

TGF- β 1 als pathophysiologischer Faktor bei der Frakturheilung

Die Frakturheilung stellt einen im Körper einzigartigen Reparaturprozess dar. Knochen ist das einzige Gewebe, welches sich unter weitestgehender Wiederherstellung seiner ursprünglichen Eigenschaften regeneriert ohne Ausbildung funktionell minderwertigen Narbengewebes. Während dieses Prozesses spiegeln sich Abläufe aus der embryonalen Osteogenese sowie dem Längenwachstum wider [6, 9, 30]. Trotz enormer wissenschaftlicher Bemühungen und Fortschritte auf diesem Gebiet sind die in den Frakturheilungsprozess involvierten molekularen und zellulären Mechanismen nicht umfassend aufgeklärt. Problematisch bei der Untersuchung der Knochenregeneration ist, dass systematische Untersuchungen des lokalen Regeneratgewebes am Menschen durch wiederholte Probengewinnung aus ethischen Gründen nicht vertretbar sind.

Zahlreiche Zytokine, welche in die Regulation dieses Vorganges involviert sind, konnten mithilfe immunohistochemischer Nachweisverfahren sowie mittels Genexpressionsanalysen in unterschiedlichen In-vitro- und Tiermodellen identifiziert werden [9]. In vielen Fällen sind die Wirkmechanismen dieser Faktoren, ihre gegenseitige Beeinflussung und Induktion sowie die Regelkreise zur zeitlichen Steuerung bislang jedoch nur unzureichend bekannt [19]. Darüber hinaus ist die Übertragbarkeit dieser modellhaften Untersuchungen auf den Menschen limitiert [20, 21].

Genannte Untersuchungen konnten demonstrieren, dass eine Schlüsselposition innerhalb der Frakturheilungskaskade von „Transforming Growth Factor beta 1 (TGF- β 1)“ besetzt wird. Neben der direkten Stimulation von Osteoblasten, Chondroblasten und Chondrozyten verstärkt TGF- β 1 die osteoinduktive Wirkung weiterer Faktoren wie zum Beispiel der ebenfalls zur TGF- β -Superfamilie zählenden „Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)“ sowie des „Insulin-like Growth Factors (IGF)“ [2, 8, 24]. In Tierversuchen konnte ein stimulierender Effekt von TGF- β 1 auf die Frakturheilung bereits demonstriert werden [13, 22, 25, 28].

Verschiedene Autoren vertreten darüber hinaus die Meinung, dass nicht nur die lokale Freisetzung von Wachstumsfaktoren im Frakturbereich erforderlich ist, sondern auch eine systemische Reaktion, um den Effekt der lokalen Wirkung zu triggern [1, 5, 7, 10]. Ein nicht ausreichendes Angebot an systemischen Wachstumsfaktoren führt zu Knochensubstanzverlust und zur verminderten Differenzierung von Osteoblasten [18]. Erwartungsgemäß konnte die systemische Gabe von TGF- β 1 zur Unterstützung der Frakturheilung dieses Defizit vermindern und teilweise sogar beseitigen [8]. Die Bedeutung von TGF- β 1 als lokaler und systemischer Funktionsträger im Frakturheilungsprozess wird damit untermauert.

Unterschiede im zeitlichen Verlauf der systemischen TGF- β 1-Konzentration

während der verzögerten gegenüber der zeitgerechten Frakturheilung am Menschen konnten von uns bereits an einem kleineren Patientenkollektiv gezeigt werden [33]. Systemische Messungen osteogener Zytokine im Probandenserum wurden auch von anderen Arbeitsgruppen als hilfreiches Instrument zur Nachverfolgung physiologischer Prozesse in vivo im Rahmen der Knochenbildung etabliert [15, 16, 17, 32].

Ziel der vorliegenden Studie war zum einen die Beschreibung eines charakteristischen Zeitverlaufes systemischer TGF- β 1-Serumkonzentrationen während der Frakturheilung. Des Weiteren sollten mithilfe dieses Parameters mögliche Unterschiede zwischen Patienten mit normaler und verzögerter bzw. ausbleibender Frakturheilung aufgedeckt werden.

Material und Methoden

Patienten

Zwischen Januar 2002 und Januar 2004 konnten 136 Patienten der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Ludwigshafen im Alter von 18–80 Jahren mit operativ versorgter Schafffraktur eines langen Röhrenknochens in die Studie eingeschlossen werden.

Zur Erlangung eines möglichst homogenen Patientenkollektivs wurden folgende Ausschlusskriterien definiert: mehr als 2 Schafffrakturen, Polytrauma-

G. Zimmermann · A. Moghaddam · M. Reumann · B. Wangler · L. Breier · A. Wentzensen · P. Henle · S. Weiss
TGF- β 1 als pathophysiologischer Faktor bei der Frakturheilung

Zusammenfassung

Ziel. TGF- β 1 ist ein wichtiges lokales und systemisches regulatorisches Molekül bei der Frakturheilung. Verschiedene Autoren wiesen Unterschiede der systemischen Werte von TGF- β 1 bei der Knochenheilung nach Kallusdistraktion und Osteotomien nach. Frühere Studien ergaben charakteristische Veränderungen beim Vergleich der physiologischen Werte von Wachstumsfaktoren während der normalen und der verzögerten Frakturheilung. Ziel dieser Studie war daher die Evaluation möglicher Unterschiede bei den Serumwerten von Patienten mit normaler und verzögerter Frakturheilung.

Methode. Patienten mit Schaftfrakturen eines langen Röhrenknochens wurden prospektiv rekrutiert. Ein Jahr lang wurden periphere Blutproben nach einem standardisierten Zeitplan entnommen. Am Ende des individuellen Untersuchungszeitraums wurden

die TGF- β 1-Werte bestimmt. Um ein homogenes Patientenkollektiv zu erhalten, wurden nur Patienten mit höchstens 2 Frakturen in die Studie aufgenommen. Nach Anpassung hinsichtlich 4 Kriterien wurden die Patienten mit normaler mit den Patienten mit verzögerter Frakturheilung verglichen. Von verzögerter Frakturheilung gingen wir aus, wenn 4 Monate nach Trauma keine Konsolidierung erfolgt war.

Ergebnisse. Während eines Jahres konnten in der prospektiven Studie 15 Patienten mit normaler und 15 mit verzögerter Frakturheilung verglichen werden. Die Bestimmung der absoluten Serumwerte ergaben in beiden Gruppen typischerweise einen Anstieg von TGF- β 1 bis zu 2 Wochen nach Fraktur und anschließend einen Abfall bis zur 6. Woche nach Fraktur. Der Abfall der Serumkonzentration trat jedoch bei Patienten mit verzögerter

Frakturheilung früher auf und bewirkte, dass 4 Wochen nach Trauma die Serumwerte von TGF- β 1 in der Gruppe mit verzögerter Heilung signifikant niedriger waren ($p=0,00006$).

Fazit. Selbst an einer relativ kleinen Patientenzahl konnten wir einen signifikanten Unterschied der Serumkonzentrationen von TGF- β 1 zwischen den untersuchten Gruppen zeigen. Sollten sich die Ergebnisse an einem größeren Kollektiv bestätigen, könnte sich das Zytokin TGF- β 1 als prädiktiv für die Entstehung einer verzögerten Frakturheilung erweisen.

Schlüsselwörter

Verzögerte Frakturheilung · Pseudarthrose · BMP · TGF- β 1 · Knochenwachstumsfaktoren

TGF- β 1 as a pathophysiological factor in fracture healing

Abstract

Aim. TGF- β 1 is an important local and systemic regulatory molecule during fracture healing. Various authors have shown differences in the systemic levels of TGF- β 1 over the time taken for bone healing in distraction osteogenesis and osteotomies. Previous studies have shown characteristic differences in the physiological levels of growth factors between normal fracture healing and delayed fracture union. The aim of the present study was to evaluate possible differences in sera levels of patients with normal and delayed union fracture healing.

Methods. Patients with long bone shaft fractures were recruited prospectively. Peripheral blood samples were collected over a period of 1 year using a standardized time schedule. At the end of the individual's investigation

period, TGF- β 1 levels were determined. To achieve a homogeneous collective of patients, only those with a maximum of two fractures were included in the study. After matching for four criteria, we compared patients with normal fracture healing to patients with delayed unions. The fact of delayed union was accepted in case of failed consolidation 4 months after trauma.

Results. During a prospective study period of 1 year, 15 patients with normal fracture healing could be compared to 15 patients suffering from delayed union. By determining the absolute sera levels we found a typical increase of TGF- β 1 up to 2 weeks after fracture in both groups, with a subsequent decrease up to the sixth week after fracture. However, a decline in serum concentration occurred

earlier in patients with delayed union, causing significantly lower TGF- β 1 levels in the non-union group 4 weeks after trauma ($P=0.00006$).

Conclusion. Even with a relatively small number of patients, we could show a significant difference in serum concentrations of TGF- β 1 between the investigated groups. If these results can be verified within a larger collective, TGF- β 1 could be used as a predictive cytokine for delayed fracture healing.

Keywords

Delayed union · Fracture healing · Pseudarthrosis · BMP · TGF- β 1 · Bone growth factors

tisierung (ISS >16), erhebliche Weichteilverletzungen (Grad 3 nach Tscherny und Oestern), zweit- oder drittgradig offene Frakturen (nach Gustilo und Anderson) sowie postoperative Beatmungspflichtigkeit für >24 h [11, 12, 29].

Der Tatsache, dass Serumspiegel von *TGF-β1* durch chronische Erkrankungen sowie medikamentöse Dauertherapien beeinflusst werden, wurde mit der Definition weiterer Ausschlusskriterien Rechnung getragen. Diese umfassen das Vorliegen einer dialysepflichtigen Niereninsuffizienz, chronischer Lebererkrankungen, von Malignomen, Kollagenosen, chronisch entzündlicher Darmerkrankungen sowie Dauertherapie mit Immunsuppressiva oder nichtsteroidalen Antiphlogistika (>3 Monate).

Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden mindestens ein Jahr lang nachverfolgt. Kontrolluntersuchungen wurden zunächst im Abstand von 2 Wochen, ab dem 3. Monat monatlich durchgeführt.

Bestanden nach 4 Monaten Zweifel an der knöchernen Durchbauung des Frakturspalts auf den konventionellen Röntgenbildern und klagte der Patient über belastungsinduzierte Schmerzen, erfolgte die Durchführung einer Computertomographie zur Diagnosesicherung.

Ergab sich hierbei der Befund einer ausgebliebenen Frakturheilung, wurde der Patient der Gruppe „Verzögerte Frakturheilung“ zugewiesen und eine erneute operative Versorgung avisiert.

Venenblutentnahme

Allen eingeschlossenen Patienten wurden während der ersten 3 Monate im Rahmen der Kontrolluntersuchungen im 2-wöchentlichen Abstand peripher-venöse Blutproben abgenommen. Zusätzlich erfolgte eine Blutentnahme ein Jahr nach der primären Operation. Blieb die Frakturheilung aus, erfolgten weiterhin regelmäßige Blutentnahmen bis zur sicheren knöchernen Durchbauung. In dieser Gruppe wurde der Basiswert ein Jahr nach der Revisionsoperation bestimmt.

Die Blutentnahmen erfolgten jeweils morgens zwischen 08.00 und 11.00 Uhr im nüchternen Zustand der Patienten nach Hautdesinfektion mit 60%igem Iso-

propanol. Anschließend wurden unverzüglich die übrigen Blutbestandteile vom Serum abgetrennt, die Serumproben aliquotiert und bei -80°C tiefgefroren.

Matching

Patienten mit verzögerter Frakturheilung wurden einem Matching-Partner aus dem Restkollektiv mit zeitgerechter Frakturheilung anhand folgender Kriterien zugeordnet:

Alter (± 5 Jahre), Geschlecht, Frakturtyp (nach AO-Klassifikation) sowie Art der osteosynthetischen Versorgung (■ **Tab. 1**). Bei einem Verfahrenswechsel innerhalb der 1. Woche galt die sekundäre Versorgung als Kriterium.

Bestimmung der *TGF-β1*-Werte

Zur quantitativen Bestimmung von *TGF-β1* im Patientenserum diente ein kommerziell erhältlicher ELISA (human*TGF-β1*-Quantikine(tm)-Elisa-Kit, R&D Systems, Wiesbaden). Für jeden Wert erfolgten Doppelbestimmungen. Zur Vermeidung von Datenverzerrungen aufgrund einer Inter-Assay-Variabilität wurden alle Proben eines Patienten sowie des entsprechenden Matching-Partners nach Beendigung des Beobachtungszeitraums mit demselben Assay gemessen.

Statistik

Um die Mindestgruppengröße zu bestimmen, wurde anhand der Werte der ersten 3 Patienten eine Pretrial-Power-Analyse durchgeführt. Diese ergab eine Gruppengröße von je 15 Patienten.

Beide Patientengruppen wurden zu den oben genannten Zeitpunkten bezüglich ihrer *TGF-β1*-Serumwerte im Verlauf verglichen. Um signifikante Veränderungen über den posttraumatischen Zeitverlauf innerhalb einer Gruppe zu erkennen, wurde zunächst der Friedman-Test angewendet. Falls dieser signifikante Ergebnisse ergab, wurde der Wilcoxon-signed-rank-Test für unabhängige Stichproben verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen dem als Basiswert definierten 1-Jahres-Wert und den jeweiligen posttraumatischen Werten einer Gruppe zu erkennen.

Zum Vergleich zwischen den beiden Gruppen zu den jeweiligen Beobachtungszeitpunkten wurde der nonparametrische Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben herangezogen. Das Signifikanzniveau wurde auf $p > 0,05$ festgelegt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS for Windows 11.0 (Norusis SPSS GmbH Inc.).

Die Untersuchung wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki in der Fassung von 1996 durchgeführt. Ein zustimmendes Votum der Ethikkommission der medizinischen Fakultät Heidelberg Nr. 157/2002 lag vor.

Ergebnisse

Studienkollektiv

136 Patienten konnten nach Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien in die Studie aufgenommen werden. Von diesen 136 Patienten wiesen 17 Patienten eine atrophe verzögerte Frakturheilung auf. In allen Fällen erfolgte die Bestätigung der Diagnose während des folgenden operativen Eingriffs. Aus diesem Kollektiv konnten 15 Patienten mit jeweils einem Patienten aus dem Restkollektiv zu einem Matching-Paar verbunden werden. Zwei Patienten mit verzögerter Frakturheilung konnten keinem geeigneten Partner zugeordnet werden und mussten daher von der Auswertung ausgeschlossen werden.

TGF-β1-Serumkonzentrationen

Sowohl im Patientenkollektiv mit zeitgerechter Heilung der Fraktur als auch bei Patienten mit verzögerter Frakturheilung konnte ein charakteristischer postoperativer Verlauf der *TGF-β1*-Konzentration mit signifikanten Veränderungen über die Zeit innerhalb der beiden Gruppen demonstriert werden (jeweils $p < 0,05$).

Es zeigte sich in der 1. und 2. Woche ein initialer Anstieg der *TGF-β1*-Konzentration im Serum, dem ein Abfall nach der 2. Woche folgte. Ab der 4. Woche nach der operativen Versorgung näherten sich diese wieder dem Basiswert an (■ **Abb. 1**).

Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren bereits zum Zeit-

Tab. 1 Darstellung der gematchten Patienten

Verzögerte Frakturheilung						Zeitgerechte Frakturheilung					
Nr.	Geschlecht	Alter [Jahre]	Frakturtyp	Lokalisation	Osteosynthese	Nr.	Geschlecht	Alter [Jahre]	Frakturtyp	Lokalisation	Osteosynthese
1	w.	57	A	Femur	Nagel	1	w.	62	A	Femur	Nagel
2	m.	35	A	Tibia	Nagel	2	m.	36	A	Tibia	Nagel
3	m.	46	C1°	Tibia	Nagel	3	m.	41	C1°	Tibia	Nagel
4	m.	54	C	Tibia	Platte	4	m.	49	C	Tibia	Platte
5	m.	48	C1°	Tibia	Platte	5	m.	45	C1°	Tibia	Platte
6	w.	45	A	Tibia	Platte	6	w.	50	A	Tibia	Platte
7	m.	51	C	Tibia	Nagel	7	m.	55	C	Tibia	Nagel
8	m.	48	C	Femur	Platte	8	m.	43	C	Femur	Platte
9	m.	48	C1°	Tibia	Platte	9	m.	48	C1°	Tibia	Platte
10	m.	34	A	Unterarm	Platte	10	m.	37	A	Unterarm	Platte
11	m.	20	A	Tibia	Nagel	11	m.	22	A	Tibia	Nagel
12	m.	51	B	Tibia	Platte	12	m.	48	B	Tibia	Platte
13	m.	50	A	Oberarm	Nagel	13	m.	45	A	Oberarm	Nagel
14	m.	70	B	Tibia	Fixateur externe	14	m.	75	B	Tibia	Fixateur externe
15	w.	56	C	Tibia	Platte	15	w.	52	C	Tibia	Platte

Die Patienten wurden bezüglich 4 Kriterien paarweise ausgewählt: Alter (± 5 Jahre), Geschlecht (w.: weiblich, m.: männlich), Frakturlokalisierung und -typ (unterteilt nach AO) und Art der Osteosynthese. Offene Frakturen wurden nach Gustilo klassifiziert und gematcht (1°).

punkt 4 Wochen nach operativer Versorgung in den absoluten ($p_{abs}=0,00006$, zeitgerechte Heilung: $61,7 \pm 15,6$ ng/ml; verzögerte Heilung $43,6 \pm 7,4$ ng/ml) und relativen Werten ($p_{rel}=0,041$) sowie im weiteren Verlauf 12 Wochen nach der Operation in den relativen Werten ($p_{rel}=0,005$) nachweisbar (■ **Abb. 2**).

Diskussion

Unsere Ergebnisse zeigen charakteristische postoperative Zeitverläufe der $TGF-\beta_1$ -Serumkonzentration im Rahmen der Heilung osteosynthetisch versorgter Frakturen am Menschen. Des Weiteren sind mit Hilfe dieses Parameters signifikante Unterschiede zwischen zeitgerechter und verzögerter bzw. ausbleibender Frakturheilung bereits 4 Wochen nachweisbar sowie auch im weiteren Verlauf nach der Operation.

Dies legt eine Übertragbarkeit der bereits aus Tierversuchen bekannten Bedeutung von $TGF-\beta_1$ während der Frakturheilung [23] auf den Menschen nahe. Im Tierversuch konnte durch lokale Applikation von $TGF-\beta_1$ eine deutliche Steige-

rung der Kallusbildung und letztendlich eine Verbesserung von Belastungsfähigkeit und Steifigkeit des Regenerats nachgewiesen werden [24, 26]. Darüber hinaus ließ sich durch die systemische Gabe von $TGF-\beta_1$ bei alten Ratten die Frakturheilung beschleunigen [8]. Untersuchungen mit experimentell herbeigeführten, unphysiologischen $TGF-\beta_1$ -Konzentrationen, die zeigten, dass sowohl zu niedrige als auch sehr hohe Konzentrationen von $TGF-\beta_1$ die Frakturheilung negativ beeinflussen können, weisen auf die Notwendigkeit der streng regulierten Aktivität von $TGF-\beta$ hin [8, 22, 25, 27].

Die Bedeutung von $TGF-\beta_1$ im Rahmen der Kallusbildung und -reifung wurde auch durch klinische Untersuchungen an Patienten herausgestellt, die einem Kallusdistaktionsverfahren zur Extremitätenverlängerung unterzogen wurden. Hierbei konnten erhöhte $TGF-\beta_1$ -Serumkonzentrationen über den gesamten Zeitraum der Kallusdistaktion nachgewiesen werden [32]. Eine Bestätigung dieser Daten sowie eine Hinweis auf die Bedeutung von $TGF-\beta_1$ während der Knochenregeneration liefern die Ergebnisse der vor-

liegenden Studie, die im Umkehrschluss niedrigere $TGF-\beta_1$ -Serumspiegel in Patienten mit ausbleibender Frakturheilung zeigen.

Als Stärke des vorliegenden Studiendesigns kann die prospektive Probengewinnung angesehen werden, welche die Analyse bzw. die Bestimmung des Zeitverlaufs der $TGF-\beta_1$ -Serumspiegel vor der eigentlich Diagnosestellung einer verzögerten Frakturheilung ermöglicht. Hierdurch können nach dem Initialtrauma kurz- oder mittelfristig bestehende Unterschiede zwischen den beiden Gruppen erfasst werden, die – wie gezeigt – zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nicht mehr vorhanden sein müssen.

Da systemische Spiegel von $TGF-\beta_1$ erheblichen Schwankungen unterliegen, war die weitgehende Eliminierung von Störfaktoren notwendig. Dies erforderte die konsequente Anwendung der beschriebenen Ausschlusskriterien sowie das Matching geeigneter Patienten. Einflüsse durch die physiologisch vorhandenen tageszeitlichen Schwankungen der $TGF-\beta_1$ -Spiegel wurden durch morgendliche Blutabnahmen zu einem konstanten

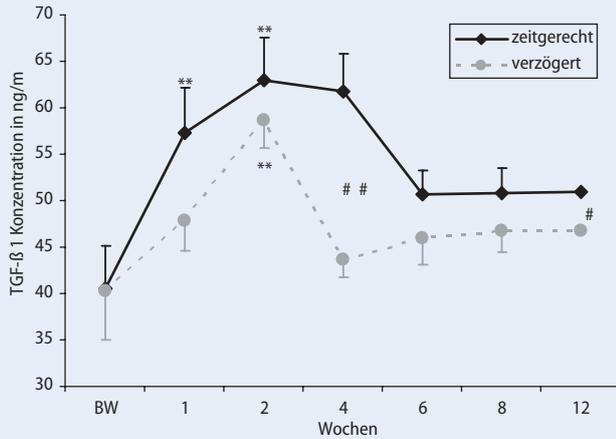


Abb. 1 ▲ TGF-β1-Serumkonzentrationen in absoluten Werten. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Serumkonzentrationen von TGF-β1 (Mittelwert und Standardabweichung) bei Patienten mit Schafftrauma und zeitgerechter bzw. verzögerter Frakturheilung. Signifikante Unterschiede im Verhältnis zum Basiswert (BW: physiologischer Wert erhalten nach 1 Jahr) sind mit Sternchen gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen „zeitgerecht“ und „verzögert“ sind mit Rautenzeichen gekennzeichnet (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$)

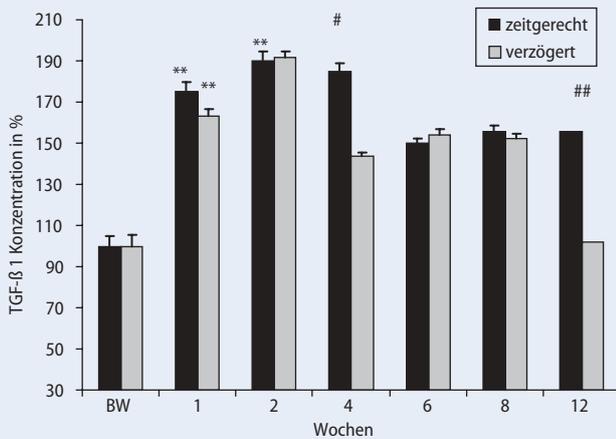


Abb. 2 ▲ TGF-β1-Serumkonzentrationen in relativen Werten. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Serumkonzentrationen von TGF-β1 (Mittelwert und Standardabweichung) bei Patienten mit Schafftrauma und zeitgerechter bzw. verzögerter Frakturheilung. Signifikante Unterschiede im Verhältnis zum Basiswert (BW: physiologischer Wert erhalten nach 1 Jahr) sind mit Sternchen gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen „zeitgerecht“ und „verzögert“ sind mit Rautenzeichen gekennzeichnet (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$)

Zeitpunkt am nüchternen Patienten vermindert.

Ausschluss- und Matching-Kriterien auf traumatischem Gebiet sollten insbesondere Einflüssen durch unterschiedliche Arten und Eigenheiten der Frakturheilung in Abhängigkeit von Lokalisation, Frakturtyp sowie dem jeweiligen Osteosyntheseverfahren Rechnung tragen. Weichteilverletzungen bzw. deren Heilung führen ebenfalls zu einer Erhöhung der TGF-β1-Konzentration, sodass auch

Patienten mit erheblichen Begleitverletzungen ausgeschlossen wurden.

Weiteren Einflussmöglichkeiten auf die TGF-β1-Serumkonzentrationen wie Geschlecht und Alter der Patienten sowie das Vorliegen von Erkrankungen oder Therapien, die einen Einfluss auf die Zellproliferationsrate ausüben, wurde durch die Definition zusätzlicher, nicht primär traumatischer Ausschluss- und Matching-Kriterien begegnet.

Aus den Zeitverläufen der TGF-β1-Serumkonzentrationen lassen sich Rückschlüsse auf die Prozesse ziehen, in denen dieses Zytokin von offensichtlicher Bedeutung ist. In dem Zeitraum der von uns gemessenen Maximalwerte 2 Wochen nach dem Frakturgeschehen fällt die Weiterdifferenzierung der proliferierenden und kollagensynthetisierenden Chondrozyten in hypertrophe Chondrozyten. Im weiteren Verlauf erfolgt der Umbau des knorpeligen Kallus zur Vorbereitung der Kalzifizierung [4]. Die tragende Rolle, die während dieses Prozesses TGF-β1 zukommt, konnte bereits von anderen Arbeitsgruppen anhand unterschiedlicher Modelle demonstriert werden [3, 14, 31]. Der rasche und ausgeprägte Rückgang der TGF-β1-Konzentration im Serum von Patienten mit verzögertem Heilungsverlauf nach 2 Wochen bietet sich daher als Baustein des pathophysiologischen Prozesses mit dem Endpunkt einer ausbleibenden Frakturheilung an. Durch die verminderte Verfügbarkeit von TGF-β1 während dieser Phase tritt möglicherweise ein zu geringer Anteil der Chondrozyten im unreifen Kallus in das Hypertrophiestadium über, sodass es zur Verlangsamung oder gar zum Stillstand des Ossifikationsprozesses kommt. Es persistiert ein fibrocartilaginärer Kallus mit dem Resultat der Ausbildung einer Pseudarthrose.

Dieser mögliche Mechanismus wird durch Ergebnisse von Tierversuchen unterstützt. Die lokale Applikation von TGF-β1 zeigt einen stimulierenden Effekt auf die Frakturheilung und bei Wirbelkörperfusionen [14a, 23a]. Eine systemische Applikation von TGF-β1 wurde bisher am Menschen nicht durchgeführt, da es hierbei zu erheblichen pathologischen Auswirkungen kommen könnte. So konnte ein Tiermodell etabliert werden, in welchem eine systemische Sklerose durch die systemische Gabe von TGF-β1 induziert wird [2a]. Weiterhin wies bei Ratten und Kaninchen praktisch jedes abdominale Organ nach systemischer Gabe von TGF-β1 pathologische Läsionen auf [26a].

Unklar bleibt nach diesen Erkenntnissen jedoch, welcher Mechanismus zur insuffizienten Bereitstellung von TGF-β1 führt und damit als pathogenetischer Auslöser anzusehen ist. Zahlreiche Einzelfaktoren sind als Prädiktoren einer unzu-

reichenden Frakturheilung bekannt. Hierzu zählen unter anderem biomechanische Einflüsse wie Frakturspaltweite, Belastung und Rigidiät der Versorgung sowie biochemische und metabolische Größen wie Blutperfusion, Verfügbarkeit niedrig differenzierter Vorläuferzellen und die komplexe Kaskade involvierter Zytokine und Enzyme. Ein singulärer Auslöser einer erfolglosen Frakturheilung ist wohl im seltensten Fall identifizierbar, da jeder Patient ein individuelles Kausalitätsmuster aufweist.

Eine einmalige Abnahme eines einzelnen Wachstumsfaktors dürfte somit zweifellos nicht geeignet sein, um die Qualität der weiteren Frakturheilung mit ausreichender Sicherheit abzuschätzen.

In der von unserer Arbeitsgruppe publizierten Pilotstudie 2005 konnte bereits ein signifikanter Unterschied in den Serumwerten 4 Wochen nach der Fraktur identifiziert werden. Nach der Auswertung von jetzt 15 Patienten je Gruppe finden sich diese signifikanten Unterschiede wesentlich deutlicher. Zusätzlich ist jetzt in den relativen Verläufen der *TGF-β1*-Serumspiegel nach 4 Wochen ein signifikanter Unterschied vorhanden ebenso wie nach 12 Wochen.

Angesichts der quantitativen Limitierung unserer Studie ist es sicherlich nicht gerechtfertigt, einen erniedrigten *TGF-β1*-Wert bereits als prädiktiven Marker mit entsprechender Sensitivität bzw. Spezifität für die Entstehung einer Pseudarthrose zu interpretieren. Dennoch liefert unsere Studie diesbezüglich erste interessante Hinweise. Würde man eine hypothetische Schwellenkonzentration bei 45 ng/ml annehmen, so ließen sich aufgrund unserer Daten 80% der Patienten mit einer verzögerten Frakturheilung detektieren, ohne ein falsch-positives Ergebnis zu liefern.

Es wäre wünschenswert, dass die Untersuchung der Ursachen und Folgen der verminderten *TGF-β1*-Konzentration bei verzögert heilenden Knochenbrüchen und damit die Einordnung in die pathophysiologische Kaskade der verzögerten Frakturheilung in Zukunft zur weiteren Aufklärung der Pseudarthrosenentstehung führen.

Fazit für die Praxis

Als wichtiges Steuerungselement der Frakturheilung kann *TGF-β1* systemisch gemessen werden und weist Unterschiede bei Patienten mit verzögerter und zeitgerechter Knochenkonsolidierung auf. Wie in unserer Studie gezeigt, sind die systemischen Spiegel von *TGF-β1* bei Patienten mit verzögerter Frakturheilung 4 Wochen nach dem Trauma hochsignifikant niedriger ($p=0,0006$) als bei Patienten mit zeitgerechter Frakturheilung. Da die klinische Diagnose einer verzögerten Frakturheilung bzw. Pseudarthrose jedoch definitionsgemäß erst 4 Monate nach der Fraktur gestellt werden kann, wäre die Möglichkeit der Früherkennung einer gestörten Knochenregeneration bereits nach 4 Wochen eine attraktive zusätzliche klinische Entscheidungshilfe. Eine Bestätigung unserer *TGF-β1*-Ergebnisse bei Patienten mit regelrechter und verzögerter Frakturheilung in einem größeren Patientenkollektiv scheint daher für die weitere Entwicklung potenzieller prädiktiver Marker der Pseudarthrose lohnenswert.

Korrespondierender Autor

Dr. G. Zimmermann
Unfallchirurgische Klinik der
Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik,
Universität Heidelberg
Ludwig-Guttman-Straße 13,
67071 Ludwigshafen
Zimmermann@BGU-Ludwigshafen.de

Danksagung. Diese Studie wurde durch Gelder der Stiftung Orthop. Univ.-Klinik Heidelberg unterstützt. Besonderer Dank gilt auch Frau Ilse Metzger (Klinisches Labor der BG-Unfallklinik Ludwigshafen) und Frau Rosalie Bock (Forschungslabor Stiftung Orthopädische Klinik Heidelberg) für ihre außerordentliche Unterstützung der Studie.

Interessenkonflikt. Es besteht kein Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor versichert, dass keine Verbindungen mit einer Firma, deren Produkt in dem Artikel genannt ist, oder einer Firma, die ein Konkurrenzprodukt vertreibt, bestehen. Die Präsentation des Themas ist unabhängig und die Darstellung der Inhalte produktneutral.

Literatur

1. Bab I, Gazit D, Muhrad A, Shteyer A (1988) Regenerating bone marrow produces a potent growth-promoting activity to osteogenic cells. *Endocrinology* 123: 345–352

2. Bonewald LF, Dallas SL (1994) Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation. *J Cell Biochem* 55: 350–357
- 2a. Chujo S, Shirasaki F et al. (2005) Connective tissue growth factor causes persistent proalpha 2 (I) collagen gene expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 203(2): 447–456
3. D'Angelo M, Billings PC, Pacifici M et al. (2001) Authentic matrix vesicles contain active metalloproteases (MMP). A role for matrix vesicle-associated MMP-13 in activation of transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 276: 11347–11353
4. Einhorn TA (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthopaed Rel Res* 355: 7–21
5. Einhorn TA, Simon G, Devlin VJ et al. (1990) The osteogenic response to distant skeletal injury. *J Bone Joint Surg Am* 72: 1374–1378
6. Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA (1999) Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* 87: 57–66
7. Gazit D, Karmish M, Holzman L, Bab I (1990) Regenerating marrow induces systemic increase in osteo- and chondrogenesis. *Endocrinology* 126: 2607–2613
8. Gazit D, Zilberman Y, Turgeman G et al. (1999) Recombinant TGF-beta1 stimulates bone marrow osteoprogenitor cell activity and bone matrix synthesis in osteopenic, old male mice. *J Cell Biochem* 73: 379–389
9. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL et al. (2003) Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 88: 873–884
10. Groeneveld EH, Burger EH (2000) Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* 142: 9–21
11. Gustilo RB, Anderson JT (1976) Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones: retrospective and prospective analyses. *J Bone Joint Surg Am* 58: 453–458
12. Gustilo RB, Mendoza RM, Williams DN (1984) Problems in the management of type III (severe) open fractures: a new classification of type III open fractures. *J Trauma* 24: 742–746
13. He XB, Lu WZ, Tang KL et al. (2003) Effects of bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta on biomechanical property for fracture healing in rabbit ulna. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 17: 185–188
14. Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME (1990) Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol* 110: 2195–2207
- 14a. Kandziora F, Pflugmacher R, Scholz M et al. (2002) Comparison of BMP-2 and combined IGF-I/TGF-ss1 application in a sheep cervical spine fusion model. *Eur Spine J* 11(5): 482–493
15. Kaspar D, Neidlinger-Wilke C, Holbein O et al. (2003) Mitogens are increased in the systemic circulation during bone callus healing. *J Orthop Res* 21: 320–325

Hier steht eine Anzeige.



16. Lammens J, Liu Z, Aerssens J et al. (1998) Distraction bone healing versus osteotomy healing: a comparative biochemical analysis. *J Bone Miner Res* 13: 279–286
17. Liu Z, Luyten FP, Lammens J, Dequeker J (1999) Molecular signaling in bone fracture healing and distraction osteogenesis. *Histol Histopathol* 14: 587–595
18. Manolagas SC, Jilka RL (1995) Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 332: 305–311
19. Miyazono K (2000) Positive and negative regulation of TGF-beta signaling. *J Cell Sci* 113 (Pt 7): 1101–1109
20. Nunamaker DM (1998) Experimental models of fracture repair. *Clin Orthopaed Rel Res* 355S: 56–65
21. Nunamaker DM (1998) Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*: S56–65
22. Park SH, O'Connor KM, McKellop H (2003) Interaction between active motion and exogenous transforming growth factor Beta during tibial fracture repair. *J Orthop Trauma* 17: 2–10
23. Rosier RN, O'Keefe RJ, Hicks DG (1998) The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*: S294–300
- 23a. Schmidmaier G, Herrmann S, Green J et al. (2006) Quantitative assessment of growth factors in reaming aspirate, iliac crest, and platelet preparation. *Bone* 39(5): 1156–1163
24. Schmidmaier G, Wildemann B, Gabelein T et al. (2003) Synergistic effect of IGF-I and TGF-beta1 on fracture healing in rats: single versus combined application of IGF-I and TGF-beta1. *Acta Orthop Scand* 74: 604–610
25. Schmidmaier G, Wildemann B, Heeger J et al. (2002) Improvement of fracture healing by systemic administration of growth hormone and local application of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1. *Bone* 31: 165–172
26. Schmidmaier G, Wildemann B, Lubberstedt M et al. (2003) IGF-I and TGF-beta 1 incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating stimulates osteoblast differentiation and collagen-1 production but reduces osteoblast proliferation in cell culture. *J Biomed Mater Res* 65B: 157–162
- 26a. Terell TG, Working PK et al. (1993) Pathology of recombinant human transforming growth factor-beta 1 in rats and rabbits. *Int Rev Exp Pathol* 34 Pt B: 43–67
27. Tieline L, Puolakkainen P, Pohjonen T et al. (2002) The effect of transforming growth factor-beta1, released from a bioabsorbable self-reinforced polylactide pin, on a bone defect. *Biomaterials* 23: 3817–3823
28. Tielinen L, Manninen M, Puolakkainen P et al. (2001) Inability of transforming growth factor-beta 1, combined with a bioabsorbable polymer paste, to promote healing of bone defects in the rat distal femur. *Arch Orthop Trauma Surg* 121: 191–196
29. Tscherner H, Oestern HJ (1982) Die Klassifizierung des Weichteilschadens bei offenen und geschlossenen Frakturen. *H. z. Unfallheilk* 85
30. Vorkamp A, Pathi S, Peretti GM et al. (1998) Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mech Dev* 71: 65–76
31. Wang Y, Middleton F, Horton JA et al. (2004) Microarray analysis of proliferative and hypertrophic growth plate zones identifies differentiation markers and signal pathways. *Bone* 35: 1273–1293
32. Weiss S, Baumgart R, Jochum M et al. (2002) Systemic regulation of distraction osteogenesis: a cascade of biochemical factors. *J Bone Miner Res* 17: 1280–1289
33. Zimmermann G, Henle P, Kusswetter M et al. (2005) TGF-beta1 as a marker of delayed fracture healing. *Bone* 36: 779–785