

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, und
Wiederherstellungschirurgie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Michael J. Raschke -

**Der Einfluss vom
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)
auf die Muskelregeneration im Traumamodell mit
Beinverkürzung und -distraktion**

**INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae**

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Gorschlüter, Mohammed Karim
aus Damaskus/Syrien

2010

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan : Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter : Univ.-Prof. Dr. med. Michael J. Raschke

2. Berichterstatter : Univ.-Prof. Dr. med. Rainer H. Meffert

Tag der mündlichen Prüfung : 03.08.2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Michael J. Raschke -

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Michael J. Raschke
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Rainer H. Meffert

ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluss vom Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) auf die Muskelregeneration im Traumamodell mit Beinverkürzung und -distraction

Mohammed Karim Gorschlüter

Einleitung: Nach der Entdeckung des endothelialen Wachstumsfaktors 1983 und seiner wichtigen Rolle in der Neovaskularisation kam es zu einem explosionsartigen Anstieg in der Forschung nach Regulationsmechanismen der Angiogenese. VEGF ist bei vielen Gewebearten beteiligt, u.a. auch bei der Muskulatur. Neue Erkenntnisse zeigen, dass VEGF die Muskelzellen vor der Apoptose schützt und an der Bildung neuer Muskelfasern beteiligt ist und somit die Regeneration stimuliert. Unser Versuch (Aktenzeichen 50.0835.1.0 (G12/2001)) stützt sich auf diese Erkenntnisse in der Literatur

Material und Methode: 22 ausgewachsene, männliche Neuseeland Weiß Kaninchen mit einem Körpergewicht von 3500 g \pm 280 g wurden in 2 Gruppen unterteilt. Bei allen Tieren erfolgte an einem Unterschenkel durch 90 Minuten Ischämie (Tourniquet) und 30 Minuten Anlage einer Kontusionsklemme (10 N auf 1 cm²) eine Unterschenkeltraumatisierung, um ein Kompartmentsyndrom und damit eine Weichteiltraumatisierung auszulösen. Danach wurde ein 1 cm großer Knochenblock rezisiert. Die Testgruppe erhielt ein VEGF₁₆₅-getränktes Kollagen in den Frakturbereich. Anschließend erfolgte die graduelle Distraction von 1 mm/24h für zehn Tage zur Wiederherstellung der Ausgangslänge. Die Kompartimentdrücke wurden unmittelbar vor und nach der Traumatisierung, postoperativ und anschließend nach 24 h und 48 h gemessen, simultan wurde auch der Blutdruck gemessen. Die Muskelkraftmessung erfolgte vor der Traumatisierung sowie postoperativ in 5 Tages-Abständen. Nach 40 Tagen wurden die Tiere getötet und histomorphometrisch und immunhistologisch untersucht und die ermittelten Daten miteinander verglichen.

Ergebnisse: Wir konnten nachweisen, dass durch die erfolgte Traumatisierung tatsächlich eine signifikante Erhöhung des Muskellogendruckes im ventralen Kompartments von 30 mmHg bei allen Versuchstieren erzeugt wurde. Der Vergleich der Muskelkrafterholung mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe zeigte eine signifikant höhere Muskelkraftregeneration (86 % vs. 52 %). Außerdem beobachteten wir eine signifikant geringere Narbengewebsbildung in der Muskulatur (2,5 % vs. 9,9 %). In der Immunhistologie stellten wir nach 40 Tagen keine signifikante Gefäßneubildung gegenüber der Kontrollgruppe fest.

Schlussfolgerung: Die VEGF₁₆₅-Gabe reduzierte das durch die Muskeltraumatisierung entstehende Narbengewebe und führte zu einer besseren Muskelregeneration. Dieser Vorgang wurde nicht nur durch eine Verbesserung der Muskeldurchblutung, sondern wahrscheinlich auch durch eine vermehrte Aktivierung von Entzündungszellen und Sattelitzellen sowie myogenen Vorläuferzellen verursacht. Die Gefäßreaktion konnte nach 40 Tagen immunhistologisch nicht mehr nachgewiesen werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 03.08.2010

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	8
1.1 Das Ziel dieser Studie	9
1.2 Die Neovaskularisation	11
1.2.1 Vaskulogenese	11
1.2.2 Angiogenese	12
1.2.2.1 Sprouting	12
1.2.2.2 Non-Sprouting	14
1.3 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	15
1.3.1 VEGF in der Frakturheilung	22
1.3.2 VEGF in der Weichteilkonsolidierung	24
1.4 Das Kompartmentsyndrom	26
1.4.1 Das akute Kompartmentsyndrom	29
1.4.2 Das funktionelle Kompartmentsyndrom	36
2. Material und Methode	38
2.1 Studiendesign	38
2.2 Studienablauf	38
2.3 Versuchstiere	40
2.4 Operationsmethode	41
2.4.1 Narkose, Anästhesie	41
2.4.2 Traumatisierung	42
2.4.3 Operationstechnik	43

2.5	Kompartimentdruckmessung	45
2.6	Kallusdistraktion	48
2.7	Muskelkraftmessung	48
2.8	Radiologisches Monitoring	52
2.9	Tötung und Probenentnahme	52
2.10	Aufarbeitung der Proben	53
2.10.1	Gewinnung der histologischen Schnitte	53
2.10.2	Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE)	54
2.10.3	Azan-Färbung nach Heidenhain	55
2.11	Histomorphometrie	56
2.12	Immunhistochemische Analyse	57
2.13	Statistik	58
3.	Ergebnisse	59
3.1	Kompartimentdruck	59
3.2	Muskelkraft	62
3.3	Histomorphometrie	64
3.4	Immunhistologie	70
4.	Diskussion	72
4.1	Beurteilung der in vivo Untersuchungen	72
4.2	Beurteilung der in vitro Untersuchungen	78
4.3	Schlussfolgerung	82

5. Literaturverzeichnis	84
6. Abbildungsverzeichnis	95
6.1 Diagrammverzeichnis	97
6.2 Tabellenverzeichnis	97
7. Anhang	98
7.1 Lebenslauf	98
7.2 Danksagung	100

1. Einleitung

Unfälle mit einem Hochrasanztrauma können zu offenen Frakturen mit Weichteilverletzungen und dem Verlust von Knochensegmenten führen, dabei sind besonders die unteren Extremitäten betroffen (75).

Gerade Motorradunfälle führen sehr häufig zu Unterschenkelfrakturen. Retrospektive Studien von Wick et al. (117-119) zeigten, dass die untere Extremität in 46 % der Fälle betroffen war. Speziell die Tibiafraktur ist aufgrund der Anatomie und der kritischen Blutversorgung im distalen Drittel durch mögliche Komplikationen wie ein Kompartmentsyndrom (s.u.), eine Infektion und eine mögliche Verzögerung der Frakturheilung gefürchtet (1).

Eine schnelle und adäquate Therapieeinleitung mit Debridement von Knochen- und Weichteilgewebe sowie eine minimalinvasive Knochenfixierung, die die Gewebserfusion und damit auch die Heilungsrate steigert und das Infektionsrisiko senkt, sollte bei einer Tibiafraktur möglichst angestrebt werden (75).

Bei einem manifesten Kompartmentsyndrom wird frühzeitig eine Fasziotomie durchgeführt, um den Logendruck zu senken und mögliche Folgen zu vermeiden. Nicht selten kann es bei zu später Diagnose zur Funktionseinbuße bis hin zur Amputation der betroffenen Extremität kommen und damit das Outcome der Erkrankung erheblich verschlechtern (73).

Seit der Entdeckung des Vascular Endothelial Growth Factor (s.u.) vor ca. 20 Jahren kam es zu einem explosionsartigen Interesse in der Regulation der Angiogenese, besonders im Bereich der Onkologie erhoffte man sich einen neuen Durchbruch in der Krebstherapie (48).

Die neuen Erkenntnisse über VEGF und die Neovaskularisation sowie andere Studien wie Kleinheinz et al. (60) und Arsic et al. (3) veranlassten unsere Gruppe, diesen Wachstumsfaktor in unserer Forschung mit einzubeziehen.

1.1 Ziel dieser Studie

In einer Studie von Meffert et al. (74, 76) wurde der Einfluss eines Weichteiltraumas auf die Muskel- und Kallusregeneration evaluiert. Hierbei wurden 2 Gruppen mit je 11 Neuseeland Weiß Kaninchen miteinander verglichen. Einer Gruppe wurde ein definiertes Weichteiltrauma, ein Kompartmentsyndrom, zugeführt, danach ein 10 mm großer Knochenblock resiziert und nachfolgend für 10 Tage distrahiert. In der Kontrollgruppe wurde auf jegliche Weichteiltraumatisierung verzichtet. Während dieser 40-tägigen Studie wurden Muskelkraftmessungen und radiologische Aufnahmen durchgeführt. Am 40. postoperativen Tag erfolgte die radiologische, biomechanische und histomorphometrische Analyse, die mit der Kontrolle verglichen wurde.

Die Ergebnisse der Kallusuntersuchung zeigten eine signifikante Beeinträchtigung der Kallusqualität im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei Regeneratversagen, ein fehlendes Remodeling oder Pseudoarthrosen bei keinem der Tiere festzustellen waren.

Es stellte sich ferner heraus, dass keines der Versuchstiere der Traumagruppe seine volle Muskelkraft wiedererlangte und dass signifikante Unterschiede in der Muskelkraft im Seitenvergleich vorlagen.

Außerdem zeigten die histologischen und histomorphometrischen Untersuchungen eine deutliche Verdrängung des Muskelgewebes durch Narbengewebe bzw. Bindegewebe, aus denen Rückschlüsse auf die Muskelregeneration gezogen wurden. Letztendlich führte die Untersuchung zur der Schlussfolgerung, dass sowohl die Knochenqualität als auch der Muskelfunktion durch das zugeführte Weichteiltrauma beeinträchtigt wurden.

Der gegenwärtige Versuch baut auf die Resultate der oben erwähnten Studie von Meffert et al. (74, 76) auf. Da die externe Gabe vom Wachstumsfaktor VEGF bei Kleinheinz et al. (60) zu einer signifikant höheren Knochenflächendichte und Knochenregeneration führte, entschieden wir uns, die möglichen Auswirkungen auf die Knochen- und Muskelregeneration durch die zusätzliche Applikation von VEGF im Traumamodell des Kaninchenschenkels zu untersuchen.

Zumal in einem anderen Versuch von Arsic et al. (3) auch die Muskelregeneration durch VEGF stimuliert werden konnte, erwarteten wir von VEGF sowohl in der Knochenqualität als auch in der Muskelfunktionalität einen positiven Effekt. Um weitere

Tierversuche zu vermeiden, verglichen wir unsere Daten mit den Ergebnissen der letzten Untersuchung von Meffert et al. (74, 76) auf Signifikanz.

Diese Dissertation beschäftigt sich hauptsächlich mit den Veränderungen der Muskulatur bezüglich Weichteiltrauma und VEGF Applikation.

Verglichen werden die Muskelkraftherholung, die Histomorphometrie bezüglich des Anteils von Narbengewebe in der Muskulatur und die immunhistologische Bestimmung der Gefäßzahl beider Gruppen auf mögliche Signifikanz und Korrelation. Außerdem werden die Kompartimentdrucksenkung und ihr Verlauf nach der Operation bestimmt und gegenübergestellt.

Die Ergebnisse der Knochenveränderungen werden von den Doktoranden Karla Schütte und Niklas Deventer in Ihren jeweiligen Dissertationen beschrieben.

Die Arbeitshypothese wird folgendermaßen formuliert:

- VEGF wird keinen Einfluss auf die Muskelkraftherholung, auf die Histomorphometrie oder Immunhistologie haben (H0).
- VEGF wird:
 - die Muskelkraftherholung verbessern (H1),
 - das Narbengewebe in der Muskulatur senken (H2),
 - zu einer deutlichen Gefäßneubildung in der Muskulatur führen (H3).

1.2 Die Neovaskularisation

Die Blutgefäßbildung unterscheidet die Vaskulogenese und Angiogenese, und sie ist eine fundamentale Voraussetzung für die Organbildung und –differenzierung während der Embryogenese und für viele postnatale, physiologische und pathologische Prozesse im Körper verantwortlich. Besonders zu erwähnen sind der Menstruationszyklus, die Wundheilung, die Gewebischämie und das Remodeling sowie die Neovaskularisation bei Neoplasien (25, 33).

Diese Erkenntnis führte zu einem überaus großen Interesse an der Regulation der Blutgefäßbildung, besonders im Bereich der Onkologie (25, 48).

Ein wichtiges und essentielles Schlüssel-molekül sowohl in der Vaskulogenese als auch in der Angiogenese ist der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), der besonders durch die Hypoxie stimuliert wird (25, 66).

1.2.1 Vaskulogenese

Die Bildung von Blutgefäßen durch Differenzierung von mesodermalen Angioblasten zu Endothelzellen mit nachfolgender Bildung eines primitiven, vaskulären Netzwerkes wird als Vaskulogenese bezeichnet und ist ein essentieller Mechanismus in der Organogenese. Anders als bei der Angiogenese sind keine vorhandenen Epithelzellen zur Gefäßbildung nötig (25, 92).

Entgegen früherer Meinungen weiß man heute, dass diesem Prozess neben der Embryogenese auch im ausgereiften Körper bei bestimmten physiologischen und pathologischen Situationen wie der Wund- und Gewebshheilung sowie der Ischämie und der Tumorangiogenese, eine besondere Bedeutung zukommt. Man nimmt an, dass das Knochenmark, das ein reiches Reservoir an gewebsspezifischen Stamm- und Vorläuferzellen besitzt, auch über eine knappe Anzahl an endothelialen Vorläuferzellen (Endothelial Cell Precursors, EPC) verfügt, die bei bestimmten Situationen mobilisiert und freigesetzt werden (10, 17, 25, 90, 92). Die endothelialen Vorläuferzellen (EPC) konnten erstmals 1997 im peripheren Blut identifiziert werden (5).

Durch die Beobachtungen von Asahara et al. (4) konnte gezeigt werden, dass die Neovaskularisation nicht ausschließlich auf die Angiogenese zurückzuführen war, so dass auch von einer postnatalen Vaskulogenese ausgegangen werden musste.

Andere Studien beweisen, dass die externe Applikation von VEGF zum Anstieg dieser Vorläuferzellen im Blut führte, und dass man davon ausgehen muss, dass sowohl der angiogenetische als auch der vaskulogenetische Prozess in ischämischem Gewebe induziert wird (6, 57). Diese Tatsache führte zu einer erneuten Bedeutung der Vaskulogenese in der Forschung über die Gefäßbildung (25).

1.2.2 Angiogenese

Als Angiogenese wird per Definitionem ein Prozess bezeichnet, bei dem durch Wachstum und Umstrukturierung aus einem primitiven, kapillären Gefäßnetzwerk ein komplexes und reifes Gefäßnetzwerk entsteht. Vorhandene Epithelzellen sind eine Voraussetzung für die Angiogenese. Sie spielt sowohl in der Embryonalentwicklung als auch im ausgereiften Organismus eine wichtige Rolle im Körper (92).

Man unterscheidet in der Angiogenese zwei verschiedene Formen der Gefäßbildung: „Sprouting“ und „Non- Sprouting“ oder „Intussusception“ (92).

1.2.2.1 Sprouting

Die Aussprossung neuer Gefäße aus bereits existierenden Strukturen läuft in mehreren Phasen ab (92). Eine kurze schematische Veranschaulichung des komplexen Mechanismus macht Abbildung 1 deutlich.

1. Zunächst kommt es zur Dilatation und Füllung der Gefäße mit einer Zunahme der Gefäßpermeabilität und Fenestrierung, einhergehend mit extravaskulären Fibrinablagerungen als Antwort auf VEGF und der erhöhten NO-Produktion. Es entsteht eine vorläufige, extrazelluläre Matrix zur Stabilisierung der Gefäßwand.

2. Die Freisetzung von Serinproteasen der Plasminogenaktivatorfamilie und Matrixmetalloproteasen aus verschiedenen Zellen, einschließlich Endothelzellen und Fibroblasten sowie Entzündungszellen, führen zum Abbau der Basalmembran und der gefäßumgebenden Extrazellulärmatrix. Damit wird der Weg frei für die Endothelmigration zum Ort des Stimulationsreizes.

3. Die Plasminogenaktivatoren u-PA und t-PA konvertieren das aus dem Plasma ausgetretene Plasminogen zu Plasmin, das wiederum Fibronectin, Laminin und andere Proteine abbaut. Zusätzlich aktiviert Plasmin weitere Metalloproteasen und induziert die Mobilisation von FGF (Fibroblast Growth Factor) aus dem Extrazellulärraum.

Angiopoetin-2 fördert den Abbau von Perizyten, die die Endothelzellen in ihrer Proliferation hemmen. Es kommt somit zur Endothelzellmigration und –proliferation sowie der Ausbildung eines Kapillarlumens (28, 37, 48).

Eine Vielzahl von proangiogenetischen Wachstumsfaktoren sind neben VEGF für die Angiogenese verantwortlich. Wichtig zu erwähnen sind das Fibroblast Growth Factor (FGF), das Epidermal Growth Factor (EGF), das Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) sowie das Placental Growth Factor (PlGF). Dabei spielt VEGF ein Schlüsselmolekül in der Einleitung der angiogenetischen Kaskade und ist zusätzlich wichtig neben FGF für die Proliferation, Migration und für das Überleben der Endothelzellen. Eine Verschiebung im Gleichgewicht zugunsten der proangiogenen Stimuli wird in der Literatur als „Angiogenic Switch“ bezeichnet (25, 48).

4. Durch die Anastomosierung der neu gebildeten Kapillaren und den Beginn der Durchblutung wird die Reifung der neu gebildeten Gefäße eingeleitet. Zur Entwicklung und Stabilisierung der Wandstruktur kommt es durch Rekrutierung und Differenzierung von glatten Muskelzellen und Perizyten durch PDGF-BB, TGF- β 1 (Transforming Growth Factor β 1) und Angiopoetin1 (28, 48, 92).

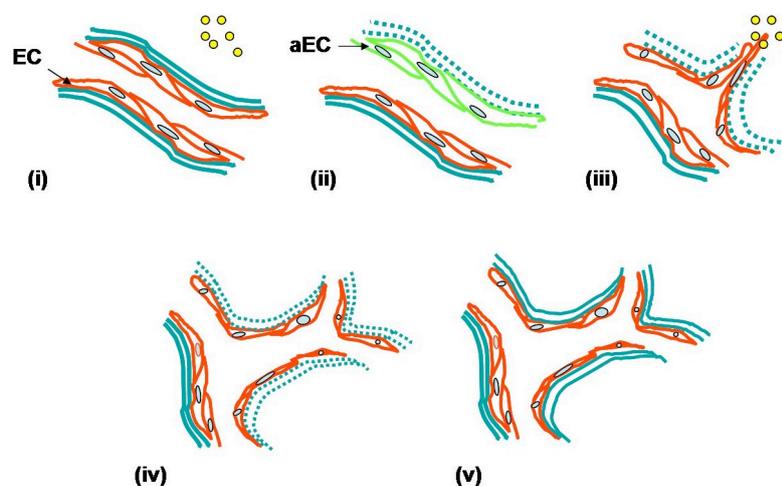


Abbildung 1: Sprouting Angiogenese. (i) Aktivierung von Endothelzellen (EC) durch VEGF (gelbe Punkte); (ii) Freisetzung von Proteasen aus aktivierten Endothelzellen (aEC) und Degeneration der Basalmembran (blaugepunktete Linie); (iii) chemotaktische Migration der Endothelzellen Richtung Stimulationsreiz; (iv) Proliferation von EC und Lumenbildung; (v) Reifung der neugebildeten Gefäße.

Quelle: Yue et al. Chinese Medicine 2007 (125)

1.2.2.2 Non-Sprouting oder Intussusception

Das Non-Sprouting wurde erstmals im postnatalen Kapillarbett der Lunge von Kaninchen beschrieben (62).

Unter Non-Sprouting oder Intussusception versteht man die Spaltung der bereits durch die Sprouting Angiogenese gebildeten Gefäße. Hierbei kommt es zu einer schnellen Expansion des Gefäßnetzwerks, das zu einer Optimierung und Vergrößerung der Gefäßoberfläche führt (62).

Durch Protrusion der gegenüberliegenden Kapillarwände ins Lumen bildet sich eine Kontaktzone zwischen den Endothelzellen, die das Gefäßlumen partitioniert (62).

Definitiv weiß man, dass dieser Prozess schneller und ökonomischer als die Sprouting Angiogenese verläuft. Darüber hinaus besteht keine primäre Abhängigkeit von Endothelzellproliferation und -migration, jedoch ist ein vorhandenes Gefäßnetzwerk unabdingbar (28).

1.3 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Die Geschichte des VEGFs reicht bis zum Jahr 1983, als Senger et al. (95) ein Protein entdeckten, das 50.000-mal effektiver wirkte als Histamin. Nach seinen Auswirkungen auf die Gefäßzellen nannten sie das Protein Vascular Permeability Factor (VPF).

Kurz danach, im Juni 1989, isolierten Ferrara et Henzel (35) ein zellspezifisches Mitogen und bezeichneten es auch nach seiner begrenzten spezifischen Wirkung auf die Zielzellen VEGF. Erst die Desequenzierung beider Proteine im selben Jahr zeigte, dass VPF und VEGF identisch waren.

Nach der Entdeckung des VEGFs wurden 1990 dessen Rezeptoren von Vaisman et al. (111) charakterisiert.

Struktur und Isoformen des VEGFs

Zur VEGF Familie gehören die 45 kDa großen Glykoproteine VEGF-A sowie VEGF-B, die VEGF-C, VEGF-D und der Placental Growth Factor (PlGF), die sich mit unterschiedlicher Affinität und Aufgabe an die drei VEGF Rezeptoren (VEGFR-1 bis 3) binden können (94).

Ein entsprechendes Homologon wurde im Genom des Parapoxvirus Orf (VEGF-E) und im Gift der Viper-Schlange (VEGF-F) entdeckt, das VEGF ähnliche Wirkungen besitzt (94).

Der Mensch verfügt über fünf verschiedene Gene für die Bildung von VEGF (VEGF-A bis D und PlGF) und deren Isoformen, die auf verschiedene Chromosomen verteilt sind. Durch alternatives Splicing der m-RNA lassen sich die Isoformen bilden, die nach der Anzahl ihrer Aminosäuren benannt werden (94).

Das auf dem Chromosom 6p21.3 lokalisierte VEGF-A Gen spielt mit seinen Isoformen die entscheidende Rolle bei der Induktion der Angiogenese und Vaskulogenese und ist codiert durch acht Exons und sieben Introns mit einer Gesamtgenlänge von 14 Kb (33, 34, 94). Es sind mindestens sechs Isoformen (121, 145, 165, 183, 189 und 206 Aminosäurenreste) von VEGF-A bekannt (das VEGF der Maus besitzt eine Aminosäure weniger), die individuelle, aber überlappende Funktionen bei der Angiogenese besitzen, bedingt durch ihre Bindungsaffinität zu Heparan-/Heparinsulfat in der Extrazellulärmatrix (ECM) und zu Neuropilin (s.u.) (34, 94).

Die Auswirkungen von VEGF-A sind eng verbunden mit der Isoform 165, die alle nötigen Informationen für die Blutgefäßbildung besitzt (33, 34). Dieses wird durch Stalmans et al. (98) gestützt, bei dem genmanipulierte Mäuse, die nur die Isoform 164 (entsprechend humanes VEGF₁₆₅) produzierten, vollkommen gesund geboren wurden. VEGF₁₆₅ hat eine mittelnde Eigenschaft, denn es besitzt eine diffusionsfähige Rezeptorbindungsstelle (amino-terminal domaine) ähnlich VEGF₁₂₁ und ein Carboxylende für die Bindung von Heparinsulfat in der ECM, wohingegen das frei sezernierte und schwach saure VEGF₁₂₁ keine Heparinbindungsstelle hat. Heute weiß man, dass neben der Ortsbindung die Bindungsstelle für die mitogene Aktivität der Endothelzellen wichtig ist, wobei die Bindungsaffinität mit steigender Aminosäureanzahl wächst. Damit befindet sich am Ort der VEGF-Synthese die höchste Wachstumsfaktorpotenz. Dort bilden die gebundenen Isoformen eine Art Reservoir für VEGF, das durch Proteasen in der ECM moduliert und aktiviert werden kann ohne die Transkription zu induzieren. Der Verlust des Carboxylendes, sei es während des alternativen Splicings oder während der Proteolyse, führt zum deutlichen Verlust der mitogenen Potenz (33, 34, 59, 94). Studien konnten beweisen, dass die alleinige Expression des freidiffusionsfähigen VEGF₁₂₁ zu kardiologischen Fehlbildungen und zum postnatalen Tod führten (19, 98). VEGF-A wird neben Endothelzellen auch von vielen verschiedenen anderen Zellen exprimiert, unter anderem auch von Osteoblasten und Osteoblast Like Cells (36).

Das mit VEGF-A und PlGF (Placental Growth Factor) strukturähnliche VEGF-B (45% Homologie zu VEGF-A) ist ein Ligand für VEGFR-1 und Neuropilin-1 (NRP-1), dessen 4000 bp großes Gen auf Chromosom 11q13 lokalisiert ist und zwei humane Isoformen (VEGF-B₁₆₇ und VEGF-B₁₈₆) besitzt. Die Promotorregion des VEGF-B Gens unterscheidet sich hinsichtlich des Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) vom VEGF-A Gen und wird dadurch nicht durch Hypoxie induziert. Zurzeit kann noch keine präzise Rolle in vivo zugeordnet werden, doch es gibt Hinweise, dass VEGF-B eine neuroprotektive und schwach angiogentische Wirkung besitzt und wahrscheinlich bei Entzündungen eine Rolle spielt. Da es in hohen Spiegeln in der Skelettmuskulatur, dem Myokard und dem braunem Fettgewebe ausgeschieden wird, könnte es bei dem zellulären Energiemetabolismus eine Rolle spielen. VEGF-B negative Mäuse wiesen kleinere Herzen und eine schlechtere Rekonvaleszenz nach induziertem Myokardinfarkt auf, was darauf hindeutet, dass die Kollateralgefäßbildung der Koronararterien wahrscheinlich auch VEGF-B abhängig sein könnte (94, 100, 104).

VEGF-C (30% Homologie zu VEGF-A) und VEGF-D (61% Homologie zu VEGF-C, 31% zu VEGF-A) sind hauptsächlich an der Lymphangiogenese, sowohl während der Embryogenese als auch postnatal, beteiligt und spielen eine wichtige Rolle bei Tumoren und deren Metastasierungen sowie bei Entzündungen (94, 104).

Die aktiven Formen von VEGF-C und VEGF-D werden anders als bei dem Rest der Familie nicht durch alternatives Splicing, sondern durch proteolytische Spaltung in der extrazellulären Matrix (ECM) durch Proteasen gebildet (94, 104).

Das VEGF-C Gen auf Chromosom 4q34 mit einer Genlänge von 40 Kb bildet ein Vorläuferprotein, welches durch proteolytische Aktivierung im ECM an VEGFR-2 und VEGFR-3 bindet. Während der Embryogenese wird sowohl die Angiogenese als auch die Lymphangiogenese induziert (94, 104). In einer Studie von Karkkainen et al. (58) wurde festgestellt, dass VEGF-C essentiell für die Lymphangiogenese und für das Überleben ihrer genmutierten Mäuse während der Embryogenese war.

Auch VEGF-D, mit einer Genlänge von 2 Kb auf Chromosom Xp22.31, bindet an den Rezeptoren VEGFR-2 und VEGFR-3. Anders als beim Menschen kann VEGF-D bei der Maus nur an VEGFR-3 binden (94, 104). VEGF-D scheint im Gegensatz zu VEGF-C nicht essentiell für die Embryogenese und das Überleben der Mäuse zu sein, was von Baldwin et al. (7) beobachtet wurde.

Das Placental Growth Factor (PlGF) wird vornehmlich in der Plazenta, im Herzen und in den Lungen sezerniert und bindet an VEGFR-1 und NRP-1 sowie NRP-2. Die angiogenetische Rolle von PlGF erwies sich in vielen Studien als unsicher und uneinheitlich. Man nimmt an, dass der angiogenetische Effekt durch Potenzierung der Aktivität von VEGF-A zustande kommt. Mehrere Mechanismen könnten dabei eine Rolle spielen. Zum einen könnte die Verdrängung von VEGF-A von den VEGFR-1 Rezeptoren deren vermehrte Bindung an VEGFR-2 erklären. Des Weiteren könnten die Transphosphorylierung von VEGFR-2 durch VEGFR-1 durch einen intrazellulären „crosstalk“ oder die PlGF/VEGF-A Dimerisierung und Aktivierung der beiden Rezeptoren eine Rolle spielen. Ein Ausschalten des 800 Kb langen Gens in Mäusen führte phänotypisch zu keinen Auffälligkeiten. Jedoch erholten sich die Mäuse sehr schwach vom experimentell gesetzten Herzinfarkt und bildeten schwache Kollateralkreisläufe nach Extremitätenischämie (94, 104).

Fiedler et al. (36) stellten eine funktionale Rolle von PlGF und VEGF-A bei der Rekrutierung von mesenchymalen Vorläuferzellen im Rahmen der Ossifikation fest.

VEGF Rezeptoren

Die Endothelzellen sekretieren drei verschiedene Rezeptoren, die auch von anderen Zellen gebildet werden können und zu der Tyrosinkinase Familie (RTK) gehören (siehe Abbildung 2). Diese sind gekennzeichnet durch eine extrazelluläre Domäne, eine transmembrane Region und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne (34).

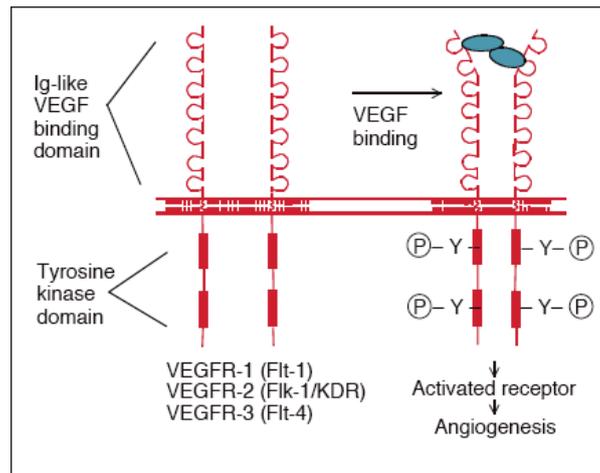


Abbildung 2: Die VEGF Rezeptorfamilie. Bestehend aus 7 extrazellulären immunoglobulin-like loops, einer transmembranen Region und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne. Die Bindung von VEGF (blaue Kreise) an die extrazelluläre Domäne führt zur Dimerisierung der Rezeptoren und damit zur Autophosphorylierung der Tyrosinreste (-Y-P).

Quelle: Gerald McMahon (72)

Der VEGFR-1 Rezeptor, auch bekannt als Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1), bindet mit hoher Affinität VEGF-A, VEGF-B und PlGF, besitzt aber eine schwache mitogene Wirkung und eine geringe Kinaseaktivität. Die genaue Funktion des Rezeptors wird kontrovers diskutiert, zum Teil bedingt durch die unterschiedlichen Funktionen verschiedener Zellen und deren Entwicklungsstand. VEGFR-1 besitzt einen chemotaktischen Effekt auf Entzündungszellen und auf mesenchymalen Vorläuferzellen im Rahmen der Ossifikation (36, 94). Aus Studien von Fong et al. (38, 39) ist bekannt, dass während der frühen embryonalen Entwicklung der Rezeptor essentiell für die Organisation der embryonalen Gefäße, aber nicht für die Differenzierung der Endothelzellen verantwortlich ist. Die genmutierten Mäuse starben

im Uterus zwischen Tag 8,5 und 9,5 an übergroßen, stark vermehrten und disorganisierten Endothelzellen. Folglich glaubt man, dass der Rezeptor eine antagonistische Rolle bei der Angiogenese spielen kann. Dabei scheint die 10-fach erhöhte VEGF Affinität der extrazellulären Domäne gegenüber VEGFR-2 (s.u.) ausschlaggebend für die antagonistische Funktion des Rezeptors zu sein (50). Heute weiß man, dass eine erhöhte freilösliche Form der extrazellulären Domäne (sFlt1), welche die Wirkung von VEGF und PlGF antagonisiert, zur Pathogenese der Präeklampsie beiträgt (64, 70). Die Tyrosinkinaseaktivität ist hauptsächlich für das Induzieren von Proteasen (uPA, tPA, MMP9) in der Extrazellulärmatrix (ECM) und anderen Wachstumsfaktoren sowie für die monozytale Chemotaxis mitverantwortlich (34).

Gerber et al. (41) fanden heraus, dass im Gegensatz zu Flk-1 (VEGFR-2) das Flt-1 Gen einen hypoxia-inducible enhancer in der Promotorregion besitzt, das bei Hypoxie direkt aktiviert und hoch reguliert wird. Neben Endothelzellen wird der Rezeptor auch auf anderen Zellen exprimiert, unter anderem auf Perizyten, Monozyten, Makrophagen, Osteoblasten und hämatopoetischen Stammzellen etc. (94).

Für die mitogenen, angiogenen und permeabilitätssteigernden Effekte von VEGF sind die VEGFR-2 Rezeptoren verantwortlich (34).

Neben VEGF-A binden auch VEGF-C und VEGF-D an diesem Rezeptor an. Er wird von vielen Zellen wie Endothelzellen, zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen, hämatopoetische Stammzellen, neuronale Zellen und Osteoblasten gebildet (51). Der auch als KDR (Kinase insert Domain Receptor) oder Flk-1 (Fetal liver kinase 1) bekannte Rezeptor spielt eine essentielle Schlüsselrolle in der Vaskulogenese und Angiogenese während der embryonalen Entwicklung. Das Fehlen des Rezeptors endet mit dem Tod des Embryos zwischen den Tagen 8,8 und 9,5 im Uterus (34). Während der Embryogenese werden VEGFR-2 in hohen Konzentrationen von Angioblasten gebildet, die im Verlauf der weiteren Entwicklung kontinuierlich abnehmen und bei erneuten physiologischen und pathologischen Prozessen wieder hoch reguliert werden (51). Wie schon oben erwähnt, wird dieser Rezeptor anders als bei Flt-1 nicht direkt durch die Hypoxie, sondern wahrscheinlich auf parakrinem Weg durch Entzündungsfaktoren hoch reguliert (41). Auch besitzt der Rezeptor anders als Flt-1 eine hohe Kinaseaktivität und eine hohe mitogene Wirkung, dafür bindet es VEGF mit einer geringeren Affinität als Flt-1 (50).

VEGF-C und VEGF-D binden an den VEGFR-3 Rezeptor (Fms-like tyrosine kinase-4, Flt-4) an, der während der Embryogenese auf allen Endothelzellen exprimiert wird und an der Blutgefäßbildung beteiligt ist. Postnatal bleibt Flt-4 auf lymphatische Endothelzellen beschränkt und induziert dort die Lymphangiogenese (94). Das Fehlen des Rezeptors in Mäuseembryos führte zum Tode am Tag 9,5 bedingt durch größere, unorganisierte Gefäße und kardiovaskuläre Missbildungen. Diese könnten durch die ausgefallene direkte Wirkung des Rezeptors oder indirekt durch die vermehrte Bindung von VEGF-C und VEGF-D an VEGFR-2 erklärt werden (26). Makinen et al. (68) konnte erfolgreich durch eine flüssige („soluble“) Form des Rezeptors die Lymphangiogenese der Haut von Mäusen erfolgreich blockieren. In einer weiteren Studie von He et al. (49) konnte durch die Blockade des VEGFR-3 die regionale Lymphknotenmetastasierung unterdrückt werden, was zu großen Hoffnungen in der Krebstherapie Anlass gibt.

Neuropilins (Nrp-1 und Nrp-2) sind an der immunologischen und neuronalen Entwicklung beteiligt und spielen auch eine wichtige Rolle bei der VEGF induzierten Angiogenese. In der Neurogenese binden die Rezeptoren Semaphorine, die die axonale Führung unterstützen (94).

Nrp-1 bindet VEGF-A₁₆₅, VEGF-B und PlGF und wird hauptsächlich von Arterien freigesetzt. Ferner wirkt es als Co-Rezeptor, das die Effektivität der Signaltransduktion von VEGFR-2 verbessert. Man geht heute davon aus, dass dieser Rezeptor für die Entstehung des kardiovaskulären Systems nötig ist, weil es auch den VEGF-A₁₆₅-Spiegel regelt (94).

Nrp-2 dagegen bindet VEGF-A₁₆₅, VEGF-C und PlGF und scheint eine geringere Bedeutung zu haben als Nrp-1. Mäuse ohne diesen Rezeptor hatten eine normale Gefäßbildung. Der Rezeptor wird hauptsächlich von venösen und lymphatischen Endothelzellen sezerniert (104).

Regulation und Aufgaben von VEGF

Das VEGF Gen wird durch viele unterschiedliche und komplizierte Mechanismen aktiviert und reguliert, dabei sind die Hypoxie und Hypoglykämie wichtige und starke Stimuli für die VEGF-Induktion (82). Der Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF1), aktiviert durch pO_2 Abnahme, bindet an die Promotorregion des VEGF-Gens und induziert dessen Transkription (33, 82). Dieser Mechanismus ist ähnlich dem der Erythropoetin-Regulation (45). Außerdem kann die VEGF Expression durch viele Zytokine, Wachstumsfaktoren und andere extrazelluläre Moleküle moduliert und reguliert werden. Der Fibroblast Growth Factor-4 (FGF-4), der Platelet Derived Growth Factor (PDGF), der Tumor Necrosis Factor α ($TNF\alpha$) und einige Interleukine können die VEGF-Produktion potenzieren. Auch kann Stickstoffoxid (NO), das durch VEGF selbst induziert wird, durch eine positive Rückkopplung die VEGF-Bildung steigern (82). Ein weiterer Mechanismus, der von Tumoren verwendet wird, ist die Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen wie p53 oder die Aktivierung von Onkogenen durch Mutation (33, 89).

Aus den beiden Studien von Ferrara et al. (31) und Carmeliet et al. (18) geht hervor, dass VEGF eine essentielle und lebensnotwendige Rolle in der fetalen Vaskulogenese und der Angiogenese in der Maus spielt. Der Wachstumsfaktor ist für die Proliferation und Migration von Endothelzellen und somit für die Gefäßbildung entscheidend (94). Bis zur Rekrutierung von Perizyten und der Reifung der neuen Gefäße fördert VEGF das Überleben der Endothelzellen durch die Induktion der Anti-Apoptose-Proteine Bcl-2 und A1 (B-cell lymphoma) in Endothelzellen (34). Es wurde gezeigt, dass schon die Inaktivierung eines VEGF-Allels zum Tod des Embryos zwischen dem 11. und 12. Tag führte. Es wies schwere Entwicklungsanomalien, eine defekte Vaskularisation in verschiedenen Organen und eine deutliche Verringerung der kernhaltigen roten Blutzellen auf. Daraus lässt sich schließen, dass VEGF nicht nur die Vaskulogenese, sondern auch die frühe Hämatopoese reguliert (89). Postnatal sinkt der VEGF-Spiegel zunehmend in ruhenden Endothelzellen (EC) bis auf ein Minimum, erhöhte Spiegel findet man physiologisch unter anderem im weiblichen Reproduktionstrakt (32, 107) oder im Rahmen der proliferativen Phase der Wundheilung (84). VEGF besitzt nicht nur angiogenetische Eigenschaften, vor kurzem wurden ihm auch neurotrophische und neuroprotektive Eigenschaften sowie die Stimulation der Neurogenese zugeordnet (56). Außerdem kann eine systemische Gabe des Faktors zu einer dosisbedingten

Auswirkung auf das Herzkreislaufsystem führen. Bedingt durch die Induktion der endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) und der erhöhten Produktion von NO entsteht eine Vasodilatation mit Permeabilitätssteigerung und anschließendem Absinken des mittleren arteriellen Druckes mit reflektorischer Tachykardie (124).

Viele pathologische Erkrankungen wie die Diabetische Retinopathie, Endometriose und andere Entzündungen wie die Rheumatoide Arthritis sind mit erhöhter Bildung von VEGF m-RNA assoziiert (33). Einen ganz entscheidenden Platz nimmt die Tumorpathologie ein, die nach der Entdeckung dieser Assoziation einen großen Stein in der weiteren Tumorforschung nach antiangiogenetischen Therapeutika ins Rollen brachte, bis heute wird daran noch intensiv geforscht (89). Einer der ersten monoklonalen Antikörper für die Behandlung des Kolonkarzinoms war Bevacizumab (Avastin®) (94). Heute hat Avastin® einen festen Stellenwert bei der Behandlung der feuchten, altersabhängigen Makuladegeneration.

Ferner stehen heute Rezeptorinhibitoren wie PTK787 zur Verfügung, die sich aber noch in der III. Phase der Forschungs-Studien befinden (89).

In der Kardiologie gilt VEGF als Hoffnungsträger bei myokardialer Ischämie und peripheren Gefäßverschlusserkrankungen (89). Viele Studien brachten Ansätze und Erfolge, an denen heute weitergeforscht wird (102, 103).

1.3.1 VEGF in der Frakturheilung

Die Knochenbildung beginnt in der frühen fetalen Entwicklung und unterliegt einem ständigen Umbau im adulten Körper. Die sekundäre Knochenheilung und damit die Kallusbildung in unserem Versuch hat eine große Ähnlichkeit mit der physiologischen Knochenbildung, der enchondralen Ossifikation, während der Embryogenese (30). Jede Knochenverletzung, sei es durch eine Fraktur oder eine Osteotomie, führt zu einer Durchblutungsunterbrechung und damit zur Ischämie. Eine ausreichende Durchblutung sowie Stabilisierung des Bruches sind aber essentielle Voraussetzungen für die Heilung einer Fraktur (97).

VEGF ist ein fundamentaler Faktor für die enchondrale Ossifikation (16). Street et al. (99) bewiesen durch ihre Studie an Mäusen mit femoralen Frakturen und kortikalen Knochendefekten, dass VEGF für die Knochenheilung und Mineralisierung essentiell ist und zwar sowohl bei der primären als auch bei der sekundären Knochenheilung. In einem anderen von ihnen durchgeführten Versuch stellten sie bei einem segmentalen

Defekt von Kaninchen Radii fest, dass die externe VEGF-Gabe eine signifikante knöcherne Überbrückung des Defektes im Gegensatz zur Kontrollgruppe bewirkte (99). Auch Pacicca et al. (85) kamen bei ihrer Distraktionsstudie zu dem Ergebnis, dass es einen engen Zusammenhang zwischen der Expression von VEGF, der Neovaskularisation und der Knochenbildung gibt. Durch die VEGF-Produktion werden Endothelzellen angelockt, die die Blutgefäßbildung in den avaskulären Chondrozyten im Kallus fördern. Per Hypertrophie der Chondrozyten werden hohe Spiegel von VEGF freigesetzt, danach gehen diese in den programmierten Zelltod (Apoptose) über. Die untergegangenen Chondrozyten werden von Osteoklasten/Chondroblasten abgebaut und durch Osteoblasten ersetzt, die die Knochenbildung induzieren (42). Die Blockade der VEGF-Wirkung in einem Mäusemodell zeigte ein reversibles Ausbleiben der enchondralen Ossifikation und damit des Längenwachstums bzw. der knöchernen Umwandlung des Kallus (43).

Pufe et al. (88) beobachteten, dass VEGF im Kallus ausgeschieden wurde und im gesunden Knochen nicht bzw. nur unbedeutend gering nachzuweisen war. Ferner fanden sie heraus, dass in der frühen Phase der Knochenheilung VEGF für die Revaskularisierung der Frakturumgebung verantwortlich ist. Die durch die Fraktur einwandernden Thrombozyten und Entzündungszellen produzieren VEGF und andere Wachstumsfaktoren wie den Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) und den Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2), die wiederum das Einwandern von Endothelzellen bewirken. VEGF spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten aus mesenchymalen Vorläuferzellen. Die Quelle dieser Vorläuferzellen ist noch fragwürdig. Man nimmt an, dass das umliegende Knochenmark und das Periost der Ausgang dieser Zellen sind. Die Obliteration der Knochenmarkhöhle und das Entfernen des Periosts führt zu einer verlängerten Knochenheilung (67). Fiedler et al. (36) testeten VEGF-A, VEGF-C, VEGF-E und PlGF sowie deren entsprechende Rezeptoren auf ihren chemotaktischen Effekt, Osteoblasten aus mesenchymalen Vorläuferzellen zu rekrutieren. Dabei fanden sie heraus, dass nur VEGF-A und PlGF einen dosisabhängigen Effekt auf die Vorläuferzellen hatten, wahrscheinlich bedingt durch ihre Fähigkeit, an VEGFR-1 zu binden.

VEGF wirkt auch chemotaktisch auf Osteoklasten (29, 83) und Osteoblasten (71) und beeinflusst ihre Aktivität (99). Es induziert direkt und indirekt die Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten durch die Stimulation der Endothelzellen, spezifische Wachstumsfaktoren zu produzieren (36).

1.3.2 VEGF in der Weichteilkonsolidierung

Die aus dem Mesoderm entstehende Skelettmuskulatur ist ein hoch regeneratives Gewebe, das auch nach wiederholten Verletzungen die Fähigkeit zur kompletten Regeneration besitzt (96).

Direkt nach einer Verletzung kommt es zu einer Hyalinisierung und Vakuolisierung der Myofibrillen. Je nach Ausprägung der Verletzung und die der versorgenden Blutgefäße kommt es zum Hämatom und/oder zu einem interstitiellen Ödem mit Infiltration von Entzündungszellen (96). Die Neutrophilen Granulozyten (1-6 h post Trauma) sind die ersten Entzündungszellen vor Ort, gefolgt von den Makrophagen (>48 h post Trauma), die die nekrotischen Myofibrillen phagozytieren und die Muskelregeneration einleiten (20, 96).

An der Muskelregeneration sind mehrere Zellen beteiligt, wobei die Satellitenzellen die Hauptrolle spielen (96). Die Herkunft dieser Zellen wird kontrovers diskutiert. Man nimmt an, dass ein Großteil dieser Zellen mesodermale Vorläuferzellen sind, die sich nicht weiter differenziert haben und zwischen Sarkolemm und Basalmembran lokalisiert sind. Ein anderer, kleinerer Teil entsteht vermutlich aus dem Knochenmark und aus anderen vaskulären Komponenten (Endothelzellen, Perizyten und Mesoangioblasten) (20, 96). Viele Daten zeigen, dass die Satellitenzellen nicht myogenspezifisch sind, denn sie lassen sich in vitro auch in einem osteogenen Prozess einleiten oder sich zu Adipozyten differenzieren (20). Die Aktivierung dieser Zellen führt zur Proliferation in den ersten 2 bis 3 Tagen und zur Differenzierung dieser Zellen zu Myoblasten, die wiederum Myofibrillen bilden und die Verletzung binnen zwei Wochen regenerieren. Ein kleiner Teil dieser proliferierten Satellitenzellen verharrt in diesem Zustand für die nächste Verletzung (96).

Auch andere Stammzellen sind an der Muskelregeneration beteiligt, jedoch zu einem kleinen, gering effektiven Prozentsatz. Diese befinden sich entweder im Muskel selbst („muscle-derived stem cells“) oder werden aus dem Knochenmark oder anderen Geweben („non muscle-derived stem cells“) rekrutiert. Die Stammzellen können sich sowohl zu Satellitenzellen differenzieren und so den Pool wieder auffüllen als auch direkt zu Myoblasten differenzieren und so die verletzten Myofibrillen direkt ersetzen (20, 96).

Eine entscheidende Voraussetzung für eine erfolgreiche Weichteilkonsolidierung ist die Revaskularisierung des traumatisierten Bereichs und deren Reinnervierung durch Nervenzellen (20, 54). Auch hier spielt VEGF eine wichtige Rolle, wie auch bei der Muskelregeneration sowie dessen Überleben bei Ischämie.

Rissanen et al. (91) führten eine Studie an acht ischämisch betroffenen Personen und 20 Neuseeland-Kaninchen durch. Dabei kamen sie zum Ergebnis, dass eine akute Ischämie zur diffusen Bildung und Ausschüttung von VEGF und VEGFR-2 in betroffenen Muskelzellen und Makrophagen führte. Diese Zellen besaßen auch hohe Spiegel von HIF-1 α , das bekanntlich bei Hypoxie zur Hochregulation von VEGF und VEGFR-1 führt.

Da Makrophagen VEGFR-1 auf ihrer Oberfläche ausscheiden, werden diese von VEGF chemotaktisch angezogen (9). Makrophagen spielen eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von Muskeltrümmern sowie bei der Muskelregeneration durch die Induktion von verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren (20).

Ferner beobachteten sie, dass bei einer chronischen Ischämie und sich von der Ischämie erholenden Muskelzellen die VEGF und VEGFR-2 Produktion nur in atrophischen und regenerierenden Muskelzellen bzw. -fibrillen zu verzeichnen war, jedoch nicht in normalen bzw. gesunden Muskelzellen. Außerdem waren diese Regionen auch von Entzündungszellen (Monozyten-Makrophagen) infiltriert und besaßen eine erhöhte Anzahl von kapillären Blutgefäßen. HIF-1 α ließ sich in atrophischen Muskelzellen nachweisen, jedoch in geringerer Dosis als bei akuter Ischämie (91).

Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die Arbeitsgruppe von Germani et al. (44). Sie fanden heraus, dass VEGF sowie Flt-1 und Flk-1 sowohl in ruhenden als auch in aktivierten Satellitenzellen und sich regenerierenden Muskelfibrillen exprimiert wurden. Außerdem beobachteten sie, dass in Verbindung mit VEGF eine Reduktion der Apoptose in Myoblasten zu verzeichnen war, die sich schließlich zu Myofibrillen zusammenschlossen. Sie stellten außerdem fest, dass VEGF neben Makrophagen auch auf myogene Vorläuferzellen einen chemotaktischen Effekt ausübt.

1.4 Das Kompartmentsyndrom

Ein Kompartmentsyndrom ist eine häufige und ernstzunehmende Komplikation, das bei Fehldeutung oder unerkannt, zu bleibenden Schäden und im schlimmsten Fall zum Tod führen kann (11).

Auf den Unterschenkel bezogen wird per Definitionem ein erhöhter Gewebedruck innerhalb eines Muskelkompartments bzw. einer Faszienloge beschrieben, der zur myoneuralen Anoxie und daraus folgend zu neuromuskulären Funktionsausfällen und Muskelnekrose führt (21).

Die ersten Komplikationen nach Frakturen und konstringierenden Verbänden wurden erstmals von Volkmann ab 1881 dokumentiert (114). Über die erste chirurgische Therapie wurde erst sieben Jahre danach von Petersen berichtet. Die erste durchgeführte experimentelle Studie wurde von Jepson 1926 gemacht (106).

Die Anatomie des Unterschenkels

Der menschliche Unterschenkel besitzt vier Kompartimente bzw. Faszienlogen.

Das ventrale Kompartiment wird am häufigsten durch das Logensyndrom betroffen, wahrscheinlich bedingt durch seine begrenzenden Strukturen. Das laterale Kompartiment wird am zweithäufigsten durch ein Kompartmentsyndrom kompliziert, meist in Assoziation mit einem anterioren Logensyndrom. Komplikationen im hinteren Kompartiment stellen eine Seltenheit dar, verglichen mit dem anterolateralen Kompartiment (11).

Die Extensorenloge bzw. das ventrale Kompartiment (siehe Abbildung 3) wird ventral durch die Fascia cruris, lateral durch das Septum intermusculare cruris anterior, dorsal durch die Membrana interossea und medial durch die Tibia begrenzt. Drei Muskeln werden von dieser Loge begrenzt: die ventral gelegenen Musculus tibialis anterior und der Musculus extensor digitorum longus und der dorsal und nahezu von den beiden ventralen Muskeln umgebende Musculus extensor hallucis longus. An weiteren Strukturen ziehen, geschützt durch den Tibiaknochen und die Muskulatur, die Arteria tibialis anterior, die Venae tibiales anteriores und der Nervus peroneus profundus (81).

Die Peroneusloge bzw. das laterale Kompartiment (siehe Abbildung 3) beinhaltet die Musculi peroneus longus et brevis sowie den Nervus peroneus superficialis am medialen Rand des Musculus peroneus longus. Die Loge wird durch das Septum intermusculare cruris anterior und posterior sowie Fibula umgrenzt (81).

Die tiefe Flexorenloge bzw. das dorsale tiefe Kompartiment (siehe Abbildungen 3) wird ventral durch die Membrana interossea sowie durch den Tibia- und Fibulaknochen begrenzt. Nach dorsal umschließt das tiefe Blatt der Fascia cruris die tiefe Flexorenloge. Hier verlaufen als wichtige Strukturen die Arteria peronea und die Venae peroneae zwischen dem anterior gelegenen Musculus tibialis posterior und dem laterodorsalen Musculus flexor hallucis longus. Die Arteria tibialis posterior, die Venae tibialis posteriores und der Nervus tibialis liegen geschützt zwischen dem Musculus flexor hallucis longus, dem Musculus tibialis posterior und dem mediodorsal gelegenen Musculus flexor digitorum longus (81).

Die oberflächliche Flexorenloge bzw. das dorsale oberflächliche Kompartiment (siehe Abbildungen 3) wird durch den ventral gelegenen Musculus soleus und dem dorsal gelegenen Musculus gastrocnemius gebildet. Begrenzt wird diese Loge durch das Septum intermusculare cruris posterior und der Fascia cruris. Zwischen den Muskelköpfen des Musculus gastrocnemius zieht der Nervus cutaneus surae medialis. Als weitere Struktur beinhaltet die Loge die Sehne des Musculus plantaris zwischen dem Musculus soleus und dem Caput mediale des Musculus gastrocnemius (81).

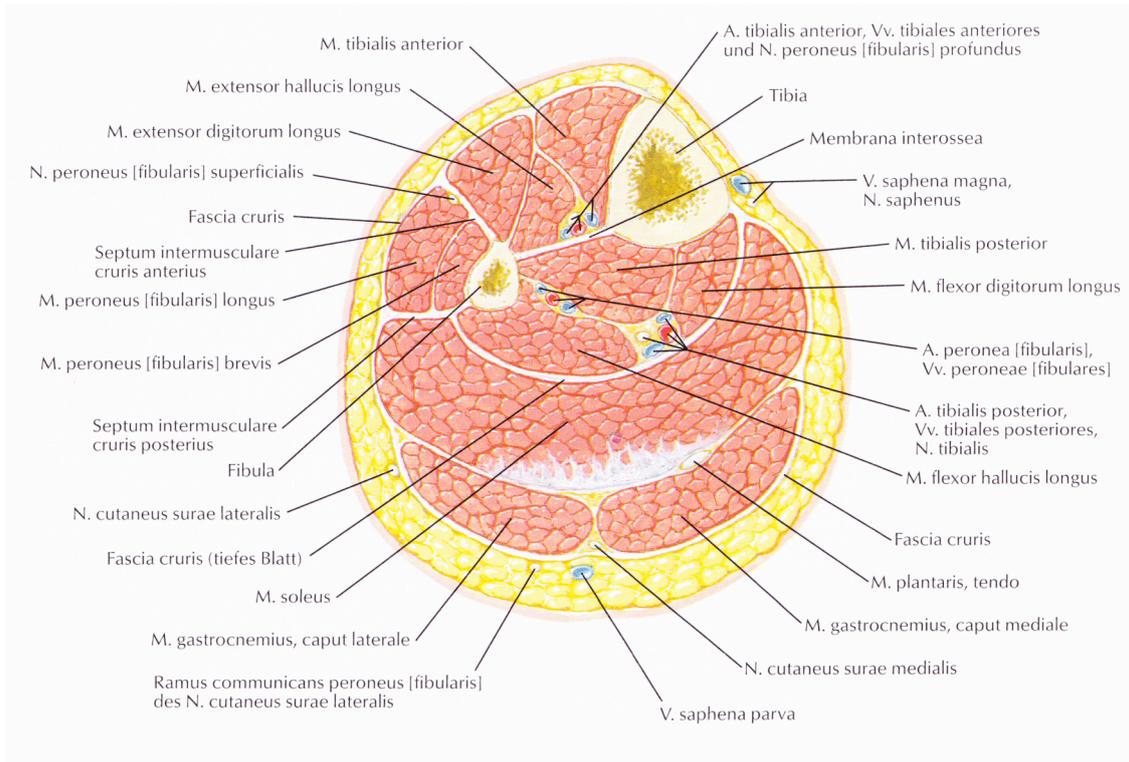


Abbildung 3: Querschnitt durch den Unterschenkel zur Darstellung der Anatomie

Quelle: Frank H. Netter (81)

Ätiologie und Pathophysiologie

Es gibt eine Vielfalt von ätiologischen Faktoren, die ein Kompartmentsyndrom bzw. ein Logensyndrom auslösen können. Zu erklären ist das meistens durch zwei grobe pathophysiologische Mechanismen. Zum einen führt die Vermehrung des Kompartimentinhaltes zur Drucksteigerung im betroffenen Kompartiment (14), was häufig bei vasalen Verletzungen und daraus folgenden Blutungen sowie Ödembildung der Muskulatur nach Verletzungen und lang anhaltenden Ischämien möglich ist. Weiterhin können auch Frakturtherapien und Verbrennungen sowie eine intravenöse Drogenapplikation zum Kompartmentsyndrom beitragen (61). Auch intensive muskuläre Anstrengungen (61), Schlangenbisse (61) und paravasale Infusionen (69) können durch Volumenzunahme ein Kompartmentsyndrom auslösen.

Zum anderen kann auch die Analogie, nämlich die Verminderung des Kompartimentvolumens, zur Gewebedrucksteigerung führen (14). Das ist bei konstringierenden Verbänden und Gipsverbänden sowie Einklemmungen häufig der Fall (61). Ferner können auch übermäßige Extension von Frakturen (14) und zirkuläre Verbrennungen (65) dazu beitragen.

1.4.1 Das akute Kompartmentsyndrom

Das akute Kompartmentsyndrom ist mit bis zu 40% eine besonders häufige Komplikation bei Tibiaschaftfrakturen (61, 65, 73). Ungefähr 23% der akuten Kompartmentsyndrome sind durch Verletzungen des Weichteilgewebes verursacht, ohne die Koinzidenz einer Fraktur (61). Trümmerbrüche besitzen aufgrund der hohen Trauma-Energie eine höhere Neigung zur Entwicklung eines Logensyndroms (106). Als Weiteres können offene Frakturen ebenfalls ein Kompartmentsyndrom entwickeln, auch wenn das betroffene Kompartiment durch die Verletzung freiliegt. Jedoch werden geschlossene Frakturen weitaus häufiger durch ein Logensyndrom kompliziert (61, 106). Die Inzidenz für ein Kompartmentsyndrom liegt nach Köstler et al. (61) für geschlossene Frakturen zwischen 1% und 29% und für offene Frakturen zwischen 1% und 10%. Besonders betroffen von dieser Komplikation sind junge männliche Patienten, wobei die Inzidenz mit zunehmendem Alter abnimmt. Als mögliche Gründe für ihre Beobachtungen werden von McQueen et al. (73) einerseits das größere Muskelvolumen junger Männer im Vergleich zu älteren Menschen und weiblichen Patienten, andererseits der mit dem Alter steigende Blutdruck, der protektiv auf die Entstehung eines Kompartmentsyndroms wirkt, genannt.

Auch jede Revaskularisierung eines zuvor ischämischen Abschnitts des Unterschenkels kann zu einem Logensyndrom führen (61), sei es traumatisch bedingt oder durch eine bestimmte Lagerung in der Steinschnittlage (11), Trendelenburg (61) und Lloyd Davies Position oder nach Anlage eines Tourniquet (108). Die Inzidenz ist je nach Ursache der Ischämie unterschiedlich und von ihrer Dauer abhängig. Köstler et al. (61) schätzt die Inzidenz nach Reperfusion zwischen 0% und 21% ein.

Die Pathophysiologie des Kompartmentsyndroms ist sehr komplex, da unterschiedliche Mechanismen simultan arbeiten (11).

Der Logendruck liegt unter physiologischen Bedingungen unter 10 mmHg (11) und der Perfusionsdruck über 70 bis 80 mmHg (61, 123). Ein Kompartimentdruck zwischen 20 mmHg und 30 mmHg führt zu Schmerzen und Parästhesien (11), ein anhaltender Druck über 30 mmHg bis 40 mmHg zu irreversiblen Schäden an Nerven und Muskelgewebe nach sechs bis zwölf Stunden (106, 123).

Die kapillare Durchblutung ist proportional zum arteriellen Blutdruck abzüglich des venösen Blutdrucks. Umgekehrt ist auch die kapillare Durchblutung proportional zum Gefäßwiderstand. Jede Änderung des Verhältnisses führt zur Ischämie, die folglich

eine Hypoxie auslöst und die betroffenen Zellen zum anaeroben Stoffwechsel zwingt. Durch diese Stoffwechsellage entstehen Abbauprodukte, die durch die Ischämie nicht abtransportiert werden können. Als weitere Folge der Ischämie werden Endothelzellen geschädigt, die das Austreten von Plasma und die Bildung eines interstitiellen Ödems verursachen, was den Kompartimentdruck zusätzlich erhöht. Hierbei hängt der Grad der Endothelschädigung mit der Dauer der Ischämiezeit zusammen (11).

Kommt es nach der Ischämie zur Reperfusion, beginnt der aerobe Stoffwechsel. Durch die Bildung von Prostaglandin, NO und die Aktivierung des Komplementsystems sowie andere Mechanismen zur Regulierung des Gefäßwiderstandes, können freie Radikale entstehen, die das Endothel weiter schädigen und ein Reperfusionssyndrom bzw. (Post-) Tourniquet-Syndrom auslösen können (11, 108). Das Reperfusionssyndrom ist in der Kardiologie und Phlebologie bei Infarkten gut bekannt (106).

Als Gegensteuerung und zur Verhinderung des weiteren Austretens von Plasma werden weitere Mechanismen aktiviert, die die Durchblutung zusätzlich verschlechtern. Hierzu gehören die Vasokonstriktion, die vermehrte Thrombozytenaggregation, die mikrovaskuläre Obstruktion, die Thrombose und die lokale Entzündung (11, 108).

Eine weitere Schädigung der Muskulatur mit fortschreitender Zellyse kann eine systemische Entzündung auslösen und in einer Myoglobulinurie, metabolische Azidose und Hyperkaliämie bis zum Nierenversagen und Multiorganversagen führen (11).

Das menschliche Gewebe reagiert verschieden auf Hypoxie. Am sensibelsten reagiert das sensorische Nervengewebe, gefolgt vom motorischen Nervengewebe, der Muskulatur und der Haut. Zuletzt reagiert der Knochen auf die Hypoxie (11).

Die Patienten klagen zunächst über Sensibilitätsausfälle, die zunehmend mit weiteren neurologischen Defiziten und Muskelfunktionsstörungen einhergehen. Das klassische Leitsymptom dieser Komplikation ist ein brennender, bohrender Schmerz, der bei passiver Dehnung der entsprechenden Muskelgruppe zunimmt. Die betroffene Muskelgruppe ist druckdolent und verhärtet mit gelegentlicher Hautrötung und Spannungsblasen über dem betroffenen Areal. Die Fußpulse sind bei einem Kompartmentsyndrom, wenn eine vaskuläre Verletzung als Ursache auszuschließen ist, tastbar, da der Kompartimentdruck in seltenen Fällen den arteriellen Blutdruck übersteigt (11, 61, 106, 123).

Die frühe Diagnosestellung ist zur Verhinderung eines manifesten Kompartmentsyndroms und auch für den Ausgang der Komplikation von entscheidender Bedeutung. Je länger mit einer Therapie gewartet wird, desto schlechter fällt das Endergebnis aus (61, 65, 93).

Wie üblich in der Diagnostik, kann eine klinische und/oder eine apparative Diagnostik vorgenommen werden.

Bei einem bewusstseinsklaren Patienten ist die klinische Untersuchung für die Diagnose des Kompartmentsyndroms oft ausreichend (14, 61, 106). Dabei nimmt die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines Logensyndroms mit der Anzahl der vorhandenen klinischen Symptome exponentiell zu (110).

Probleme treten jedoch auf, wenn wenige bzw. unspezifische Symptome vorliegen, wie es bei einem drohenden Kompartmentsyndrom der Fall sein kann. Ist der Patient nicht bei vollem Bewusstsein oder hat weitere diagnose-erschwerende Erkrankungen oder gibt es Unklarheiten, greift man auf objektive, apparative Methoden zurück (11, 61, 123).

Hier dient die Intrakompartimentdruckmessung (ICP) als erfolgreiche minimalinvasive Standardmethode, weil der Gewebedruck die erste essentielle Manifestation des Logensyndroms ist. Der Vorteil bei dieser Methode liegt, je nach Messtechnik, in der einfachen und schnellen Handhabung. Auch sind Langzeitmessungen bei gefährdeten Patienten möglich, um ein drohendes Kompartmentsyndrom rechtzeitig zu therapieren. Leider gibt es keinen einheitlich akzeptierten kritischen Wert für die Indikation einer Fasziotomie, bedingt durch die interindividuellen Unterschiede der Patienten und der verwendeten Messapparatur sowie der Höhe des Blutdrucks. Hypotensive bzw. Schockpatienten benötigen einen niedrigeren Gewebedruck, um ein Logensyndrom auszulösen (11, 14, 61, 106).

Grundsätzlich lassen sich zwei Messprinzipien der Intrakompartimentdruckmessung unterscheiden.

Eine der ersten Methoden der Druckmessung wurde 1975 von Whitesides et al. (116) entwickelt, die mit Hilfe eines Manometers und einer Wassersäule den Kompartimentdruck überträgt. Dabei liegt im Kompartiment eine Punktionskanüle, an einer Wassersäule angeschlossen, welche über einem Dreibein mit einer luftgefüllten Spritze sowie einem Manometer verbunden wird. Der Druck, der aufgebaut werden muss, um die Flüssigkeitssäule Richtung Kompartiment zu bewegen, wird auf dem Manometer abgelesen (Abbildung 4).

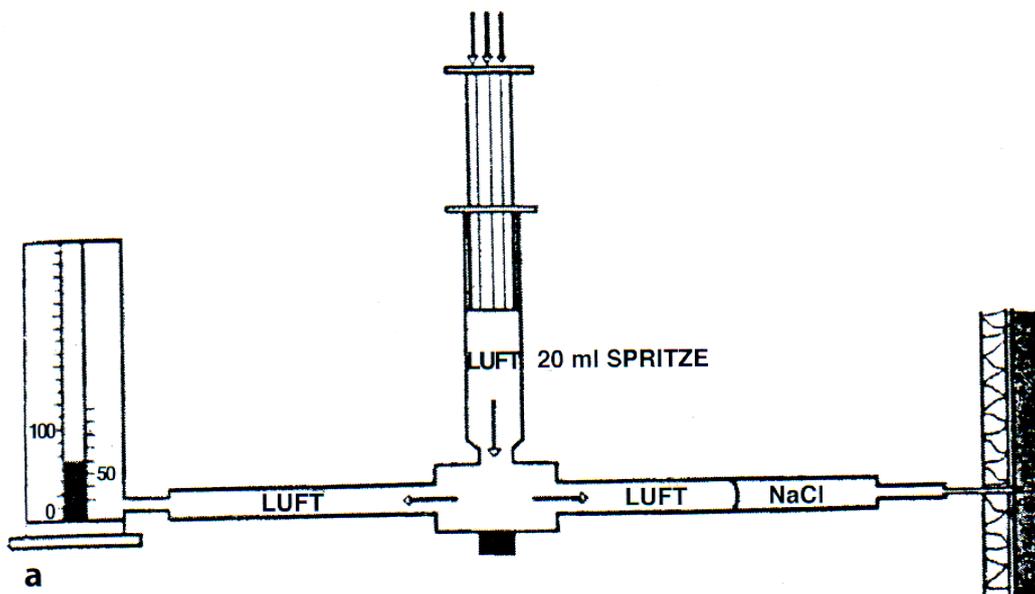


Abbildung 4: Messmethode nach Whitesides

Diese einfache Messapparatur konnte durch andere Wissenschaftler weiter verbessert werden, wobei die Methodik des flüssigkeitsgefüllten Messsystems beibehalten wurde. Eine direkte und einfache Methode zur Kompartimentdruckmessung kann mit Hilfe eines piezoelektrischen Systems erfolgen. Hierbei bedient man sich der Entdeckung der Gebrüder Curie 1880, dass piezoelektrische Körper durch Krafteinwirkung eine elektrische Spannung erzeugen (120). Der Druck im Kompartiment wird mittels elektrischer Umwandlung auf das Gerät angezeigt. Eine Kalibrierung des Gerätes ist nicht notwendig und der verwendete Katheter kann sterilisiert und wieder verwendet werden. Außerdem lassen sich Langzeitmessungen damit durchführen (122).

Eine nicht invasive Diagnostikmethode, die die Ischämie anhand des Redoxstatus des Hämoglobins misst, ist die Nahinfrarotspektroskopie (NIRS), die leider nur bis zu einer Tiefe von bis zu 4 cm eindringen kann, aber das Beurteilen des tiefen hinteren Kompartiments erschwert (11, 61). Diese Methode hat bei der Diagnostik des funktionellen Kompartimentsyndroms als eine schnelle Alternative für die invasive Intrakompartimentdruckmessung einen Erfolg versprechenden Vorteil (109), hat sich aber für die Diagnostik der akuten Form noch nicht etabliert (61, 65).

Als eine weitere, hilfreiche Methode zur Unterscheidung zwischen ischämiebedingter Parese und proximaler Nervenläsion dient die Elektronervenstimulation (123).

Mit Hilfe einer Magnetresonanztomographie (MRT) lassen sich Veränderungen bei einem manifesten Kompartmentsyndrom nachweisen und damit kann zwischen einem Kompartmentsyndrom und einer Neuropathie (65) unterschieden werden. Jedoch lassen sich beginnende Veränderungen bei einem drohenden Kompartmentsyndrom nur schwer nachweisen (61). Das MRT ist ein kommendes Verfahren bei der Diagnose des chronischen Kompartmentsyndroms (12).

Die Dopplersonographie kann bei Darstellung von arteriellen und venösen Verschlüssen hilfreich sein (65). Einige Autoren befürworten diese non-invasive Methode zur Diagnostik eines akuten Kompartmentsyndroms (ACS), weil sie einfach durchzuführen und besonders für Langzeitmessungen von Risikopatienten geeignet ist. Dabei wird der lokalvenöse Druck gemessen, der bei Zunahme eine Erniedrigung des arteriovenösen Gradienten zur Folge hat (11).

Wenn ein Kompartmentsyndrom vermutet wird, sollten alle physikalisch konstringierenden Verbände und Gipsverbände eröffnet und der Blutdruck durch Volumensubstitution gesteigert werden, um die Perfusion zu verbessern. Die Lagerung des Unterschenkels in Herzniveau und eine zusätzliche Sauerstoffgabe können die Durchblutung und die Sauerstoffsättigung im Kompartiment verbessern (61).

Die chirurgische Spaltung des akuten Kompartmentsyndroms mit Hilfe einer Fasziotomie ist die effektivste Behandlungsmethode, dabei hängt die Erfolgsaussicht von der Zeit bis zur Einleitung der Therapie ab. Damit ist das Kompartmentsyndrom ein chirurgischer Notfall (22, 61, 93).

Dabei sollten alle vier Kompartimente durch eine Zweischnitt- oder Einschnittmethode mit oder ohne Fibulektomie geöffnet werden, um eine sichere Dekompression zu erhalten (61, 106). Dabei ist die Inzidenz für Komplikationen und die Rekonvaleszenz nach Dekompression aller vier Kompartimente nicht höher als bei Öffnung eines Kompartiments (23). Auch sollte bei gleichzeitigem Vorliegen einer Fraktur die Frakturstabilisierung mit der Fasziotomie parallel durchgeführt werden (93).

Die Zweischnitttechnik ist eine einfache, sichere und schnelle Methode mit adäquater Dekompression aller vier Muskellogen des Unterschenkels und dient nach Mubarak et Owen (80) als Therapie der Wahl. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass die Gefahr der Verletzung von nervlichen und vaskulären Strukturen im Vergleich zu anderen Methoden gering ist (22).

Die perifibuläre Fasziotomie mittels einer einzigen Inzision zur Eröffnung der 4 Kompartimente des Unterschenkels wurde von Cooper et al. (24) erfolgreich an sechs Patienten durchgeführt. Jedoch sind der Zutritt und damit die Eröffnung des tiefen, dorsalen Kompartiments mittels dieser Methode schwierig. Außerdem besteht bei dieser Therapieform eine erhöhte Gefahr der Verletzung des Nervus peroneus superficialis, besonders bei traumatisierten Patienten, bedingt durch die entstellte Anatomie. Ferner bringt dieser Schnitt keine Vorteile, wenn eine bestehende Knochenfraktur therapiert werden muss (14).

Die Fibulektomie ist nach Bourne und Rorabeck (14) eine „verstümmelnde und unnötige Prozedur“. Nach Patman (86) sollte diese Technik nur angewandt werden, wenn ein schweres Trauma vorliegt.

Auf Grund von Meinungsverschiedenheiten vieler Autoren bezüglich der Länge der Dermatotomie für eine adäquate Dekompression der vier Muskellogen des Unterschenkels, wurde in vielen Studien die Länge der Hautinzision mitberücksichtigt (22). Jensen et Sandermann (55) untersuchten die subkutane Hautinzision in der Zweischnitttechnik und beobachteten, dass 13 % der operierten Patienten wegen einer unzureichenden Dekompression revidiert werden mussten. Cohen et al. (22) verglichen eine 8 cm und eine durchschnittliche 16 cm lange Dermatotomie mittels Zweischnittmethode miteinander. Sie kamen zum Ergebnis, dass sich mittels der 8 cm langen Hautinzision der Kompartimentdruck nicht adäquat senken ließ und bei durchschnittlich 25 mmHg verharrte. Erst die Revision und eine erweiterte Dermotomie zwischen 12 cm und 20 cm erzielte ein adäquates Ergebnis von durchschnittlich 13 mmHg. Daraus wird ersichtlich, dass die Haut einen beitragenden Effekt auf den Kompartimentdruck besitzt und eine offene Fasziotomie für eine adäquate Dekompression nötig ist.

Nach der Dermatofasziotomie sollte die Muskulatur auf avitales Gewebe untersucht und eventuell resiziert werden, um die Gefahr der Myoglobinurie und ein mögliches Nierenversagen zu minimieren (11, 47). Die Beurteilung nach den vier „K's“ könnte dabei helfen, untergegangenes Muskelgewebe zu identifizieren:

1. Kontraktilität,
2. Konsistenz,
3. Kolorit und
4. Kapillardurchblutung bei der Inzision.

Nicht sicher zu beurteilendes Gewebe sollte belassen werden und ggf. mittels eines „second looks“ nachresiziert werden, da die Muskulatur, wie oben schon erwähnt, eine hohe Regenerationskapazität besitzt (47).

Die Wundheilung kann je nach der Länge der Hautinzision und der Dauer der Schwellung durch eine primäre und sekundäre Naht oder mittels einer Sekundärheilung mit Hilfe von Spalthaut verschlossen werden. Diese kann frühestens drei bis vier Tage nach der Operation unter begleitender Kompartimentdruckmessung vorgenommen werden, da eine Gefahr der Drucksteigerung noch möglich ist (106).

Die Häufigkeit von Komplikationen nach einer Fasziotomie ist je nach Studie und angewandter Operationsmethode sehr unterschiedlich. Es ist jedoch ersichtlich, dass diese, wie auch die Erfolgsquote für ein Restitutio ad integrum, von der Ischämiezeit sowie der Höhe des Kompartimentdruckes bis zur Einleitung der Therapie abhängig sind (2, 47, 61, 65). Typische Komplikationen sind Weichteil- und Knocheninfektion (106), Wundinfektionen (11), Nervenverletzungen (11), Blutungen (11) und bei fortgeschrittener Erkrankung systemische Manifestationen wie Nierenversagen, Sepsis und Amputation sowie Tod (2, 47).

Eine nicht standardisierte Muskellogendrucksenkung lässt sich ebenso durch eine Verkürzung der Extremität erzielen. Möllenhoff et al. (77, 78) konnten durch Verkürzung des Knochens um 10 % seiner Ausgangslänge einen erhöhten Kompartimentdruck senken.

Eine weitere, jedoch nicht standardisierte, adjuvante Therapieoption ist die hyperbare Oxygenierung (HBO-Therapie) (11). Die Oxygenierung führt zu einer erhöhten Sauerstättigung und zur Vasokonstriktion der Gefäße in den Kompartimenten, das der Transsudation entgegenwirkt. Studien belegen, dass durch die HBO-Therapie die Ödem- und Nekrosebildung signifikant reduziert werden konnte (106). Eine erste Studie von Bouachour et al. (13) an unfallchirurgische Patienten in Frankreich beobachtete eine signifikant, bessere Wundheilung ohne Weichteilnekrosen bei HBO-therapierten Patienten.

Die Wirksamkeit von Antioxidantien wie Mannitol zur Verhinderung eines Reperfusionssyndroms und zur Senkung des Kompartimentdruckes bei vaskulärer Ischämie wurde in Studien an Hunden nachgewiesen. Jedoch sind die Auswirkungen an Menschen noch unklar und benötigen der weiteren Evaluation (61, 106).

1.4.2 Das funktionelle Kompartmentsyndrom (syn. Exertional Compartment Syndrome)

Das funktionelle Kompartmentsyndrom lässt sich in eine akute und eine chronische Form einteilen, die durch Zunahme des Kompartimentinhaltes zur Symptomatik führt (65). Betroffene Personen sind hauptsächlich Sportler (12) und rekrutierte Soldaten (23), die nach bzw. während eines langen Laufes oder Marsches über Schmerzen im Bein klagen.

Die akute Form des funktionellen Kompartmentsyndroms kommt seltener als die chronische Form vor und kann auch Nichtathleten treffen. Sie ist bedingt durch ein lang anhaltendes, ungewohntes und isometrisches Training, oft vorkommend bei athletischen und militärischen Übungen und schon 1945 von Vogt als „march gangrene“ bezeichnet (2, 12, 65). Am häufigsten ist das anteriore Kompartiment des Unterschenkels betroffen, gefolgt von dem lateralen Kompartiment. Anders als bei der chronischen Form sistieren die Schmerzen nach den Übungen nicht bzw. nehmen in ihrer Intensität zu und entsprechen damit der Symptomatik des akuten Kompartmentsyndroms, das auch als Notfall therapiert wird (12, 65).

Das chronisch funktionelle Kompartmentsyndrom wurde erstmals von Mavor 1956 veröffentlicht, der damals einen bilateralen Beinschmerz ohne erkennbare Traumatisierung bei einem Fußballspieler während des Trainings beschrieb (69).

Das Vorkommen dieser Erkrankung in der Bevölkerung und bei Sportlern ist unklar und kann sich je nach Studie unterscheiden. Man vermutet eine Inzidenz zwischen 10% und 60%, wobei durch die heutige Emanzipation beide Geschlechter gleichermaßen betroffen sind (12, 109).

Die Pathophysiologie dieses Syndroms ist bis dato nicht im Detail erschöpfend geklärt worden (109). Es wird angenommen, dass die während des Trainings abnormal hohen Logendrücke durch ein „non-compliant“-fähiges Kompartiment zu begründen sind, das die entstehende Volumenzunahme der Muskulatur durch eine erhöhte Durchblutung und Ödembildung nicht kompensieren kann, und es dadurch zu einer transienten Ischämie und Schmerzen kommt. Ferner hypertrophiert die Muskulatur bei chronischen Übungen, was eine Verkleinerung des Logenraums zur Folge hat (12).

Die Symptome treten zu 80% bis 95% bilateral auf, wobei zu 40% bis 60% das anteriore Kompartment betroffen wird, gefolgt von dem tiefen und hinteren Kompartment. Die Patienten klagen über brennende und ziehende Schmerzen, die bis in den Fuß ausstrahlen und meist in den ersten 30 Minuten nach Trainingsbeginn entstehen. Die Symptome sistieren nach Beendigung der Übung (12).

Die Diagnose besteht aus Anamnese, Reproduktion von Symptomen und deren klinische Untersuchung sowie aus der Intrakompartimentdruckmessung vor und nach der muskulären Anstrengung. Auch hier teilen sich die Meinungen der Autoren bezüglich Operationstechnik und Höhe des Kompartimentdrucks für die Diagnose (12, 109).

Wie so oft kann auch bei dieser Erkrankung zwischen einer chirurgischen Intervention mit Fasziotomie und einer konventionellen Therapie unterschieden werden, wobei die konventionelle Therapieform und der von ihr zu erwartende Erfolg von vielen Autoren kontrovers diskutiert wird (109). Sichere Erfolgsraten können durch die Einstellung der verursachenden Aktivitäten und durch Fasziotomie des betroffenen Kompartments erzielt werden, wobei sich die prozentualen Erfolgsquoten nach Fasziotomien studienabhängig unterscheiden (12, 23). Ein Übergang der chronischen Form in das akute Kompartmentsyndrom ist sehr selten, bisher wurde nur ein Fall beschrieben (46).

2. Material und Methode

2.1 Studiendesign

Die tierexperimentellen Versuche der Testgruppe erfolgten an 14 Kaninchenhinterläufen im Zeitraum von März 2006 bis Mai 2006.

Das Ziel dieser prospektiv angelegten Studie war die Erforschung einer möglichen Wirkung des endothelialen Wachstumsfaktors VEGF auf die Muskel- und Kallusregeneration nach einem künstlich gesetzten Weichteiltrauma, in diesem Fall ein Kompartmentsyndrom, sowie die Untersuchung auf eine Signifikanz mit einer Kontrollgruppe (Meffert et al. 2007, Meffert et al. 2008).

Dabei wurden die Muskulatur und der Knochen biomechanisch, histomorphometrisch und immunhistologisch analysiert.

2.2 Studienablauf

In einer Eingewöhnungsphase von 6 bis 7 Tagen besuchten wir die Versuchstiere täglich, damit sich die Tiere an uns gewöhnen und auch letzte Hemmungen im Team, bei Versuchen an lebenden Tieren nicht ungewöhnlich, abgebaut werden konnten.

Außerdem führten wir Voruntersuchungen wie Muskelkraftmessungen und Röntgenuntersuchungen durch. Dabei konnten auch gleichzeitig die in dieser Studie verwendeten Geräte getestet und bei Bedarf erneut kalibriert oder repariert werden. Zusätzlich standen alle Vorbereitungen für die Operationswoche auf dem Programm und es wurden letzte Unklarheiten in unserer Arbeitsgruppe beseitigt.

Jedes Tier wurde gewogen, mit einem Eddingstift deutlich an der Innenseite beider Ohren alphabetisch gekennzeichnet und es bekam einen eigenen Begleitbogen. Darauf wurden die täglichen speziellen Untersuchungen vermerkt sowie Auffälligkeiten dokumentiert. Für die Muskelkraftmessungen und die Operationen wurden die Kaninchen während der Vorbereitungszeit entsprechend rasiert und teilweise nachrasiert.

In der Operationswoche wurden täglich zwei Tiere operiert, wobei alternierend das rechte und das linke Bein traumatisiert und operiert wurde.

Das Traumamodell umfasste die künstliche Erzeugung einer Ischämie und die zusätzliche lokale Traumatisierung des Musculus tibialis anterior, die zum Kompartmentsyndrom führten.

Der Logendruck des M. tibialis anterior wurde vor und nach der Traumatisierung und auch postoperativ nach 24 und 48 Stunden mittels einer Drucksonde ermittelt. Es wurde jeweils erst dann operiert, wenn ein Kompartmentsyndrom diagnostiziert wurde.

Die Operation bestand aus einer Tibiaverkürzung von 10 mm (entsprechend 10 % des Tibiaschaftes) und dem anschließenden Einsatz eines mit 12 µg VEGF₁₆₅-getränkten Schwämmchens sowie der Fixierung durch einen Fixateur externe. Das Kollagenschwämmchen diente als Träger für das VEGF₁₆₅, aus dem eine kontinuierliche Menge an VEGF₁₆₅ pro Zeiteinheit abgegeben werden sollte. Näheres hierzu ist in der Dissertation des Doktoranden Niklas Deventer zu finden.

In der Nachoperationsphase führten wir bei den Tieren in einem 5 Tage- und 10 Tage-Rhythmus weitere Muskelkraft- und Röntgenuntersuchungen durch.

Mit der zehntägigen Distraktionsphase begannen wir am 10. postoperativen Tag.

Eine klinische Visite wurde täglich morgens und abends durchgeführt, wobei auf Verletzungen, Erkrankungen (anhand des Trink- und Essverhaltens sowie der Urin- und Stuhlausscheidung), Unwohlsein und OP-Wunden (speziell Rötung, Blutung und Schwellung) sowie die Stabilität der Fraktur, geachtet wurde. Alles wurde in den Begleitbögen dokumentiert.

Nach 40 Tagen wurden die Tiere durch intravasale Gabe von T61 getötet und der Musculus tibialis anterior sowie der Tibiaknochen beidseitig gewonnen und histomorphometrisch, biomechanisch und immunhistologisch bearbeitet und quantifiziert.

Eine übersichtliche Veranschaulichung des Ablaufs dieser Studie wird nochmals im Diagramm 1 wiedergegeben.

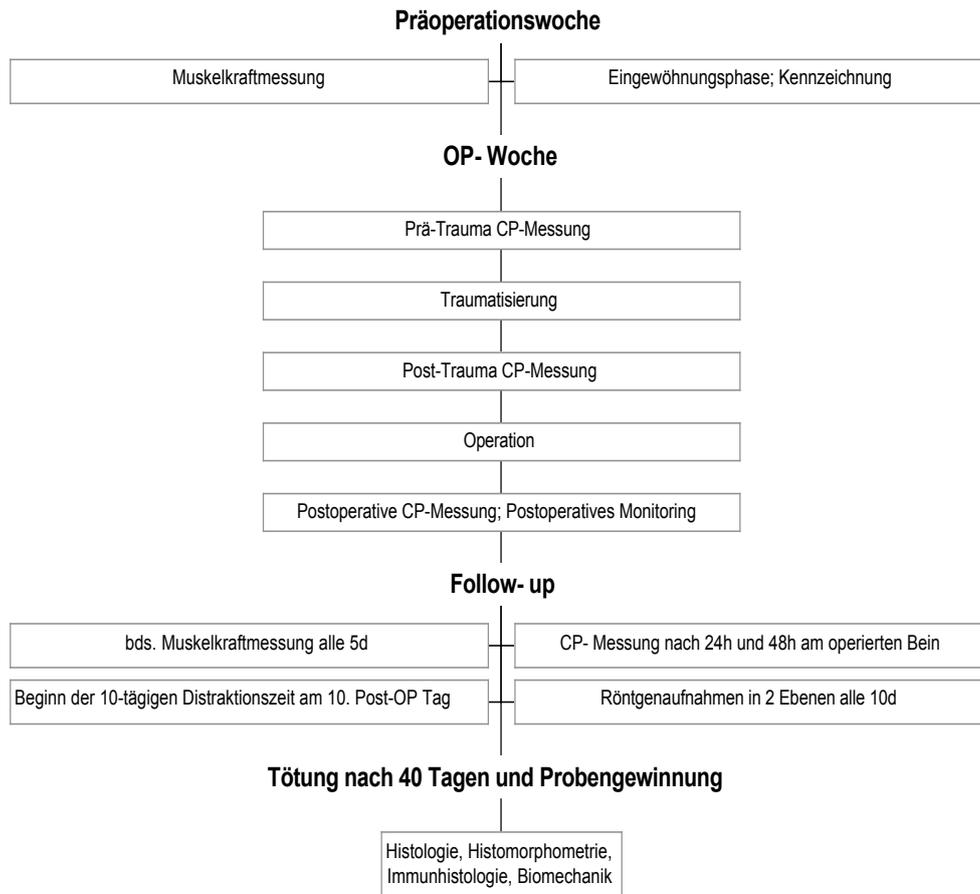


Diagramm 1: Studienablauf

2.3 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 14 skelettreife, männliche „Neuseeland Weiß“ Kaninchen mit einem Körpergewicht von 3500 g \pm 280 g gewählt, die dann speziell für das Versuchsvorhaben gezüchtet wurden (Fa. Peter Rollie, Ennigerloher Str. 111, 59302 Oelde).

Durch die Skelettreife, die Rasse, das Gewicht sowie das Geschlecht und die gleiche Tierhaltung war eine bestmögliche Übereinstimmung gegeben, eine Randomisierung wurde folglich nicht durchgeführt.

Die Versuche wurden nach Genehmigung der Bezirksregierung Münster am 13.12.2005 an Herrn Prof. Dr. med. R. H. Meffert und Frau Dr. med. S. Ochman unter dem Aktenzeichen 50.0835.1.0 (G12/2001) in der Zentralen Tierexperimentellen

Einrichtung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster im Zeitraum von März bis Mai 2006 durchgeführt.

Für die Versuche wurden die Tiere in speziellen und dafür vorgesehenen Einzelboxen mit Plastikböden der Größe III (Maße 100cm x 55cm x 60cm) bei 20-22 °C gehalten. Die Beleuchtung wurde in einem Zwölfstundenintervall geregelt, um Tag- und Nachtphasen zu simulieren. Wasser und Futter wurden ad libitum zur Verfügung gestellt.

Außerdem standen die Tiere unter der ständigen Aufsicht des Tierarztes und Leiters der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Medizinischen Fakultät der WWU Münster und Tierschutzbeauftragter Dr. med. vet. M. Lücke.

2.4 Operationsmethode

2.4.1 Narkose, Anästhesie

Unter Narkose wurden bei allen Tieren die prä- und postoperativen Untersuchungen durchgeführt.

Für die Narkose wurde den Tieren eine parenterale Mischanästhesie mit 0,5 ml bei 20 mg/ml Xylacinhydrochlorid (Rompun[®]) und 1,5 ml bei 100 mg/ml Ketaminhydrochlorid (Ketanest[®]) intramuskulär in die Paravertebralmuskulatur injiziert. Nach ca. 2-3 min. trat bei den Tieren eine suffiziente Anästhesie und Narkose für eine Periode von ca. 25-30 Minuten ein.

Wir entschieden uns für das gut steuerbare Kurznarkotikum Ketaminhydrochlorid, das eine dissoziative Anästhesie mit Bewusstseinsverlust, Analgesie und Amnesie verursacht und einen schnellen Wirkungseintritt aufweist. Außer der erwähnten höheren analgetischen und anästhetischen Potenz bewirkt Ketaminhydrochlorid auch eine verkürzte Aufwachzeit, wodurch sich die Kaninchen recht schnell erholten (105).

Xylazinhydrochlorid besitzt eine analgetische, sedative und muskelrelaxierende Wirkung und steigert somit die Wirkung von Ketaminhydrochlorid (113). Bei einigen Tieren ließ jedoch mit der Zeit die Wirkung des Narkotikums nach, so dass in diesen Fällen die Dosis erhöht werden musste.

Durch Maskeninsufflation von 2 l N₂O/min., 4 l O₂/min. und 1-2 % Isofluran in einer Kombination mit einer parenteralen Morphinderivatgabe (0,5 ml Buprenorphin s.c., 0,3 mg/ml) wurde die eigentliche Operation durchgeführt.

Nach der Operation erhielten die Tiere eine subkutane Depotspritze, bestehend aus der Kombination eines Analgetikums (10 mg Tramadol) und eines Sedativums (20 mg Acetylpromacin) in 20 ml NaCl. Dies wurde am nächsten Tag wiederholt. Danach zeigten die Tiere keine Anzeichen von Schmerzen, beurteilt nach dem Essverhalten, der uneingeschränkten Beweglichkeit, der Zutraulichkeit und der Munterkeit. Daraufhin wurden die Medikamente abgesetzt, um die Gefahr einer Nebenwirkung zu reduzieren.

2.4.2 Traumatisierung

Das Traumamodell bestand aus einer künstlichen Ischämie und einer lokalen Traumatisierung des Musculus tibialis anterior, um ein Kompartmentsyndrom auszulösen und dessen Verlauf zu messen. Dieses führten wir exakt nach demselben Schema unserer Kontrollgruppe (40) durch, um beim späteren Vergleich der Ergebnisse auch vergleichbare Werte zu erhalten.

Zur Erzeugung der Extremitätenischämie wurde ein Tourniquet (unsteriler OP-Handschuh) am zu operierenden Bein des narkotisierten Tieres ca. 2 cm oberhalb des Kniegelenks und somit oberhalb der Fraktur für genau 90 min. angelegt (Abbildung 5). Hierdurch wurde eine künstliche Ischämie erzeugt, die bei jeder größeren Verletzung und bei einem Hochrasanztrauma in der Realität auch entstehen würde.

Um ein Kompartmentsyndrom sicherzustellen, wurde zusätzlich eine spezielle Kontusionsklemme mit einem Druck von 7 bis 8 N (entsprechend 10 N auf einem Feld von 1 cm² nach Hebelkorrektur= 100kPa) über die Frakturstelle auf den Muskelbauch des M. tibialis anterior distal der CP-Eintrittsstelle (CP= Compartment Pressure) für genau 30 min. angelegt (Abbildung 6).

Auch die nach Abnahme des Tourniquets entstehende Hyperämie in der Reflowphase (siehe Abbildung 7) konnte zusätzlich zum Kompartmentsyndrom durch eine weitere Verschlechterung der Mikrozirkulation durch das entstehende Ödem beitragen (61).



Abbildung 5: Erzeugung einer Ischämie durch ein Tourniquet (OP-Handschuh)

Abbildung 6: Anlage der Kontusionsklemme zur lokalen Muskeltraumatisierung

Abbildung 7: Hyperämie in der Reflowphase nach Abnahme des Tourniquets

2.4.3 Operationstechnik

Einige Tiere mussten vor der Operation nochmals an den zu operierenden Beinen nachrasiert werden. Es wurde alternierend das rechte oder linke Bein traumatisiert und operiert. Vor der eigentlichen Operation und in Narkose erfolgte die Anlage einer arteriellen Kanüle zur blutigen Blutdruckmessung in der zentralen Ohrarterie.

Anschließend wurde die Maskennarkose eingeleitet und ein EKG abgeleitet. Das Tier wurde in Rückenlage auf einer mit 37 °C beheizten Unterlage auf dem OP-Tisch gelagert und der zu operierende Hinterlauf mit Polyvidon-Jod (Betasisodona-Lösung®) desinfiziert und ein steriles OP-Feld durch Stoff- und Papierabdeckungen hergestellt. Nach einer ca. 5 cm langen Hautlängsinzision an der anteromedialen Seite des Unterschenkels wurde das Periost so gut wie möglich vom Schaft entfernt und ein monolateraler Distraktor (Typ Orthofix M-103®) von anterior in einem Winkel nach medial von ca. 20° an die Tibia angelegt.

Diese Position erwies sich in durchgeführten Vorversuchen von Meffert et al. (74-76) als optimal, da dadurch das Kaninchen den Fuß wieder ungestört beugen konnte und sich Druckstellen vermeiden ließen. Das bedeutete für uns einen Kompromiss zwischen Tragesicherheit und Stabilität (77).

Um die konischen Pins (2,0-2,5 mm Durchmesser) einzusetzen, mussten zunächst mit einem Bohrer Löcher mit einem Durchmesser von 2 mm vorgebohrt werden.

Die Osteotomie folgte mittels einer wassergekühlten, oszillierenden Säge (Stryker, Model 1370), wobei ein Knochenblock von ca. 10 mm Länge (entsprechend ca. 10 % der Tibia-Gesamtlänge) direkt unterhalb der Verschmelzung von Tibia und Fibula resiziert wurde (siehe Abbildung 8).

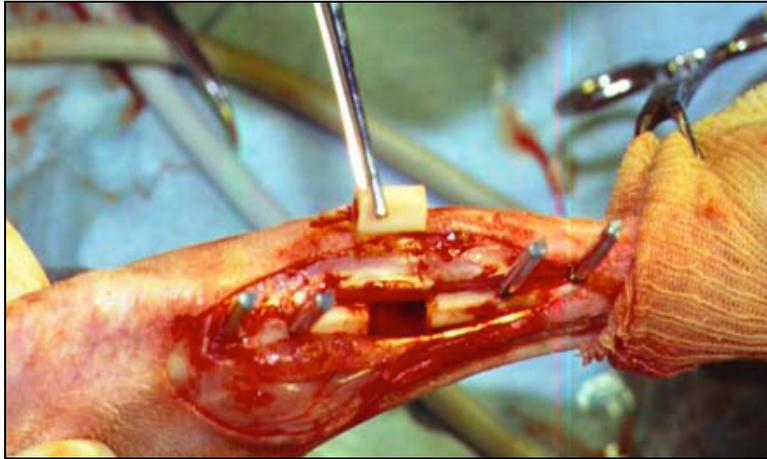


Abbildung 8: Resektion eines 10 mm großen Knochenblocks

Die entstandene proximale und distale Markraumöffnung wurde mit einem durch VEGF₁₆₅ versetzten Kollagen (Resorba®) aufgefüllt und der Knochendefekt durch eine kompressionsfreie Verkürzung geschlossen. Um den Knochendefekt herum fixierten wir ein zusätzliches, mit 12 µg VEGF₁₆₅ versetztes Kollagen (Resorba®), das in Abbildung 9 zu sehen ist.

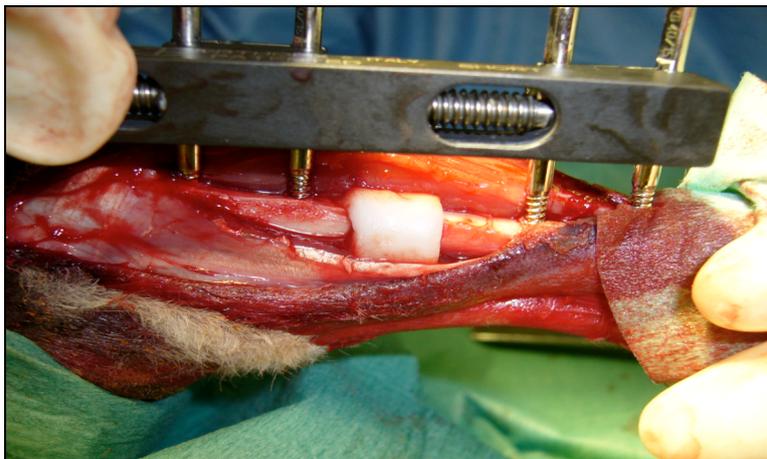


Abbildung 9: VEGF₁₆₅ versetztes Kollagen (Resorba®)

Die den Knochen umgebenden Weichteile wurden zur Vermeidung von Interponaten sowie lokaler Knick- oder Druckbildungen schonend retrahiert und das Muskelkompartiment des Musculus tibialis anterior zur Entlastung nicht geöffnet. Da die im Weichteilmantel verbliebenen Reste des sehr dünnen Periosts nicht vernäht werden konnten, erfolgte ein plastischer Verschluss durch die Adaptation an die ortsständige Muskulatur. Diese konnte aufgrund der Verkürzung spannungsfrei durch eine Vereinigung des ventralen Kompartiments mit der umliegenden Muskulatur durch einen resorbierenden Faden (Vicryl 5-0) durchgeführt werden.

Die Wunde wurde dann mittels Naht und Flüssigpflaster verschlossen.

Zum postoperativen Monitoring wurden die operierten Kaninchen auf eine Decke unter eine wärmende Rotlichtlampe gelegt und über einen Zeitraum von ca. 30 min. beobachtet, um das Selbstverletzungsrisiko im Benommenheitszustand zu minimieren. Erst danach wurden die Kaninchen wieder zurück in ihren Stall gebracht.

Ad nunc durften die Tiere das operierte Bein schmerzadaptiert bewegen und belasten.

2.5 Kompartimentdruckmessung

Die Kompartimentdruckmessung der Extensorenloge des Unterschenkels führten wir minimal-invasiv und unter Narkose mittels einer piezoresistiven Drucksonde durch. Um eine Aussage über den Verlauf des Logendrucks in Verbindung mit unserem Traumamodell zu erhalten, wurde der Druck unmittelbar präoperativ, nach Traumatisierung und postoperativ an beiden Kaninchenhinterläufen gemessen. Außerdem wurde simultan der arterielle Blutdruck aufgezeichnet um sicherzustellen, dass ein Logensyndrom vorlag, und es grafisch darstellen zu können.

Um ein mögliches postoperatives Ansteigen des Druckes frühzeitig zu erkennen und gegebenenfalls eine therapeutische Fasziotomie einzuleiten, wurde die Messung jeweils 24 und 48 Stunden nach der Operation wiederholt. Bei einem postoperativen Kompartimentdruckanstieg von über 20 mmHg wurde das Tier engmaschiger beobachtet und die Messung des Logendrucks in kürzeren Abständen wiederholt.

Dazu wurde unter sterilen Bedingungen eine 14 G (orange) Braunüle ca. 2 cm distal des Ursprungs des M. tibialis anterior bis in die Muskelloge vorgeschoben und die Metallkanüle entfernt. Danach wurde die desinfizierte, piezoresistive Sonde des

Druckmessgerätes ca. 2 cm tief in das Kompartiment geschoben und die Braunüle über die Sonde zurückgezogen (siehe Abbildungen 10-12). Die exakte Platzierung und eine neutrale Gelenkposition im Tibiotarsal-Gelenk mit einer Dorsalflexion von 90° (77) waren für den Erhalt der reproduzierbaren Druckwerte besonders wichtig.



Abb. 10: Logenpunktion

Abb. 11: Sondeneinführung

Abb. 12: Logenlage

Der arterielle Blutdruck wurde mittels Punktion der zentralen Ohrarterie (Arteria auricularis media) blutig bestimmt. Zur Erzeugung einer Hyperämie und Darstellung der Arterie wurde die Außenseite des Ohrs vorsichtig mit den Fingerspitzen beklopft und der Puls zur Kontrolle ertastet. Nach der Rasur der Punktionsstelle mit einem Einmalrasierer wurde sie desinfiziert und mittels einer 22 G Braunüle punktiert. Die Braunüle wurde mittels Klebeband fixiert und mit der Drucksonde verbunden. Diese war mit dem Spider-8-Messgerät und einem Laptop verbunden, so dass wir den Blutdruck in Echtzeit auf dem Bildschirm verfolgen und speichern konnten.

Für die Messung des Logendruckes mussten zwei verschiedene Druckmessgeräte eingesetzt werden. Durch den Ausfall der ersten Drucksonde, die nicht innerhalb unserer Versuchsperiode repariert werden konnte, kam ein Ersatzgerät zum Einsatz. Die Messvorbereitungen und die Messungen mit der neuen Drucksonde erfolgten nach demselben, zuvor beschriebenen Schema.

Die perioperativen Kompartimentdrücke der beiden ersten Tiere (Tier B, Tier C) wurden mit einer RAUMEDIC Drucksonde gemessen. Diese war an ein Spider-8-Datenerfassungsgerät angeschlossen und mit einem Laptop verbunden. So war es möglich, in Abständen von 0,02 Sekunden den Kompartimentdruck zu messen und einen sehr genauen Mittelwert zu ermitteln, der dann in Relation zum simultan

gemessenen, arteriellen Blutdruck gesetzt wurde und auf dem Bildschirm zu verfolgen war (siehe Abbildung 13).

Als Ausweichgerät wählten wir den KODIAG der Firma Braun Shering Expertise (siehe Abbildung 14), ein durch eine 9V-Batterie betriebenes Gerät mit einer 3-stelligen LCD-Anzeige und einer Auflösung von 1 mmHg.

Die mit einem Durchmesser von 4 French mitgelieferte piezoresistiven Sonde wird vom Hersteller mit einer Empfindlichkeit von $5 \mu\text{V/V mmHg}$ in einem Messbereich von 0-200 mmHg und einer Genauigkeit von $\pm 1 \text{ mmHg}$ angegeben. Die Langzeitstabilität beträgt $< 2 \text{ mmHg/24 h}$, max. 5 mmHg.

Mit diesem Gerät wurden die postoperativen Drücke (24 h und 48 h) der Tiere B und C sowie die Kompartimentdrücke aller anderen neun Tiere ermittelt. Bei beiden Sonden wurde genau auf die neutrale Gelenkposition der Tiere geachtet. Die Druckwerte mussten nach einer Manipulation der Gelenkstellung und äußerem Druck auf einen konstanten Wert zurückfallen, der aber erst notiert wurde, wenn er sich mindestens 5 Sekunden lang nicht veränderte.

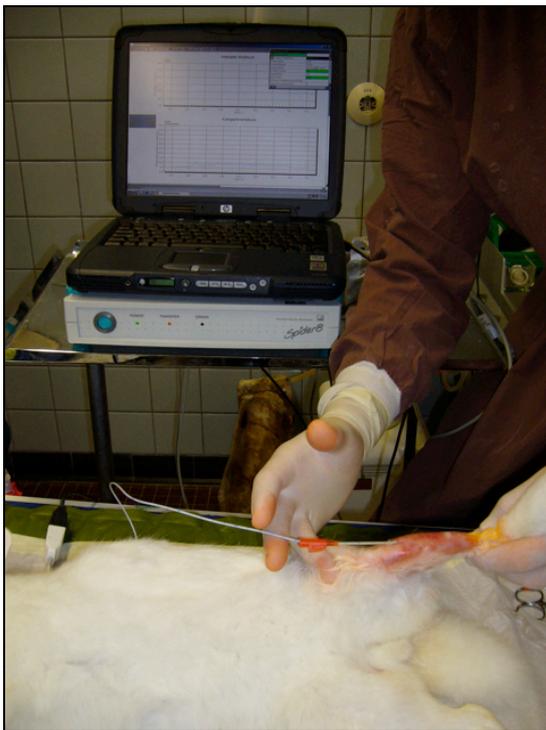


Abbildung 13: RAUMEDIC Drucksonde verbunden mit einem Spider-8-Datenerfassungsgerät und Laptop



Abbildung 14: KODIAG Drucksonde

2.6 Kallusdistraktion

Die Kallusdistraktionsphase dauerte vom 10. bis zum 20. postoperativen Tag, also insgesamt 10 Tage.

Hierzu wurde alle 12 Stunden das operierte Bein um 0,5 mm distrahiert (siehe Abbildung 15), das entspricht einer halben Umdrehung im Uhrzeigersinn am monolateralen Distraktor vom Typ ORTHOFIX M-103®.

Nach 10 Tagen hatten wir somit unsere Tibia-Ausgangslänge von 10 mm erreicht.

Die Distraktion führten wir ohne Narkose durch, da es für die Tiere wie auch für Menschen, Erwachsene und Kinder gleichermaßen, nicht schmerzhaft ist.

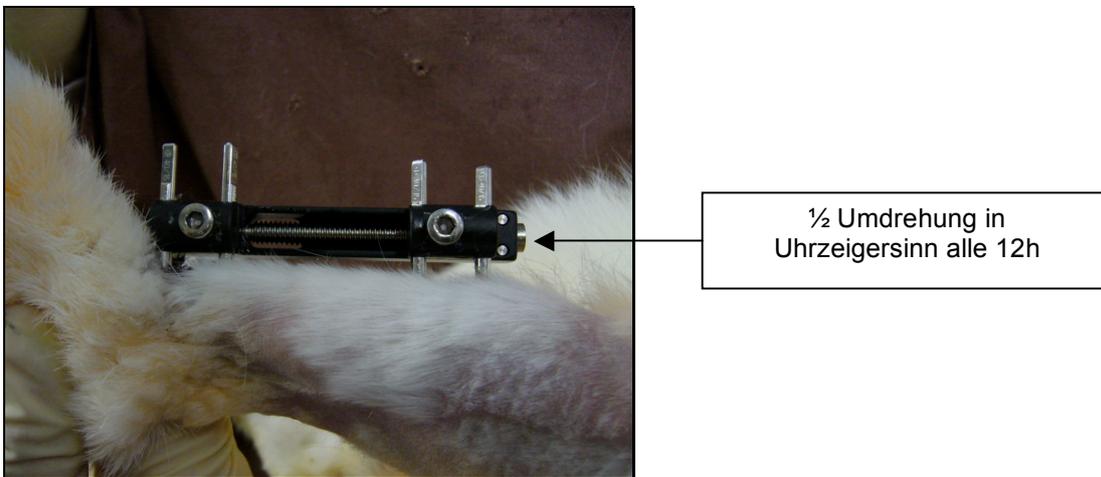


Abbildung 15: Kallusdistraktion

2.7 Muskelkraftmessung

Die postoperative Muskelkraftmessung wurde regelmäßig beidseitig in fünf Tagesabständen vorgenommen. Auch präoperativ wurde eine Messung an allen Tieren durchgeführt, um Referenzwerte für die Muskelkraftherholung am Ende unseres Versuches zu erhalten und sie mit der Kontrollgruppe (40) auf Signifikanz vergleichen zu können. Hier war es uns wichtig herauszufinden, ob die Gabe von VEGF₁₆₅ einen Einfluss auf die Muskelkraftherholung nach einer Traumatisierung besitzt.

Präparation

Die Muskelkraftuntersuchungen wurden sowohl prä- als auch postoperativ immer nach demselben Schema durchgeführt.

Zur Vorbereitung auf die Untersuchung wurde das Kaninchen narkotisiert, um das Tier zu fixieren und um eine Schmerzfreiheit zu garantieren. Außerdem diente die Narkose der Entspannung und Relaxierung des Muskels, die zur Verhinderung eines systematischen Fehlers wichtig sind. Ein nicht gut relaxierter Muskel würde zu einer deutlich geringeren Kraftentwicklung und damit zu einer Ergebnisverfälschung führen.

Um eine bessere Auflagefläche zu erreichen und den Kontaktwiderstand zu senken, mussten im Verlauf des Nervus fibularis profundus (siehe Abbildung 16) die Haare rasiert bzw. nachrasiert werden. Dabei wurde eine Fläche, angefangen hinter dem Fibulaköpfchen bis zur Mitte des Oberschenkels, glatt rasiert. Dazu wurden wieder die bereits erwähnten Hilfsmittel wie Maschinenrasur, Nassrasur und Veet Enthaarungscreme verwendet.

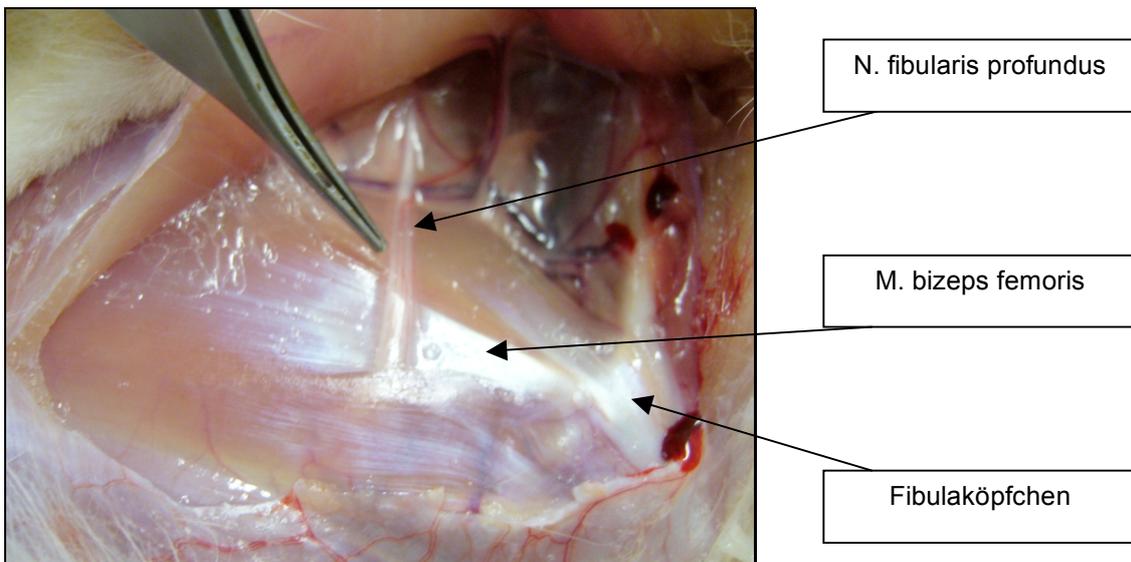


Abbildung 16: Postmortale Darstellung des Verlaufs des Nervus fibularis profundus

Dann wurde das narkotisierte Kaninchen positionsgerecht in einem 90°-Winkel auf den Untersuchungsstuhl gesetzt und mittels Klettverschlüssen am Oberkörper fixiert. Das zu untersuchende Bein musste im Knie- und Fußgelenk den 90° Winkel bilden, um das Ziel einer isometrischen Kontraktion zu erreichen (siehe Abbildung 17). Unter der

Platte des Krafttransducers wurde ein ca. 1 cm² großes, doppelseitiges Klebeband geklebt, damit das vordere Drittel des Kaninchenfußes nicht verrutschen konnte.

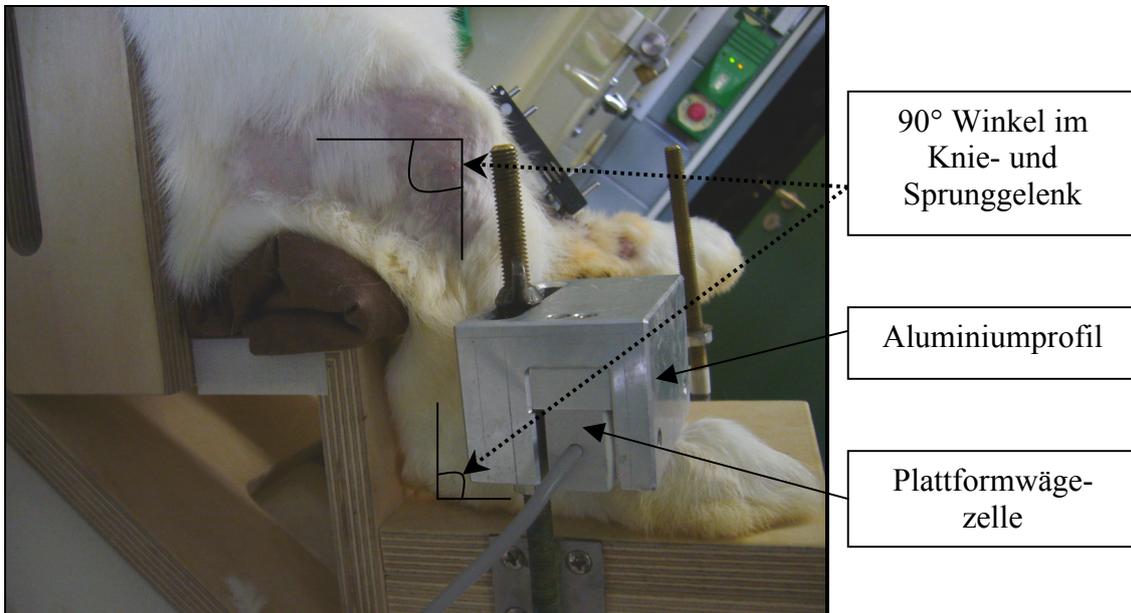


Abbildung 17: Kaninchen im Untersuchungsstuhl zur Muskelkraftmessung

Messeinrichtung

Nach der messgerechten Fixierung des Tieres wurde die transkutane elektrische Nervenstimulation mittels einer bipolaren Elektrode stimuliert, diese verfügt über zwei Metallkontakte in einem Abstand von 7,5 mm. Auf die Elektrode wurde etwas Kontaktcreme (Epicont Hellige; Hersteller GE Medical Systems) aufgetragen und dann der Nerv gesucht (siehe Abbildung 18). Dieser war anfangs sehr schwer zu finden und man benötigte etwas Geduld und Übung.

Der Nerv wurde mit einer Reizamplitude von 5,1 mA, Reizlänge 2,56 ms und einem Intervall von 50 ms stimuliert. Diese Werte wurden durch Voruntersuchungen (74) ermittelt und gelten als optimale Einstellung. Dabei kommt es zu keiner maximalen oder tetanischen Kontraktion, die die Ergebnisse verfälschen könnte. Der Nerv wurde mehrmals stimuliert, um eine ausreichende Anzahl von Ausschlägen registrieren zu können. Aus den so erzielten Messwerten wurde dann ein Mittelwert berechnet.

Die Stimuli wurden von einer Plattform-Wägezelle (PW4KRC3 der Firma Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH) aufgenommen, die über ein Datenerfassungsgerät

(Spider 8), ebenfalls von der Firma HBM GmbH, wiederum mit einem Laptop verbunden war (Abbildung 18). So war es möglich, die Kraftkurven in Echtzeit auf dem Laptopbildschirm zu verfolgen und sie direkt in Form einer Exceltabelle zu speichern. Der Transducer bzw. die Plattform-Wägezelle (Abbildung 17, 18) wurde durch ein Aluminiumprofil auf dem Untersuchungsstuhl gehalten, dadurch war es möglich, den Kraftsensor präzise über das vordere Drittel des Kaninchenfußes zu fixieren.

Eine Wägezelle ist eine Sonderform des Kraftsensors, sie misst die Masse eines Körpers in Gramm bis Tonnen und nicht direkt die Kraft in Newton wie bei einem Kraftaufnehmer. Über einen Dehnungsmessstreifen werden die auf einen Körper wirkenden Scherkräfte durch eine Veränderung der Geometrie in elektrische Impulse umgewandelt (Transducer) (121), mit einem Catman-Analyseprogramm erfolgt dann die Wandlung in die Einheit Newton und ihre Darstellung.

Das verwendete Gerät wird vom Hersteller mit einer Nennlast von 0,3 Kg bis 3 Kg und einer Genauigkeitsklasse von C3MR angegeben.

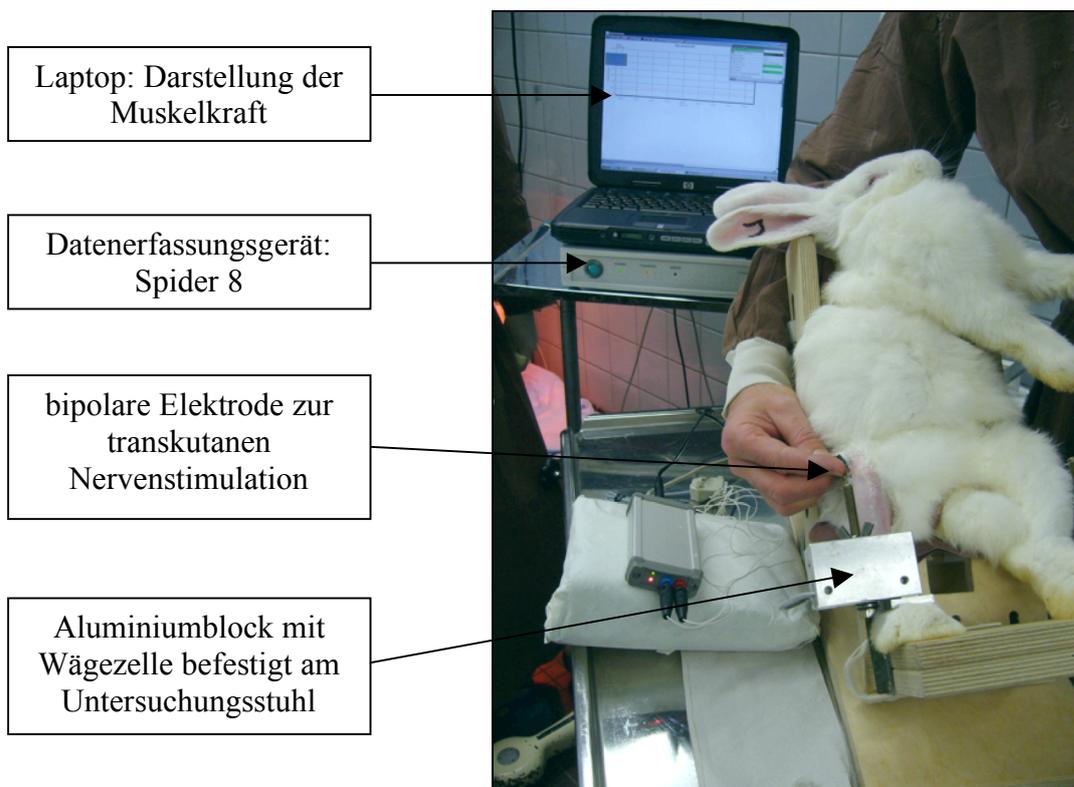


Abbildung 18: Messapparatur der transkutanen Nervenstimulation

2.8 Radiologisches Monitoring

In der Einführungswoche wurde bei jedem Tier eine Röntgenaufnahme durchgeführt, um weitere Referenzwerte für die späteren Ergebnisse zu erhalten.

Postoperativ und danach in 10 Tagesabständen wurden die Aufnahmen am operierten Bein in einem 90° Winkel zum Fixateur mit Gegenseite wiederholt.

Alle Aufnahmen führten wir mit einer Exposition von 33 kV, 10 mAs für 3 msec durch. Der Röhren-Film-Abstand betrug 65 cm.

Weitere Einzelheiten hierzu werden in den Dissertationen von Karla Schütte und Niklas Deventer dargelegt.

2.9 Tötung und Probenentnahme

Nach 40 Tagen wurden die Kaninchen mit Hilfe einer intramuskulären Mischinjektion mit 1,5 ml Ketamin (100 mg/ml) und 0,5 ml Rumpun[®] (Xylacin 20 mg/ml) narkotisiert und danach mit einer intrakardialen Injektion von T61[®] getötet.

Zunächst wurden die Hinterläufe der Versuchstiere im Hüftgelenk exartikuliert und die Pins und die Distraktoren demontiert.

Danach wurde durch einen mediodorsalen Längsschnitt das Fell sorgfältig mit einem Skalpell entfernt und die Muskelfaszie vorsichtig eröffnet, um den Musculus tibialis anterior nicht zu beschädigen. Dieser wurde an den Sehnen unterhalb der Patella und in Höhe des Sprunggelenks delikate von der Tibiavorderkante entfernt, um möglichst das Periost nicht zu verletzen.

Hic et nunc wurde der Muskel auf einen Korkstreifen mittels einer Naht fixiert und in Paraformaldehyd konserviert, um die Muskelzellen und das Bindegewebe vor der postmortalen Autolyse zu schützen.

Die Entsorgung der Kadaver erfolgte dann gemäß den gesetzlichen Bestimmungen.

2.10 Aufarbeitung der Proben

2.10.1 Gewinnung der histologischen Schnitte

Die auf einer Korkplatte fixierten Muskelproben verweilten in 4 %-igem Paraformaldehyd für 24-48 Stunden bei einer Kühlschranktemperatur von 4 °C.

Erst nach dieser Lagerung der Präparate entschieden wir uns die Muskulatur zu schneiden, da Schnittversuche am frischen Muskel zu Verunstaltungen und Zerfransungen geführt hatten. Außerdem wurde durch diese Methode die Zeit bis zur Autolyse weiter verkürzt.

Die entnommenen 22 Präparate der 11 Tiere wurden von proximal aus in 4 gleichgroße Muskelstücke geschnitten und aufsteigend nummeriert, um Schnitte aus verschiedenen Bereichen des Muskels für die spätere histologische Untersuchung zu gewinnen (Abbildung 19).

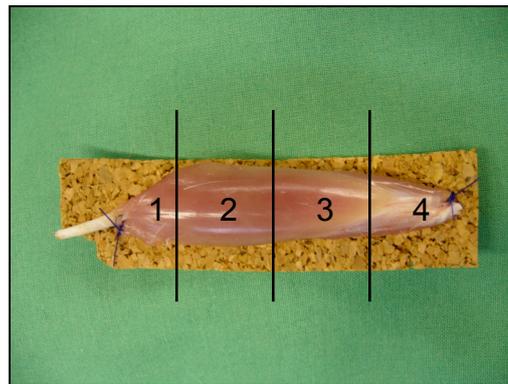


Abbildung 19: An einer Korkplatte fixierter Musculus tibialis anterior; Schnitt in 4 gleichgroße Stücke

Anschließend wurden die Proben in eine 0,1 molare Pufferlösung mit einem pH-Wert von 7,4 für 24 h gelagert. Um die Proben später am Mikrotom besser schneiden zu können, wurden sie nach dieser Lagerung in eine 20 %-ige EDTA-Lösung (Ethyldiamin-tetraacetat) gegeben. Dort verblieben die Präparate für weitere 2 Wochen, bevor sie erneut in eine Pufferlösung (0,1 molar; pH 7,4; Wechsel 2 bis 3-mal pro Tag) gegeben wurden. Die so entkalkten Proben verweilten in der Pufferlösung für 24 h. Danach erfolgte das nachfolgend beschriebene Entwässerungsschema:

Eine Lagerung über 8 h in 70 % Isopropanolalkohol, anschließend für jeweils 24 h in 90 %, 96 % und 100 % Isopropanolalkohol. Die Alkohole wurden 2 bis 3-mal täglich gewechselt, um die entsprechende Alkoholkonzentration beibehalten zu können.

Im Anschluss daran lagerten die Proben in Zedernholzöl für ca. 2 Wochen und danach für 24 h in einer Zedernholzöl-Paraffin-Mischung (1:1) bei 48 °C. Wir verwendeten Zedernholzöl, um die Antigene für die spätere Immunhistologie nicht zu gefährden. Zuletzt folgte eine aufsteigende Paraffinreihe I-V im Wechsel von 8 h und 16 h bei 60 °C, um das schwerflüssige Zedernholzöl durch das Paraffin zu verdrängen.

Am folgenden Tag wurden die Präparate mittels der Einbettstation AP280 der Firma MICROM in Paraffin eingebettet und die entstehenden Blöcke anschließend auf einer Kühlplatte bei -10 °C für einige Minuten ausgehärtet.

Die Paraffinblöcke mit den enthaltenen Muskelstücken 2 und 3 (siehe Abbildung 19) wurden mit dem Schlittenmikrotom der Firma LEICA in 5 µm dünne Schnitte gefertigt, auf handelsübliche Objektträger fixiert und anschließend im Wärmeschrank über Nacht gestreckt. Wir wählten gezielt diese Muskelstücke, weil sich das Weichteiltrauma hauptsächlich in diesem Bereich abgespielt hatte.

2.10.2 Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE)

Die Schnittpräparate wurden zum Entparaffinieren dreimal für fünf Minuten in Xylol und anschließend in eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 % und 70 % Ethanol) für jeweils fünf Minuten in Wasser gebracht. Danach wurden die Proben für zwei Minuten in Aqua destillata gelegt und im Anschluss in die Färbelösung Hämalan nach Mayer (Bindung der positiv geladenen Komplexverbindungen des Alauns an die negativ geladenen Phosphatgruppen von Nukleinsäuren) für zehn Minuten gegeben. Hiernach wurden die Präparate für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut (intensive Verdunklung der Farbe bei höher werdendem pH). Es folgte eine Färbung mit Eosin (negativ geladene Teilchen binden an positive Gruppen wie Eiweiße). Schließlich wurden die Schnitte in 70 % Ethanol differenziert und durch eine aufsteigende Alkoholreihe (96 % und 100 % Ethanol) für jeweils zweimal zwei Minuten wieder entwässert. Nach dem erneuten Eintauchen in Xylol wurden die Proben mit Eukitt eingedeckt.

Nach der Färbung sollen sich die Zellkerne in blau, das Muskelgewebe in rot und das Kollagengewebe in einem dunklen rot darstellen.

2.10.3 Azan-Färbung nach Heidenhain

Zur Herstellung dieser Färbung wurden die Schnitte wie bei der oben beschriebenen HE-Färbung entparaffiniert und in Wasser gebracht.

Danach wurden die Präparate zum Vorbeizen für fünfzehn Minuten in Anillinalkohol bei 37 °C gelegt und anschließend in vorgewärmtem Aqua destillata gespült. Hierdurch sollte verhindert werden, dass die Schnitte durch den starken Temperaturunterschied reißen. Im Anschluss wurden sie in einer vorgewärmten Azokarminlösung im Wärmeschrank bei 60 °C für fünfzehn Minuten gefärbt und später wieder in warmem Aqua destillata mehrmals gespült und abgekühlt.

Die abgekühlten Präparate wurden anschließend nochmals in Anilinalkohol solange differenziert, bis nur noch die Zellkerne deutlich hervortraten. Die Differenzierung wurde durch essigsaurer Alkohol unterbrochen (ca. fünf Minuten) und die Schnitte hinterher wieder in Aqua destillata gespült.

Es folgte das Entfärben und Beizen des Bindegewebes in 5 %-iger Phosphorwolframsäure für ca. 1,5 Stunden. Nach kurzem Abspülen in Aqua destillata wurden die Schnitte in einem Anilinblau-Orange-Gemisch (Anilinblau-Orange: Aqua destillata= 1:2) für ca. 30 Minuten gefärbt und danach mehrmals in Aqua destillata gespült.

Das Differenzieren von Bindegewebe und Gewebsbestandteile, bis diese deutlich hervortraten, erfolgte mittels 96 %-igem Ethanol.

Danach wurden die Präparate in 98 % und 100 % Isopropanolalkohol entwässert und nach einem Eintauchen in Xylol mit Eukitt eingedeckt.

Dabei sollen sich die Zellkerne rot, das Kollagen/retikuläre Fasern hellblau und die Muskelfasern rot anfärben.

2.11 Histomorphometrie

Die Histomorphometrie diente der quantitativen Bestimmung des Bindegewebes bzw. des Narbengewebes im M. tibialis anterior. Da die Muskulatur ein hochregeneratives Gewebe ist (siehe Einleitung), verglichen wir den Bindegewebsanteil der Kontrollgruppe (40) mit unseren Versuchstieren, die zusätzlich VEGF₁₆₅ erhalten hatten, auf Signifikanz.

Die querschnittenen Muskelschnitte der oben erwähnten Paraffinblöcke 2 und 3 (in diesem Bereich erfolgte die Traumatisierung) wurden mit Hilfe des Programms Image-Pro Plus und des Mikroskops Olympus BX51 in 40-facher Vergrößerung einzeln abfotografiert.

Mit dem Bildbearbeitungsprogramm „The Gimp“ wurden die Bilder von Faszie und größeren Gefäßen sowie Nervengewebe befreit. Um das Verhältnis zwischen Muskel- und Bindegewebe zu ermitteln, verwendeten wir wiederum das Programm Image-Pro Plus für Windows, das anhand der Farbpixel die Flächen von Muskelgewebe und Bindegewebe berechnet und beide ins Verhältnis setzt.

Nach derselben Methode wurden nochmals die Muskelschnitte der zu vergleichenden Kontrollgruppe (40) bearbeitet und das Verhältnis berechnet, um möglichst eine einheitliche Auswertungsmethode zu erhalten und systemische Fehler beim Vergleich zu vermeiden.

Beide Gruppen wurden von zwei unabhängigen Personen zweimal ausgewertet und der Mittelwert mit der Standardabweichung berechnet.

Anhand der Mittelwerte der Bindegewebsanteile wurden dann beide Gruppen auf Signifikanz untersucht, um mögliche Auswirkungen durch die Gabe von VEGF₁₆₅ zu erforschen.

2.12 Immunhistochemische Analyse

Die Immunhistologie diente zur Darstellung von Gefäßen im Musculus tibialis anterior. Da aus der Literatur bekannt ist, dass die Gabe von VEGF₁₆₅ zur Neovaskularisation führt (siehe Einleitung), bestand unsere Idee darin, mögliche Veränderungen durch VEGF₁₆₅ in der Histomorphometrie und in der Muskelkraft auch immunhistochemisch durch die Veränderung der Gefäßzahl zu untersuchen und eine eventuelle Korrelation herauszufinden. Hierbei wurden sowohl die Kontrollgruppe (40) als auch die Versuchsgruppe nach demselben Schema untersucht und quantifiziert.

Die immunologische Darstellung der Gefäße erfolgte mit einem Antikörper gegen α -Smooth Muscle Actin (SMA).

Dieses zum Mikrofilamentsystem des Zytoskeletts zugehörige Protein zählt zu einem der sechs Isoformen des Aktinproteins (α -Skelettmuskel, α -Herzmuskel, α -Smooth Muscle, β -Non-muscle, γ -Smooth Muscle und γ -non-muscle) (101).

Wir wählten diesen Antikörper aus, weil er spezifisch glatte Muskelzellen, wie in den Gefäßen vorhanden, selektiv bindet. Damit lassen sich die Gefäße gezielt färben und darstellen.

Zunächst wurden die Proben zum Entparaffinieren dreimal für fünf Minuten in Xylol gelegt und mittels der absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 % für jeweils 2 Minuten) rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte zum Beizen in TBS-Puffer (Tris Buffered Saline) dreimal für fünf Minuten gegeben und danach zur Demaskierung in das proteolytische Enzym Trypsin für zehn Minuten bei 37 °C gelegt. Beendet wurde die Reaktion durch das Eintauchen der Proben in Aqua destillata für fünf Minuten. Hiernach erfolgte ein erneutes Waschen in TBS-Puffer für fünf Minuten. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden, wurden die Proben mit 10 %-igem Pferdeserum über dreißig Minuten beimpft. Erst im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit dem SMA-Antikörper (Monoklonaler Maus Anti-Human Smooth Muscle Actin, Verdünnung 1:400) über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Morgen wurden die Präparate erneut in TBS-Puffer gewaschen (3x5 Minuten) und das Ergebnis der Inkubation mittels eines biotinylierten Anti-Maus IgG und Anti-Ziege IgG aus einem Pferd (Vector Laboratories, Burlingame, USA) und anschließender Avidin-Biotin-Komplex Detektion (Vectastain® ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) für jeweils dreißig Minuten nachgewiesen. Nach jeder Beimpfung mit den oben genannten

Substanzen wurde jeweils dreimal für zehn Minuten mit TBS-Puffer gewaschen. Das Entwickeln der Schnitte erfolgte über zwanzig Minuten im Dunkeln mit Vector[®]Red (Substrat Kit I, Vector Laboratories, Burlingame, USA) und das Gegenfärben mit Vector[®] Methyl-Grün (Carl Roth, Karlsruhe) für fünf bis zehn Minuten bei 60 °C. Danach wurde die Reaktion durch Aqua Destillata gestoppt und die Versuchsproben mittels der aufsteigenden Alkoholreihe (95 %, 100 % für je 5 Sekunden) dehydriert und nach dem Eintauchen in Xylol mit Eukitt eingedeckt.

Hierunter sollte sich die Skelettmuskulatur unter dem Lichtmikroskop in einem sehr hellen blauen Ton abzeichnen. Die Gefäße bzw. die glatte Muskulatur der Gefäße sollte sich dunkelrot färben.

Für die Auswertung der Schnitte wurden von einer unabhängigen Mitarbeiterin jeweils zehn willkürliche Ausschnitte eines Präparates in 100-facher Vergrößerung mit dem Bildanalysesystem Olympus BX51 abfotografiert. Als nächstes wurden die einzelnen Ausschnitte von derselben Mitarbeiterin mit Hilfe der Software Image-Pro Plus anhand der Gefäßzahl quantifiziert. Hierzu berechnete die Software anhand der Farbpixel die Gefäßzahl nach den Größen 0-5 µm, 5-10 µm, 10-20 µm und >20 µm, die in einer Excel-Tabelle gespeichert wurden.

2.13 Statistik

Für die statistische Auswertung und die grafische Darstellung wurde das Programm Microsoft Excel 2004 für Apple verwendet.

Berechnet wurde als Lagemaß der arithmetische Mittelwert (MEAN) und die Standardabweichung (SD). Zum Feststellen von Signifikanzen anhand der berechneten Mittelwerte wählten wir in Absprache mit einem Biomathematiker den zweiseitigen t-Test für unverbundene Stichproben. Als signifikant wurde p kleiner als 0,05 bestimmt.

3. Ergebnisse

Von den ursprünglich 14 gelieferten Kaninchen verstarb ein Tier bereits präoperativ, eins während und ein weiteres direkt nach der Operation. Das entspricht einer Dropout-Rate von 21,4 % und liegt im Rahmen der Ergebnisse der Kontrollgruppe (40). Eine Obduktion zur Ermittlung der Todesursache wurde aufgrund der einkalkulierten Dropout-Rate und der jetzt mit der Kontrollgruppe (40) identischen Anzahl von Tieren, die verglichen werden sollen, nicht durchgeführt.

Neun der überlebenden 11 Tiere zeigten während der Postoperationsphase keine klinischen und radiologischen Auffälligkeiten mit einer achsengerechten Kallusbildung und einer unauffälligen Wundheilung.

Das Tier E entwickelte am 30. postoperativen Tag eine leichte Fixateurdruckstelle, die erfolgreich mit einer Betaisodona-Salbe und einem Klettband zur Abpolsterung der Druckstelle behandelt wurde.

Am 16. Tag stellten wir bei der Visite bei dem Tier G eine Fixateurlockerung fest, die wieder befestigt wurde. Die danach vorgenommene vorsorgliche radiologische Untersuchung zeigte aber keine Auffälligkeiten.

3.1 Kompartimentdruck

Die Logendrucke wurden präoperativ, nach der Traumatisierung und im Anschluss an die Operation sowie jeweils nach 24 h und 48 h gemessen.

Um das Kompartmentsyndrom zu bestätigen, wurde in dieser Studie zusätzlich der arterielle Blutdruck simultan gemessen.

Alle Tiere hatten vor der Operation und der Traumatisierung einen durchschnittlichen Logendruck von $6,8 \text{ mmHg} \pm 0,8 \text{ mmHg}$ (SD 11,7 %) und lagen somit im physiologischen Rahmen des Logendrucks (siehe Einleitung).

Nach der Weichteiltraumatisierung entwickelten alle Tiere ein Kompartmentsyndrom mit einem durchschnittlichen Wert von $29,9 \text{ mmHg} \pm 3,9 \text{ mmHg}$ (SD 13,2 %), was im

Diagramm 2 dargestellt wird. Ferner lässt sich dem Diagramm entnehmen, dass sich die Differenz zwischen dem mittleren arteriellen Blutdruck und dem Logendruck verringert hat, was die Diagnose eines Kompartmentsyndroms bestätigt. Je nach Autor wäre der kritische Kompartimentdruck für eine Einleitung der chirurgischen Therapie erreicht (siehe Einleitung). Durch die 1 cm große Knochenblockresektion und die Verkürzung der jeweiligen Extremität konnte eine Erweiterung des Kompartments erreicht werden, das dadurch mehr Volumen aufnehmen und somit den Logendruck senken konnte.

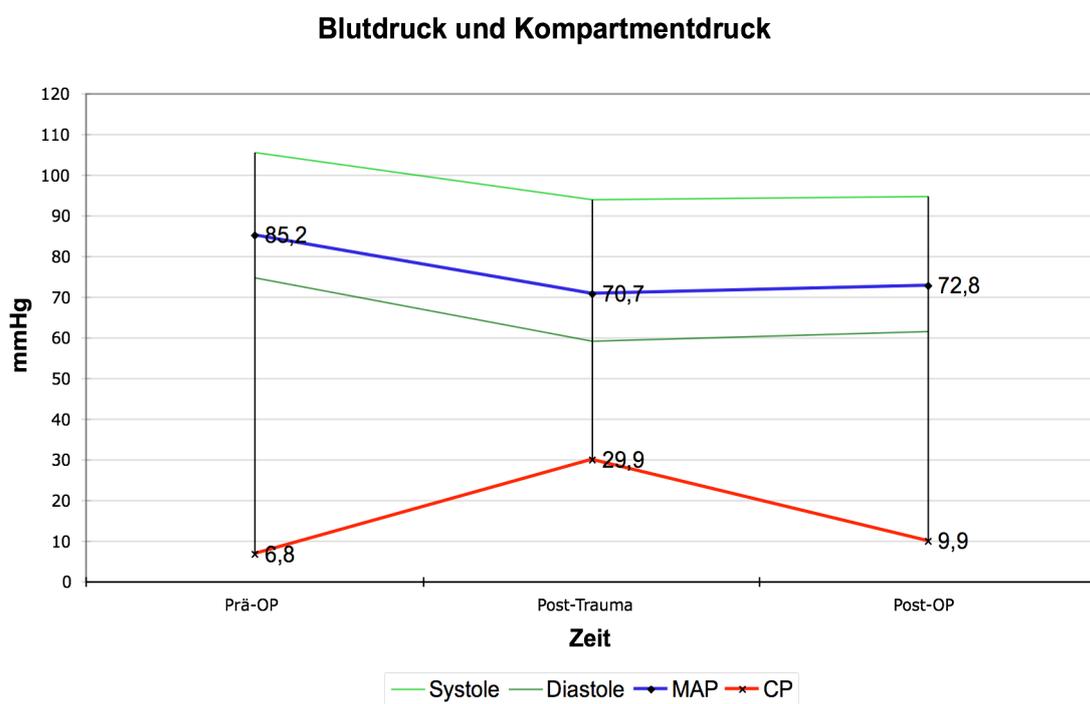


Diagramm 2: Verlauf der Mittelwerte von Kompartimentdruck und Blutdruck in der Perioperationszeit; MAP= mittlerer arterielle Druck; CP= Kompartimentdruck

Besonders auffällig waren hier die interindividuellen Drucksenkungen bei den Tieren. Bei dem Tier C ließ sich der Logendruck nach der Operation um 88,3 % senken, wobei sich bei Tier I der Druck nur um ein Drittel senken ließ. Insgesamt konnte der Kompartimentdruck bei allen Tieren um durchschnittlich 66 % auf 9,9 mmHg \pm 4,9 mmHg gesenkt werden und lag somit im Durchschnitt 45,6 % höher als der Ausgangswert, jedoch noch im Rahmen des physiologischen Bereichs.

Bei zwei Tieren ließen sich die Drücke nicht unter 13 mmHg senken und betrugen 19 mmHg (Tier I) und 17 mmHg (Tier G). Diese standen nach der Operation unter einer engmaschigen, klinischen Kontrolle für eine eventuelle operative Fasziotomie, die jedoch nicht notwendig war. Der Logendruck senkte sich stetig bei fast allen Tieren im Verlauf von 24 Stunden und lag durchschnittlich etwas höher als der Ausgangswert bei 7,2 mmHg (SD 53 %). Die Tiere E und F verzeichneten eine Zunahme des Druckes, der sich jedoch nach 48 Stunden senkte und bei 8 mmHg lag.

Insgesamt stieg der Logendruck im Rahmen des physiologischen Bereiches bei der überwiegenden Zahl der Tiere nach weiteren 24 Stunden um 10 % an auf Werte bis 13 mmHg und betrug durchschnittlich $7,9 \text{ mmHg} \pm 3 \text{ mmHg}$.

Am Ende unserer Logendruck-Messreihe lagen fast alle Logendrucke wieder im physiologischen Druckbereich, wobei fünf Kaninchen ihren Ausgangswert erreichten bzw. diesen unterboten.

Der Verlauf des Logendrucks wird in Diagramm 3 nochmals anschaulich dargestellt.

Kompartimentdruckverlauf in der Tibialis anterior Loge

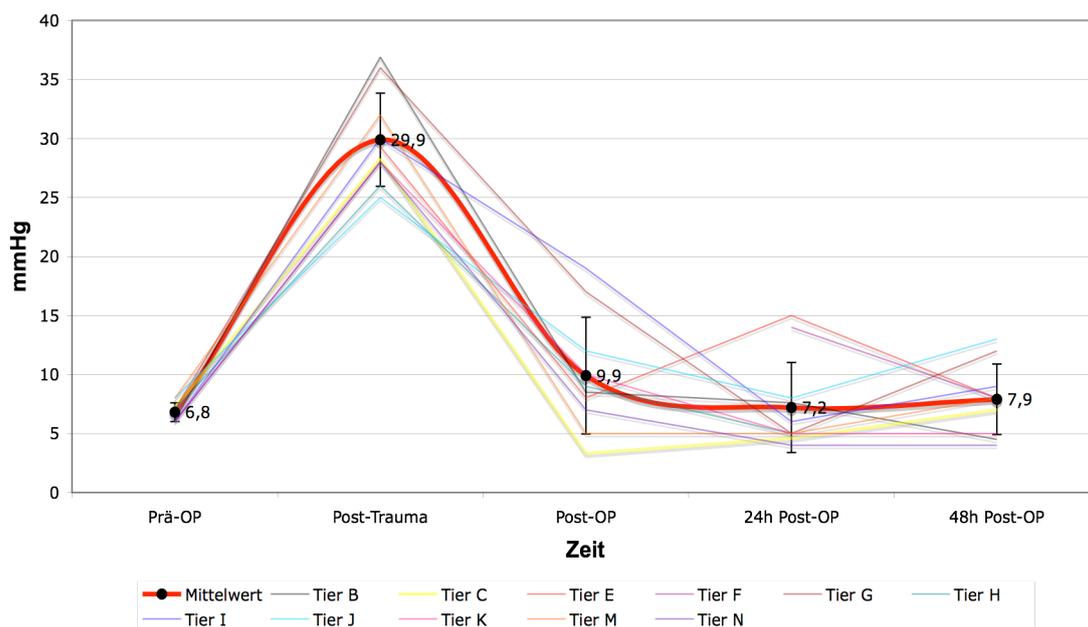


Diagramm 3: Kompartimentdruckverlauf in der Tibialis anterior Loge; Mittelwert der 11 Tiere und Standardabweichung sowie Verlauf bei den einzelnen Versuchstieren

3.2 Muskelkraft

Die Muskelkraftmessungen wurden bei allen Tieren sowohl in der präoperativen Woche als auch nach den Operationen in einem 5 Tage-Rhythmus quantitativ durchgeführt. Es wurden jeweils beide Hinterläufe gemessen und folgende Stimulationsparameter verwendet: Reizamplitude 5,1 mA; Reizlänge 2,56 ms; Intervall 50 ms.

Diese Parameter wurden von der vorher durchgeführten Kontrollstudie von Meffert et al. (40) übernommen, um eine möglichst identische Versuchsdurchführung beizubehalten.

Als Ausgangswert wählten wir den Mittelwert der Gegenseite einschließlich des 30. postoperativen Tags, weil wir bei der Auswertung am Ende unserer Versuchsreihe feststellen mussten, dass einige Ausgangswerte der Operationsseite unserer Versuchstiere unbrauchbar waren.

Bei allen Tieren verzeichneten wir nach der Operation am Hinterlauf einen immensen Muskelkraftverlust verglichen mit der nicht operierten Gegenseite. Dieser betrug bei der ersten Messung nach fünf Tagen im Durchschnitt $0,27 \text{ N} \pm 0,09 \text{ N}$, das entspricht einem Kraftverlust von 72 %. Wie beim Kompartimentdruck erkennt man auch bei der Muskelkraft die interindividuellen Unterschiede der Tiere an der Standardabweichung von 33 %, welches sich in den folgenden Messungen weiterhin um diesen Bereich fortsetzte.

In den Folgetagen nach der Operation nahm die durchschnittliche Muskelkraft der Tiere kontinuierlich bis zum 25. Tag zu. Dabei erholte sich die Muskulatur am schnellsten zwischen dem 10. und 15. Tag, danach nur noch in kleineren Schritten. Ab dem 30. postoperativen Tag beobachteten wir eine Abnahme der Muskelkraft, auch an der nicht operierten Gegenseite.

Daher wählten wir als Vergleichszeitpunkt mit der Kontrollgruppe (40) wieder den 30. Tag aus. Dabei stellte sich heraus, dass sich zwar alle Tiere erholt hatten, jedoch mit unterschiedlicher Intensität. 4 Tiere (36 %) konnten zum Stichtag im Schnitt ca. die Hälfte ihrer Ausgangskraft erreichen. Die überwiegende Mehrheit (64 %) erlangte eine Muskelkraftherholung von durchschnittlich 91 %. Vier Versuchstiere hatten sich sogar komplett erholt und ihre volle Muskelausgangskraft wieder erreicht, ein weiteres Tier hatte 96 % der Ausgangskraft zurück gewonnen (siehe Tabelle 1 auf Seite 66).

Auffällig waren die Tagesschwankungen der einzelnen Tiere während der Muskelkraftmessung. Einige Kaninchen zeigten bei vorherigen Messzeitpunkten deutlich bessere Werte als Tage danach. Betrachtet man den 25. Tag und damit das Regenerationsmaximum bei diesen Tieren, hatte das Versuchstier E 81,6 % vs. 61,8 %, Versuchstier F 78,18 % vs. 42,7 % und Tier H 82,2 % vs. 48,3 % in Vergleich zum 30. Tag. Die Muskelkraftregeneration betrug im Durchschnitt für alle Tiere am 25. Tag 85,7 % \pm 21,6 %.

Insgesamt betrachtet, haben sich die Tiere nach der Operation schnell erholt und nach 30 Tagen 75,2 % \pm 25,1 % ihrer Ausgangskraft wieder erreicht.

Muskelkrafterholung zwischen Kontroll- und VEGF-Gruppe

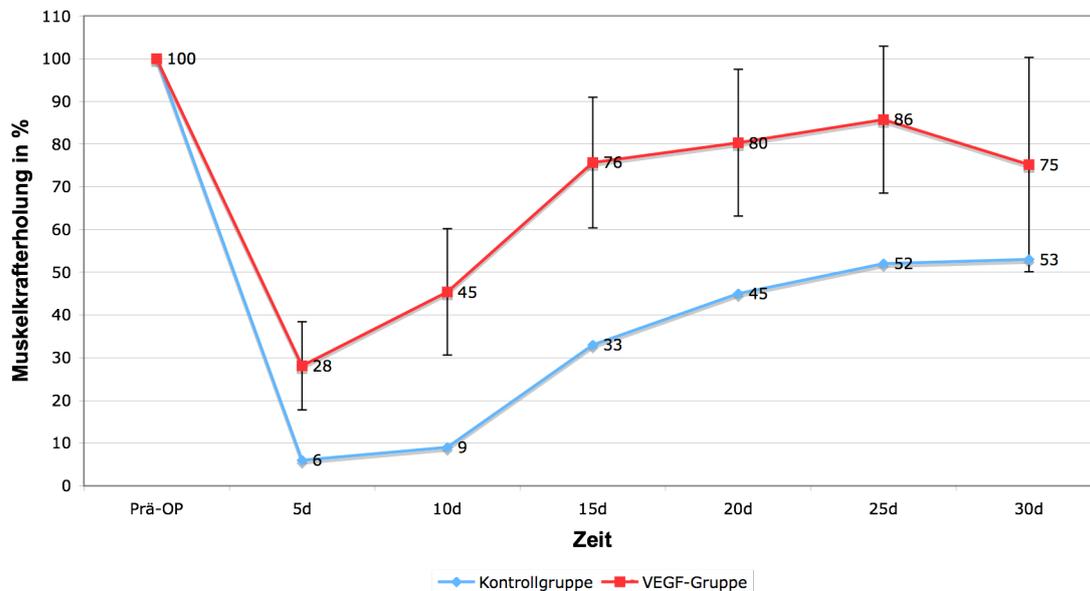


Diagramm 4: Muskelkraftregeneration zwischen Kontroll- und VEGF-Gruppe während der Versuchszeit

Das Diagramm 4 stellt die Ergebnisse der Kontrollgruppe (40) und unserer Versuchsgruppe gegenüber. Dabei wird deutlich, dass beide Kurven ähnlich, nahezu synchron verlaufen, die der VEGF-Gruppe nur nach oben verschoben. Nach den Operationen hatte die Kontrollgruppe (40) eine höhere Kräfteinbuße als unsere Gruppe (94 % vs. 72 %). Im weiteren Verlauf stieg die Muskelkraft kontinuierlich bis zum 30. postoperativen Tag an. Die schnellste Muskelkrafterholung liegt zwischen den 10. und

15. Tag und das Regenerationsmaximum zwischen den 10. und 25. Tag. Die Muskelkraftherholung am 30. postoperativen Tag betrug in der Kontrollgruppe (40) 53 % und war damit im Vergleich um 22,2 % niedriger.

Der angewendete t-Test ergab, dass sich die traumatisierte Muskulatur am 30. postoperativen Tag unter der Applikation von VEGF nicht signifikant schneller erholte ($p=0,059$) als in der Kontrollgruppe (40).

3.3 Histomorphometrie

In der HE-Färbung der Muskulatur präsentierten sich die Muskelzellkerne blau, während sich das Sarkolemm, die Muskelfasern und das Bindegewebe in verschiedenen Rottönen darstellten. Die Auswertung des Verhältnisses zwischen Bindegewebe und Muskulatur konnte leider nicht mit Hilfe der Hämatoxilin-Eosin-Färbung und des Programms Image-Pro Plus vorgenommen werden, da der Kontrast der Farbpixel für die Differenzierung nicht ausreichte. Es kam zu Überschneidungen zwischen Muskulatur und Bindegewebe, die zu falschen Ergebnissen führten.

Die Azanfärbung nach Haidenhain ermöglichte dagegen eine genaue Differenzierung der einzelnen Strukturen in den Präparaten. Das Bindegewebe färbte sich blau-violett an, während sich das Muskelgewebe in einem rötlichen Ton darstellte. Die Erythrozyten und Gliafasern wie auch die Zellkerne erschienen in rot bis dunkelrot. Anhand dieser Farbunterscheidung war es dann möglich, per Computer das Verhältnis zwischen Binde- und Muskelgewebe bei beiden Versuchen quantitativ zu bestimmen.

Schon die Übersichtsvergrößerung im Mikroskop zeigte bei einigen Präparaten deutliche morphologische Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe waren Narbengewebe und Narbenstrassen bei den Muskelschnitten der VEGF-Gruppe eine Seltenheit. Der Ort des Traumas ließ sich aber bei allen operierten Tieren, sowohl in der Kontroll- (40) als auch in der Testgruppe, nachweisen.

Die Muskelschnitte der Kontrollgruppe (40) wiesen eine deutliche Vermehrung des Endo-, Peri- und Epimysiums auf. Wir beobachteten in den Präparaten ganze Narbenstraßen, wobei intaktes Muskelgewebe durch Binde- und Narbengewebe verdrängt wurde (siehe Abbildung 20).

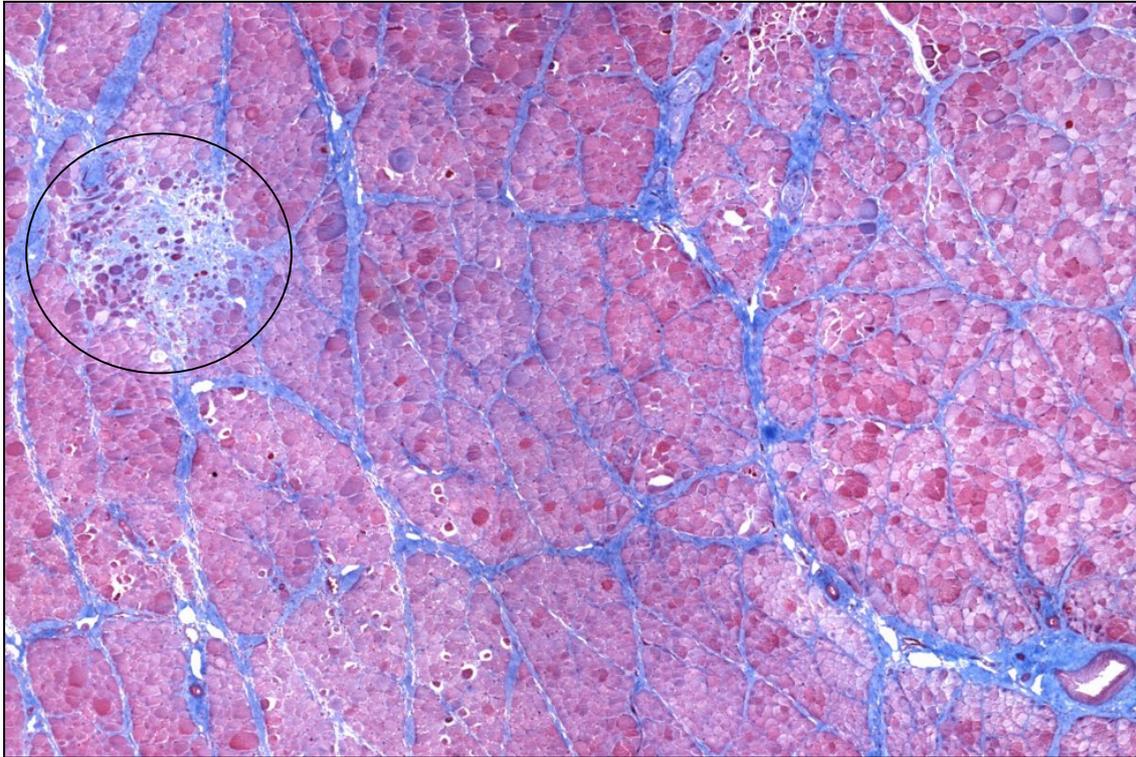


Abbildung 20: Histologischer Ausschnitt aus der Kontrollgruppe, Azan-Färbung:
Darstellung von Bindegewebe (blau), Muskulatur (rot-bläulich) und Narbengewebe/Trauma (Kreis); rechts unten im Bild ist ein Gefäß angeschnitten

Die von uns ermittelten Ergebnisse der Kontrollgruppe (40) bezüglich des Bindegewebsanteils ergaben eine mittlere Bindegewebsvermehrung um fast 400 % verglichen mit der nicht operierten Gegenseite. Der durchschnittliche Bindegewebsanteil der operierten und der nicht operierten Seite war signifikant höher und betrug $9,9 \% \pm 1,8 \%$ vs. $2,5 \% \pm 0,9 \%$. Die Ergebnisse der OP-Seite der einzelnen Versuchstiere der Kontrollgruppe (40) werden in Tabelle 1 auf Seite 66 dargestellt.

Der Vergleich zwischen den ermittelten Daten der Muskelkraftherholung von Meffert et al. (40) und unseren Ergebnissen der Bindegewebsvermehrung in der Kontrollgruppe

zeigte eine Korrelation auf. Dabei stellten wir fest, dass eine zunehmende Bindegewebsvermehrung mit einer schlechteren Muskelkraftherholung einherging. Am deutlichsten wurde der Muskelkraftverlust bei Bindegewebswerten über 10 % beobachtet. Nach 30 Tagen erholte sich die Muskulatur bei den fünf Tieren im Durchschnitt nur um $30\% \pm 18\%$ des Ausgangswertes.

Das unten aufgeführte Diagramm 5 verdeutlicht nochmals die Korrelation zwischen der Bindegewebsvermehrung und der Muskelkraftherholung, dabei betrug der von uns ermittelte Korrelationskoeffizient 0,8.

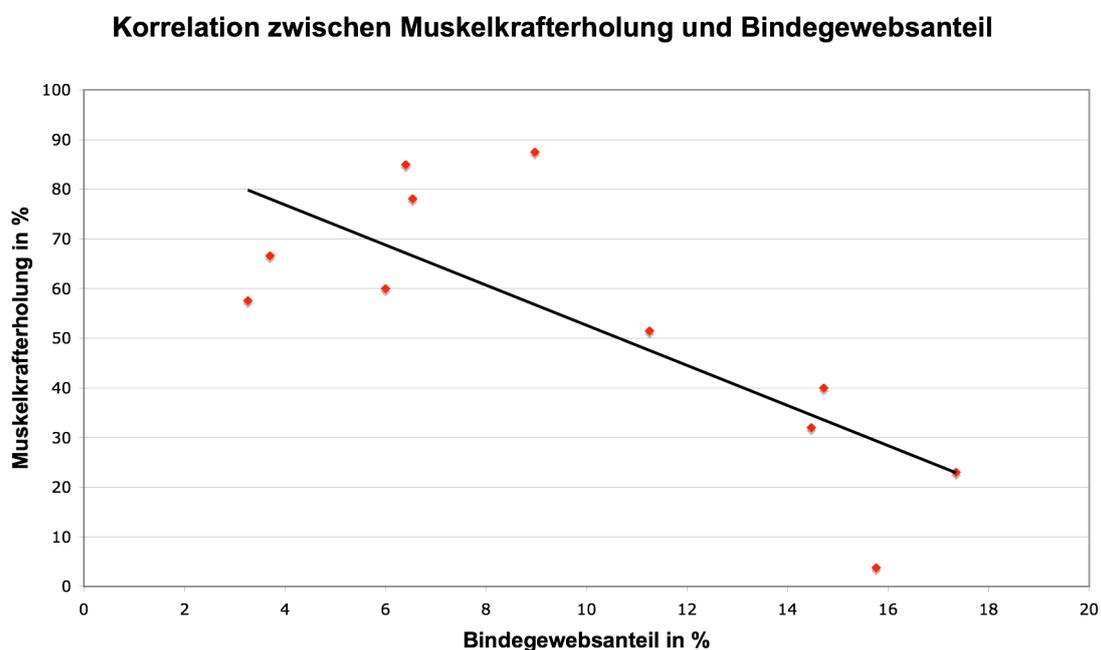


Diagramm 5: Korrelation zwischen Bindegewebe und Muskelkraftherholung mit Regressionsgerade in der Kontrollgruppe

Aus dem Diagramm 5 lässt sich ferner entnehmen, dass nicht alle Tiere auf der Regressionsgerade lagen. Einige Tiere schienen empfindlicher auf den erhöhten Bindegewebsanteil zu reagieren, andere dagegen wurden kaum davon beeinflusst. Diese interindividuellen Schwankungen lassen sich anhand zweier Extrembeispiele verdeutlichen. Das Tier NT (Kontrollgruppe) wies einen Bindegewebsanteil von $3,3\% \pm 0,5\%$ und eine Muskelkraftherholung von $57,6\%$ auf, wogegen sich das Tier MT (Kontrollgruppe) trotz eines Bindegewebsanteils von $9\% \pm 0,6\%$ zu $87,5\%$ erholte.

In der VEGF-Gruppe (Testgruppe) waren zum Teil verbreitete Bindegewebsstraßen und lokalisiertes Narbengewebe zu beobachten, jedoch in einem deutlich geringeren Ausmaß als in der Kontrolle (40). Die Abbildung 21 zeigt den typischen Ausschnitt eines Muskelquerschnitts aus der Testgruppe in der Azan-Färbung. Hierbei wird deutlich, dass das Bindegewebe fast ausschließlich vermehrt um das Trauma vorkommt. Vergleichend ist das Bindegewebe der Kontrollgruppe in der Abbildung 20 auch im angrenzenden Endo-, Peri- und Epimysiums vermehrt vorhanden.



Abbildung 21: Histologischer Ausschnitt aus der Testgruppe (Tier G), Azan-Färbung: der Kreis stellt das untergegangene Muskelgewebe und Narbengewebe/-straße dar; Muskelgewebe = rot; Bindegewebe = blau

Diese Beobachtungen, die schon subjektiv anhand eines Blickes durch das Mikroskop zu erheben waren, konnten durch die Histomorphometrie objektiviert werden.

Die unten aufgeführte Tabelle dokumentiert alle erhobenen Daten der Kontroll- (40) und Testgruppe.

Gruppe	Bindegewebsanteil in %	Muskelkraftherholung in % (30. Tag)
VEGF/Test		
B	2,6	44,9
C	0,6	100,0
E	2,8	61,8
F	2,2	42,7
G	2,5	100,0
H	2,3	48,3
I	1,7	100,0
J	2,0	100,0
K	5,2	81,4
M	3,1	95,9
N	2,6	52,5
MEAN ± SD	2,5 ± 0,9	75,2 ± 25,1
Kontrolle		
AT	3,7	66,6
BT	6,4	85,0
CT	14,5	32,0
DT	14,7	40,0
ET	11,3	51,5
HAT	17,4	23,0
JT	15,8	3,8
KT	6,0	60,0
LT	6,5	78,1
MT	9,0	87,5
NT	3,3	57,6
MEAN ± SD	9,9 ± 1,8	53,2 ± 26,5

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Histomorphometrie und Muskelkraftherholung aus Testgruppe und Kontrollgruppe; Auffälligkeiten sind rot gekennzeichnet

Aus der obigen Tabelle wird abermals deutlich, dass das Bindegewebe in der Testgruppe sichtlich geringer vorkam als in der vergleichenden Kontrollgruppe (40). Der angewendete t-Test bestätigte die Signifikanz der angegebenen Werte ($p < 0,05$).

Keines der Tiere der Testgruppe verzeichnete einen Bindegewebsanteil über 10 %, mit Ausnahme von Tier K hatten alle Tiere einen Anteil unter 5%. Die Bindegewebsquote auf der operierten Seite der Kaninchenläufe lag im Schnitt genau 1% über der auf der Gegenseite ($2,5 \% \pm 0,9 \%$ vs. $1,5 \% \pm 0,5 \%$).

Die Kontrollgruppe (40) hatte im Vergleich eine Vermehrung um den Faktor 4, die Testgruppe lediglich um den Faktor 1,6. Der durchschnittliche Bindegewebsanteil auf der traumatisierten Seite betrug in der Testgruppe $2,5 \% \pm 0,9 \%$ vs. $9,9 \% \pm 1,8 \%$ in der Kontrollgruppe (40).

Die nicht operierten Gegenseiten beider Gruppen unterschieden sich um 1 % ($1,5 \% \pm 0,5 \%$ vs. $2,5 \% \pm 0,9 \%$).

Weiterhin ist der Tabelle zu entnehmen, dass keine bzw. nur eine minimale Korrelation zwischen Bindegewebsanteil und Muskelkraft besteht. Anders als in der Kontrollgruppe (40) beträgt der Korrelationskoeffizient in der Testgruppe lediglich 0,1.

Beispielsweise führte ein hoher Bindegewebsanteil von $5,2 \% \pm 1,2 \%$ und $3,1 \% \pm 0,8 \%$ bei den Tieren K und M nicht zu einer erwarteten Kraftminderung, wie das bei der Kontrollgruppe (40) der Fall war. Ganz im Gegenteil konnten die Tiere 81,4 % und 95,9 % ihrer Ausgangskraft erreichen. Tier F hatte als Gegenbeispiel einen niedrigeren Anteil von $2,2 \% \pm 0,8\%$ an Bindegewebe und erholte sich nur zu 42,7 % seiner Ausgangskraft.

Jedoch hatten einige Tiere, wie in dem oben beschriebenen Abschnitt Muskelkraft erwähnt, Tagesschwankungen, so dass die Muskelkraftherholung am 25. Tag besser ausfiel als in der obigen Tabelle beschrieben.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass am Tag 30 keine Korrelation zwischen Muskelkraft und Bindegewebskontingent, wie in der Kontrollgruppe (40) beobachtet, bestand. Jedoch zeigte sich in der Testgruppe eine signifikant niedrigere Bindegewebsproliferation ($p < 0,05$).

3.4 Immunhistologie

Zur Darstellung der Gefäße und zur quantitativen Bestimmung der Gefäßzahl setzten wir die immunhistochemische Analyse ein, bei beiden Versuchsgruppen nach derselben Methode. Durch die Verwendung eines Antikörpers gegen α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) war es möglich, die glatte Muskulatur der Gefäße gezielt zu identifizieren und mit Hilfe einer Färbung für die Quantifizierung sichtbar zu machen. Das gab uns die Möglichkeit, beide Versuchsgruppen auf Signifikanz zu untersuchen und damit auch auf Veränderungen durch die Gabe von VEGF₁₆₅.

Bei der Durchführung färbten sich die Gefäße rot an und das übrige Präparat zeigte sich blass bis durchsichtig. Die Gefäße wurden nach ihrer Größe eingeteilt.

Die mikroskopische Betrachtung der Schnitte der Kontrollgruppe (40) zeigte eine Anhäufung von Gefäßen, verteilt im gesamten Präparat. Die Gefäßzahl unterschied sich je nach Tier zum Teil erheblich voneinander.

Bei der Zählung fiel uns auf, dass bei allen Kaninchen kleine Gefäße mit einem Durchmesser von $5,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$ mit durchschnittlich $178,7 \pm 68,6$ Gefäßen am häufigsten vorkamen. Die nächst größeren Gefäße mit einem mittleren Durchmesser von $13,5 \pm 0,28 \mu\text{m}$ kamen bei allen Tieren im Schnitt $79,7 \pm 26,0$ Mal vor. Größere Gefäße mit einem Durchmesser über $20 \mu\text{m}$ waren vergleichsweise selten zu finden. Hier zählten wir durchschnittlich $16,8 \pm 17,0$ Gefäße mit einem Durchmesser von $23,7 \pm 0,61 \mu\text{m}$ und $5,5 \pm 4,1$ mit einem Durchmesser von $49,7 \pm 20,8 \mu\text{m}$.

Die Gesamtgefäßzahl aller Tiere betrug im Schnitt $280,7 \pm 93,4$. Die hohe Standardabweichung spiegelt noch einmal die interindividuellen Differenzen zwischen den einzelnen Versuchstieren wider.

Anders fielen die Ergebnisse in der Testgruppe aus. Zwar zählten auch wir am häufigsten kleine Gefäße, jedoch unterschied sich die absolute Zahl erheblich. Gefäße mit einem Gefäßdurchmesser von durchschnittlich $5,9 \pm 0,4 \mu\text{m}$ kamen im Mittel $60,7 \pm 33,5$ Mal im Präparat vor. Am zweithäufigsten, wie auch in der Kontrolle (40), registrierten wir durchschnittlich bei allen Tieren $17,8 \pm 8,6$ Gefäße mit einem Durchmesser von $13,4 \pm 1,0 \mu\text{m}$. Größere Gefäße waren auch in unserer Gruppe eine Seltenheit, im Mittel $5,3$ Gefäße mit einem Durchmesser über $20 \mu\text{m}$.

Das Diagramm 6 stellt die Werte der Kontrollgruppe (40) und unserer Testgruppe anschaulich gegenüber.

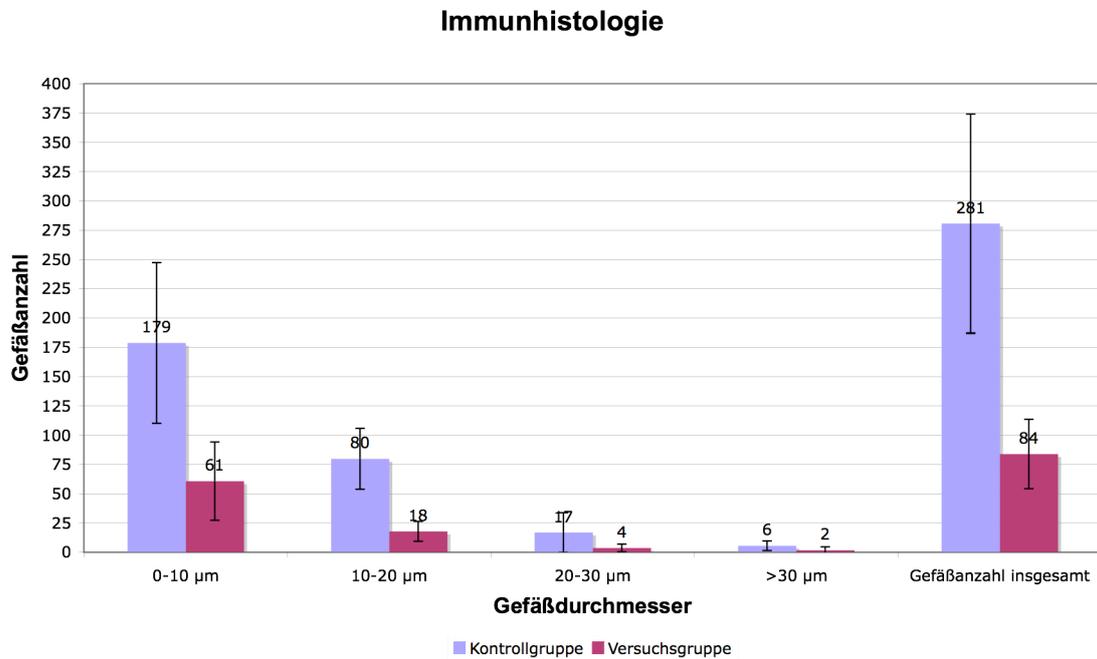


Diagramm 6: Gegenüberstellung der durchschnittlichen Gefäßanzahl von Kontroll- und Testgruppe mit Standardabweichung

Insgesamt unterschieden sich die Gefäßgröße und die prozentuale Häufigkeit bei beiden Gruppen aber nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$). Auch die anfangs höher gezählte, absolute Gefäßzahl ergab im t-Test keine Signifikanz ($p = 0,3$).

Eine mögliche Erklärung zu den verzeichneten Ergebnissen wird im Diskussionsteil besprochen.

4. Diskussion

4.1 Beurteilung der in vivo Untersuchungen

Seit der Entdeckung des endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) und seiner Rolle in der Regulation der Neovaskularisation ist es zu einem explosionsartigen Anstieg von Versuchen gekommen, die diesen Faktor betreffen. Allein die Suche nach dem Schlüsselwort VEGF in der elektronischen, biomedizinischen Literatursuchmaschine Pubmed erbrachte am 12.01.2009 die beeindruckende Zahl von 25.269 Literatureinträgen. Jedoch gibt es weniger als eine handvoll Studien, die die Wirkung von VEGF auf die Muskelregeneration untersuchten und eine Verbesserung der Regeneration in vivo darstellen konnten. Daher war es interessant, eine in vivo Untersuchung durchzuführen, die mehr Informationen darüber bot.

In Studien von Meffert et al. (74, 76) wurden bereits der Einfluss der Muskeltraumatisierung auf die Knochen- und Muskelregeneration untersucht, so dass wir uns entschlossen, diesen Versuch unter der Applikation von VEGF₁₆₅ zu wiederholen. Die in dieser Dissertation behandelte Fragestellung bezieht sich gezielt auf die Muskulatur und die Ergebnisse der Meffert-Studie von 2008 (74), im Besonderen auf die Ergebnisse der Dissertation von S. Frey 2005 (40).

Aus ethischen Gründen verzichteten wir auf eine erneute Versuchsreihe mit weiteren Tieren zur Kontrolle und bezogen uns auf die bereits erzielten Ergebnisse der genannten Gruppe. Um exakt vergleichbare Daten zu erhalten, wurden die Versuche von den gleichen Operateuren und Untersucher durchgeführt, die auch die Kontrollgruppe analysiert hatten (ergänzt um neue Mitarbeiter). Zudem wurden für alle Analysemessungen die gleichen Messplätze angeschafft worden. Es wurden exakt gleiche Tiere (Rasse, Gewicht) vom gleichen Zuchthof gekauft.

Es ist bekannt, dass Kaninchen schreckhafte und stressempfindliche Tiere sind, die jedoch häufig in der muskuloskelettalen Forschung verwendet werden. Durch die hohe Ähnlichkeit der Muskelkompartimente zum menschlichen Unterschenkel lassen sich Logendrücke und Muskelkraftwerte auf den Menschen übertragen (40, 76).

Die in unserem Versuch verzeichnete Dropout-Rate von 21,4 %, bei der drei Versuchstiere perioperativ verstarben, entsprach der Rate der zu vergleichenden Kontrollgruppe (40). Dort verstarb ein Tier postoperativ an einer Pneumonie und zwei Tiere mussten wegen Lockerung des Fixateur's eingeschläfert werden. Vergleichend notierten wir keine solch gravierenden, postoperativen Komplikationen, die zur Einschläferung bzw. zur Erhöhung der Ausfallquote führten. Da es bekannt ist, dass das Kaninchenmodell in der externen Fixierung mit hohen postoperativen Dropout-Raten und Komplikationen einhergehen kann (77), hatten wir folglich eine vergleichsweise geringe Ausfallrate bezogen auf Tibiafixierung, Pseudarthrose und anderen postoperativen Komplikationen.

Letztendlich können wir nicht sagen, woran unsere Tiere perioperativ verstarben. Jedoch ließen uns die akzeptable Dropout-Rate von 21,4 % und das Wissen über ihre Stressempfindlichkeit von einer Obduktion absehen.

In unseren Versuchen ist es uns gelungen, durch das Weichteiltrauma bei allen Tieren ein Kompartmentsyndrom auszulösen und die damit nötige Traumatisierung des M. tibialis anterior für unsere weiteren Untersuchungen sicherzustellen.

Bei allen Tieren, wie auch in der Kontrollgruppe (40) beschrieben, verzeichneten wir nach der Traumatisierung einen erheblichen Druckanstieg in der Muskelloge, der sich nach der operativen Tibiaverkürzung von 1 cm senkte und nach 48 h wieder im physiologischen Normbereich lag.

Der ermittelte durchschnittliche Wert von $29,9 \text{ mmHg} \pm 3,9 \text{ mmHg}$ (SD 13,2 %) lag im Schnitt etwa 1 mmHg unterhalb der Kontrollgruppe (Mittelwert 31 mmHg), der Unterschied war somit minimal. Je nach Autor wäre der Kritische Wert für die Einleitung der chirurgischen Therapie gegeben (11).

Aus der Literatur ist bekannt, dass der Kompartimentdruck auch blutdruckabhängig ist, wobei hohe Kompartimentdrücke bei einem Schockzustand eher die Diagnose eines Kompartmentsyndroms zulässt als der umgekehrte Fall (14, 73). Da die kapilläre Durchblutung proportional zum arteriellen Blutdruck ist, minus den venösen Blutdruck (11), würde nach dieser Formel ein hoher arterieller Blutdruck sowie ein geringer venöser Blutdruck (keine Rechtsherzstauung, keine tiefe Beinvenenthrombose) einem Logensyndrom entgegenwirken. Aus diesem Grund und um ein Kompartmentsyndrom durch diese Methode der Weichteiltraumatisierung zu festigen, führten wir in diesem Versuch eine simultane, invasive Blutdruckbestimmung durch. Wir konnten beweisen, dass sich der mittlere arterielle Blutdruck posttraumatisch im Durchschnitt von

85,2 mmHg auf 70,7 mmHg gesenkt hatte und umgekehrt der Logendruck von 6,8 mmHg auf 29,9 mmHg gestiegen war (siehe dazu Diagramm 2 auf Seite 60).

Trotz der Uneinigkeit der Autoren über einen Kritischen Wert, konnten wir zeigen, dass ein Kompartmentsyndrom durch diese relativ einfache Traumatisierungsmethode zu erzeugen war. Außerdem lässt sich aus Diagramm 2 ferner schließen, dass die Tiere anhand des abgefallenen Blutdrucks in guter Narkose lagen und keinen Schmerzen ausgesetzt waren. In der Literatur findet man überwiegend retro- (52) und prospektive Studien (22), die ein Logensyndrom untersuchen. Es gibt jedoch kaum Traumatisierungsmethoden zur Erzeugung eines Logensyndroms, die meisten beruhen auf die Ligatur von Gefäßen (115). Für unseren Versuch benötigten wir eine Methode, die einfach durchzuführen und reproduzierbar war, ohne die Tiere für die weiteren Untersuchungen einer erneuten Operation auszusetzen. Außerdem konnten wir dadurch den typischen Fall eines Polytraumas, wie man es aus der Poliklinik der Unfallchirurgie kennt, nachstellen. Eine solche Methode wurde von Meffert et al. 2008 beschrieben (74). Wir verwendeten diese Methode, da wir dasselbe Schema der Traumatisierung benötigten, um Aussagen über unsere erzielten Ergebnisse zu treffen und mit der Kontrolle (40) zu vergleichen.

Ogleich wir zur Messung des Kompartimentdruckes zwei verschiedene Messsonden einsetzen mussten, war die ermittelte Standardabweichung für alle Tiere nicht signifikant und unterhalb der verzeichneten Abweichung der Kontrollgruppe (40) (Durchschnitt für alle Tiere über die gesamte Messzeit 3,3 mmHg vs. 3,7 mmHg). Damit lässt sich ein gravierender, systematischer Fehler durch Sondenwechsel während des Versuches ausschließen.

Wie auch in der Dissertation von Sönke Frey (40) beschrieben, konnten auch wir in unseren Versuchen interindividuelle Unterschiede bei den Logendrücken der einzelnen Tiere feststellen, sie zeigten sich sowohl vor als auch nach der Traumatisierung und Operation. Sicherlich ist ein Teil der gemessenen Druckunterschiede zwischen den einzelnen Versuchstieren durch das Individuum selbst erklärbar. Jedes Tier besitzt, wie beim Menschen auch, eine gewisse Variation in Größe und Gewicht sowie im anatomischen Aufbau seines Unterschenkels wie die Tibialänge und der Muskelaufbau. Durch die gleiche Züchtung und der relativ geringen Abweichung beim Körpergewicht konnten wir die natürliche Variation aber größtenteils minimieren. Ferner ist auch jede Messung mit einer gewissen Messstreuung behaftet, die wir durch eine exakte Lage und einer gewissen zeitlichen Latenz des angezeigten Wertes prüften und damit die Streubreite auf ein Minimum reduzierten.

Nach der Operation war die interindividuelle Variationsbreite der Drucksenkung am höchsten (Standardabweichung von 4,9 mmHg), ähnliches zeichnete sich auch in der Kontrolle (40) ab. Wir verzeichneten eine höhere, nicht signifikante Drucksenkung nach der Operation in Vergleich zur Kontrollgruppe (40), die ohne die größten Ausreißer (Tier G und I) wahrscheinlich im signifikanten Bereich gelegen hätte. Auch lagen unsere verzeichneten, postoperativen Mittelwerte (24 h und 48 h) im physiologischen Bereich und unterhalb der Kontrollwerte (40), jedoch ohne Signifikanz. Den von Frey (40) beschriebenen Druckanstieg 24 Stunden nach der Operation konnten wir in unserem Versuch nicht feststellen. Eine mögliche Erklärung für die Streuung wäre sicherlich die oben erwähnte unterschiedliche, individuelle und anatomische Variation. Auch wählten wir bei der Operation einheitlich eine standardisierte Knochenblockresektion von 1 cm aus und nicht individuell 10% der Ausgangslänge. Dadurch könnte je nach Ausgangslänge der Tibia die prozentuale Verkürzung eine Rolle bei der Drucksenkung gespielt haben.

Meffert et al. (75) untersuchte den Logendruck nach Tibiakürzung ohne Traumatisierung und kam zu dem Ergebnis, dass die Tibiakürzung keine Auswirkungen auf den normalen Kompartimentdruck hatte. Durch unsere Studie, die Versuche der Kontrollgruppe (40) und die Arbeit von Möllenhof et al. (78, 79) kann diese These, wenigstens bei erhöhten Logendrücken, widerlegt werden.

Das Hauptthema unserer Studie war die Erforschung der Muskelregeneration unter dem Einfluss von VEGF₁₆₅. Dazu wurde die Muskelkraft vor dem Weichteiltrauma und postoperativ in 5 Tages-Abständen beidseitig gemessen.

Der in den ersten Tagen nach der Operation registrierte Kraftverlust der Muskulatur entsprach den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen (8, 53) und der Dissertation von Sönke Frey (40). Durch die Tibiakürzung hatte sich auch die Muskelvordehnung verändert, die die Muskelkraft beeinflusst. Hierbei kommt es zur Überlappung der gegensinnig gepolten Aktinfilamenten aus den zwei Sarkomerhälften, die gegen die Z-Scheibe gepresst werden, dadurch nimmt die Kraft bei kürzeren Längen ab. Hinzu kommt eine erschwerte Bildung von aktiven Querbrücken, da der Abstand zwischen den parallelen Myofilamenten größer wird (92).

Insgesamt verzeichneten wir direkt nach der Operation aber einen geringeren Kraftverlust gegenüber der Kontrolle (40), nämlich 72 % vs. 94 %. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte das etwa 1-2 mm dicke und mit VEGF₁₆₅ getränkte Kollagen zwischen den Knochenenden sein, das in den ersten Tagen vom Körper noch nicht

vollständig resorbiert wurde und die Muskelvordehnung erhöht und damit auch, nach der oben beschriebenen Physiologie, die Muskelkraft. Umgerechnet entspräche diese zusätzliche Länge bei einem 10 mm großen Knochenblockresektat immerhin einer etwa 10 % bis 20 % höheren Muskelkraft. Ohne diese Zusatzlänge käme man auf einen ähnlichen Wert wie die Kontrollgruppe (40). Die Resorptionszeit des Kollagens im Kaninchenkörper wurde in dieser Studie nicht untersucht, da die ersten Werte der Muskelkraft nicht entscheidend für unsere Fragestellung waren. Leider führt auch die Literatur keine bessere Methode für die kontinuierliche Abgabe von VEGF auf Kallus- und Muskelregion an. Wichtig ist noch zu erwähnen, dass bei der Probenentnahme keine Überreste des Kollagens gefunden wurden, und dass die Ergebnisse der Endmessungen für unseren Versuch damit aussagekräftig sind. Sicherlich wäre die Regenerationsgeschwindigkeit der Muskulatur interessant zu vergleichen, jedoch kann man anhand des Diagramms 4 auf Seite 63 feststellen, dass sich die Steigung beider Kurven kaum unterscheidet. Das Regenerationsmaximum und die schnellste Muskelkraftherholung (steilster Kurvenverlauf) waren bei beiden Versuchen identisch. Dies ist auf die gleichen Versuchsbedingungen der Beinverlängerung im Fixateur und auch der Normalisierung der Muskelvorspannung zurückzuführen.

Der weitere Verlauf der Krafterlangung war insgesamt für alle Tiere steigend. Anstatt des 35. Tages wählten wir als Vergleichszeitpunkt den 30. Tag, da wir ab dem 25. postoperativen Tag einen durchschnittlichen Abfall der Kraftkurve verzeichneten. Diesen Kraftverlust registrierten wir auch an den gesunden, nicht operierten Hinterläufen der Tiere. In der Dissertation von S. Frey (40) und in der Literatur wurde aber nichts dergleichen beschrieben. Eine mögliche Erklärung wäre, dass sich zum Ende des Versuchs eine Gewöhnung der Tiere an die Narkose einstellte, die nicht zur vollen Relaxierung der Tiere führte und damit zu geringeren Kraftausschlägen. Das wäre auch deshalb plausibel, weil dieses Phänomen der Toleranz auch von S. Frey (40) beschrieben wurde und die Kraftereinbußen schließlich beidseits vorkamen. Durch eine zu geringe Sedierung war die Muskulatur nicht komplett relaxiert und die Tiere boten einen gewissen Widerstand gegen die elektrische Nervenstimulation.

Dieses könnte auch die Erklärung für unsere unbrauchbaren präoperativen Werte gewesen sein, die wir dann durch den Mittelwert der Gegenseite ersetzten und die Erholung mit dieser Gegenseite verglichen. Da dieselbe Vorgehensweise auch von der Kontrolle (40) durchgeführt wurde, kommt es zu keinem Fehler beim Vergleich der gemessenen Daten. Zusätzlich bestanden anfangs eine Hemmung und die Befürchtung, die Tiere durch eine Überdosis zu töten. Außerdem verwendeten wir eine

andere Methode der Muskelkraftmessung als in der Kontrolle (40) beschrieben, so dass wir die erzielten Werte nicht richtig einschätzen konnten. Der Druckaufnehmer der Messapparatur wurde in Absprache mit dem Ingenieur Dr. Steffen Schanz als Mitarbeiter unseres Forschungslabors entwickelt und von ihm als vergleichbar eingeordnet. Alle Messungen konnten dadurch in Echtzeit auf den Bildschirm wiedergegeben und in Form einer Excel-Tabelle gespeichert werden.

Die im Verlauf gemessene hohe Standardabweichung von durchschnittlich 30 % verdeutlicht noch einmal die bereits zuvor erwähnten, möglichen Erklärungen zur interindividuellen Differenzen zwischen den einzelnen Tieren. Außerdem ist ein möglicher, weiterer Ansatz das Traumamodell selbst. Die Zange musste 30 Minuten lang in derselben Position gehalten werden und jede Bewegung führte durch die äußerst flexible Haut des Kaninchens zu einer Deplatziierung und machte eine erneute Positionierung und Fixierung nötig. Andererseits konnte bei unvollständiger Relaxierung des Kaninchens das Tourniquet durch Abwehrbewegungen verrutschen. Auch wenn stets versucht wurde, sorgfältig zu arbeiten, waren Abweichungen in der Versuchsdurchführung unvermeidbar. Diese könnte zu einer Veränderung der Traumatisierung geführt haben und somit die interindividuellen Differenzen bedingen bzw. verstärken.

Die Ergebnisse des 30. postoperativen Tages zeigen eine grenzende Signifikanz ($p=0,059$) in der Muskelkraftherholung verglichen mit der Kontrollgruppe (40). Die Tiere erholten sich nach dem Weichteiltrauma und der Operation im Schnitt zu $75,2 \% \pm 25,1 \%$, die Kontrolle (40) zu 53% . Nimmt man als Vergleichszeitpunkt den 25. Tag, das Regenerationsmaximum (höchster Punkt in der Regenerationskurve, siehe Diagramm 4), wäre die Signifikanz eindeutig und deutlich unter $p=0,05$. Die Erholung betrug am 25. Tag durchschnittlich $85,7 \% \pm 21,6 \%$. Wie bereits erwähnt, wäre eine mögliche Gewöhnung der Tiere an die Narkose und die unzureichende Relaxierung ein Grund für die danach absteigende Kurve. Die Signifikanz wäre auch eindeutig, wenn man das Tier B, mit der schlechtesten Muskelkraftherholung, nicht mit in die Wertung einbeziehen würde. In der Dissertation von Sönke Frey (40) wurde beschrieben, dass sich das Tier JT nach der Operation nicht erholte und als Ausreißer eingestuft wurde. Würde man dieses Tier JT und das Tier B aus der Wertung herausnehmen, ergäbe sich eine Signifikanz in der Muskelkraftherholung durch die Gabe von VEGF₁₆₅ ($p=0,041$). Das Gewicht der Studie wäre dann mit 10 Tieren immer noch ausreichend, um eine Scheinsignifikanz auszuschließen.

4.2 Beurteilung der in vitro Untersuchungen

Neben der Muskelkraftmessung erfolgte die histomorphometrische Analyse zur Beurteilung des Regenerationsverhaltens der Muskulatur nach der Weichteiltraumatisierung. Dadurch war es uns möglich, die Quantifizierung des Bindegewebsgehalts beider Gruppen auf Signifikanz zu untersuchen. Da die aus dem Mesoderm entstehende Skelettmuskulatur ein hoch regeneratives Gewebe ist, das auch nach wiederholten Verletzungen die Fähigkeit zur kompletten Regeneration besitzt (96), stützten wir uns auf diese aus der Literatur bekannte Aussage und untersuchten dieses Regenerationsverhalten histologisch. Ein geringerer Bindegewebsanteil spräche für ein geringeres Narbengewebe im Präparat und damit für eine positive Regeneration der Muskulatur.

Wir kamen zum Ergebnis, dass der Bindegewebsanteil in der Testgruppe signifikant niedriger ausgefallen war als in der Kontrolle (40). Verglichen wurden dabei sowohl die Werte von S. Frey (40) als auch die nachträglich neu ermittelten Werte der Kontrolle durch das einheitliche Auswertungsschema. Dadurch konnten wir einen systemischen Fehler durch unterschiedliche Auswertungsmethoden ausschalten und die Signifikanz festigen.

Wir stellten fest, dass sich die Ergebnisse der beiden Auswertungsmethoden der Kontrolle signifikant voneinander unterschieden ($p=0,048$). Die Bindegewebsquote der operierten Seite lag bei allen Tieren im Schnitt um 5 % höher als von uns verzeichnet (14,6 % vs. 9,9 %). Eine mögliche Erklärung für die Signifikanz wäre die Auswertungsmethode selbst. In unserer Auswertung konnten wir den gesamten quergeschnittenen Muskel auf dem Objektträger mit Hilfe des Programms Image-Pro Plus und des Mikroskops Olympus BX51 in 40-facher Vergrößerung automatisch abfotografieren. Im Unterschied zu der durchgeführten Methode von S. Frey (40), der das Präparat eigenständig in 160-facher Vergrößerung einzeln abfotografierte und danach zusammenlegte, waren bei uns Bildüberschneidungen unwahrscheinlich. Außerdem wurde mit unserer Methode anhand der Farbpixel das Binde- und Muskelgewebe anteilig durch ein Programm berechnet, somit waren eventuell subjektive Umzeichnungen der einzelnen Strukturen, wie in der Dissertation von S. Frey (40) beschrieben, nicht möglich. Nicht zuletzt befreiten wir angeschnittene Muskelfaszien und große Gefäße sowie Nervengewebe mittels eines Bildbearbeitungsprogramms, damit diese die Auswertung nicht verfälschten.

Letztendlich bleiben trotzdem beide Auswertungsmethoden sehr aufwendig und im Detail noch nicht ausgereift. Zum Ausschluss eines Bias erfolgte eine zusätzliche Auswertung, um subjektive Bewertungen zu vermeiden.

Auch stellten wir bei den von uns neu ermittelten Ergebnissen der Kontrollgruppe eine Korrelation zwischen Bindegewebe und Muskelkraft fest. Wie schon von S. Frey (40) beobachtet, bemerkten auch wir, dass die Muskelkraft bei Bindegewebswerten über 10 % deutlich abnahm. Eine vergleichbare Korrelation wurde aber in unserem Versuch nicht verzeichnet. Zwar hatte sich das Bindegewebe der operierten Seite, verglichen mit der Gegenseite, signifikant vermehrt, doch es wurden von uns keine Werte über 10 % beobachtet. Wie schon in der Diskussion erwähnt, hatten unsere Versuchstiere Tagesschwankungen, wahrscheinlich bedingt durch die zunehmende Narkosetoleranz. Somit hatten alle Tiere, bis auf Tier B, eine bessere Muskelkraftregeneration als am 30. Tag verzeichnet und damit konnte wahrscheinlich eine Korrelation nicht stattfinden bzw. waren die Ergebnisspannen für eine Korrelation nicht groß genug.

Wir konnten auch damit deutlich machen, dass die nicht erzielte Signifikanz am 30. Tag der Muskelregeneration tatsächlich durch eine wahrscheinliche Narkosetoleranz zu erklären war und nicht durch ein erhöhtes Narbengewebe. Somit konnten wir durch die Histomorphometrie bestätigen, dass die Muskelregeneration durch VEGF₁₆₅ signifikant verbessert wurde.

Insgesamt konnten wir die Beobachtungen von S. Frey (40) bestätigen, dass sich die Muskelkraftregeneration bei Bindegewebswerten über 10 % deutlich verschlechtert. Leider fanden wir in der Literatur keine vergleichbaren Studien, an denen wir unsere Ergebnisse vergleichsweise beurteilen konnten. Außerdem konnten wir beweisen, dass die VEGF₁₆₅-Gabe zu einem signifikant niedrigen Anteil des Narbengewebes in der Muskulatur führte und auch zur Muskelregeneration beitrug.

Die immunhistochemische Analyse diente der weiteren Objektivierung der Wirkung von VEGF auf die Muskulatur. Es ist aus der Literatur bekannt, dass VEGF nicht nur zur Neovaskularisation (25, 66) beiträgt, sondern auch zur Muskelregeneration nach Ischämie (15). Rissanen et al. (91) führten eine Studie an acht ischämisch betroffenen Personen und 20 Neuseeland Kaninchen durch. Dabei kamen sie zum Ergebnis, dass eine akute Ischämie zur diffusen Bildung und Ausschüttung von VEGF und VEGFR-2 von den betroffenen Muskelzellen und Makrophagen führte. Diese Zellen besaßen auch hohe Spiegel von HIF-1 α , das bekanntlich bei Hypoxie zur Hochregulation von VEGF und VEGFR-1 führt. Um eine Aussage über die Wirkung von VEGF₁₆₅ festzustellen, zählten wir in beiden Gruppen die Gefäße und verglichen diese auf Signifikanz.

Die ermittelten Ergebnisse waren nicht wie von uns erwartet. Wir erwarteten nach den Ergebnissen der Muskelkraftregeneration und der Histomorphometrie einen deutlichen Anstieg der Gefäßzahl als Folge von VEGF₁₆₅ und damit mit einer weiteren Bestätigung der Wirkung von VEGF₁₆₅ auf die Muskulatur. Aus anderen Studien ist bekannt, dass es durch die Gabe von VEGF₁₆₅ zu einer erhöhten Gefäßneubildung in der applizierten Muskulatur und zu einem Anstieg der Gefäßzahl kommt (87, 126). Jedoch unterschieden sich die Anzahl der Gefäße beider Gruppen nicht signifikant voneinander, weder prozentual noch absolut. Die Anzahl der Gefäße in der Kontrollgruppe (40) lag sogar absolut höher als in der VEGF-Gruppe ($280,7 \pm 93,4$ vs. $83,8 \pm 29,6$), jedoch ohne Signifikanz ($p=0,31$).

Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse könnte in den zeitlichen Abläufen liegen. Nach 40 Tagen hatte sich die Anzahl der Gefäße in der Muskulatur normalisiert und eine Gefäßreaktion war somit nicht mehr nachzuweisen. Eine solche verhältnismäßig lange Zeitspanne wurde in anderen Studien nicht untersucht. In unseren Versuchen konnte ein immunologischer Nachweis von VEGF₁₆₅ aus technischen Gründen nicht erfolgen, so dass wir unsere Ergebnisse der Immunhistologie nicht weiter untersuchen konnten. Deshalb wären weitere longitudinale Untersuchungen nach 10-20-30 Tagen zu empfehlen.

Vielleicht war aber auch die Applizierungsmethode mit einem Kollagenschwämmchen nicht die richtige Wahl für unsere Untersuchung. Eine Literaturrecherche ergab keine vergleichende Studie, die diese Darreichungsform auf die Muskulatur untersucht hatte. Die meisten Studien beschreiben eine gen-therapeutische Gabe von VEGF entweder

intramuskulär oder intraarteriell (63). Somit könnte die Bestimmung der VEGF₁₆₅-Konzentration in der Muskulatur auf der Basis unserer Versuchsmethode sicherlich ein möglicher und interessanter Untersuchungsansatz für eine weitere Studie sein.

Nicht zuletzt könnten unsere Ergebnisse auch zufällig zu einer Signifikanz geführt haben. Dagegen sprechen jedoch die ausreichende Anzahl der Versuchstiere und die ermittelten Signifikanzen der Muskelregeneration und der Histomorphometrie.

Wir nehmen auch an, dass die Wirkung von VEGF₁₆₅ wahrscheinlich auch auf einen anderen Mechanismus als die Verbesserung der Muskeldurchblutung beruht.

Literarische Recherchen zeigten, dass Entzündungszellen wie Makrophagen von VEGF chemotaktisch angezogen werden und dort zur Induktion von verschiedenen Zytokinen führen (9, 20). Außerdem weiß man, dass VEGF sowie Flt-1 und Flk-1 sowohl in ruhenden als auch in aktivierten Satellitenzellen und sich regenerierenden Muskelfibrillen exprimiert werden (44).

Somit kam es wahrscheinlich auch nach Literatur zusätzlich zu der verbesserten Muskelregeneration durch eine vermehrte und schnelle Aktivierung von Entzündungszellen, die das Trümmergewebe schnell abbauten. Verstärkend kam es mutmaßlich durch die zusätzliche Gabe von VEGF₁₆₅ zu einer Reduktion der Apoptose, dass zu einem verminderten Untergang von Muskelzellen führte (3, 44). Nicht zuletzt könnte die erhöhte Satellitenzellenaktivierung, die zur Muskelregeneration beiträgt, und die erhöhte Chemotaxis auf myogene Vorläuferzellen ihren Beitrag geleistet haben (44).

In einer anderen Studie von Arsic et al. (3) konnte auch eine Stimulation der Muskelregeneration durch VEGF festgestellt werden. Dabei kam man auch zu dem Ergebnis, dass VEGF vor Muskelapoptosis schützt und zur Bildung neuer Muskelfasern beiträgt.

Letztendlich konnten wir zeigen, dass die Wirkung von VEGF₁₆₅ nach 40 Tagen immunhistologisch nicht mehr nachzuweisen war und somit neue Erkenntnisse bezüglich Wirkungsdauer von VEGF₁₆₅ auf die Gefäße gewinnen.

Außerdem konnten wir histomorphometrisch beweisen, dass VEGF₁₆₅ zu einer signifikanten Minderung von Narbengewebe führt.

Wir glauben, in unserem Versuch die Ergebnisse von Arsic et al. (3) bestätigt zu haben, dass VEGF zur Muskelregeneration beiträgt.

4.3 Schlussfolgerung

Unfälle mit einem Hochrasanztrauma können zu offenen Frakturen mit Weichteilverletzungen und dem Verlust von Knochensegmenten führen. Dabei ist besonders die untere Extremität betroffen. Eine schnelle und adäquate Therapieeinleitung mit Debridement von Knochen- und Weichteilgewebe und eine minimalinvasive Knochenfixierung durch externe Stabilisierung, die die Gewebesperfusion und damit auch die Heilungsrate steigert und das Infektionsrisiko senkt, sollte bei einer Tibiafraktur möglichst angestrebt werden (75). Häufig werden diese Verletzungen durch ein Kompartmentsyndrom begleitet (61, 65, 73), das die Ausgangssituation weiterhin kompliziert. In solchen Situationen wäre eine initiale Verkürzung des Knochens bei komplexen, offenen Unterschenkelfrakturen mit Substanzverlust (27) in Verbindung mit einer gleichzeitigen Senkung des Logendruckes (78, 79) von einem großen therapeutischen Vorteil.

Wir konnten durch unseren Versuch nachweisen, dass ein Kompartmentsyndrom mittels unserer Methode der Weichteiltraumatisierung zu erzeugen war und mit Hilfe einer 1 cm großen Knochenblockresektion therapiert werden konnte. Damit konnten wir die Ergebnisse von Möllenhof et al. (78, 79) bestätigen.

In vielen Bereichen der Medizin gilt der endotheliale Wachstumsfaktor VEGF als Hoffnungsträger in der Behandlung von verschiedenen Erkrankungen. Besonders auf dem Gebiet der Gefäßchirurgie und der peripheren arteriovasculären Krankheiten werden durch VEGF große Erwartungen geweckt als alternative Behandlungsmethode zur Amputation. Durch die erhöhte Gefäßneubildung verspricht man sich eine bessere Durchblutung des Gewebes.(112).

Auch wir versprachen uns am Anfang der Studie eine höhere Kallus- und Muskelregeneration durch die VEGF₁₆₅-bedingte, gesteigerte Durchblutung beider Gewebearten. Wir konnten zwar zeigen, dass es durch die Gabe von VEGF₁₆₅ zu einer signifikant besseren Muskelregeneration gekoppelt mit einer signifikant erniedrigten Narbengewebsbildung (H2 der Arbeitshypothese) und einer besseren Muskelkraftregeneration (H1 der Arbeitshypothese) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (40) gekommen war. Doch konnten wir den Einfluss der besseren Gewebsdurchblutung der Muskulatur immunhistologisch nicht mehr beweisen, da nach

40 Tagen die Gefäßreaktion nicht mehr nachzuweisen war, wohl aber die positiven Folgen von VEGF₁₆₅ auf die Muskelregeneration.

Wir konnten durch unseren Versuch weitere Erkenntnisse zu VEGF₁₆₅ und zur Muskelregeneration beitragen und neue Hoffnungen im Einsatz von VEGF₁₆₅ bei Muskelverletzungen setzen.

5. Literaturverzeichnis

1. Andreas Hirner KW. Chirurgie Schnitt für Schnitt. Vol. 1. 1 ed: Georg Thieme Verlag, p. 954, 2004.
2. Archbold HA, Wilson L, Barr RJ. Acute exertional compartment syndrome of the leg: consequences of a delay in diagnosis: a report of 2 cases. *Clin J Sport Med* 14 (2): 98-100, 2004.
3. Arsic N, Zacchigna S, Zentilin L, Ramirez-Correa G, Pattarini L, Salvi A, Sinagra G, Giacca M. Vascular endothelial growth factor stimulates skeletal muscle regeneration in vivo. *Mol Ther* 10 (5): 844-54, 2004.
4. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Wagner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85 (3): 221-8, 1999.
5. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 (5302): 964-7, 1997.
6. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J* 18 (14): 3964-72, 1999.
7. Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, Williams RA, Hibbs ML, Grail D, Kubo H, Stacker SA, Achen MG. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol* 25 (6): 2441-9, 2005.
8. Barker KL, Simpson AH. Recovery of function after closed femoral shortening. *J Bone Joint Surg Br* 86 (8): 1182-6, 2004.
9. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87 (8): 3336-43, 1996.
10. Bauer SM, Bauer RJ, Velazquez OC. Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds. *Vasc Endovascular Surg* 39 (4): 293-306, 2005.

11. Beraldo S, Dodds SR. Lower limb acute compartment syndrome after colorectal surgery in prolonged lithotomy position. *Dis Colon Rectum* 49 (11): 1772-80, 2006.
12. Bong MR, Polatsch DB, Jazrawi LM, Rokito AS. Chronic exertional compartment syndrome: diagnosis and management. *Bull Hosp Jt Dis* 62 (3-4): 77-84, 2005.
13. Bouachour G, Cronier P, Gouello JP, Toulemonde JL, Talha A, Alquier P. Hyperbaric oxygen therapy in the management of crush injuries: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *J Trauma* 41 (2): 333-9, 1996.
14. Bourne RB, Rorabeck CH. Compartment syndromes of the lower leg. *Clin Orthop Relat Res* (240): 97-104, 1989.
15. Breen E, Tang K, Olfert M, Knapp A, Wagner P. Skeletal muscle capillarity during hypoxia: VEGF and its activation. *High Alt Med Biol* 9 (2): 158-66, 2008.
16. Carlevaro MF, Cermelli S, Cancedda R, Descalzi Cancedda F. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci* 113 (Pt 1): 59-69, 2000.
17. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9 (6): 653-60, 2003.
18. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenshtein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380 (6573): 435-9, 1996.
19. Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, Ehler E, Kakkar VV, Stalmans I, Mattot V, Perriard JC, Dewerchin M, Flameng W, Nagy A, Lupu F, Moons L, Collen D, D'Amore PA, Shima DT. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med* 5 (5): 495-502, 1999.
20. Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84 (1): 209-38, 2004.
21. Co. WdG. Pschyrembel, 1998.
22. Cohen MS, Garfin SR, Hargens AR, Mubarak SJ. Acute compartment syndrome. Effect of dermatomy on fascial decompression in the leg. *J Bone Joint Surg Br* 73 (2): 287-90, 1991.

23. Cook S, Bruce G. Fasciotomy for chronic compartment syndrome in the lower limb. *ANZ J Surg* 72 (10): 720-3, 2002.
24. Cooper GG. A method of single-incision, four compartment fasciotomy of the leg. *Eur J Vasc Surg* 6 (6): 659-61, 1992.
25. Costa C, Soares R, Schmitt F. Angiogenesis: now and then. *Apmis* 112 (7-8): 402-12, 2004.
26. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci* 28 (9): 488-94, 2003.
27. D. Soneriu AW, S. Schubert, S. Piatek. Kallusdistraction zur Verlängerung von Extremitäten oder zur Überbrückung von Knochendefekten, Klinik für Unfallchirurgie der Otto-von-Guericke-Universität (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. St. Winckler), 2003.
28. Dome B, Hendrix MJ, Paku S, Tovari J, Timar J. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol* 170 (1): 1-15, 2007.
29. Engsig MT, Chen QJ, Vu TH, Pedersen AC, Therkidsen B, Lund LR, Henriksen K, Lenhard T, Foged NT, Werb Z, Delaisse JM. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol* 151 (4): 879-89, 2000.
30. Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* 87 (1-2): 57-66, 1999.
31. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380 (6573): 439-42, 1996.
32. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med* 4 (3): 336-40, 1998.
33. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18 (1): 4-25, 1997.
34. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9 (6): 669-76, 2003.
35. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161 (2): 851-8, 1989.

36. Fiedler J, Leucht F, Waltenberger J, Dehio C, Brenner RE. VEGF-A and PlGF-1 stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 334 (2): 561-8, 2005.
37. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 267 (16): 10931-4, 1992.
38. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376 (6535): 66-70, 1995.
39. Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* 126 (13): 3015-25, 1999.
40. Frey SP. Der Einfluss des Weichteiltraumas auf die Muskulatur nach akuter Beinverkürzung und anschließender Verlängerung, Westfälische Wilhelms-Universität, 2005.
41. Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 272 (38): 23659-67, 1997.
42. Gerber HP, Ferrara N. Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med* 10 (5): 223-8, 2000.
43. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5 (6): 623-8, 1999.
44. Germani A, Di Carlo A, Mangoni A, Straino S, Giacinti C, Turrini P, Biglioli P, Capogrossi MC. Vascular endothelial growth factor modulates skeletal myoblast function. *Am J Pathol* 163 (4): 1417-28, 2003.
45. Goldberg MA, Schneider TJ. Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem* 269 (6): 4355-9, 1994.
46. Goldfarb SJ, Kaeding CC. Bilateral acute-on-chronic exertional lateral compartment syndrome of the leg: a case report and review of the literature. *Clin J Sport Med* 7 (1): 59-61; discussion 62, 1997.
47. Green JE, Crowley B. Acute exertional compartment syndrome in an athlete. *Br J Plast Surg* 54 (3): 265-7, 2001.

48. Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev* 52 (2): 237-68, 2000.
49. He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T, Alitalo K. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst* 94 (11): 819-25, 2002.
50. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (16): 9349-54, 1998.
51. Hofer E, Schweighofer B. Signal transduction induced in endothelial cells by growth factor receptors involved in angiogenesis. *Thromb Haemost* 97 (3): 355-63, 2007.
52. Hope MJ, McQueen MM. Acute compartment syndrome in the absence of fracture. *J Orthop Trauma* 18 (4): 220-4, 2004.
53. Hughes RE, Schneeberger AG, An KN, Morrey BF, O'Driscoll SW. Reduction of triceps muscle force after shortening of the distal humerus: a computational model. *J Shoulder Elbow Surg* 6 (5): 444-8, 1997.
54. Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med* 33 (5): 745-64, 2005.
55. Jensen SL, Sandermann J. Compartment syndrome and fasciotomy in vascular surgery. A review of 57 cases. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 13 (1): 48-53, 1997.
56. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (18): 11946-50, 2002.
57. Kalka C, Tehrani H, Laudenberg B, Vale PR, Isner JM, Asahara T, Symes JF. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg* 70 (3): 829-34, 2000.
58. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 5 (1): 74-80, 2004.
59. Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, Ferrara N. The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* 271 (13): 7788-95, 1996.

60. Kleinheinz J, Stratmann U, Joos U, Wiesmann HP. VEGF-activated angiogenesis during bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg* 63 (9): 1310-6, 2005.
61. Kostler W, Strohm PC, Sudkamp NP. Acute compartment syndrome of the limb. *Injury* 35 (12): 1221-7, 2004.
62. Kurz H, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci* 18: 65-70, 2003.
63. Leong-Poi H, Kuliszewski MA, Lekas M, Sibbald M, Teichert-Kuliszewska K, Klibanov AL, Stewart DJ, Lindner JR. Therapeutic arteriogenesis by ultrasound-mediated VEGF165 plasmid gene delivery to chronically ischemic skeletal muscle. *Circ Res* 101 (3): 295-303, 2007.
64. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 350 (7): 672-83, 2004.
65. Liem NR, Bourque PR, Michaud C. Acute exertional compartment syndrome in the setting of anabolic steroids: an unusual cause of bilateral footdrop. *Muscle Nerve* 32 (1): 113-7, 2005.
66. Lokmic Z, Darby IA, Thompson EW, Mitchell GM. Time course analysis of hypoxia, granulation tissue and blood vessel growth, and remodeling in healing rat cutaneous incisional primary intention wounds. *Wound Repair Regen* 14 (3): 277-88, 2006.
67. Maes C, Coenegrachts L, Stockmans I, Daci E, Luttun A, Petryk A, Gopalakrishnan R, Moermans K, Smets N, Verfaillie CM, Carmeliet P, Bouillon R, Carmeliet G. Placental growth factor mediates mesenchymal cell development, cartilage turnover, and bone remodeling during fracture repair. *J Clin Invest* 116 (5): 1230-42, 2006.
68. Makinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ, Kauppinen R, Jackson DG, Kubo H, Nishikawa S, Yla-Herttuala S, Alitalo K. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med* 7 (2): 199-205, 2001.
69. Mavor GE. The anterior tibial syndrome. *J Bone Joint Surg Br* 38-B (2): 513-7, 1956.
70. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA.

- Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 111 (5): 649-58, 2003.
71. Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, Kessler S, Gunther KP, Dehio C, Puhl W, Brenner RE. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone* 30 (3): 472-7, 2002.
 72. McMahan G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist* 5 Suppl 1: 3-10, 2000.
 73. McQueen MM, Gaston P, Court-Brown CM. Acute compartment syndrome. Who is at risk? *J Bone Joint Surg Br* 82 (2): 200-3, 2000.
 74. Meffert RH, Frey SP, Jansen H, Ochman S, Raschke MJ, Langer M. Muscle strength quantification in small animals: a new transcutaneous technique in rabbits. *J Orthop Res* 26 (11): 1526-32, 2008.
 75. Meffert RH, Inoue N, Tis JE, Brug E, Chao EY. Distraction osteogenesis after acute limb-shortening for segmental tibial defects. Comparison of a monofocal and a bifocal technique in rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 82 (6): 799-808, 2000.
 76. Meffert RH, Jansen H, Frey SP, Raschke MJ, Langer M. The Influence of Soft Tissue Trauma on Bone Regeneration after Acute Limb Shortening. *Clin Orthop Relat Res* 460: 202-209, 2007.
 77. Meffert RH, Tis JE, Lounici S, Rogers JS, Inoue N, Chao EY. Comparison of two systems for tibial external fixation in rabbits. *Lab Anim Sci* 49 (6): 650-4, 1999.
 78. Möllenhof G. Wirkungen unterschiedlicher Verkürzung eines traumatisierten Extremitätenabschnitts auf die Weichteil-Knochen-Durchblutung am Beispiel des Unterschenkels. Habilitationsschrift, Ruhr-University Bochum, 1997.
 79. Möllenhof GJ, C.; Muhr, G. Kallotaxis – Osteogenese durch Dehnung – eine schonende Möglichkeit der Beinlängenwiederherstellung nach posttraumatischer primärer Unterschenkelverkürzung. *Zentrbl. Chir*, 122: 970-973, 1997.
 80. Mubarak SJ, Owen CA. Double-incision fasciotomy of the leg for decompression in compartment syndromes. *J Bone Joint Surg Am* 59 (2): 184-7, 1977.
 81. Netter FH. Atlas der Anatomie des Menschen. Vol. 2: Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 2000.

82. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 13 (1): 9-22, 1999.
83. Niida S, Kaku M, Amano H, Yoshida H, Kataoka H, Nishikawa S, Tanne K, Maeda N, Nishikawa S, Kodama H. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J Exp Med* 190 (2): 293-8, 1999.
84. Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 152 (6): 1445-52, 1998.
85. Pacicca DM, Patel N, Lee C, Salisbury K, Lehmann W, Carvalho R, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis. *Bone* 33 (6): 889-98, 2003.
86. Patman RD. Compartmental syndromes in peripheral vascular surgery. *Clin Orthop Relat Res* (113): 103-10, 1975.
87. Portlock JL, Keravala A, Bertoni C, Lee S, Rando TA, Calos MP. Long-term increase in mVEGF164 in mouse hindlimb muscle mediated by phage phiC31 integrase after nonviral DNA delivery. *Hum Gene Ther* 17 (8): 871-6, 2006.
88. Pufe T, Wildemann B, Petersen W, Mentlein R, Raschke M, Schmidmaier G. Quantitative measurement of the splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor in the time flow of fracture healing: a study in the rat. *Cell Tissue Res* 309 (3): 387-92, 2002.
89. Ribatti D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *Br J Haematol* 128 (3): 303-9, 2005.
90. Ribatti D. The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review. *Leuk Res* 31 (4): 439-44, 2007.
91. Rissanen TT, Vajanto I, Hiltunen MO, Rutanen J, Kettunen MI, Niemi M, Leppanen P, Turunen MP, Markkanen JE, Arve K, Alhava E, Kauppinen RA, Yla-Herttuala S. Expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR/Flk-1) in ischemic skeletal muscle and its regeneration. *Am J Pathol* 160 (4): 1393-403, 2002.
92. Robert F. Schmidt GT, Florian Lang. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*: Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2005.
93. Rorabeck CH. The treatment of compartment syndromes of the leg. *J Bone Joint Surg Br* 66 (1): 93-7, 1984.

94. Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* 580 (12): 2879-87, 2006.
95. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219 (4587): 983-5, 1983.
96. Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev* 20 (13): 1692-708, 2006.
97. Spector JA, Mehrara BJ, Greenwald JA, Saadeh PB, Steinbrech DS, Bouletreau PJ, Smith LP, Longaker MT. Osteoblast expression of vascular endothelial growth factor is modulated by the extracellular microenvironment. *Am J Physiol Cell Physiol* 280 (1): C72-80, 2001.
98. Stalmans I, Ng YS, Rohan R, Fruttiger M, Bouche A, Yuce A, Fujisawa H, Hermans B, Shani M, Jansen S, Hicklin D, Anderson DJ, Gardiner T, Hammes HP, Moons L, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P, D'Amore PA. Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest* 109 (3): 327-36, 2002.
99. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (15): 9656-61, 2002.
100. Sun Y, Jin K, Childs JT, Xie L, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor-B (VEGFB) stimulates neurogenesis: evidence from knockout mice and growth factor administration. *Dev Biol* 289 (2): 329-35, 2006.
101. Systems RD.
102. Takeshita S, Tsurumi Y, Couffinahl T, Asahara T, Bauters C, Symes J, Ferrara N, Isner JM. Gene transfer of naked DNA encoding for three isoforms of vascular endothelial growth factor stimulates collateral development in vivo. *Lab Invest* 75 (4): 487-501, 1996.
103. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest* 93 (2): 662-70, 1994.
104. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 65 (3): 550-63, 2005.

105. Thomas Karow RL-R. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 16 ed, p. 1236, 2008.
106. Tiwari A, Haq AI, Myint F, Hamilton G. Acute compartment syndromes. *Br J Surg* 89 (4): 397-412, 2002.
107. Torry DS, Holt VJ, Keenan JA, Harris G, Caudle MR, Torry RJ. Vascular endothelial growth factor expression in cycling human endometrium. *Fertil Steril* 66 (1): 72-80, 1996.
108. Turnbull D, Mills GH. Compartment syndrome associated with the Lloyd Davies position. Three case reports and review of the literature. *Anaesthesia* 56 (10): 980-7, 2001.
109. Tzortziou V, Maffulli N, Padhiar N. Diagnosis and management of chronic exertional compartment syndrome (CECS) in the United Kingdom. *Clin J Sport Med* 16 (3): 209-13, 2006.
110. Ulmer T. The clinical diagnosis of compartment syndrome of the lower leg: are clinical findings predictive of the disorder? *J Orthop Trauma* 16 (8): 572-7, 2002.
111. Vaisman N, Gospodarowicz D, Neufeld G. Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 265 (32): 19461-6, 1990.
112. van Weel V, Deckers MM, Grimbergen JM, van Leuven KJ, Lardenoye JH, Schlingemann RO, van Nieuw Amerongen GP, van Bockel JH, van Hinsbergh VW, Quax PH. Vascular endothelial growth factor overexpression in ischemic skeletal muscle enhances myoglobin expression in vivo. *Circ Res* 95 (1): 58-66, 2004.
113. Vet iPedia.
114. Volkmann R. THE CLASSIC: Ischaemic Muscle Paralysis and Contractures. *Clin Orthop Relat Res* 456: 20-1, 2007.
115. Wang JX, Li Y, Zhang LK, Zhao J, Pang YZ, Tang CS, Zhang J. Taurine inhibits ischemia/reperfusion-induced compartment syndrome in rabbits. *Acta Pharmacol Sin* 26 (7): 821-7, 2005.
116. Whitesides TE, Jr., Haney TC, Harada H, Holmes HE, Morimoto K. A simple method for tissue pressure determination. *Arch Surg* 110 (11): 1311-3, 1975.
117. Wick M, Ekkernkamp A, Muhr G. [Motorcycle accidents in street traffic. An analysis of 86 cases]. *Unfallchirurg* 100 (2): 140-5, 1997.
118. Wick M, Ekkernkamp A, Muhr G. [The epidemiology of multiple trauma]. *Chirurg* 68 (11): 1053-8, 1997.

119. Wick M, Muller EJ, Ekkernkamp A, Muhr G. The motorcyclist: easy rider or easy victim? An analysis of motorcycle accidents in Germany. *Am J Emerg Med* 16 (3): 320-3, 1998.
120. Wikipedia. <http://de.wikipedia.org/wiki/Piezoelektrizitat>
121. Wikipedia. <http://de.wikipedia.org/wiki/Wagezelle>
122. Willy C, Gerngross H, Sterk J. Measurement of intracompartmental pressure with use of a new electronic transducer-tipped catheter system. *J Bone Joint Surg Am* 81 (2): 158-68, 1999.
123. Woolley SL, Smith DR. Acute compartment syndrome secondary to diabetic muscle infarction: case report and literature review. *Eur J Emerg Med* 13 (2): 113-6, 2006.
124. Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, Ross J, Jin H. Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol* 27 (6): 838-44, 1996.
125. Yue PY, Mak NK, Cheng YK, Leung KW, Ng TB, Fan DT, Yeung HW, Wong RN. Pharmacogenomics and the Yin/Yang actions of ginseng: anti-tumor, angiomodulating and steroid-like activities of ginsenosides. *Chin Med* 2: 6, 2007.
126. Zacchigna S, Tasciotti E, Kusmic C, Arsic N, Sorace O, Marini C, Marzullo P, Pardini S, Petroni D, Pattarini L, Moimas S, Giacca M, Sambuceti G. In vivo imaging shows abnormal function of vascular endothelial growth factor-induced vasculature. *Hum Gene Ther* 18 (6): 515-24, 2007.

6. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** schematische Darstellung einer Angiogenese durch Sprouting aus Yue et al. „Pharmacogenomics and the Yin/Yang actions of ginseng: antitumor, angiomodulating and steroid-like activities of ginsenosides“ Chin Med 2:6 2007
- Abbildung 2:** Darstellung der VEGF Rezeptorfamilie aus Gerald McMahon „VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis“ Oncologist 5 Suppl 1:3-10, 2000
- Abbildung 3:** Querschnitt knapp oberhalb der Mitte des Unterschenkels zur Darstellung der Anatomie aus Frank H. Netter „Atlas der Anatomie des Menschen“ 2. Erweiterte Auflage, Thieme Verlag 2000
- Abbildung 4:** Messmethode nach Whitesides aus der Dissertation von Astrid Klaß 2002 „Das Fußkompartmentsyndrom - eine experimentelle Studie“.
- Abbildung 5:** Anlage eines OP-Handschuhs als Tourniquet zur künstlichen Erzeugung einer Ischämie am zu operierenden Kaninchenbein
- Abbildung 6:** Anlage einer speziellen Kontusionsklemme über der Frakturstelle auf den Muskelbauch des Musculus tibialis anterior zur weiteren Muskeltraumatisierung
- Abbildung 7:** Darstellung einer Hyperämie nach Reperfusion eines zuvor ischämisierten Kaninchenbeins durch ein Tourniquet
- Abbildung 8:** intraoperatives Bild einer Resektion eines 10 mm großen Knochenblocks des Tibiaknochens, entnommen aus der Dissertation von Sönke Frey 2005 „Der Einfluss des Weichteiltraumas auf die Muskulatur nach akuter Beinverkürzung und anschließender Verlängerung“
- Abbildung 9:** intraoperative Aufnahme eines mit VEGF₁₆₅ versetztes Kollagen zur Füllung des Knochendefekts nach Knochenblockresektion
- Abbildung 10:** schematische Illustration einer Kompartimentdruckmessung, dabei wird mittels einer 14 G Braunüle ca. 2 cm distal des Muskelursprungs des Musculus tibialis anterior in den Muskel eingestochen

- Abbildung 11:** schematische Illustration einer Kompartimentdruckmessung; nach Entfernung der Metallkanüle wurde die abgebildete Drucksonde wie ein Mandrin in die Braunüle vorgeschoben
- Abbildung 12:** schematische Illustration einer Kompartimentdruckmessung; die abgebildete Drucksonde liegt ca. 2 cm im anterioren Kompartiment, die Braunüle wurde über die Sode zurückgeschoben
- Abbildung 13:** Veranschaulichung einer Logendruckmessung mittels einer RAUMEDIC Drucksonde, die mit einem Datenerfassungsgerät (Spider 8, dargestellt unterhalb des Laptops) und einem Laptop verbunden ist
- Abbildung 14:** intraoperative Darstellung einer Kompartimentdruckmessung mittels eines KODIAC-Ausweichgeräts
- Abbildung 15:** Das Bild stellt einen monolateralen Distraktor vom Typ Orthofix M-103[®] an einem operierten Kaninchenhinterlauf dar, bei dem alle 12 h eine Kallusdistraktion um 0,5 mm erfolgte
- Abbildung 16:** photographische Darstellung des Nervus fibularis profundus bei einem Versuchstier bei der Probenentnahme post mortem
- Abbildung 17:** Das Bild stellt eine Muskelkraftmessung bei einem Versuchstier im Seitenbild dar, Knie- und Sprunggelenk sind in 90° Stellung
- Abbildung 18:** schematische Darstellung der Messapparatur bei einer Muskelkraftmessung während einer transkutanen Nervenstimulation
- Abbildung 19:** dargestellt ist die histologische Aufarbeitung des M tibialis anterior, fixiert auf eine Korkplatte nach Probengewinnung
- Abbildung 20:** Histologischer Muskelquerschnitt in Azan-Färbung vom Tier JT der Kontrollgruppe; dargestellt werden durch das Trauma untergegangenes Muskelgewebe und das vermehrte Narben- und Bindegewebe; erstellt mit Hilfe der Software Image-Pro Plus
- Abbildung 21:** Histologischer Muskelquerschnitt in Azan-Färbung von dem Tier G der Testgruppe; hier wird der Ort des Traumas und das Narben- und Bindegewebe dargestellt; erstellt mit Hilfe der Software Image-Pro Plus

6.1 Diagrammverzeichnis

- Diagramm 1:** Darstellung des Studienablaufs anhand eines Flussdiagramms
- Diagramm 2:** Verlauf von Blutdruck und Kompartimentdruck in der Perioperationszeit, verkleinerte Kluft zwischen dem mittleren arteriellen Blutdruck und Kompartimentdruck nach der Traumatisierung
- Diagramm 3:** Kompartimentdruckverlauf aller Tiere sowie Mittelwert und Standardabweichung
- Diagramm 4:** Gegenüberstellung der Muskelkraftregeneration zwischen Kontroll- und VEGF-Gruppe
- Diagramm 5:** Korrelation zwischen Bindegewebe und Muskelkraftherholung mit Regressionsgerade in der Kontrollgruppe
- Diagramm 6:** Gegenüberstellung der durchschnittlich gezählten Gefäße beider Versuche in der Immunhistologie als Balkendiagramm mit Standardabweichung

6.2 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1:** Gegenüberstellung der Ergebnisse der Histologie und der Muskelkraftmessung der VEGF- und Kontroll-Gruppe; aufgeführt sind der Bindegewebsanteil der Muskelquerschnitte und die Muskelkraftherholung im Vergleich zur gesunden Gegenseite am 30. postoperativen Tag; Auffälligkeiten sind rot gekennzeichnet

7. Anhang

7.1

Lebenslauf

7.2 Danksagung

Als erstes möchte ich mich bedanken bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. R. H. Meffert für die Überlassung des Themas und der guten Betreuung während der gesamten Arbeit.

Einen besonderen Dank an Herrn Univ.-Prof. Dr. med. M. J. Raschke für die Möglichkeit der Durchführung der Versuche im Labor der Unfallchirurgie und für die Bereitstellung des notwendigen Equipments.

Außerdem gilt mein Dank Frau Dr. med. S. Ochman für die hervorragende Zusammenarbeit sowie Betreuung, Motivation und Unterstützung.

Einen besonderen Dank auch an das Labor der Unfallchirurgie, insbesondere bedanke ich mich bei den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Simone Niehues und Frau Claudia Niepagenkemper.

Nicht zuletzt möchte ich mich bedanken bei meinen Eltern und meiner Freundin für die Unterstützung und Motivation während meines Studiums und der Dissertation. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.