken bezogen auf die Ausheilung.

Von den ausgeheilten Patienten bekamen 48 eine Plattenosteosynthese, was 35,6 % der Patienten in dieser Gruppe entspricht. 21 (15,6 %) Patienten wurden mit additiver Platte versorgt, sieben (5,2 %) mit Fixateur externe, 17 (12,6 %) mit einem intramedullären Nagel, elf (8,1 %) mit einer Metallentfernung. 23 (17 %) Patienten erhielten eine Dekortikation und acht (5,9 %) Patienten wurden anderweitig versorgt (hier solltest du kurz Beispiele nennen. Was ist unter ‚anderen Versorgungsarten‘ zu verstehen?). Bei den nicht ausgeheilten Patienten lag die Anzahl der Plattenosteosynthesen bei 21, dies entspricht 22,6 %. Mit einer additiven Platte wurden der (3,2 %) versorgt, mit einem Fixateur externe 25 (26,9 %), einen intramedullären Nagel erhielten zehn (10,8 %), eine Metallentfernung 16 (17,2 %), eine Dekortikation zehn (10,8 %) und eine andere Versorgungsart acht (8,7 %). Verglichen wurde nun, ob es einen Unterschied zwischen der ausgeheilten und der nicht ausgeheilten Patientengruppe gab, da die einzelnen Untergruppen zu klein waren um Unterschiede zwischen verschiedenen Operationstechniken zu entdecken. Der Unterschied zwischen

den Gruppen war signifikant mit $p = <0,001$. Wir konnten sehen, dass die Operationstechnik in der Pseudarthrosenoperation einen Unterschied macht, eine Aussage darüber, welche Versorgung besser oder schlechter ist, lässt sich aber nicht treffen.

3.1.4 Einfluss eines septischen Verlaufs auf die Heilung

In Abbildung 14 sieht man die Darstellung des Einflusses eines septischen Verlaufs auf die Knochenheilung.

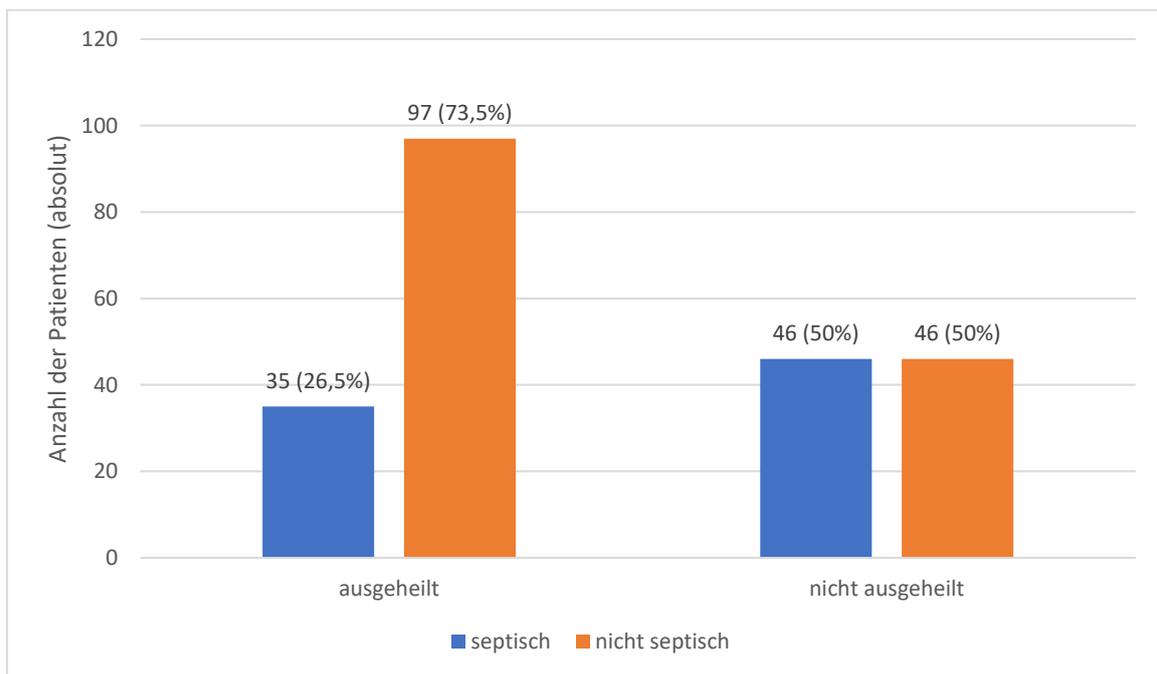


Abbildung 14: Die Verteilung zwischen septischen und nicht septischen Verläufen in den Gruppen der ausgeheilten und der nicht ausgeheilten Patienten.

Insgesamt waren 81 Patienten im Verlauf septisch, davon heilte bei 35 Patienten die Pseudarthrose aus, bei 46 nicht. Bei den nichtseptischen Patienten heilten 97 Pseudarthrosen aus, bei ebenfalls 46 heilte die versorgte Pseudarthrose nicht. Insgesamt waren bei den ausgeheilten Patienten 73,5 % Patienten infektionsfrei, 26,5 % hatten eine Infektion. Bei den nicht ausgeheilten Patienten lag der Prozentwert bei jeweils ca. 50 %.

3.1.5 Einfluss des American Society of Anesthesiologists (ASA) - Wertes auf die Heilung

Abbildung 15 zeigt den Einfluss der unterschiedlichen ASA – Werte auf die Ausheilung.

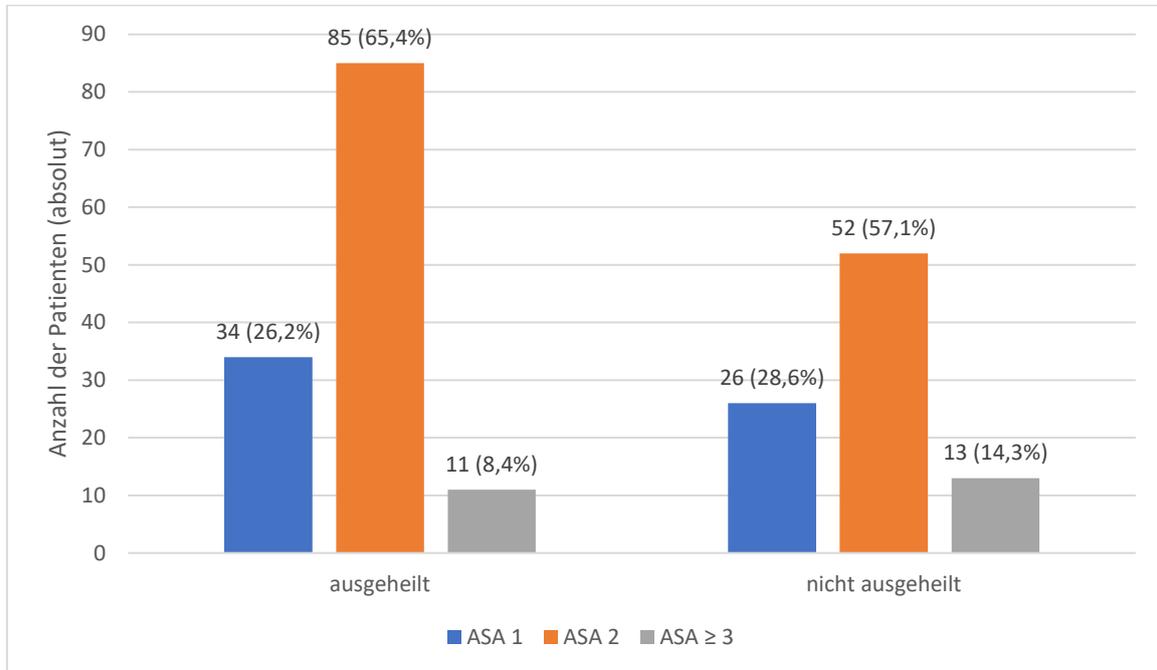


Abbildung 15: Die unterschiedliche Verteilung des ASA-Scores zwischen ausgeheilten und nicht ausgeheilten Patienten.

In der Gruppe der ausgeheilten Patienten hatten 34 (26,2 %) der Patienten einen ASA – Score 1, 85 (65,4 %) der Patienten hatten einen ASA – Score 2 und elf (8,4 %) der Patienten hatten einen Score 3 oder größer. Bei den nicht ausgeheilten Patienten war die Verteilung der ASA – Werte wie folgt; 26 (28,6 %) der Patienten hatten einen Score 1, 52 (57,1 %) hatten einen Score 2 und 13 (14,5 %) der Patienten erreichten einen Wert 3 oder größer. Verglichen wurde, ob es einen messbaren Unterschied in den beiden Gruppen bezüglich der Ausheilung gibt, dieser war nicht signifikant mit $p = 0,175$. Es ließ sich keine Aussage treffen ob der ASA-Score einen Einfluss auf die Ausheilung hat.

3.1.6 Einfluss der Invasivität der Versorgung nach NUSS auf die Heilung

Der NUSS-Score ergibt anhand der erreichten Risikowerte (Punktzahl) ein Therapieschema vor, das mit steigender Punktzahl invasiver wird. Wie bereits in Material und Methoden erklärt, wurden hier retrospektive Daten erhoben. Deshalb konnte das Therapieschema des NUSS-Scores nicht intraoperativ umgesetzt werden, so dass stattdessen die NUSS-Parameter, soweit vorhanden, analysiert wurden und in einem modifizierten NUSS-Score, dem Tübinger NUSS-Score, in ebenfalls vier Risikogruppen eingeteilt wurden. Anschließend wurde betrachtet, wie die Verteilung der Behandlungsgruppen sich in Bezug auf die Ausheilung unterschied, dies ist in Abbildung 16 zu sehen.

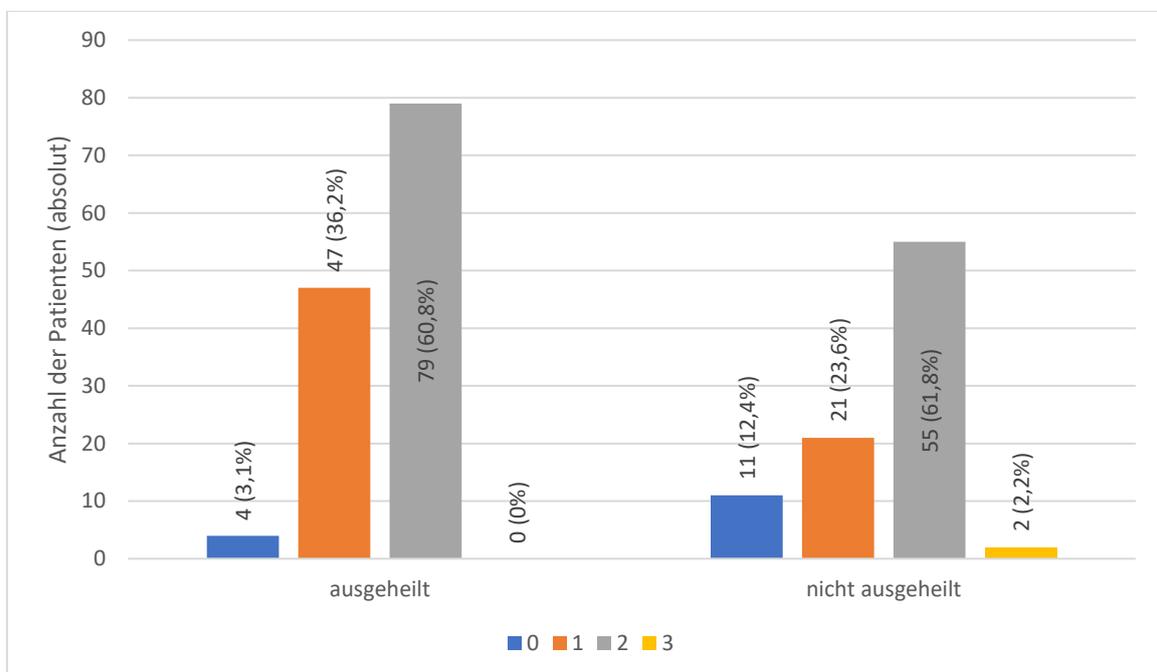


Abbildung 16: Die unterschiedliche Verteilung der Invasivität der Behandlung bezogen auf Ausheilung und Nicht-Ausheilung. Abgebildet sind die nach dem Tübinger NUSS-Score unterteilten Risikogruppen.

In der Gruppe der ausgeheilten Patienten bekamen vier (3,1 %) der Patienten das Therapieschema 1 (verbesserte mechanische Stabilität), 47 (36,2 %) der Patienten das Therapieschema 2 (verbesserte mechanische Stabilität plus einen biologischen Wachstumsanreiz), 79 (60,8 %) der Patienten das Therapieschema 3 (Knochentransport plus biologischer Wachstumsanreiz) und keiner das Therapieschema 4 (Amputation, Arthrodesse oder Prothese).

In der Gruppe der nicht ausgeheilten Patienten bekamen elf (12,4 %) Patienten das Therapieschema 1, 21 (23,6 %) der Patienten das Therapieschema 2, 55 (61,8 %) der Patienten das Therapieschema 3 und zwei (2,2 %) das Schema 4.

3.1.7 Anzahl der Weichteil-Operationen und deren Einfluss auf die Heilung

In der Abbildung 17 sieht man den Einfluss der Anzahl der Weichteiloperationen auf die Heilung. Die Weichteiloperationen wurden ab dem Unfallzeitpunkt bis zur endgültigen Ausheilung erfasst. Sie umfassen Lappenplastiken, Spalthaut und weitere Eingriffe wie Vacuumverbandversorgung.

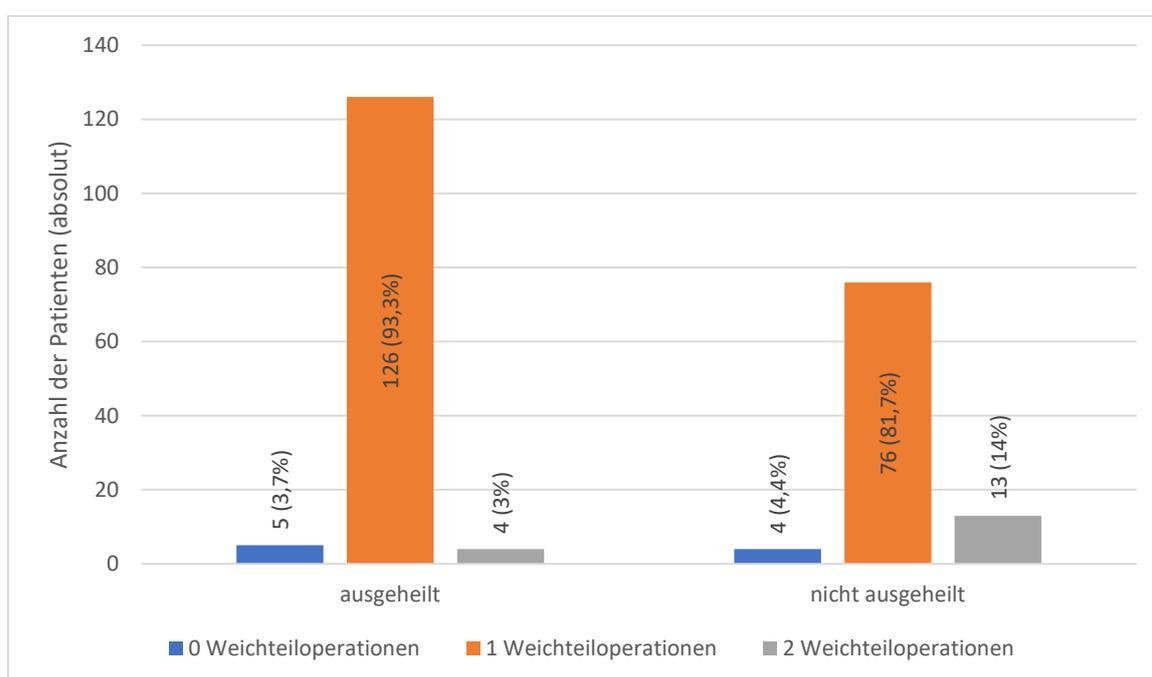


Abbildung 17: Verteilung der Anzahl der Weichteiloperationen zwischen ausgeheilten und nicht ausgeheilten Patienten.

Bei den ausgeheilten Patienten hatten fünf (3,7 %) keine Weichteiloperation vor dem Pseudarthroseeingriff, 126 (93,3 %) hatten eine Weichteiloperation und vier (3 %) hatten zwei vorangegangene Operationen. In der Gruppe der nicht ausgeheilten Patienten hatten vier (4,4 %) keinen Weichteileingriff, 76 (81,7 %) Patienten hatten eine Operation an den Weichteilen und 13 (14 %) hatten zwei Eingriffe. Verglichen wurde, ob ein Unterschied zwischen ausgeheilten und nicht ausgeheilten Patienten im Bezug auf die Anzahl der Weichteiloperationen besteht. Der Unterschied war signifikant mit $p=0,002$. So können wir sagen, dass die Gruppen der ausgeheilten und der nicht ausgeheilten Patienten sich in der

Anzahl der Weichteiloperationen signifikant unterscheiden, nicht zu sagen ist, wie viele Weichteiloperationen ausschlaggebend sind für eine Nicht-Heilung der Patienten.

3.1.8 Gesamtübersicht der erhobenen Faktoren der Datenerhebung

Die unten abgebildete Tabelle zeigt die Gesamtübersicht der erhobenen und später ausgewerteten Faktoren.

		Heilung Ja (n=135)	Heilung Nein (n=94)	P Wert
Alter Mittelwert (SD)	226	48,21 (Range 63,25)	49,50 (Range 67,25)	0,50*
Geschlecht	229			
männlich n (%)		97 (71,9 %)	77 (81,9 %)	0,09**
weiblich n (%)		38 (28,1 %)	17 (18,1 %)	
Körpergröße Mittelwert (SD)	143	1.75 (0.10)	1.74 (0.08)	0.02*
Körpergewicht Mittelwert (SD)	144	86,60 (19.10)	83,67 (19,29)	0.49*
BMI Mittelwert (SD)	143	28.38 (5,72)	27,36 (4,95)	0.26*
Anzahl Knochen-OPs	225			
Primärversorgung		4 (3.0 %)	4 (4.4 %)	0.06***
0 n (%)		50 (37.3 %)	40 (44.0 %)	
1 n (%)		64 (47.8 %)	28 (30.8 %)	
2 n (%)		19 (20.9 %)	15 (16.5 %)	
>=3 n (%)				
Initiale Fraktur im Rahmen eines Polytrauma	228			
Ja n (%)		21 (15.6 %)	13 (14.0 %)	0.85**
Nein n (%)		114 (84.4 %)	80 (86.0 %)	
Schädel-Hirn-Trauma	228			
Ja n (%)		6 (4.4 %)	4 (4.3 %)	0.99***
Nein n (%)		129 (95.6 %)	89 (95.7 %)	
Gustillon-Klassifikation	224			
0		89 (66.4 %)	60 (66.7 %)	0.53***
1		10 (7.5 %)	6 (6.7 %)	
2		20 (14.9 %)	9 (10 %)	

3		15 (11.2 %)	15 (16.7 %)	
Weichteilops median p 25-75	229	0 (0 – 0)	0 (0 – 2)	<0.01 ^{&}
Weichteilop = 0 n (%)	229	110 (81.5 %)	53 (56.4 %)	0.002**
Art der Pseudarthrose	227			
atroph n (%)		88 (65.2 %)	55 (59.8 %)	0.32**
hypertroph n (%)		33 (24.4 %)	21 (22.8 %)	
oligotroph n (%)		14 (10.4 %)	16 (17.4 %)	
1 PSA OP	228			
Plattenosteosynthese n (%)		48 (35.6 %)	21 (22.6 %)	<0.001*
Fixateur externe n (%)		7 (5.2 %)	25 (26.9 %)	*
Dekortikation n (%)		23 (17 %)	10 (10.8 %)	
Metallentfernung (%)		11 (8.1 %)	16 (17.2 %)	
Intramedullärer Nagel n (%)		17 (12.6 %)	10 (10.8 %)	
Additive Plattenosteosynthese n (%)		21 (15.6 %)	3 (3.2 %)	
Dynamisierung n (%)		3 (2.2 %)	3 (3.2 %)	
Dynamisierung n (%)		2 (1.5 %)	1 (1.1 %)	
Isolierte Schraubenosteosynthese n (%)		2 (1.5 %)	1 (1.1 %)	
Konservativ n (%)		0 (0 %)	2 (2.2 %)	
Spacereinsatz n (%)		1 (0.7 %)	0 (0 %)	
Zuggurtung n (%)				
Septischer Verlauf	224			<0,01**
Ja n (%)		35 (26,5 %)	46 (50 %)	
Nein n (%)		97 (73,5 %)	46 (50 %)	
Spongiosaerhalt	226			0,935**
Eigene Spongiosa von anderem Entnahmeort n (%)		61 (45,5 %)	41 (44,6 %)	
nein n (%)		47 (35,1 %)	35 (38,0 %)	
lokale Spongiosa n (%)		18 (13,4 %)	10 (10,9 %)	
Fremdspongiosa n (%)		8 (6 %)	6 (6,5 %)	
Spongiosa Ort	223			0,922**
		68 (50,7 %)	47 (52,8 %)	

keine erhalten n (%)		52 (38,8 %)	31 (34,8 %)	
Beckenkamm n (%)		8 (6,0 %)	6 (6,7 %)	
Tibia n (%)		6 (4,5 %)	5 (5,6 %)	
Femur n (%)				
NUSS score Mittelwert (SD)	182	30,44 (8,15)	32,85 (7,62)	0,046*
ASA-Score	221			
1 n (%)		34 (26,2 %)	26 (28,6 %)	0,175***
2 n (%)		85 (65,4 %)	52 (57,1 %)	
3 n (%)		9 (6,9 %)	13 (14,3 %)	
4 n (%)		2 (1,5 %)	0 (0 %)	
Rauchen	229			0,773**
Ja n (%)		45 (34,4 %)	29 (32,2 %)	
Nein n (%)		86 (65,6 %)	61 (67,8 %)	
Heparin	228			0,999**
Ja n (%)		85 (63 %)	59 (63,4 %)	
Nein n (%)		50 (37 %)	34 (36,6 %)	
Marcumar	229			0,651***
Ja n (%)		2 (1,5 %)	3 (3,2 %)	
Nein n (%)		133 (98,5 %)	91 (96,8 %)	
Faktor X Inhibitor	229			0,167***
Ja n (%)		0 (0 %)	2 (2,1 %)	
Nein n (%)		135 (100 %)	92 (97,9 %)	
ASS	229			0,132**
Ja n (%)		7 (5,2 %)	10 (10,6 %)	
Nein n (%)		128 (94,8 %)	84 (89,4 %)	
Thrombozytenaggregationshemmer	229			0,410***
Ja n (%)		0 (0 %)	1 (1,1 %)	
Nein n (%)		135 (100 %)	93 (98,9 %)	
Blutdruck Medikamente	229			0,066**
Ja n (%)		29 (21,5 %)	31 (33 %)	
Nein n (%)		106 (78,5 %)	63 (67 %)	
Steroide	222			0,999***
Ja n (%)		1 (0,8 %)	0 (0 %)	
Nein n (%)		131 (99,2 %)	90 (100 %)	

Diuretika	229			
Ja n (%)		12 (8,9 %)	7 (7,4 %)	0,810**
Nein n (%)		123 (91,1 %)	87 (92,6 %)	
Osteoporose Medikamente	229			
Ja n (%)		3 (2,2 %)	0 (0 %)	0,271***
Nein n (%)		132 (97,8 %)	94 (100 %)	
Bekannte PSA in der Vergangenheit	229			
Ja n (%)		4 (3 %)	5 (5,3 %)	0,493***
Nein n (%)		131 (97 %)	89 (94,7 %)	
Kardiovaskuläre Erkrankungen	229			
Ja n (%)		32 (23,7 %)	24 (25,5 %)	0,757**
Nein n (%)		103 (76,3 %)	70 (74,5 %)	
Diabetes Mellitus	229			
Ja n (%)		8 (5,9 %)	6 (6,4 %)	0,999**
Nein n (%)		127 (94,1 %)	88 (93,6 %)	
Rheumaerkrankung	229			
Ja n (%)		2 (1,5 %)	4 (4,3 %)	0,405***
Nein n (%)		133 (98,5 %)	90 (95,7 %)	
Psychische Erkrankung	229			
Ja n (%)		4 (3 %)	1 (1,1 %)	0,410***
Nein n (%)		131 (97 %)	93 (98,9 %)	
Neurologische Erkrankung	224			
Ja n (%)		2 (1,5 %)	2 (2,2 %)	0,999***
Nein n (%)		131 (98,5 %)	89 (97,8 %)	
Lungenerkrankung	224			
Ja n (%)		2 (1,5 %)	2 (2,2 %)	0,999***
Nein n (%)		131 (98,5 %)	89 (97,8 %)	
Nierenerkrankung	224			
Ja n (%)		2 (1,5 %)	3 (3,3 %)	0,651***
Nein n (%)		131 (98,5 %)	88 (96,7 %)	
Carcinome in der Vorgeschichte	224			
Ja n (%)		1 (0,8 %)	1 (1,1 %)	0,999***
Nein n (%)		132 (99,2 %)	90 (98,9 %)	
INR physiologisch	214			

1 n (%)		2 (1,6 %)	3 (3,5 %)	0,650***
2 n (%)		126 (98,4 %)	83 (96,5 %)	
PTT physiologisch	217			
1 n (%)		48 (37,2 %)	41 (46,6 %)	0,206**
2 n (%)		81 (62,8 %)	47 (53,4 %)	
Erythrozyten Mittelwert (SD)	226	4,87 (0,48)	4,80 (0,65)	0,398*
Hb Mittelwert (SD)	227	14,61 (1,54)	14,25 (1,80)	0,103*

Tabelle 11: Retrospektiv erhobene und analysierte Faktoren. In Spalte 1 steht der jeweils analysierte Parameter In der zweiten Spalte ist die Anzahl der Patienten, für die ein Wert im jeweils betrachteten Punkt vorhanden war, gelistet. In der dritten und vierten Spalte finden sich jeweils der absolute und prozentuale Wert der Patienten, die aus der Untergruppe des analysierten Wertes ‚ausgeheilt‘ oder ‚nicht ausgeheilt‘ sind. Spalte 5 zeigt den p-Wert und gibt damit die Signifikanz des Unterschiedes zwischen Heilung und keiner Heilung an. $p < 0,05$ gilt als signifikant.

*T test independent samples, ** Chi quadrate, ***Fisher Test, &Mann Whitney

In Tabelle 11 werden nacheinander alle erhobenen Parameter aufgelistet. Ausgeheilt sind insgesamt 135 Patienten zum Endpunkt der Datenerhebung, 94 sind nicht ausgeheilt. Ausgeheilt werden dabei alle Patienten genannt die grundsätzlich geheilt sind, unabhängig davon wie viele Operationen vorangegangen sind. Die dick hervorgehobenen Werte wurden bereits im vorangegangenen Text (3.1.1. bis 3.1.7) graphisch dargestellt und erläutert.

Als weiterer Wert wurden die Weichteiloperationen analysiert. 81,5 % der ausgeheilten Patienten und 56,4 % der nicht ausgeheilten Patienten erhielten keine Weichteiloperation. Mit $p=0,002$ war dieser Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen signifikant, so dass die Anzahl der Weichteiloperationen einen Unterschied zwischen Heilung und keiner Heilung ausmacht

3.1.9 Tübinger NUSS-Score vs. Tübinger Procedere

Da die erhobenen Daten retrospektiv ausgewertet wurden, konnte der NUSS-Score nicht zur Therapieplanung herangezogen werden, so dass die Operationsstrategie nicht davon beeinflusst wurde. Außerdem wurden nicht alle Parameter des NUSS-Scores bei unseren Patienten erhoben und einige Parameter sind retrospektiv nicht mehr beurteilbar. Deshalb entschlossen wir uns, die für den NUSS-Score verwendeten Faktoren auf die Werte zu reduzieren, die im Alltag in der Klinik erhoben werden können, und aus dem dann noch errechenbaren Punktwert ebenfalls vier Risikogruppen zu bilden, die in ihrer Aufteilung den NUSS-Score Risikogruppen entsprechen. Im Tübinger NUSS-Score, also dem gekürzten und somit modifizierten NUSS-Score, wurden die Patienten anhand der erhaltenen Punktwerte eingeschlossen. Je nachdem, welche operative Therapie die Patienten bisher erhalten hatten und welcher NUSS-Score Risikogruppe diese Therapie entsprach, wurde daraus die Tübinger Risikogruppe (Tü-RG) gebildet.

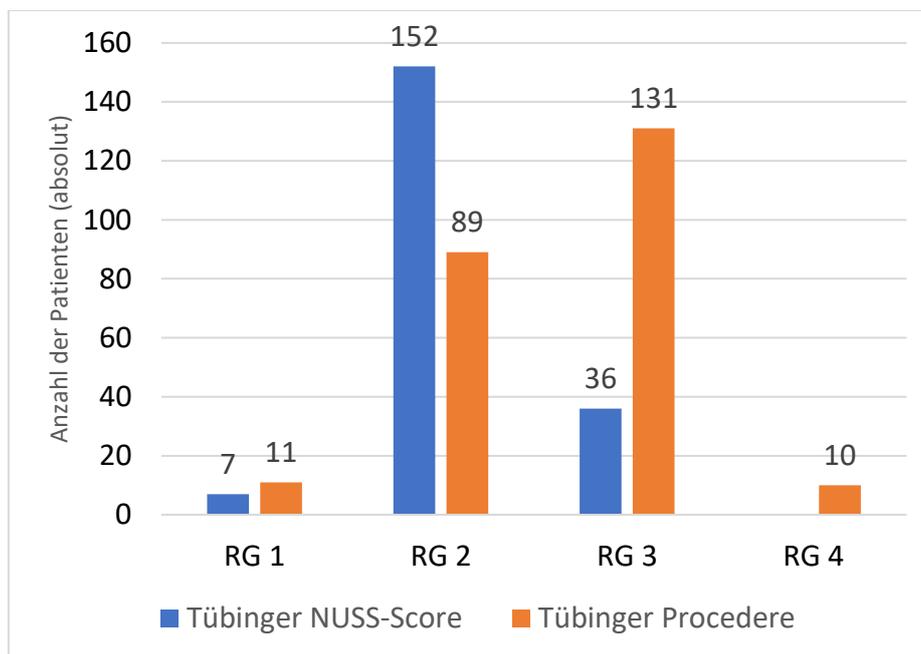


Abbildung 18: Zu sehen ist die unterschiedliche Einteilung der Patienten nach Aufnahme des Tübinger, dem modifizierten, NUSS-Scores und allein nach erfolgter operativer Therapie. Die blauen Balken entsprechen der Risikogruppenverteilung nach dem Tübinger NUSS-Score, die orangenen Balken der Risikogruppenverteilung nach dem Tübinger Procedere.

Die in Abbildung 18 dargestellte Verteilung der Risikogruppen zwischen Tübinger NUSS-Score (blau) und Tübinger Risikogruppen (orange) zeigt, dass in

Risikogruppe 1 (RG 1) 7 Patienten nach NUSS-Score eingegliedert waren; im Tübinger Procedere waren es 11 Patienten. In Risikogruppe 2 waren nach NUSS-Score 152 Patienten und nach Tübinger Procedere 89 Patienten. In Risikogruppe 3 waren nach NUSS-Score 36 Patienten und nach Tübinger Score 131 und in Risikogruppe 4 waren nach NUSS-Score keine und nach Tübinger Score 10 Patienten.

Der Mittelwert des Tübinger NUSS-Scores lag bei 2,14, der Mittelwert des Tübinger Procedere lag bei 2,58. Der Median des Tübinger NUSS-Scores war 2, der Median des Tübinger Procedere 3.

3.1.10 Risikogruppenverteilung bezogen auf die Ausheilung

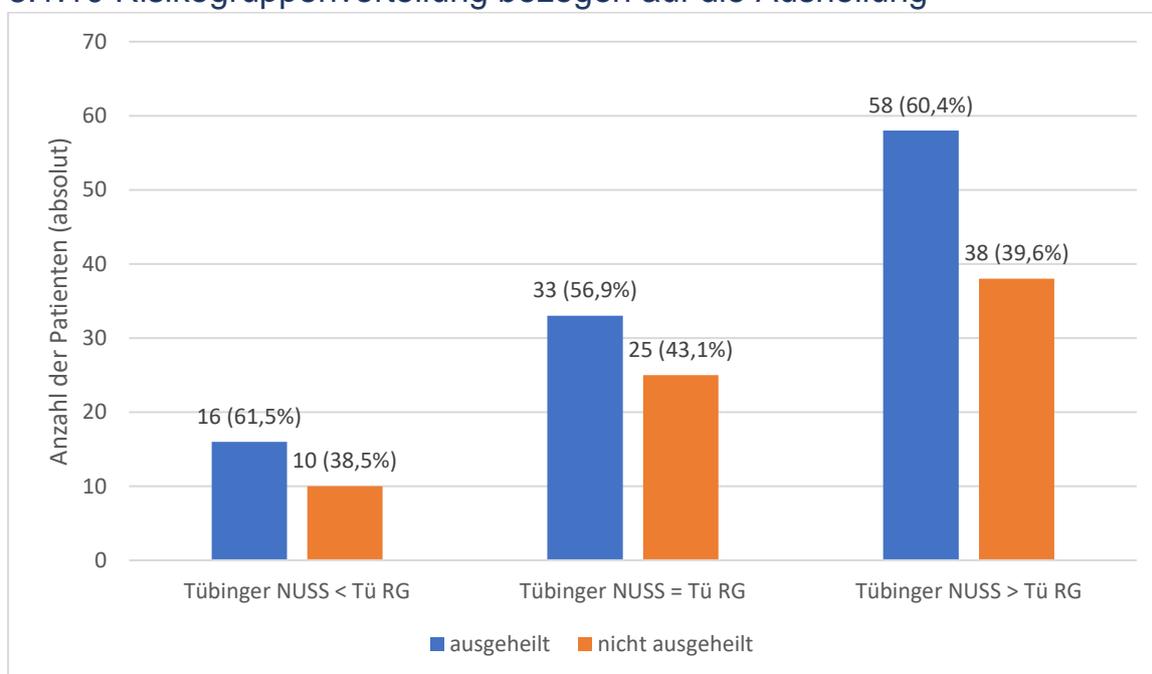


Abbildung 19: Dargestellt sind die Unterschiede zwischen den Risikogruppen nach Punktwert des modifizierten Tübinger NUSS-Scores und, vor Erhebung eines NUSS-Scores, allein nach der operativ erfolgten Therapie. Dies wurde noch nach ausgeheilten und nicht ausgeheilten Patienten aufgegliedert.

In Abbildung 19 sieht man die Verteilung zwischen der Risikogruppeneinteilung nach Tübinger NUSS-Score und Tübinger Procedere. Es soll verdeutlicht werden, wie die Einteilung nach dem Tübinger, dem modifizierten NUSS-Score anhand der erhobenen Parameter erfolgte und wie die Patienten ohne eine Score-Einteilung initial therapiert wurden. Die Unterschiede sind hier graphisch dargestellt, getrennt nach ausgeheilten (blau) und nicht ausgeheilten (orange) Patienten.

In den ersten beiden Säulen sind die Patienten abgebildet, bei denen die Risikogruppeneinteilung des Tübinger NUSS-Scores kleiner war als die Tübinger Risikogruppe des Tübinger Procedere, die also invasiver therapiert wurden als der modifizierte Tübinger NUSS-Score es vorgegeben hätte.

In dem zweiten Säulenpaar sind alle Patienten bei denen die Tübinger Risikogruppe des Tübinger Procedere gleich war wie die Tübinger NUSS-Score Risikogruppe. Hier erfolgte die Initialtherapie so, wie sie auch nach Tübinger NUSS-Score empfohlen worden wäre.

Das dritte Säulenpaar zeigt die Patienten, bei denen die Risikogruppeneinteilung durch den Tübinger NUSS-Score höher war als die Risikogruppe nach Tübinger Procedere. Die Patienten hätten nach NUSS-Score Empfehlung ein invasiveres Therapieschema erhalten sollen.

In der Gruppe, in denen der Tübinger NUSS-Score kleiner war als die Risikogruppe nach Tübinger Procedere, heilten 16 (61,5 %) Patienten aus. 10 (38,5 %) der Patienten heilten nicht aus. In der Gruppe der Patienten, bei denen die Tübinger NUSS-Score RG gleich war wie die Risikogruppe nach Tübinger Procedere, heilten 22 (56,9%) der Patienten aus, während 25 (43,1 %) Patienten nicht ausheilten. In der Gruppe in der die Tübinger NUSS-Score größer war als die Risikogruppe nach Tübinger Procedere heilten 58 (60,4 %) der Patienten aus, 38 (39,6 %) der Patienten heilten nicht aus.

3.1.11 Analyisierte Parameter des modifizierten Tübinger NUSS-Scores

		Heilung Ja (n=135)	Heilung Nein (n=94)	P value
NUSS Gustil	224			
0 n (%)		89 (66,4 %)	60 (66,7 %)	0,999**
1 n (%)		10 (7,5 %)	6 (6,7 %)	
3 n (%)		35 (26,1 %)	24 (26,7 %)	
NUSS Invasiv	219			
0 n (%)		4 (3,1 %)	11 (12,4 %)	0,005***
1 n (%)		47 (36,2 %)	21 (23,6 %)	
2 n (%)		79 (60,8 %)	55 (61,8 %)	
3 n (%)		0 (0 %)	2 (2,2 %)	

NUSS Knochen Op	225			
1 n (%)		4 (3 %)	4 (4,4 %)	0,677***
2 n (%)		50 (37,3 %)	40 (44 %)	
3 n (%)		74 (55,2 %)	43 (47,3 %)	
4 n (%)		6 (4,5 %)	4 (4,4 %)	
NUSS Weichteil Op	228			
0 n (%)		5 (3,7 %)	4 (4,3 %)	0,006***
2 n (%)		126 (93,3 %)	76 (81,7 %)	
3 n (%)		4 (3 %)	13 (14 %)	
NUSS WeberCech	227			
Hypertroph n (%)		33 (24,4 %)	21 (22,8 %)	0,323**
Oligotroph n (%)		14 (10,4 %)	16 (17,4 %)	
Atroph n (%)		88 (65,2 %)	55 (59,8 %)	
NUSS septisch	224			
0 n (%)		97 (73,5 %)	46 (50 %)	<0,001**
1 n (%)		35 (26,5 %)	46 (50 %)	
NUSS alignment	229			
ja n (%)		12 (8,9 %)	11 (11,7 %)	0,509**
nein n (%)		123 (91,1 %)	83 (88,3 %)	
NUSS ASA	221			
1-2 n (%)		119 (91,5 %)	78 (85,7 %)	0,192**
3-4 n (%)		11 (8,5 %)	13 (14,3 %)	
NUSS Rauchverhalten	221			
nein n (%)		86 (65,6 %)	61 (67,8 %)	0,773**
ja n (%)		45 (34,4 %)	29 (32,2 %)	
NUSS Steroide	222			
nein n (%)		131 (99,2 %)	90 (100 %)	0,999***
ja n (%)		1 (0,8 %)	0 (0 %)	
NUSS NSAR	222			
nein n (%)		104 (78,8 %)	68 (75,6 %)	0,625**
ja n (%)		28 (21,2 %)	22 (24,4 %)	
NUSS Diabetes mellitus	229			
nein n (%)		127 (94,1 %)	88 (93,6 %)	0,999**
ja n (%)		8 (5,9 %)	6 (6,4 %)	
NUSS Hb	227			
>10 n (%)		134 (99,3 %)	90 (97,8 %)	0,567***
<10 n (%)		1 (0,7 %)	2 (2,2 %)	

NUSS Leukozyten	226			
<12 n (%)		128 (95,5 %)	91 (98,9 %)	0,146***
>12 n (%)		6 (4,5 %)	1 (1,1 %)	
NUSS CRP	205			
<20 n (%)		110 (91,7 %)	72 (84,7 %)	0,177***
>20 n (%)		10 (8,3 %)	13 (15,3 %)	

Tabelle 12: Alle erhobenen Parameter des modifizierten NUSS - Scores in tabellarischer Übersicht. In der ersten Spalte die erhobenen Parameter, in der zweiten Spalte die Anzahl der jeweils ausgewerteten Patienten. In der dritten Spalte finden sich die Zahlen der ausgeheilten Patienten, in der vierten Spalte die Zahlen der nicht ausgeheilten Patienten. In Spalte fünf stehen die p-Werte die den Unterschied zwischen Ausheilung und keiner Heilung angeben. Signifikanzniveau war $p < 0,05$.

*T test independent samples, ** Chi quadrate, ***Fisher Test, &Mann Whitney

In Tabelle 12 werden die einzelnen Faktoren des NUSS-Scores aufgezählt. Alle fett hervorgehobenen Werte sind weiter oben bereits erläutert, da der Wert unabhängig vom NUSS-Score erhoben wurde.

Analysiert wurde die Invasivität des bei der ersten Pseudarthrosenoperation durchgeführten Eingriffes. In der Gruppe der ausgeheilten Patienten wurden 4 (3,1 %) mit der Invasivität 0, also mit einer rein mechanischen Verbesserung behandelt. 47 (36,2 %) der Patienten wurden mit der Invasivität 1 behandelt, bekamen entweder eine biologische oder eine mechanische Verbesserung. 79 (60,8 %) der Patienten wurden mit der Invasivität 2, einer mechanischen und biologischen Verbesserung behandelt und 0 (0,0 %) der Patienten bekamen eine Behandlung die der Invasivität 3 entspricht, einer Amputation oder Arthrodesen. In der Gruppe der nicht ausgeheilten Patienten wurden 11 (12,4 %) mit der Invasivität 0 behandelt, 21 (23,6 %) wurden mit der Invasivität 1 behandelt, 55 (61,8 %) wurden mit der Invasivität 2 behandelt und 2 (2,2 %) mit der Invasivität 3. Der Unterschied war mit $p=0,005$ signifikant.

Ein weiterer Punkt, der eine Rolle im NUSS-Score spielt, ist das Alignment. Wir untersuchten ob die Ausrichtung der Fraktur vor der ersten Pseudarthrosenoperation einen Unterschied ausmachte. In der Gruppe der ausgeheilten Patienten wurden bei 12 (8,9 %) der Patienten die Frakturen vor der OP ausgerichtet, bei 123 (91,1 %) nicht. In der Gruppe der nicht ausgeheilten Patienten wurde bei 11 (11,7 %) die Fraktur ausgerichtet, bei 83 (88,3 %) nicht. Der Unterschied war mit $p=0,509$ nicht signifikant.

Die Einnahme von NSAR (nichtsteroidale Antirheumatika) zum Zeitpunkt der ersten Pseudarthrosenoperation ist ein weiterer Faktor des NUSS-Scores. In der Gruppe der ausgeheilten Patienten nahmen 28 (21,2 %) der Patienten NSAR ein, 104 (78,8 %) nahmen keine ein. In der Gruppe der nicht ausgeheilten Patienten nahmen 22 (24,4 %) der Patienten zum Zeitpunkt der ersten Pseudarthrosenoperation NSAR ein, 68 (75,6 %) nicht. Der P-Wert betrug $p=0,625$.

Die Höhe des Hb-Wertes zählt ebenfalls in den NUSS-Score, hier jedoch anders aufgeschlüsselt als in der Tabelle weiter oben. In der Gruppe der ausgeheilten Patienten hatten 134 (99,3 %) einen Hb-Wert größer als 10 und 1 (0,7 %) der Patienten hatte einen Hb-Wert kleiner als 10. In der Gruppe der nicht ausgeheilten Patienten hatten 90 (97,8 %) einen Hb-Wert größer als 10 und 2 (2,2 %) der Patienten hatten einen Hb-Wert kleiner als 10. Der P-Wert betrug $p=0,567$.

Ebenfalls in den NUSS-Score zählt der Leukozyten-Wert der Patienten zum Zeitpunkt der ersten Pseudarthrosenoperation. Kriterium war hier, ob der Wert größer oder kleiner als 12 /nl. In der Gruppe der ausgeheilten Patienten hatten 128 (95,5 %) der Patienten einen Leukozyten-Wert unter 12 /nl. 6 (4,5 %) der Patienten hatten einen Wert der über 12 /nl lag. In der Gruppe der nicht ausgeheilten Patienten hatten 91 (98,9 %) der Patienten einen Leukozyten-Wert der unter 12 /nl lag und 1 (1,1 %) hatten einen Wert der über 12 /nl lag. Der Unterschied war mit $p=0,146$ nicht signifikant.

Der CRP-Wert ist ein weiterer Faktor der im NUSS-Score Einfluss findet. Unterschieden wurde in Werte kleiner 20 mg/l und größer 20 mg/l. In der Gruppe der ausgeheilten Patienten hatten 110 (91,7 %) zum Zeitpunkt der ersten Pseudarthrosenoperation einen CRP-Wert kleiner 20 mg/l. 10 (8,3 %) hatten einen Wert größer 20 mg/l. In der Gruppe der nicht ausgeheilten Patienten hatten 72 (84,7 %) einen CRP-Wert kleiner 20 mg/l und 13 mg/l (15,3 %) hatten einen CRP-Wert größer 20 mg/l. Der Unterschied war mit $p=0,177$ nicht signifikant. Getestet wurde hier mit dem Exakten Fisher-Test, da der Stichprobenumfang

gering war und der Exakte Fisher-Test auch dann noch verlässliche Resultate liefert.

Insgesamt ergab sich bei der retrospektiven Datenauswertung Anlass zur Modifizierung des NUSS-Scores. Der bisher bestehende NUSS-Score zeigte sich klinisch auf Grund seiner Komplexität nicht einsetzbar. Wir kürzten daraufhin den NUSS-Score um die nicht regelhaft erhobenen Parameter und bildeten aus der übrig gebliebenen Summe den Tübinger NUSS-Score. Dieser wurde ebenfalls in vier Risikogruppen gegliedert in die die Patienten eingeteilt wurden. So blieb der sehr gute und mit Therapieschema bisher einzigartige Ansatz des NUSS-Scores erhalten, wurde aber sehr viel alltagstauglicher in der Handhabung und Ausführung.

In unserer Auswertung zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Heilung und Nicht-Heilung. Unter anderem ließ sich dies bei der Anzahl der Weichteiloperationen und der Art der 1. Pseudarthrosenoperation, also der intraoperativen Versorgung darstellen. Jedoch konnte, da jeweils mehrere Gruppen aufgelistet waren und die Patientengruppen zu klein waren, kein Unterschied zwischen einzelnen Untergruppen aufgezeigt werden. Einzig, dass es einen signifikanten Unterschied gibt und diese Punkte damit ein Risikofaktor sein könnten, ließ sich zeigen. Dass ein septischer Verlauf einen Unterschied zwischen Heilung und Nicht-Heilung bringt, konnten wir dagegen mit einem signifikanten Unterschied belegen.

3.2 Prospektive Ergebnisse

Die analysierten biologischen Wachstumsfaktoren wurden in verschiedenen Patientengruppen gemessen und verglichen. Jeweils im defekten Knochenanteil der Pseudarthrose, und im gesunden Knochenanteil der Spongiosa, die dem jeweiligen Patienten intraoperativ entnommen (Beckenkamm, Tibiakopf, Calcaneus) und dann am Ort der Pseudarthrose wieder implantiert wurde. Deshalb wurden in die Studie auch nur Patienten eingeschlossen, die eigene Spongiosa transplantiert bekamen. Patienten mit einem septischen Verlauf wurden im Vorhinein ausgeschlossen, da mögliche Interaktionen innerhalb der untersuchten Proteine bei vorliegender Infektkonstellation nicht ausgeschlossen werden konnten. Die genaue Patienteneinteilung in die drei Gruppen ist in Kapitel 2.3 detailliert beschrieben.

3.2.1 Angiogenetische Wachstumsfaktoren

Der angiogenetischen Wachstumsfaktor VEGF und seine Rezeptoren VEGF-R1 und VEGF-R2 sind erheblich an der Vaskularisierung der Frakturzone beteiligt (siehe oben, Abschnitt 1.2.6.1.1 VEGF).

3.2.1.1 VEGF

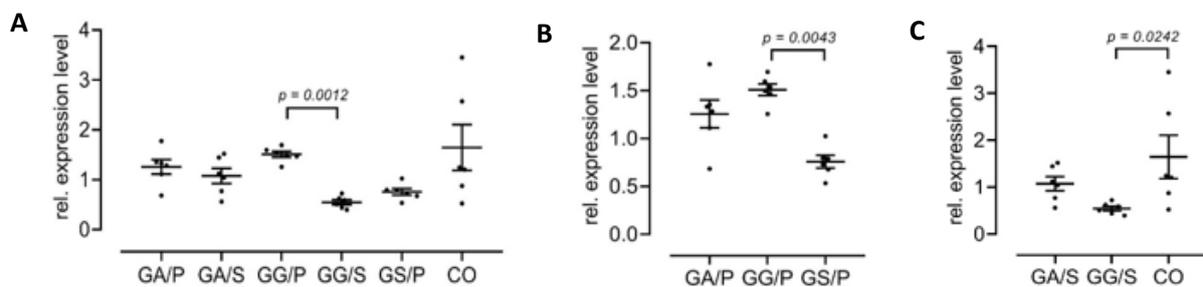


Abbildung 20: (A) VEGF-Expression in allen Gruppen. (B) Die VEGF-Expression isoliert betrachtet in den Pseudarthroseguppen. (C) Die VEGF-Expression in den Spongiosagruppen und der Kontrollgruppe

In Abbildung 20 sieht man die relative Ausprägung von VEGF in den unterschiedlichen Gruppen. In Diagramm A sind alle Gruppen miteinander verglichen, hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der gelenknahen Pseudarthroseguppe (GG/P) und der gelenknahen Spongiosagruppe (GG/S) mit $p = 0,0012$.

In Diagramm B sind die Pseudarthrosengruppen miteinander verglichen. Hier sieht man zwischen der gelenknahen Pseudarthrosengruppe (GG/P) und der schaftnahen Pseudarthrosengruppe (GS/P) einen signifikanten Unterschied mit $p = 0,0043$.

In Diagramm C sind die Spongiosagruppen und die Kontrollgruppe zu sehen. Ein mit $p = 0,0242$ signifikanter Unterschied ist zwischen der Kontrollgruppe (CO) und der gelenknahen Spongiosagruppe (GG/S) zu sehen.

Insgesamt ist die Expression von VEGF in den Pseudarthrosengruppen größer als in den Spongiosa- und Kontrollgruppen.

3.2.1.2 VEGF-R1

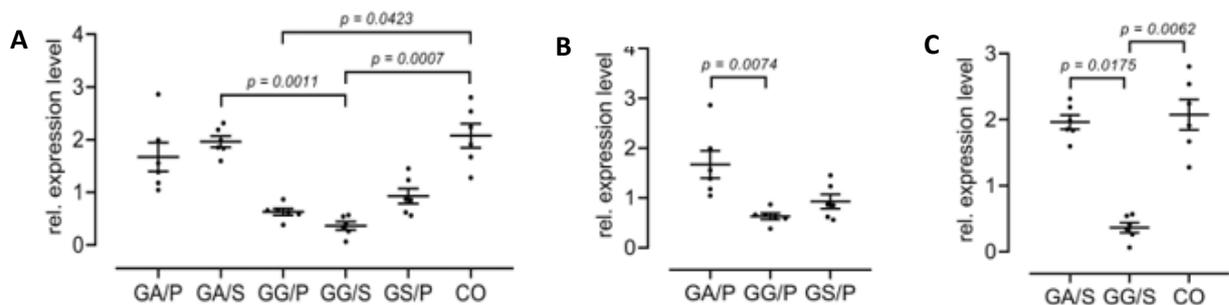


Abbildung 21: (A) VEGF-R1-Expression in allen Gruppen. (B) Die VEGF-R1-Expression isoliert betrachtet in den Pseudarthrosengruppen. (C) Die VEGF-R1-Expression in den Spongiosagruppen und der Kontrollgruppe.

Abbildung 21 zeigt die Expression von VEGF-R1 in allen Gruppen. In Diagramm A zu sehen sind signifikante Unterschiede zwischen der Arthrodesen-Spongiosagruppe (GA/S) und der gelenknahen Spongiosagruppe (GG/S) mit $p = 0,0011$. Ebenfalls signifikant war der Unterschied zwischen der gelenknahen Pseudarthrosengruppe (GG/P) und der Kontrollgruppe (CO) mit $p=0,0423$ und zwischen der gelenknahen Spongiosagruppe (GG/S) und der Kontrollgruppe (CO) mit $p = 0,0007$.

In Diagramm B war der Unterschied zwischen der Arthrodesen-Pseudarthrosengruppe (GA/P) und der gelenknahen Pseudarthrosengruppe (GG/P) signifikant mit $p = 0,0074$.

In Diagramm C sind die gesunden Gruppen bezüglich der Ausprägung von VEGF-R1 verglichen. In der gelenknahen Spongiosagruppe (GG/S) war die Ausprägung deutlich geringer, so dass der Unterschied zu der Arthrodesen-Spongiosagruppe (GA/S) mit $p = 0,0175$ und zur Kontrollgruppe (CO) mit $p = 0,0062$ signifikant war.

Die Signifikanzwerte zwischen Diagramm A und C variieren deshalb, da im ersten Diagramm die Werte aller Gruppen verglichen wurden, im dritten Diagramm nur die Werte der Spongiosagruppen und der Kontrollgruppe.

3.2.1.3 VEGF-R2

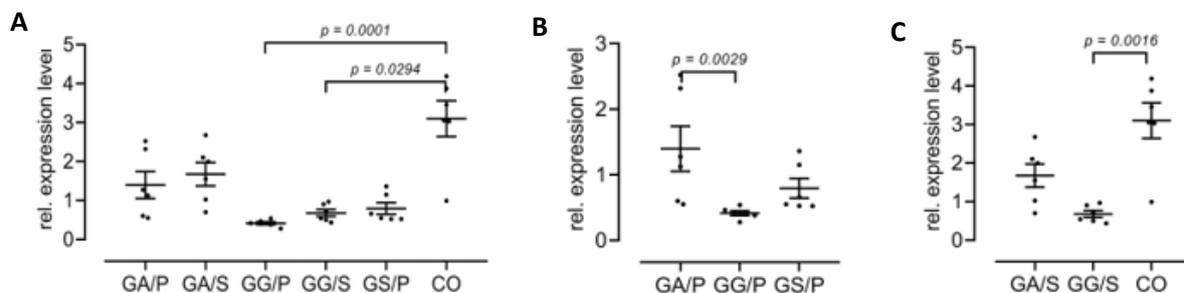


Abbildung 22: (A) VEGF-R2-Expression in allen Gruppen. (B) Die VEGF-R2-Expression isoliert betrachtet in den Pseudarthrosegruppen. (C) Die VEGF-R2-Expression in den Spongiosagruppen und der Kontrollgruppe.

In Abbildung 22 ist die Expression von VEGF-R2 dargestellt. Im Diagramm A ist der Unterschied von der gelenknahen Pseudarthrosengruppe (GG/P) zu der Kontrollgruppe (CO) mit $p = 0,0001$ und zwischen der gelenknahen Spongiosagruppe (GG/S) und der Kontrollgruppe (CO) mit $p = 0,0294$ signifikant.

In Diagramm B ist der Unterschied zwischen der Arthrodesen-Pseudarthrosengruppe (GA/P) und der gelenknahen Pseudarthrosengruppe (GG/P) mit $p=0,0029$ signifikant.

Diagramm C zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der gelenknahen Spongiosagruppe (GG/S) und der Kontrollgruppe (CO) mit $p=0,0016$.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die angiogenetischen Wachstumsfaktoren VEGF, VEGF-R1 und VEGF-R2 sehr einheitlich exprimiert sind. Bis auf GG/P in VEGF sind in den gelenknahen Gruppen sowohl im

pseudarthrotischen Knochen wie auch in der Spongiosa die angiogenetischen Wachstumsfaktoren geringer exprimiert als in allen anderen Proben.

3.2.2 Osteoblastäre Wachstumsfaktoren

3.2.2.1 BMP2

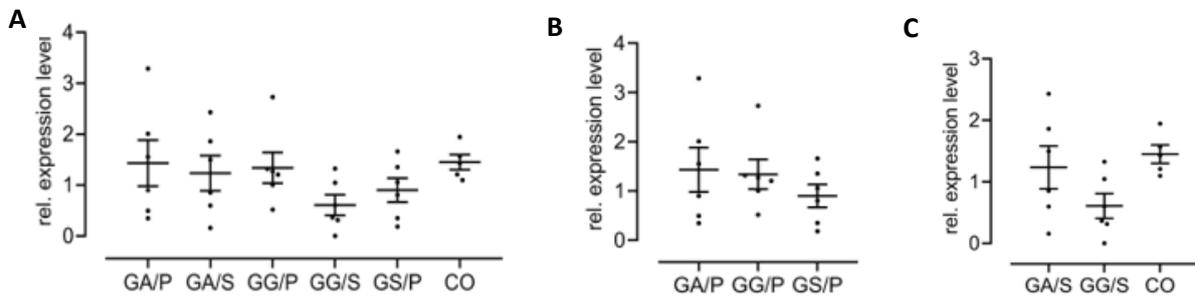


Abbildung 23: (A) BMP2-Expression in allen Gruppen. (B) Die BMP2-Expression isoliert betrachtet in den Pseudarthroseguppen. (C) Die BMP2-Expression in den Spongiosagruppen und der Kontrollgruppe.

In Abbildung 23 sieht man die Expression von BMP2 in allen untersuchten Gruppen. Insgesamt betrachtet war die Verteilung in allen Gruppen ähnlich. Zwischen den Gruppen ließ sich kein signifikanter Unterschied ermitteln.

3.2.2.2 BMP7

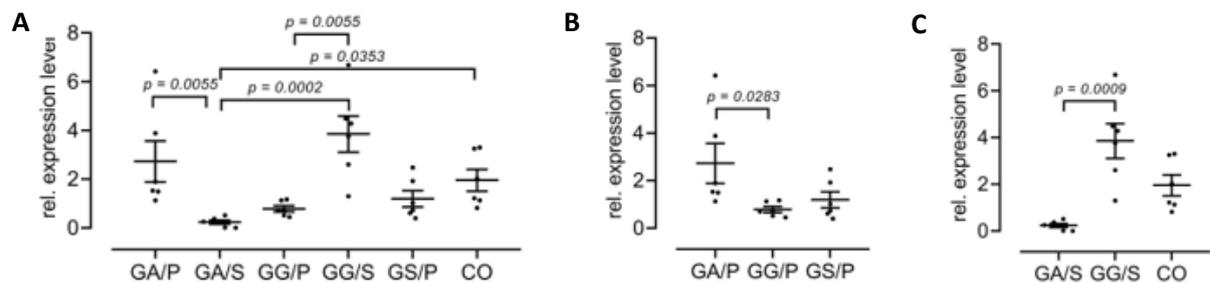


Abbildung 24: (A) BMP7-Expression in allen Gruppen. (B) Die BMP7-Expression isoliert betrachtet in den Pseudarthroseguppen. (C) Die BMP7-Expression in den Spongiosagruppen und der Kontrollgruppe.

In Abbildung 24 ist die Expression von BMP7 in allen Gruppen dargestellt. In Diagramm A zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Arthrodesen-Pseudarthrosengruppe (GA/P) und der Arthrodesen-Spongiosagruppe (GA/S) mit $p=0,0055$. Zwischen der Arthrodesen-Spongiosagruppe (GA/S) und der gelenknahen Spongiosagruppe (GG/S) war der Unterschied mit $p = 0,0002$ signifikant. Die Arthrodesen-Spongiosagruppe (GA/S) und die Kontrollgruppe (CO) zeigten mit $p=0,0353$ ebenfalls einen signifikanten Unterschied und zwischen der gelenknahen Pseudarthrosengruppe (GG/P) und der gelenknahen Spongiosagruppe (GG/S) war der Unterschied mit $p = 0,0055$ signifikant.

In Diagramm B ist die Expression von BMP7 in den Pseudarthrosegruppen dargestellt. In der gelenknahen Pseudarthrosengruppe (GG/P) war die Ausprägung am geringsten, so dass der Unterschied zu der Arthrodesen-Pseudarthrosengruppe (GA/P) mit $p = 0,0283$ signifikant war.

Diagramm C zeigt mit $p = 0,0009$ einen signifikanten Unterschied der Arthrodesen-Spongiosagruppe (GA/S) und der gelenknahen Spongiosagruppe (GG/S).

3.2.2.3 TGF- β 1

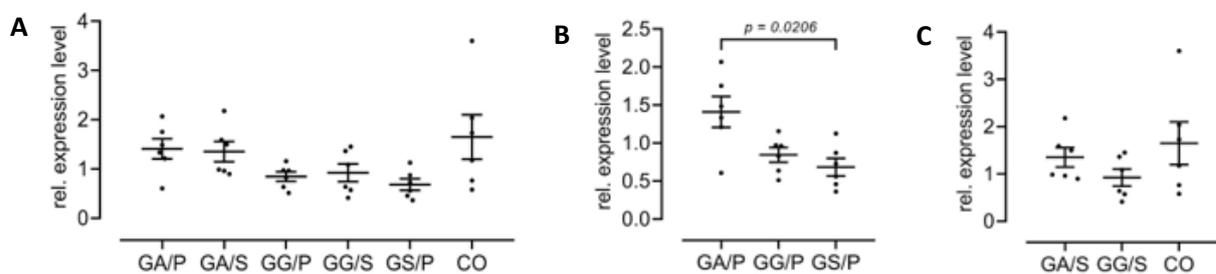


Abbildung 25: (A) TGF- β 1 -Expression in allen Gruppen. (B) Die TGF- β 1 -Expression isoliert betrachtet in den Pseudarthrosegruppen. (C) Die TGF- β 1 -Expression in den Spongiosagruppen und der Kontrollgruppe.

Abbildung 25 zeigt die unterschiedliche Expression von TGF- β 1 in allen untersuchten Gruppen. In Diagramm 1 ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied zeigen.

In Diagramm 2 zeigte sich mit $p = 0,0206$ ein signifikanter Unterschied zwischen der Arthrodesen-Pseudarthrosengruppe (GA/P) und der schaftnahen Pseudarthrosengruppe (GS/P).

In Diagramm 3 sind die Spongiosagruppen und die Kontrollgruppe zu sehen. In der Kontrollgruppe war die Ausprägung höher als in den anderen beiden Gruppen, insgesamt jedoch ohne signifikanten Unterschied.

3.2.2.4 SOST

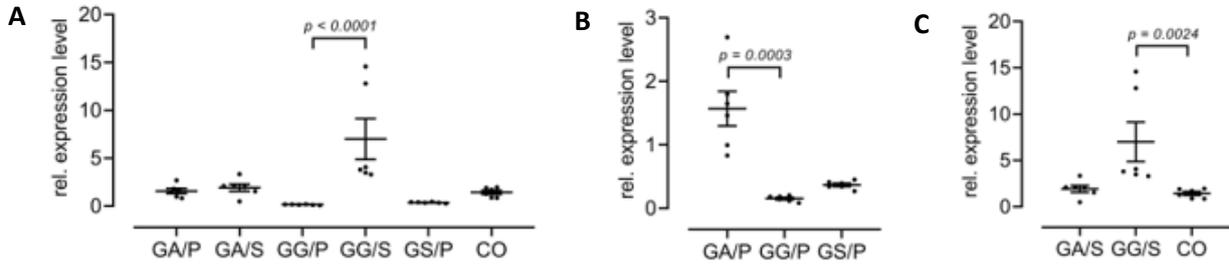


Abbildung 26: (A) SOST -Expression in allen Gruppen. (B) Die SOST -Expression isoliert betrachtet in den Pseudarthrosgruppen. (C) Die SOST -Expression in den Spongiosagruppen und der Kontrollgruppe.

Abbildung 26 zeigt die Expression von SOST in allen analysierten Gruppen. In Diagramm 1 zeigte sich der gelenknahen Pseudarthrosengruppe (GG/P) und der gelenknahen Spongiosagruppe (GG/S) ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,0001$.

Im zweiten Diagramm war der Unterschied zwischen der Arthrodesen-Pseudarthrosengruppe (GA/P) und der gelenknahen Pseudarthrosengruppe (GG/P) signifikant mit $p = 0,0003$.

In den Spongiosagruppen und der Kontrollgruppe in Diagramm 3 zeigte sich zwischen der gelenknahen Spongiosagruppe (GG/S) und der Kontrollgruppe (CO) ein statistisch signifikanter Unterschied mit $p = 0,0024$.

Insgesamt zeigt sich ein uneinheitliches Expressionsmuster von SOST in den Gruppen.

3.2.2.5 Osteocalcin

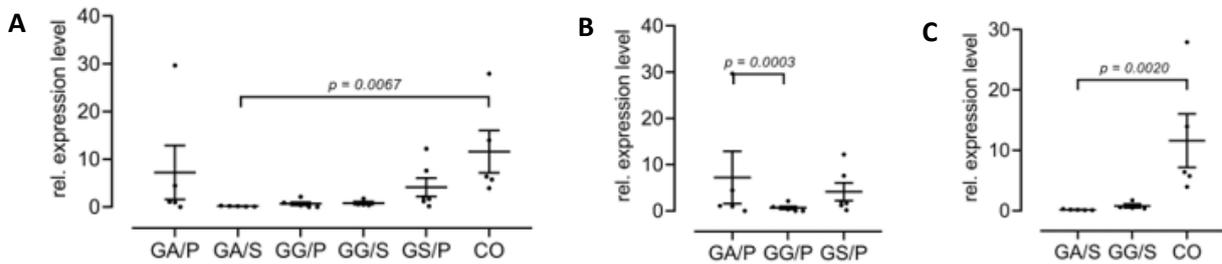


Abbildung 27: (A) Osteocalcin -Expression in allen Gruppen. (B) Die Osteocalcin -Expression isoliert betrachtet in den Pseudarthrosegruppen. (C) Die Osteocalcin -Expression in den Spongiosagruppen und der Kontrollgruppe

Die Expression von Osteocalcin in den unterschiedlichen Gruppen ist in Abbildung 27 dargestellt. In Diagramm A war der Unterschied zwischen Arthrodesen-Spongiosagruppe (GA/S) und der Kontrollgruppe (CO) mit $p = 0,0067$ signifikant.

In Diagramm B zeigt sich zwischen der Arthrodesen-Pseudarthrosengruppe (GA/P) und der gelenknahen Pseudarthrosengruppe (GG/P) ein signifikanter Unterschied mit $p = 0,0003$.

Diagramm C zeigt einen mit $p = 0,0020$ signifikanten Unterschied zwischen der Arthrodesen-Spongiosagruppe (GA/S) und der Kontrollgruppe (CO).

Zusammenfassend zeigt sich bei BMP2 ein sehr homogenes Expressionssmuster, es gibt keine Ausreißer oder sehr unterschiedlich regulierte Gruppen. Bei BMP7 ergeben sich viele statistisch signifikante Unterschiede in der Expression. GA/P, GG/S und CO sind deutlich stärker hochreguliert als die anderen Gruppen. TGF- β 1 zeigt wieder ein sehr einheitliches Expressionsmuster. Auch SOST zeigt eine sehr homogene Verteilung bis auf zwei Ausreißer in GG/S. Bei Osteocalcin ergibt sich eine vermehrte Ausprägung in CO, ansonsten zeigt sich Osteocalcin in den pseudarthrotischen Knochenproben im Gegensatz zu den Spongiosaproben vermehrt exprimiert.

3.2.3 Osteoklastäre Wachstumsfaktoren

3.2.3.1 BAMBI

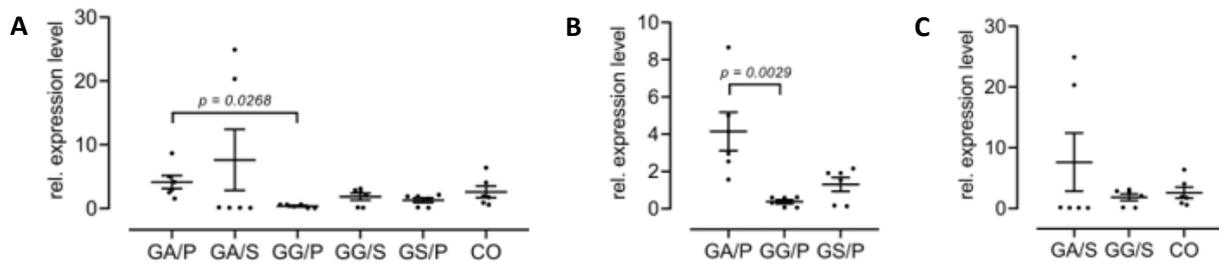


Abbildung 28: (A) BAMBI -Expression in allen Gruppen. (B) Die BAMBI -Expression isoliert betrachtet in den Pseudarthrosengruppen. (C) Die BAMBI -Expression in den Spongiosagruppen und der Kontrollgruppe.

In Abbildung 28 ist die Ausprägung von BAMBI in allen untersuchten Gruppen dargestellt. In Diagramm A war der Unterschied zwischen der Arthrodesen-Pseudarthrosengruppe (GA/P) und der gelenknahen Pseudarthrosengruppe (GG/P) mit $p = 0,0268$ signifikant.

In Diagramm B ergab sich ein signifikanter Unterschied mit $p = 0,0029$ zwischen der Arthrodesen-Pseudarthrosengruppe (GA/P) und der gelenknahen Pseudarthrosengruppe (GG/P).

Signifikante Unterschiede zwischen gleichen Gruppen aber mit anderen Signifikanzen resultieren daraus, dass in Diagramm A die Werte aller Gruppen miteinander verglichen wurden, in Diagramm B nur noch die Werte der Pseudarthrosengruppen.

In Diagramm C ließ sich kein signifikanter Unterschied zeigen.

Bei BAMBI, dem einzigen osteoklastären Wachstumsfaktor zeigt sich in der Arthrodesen-Gruppe sowohl im pseudarthrotischen Knochen, wie auch dem spongiösen Knochen eine vermehrte Expression im Vergleich zu den weiteren Proben. GG/P ist die Probe, die am wenigsten ausgeprägt ist, der Unterschied zwischen GG/P und GA/P ist hierbei signifikant.

4. Diskussion

4.1 Retrospektive Datenanalyse

Bis heute sind die Gründe für die Entstehung von Pseudarthrosen nicht abschließend geklärt [19]. Es gibt mehrere Risikofaktoren, die eine Rolle spielen, wie Alter, Geschlecht, Gewicht und Nebenerkrankungen [3]. Während die operative Pseudarthrosenversorgung immer weitere Fortschritte macht, tat sich in der Klassifikation der Pseudarthrosen lange Zeit nichts. Die gültige Pseudarthrosenklassifikation war über viele Jahre die Klassifikation nach Weber und Cech aus dem Jahr 1976 [18]. Die Klassifikation nach Weber und Cech ist insofern limitiert, da von einem zweidimensionalen Röntgenbild auf die Biologie am Knochen Rückschlüsse gezogen werden. Es werden dabei keine weiteren Faktoren oder Parameter (wie Weichteilstatus oder Komorbiditäten etc.) inkludiert. Für die Pseudarthrosen der Tibia existiert alternativ seit 2010 der RUST: dieser gibt dem behandelnden Arzt ein diagnostisches Mittel an die Hand, kann jedoch keinerlei Aussage über das funktionelle Outcome der Patienten treffen [24, 97]. Im Verlauf der letzten Jahre erfolgte zunehmend die Erkenntnis, dass sowohl die Biomechanik wie auch bestimmte Risikofaktoren eine Rolle in der Entstehung von Pseudarthrosen spielen müssten. Nachdem, trotz aller Erkenntnisse weiterhin die Klassifikation von Weber und Cech genutzt wurde, ergab sich für Calori *et al.* 2008 die Notwendigkeit den sogenannten NUSS-Score aufzulegen [3].

Der NUSS-Score betrachtete erstmals den Patienten und das klinische Patientenbild insgesamt, nicht nur das Röntgenbild. Außerdem ergibt sich aus dem NUSS-Score eine Therapieempfehlung, die auf einem Gesamtwert beruht, der verschiedenste Risikofaktoren berücksichtigt.

Van Basten Batenburg *et al.* [6] haben gezeigt, dass die Einteilung der Patienten in Risikogruppen mittels des NUSS-Scores eine deutlich höhere Interrater-Reliabilität im Gegensatz zur Klassifikation nach Weber und Cech [18] ergibt. Hier lässt sich interpretieren, dass der NUSS-Score deutlich unabhängiger vom Anwender ist und eine hohe Übereinstimmung für unterschiedliche Anwender in den Ergebnissen zeigt.

4.1.1 Patientenzahlen in unserer Studie vs. in der Literatur

Nach Einführung des NUSS-Scores im Jahr 2008, erfolgte 2011 durch Abumunaser *et al.*, 2014 und durch Calori *et al.* wie auch 2019 durch van Basten Batenburg die Validierung desselben [4-6].

In der vorliegenden Studie wurden retrospektiv 1140 Patienten eingeschlossen. Diese wurden mithilfe einer ICD – 10 Abfrage aus den Jahren 2009 bis 2016 gewonnen. 240 Patienten hatten eine Pseudarthrose der Tibia. Dies ist das größte und einheitlichste Patientenkollektiv, das bisher mit einer Pseudarthrose einer Lokalisation untersucht wurde. Statistisch ist dies wichtig, um Unterschiede zwischen den Gruppen besser ausmachen zu können und Risikofaktoren zu identifizieren. Außerdem lässt sich so die Streubreite der einzelnen patientenbezogenen Faktoren wie dem Alter oder dem Gewicht reduzieren und die Ergebnisse sind besser auf größere Patientenzahlen übertragbar.

Abumunaser *et al.* [4] führten eine retrospektive Datenerhebung der Jahre 2002 bis 2009 an einem Zentrum durch und identifizierten 40 Patienten mit Pseudarthrosen der unteren Extremität. Acht davon waren an der Tibia lokalisiert. Sie kamen zu dem Schluss, dass der NUSS-Score eine valide Leitlinie für die Behandlung von Pseudarthrosen der unteren Extremität sei, jedoch wurde dies anhand von nur 40 Patienten erhoben, so dass die Aussagekraft des recht kleinen Patientenkollektivs eingeschränkt ist.

Calori *et al.* [5], die den NUSS-Score 2014 ebenfalls validierten, untersuchten zu diesem Zweck 300 Patienten mit Pseudarthrosen der langen Knochen an einem Trauma-Zentrum. Diese wurden innerhalb eines Jahres retrospektiv eingeschlossen. 156 davon waren an der Tibia lokalisiert. In der anschließend durchgeführten statistischen Analyse zeigte sich, dass eine statistisch signifikante Ausheilungsrate in allen Patienten bestand, so dass der NUSS-Score ein verlässliches Instrument zur Klassifizierung und Therapieempfehlung bei Pseudarthrosen bildet. Damit kamen Calori *et al.* [5] zum gleichen Ergebnis wie Abumunaser *et al.* [4], jedoch wurde auch hier ein sehr heterogenes Patientenkollektiv betrachtet und ausgewertet, es wurde nicht nach Pseudarthrosenlokalisierung getrennt. Es wäre interessant gewesen, zu sehen ob

sich Pseudarthrosen der unteren Extremität im Gegensatz zu Pseudarthrosen der oberen Extremität im Hinblick auf Ausheilungsraten, Anzahl der Operationen und operative Versorgungsart unterscheiden.

Die neueste Validierung des NUSS-Scores ist von 2019 und erfolgte durch van Basten Batenburg *et al.* [6]. In die Studie wurden 44 Patienten retrospektiv aus einem Zeitraum zwischen 2005 und 2015 mit einer Pseudarthrose der Tibia eingeschlossen. Es wurde damit ebenfalls ein sehr kleines Patientenkollektiv eingeschlossen, die Möglichkeit die Ergebnisse auf eine große Patientenmenge zu übertragen muss deshalb aber sehr kritisch betrachtet werden.

4.1.2 Kritische Beurteilung unserer Studie

In unserer Studie zeigten sich einige Daten als signifikant im Unterschied zwischen ausgeheilten und nicht geheilten Frakturen. Dazu gehörten das Geschlecht, die Anzahl der Knochenoperation zwischen Primärversorgung und Pseudarthrosen - Operation, die Anzahl der Weichteiloperationen vor der Pseudarthrose - Operation, der Art der Frakturversorgung bei der Pseudarthrosen - Operation, ein septischer Verlauf und der ASA-Score der Patienten. Dies sind alle Faktoren, die bereits in vorausgegangenen Studien [17, 25] als mögliche Risikofaktoren identifiziert wurden. Bestätigt sich dies ebenfalls für andere Pseudarthroselokalisationen, können diese Patienten in Zukunft besser überwacht werden und je nach Risikofaktor dahingehend behandelt werden um der Entstehung einer Pseudarthrose möglichst vorzubeugen.

In der multivariablen Regressionsanalyse ließen sich allerdings keine zusammenhängenden Risikofaktoren darstellen. Da die Fallzahl insgesamt mit 240 Patienten zwar verhältnismäßig groß war, die einzelnen Subgruppen, zum Beispiel bei Betrachtung der operativen Frakturversorgung jedoch klein waren, ließen sich keine signifikanten Aussagen über einen konkreten Risikofaktor treffen. Die Aussage, dass die Art der operativen Frakturversorgung in der Pseudarthrosenoperation einen Unterschied für die Heilung bringt, ließ sich jedoch darstellen. Um dies weiter zu verifizieren und einzelne Risikofaktoren

herauszuarbeiten, empfiehlt sich die weitere Aufarbeitung retrospektiver Fälle, um ein größeres Patientenkollektiv zu generieren.

Eine weitere Schwäche dieser Arbeit ist, dass die Patientenauswertung rein retrospektiv und nicht prospektiv erfolgte. Eine prospektive Patientengenerierung hätte es uns erlaubt, alle vom NUSS-Score verlangten Parameter einzuschließen und die Patienten direkt entsprechend ihrer Risikogruppe zu therapieren. So hätte der NUSS-Score und die daraus resultierenden Therapieschemata evaluiert werden können. Der Vorteil am retrospektiven Vorgehen ist jedoch, dass wir die Patienten, bei Nachbehandlung in der BG Klinik Tübingen, über einen sehr langen Zeitraum verfolgen konnten. Insgesamt hatten wir einen Follow – up Zeitraum von sieben Jahren. 11 Patienten mussten wir aus der Ausheilungsstatistik ausschließen, da diese die Nachbehandlung nicht bei uns fortsetzen. Von 229 übrigbleibenden Patienten heilten 135 bis Ende 2016 aus.

Van Basten Batenburg *et al.* [6] kamen in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass eine Anpassung des NUSS – Scores notwendig ist. Während unserer Datenerhebung stießen wir ebenfalls auf das Problem, dass nicht alle Parameter des NUSS – Scores in der retrospektiven Datenerhebung vorhanden sind. Parameter die, da nicht standardmäßig erhoben, ausgeschlossen wurden, waren die Knochenqualität, die Blutsenkungsgeschwindigkeit, der HbA1c und die Effektivität der primären operativen Versorgung.

Zum Großteil waren diese im Nachhinein auch nicht rekonstruierbar. Dies brachte uns auf den Gedanken, dass der NUSS – Score sehr komplex und in bisherigen Form im Alltag kaum benutzbar ist, sodass wir eine Anpassung des NUSS – Scores vornahmen.

4.1.3 Die Anpassung des NUSS-Scores

Initial sind im NUSS-Score maximal 100 Punkte erreichbar. Diese werden in vier Risikogruppen eingeteilt. Da im klinischen Alltag mehrere Faktoren nicht regelmäßig erhoben werden und bei retrospektiven Fällen und auswärtiger Initialversorgung nicht beurteilbar sind, wurde der Score von uns angepasst.

Nicht regelmäßig erhoben werden die Blutsenkung und der HbA1c. Nicht beurteilen lässt sich retrospektiv die Knochenqualität und die Stabilität der initialen Frakturversorgung. Aus diesen Gründen waren die 100 Punkte nicht erreichbar und es ergab sich eine Reduktion der maximalen Punktzahl auf 76. Diese teilten wir in die gleichen 4 Risikogruppen mit den gleichen Therapieempfehlungen ein wie im NUSS-Score. Auf dem modifizierten Tübinger NUSS-Score (RG 1: 1 - 19 Punkte, RG 2: 20 - 38 Punkte, RG 3: 39 – 57, RG 4: 58 - 76) erfolgten all unsere Berechnungen zum Vergleich der NUSS Einteilung und des Tübinger Procedere.

Abumunaser *et al.* [4] sahen bei Anwendung des NUSS - Scores ihre Einteilung der Patienten bestätigt und berichteten über entsprechende Therapien. Insofern erfolgte keine Anpassung des NUSS – Scores, da in der Studie berichtet wird, dass alle Werte erhoben werden konnten. Dies ist unserer Ansicht nach bei einer retrospektiven Studie nicht möglich, da z.B die Knochenqualität zum Zeitpunkt der Primäroperation nicht mehr erhoben werden kann. Wird die Studie prospektiv durchgeführt, hat man die Möglichkeit alle Parameter von Anfang an zu erheben, auch wenn sie nicht dem Standard entsprechen.

Calori *et al.* [5] berichtet über die gleiche Gruppeneinteilung wie im NUSS – Score. Auch in dieser Studie konnten alle Parameter des NUSS – Scores erhoben werden. Insofern wurden keine Modifikationen am NUSS – Score durchgeführt. Dies liegt allerdings daran, dass Calori *et al.* [3] 2008 den NUSS-Score einführt. Sie konnten also bereits zu Beginn der Studie alle Parameter erheben. Da wir unsere Studie retrospektiv durchführten war uns dies nicht möglich.

Van Basten Batenburg *et al.* [6] berichteten über Parameter des NUSS – Scores, die nicht erhoben werden konnten, führten jedoch keine Anpassung der Punktezahl durch. Stattdessen wurden die gleichen Risikogruppen wie bei Calori *et al.* [5] und Abumunaser *et al.* [4] gewählt.

Insgesamt kann also davon ausgegangen werden, dass Calori *et al.* [5], die auch den NUSS – Score entwickelt hatten, eine prospektive Datenerfassung

durchführten und damit alle zu erhebenden Werte sichergestellt werden konnten. Dies ist möglich, da sie dann die Primärbehandlung und das ausführliche Labor selbst durchführten. Abumunaser *et al.* [4] und van Basten Batenburg *et al.* [6] führten, genauso wie wir, eine retrospektive Studie durch, weshalb van Basten Batenburg *et al.* [6] von nicht erhebenden Parametern berichten. Zu diesem Ergebnis gelangten wir ebenfalls. Während van Basten Batenburg *et al.* [6] die Anpassung des NUSS – Scores vorschlugen, dies jedoch nicht umsetzten, entschlossen wir uns zu einer Reduzierung der Parameter und so zu einer vereinfachten Anwendbarkeit des NUSS – Scores. Wir erhoben keinen HbA1c, keine Blutsenkungsgeschwindigkeit, keine Knochenqualität und keine Effektivität der primären operativen Versorgung.

Die Tübinger Risikogruppen ergaben sich aus der tatsächlich durchgeführten operativen Therapie. Für Risikogruppe 1 bedeutete dies eine verbesserte mechanische Stabilität. Für Risikogruppe 2 ergab sich daraus, zusätzlich zur verbesserten mechanischen Stabilisierung, die Einbringung eines biologischen Wachstumsanreizes, z.B. über Stammzellen. Risikogruppe 3 bekam eine komplexe Behandlung mit z.B. einer Spongiosaanlagerung und dem Einbringen von Wachstumsfaktoren. Risikogruppe 4 erhielt eine Amputation, Arthrodeese oder Prothese. Da die Patientenfälle retrospektiv aufgearbeitet wurden, konnte der NUSS - Score primär nicht erhoben werden. Die Therapieempfehlungen des NUSS - Scores konnten demzufolge nicht umgesetzt werden. Deshalb wurden die Operationen retrospektiv den Therapieschemata des NUSS-Scores zugeteilt und die Risikogruppen entsprechen den Gruppen, die die Patienten mit dieser operativen Therapieversorgung bekommen hätte.

4.1.4 Tübinger Procedere vs. modifizierter Tübinger NUSS – Score

Verglichen wurden in dieser Arbeit die Risikogruppen, die die Patienten nach dem modifizierten Tübinger NUSS-Score anhand der Erhebung ihrer Risikofaktoren erreicht haben und die Tübinger Risikogruppen, die die Patienten nach dem Tübinger Procedere mit ihrer tatsächlich durchgeführten operativen Versorgung in unserer Klinik bekommen haben.

Die Ausheilung, bezogen auf die unterschiedlichen Risikogruppen im Tübinger NUSS – Score und im Tübinger Procedere, zeigte, dass das Tübinger Procedere deutlich invasiver war als die Tübinger NUSS-Score Empfehlung. Invasiver heißt in diesem Fall, dass Operationen einer Risikogruppe durchgeführt wurden, für die der Patient einen zu niedrigen Punktwert hatte. Im Mittel erreichte das Tübinger - Procedere eine Risikogruppe von 2,58, der Tübinger NUSS-Score einen Mittelwert von 2,14. Jedoch zeigte sich, dass in der Gruppe der Patienten, bei denen das Tübinger Procedere invasiver war als der Tübinger NUSS-Score, 61,5 % ausheilten. In der Gruppe, in der der Tübinger NUSS-Score invasiver war als das Tübinger Procedere heilten 60,4 % der Patienten aus. Die Gruppe der Patienten, bei denen sich NUSS-Score und Tübinger Score entsprachen, zeigte eine Ausheilungsrate von 56,9 %.

Insgesamt konnten wir also sehen, dass der NUSS-Score bei den meisten Patienten eine deutliche weniger invasive Therapie empfohlen hätte, dass sich jedoch kein Vorteil daraus in den Ausheilungsraten ergab. Es stellt sich aber die Frage, ob bei einer weniger invasiven Therapie, wie sie der NUSS empfohlen hätte, auch eine Ausheilung erreicht worden wäre.

Ebenso wie van Basten Batenburg *et al.* [6] sehen wir, dass der NUSS-Score ein valider und verlässlicher Score ist, der, an den Alltag angepasst, die Pseudarthrosen-Klassifikation von Weber und Cech [18] ablösen kann. Eine weitere Überprüfung des NUSS – Scores ist unumgänglich. Man benötigt ein größeres Patientenkollektiv, um den von uns modifizierten NUSS – Score zu validieren. Der modifizierte Tübinger NUSS – Score ist aufgrund der einfacheren Parametererhebung eindeutig alltagstauglicher geworden und liefert auch in der gekürzten Variante noch eine gute und wichtige Richtlinie für Therapiemöglichkeiten und Abschätzungen bei Pseudarthrosepatienten.

Da im NUSS – Score ebenfalls die Abfrage nach einer Diabeteserkrankung vorhanden ist, ist der HbA1c sicherlich nicht so notwendig in der Erhebung. Der HbA1c gibt zwar über die Schwere der vorliegenden Diabeteserkrankung Auskunft, allerdings ist bereits eine vorhandene Diabetes-Erkrankung ein bedeutender Risikofaktor [17] und die Unterteilung der Schweregrade nicht

ausschlaggebend unserer Meinung nach. Gleiches gilt bei der Blutsenkungsgeschwindigkeit. Heutzutage hat der CRP-Wert die Blutsenkungsgeschwindigkeit in ihrer klinischen Bedeutung abgelöst, da beide Marker für ein Infektionsgeschehen sind, der CRP-Wert jedoch leichter zu erheben und kontrollieren ist. Zudem bietet der CRP-Wert mit steigenden oder sinkenden Werten die Möglichkeit einer Beobachtung des Infektionsverlaufs, dies ist bei der Blutsenkungsgeschwindigkeit nicht möglich. Insgesamt betrachtet, kann man auf Werte wie den HbA1c und die Blutsenkungsgeschwindigkeit sicherlich verzichten, wenn dafür ein verlässliches und einfacher anzuwendendes Instrument der Pseudarthrosenbehandlung herauskommt.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass wir in unserer Studie, ebenso wie van Basten Batenburg *et al.* [6], zu dem Schluss kamen, dass der NUSS-Score ein sehr guter und praktisch anwendbarer Score ist, der die Behandlung und Therapie von Pseudarthrosepatienten unkomplizierter machen kann. Dazu schlagen wir jedoch folgende Modifizierungen vor: Das Streichen der Parameter Blutsenkung, HbA1c, Knochenqualität und die Bewertung der ersten durchgeführten Operation. Streicht man diese Werte und passt den NUSS-Score entsprechend an, so dass weiterhin vier Risikogruppen mit Behandlungsempfehlungen entstehen, ist der NUSS-Score in unseren Augen sehr viel alltagstauglicher und einfacher zu handhaben.

4.2 Prospektive Datenanalyse

Da die bisherigen Daten dieser Arbeit rein retrospektiv erhoben wurden, waren wir im Anschluss an einer prospektiven Datenerhebung interessiert. Anhand der oben beschriebenen Diskussion über mögliche Risikofaktoren sowie aus der Literatur wissen wir, dass die biologischen Prozesse eine entscheidende Rolle in der Frakturheilung spielen [22]. Die aktuelle Literatur zeigt, dass es biologische und genetische Prädispositionen geben könnte, die eine Pseudarthrose bedingen könnten [7]. Bisher ist, unseres Kenntnisstandes nach, nur wenig bei Pseudarthrosen direkt am humanen Knochen untersucht. Die meisten Daten, die bisher existieren sind systemisch im Serum erhoben [8, 98] oder am Tiermodell [99, 100] untersucht. Unsere Studie analysiert nun, als eine der ersten nach unserer Kenntnis, die Wachstumsfaktoren direkt aus dem pathologischen Knochen der Pseudarthrose. Limit ist hierbei, dass es ein seltenes Krankheitsbild ist und deshalb schwer, in kurzer Zeit viele Patienten einzuschließen. Aus diesen Patienten dann homogene Gruppen zu bilden, die eine repräsentative Gruppengröße bilden, ist umso schwieriger. Unsere Gruppen enthalten deshalb maximal acht Patienten und sind nach bestimmten Matching-Kriterien (Frakturlokalisierung, Pseudarthrosenentstehung und Art, septischem Verlauf, etc.) zusammengefasst. Als Kontrollgruppe wurden Osteotomien gewählt, deren Knochen ansonsten verworfen worden wäre.

Üblicherweise wurde in der Literatur anderer Studien immer nur ein Housekeeping Gene als Kontrolle verwendet [62, 101]. Wir sahen dann, dass die bekannten Housekeeper (GAPDH und RPL13 α) bei uns eine Mitregulierung zeigten. Die aktuelle Literatur schlägt vor, den Bestkeeper zu finden [102] oder eine Kombination aus verwendeten Genen. Wir haben daraufhin folgenden Housekeeper in der qPCR ergänzt: GAPDH [81], B2M [82], RPL13a [83], RP2, EF1 α , 18s [81] und HPRT1 [82].

Zusätzlich haben wir alle von uns untersuchten Wachstumsfaktoren in mögliche Kombinationen mit einfließen lassen. Experimentell ermittelten wir über mehrere Softwares wie Bestkeeper [102], NormFinder [84], geNorm [81] und Δ CT [82] einen nicht mitregulierenden Housekeeper. Für diese Arbeit zeigte eine

Kombination aus Noggin und Smad4 die geringste Mitregulierung, sodass wir uns dazu entschlossen, das geometrische Mittel aus der Kombination dieser Housekeeper zu nutzen.

Wir bildeten aus den prospektiv betrachteten und eingeschlossenen Patienten drei Gruppen, eine Gruppe mit Pseudarthrosen nach Arthrodesenoperation, eine Gruppe mit Pseudarthrose nach gelenknaher Fraktur und eine Gruppe mit Pseudarthrose nach schaftnaher Fraktur. Von diesen Patienten analysierten wir jeweils pseudarthrotischen Knochen und Spongiosaknochen, meistens entnommen aus dem Beckenkamm. Zusätzlich schlossen wir eine Kontrollgruppe ein. In allen Patientengruppen untersuchten wir die Expression bestimmter Wachstumsfaktoren. Diese teilten wir zuvor in angiogenetische Wachstumsfaktoren, VEGF, VEGF-R1 und VEGF-R2, in osteoblastäre Wachstumsfaktoren, BMP2, BMP7, TGF- β 1, SOST, Osteocalcin, und in den osteoklastären Wachstumsfaktor BAMBI ein.

Es ist bekannt, dass Angiogenese eine entscheidende Rolle in der Frakturheilung, besonders in der frühen Phase spielt, da über die initiale Hypoxie nach Fraktur über die Freisetzung von HIF 1 α VEGF freigesetzt wird [16]. In den folgenden Schritten der Frakturheilung sind osteoblastäre Marker entscheidend, um die Heilung voranzutreiben und im Remodeling spielen Osteoklasten die einschneidende Rolle. Die jeweiligen, oben genannten, Marker sind von uns und anderen bereits bezüglich der Frakturheilung human und im Tiermodell untersucht wurden [30, 41, 55, 61-63, 67, 69, 79, 101] und wurden deshalb von uns zur detaillierten Untersuchung ausgewählt.

Wir betrachteten die Verteilung in allen Gruppen, so wie detailliert in den Spongiosa- und Pseudarthrosengruppen.

4.2.1 Angiogenetische Wachstumsfaktoren

Zahlreiche Studien haben in der Vergangenheit eine wichtige Rolle von VEGF an der Frakturheilung gezeigt [41, 103]. Ebenfalls wurde bei einer Inhibition von VEGF eine vermehrte Ausbildung von Pseudarthrosen gesehen [104, 105]. Aufgrund dessen würde man eine verminderte Expression in Pseudarthrosen erwarten, wie in unserer Studie auch zu sehen ist. Im Gegensatz dazu haben

Sarahrudi *et al.* [106] und Weiss *et al.* [107] in Serumproben von Patienten mit Pseudarthrosen höhere VEGF-Werte als in Kontrollproben feststellen können.

In unserer Studie zeigte sich in den angiogenetischen Wachstumsfaktoren, dass VEGF sowohl im pseudarthrotischen Knochen wie auch im Spongiosaknochen weniger exprimiert ist, die Kontrollgruppe zeigte eine deutlich höhere Expression von VEGF als in den restlichen Gruppen. Auch die Spongiosagruppen zeigen eine geringere Expression von VEGF, so dass die Bildung einer Pseudarthrose nicht nur lokal Unterschiede zeigte, sondern ebenfalls in den spongiösen Knochen. Aus diesem Grund war es sehr wichtig, dass wir nicht nur die Pseudarthrosengruppen mit den Spongiosagruppen verglichen, sondern eine Kontrollgruppe hinzuzogen, um auch die, wie hier zu sehende, Expression in pseudarthrotischem und spongiösem Knochen darzustellen.

Da bisher, unserer Kenntnis nach, keine Studien an humanen Knochenproben durchgeführt wurden, können wir als erste von einer Mindereexpression von VEGF in pseudarthrotischen Knochenproben im Vergleich zur Kontrollgruppe berichten.

VEGF-R1 und VEGF-R2 zeigen ein ähnliches Expressionsmuster. Auch hier lässt sich eine generelle Expression der Wachstumsfaktoren darstellen, sowohl die Pseudarthrosengruppen wie auch die Spongiosagruppen sind im Vergleich zur Kontrollgruppe mindereexprimiert. Vergleicht man die drei untersuchten Gruppen untereinander, also die Arthrodesengruppe, die gelenknahe Pseudarthrosengruppe und die schaftnahe Pseudarthrosengruppe, zeigte die Arthrodesengruppe die geringste Rezeptorexpression. Insgesamt jedoch ist im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger ausgeprägt. Dass die angiogenetischen Wachstumsfaktoren nicht nur lokal weniger stark exprimiert sind als im gesunden Knochen, sondern auch im spongiösen Knochen, ist eine wichtige Erkenntnis in der Pseudarthrosenforschung.

4.2.2 Osteoblastäre Wachstumsfaktoren

In den osteoblastären Wachstumsfaktoren zeigte sich, dass BMP2 in den von uns untersuchten Knochenproben nicht mehr oder weniger exprimiert ist als in den Kontrollknochen. Zwischen den Pseudarthrosen und Spongiosagruppen, sowie der Kontrollgruppe zeigten sich keine Unterschiede. Zudem zeigte sich in

den einzelnen Gruppen eine große Streubreite, sodass wir davon ausgehen, dass eine größere Patientenfallzahl benötigt werden würde, um die Streubreite möglichst gering zu halten.

In Studien an Rattenknorpel aus pseudarthrotischen und gesunden Proben konnte gezeigt werden, dass die BMPs, unter anderem auch BMP-2 und BMP-7 in den Pseudarthrosen vermindert exprimiert sind. Im Vergleich dazu sind die Wachstumsfaktoren in den gesunden Knochenproben vermehrt exprimiert [108].

Lienau *et al.* haben 2010 aus Knorpelproben von Schafen mRNA isoliert und daran unterschiedliche Expressionsmuster von Wachstumsfaktoren in pseudarthrotischen Knochen und gesunden Knochen gezeigt [109]. Bei BMP2 sahen sie ebenso wie wir keine einheitliche Expression und weite Streubreiten. Das deckt sich mit unseren Ergebnissen.

BMP7 zeigt keine einheitliche Expression. In mRNA – Analysen an Schafsknorpel zeigen sich ähnliche Ergebnisse [109]. Erst im zeitlichen Verlauf lässt sich jedoch dort ein Anstieg von BMP7 im gesunden Knochen sehen. Dieser Aspekt ist in unserer Studie nicht überprüfbar, da wir keinen zeitlichen Verlauf am humanen Knochen durchführen können. Da sich jedoch die Ergebnisse in den Anfangswerten entsprechen, wäre es interessant zu sehen, ob der gesunde humane Knochen im Verlauf ebenso vermehrt BMP7 exprimiert. Die Arthrodesen-Pseudarthrosengruppe und die gelenknahe Spongiosagruppe zeigten jedoch eine große Streubreite, sodass wir auch in diesem Wachstumsfaktor eine größere Patientengruppe für notwendig erachten.

Bei TGF- β 1 zeigten sich alle Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe minderexprimiert. Bereits in anderen Studien wurde gezeigt, dass TGF - β in Pseudarthrosen im Vergleich zu heilenden Frakturen minderexprimiert ist [110, 111]. Sowohl Hankenson *et al.* im Jahr 2014 wie auch Zimmermann *et al.* im Jahr 2005 arbeiteten an humanen Blutproben von Pseudarthrosepatienten. In beiden Studien zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den TGF – β 1 Spiegel. In unserer Studie im humanen Knochen ließ sich ebenfalls ein Unterschied feststellen. Der Ansatz von Zimmermann *et al.* [111] TGF – β 1 als Prädiktor für Patienten mit erhöhtem pseudarthrotischem Risiko zu verwenden, findet bisher

so keine Anwendung im klinischen Alltag. Da sich jedoch sowohl im Blut, wie auch im Knochen, ein Unterschied zwischen Pseudarthrosepatienten und gesunden Patienten zeigte, lohnt sich die weitere Untersuchung dieses Wachstumsfaktors.

4.2.3 Osteoklastäre Wachstumsfaktoren

SOST, der für das Protein Scerostin codiert, zeigte in der Gruppe der gelenknahen Spongiosagruppe eine hohe Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe, jedoch auch eine sehr große Streubreite der einzelnen Werte. Außerdem zeigten sich in dieser Gruppe die Werte ungewöhnlich hoch, so dass die anderen Gruppen harmonischer imponieren. Eine Lösung für dieses Problem wäre ebenfalls ein größeres Patientenkollektiv, da dann beurteilt werden kann, wie groß die Streubreite tatsächlich ist und was wirkliche Ausreißer in den Werten darstellen. Insgesamt ließen sich zwischen den von uns untersuchten Gruppen und der Kontrollgruppe kaum Unterschiede sehen, so dass man nicht auf eine Mehr- oder Mindermineralisierung der Knochen schließen kann. Zum gleichen Ergebnis kommt die Studie von Clarke *et al.* [112]. Diese sahen einen geringen, allerdings nicht signifikanten Unterschied von Sclerostin zwischen normal heilenden Frakturen und Pseudarthrosen in Serumproben. Insgesamt waren die Werte im Vergleich zu Kontrollpatienten ohne Frakturen erhöht, so dass man von einem Anstieg von Sclerostin nach einer Fraktur ausgehen kann.

Insgesamt zeigt sich Osteocalcin im Vergleich zur Kontrollgruppe in den restlichen Gruppen minderexprimiert. Auch hier stellte sich die Minderexpression nicht nur lokal in den Pseudarthroseknochen dar, sondern auch in den spongiosen Knochenproben, da sich eine Expression im Spongiosaknochen nachweisen ließ. Da Osteocalcin eine wichtige Rolle in der Regulation von Knochenmasse und Knochenmineralisierung spielt, zeigten unsere Ergebnisse eine Minderausprägung dieser Merkmale, in den von uns untersuchten Pseudarthrosepatienten, in unterschiedlichen Knochenlokalisationen. In einer Studie über Stressfrakturen von Miyamoto *et al.* [113] zeigte sich im Serum eine verminderte Ausprägung von Osteocalcin in Frakturpatienten gegenüber gesunden Kontrollprobanden. Inwiefern das eine Aussage über Pseudarthrosen

zulässt, ist allerdings fraglich. Laird *et al.* [114], die an Schafsknorpel forschten, berichteten in ihrer Studie über eine vermehrte Aktivität von Osteoklasten in pseudarthrotischen Arealen. Da jedoch nur über Osteoklasten im Allgemeinen gesprochen wird, können nur geringe Schlüsse auf das Verhalten von Osteocalcin gezogen werden. In unserer Studie zeigt sich Osteocalcin in Pseudarthrosepatienten vermindert ausgeprägt, sowohl im pseudarthrotischen Knochen, wie auch im Spongiosaknochen der Patienten.

In den osteoklastären Wachstumsfaktoren zeigte BAMBI eine gegenüber der Kontrollgruppe vermehrte Expression in den Arthrodesengruppen. Sowohl die Arthrodesen-Pseudarthrosegruppe, wie auch die Arthrodesen- Spongiosagruppe waren höher ausgeprägt als die restlichen untersuchten Gruppen und die Kontrollgruppe. Die Kontrollgruppe zeigte jedoch zu den restlichen Gruppen eine höhere Expression, so dass man insgesamt von einer kongruenten Expression im pseudarthrotischen und spongiösen Knochen ausgehen kann, da sowohl die Arthrodesengruppen, wie auch die restlichen Gruppen sich gleich verhalten. Niikura *et al.* [108] sahen 2006 in ihrer Studie eine signifikante Minderexpression von BAMBI in den pseudarthrotischen Knochen gegenüber normal heilendem Knochen [108]. Bis auf die Gruppe der Arthrodesen, die jedoch sehr von Ausreißen geprägt ist, entspricht unser Ergebnis dem von Niikura *et al.* [108]. Auch wir sahen eine Minderexpression von BAMBI im pseudarthrotischen Knochen gegenüber den gesunden Kontrollknochen. Wir stimmen also mit Niikura *et al.* [108] darin überein, dass BAMBI eine wichtige Rolle in der Knochenheilung spielt, möglicherweise im Remodelling nach Fraktur.

5. Fazit

Mit einem Auftreten von bis zu 30% aller Frakturen und einem volkswirtschaftlichen Schaden von dem doppelten der normalen Behandlungskosten (25.556 \$ vs. 11.686 \$) [115] stellen Pseudarthrosen sowohl medizinisch als auch wirtschaftlich ein großes Problem dar. Der genaueren Erforschung dieses Problems hat sich die vorliegende Arbeit gewidmet.

Zum einen wurde hierfür der NUSS-Score validiert sowie zur einfacheren Verwendung im klinischen Alltag in seinen Auswahlkriterien adaptiert. Der hieraus erstandene retrospektive Anteil dieser Dissertation enthält mit 246 Patienten das unserer Kenntnis nach bislang weltweit größte homogene Patientenkollektiv, welches hierzu untersucht wurde. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der NUSS-Score mit seinen Therapieempfehlungen eine wichtige Lücke in der Klinik schließen kann. Auffällig war hierbei jedoch, dass häufig ein weniger invasives Vorgehen vorgeschlagen wird, als dies in der Klinik tatsächlich umgesetzt wird. Insgesamt konnten wir keine signifikanten Unterschiede in der Ausheilungstendenz nachweisen. Der von uns modifizierte NUSS-Score zeigte eine durchgehende Anwendbarkeit im klinischen Alltag, so dass alle Patienten eine Therapieempfehlung erhalten konnten. Da es sich hierbei um eine retrospektive Datenanalyse hält, empfehlen wir eine Anwendung des von uns modifizierten NUSS-Scores im Rahmen einer prospektiven klinischen Studie. In Folge kann dann, bei erneuter Validation, die seit 1976 bestehende, bislang gebräuchliche, Klassifikation von Weber und Cech [18] mittels des modifizierten NUSS-Score ersetzt werden.

Im prospektiven Teil der Arbeit haben wir die Ausprägung von biologischen Wachstumsfaktoren im humanen Knochen untersucht. Da die Isolation von RNA aus humanem Knochen bisher kaum durchgeführt wird, existiert unserem Kenntnisstand nach keine Vergleichsliteratur zu pseudarthrotischem Knochen. Da sich die Isolation von ausreichend RNA jedoch schwierig gestaltete, führten wir ein Pooling der RNA-Proben gematchter Patienten anhand definierter Matching-Kriterien durch. So erhielten wir ausreichend RNA um die Wachstumsfaktorenanalyse durchzuführen.

Schnell zeigte sich jedoch, dass die von uns primär verwendeten Housekeeper-Gene in humanem Knochen mitregulieren. Wir orientierten uns hierbei an bestehender Literatur [83], um neue, nicht-regulierende, Housekeeper-Gene für unsere Versuche zu verwenden. Nachdem wir zwei entsprechende Wachstumsfaktoren gefunden hatten, bildeten wir aus diesen das geometrische Mittel und verwendeten diesen Wert als Housekeeping Kontrolle [84].

Als zweites Problem ergab sich die systemische Expression einiger Wachstumsfaktoren. Wir bekamen bereits nach den ersten Versuchen den Verdacht, dass auch in unseren Spongiosagruppen, welche eigentlich als Kontrollen gedacht waren, die Wachstumsfaktoren in ihrer Expression mitregulierten. Zur Überprüfung beschlossen wir eine weitere Kontrollgruppe zu verwenden, um systemische Expressionen aufzudecken [83]. Unsere Kontrollgruppe bildeten wir aus Knochen von Patienten ohne Pseudarthrosenkomplikation. Hierbei sahen wir eine verminderte Expression von angiogenetischen Wachstumsfaktoren in Pseudarthrosepatienten. TGF- β 1, als osteoblastärer Wachstumsfaktor, zeigte ebenfalls in den Pseudarthrosepatienten eine verminderte Expression. In den osteoklastären Wachstumsfaktoren sahen wir in Osteocalcin und BAMBI eine ebenfalls verminderte Expression in den Pseudarthrosepatienten im Vergleich zu den Kontrollknochen. In Summe zeigte sich somit eine deutlich verminderte Expression von Wachstumsfaktoren im Knochen der Pseudarthrosepatienten.

Bisher einzigartig an dieser Arbeit ist, dass wir erstmals auch einen Blick in die Expression der Wachstumsfaktoren in humanen Knochen geworfen haben. Bislang wurden Wachstumsfaktoren lediglich systemisch, zum Beispiel in Serumproben, analysiert [116].

Um die Ergebnisse dieser Arbeit weiter zu vertiefen, empfehlen wir das Bilden größerer prospektiver Patientenkollektive, um Ausreißer innerhalb der Werte besser detektieren und entsprechend werten zu können. Außerdem sollte die Regulation der Wachstumsfaktoren im zeitlichen Verlauf untersucht werden, da in dieser Arbeit die Regulation der Wachstumsfaktoren eine reine Wiedergabe des Operationszeitpunktes ist.

Auch muss berücksichtigt werden, dass in dieser Arbeit nur die Ausprägung der einzelnen biologischen Wachstumsfaktoren untersucht und dargestellt wurde, also die rein transkriptive Ebene, nicht aber die Regulation der Signalwege oder die Expression der Proteine.

Literaturverzeichnis

1. Einhorn, T.A., *The cell and molecular biology of fracture healing*. Clin Orthop Relat Res, 1998(355 Suppl): p. S7-21.
2. Antonova, E., et al., *Tibia shaft fractures: costly burden of nonunions*. BMC Musculoskelet Disord, 2013. **14**: p. 42.
3. Calori, G.M., et al., *Classification of non-union: Need for a new scoring system?* Injury, 2008. **39**: p. S59-S63.
4. Abumunaser, L.A. and M.J. Al-Sayyad, *Evaluation of the calori et Al nonunion scoring system in a retrospective case series*. Orthopedics, 2011. **34**(5): p. 359.
5. Calori, G.M., et al., *Validation of the Non-Union Scoring System in 300 long bone non-unions*. Injury, 2014. **45**: p. S93-S97.
6. van Basten Batenburg, M., I.B. Houben, and T.J. Blokhuis, *The Non-Union Scoring System: an interobserver reliability study*. European Journal of Trauma and Emergency Surgery, 2019. **45**(1): p. 13-19.
7. McCoy, T.H., Jr., et al., *Genomewide Association Study of Fracture Nonunion Using Electronic Health Records*. JBMR Plus, 2019. **3**(1): p. 23-28.
8. Wei Huang, K.Z., Yangjun Zhu, Zhan Wang, Zijun Li, Jun Zhang*, *Genetic polymorphisms of NOS2 and predisposition to fracture non-union: A case control study based on Han Chinese population*. 2018.
9. Gerhard Aumüller, W.S., *Duale Reihe Anatomie, 2. Auflage*. 2010, Thieme.
10. Welsch, U.K., Wolfgang; Deller, Thomas *Histologie - Das Lehrbuch Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie*. 2018.
11. Steffen Breusch, M.C., Hans Mau, Desiderius Sabo, *Klinikleitfaden Orthopädie Unfallchirurgie*. 2019.
12. Court-Brown, C.M., *Reamed intramedullary tibial nailing: an overview and analysis of 1106 cases*. J Orthop Trauma, 2004. **18**(2): p. 96-101.
13. M. E. Müller, S.N., P. Koch, J. Schatzker, *The comprehensive classification of fractures of long bones*. 1990.
14. Pfeil, J., *Orthopädie*. 2005.
15. Bolander, M.E., *Regulation of fracture repair by growth factors*. Proc Soc Exp Biol Med, 1992. **200**(2): p. 165-70.
16. Masoud, G.N. and W. Li, *HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy*. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2015. **5**(5): p. 378-389.
17. Steinhausen, E., et al., *Pseudarthrosen*. 2013. **116**(7): p. 633-649.
18. BG Weber, O.C., *Pseudarthrosis*. Grune and Stratton, 1976.
19. Panteli, M., et al., *Biological and molecular profile of fracture non-union tissue: current insights*. J Cell Mol Med, 2015. **19**(4): p. 685-713.
20. Reed, A.A.C., et al., *Human atrophic fracture non-unions are not avascular*. 2002. **20**(3): p. 593-599.
21. Brownlow, H.C., A. Reed, and A.H. Simpson, *The vascularity of atrophic non-unions*. Injury, 2002. **33**(2): p. 145-50.
22. D. S. Elliott, K.J.H.N., D. P. Forward, D. M. Hahn, B. Ollivere, K. Kojima, R. Handley, N. D. Rossiter, J. J. Wixted, R. M. Smith, C. G. Moran, *A unified theory of bone healing and nonunion*. 2016.
23. Paley, D., et al., *Ilizarov treatment of tibial nonunions with bone loss*. Clin Orthop Relat Res, 1989(241): p. 146-65.
24. Kooistra, B.W., et al., *The Radiographic Union Scale in Tibial Fractures: Reliability and Validity*. 2010. **24**: p. S81-S86.

25. Santolini, E., R. West, and P.V. Giannoudis, *Risk factors for long bone fracture non-union: a stratification approach based on the level of the existing scientific evidence*. Injury, 2015. **46**: p. S8-S19.
26. Giannoudis, P.V., T.A. Einhorn, and D. Marsh, *Fracture healing: The diamond concept*. Injury, 2007. **38**: p. S3-S6.
27. Brinker, M.R., *Management of Aseptic*

Tibial and Femoral

Diaphyseal Nonunions

Without Bony Defects. 2016.

28. Mroz, T.E., et al., *Complications related to osteobiologics use in spine surgery: a systematic review*. Spine (Phila Pa 1976), 2010. **35**(9 Suppl): p. S86-104.
29. McKay, W.F., S.M. Peckham, and J.M. Badura, *A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft)*. Int Orthop, 2007. **31**(6): p. 729-34.
30. Leach, J. and R.G. Bittar, *BMP-7 (OP-1®) Safety in anterior cervical fusion surgery*. Journal of Clinical Neuroscience, 2009. **16**(11): p. 1417-1420.
31. Hausmann, M., et al., *[Use of Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) for the Treatment of Pseudarthroses - Efficiency and Therapy Failure]*. Z Orthop Unfall, 2014. **152**(2): p. 144-51.
32. Niedhart, C., et al., *[Complications after harvesting of autologous bone from the ventral and dorsal iliac crest - a prospective, controlled study]*. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 2003. **141**(4): p. 481-6.
33. Giannoudis, P.V., C. Tzioupis, and J. Green, *Surgical techniques: how I do it? The Reamer/Irrigator/Aspirator (RIA) System*. Injury, 2009. **40**(11): p. 1231-1236.
34. Chahla, J., et al., *Bone Marrow Aspirate Concentrate Harvesting and Processing Technique*. Arthroscopy Techniques, 2017. **6**(2): p. e441-e445.
35. S. T. J. Tsang, L.A.M., J. Frantziadis, J. P. Baren, J. F. Keating, A. H. R. W. Simpson, *Exchange nailing for nonunion of diaphyseal fractures of the tibia*. 2016.
36. Eli A. Swanson, M., * Eli C. Garrard, MD,* Daniel P. O'Connor, PhD,† and Mark R. Brinker, MD*‡, *Results of a Systematic Approach to Exchange Nailing for the Treatment of Aseptic Tibial Nonunions*. 2015.
37. Atesch Ateschrang, M., Dirk Albrecht, MD, Ulrich Stöckle, MD, Kuno Weise, MD, Fabian Stuby, MD, and Derek Zieker, MD, *High Success Rate for Augmentation Compression Plating Leaving the Nail In Situ for Aseptic Diaphyseal Tibial Nonunions*. 2013.
38. Vallier, H.A., *Current Evidence: Plate Versus Intramedullary Nail for Fixation of Distal Tibia Fractures in 2016*. 2016.
39. Yla-Herttuala, S., et al., *Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(10): p. 1015-26.
40. Robich, M.P., et al., *Myocardial therapeutic angiogenesis: a review of the state of development and future obstacles*. Expert review of cardiovascular therapy, 2011. **9**(11): p. 1469-1479.
41. Keramaris, N.C., et al., *Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF*. Injury, 2008. **39** Suppl 2: p. S45-57.
42. Gerber, H.P., et al., *VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation*. Nat Med, 1999. **5**(6): p. 623-8.
43. Ai-Aql, Z.S., et al., *Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis*. J Dent Res, 2008. **87**(2): p. 107-18.

44. Dowlati, A., *Hunting and Trapping the Vascular Endothelial Growth Factor*. 2010. **28**(2): p. 185-187.
45. Stuttfeld, E. and K. Ballmer-Hofer, *Structure and function of VEGF receptors*. IUBMB Life, 2009. **61**(9): p. 915-22.
46. Holmes, K., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition*. Cell Signal, 2007. **19**(10): p. 2003-12.
47. Even, J., M. Eskander, and J. Kang, *Bone morphogenetic protein in spine surgery: current and future uses*. J Am Acad Orthop Surg, 2012. **20**(9): p. 547-52.
48. Wozney, J.M. and V. Rosen, *Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair*. Clin Orthop Relat Res, 1998(346): p. 26-37.
49. Israel, D.I., et al., *Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells*. Growth Factors, 1992. **7**(2): p. 139-50.
50. Wozney, J., et al., *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities*. 1988. **242**(4885): p. 1528-1534.
51. Chen, D., M. Zhao, and G.R. Mundy, *Bone morphogenetic proteins*. Growth Factors, 2004. **22**(4): p. 233-41.
52. al., R.e., *Injury*. 2013.
53. Burkus, J., et al., *Anterior Lumbar Interbody Fusion Using rhBMP-2 With Tapered Interbody Cages*. Journal of spinal disorders & techniques, 2002. **15**: p. 337-49.
54. Carragee, E.J., E.L. Hurwitz, and B.K. Weiner, *A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned*. Spine J, 2011. **11**(6): p. 471-91.
55. Huang, Z., et al., *Modulating osteogenesis of mesenchymal stem cells by modifying growth factor availability*. Cytokine, 2010. **51**(3): p. 305-310.
56. Noël, D., et al., *Short-Term BMP-2 Expression Is Sufficient for In Vivo Osteochondral Differentiation of Mesenchymal Stem Cells*. 2004. **22**(1): p. 74-85.
57. Wu, M., G. Chen, and Y.-P. Li, *TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease*. Bone Research, 2016. **4**(1): p. 16009.
58. Zimmermann, G., et al., *Klinische Erfahrungen mit Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP 7) bei Pseudarthrosen langer Röhrenknochen*. Der Unfallchirurg, 2006. **109**(7): p. 528-537.
59. Friedlaender, G.E., et al., *Osteogenic Protein-1 (Bone Morphogenetic Protein-7) in the Treatment of Tibial Nonunions: A Prospective, Randomized Clinical Trial Comparing rhOP-1 with Fresh Bone Autograft**. The Journal of bone and joint surgery. American volume, 2001. **83-A Suppl 1**(Pt 2): p. S151-S158.
60. Ye, F., et al., *Comparison of the use of rhBMP-7 versus iliac crest autograft in single-level lumbar fusion: a meta-analysis of randomized controlled trials*. Journal of Bone and Mineral Metabolism, 2018. **36**(1): p. 119-127.
61. Lamplot, J.D., et al., *BMP9 signaling in stem cell differentiation and osteogenesis*. Am J Stem Cells, 2013. **2**(1): p. 1-21.
62. Sreekumar, V., et al., *BMP9 a possible alternative drug for the recently withdrawn BMP7? New perspectives for (re-)implementation by personalized medicine*. Archives of Toxicology, 2016. **91**.
63. Heldin, C.H., K. Miyazono, and P. ten Dijke, *TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins*. Nature, 1997. **390**(6659): p. 465-71.
64. *SMAD4: a gatekeeper of the bone*. Journal of Cell Science, 2013. **126**(21): p. e2104.
65. Attisano, L. and J.L. Wrana, *Signal integration in TGF- β , WNT, and Hippo pathways*. F1000Prime Rep, 2013. **5**: p. 17.

66. Massague, J. and Y.G. Chen, *Controlling TGF-beta signaling*. Genes Dev, 2000. **14**(6): p. 627-44.
67. Yan, X., et al., *Human BAMBI cooperates with Smad7 to inhibit transforming growth factor-beta signaling*. J Biol Chem, 2009. **284**(44): p. 30097-104.
68. Tricoli, J.V., et al., *The gene for human transforming growth factor alpha is on the short arm of chromosome 2*. Cytogenet Cell Genet, 1986. **42**(1-2): p. 94-8.
69. Massague, J., S.W. Blain, and R.S. Lo, *TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders*. Cell, 2000. **103**(2): p. 295-309.
70. Li, X., et al., *Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling*. J Biol Chem, 2005. **280**(20): p. 19883-7.
71. van Bezooijen, R.L., et al., *Wnt but not BMP signaling is involved in the inhibitory action of sclerostin on BMP-stimulated bone formation*. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research, 2007. **22**(1): p. 19-28.
72. Cejka, D., et al., *Sclerostin and Dickkopf-1 in renal osteodystrophy*. Clin J Am Soc Nephrol, 2011. **6**(4): p. 877-82.
73. Pelletier, S., et al., *The relation between renal function and serum sclerostin in adult patients with CKD*. Clin J Am Soc Nephrol, 2013. **8**(5): p. 819-23.
74. Mirza, F.S., et al., *Serum sclerostin levels negatively correlate with parathyroid hormone levels and free estrogen index in postmenopausal women*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(4): p. 1991-7.
75. Bailey, S., et al., *Osteocalcin and osteopontin influence bone morphology and mechanical properties*. Ann N Y Acad Sci, 2017.
76. Tsao, Y.T., et al., *Osteocalcin Mediates Biomineralization during Osteogenic Maturation in Human Mesenchymal Stromal Cells*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(1).
77. Lin, Z., et al., *The pseudoreceptor BMP and activin membrane-bound inhibitor positively modulates Wnt/beta-catenin signaling*. J Biol Chem, 2008. **283**(48): p. 33053-8.
78. Krause, C., A. Guzman, and P. Knaus, *Noggin*. Int J Biochem Cell Biol, 2011. **43**(4): p. 478-81.
79. Blázquez-Medela, A.M., M. Jumabay, and K.I. Boström, *Beyond the bone: Bone morphogenetic protein signaling in adipose tissue*. Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity, 2019. **20**(5): p. 648-658.
80. Marcelino, J., et al., *Human disease-causing NOG missense mutations: effects on noggin secretion, dimer formation, and bone morphogenetic protein binding*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(20): p. 11353-11358.
81. Chen, D., et al., *Evaluation and identification of reliable reference genes for pharmacogenomics, toxicogenomics, and small RNA expression analysis*. J Cell Physiol, 2011. **226**(10): p. 2469-77.
82. Silver, N., et al., *Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR*. BMC Mol Biol, 2006. **7**: p. 33.
83. Vigano, M., et al., *Housekeeping Gene Stability in Human Mesenchymal Stem and Tendon Cells Exposed to Tenogenic Factors*. Tissue Eng Part C Methods, 2018. **24**(6): p. 360-367.
84. Claus Lindbjerg Andersen, J.L.J.a.T.F.Ø., *Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets*. 2004.

85. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, [21] *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*, in *Methods in Enzymology*. 1987, Academic Press. p. 335-350.
86. J. Rassow, K.H., R. Netzker, R. Deutzmann, *Duale Reihe Biochemie, 4. Auflage*. 2016.
87. Kleppe, K., et al., *Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases*. *J Mol Biol*, 1971. **56**(2): p. 341-61.
88. Okayama, H. and P. Berg, *High-efficiency cloning of full-length cDNA*. *Mol Cell Biol*, 1982. **2**(2): p. 161-70.
89. Kubista, M., et al., *The real-time polymerase chain reaction*. *Mol Aspects Med*, 2006. **27**(2-3): p. 95-125.
90. Zipper, H., et al., *Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(12): p. e103.
91. Holzapfel, B. and L. Wickert, *Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete*. *Biologie in unserer Zeit*, 2007. **37**(2): p. 120-126.
92. Lumpkin, O.J., P. Déjardin, and B.H. Zimm, *Theory of gel electrophoresis of DNA*. *Biopolymers*, 1985. **24**(8): p. 1573-1593.
93. Miller, L. *Analyzing gels and western blots with ImageJ*. 2010.
94. C. A. Schneider, W.S.R.a.K.W.E., *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. 2012.
95. Bortz, J., *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler*. 2005.
96. Rinne, H., *Taschenbuch der Statistik*. 2003.
97. Whelan, D.B., et al., *Development of the radiographic union score for tibial fractures for the assessment of tibial fracture healing after intramedullary fixation*. *J Trauma*, 2010. **68**(3): p. 629-32.
98. Christian Zeckey, F.H., Lena-Marie Glaubitz, Simon Ju"rgens, Theresa Ludwig, Hagen Andruszkow, Tobias Hu"fnier, Christian Krettek, Manfred Stuhmann, *Are Polymorphisms of Molecules Involved in Bone Healing Correlated to Aseptic Femoral and Tibial Shaft Non-Unions?* 2011.
99. Oetgen, M.E., et al., *Development of a femoral non-union model in the mouse*. *Injury*, 2008. **39**(10): p. 1119-1126.
100. P. Garcia, T. Histing , J.H. Holstein , M. Klein , M.W. Laschke , R. Matthys , A. Ignatius J. Lienau, A. Peters, B. Willie, G. Duda, L. Claes, T. Pohlemann , B. Wildemann and M.D. Menger, *RODENT ANIMAL MODELS OF DELAYED BONE HEALING AND NON-UNION FORMATION: A COMPREHENSIVE REVIEW*. 2013.
101. Reumann, M.K., et al., *Production of VEGF receptor 1 and 2 mRNA and protein during endochondral bone repair is differential and healing phase specific*. *J Appl Physiol* (1985), 2010. **109**(6): p. 1930-8.
102. Michael W. Pfaffl, A.T., Christian Prgomet & Tanja P. Neuvians, *Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations*. 2004.
103. Beamer, B., C. Hettrich, and J. Lane, *Vascular endothelial growth factor: an essential component of angiogenesis and fracture healing*. *Hss j*, 2010. **6**(1): p. 85-94.
104. Gaston, M.S. and A.H. Simpson, *Inhibition of fracture healing*. *J Bone Joint Surg Br*, 2007. **89**(12): p. 1553-60.
105. Hausman, M.R., M.B. Schaffler, and R.J. Majeska, *Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis*. *Bone*, 2001. **29**(6): p. 560-564.
106. Sarahrudi, K., et al., *VEGF serum concentrations in patients with long bone fractures: a comparison between impaired and normal fracture healing*. *J Orthop Res*, 2009. **27**(10): p. 1293-7.

107. Weiss, S., et al., *The systemic angiogenic response during bone healing*. Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery, 2009. **129**(7): p. 989-997.
108. Niikura, T., D.J. Hak, and A.H. Reddi, *Global gene profiling reveals a downregulation of BMP gene expression in experimental atrophic nonunions compared to standard healing fractures*. Journal of Orthopaedic Research, 2006. **24**(7): p. 1463-1471.
109. *Insight into the Molecular Pathophysiology of Delayed Bone Healing in a Sheep Model*. Tissue Engineering Part A, 2010. **16**(1): p. 191-199.
110. Hankenson, K.D., G. Zimmerman, and R. Marcucio, *Biological perspectives of delayed fracture healing*. Injury, 2014. **45 Suppl 2**(0 2): p. S8-s15.
111. Zimmermann, G., et al., *TGF-beta1 as a marker of delayed fracture healing*. Bone, 2005. **36**(5): p. 779-85.
112. Clarke, B.L. and M.T. Drake, *Clinical utility of serum sclerostin measurements*. Bonekey Rep, 2013. **2**: p. 361.
113. Miyamoto, T., et al., *Elevated Creatine Kinase and Lactic Acid Dehydrogenase and Decreased Osteocalcin and Uncarboxylated Osteocalcin are Associated with Bone Stress Injuries in Young Female Athletes*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 18019.
114. Laird, R., et al., *Bone allograft non-union is related to excessive osteoclastic bone resorption: A sheep model study*. Histology and histopathology, 2007. **21**: p. 1277-85.
115. Antonova, E., et al., *Tibia shaft fractures: costly burden of nonunions*. BMC Musculoskeletal Disorders, 2013. **14**(1): p. 42.
116. Weiss, S., et al., *Systemic regulation of angiogenesis and matrix degradation in bone regeneration - Distraction osteogenesis compared to rigid fracture healing*. Bone, 2006. **37**: p. 781-90.

Erklärung zum Eigenanteil

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die eingereichte Dissertation eigenständig verfasst, die für die Arbeit benutzten Hilfsmittel und Quellen genannt und die Ergebnisse beteiligter Mitarbeiter sowie anderer Autoren klar gekennzeichnet habe.

Die Arbeit wurde am Siegfried Weller Institut unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Andreas K. Nüssler durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Andreas K. Nüssler und Dr. Marie Reumann.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung und unter Unterstützung von Dr. Sabrina Ehnert, Marc Ruoß, Milena Krach und Bianca Braun eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie (Lina Maria Serna Higuita) durchgeführt.

Ich versichere, die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten an der Eberhard-Karls-Universität beachtet zu haben.

Ich habe weder die Dissertation oder Teile der Dissertation als Prüfungsarbeit bei einem anderen Fachbereich eingereicht noch ein Promotionsverfahren bei einer anderen Hochschule beantragt.

Ich versichere, dass alle von mir gemachten Angaben wahrheitsgemäß und vollständig sind.

Tübingen,
den 16.07.2020

Ort, Datum

Unterschrift des Antragstellers/der Antragstellerin

Danksagung

Ich möchte mich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. Andreas K. Nüssler, für das Ermöglichen dieser Arbeit, die zur Verfügung gestellten Materialien und Geräte, sowie seine kontinuierliche Unterstützung und Rückmeldung bei ihrer Umsetzung.

Frau Dr. Marie Reumann, für die anhaltende, geduldige und unermüdliche Unterstützung während der Arbeit. Das unerlässliche Lösen kleiner wie großer Probleme, das offene Ohr und die Denkanstöße.

Frau Dr. Sabrina Ehnert, für das geduldige Beantworten aller Fragen, die Unterstützung in der Durchführung der Arbeit und die aufmunternden Worte zwischendurch.

Allen Mitarbeitern des Siegfried Weller Instituts, die mit ihrer Hilfe und ihrem Engagement einen großen Teil zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben.