

Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinikum
Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. T. Pohlemann

DISSERTATION

ENTWICKLUNG EINES MODELLS ZUR UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES EINES WEICHTEILSCHADENS AUF DIE FRAKTURHEILUNG

ZUR

**ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOCTOR MEDICINAE (DR. MED)**

AN DER

MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2011

vorgelegt von: Hagen Bernd Schaumlöffel

geb. am 21. Februar 1982 in Saarbrücken- Dudweiler

Gewidmet

Meiner Familie

DEKAN: PROF. DR. MED. M. D. MENGER

1. GUTACHTER:

2. GUTACHTER:

Jahr der Promotion: 2011

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1	Deutsche Zusammenfassung	1
1.2	Summary.....	3
2	EINLEITUNG	5
2.1	Inzidenz von Knochenbrüchen und Folgeeffekte	5
2.2	Aufbau des Knochens	6
2.2.1	Makroskopischer Aufbau des Knochens	6
2.2.2	Zellulärer Aufbau des Knochens	7
2.3	Grundprinzipien der Knochenbruchheilung	9
2.3.1	Knochenheilung	9
2.3.2	Arten der Frakturheilung:.....	10
2.3.2.1	primäre (direkte) Frakturheilung	10
2.3.2.2	sekundäre (indirekte) Frakturheilung	10
2.4	Die gestörte Frakturheilung	13
2.5	Bedeutung der Weichteildeckung für die Frakturheilung	14
2.6	Frakturmodelle	15
2.6.1	Schaf	16
2.6.2	Primaten.....	17
2.6.3	Hund	17
2.6.4	Katze	18
2.6.5	Kaninchen.....	19
2.6.6	Ratte.....	21

2.6.7 Maus	22
2.7 Zielsetzung der Arbeit - Fragestellung	24
3 MATERIAL UND METHODIK.....	25
3.1 Tiere und Tierhaltung	25
3.2 Studienaufbau	25
3.3 Anästhesie und Operationsvorbereitung.....	26
3.4 Operation	27
3.5 Röntgenologische Auswertung.....	31
3.6 Biomechanische Auswertung	31
3.7 Histologische Auswertung.....	33
3.8 Statistische Auswertung	34
4 ERGEBNISSE	36
4.1 Systemische Parameter	36
4.1.1 Körpergewicht der Mäuse	36
4.2 Radiologie.....	38
4.2.1 Kallus-/ Femurdurchmesser der radiologischen Auswertung	39
4.2.2 Goldberg-Klassifikation	39
4.3 Biomechanik.....	41
4.3.1 Biegesteifigkeit	41
4.4 Histologie	42
4.4.1 Periostale Kallusfläche (PCA).....	43
4.4.2 Periostaler Kallusdurchmesser	44
4.4.3 Prozentuale Gewebeanteile der PCA.....	46
5 DISKUSSION.....	48
5.1 Tiermodell	48

5.2	Die PTFE - Membran	51
5.3	Periostale Kallusbildung und Weichteilmantel	52
5.4	Weichteile und Frakturheilung - mögliche Pathomechanismen.....	55
5.5	Fazit	60
6	LITERATURVERZEICHNIS	61
7	DANK.....	68
8	LEBENS LAUF.....	69

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
3D	dreidimensional
a	Jahr
Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
ASBMR	American Society of Bone and Mineral Research
BMP	bone morphogenetic protein
Ca	Calcium
CD-1	Cluster of differentiation -1
Cl	Chlor
cm	Zentimeter
d	Tag
D	Dalton
d.h.	das heißt
dest.	destilliert
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	endothelium growth factor
et al.	et alii
etc.	et cetera
G	Gauge
g	Gramm
ges.	gesamt
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
H	Wasserstoff
IL	Interleukin
Inc.	Incorporation
k Da	Kilodalton
Kg	Kilogramm
korr.	korrigiert
kV	Kilovolt
l	Liter
µl	Mikroliter
m	männlich
mg	Milligramm

µg	Mikrogramm
Mg	Magnesium
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MW	Mittelwert
N	Newton
n.s.	nicht signifikant
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
O	Sauerstoff
OP	Operation
P	Phosphat
PCA	periosteal callus area
pH	pondus Hydrogenii
pos.	positiv
SD	standard deviation
SE	standard error
sek.	Sekunden
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TIFF	tagged Image File Format
TNF- α	Tumornekrosefaktor-α
U	Units
u.	und
USA	United States of America
UV	ultraviolett
v.a.	vor allem
vs.	versus
w	weiblich
WHO	World health organization
zw.	zwischen

1 ZUSAMMENFASSUNG

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Trotz unseres zunehmenden Wissens zu den Mechanismen der Frakturheilung kommt es im klinischen Alltag in bis zu 10 % der Fälle zu einer verzögerten oder ausbleibenden Heilung. Vor allem Frakturen mit assoziierten Weichteilschäden stellen weiterhin ein klinisches Problem dar, da sie mit einer deutlich erhöhten Pseudarthroserate einhergehen. Die Ursachen hierfür sind noch unzureichend bekannt. Tiermodelle sind hier aufgrund der komplexen Abläufe während der Frakturheilung immer noch erforderlich um die zugrunde liegenden Mechanismen und neue Therapieansätze zu erforschen. Während in früheren Studien vor allem Großtiermodelle verwendet wurden um die Abläufe während der Frakturheilung zu untersuchen, sind in jüngerer Zeit Kleintiermodelle in den Vordergrund gerückt. Aufgrund ihres vollständig entschlüsselten Genoms und der Verfügbarkeit vieler molekularbiologischer Werkzeuge ist die Maus ideal geeignet um molekulare Mechanismen zu untersuchen. Hier gibt es jedoch einen Mangel an Modellen zur Untersuchung der Rolle eines Weichteilschadens bei der gestörten Frakturheilung. Ziel dieser Arbeit ist demnach die Entwicklung eines Mausmodells zur Untersuchung eines Weichteilschadens auf die Frakturheilung.

Hierzu erfolgte eine standardisierte Osteotomie in der Femurdiaphyse von CD-1 Mäusen, welche mittels einer intramedullären Zugschraube (Mousescrew®) stabilisiert wurde. Zur Untersuchung der Rolle der Weichteile auf die Frakturheilung wurden in einer Gruppe die kompletten Weichteile durch eine Membran aus Polytetrafluorethylen (PTFE) vom Knochen getrennt, während in der Kontrollgruppe der Weichteilmantel wieder dem Knochen angelegt wurde. Die Untersuchung der Frakturheilung erfolgte nach 2, 5 und 10 Wochen mittels Histomorphometrie, Radiologie und Biomechanik. Tiere, bei denen die Weichteile vom Knochen mittels einer PTFE Membran getrennt wurden, zeigten eine signifikant schlechtere Heilung im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren. Dies zeigte sich in einer geringeren biomechanischen Festigkeit der Femora nach 2, 5 und 10 Wochen und einer schlechteren radiologischen Überbrückung der Osteotomie.

Histologisch war bei Tieren mit PTFE Membran, im Gegensatz zu Kontrolltieren, eine signifikant kleinere periostale Kallusbildung zu beobachten. Der periostale Kallus bestand zudem bei Tieren der Membran-Gruppe aus einem signifikant höheren Anteil an Bindegewebe bei gleichzeitig erniedrigtem Anteil an Knochen.

Zusammenfassend konnte ein standardisiertes Modell zur Untersuchung der Rolle des Weichteilmantels auf die Frakturheilung etabliert werden. Die schlechtere Heilung nach Trennung der Weichteile vom Knochen war assoziiert mit einer fast vollständig ausbleibenden periostalen Kallusbildung.

Wir schlussfolgern dementsprechend, dass ein intakter Weichteilmantel insbesondere für die periostale Kallusbildung verantwortlich ist. Das hier etablierte Modell kann nun dazu verwendet werden, die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen näher zu untersuchen, mit dem Ziel der Entwicklung neuer Therapieansätze.

1.2 Summary

Despite the growing knowledge about the mechanisms of fracture repair, up to ten percent of the cases in clinical daily life, show a delay or even a complete lack in bone healing. Especially fractures with associated soft tissue damage are still a clinical problem as the rate of the coincidence of pseudarthroses is significantly elevated. The underlying mechanisms are insufficiently known. Because of the complexity of the procedures, there is still a need of animal models to investigate the mechanisms and new therapeutic concepts. While in former studies bigger animals were in most of the cases used to examine the procedures in fracture healing, in latest publications, little animals play the mayor role. Murine fracture models seem very advantageous because of the availability of inbred strains, development of transgenic and knockout mouse models, as well as specific probes, which allows further in- depth investigation into specific pathways in the sequence of events of fracture healing. There is a lack of models for the examination of the role that a soft tissue injury plays in impaired bone healing.

Subsequently, the aim of this study is the development of a murine model to examine the soft tissue injury in fracture healing. For this, a standardized osteotomy was effectuated in the mid diaphysis of CD-1 mice. The fracture was stabilized by an intramedullary screw (Mousescrew®). For the examination of the role that the soft tissue envelope plays, in one group, this envelope was completely separated from the bone by a PTFE- membrane (polytetrafluorethylene), while the soft tissues were moved back to the fracture site in the control group. Fracture healing was evaluated after 2, 5 and 10 weeks by histomorphometry, radiology and biomechanical testing. Animals, in which the soft tissues were separated from the fracture site by a PTFE- membrane, showed a significantly worse healing compared to the matched control animals. This was quantifiable by a lower biomechanical resistance of the femora after 2, 5 and 10 weeks and a worse radiological bridging of the osteotomy. Histologically, in the animals with PTFE- membrane, adversely to the control- animals, a significantly poorer periosteal callus formation was observed. The periosteal callus was composed in the PTFE- animals by a significantly higher fraction of fibrous connecting tissue while the fraction of bone was less.

In conclusion, a standardized model to examine the role of the soft tissue envelope in fracture healing could be established. The worse healing after separating soft tissue from bone was associated with an almost complete lack of periosteal callus formation. Subsequently we presume that an intact soft tissue envelope is especially responsible for periosteal callus formation. The established model can thus be used to examine the underlying mechanisms. The aim is the development of new therapeutic pathways.

2 EINLEITUNG

2.1 Inzidenz von Knochenbrüchen und Folgeeffekte

Weltweit sterben durch Verkehrsunfälle jährlich ca. 800.000 Menschen, zehn bis 15 Millionen werden verletzt oder dauerhaft geschädigt. Nach einer Studie der „Harvard School of Public Health“ und der Weltgesundheitsorganisation (WHO) werden Unfälle und ihre Folgen bis zum Jahr 2020 in der Ursachenstatistik für Tod und Behinderung international vom derzeit 9. auf den 3. Platz vorrücken – dann nur noch übertroffen von den Folgen kardialer Erkrankungen und der unipolaren Depression (MICHAUD et al., 2006).

Trotz der ständig verbesserten Therapiemöglichkeiten gehen muskuloskeletale Verletzungen und hier vor allem Knochenbrüche mit bedeutenden medizinischen und sozioökonomischen Problemen einher.

Durch die lange Immobilisation bzw. eingeschränkte Mobilisation nach Knochenbrüchen können tiefe Beinvenenthrombosen auftreten, von denen fünf Prozent durch eine Lungenembolie zum Tode führen. In Japan verlaufen sogar 20% der perioperativen Lungenembolien tödlich (FURUYA, 2007).

Vor allem ältere Menschen erleiden überdurchschnittlich häufig Knochenbrüche. Hinzu kommt das Problem des demographischen Gesellschaftswandel. Die Menschen werden bei rückläufigen Geburtenzahlen immer älter. Im Alter kommt es wegen eines reduzierten Kräftezustandes häufig zu Sturzereignissen, die wegen verminderter Knochendichte (Osteoporose) öfter zu Frakturen führen als bei jungen Menschen; vor allem ist hier an Oberschenkelhalsbrüche zu denken. Hierdurch werden in Zukunft die altersassoziierten Frakturen im Gesamten stark ansteigen. Des Weiteren laufen Heilungsprozesse während der Frakturheilung, wie alle anderen Stoffwechselfvorgänge auch, in älteren Organismen langsamer ab (PIIRTOLA et al., 2007).

Neben den medizinischen Folgen sind vor allem bei jüngeren Menschen, die am Arbeitsleben und damit am wirtschaftlichen Wertschöpfungsprozess aktiv teilnehmen, die

sozioökonomischen Folgekosten zu beachten. Im Jahre 1999 betrug die Kosten für Frakturen und deren Folgen in den USA 100 Milliarden Dollar (GOMBERG et al., 1999; BRINKER, O'CONNOR, 2004).

Laut Einhorn et al. beträgt das momentane Risiko, im Leben einen Knochenbruch zu erleiden bei Männern 50% und bei Frauen 33%. Diese Wahrscheinlichkeiten sind bereits heute dem Risiko an einer koronaren Herzkrankheit zu erkranken, gleich, und verdeutlichen, dass Frakturen ein ernst zu nehmendes gesellschaftliches Problem darstellen (EINHORN, 1995). Die Medizin hat in den letzten 30 Jahren große Fortschritte gemacht; auch das Wissen zur Frakturheilung konnte erweitert werden. Trotzdem sind die der Frakturheilung zugrunde liegenden Mechanismen im Einzelnen nicht aufgeklärt und es kommt in 5-10% der Fälle zu einer ausbleibenden Knochenbruchheilung (EINHORN, 1995).

Während einfache Frakturen bei gesunden Patienten in der Mehrzahl der Fälle gut zu behandeln sind, kennt man eine Reihe von Faktoren, die den normalen Heilungsverlauf negativ beeinflussen (TYTHERLEIGH-STRONG et al., 1997). Eine besondere Bedeutung spielt hier ein mit einer Fraktur assoziierter Weichteilschaden, welcher mit einer erhöhten Pseudarthroserate einhergeht.

2.2 Aufbau des Knochens

2.2.1 Makroskopischer Aufbau des Knochens

Aufgebaut ist der Knochen aus der

- Substantia compacta und der
- Substantia spongiosa

Die Grundeinheit aus der der Knochen aufgebaut ist, ist das Osteon als eine zylindrische Baueinheit. Es besteht aus einem zentralen Gefäß, das im Havers'schen Kanal verläuft. Um dieses Gefäß herum sind 3-7µm dicke Knochenlamellen konzentrisch angeordnet. Zwischen diesen Lamellen sind die Osteozyten „eingemauert“. Sie stehen über als

Canaliculi verlaufende Zellfortsätze miteinander in Verbindung. Der Durchmesser eines Osteons variiert und kann 250-350µm erreichen, mit Längen bis zu einigen Zentimetern (MARKS S.C., 2003).

Die Havers'schen Kanäle durchziehen den Knochen in der Längsachse, wobei Querverbindungen zwischen ihnen als Volkmann'sche Kanäle bezeichnet werden. An den Orten größter mechanischer Beanspruchung (Peripherie) ist der Knochen kompakt angelegt mit hoher Gewebsdichte (Substantia compacta). Die Substantia compacta umgibt die Substantia spongiosa, welche aus einem dreidimensionalen Geflecht feiner Knochenbälkchen (Trabeculae) besteht. Der Knochen wird vom Periost (Knochenhaut) umhüllt, welches reich durchblutet und im Gegensatz zur Substantia compacta und spongiosa auch innerviert ist.

2.2.2 Zellulärer Aufbau des Knochens

Knochen ist kein statisches Gewebe, sondern unterliegt einem ständigen Auf- und Abbau durch das gerichtete Zusammenspiel osteo-anaboler und osteo-kataboler Zellen (PARFITT, 2002).

Drei wesentliche Zelltypen können hier unterschieden werden:

- **Osteoblasten**
- **Osteocyten**
- **Osteoklasten**

Osteoblasten und Osteocyten stammen von Osteoprogenitorzellen mesenchymaler Herkunft ab und werden zu den osteo-anabolen Zellen gezählt.

Bei den **Osteoblasten** handelt es sich um Zellen, die Bestandteile der Knochengrundsubstanz (Kollagen, Proteoglycane, Glycoproteine) synthetisieren und deren Mineralisation regulieren. Sie befinden sich an der Oberfläche der Knochenbälkchen und stehen über feine zytoplasmatische Fortsätze miteinander in Verbindung. Histologisch stellen sie sich basophil dar und weisen alle Anzeichen aktiver, proteinbildender Zellen auf. Sie produzieren Typ-I -Kollagen und sezernieren alkalische Phosphatase. Die neugebildete, noch nicht mineralisierte Knochengrundsubstanz, die von den Osteoblasten

abgegeben wird, bezeichnet man als Osteoid. Aktive Osteoblasten bilden täglich einen etwa 1µm dicken Osteoidsaum. Davon verkalken in den folgenden drei bis vier Tagen siebenzig Prozent. Der Rest mineralisiert innerhalb der nächsten sechs Wochen (MARKS S.C., 2003).

Der **Osteozyt** ist ein reifer, ausdifferenzierter Osteoblast, der vollständig von Knochengrundsubstanz umgeben ist. Osteozyten sind über feine, filopodienartige Fortsätze miteinander verbunden. „Gap junctions“ gewährleisten den Fluss von Ionen und kleinen Molekülen über eine Strecke von bis zu 15 Zellen. Die genaue Funktion der Osteozyten, die im Gegensatz zu ihren Vorläuferzellen, den Osteoblasten, keine Knochenmatrix produzieren, bleibt bis heute zu großen Teilen ungeklärt. Man geht davon aus, dass sie als eine Art Mechanosensor fungieren, der die Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten mittels Transformation mechanischer Stimuli in zelluläre Signale moduliert (JUNQUEIRA LC, 2002).

Die **Osteoklasten**, die Knochengrundsubstanz abbauen und zu den osteo- katabolen Zellen gehören, entstehen durch die Fusion mononukleärer Zellen, die aus hämatopoetischem Gewebe stammen. Es sind große, stark verzweigte und bewegliche Riesenzellen. Sie weisen histologisch einen sehr großen, azidophilen Zelleib mit bis zu fünfzig Zellkernen auf und wölben sich meist über die Oberfläche der Knochenbälkchen. An Stellen wo Knochengewebe abgebaut wird, liegen Osteoklasten in Einbuchtungen, die als „Howship-Lakunen“ bezeichnet werden. Sie besitzen saure Hydrolasen (tartratresistente saure Phosphatasen) als Enzyme zum Abbau von Hydroxylapatit.

Osteoblasten, reife Osteocyten und Osteoklasten interagieren stark miteinander und sind für das Remodeling der Knochenmasse und für die trabekuläre Mikroarchitektur des Knochens verantwortlich (MARKS S.C., 2003).

2.3. Grundprinzipien der Knochenbruchheilung

2.3.1 Knochenheilung

Im Gegensatz zu anderen Geweben, bildet der Knochen bei seiner Heilung keine Narbe aus, sondern besitzt die Fähigkeit, seine physiologische Struktur nach einer Verletzung wieder herzustellen. Viele der im Rahmen der Frakturheilung ablaufenden, zellulären und molekularen Prozesse gleichen genau denen, die während der Embrogenese in der Keimplatte ablaufen. Allerdings laufen diese Vorgänge während der Frakturheilung zeitlich versetzt ab.

Die Frakturheilung durchläuft eine genaue Abfolge biologischer Ereignisse, wobei bestimmte parakrine und autokrine interzelluläre Signaltransduktionswege in einer bestimmten Zeitfolge den Heilungsverlauf steuern (EINHORN, 1998). Zahlreiche Wachstumsfaktoren und Zytokine sind an diesem Prozess beteiligt. Ihnen kommt eine zentrale Rolle bei der Steuerung von Zellrekrutierung, Angiogenese und Zelldifferenzierung zu (WILDEMANN et al., 2004).

Durch ein Trauma mit Knochenbruch werden kleine Blutgefäße zerrissen. Die Minderversorgung des nachgeschalteten Gewebes mit Sauerstoff (Hypoxie) ist gleichfalls ein Stimulus zur Regeneration.

Bedeutend für die Knochenbruchheilung sind drei teilungsfähige Zellverbände:

1. Das **Endost**, von dem der Markraum tapetenartig ausgekleidet wird,
2. das **Periost**, das dem Knochen außen aufgelagert ist und
3. das **Havers'sche- System**, das röhrenartig den Knochen durchzieht.

Diese Systeme enthalten Zellen, die zu knochenbildenden Osteoblasten differenzieren können (Osteoprogenitorzellen).

Von großer Bedeutung für den Erfolg einer Knochenbruchheilung ist nicht zuletzt ein intakter Weichgewebsmantel (Muskulatur) um die Fraktur herum. Klinische Studien und verschiedene experimentelle Studien konnten zeigen, dass eine Verletzung des Weichteilmantels die Frakturheilung negativ beeinflusst und zur Ausbildung einer

Pseudarthrose führen kann (BASSETT et al., 1961). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch noch unzureichend bekannt.

2.3.2 Arten der Frakturheilung:

Knochengewebe kann auf verschiedene Arten heilen. Dies hängt von unterschiedlichen Faktoren ab, insbesondere von der Stellung der Frakturrenden zueinander sowie der mechanischen Stabilität der frakturierten Knochenenden. Man unterscheidet eine primäre von einer sekundären Frakturheilung.

2.3.2.1 primäre (direkte) Frakturheilung

Bedingungen hierfür sind:

1. Intakte Fragmentdurchblutung.
2. Mechanische Stabilität der Fraktur.
3. Direkter Kontakt der Fragmente zueinander nach anatomischer Reposition.

Unter diesen Voraussetzungen heilt der frakturierte Knochen ohne die Ausbildung eines Kallus. Osteone durchziehen den Frakturspalt direkt entlang der Knochenlängsachse. Knochenresorbierende Zellen (Osteoklasten) schneiden bei der primären Frakturheilung durch resorptive Vorgänge Kegel in das gegenüberliegende Frakturende. Sie sind an der Spitze einer den Frakturspalt durchwandernden Einheit (sog. „multicellular bone forming unit“). Diesen Zellen folgt ein Zentralgefäß mit begleitenden Osteoblasten. Diese sogenannten „cutting cones“ durchwandern den Frakturspalt und stellen die normale osteonale Knochenstruktur mit Ausbildung neuer Havers'scher Kanäle wieder her (MARKS S.C., 2003).

2.3.2.2 sekundäre (indirekte) Frakturheilung

Wenn eine anatomische Reposition oder eine stabile Retention der Frakturrenden nicht vorliegt, heilt der Knochen sekundär durch die Bildung eines Kallusgewebes. Hierbei erfolgt die Wiederherstellung der Knochenstruktur sowohl über einen knorpeligen Kallus (enchondrale Ossifikation) als auch über die direkte Bildung neuen Knochengewebes (intramembranöse Ossifikation). Während der sekundären Frakturheilung laufen beide Mechanismen zumeist zeitgleich ab.

Der Verlauf der sekundären Frakturheilung kann in fünf physiologische Schritte eingeteilt werden, die teilweise überlappend ablaufen (v. a. 2, 3 und 4), (EINHORN, 1991):

1. Ausbildung eines Frakturhämatoms durch Ruptur von Blutgefäßen in Periost und Endost mit anschließender inflammatorischer Reaktion
2. Chondrogenese: Organisation des Hämatoms durch einwachsende Fibroblasten und Chondroblasten mit Knorpelbildung
3. Intramembranöse Ossifikation (subperiostal)
4. Enchondrale Ossifikation
5. Remodeling

Durch das Trauma wird die Kontinuität des Knochens zerstört, gegebenenfalls mit zusätzlichem Weichteilschaden und Verletzungen von Periost, Sehnen, Nerven und Gefäßen. Es kommt dann zur Ausbildung eines Hämatoms mit lokaler inflammatorischer Reaktion und Infiltration durch Granulocyten, Monocyten und Mastzellen. Die Mastzellen wirken über Histamin- und Heparinfreisetzung vornehmlich proinflammatorisch.

Im Frakturhämatom finden sich darüber hinaus pluripotente Stammzellen, die zu Osteoblasten, Fibroblasten und Chondroblasten ausdifferenzieren. In das Hämatom sezernierte Zytokine und Wachstumsfaktoren fördern die Zellinfiltration, Angiogenese und Zelldifferenzierung.

In der Entzündungsphase wird das Frakturhämatom lokal resorbiert. Dann laufen zwei Phasen zeitgleich an verschiedenen Orten der Fraktur ab. Bei der intramembranösen Ossifikation bildet sich, ausgehend vom Periost, diaphysär Osteoid. Mesenchymale, pluripotente Stammzellen im Periost differenzieren zu Osteoprogenitorzellen, Präosteoblasten und Osteoblasten und beginnen Geflechtknochen zu bilden (s. Abb. 1) (EINHORN, 1998).

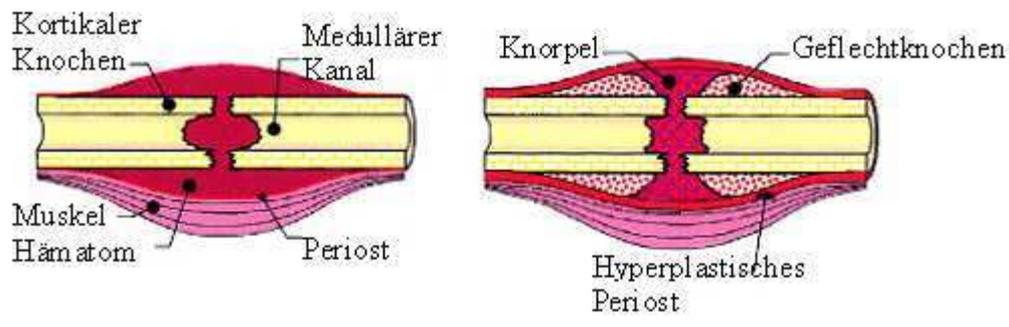
inflammatorische Phaseenchondrale und intramembranöse Ossifikation

Abb.1: Gewebszusammensetzung während der Heilung (WILDEMANN et al., 2004)

Dieser Geflechtknochen besteht aus anastomosierenden Knochenbälkchen und wächst von beiden Seiten auf den Frakturspalt zu. Fibroblasten und Osteoblasten beginnen Kollagen zu bilden, vor allem vom Typ I. Zwischen diesen Kollagenfibrillen lagern sich in der Folge Mineraldepots (Hydroxylapatit) ab.

Zeitgleich zu dieser intramembranösen Ossifikation läuft die enchondrale Ossifikation ab (s. Abb. 1). Hierbei wird das Frakturhämatom durch hyalinen Knorpel ersetzt, der wiederum sukzessive während der enchondralen Ossifikation durch Geflechtknochen ersetzt wird. Auch dieser wächst von distal und proximal auf die Fraktur zu. Zusammen mit Gefäßen wandern knorpelabbauende (chondroklastische) Zellen ein. Sie schaffen im Knorpelgewebe Hohlräume, die dann von Gefäßen und Osteoprogenitorzellen ausgefüllt werden. Letztere differenzieren zu Osteoblasten aus, kleiden die freigelegten Knorpelhöhlen tapetenartig aus und scheiden Osteoid ab, das dann mineralisiert wird. Die Höhlen werden so sukzessive mit Geflechtknochen ausgefüllt, in dem dann Osteoblasten zu Osteozyten ausdifferenzieren.

Am Ende der Phase der enchondralen Ossifikation steht der vollständige Durchbau des knorpeligen Frakturkallus mit trabekulärem Knochen.

Nach Überbrückung des Frakturspalts kommt es dann zum „Remodeling“ des knöchernen Kallus. Hier führen Knochenbildung und – resorption zu einem Abbau überschüssigen Gewebes und zum Ersatz des Geflechtknochens durch lamellären Knochen (LE et al., 2001).

2.4 Die gestörte Frakturheilung

In 5-10% der Frakturen kommt es im klinischen Alltag zu einer gestörten oder ausbleibenden Frakturheilung (Pseudarthrose oder „non-union“) (EINHORN, 2005).

Klinisch liegt per Definition eine Pseudarthrose vor, wenn nach sechs Monaten keine knöcherne Überbrückung der Fraktur erfolgt ist. Synonym wird im Englischen der Begriff „Non-Union“ gebraucht. Heilt der Knochen vier bis sechs Monate nach dem Trauma, spricht man von verzögerter Frakturheilung oder „Delayed- Union“.

Prinzipiell werden zwei Arten von Pseudarthrosen unterschieden: atrophe und hypertrophe.

Bei unzureichender Stabilisierung der Frakturrenden wird übermäßig knorpeliger Kallus gebildet. Hierbei versucht der heilende Knochen durch Vergrößerung der Querschnittsfläche eine ausreichende Stabilität zu erreichen um eine knöcherne Überbauung zu ermöglichen. Gelingt dies nicht, bleibt eine knöcherne Überbrückung aus und es kommt zu einer hypertrophen Pseudarthrose. In der Regel besteht die Therapie hier lediglich in einer adäquaten Stabilisierung der Frakturrenden, welche dann eine knöcherne Überbrückung des Frakturspalts erlaubt.

Während der hypertrophen Pseudarthrose ein mechanisches Problem zugrunde liegt, hat die atrophe Pseudarthrose eine biologische Ursache. Hier kommt es zu keiner wesentlichen Kallusformation und die Frakturrenden bilden sich zurück. Die Entstehung atropher Pseudarthrosen kann verschiedene Ursachen haben. Oft ist eine begleitende Gefäßverletzung mit nachgeschalteter Minderversorgung (Sauerstoff, Zellen und Nährstoffe) mit Pseudarthrosenbildung vergesellschaftet. Weitere Risikofaktoren sind systemische Krankheiten wie Diabetes mellitus, Infektionen oder eine periphere arterielle Verschlusskrankheit (COURT-BROWN, HUGHES, 1985). Weichteilverletzung von Muskel und Periost führen ebenfalls zu einer deutlich erhöhten atrophen Pseudarthrosenrate. Im Gegensatz zu hypertrophen Pseudarthrosen stellt die Therapie atropher Pseudarthrosen ein großes klinisches Problem dar (BROWNLOW, SIMPSON, 2000).

2.5 Bedeutung der Weichteildeckung für die Frakturheilung

Ein intakter Weichteilmantel ist entscheidend für eine ungestörte Frakturheilung. Dies konnte in zahlreichen klinischen Studien gezeigt werden (KETTUNEN et al., 2002). Schwerwiegender Weichgewebsverlust mit Periostablösung und konsekutiv verminderter Gefäßversorgung, sind mit einer schlechten Knochenheilung assoziiert (GUSTILO et al., 1984).

Bei einem Polytrauma kommt es vor allem im Rahmen von Hochrasanzverletzungen, neben der eigentlichen Fraktur, zu begleitenden Verletzungen von Gefäßen, Nerven und Muskeln. Sind diese Begleitstrukturen geschädigt, ist die Rate an Pseudarthrosen deutlich erhöht (GOMBERG et al., 1999). So zeigen Tibiafrakturen im Vergleich zu anderen Röhrenknochen die höchste Pseudarthrosenrate. Dies wird allgemein auf die schlechte Weichteildeckung bei fehlendem ventralen Muskelmantel zurückgeführt (UTVAG et al., 2002). Verschiedene tierexperimentelle Studien bestätigen die klinische Beobachtung eines Zusammenhangs von Weichteilschäden und einer gestörten Frakturheilung. In einem Frakturmodell in der Ratte konnte gezeigt werden, dass es durch Resektion der angrenzenden Muskulatur zu einer verminderten Kallusbildung kommt. Dies war begleitet von einer signifikant reduzierten Steifigkeit der untersuchten Femora (UTVAG et al., 2003).

Während ein Zusammenhang zwischen Weichteilschaden und einer gestörten Frakturheilung gut belegt ist, wissen wir kaum etwas über die zugrunde liegenden pathophysiologischen Prozesse. Von großer Bedeutung ist die Blutversorgung des Knochens, die sowohl über die Muskulatur, als auch über das Periost erfolgt (RHINELANDER, 1974).

Nach einer Fraktur steigt der Blutfluss im anhaftenden Muskel stetig an, erreicht nach zwei bis vier Wochen ein Maximum (RAND et al., 1981). Hat dieser hyperperfundierte Muskel direkten Kontakt zum Periost, heilt die Fraktur signifikant besser, als wenn dieser Muskel nach der Fraktur chirurgisch entfernt wird (UTVAG et al., 2002). Darüberhinaus fließt nach einer Fraktur das Blut nicht mehr, wie gewöhnlich, vom Knochenmark Richtung Kortex, sondern umgekehrt, zentripetal (TRUETA, 1974).

Demnach spielt die Blutversorgung des heilenden Knochens über Gefäße der angrenzenden Muskulatur eine entscheidende Rolle.

Utvåg et al. konnten im Rattenmodell zeigen, dass der Ursprung des anhaftenden Muskels (ortsständig oder eine Lappenplastik) für den Heilungserfolg nicht ausschlaggebend ist, die Intaktheit des Muskelgewebes allerdings schon. In einer Gruppe Ratten wurde hier der Muskel mechanisch vom Knochen gelöst (1), in einer anderen resezierte man den Muskel (2) und in einer dritten wurde der resezierte Muskel durch ein Gluteus-Lappenplastik ersetzt (3). Die Gruppen (1) und (3) zeigten nach 4 Wochen keine Unterschiede in der mechanischen Belastbarkeit des Knochens bei adäquater Heilung, wohingegen die Gruppe (2) eine signifikant verminderte Belastbarkeit zeigte (UTVAG et al., 2002).

Neben der Gefäßversorgung könnte die Muskulatur als Quelle für Stammzellen von Bedeutung sein. Es konnte nachgewiesen werden, dass Vorläuferzellen aus dem Muskel die Fähigkeit haben in osteogene Zellen zu differenzieren und an der Frakturheilung mitwirken (REYNDERS et al., 1999). Ob diese Zellen über Zellmigration oder über den Blutstrom an den Ort der Fraktur gelangen ist noch nicht bekannt.

Osteoblastäre Vorläuferzellen werden nach einem Trauma durch verschiedene Botenstoffe chemotaktisch angezogen, um dann in Osteoblasten auszdifferenzieren. Die osteogenetischen Stammzellen muskulären Ursprungs würden dementsprechend nach einem Weichteiltrauma im Frakturheilungsprozess fehlen, mit konsekutiv erhöhter Wahrscheinlichkeit von Störungen der Frakturheilung (GRUNDNES, REIKERAS, 1993).

2.6 Frakturmodelle

Zur Untersuchung der Frakturheilungsmechanismen sind Tiermodelle bis dato eine unabdingbare Voraussetzung. In vitro -Versuche sind bisher nicht in der Lage die in vivo ablaufenden, sehr komplexen Prozesse, zu simulieren. Studien am Menschen erlauben keine histologischen oder molekularbiologischen Untersuchungen, da hierzu repetitive operative Eingriffe erforderlich wären, die sich aus ethischen Gründen verbieten. Im Folgenden soll ein orientierender Überblick über Tiermodelle zur Untersuchung der Rolle

eines Weichteilschadens auf die Frakturheilung in unterschiedlichen Spezies gegeben werden.

2.6.1 Schaf

Vor allem für die Entwicklung und Testung neuer Human-Implantate ist das Schaf ein viel verwendetes Versuchstier (NUNAMAKER et al., 1991). So nutzte etwa die *Association for the Study of Internal Fixation (ASIF)* wiederholt Schafe für die Untersuchung der Frakturheilung unter Verwendung einer Platten-Osteosynthese (SCHENK, WILLENEGGER, 1977). Entsprechend ist die primäre Knochenbruchheilung an dieser Spezies, bei der das Remodeling, wie beim Menschen, über das Havers-System erfolgt, gut beschrieben. Des Weiteren wurde das Schaf für Studien zur intramedullären Marknagelung verwendet (SCHEMITSCH et al., 1995). Ein Vorteil des Schafes als Versuchstier ist die mit dem Menschen vergleichbare Knochenstruktur. Die Größe dieser Tiere erlaubt des Weiteren Frakturstudien mit identischen Implantaten wie sie beim Menschen Anwendung finden. Das große Tier hat jedoch mit der Notwendigkeit der Vorhaltung entsprechender Stallungen und folglich größeren Kosten einen Nachteil gegenüber kleineren Versuchstieren. Darüber hinaus sind die Möglichkeiten zu Untersuchungen auf molekularer Ebene durch das Fehlen transgener Tiere und eine verminderte Verfügbarkeit biomedizinischer Werkzeuge (Primer, Antikörper etc.) deutlich schlechter als in Kleintieren wie Ratte und Maus.

Meinig et al. verwendeten eine Polylactid- Membranen in Segmentdefektmodellen verschiedener Spezies (Ziegen, Yucatan- Minischweine, Kaninchen und Schafe) (MEINIG, 2002). Im Schafmodell wurden 7 cm große, diaphysäre Tibiadefekte mit einem Polylaktidschlauch von 0,25 mm Wandstärke, 70.000 D Molekülgewicht der Polylaktidmonomere und einer Porengröße von 5 - 15 μm überbrückt. Die Stabilisierung der Segmentdefekte erfolgte bei allen Tieren mit einem intramedullären Verriegelungsmarknagel. In einer Gruppe erfolgte zusätzlich zur Polylaktidmembran die Transplantation eines Beckenspans in den Defekt. In dieser Studie wurde in beiden Gruppen nach 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 und 64 Wochen nur dort Knochengewebe neu gebildet, wo die Knochenstümpfe nicht von der Polylaktidmembran umgeben waren. Die Autoren gehen davon aus, dass die kleine Porengröße (5 - 15 μm) das Einwachsen neuer Gefäße,

die Migration von Zellen, oder eine ausreichende Diffusion von Nährstoffmolekülen, nicht zuließ.

Schmidt et al. gingen 2008 im Schafexperiment der Frage nach, welche Rolle die Weichteile bei der Kallusdistraktion spielen. Hierzu erfolgte ein Segmenttransport mittels Fixateur externe in der Tibia von Schafen. Es wurde ein Weichteilschaden durch Resektion von Muskulatur erzeugt, während in der Kontrollgruppe die Muskulatur intakt blieb. Die Autoren beobachteten lediglich während der frühen Phase der Kallusreifung eine verminderte Mineralisation in den Tieren mit Weichteilschaden, was einherging mit einer verminderten Vaskularisation. Während späteren Phasen der Heilung fand sich kein Unterschied mehr zwischen Tieren mit oder ohne Weichteilschaden (SCHMIDT J, 2008).

2.6.2 Primaten

Primaten werden wegen hoher Anschaffungskosten und schlechter Verfügbarkeit nur eingeschränkt als Modelltiere zu Frakturheilungsstudien verwandt. Phylogenetisch ist die Knochenstruktur von Primaten mit der des Menschen am ehesten vergleichbar. Laut Nunamaker et al. sollten Studien zur Frakturheilung an Primaten aus ethischen Gründen (Ähnlichkeit in Gestalt und Sozialverhalten zum Menschen) und wegen der Verfügbarkeit anderer Modelltierarten aber möglichst verlassen werden (NUNAMAKER, 1998).

2.6.3 Hund

Da die Frakturheilung am Hund in der Tiermedizin von großer Bedeutung ist, sind viele Daten zur Behandlung und zu den biologischen Heilungsabläufen verfügbar (JOHNSON, STEIN, 1988). Aber auch für tierexperimentelle Arbeiten ist der Hund ein viel verwendetes Versuchstier. Es wurden zahlreiche Frakturmodelle mit internen und externen Stabilisierungstechniken, aber auch Modelle ohne Stabilisierung sowie mit verzögerter und ausbleibender Frakturheilung entwickelt (VOLPON, 1994; PETER et al., 1996).

Whiteside et al. untersuchten schon 1977 im Hundemodell die akuten Auswirkungen der Periostentfernung und des Ausfrärens des Markraums auf den regionalen Blutfluss im Knochen mit der Wasserstoff- Auswaschmethode. Hierzu wird eine Platinelektrode in einen zuvor im Knochen geschaffenen Hohlraum eingeführt. Über die Potentialänderung

an der Platinelektrode können Rückschlüsse auf die Blutversorgung des Knochens gezogen werden. Das Versuchstier atmet Wasserstoff über eine Maske bis zu einer gewissen Blutkonzentration ein. Über eine mathematische Berechnung kann dann die Blutversorgung des Knochens bestimmt werden. Der Blutfluss wurde hier in der rechten Tibia- Diaphyse gemessen, dann wurde das Periost gürtelförmig vom mittleren Drittel der Diaphyse entfernt und erneut gemessen. Danach wurde der Markraum ausgefräst und erneut die Knochendurchblutung gemessen. Die gleichen Messungen wurden danach an der linken Tibiadiaphyse wiederholt, allerdings wurde dort zuerst der Markraum ausgefräst (1. Messung) und dann das Periost entfernt (2. Messung). Der Blutfluss in der Hundetibia wurde weder durch die Periostentfernung, noch durch das Ausfräsen des Markraums signifikant herabgesetzt. Allerdings wurde der Blutfluss durch additives Zufügen beider Schädigungen völlig gestoppt (WHITESIDE et al., 1978). Demnach könnte bei einer Fraktur mit Periostschaden und Zerstörung des Markraums durch osteosynthetische Versorgung die Knochendurchblutung stark herabgesetzt und somit eine Heilungsstörung induziert werden.

2.6.4 Katze

Die Knochenbruchheilung an der Katze ist bisher sowohl im Rahmen von tiermedizinischen Therapiestudien als auch von Forschungsarbeiten an Frakturmodellen analysiert worden. Es wurden unterschiedlichste Methoden zur operativen sowie konservativen Behandlung von Frakturen, aber auch zum Einheilverhalten von Knochentransplantaten beschrieben (PUECH et al., 1990). Die Anatomie der langen Röhrenknochen der Katze, insbesondere des Femur, ist wegen einer langen und geraden Konfiguration besonders zur Einbringung von intramedullären Implantaten aber auch von Platten- und Schrauben- Osteosynthesen geeignet. Arbeiten zur Untersuchung der Rolle der Weichteile auf die Frakturheilung wurden jedoch keine beschrieben. Heute spielt diese Spezies zu Frakturheilungsstudien eine untergeordnete Rolle.

2.6.5 Kaninchen

Während in früheren Studien vor allem Großtiermodelle zur Untersuchung der Knochenbruchheilung benutzt wurden, hat sich in jüngerer Vergangenheit zunehmend das Arbeiten mit Kleintieren etabliert. Neben Ratte und Maus werden auch Kaninchen als dritte Nagetier-Spezies häufig zu Studien der Knochenbruchheilung genutzt (NUNAMAKER, 1998). Durch die Körpergröße dieser Tierart sind biophysikalische Untersuchungen praktikabler als bei Klein-Nagern. Osteosynthesematerialien, die vor allem an der Maus eine hohe technische Herausforderung darstellen, wie etwa Fixateur externe, Platte, Schraube, oder Verriegelungsnagel, können am Kaninchen einfacher konstruiert und angewandt werden (DEIBERT et al., 1994). Die Kosten für Anschaffung, Zucht und Haltung von Kaninchen werden verglichen mit Groß-Säugetieren als deutlich geringer beschrieben (CRITCHLOW et al., 1995).

Stafford et al. untersuchten im Kaninchenmodell die Weichteile als Ursprungsort osteogenetischer Zellen im Frakturheilungsprozess mittels immunhistochemischer Färbung des Osteokalzins in Osteoblasten. Bei zwölf weißen, männlichen Neuseeländer Kaninchen wurde an der rechten Tibia eine transverse Osteotomie durchgeführt. Um sicherzustellen, dass der Defekt nur von osteogenetischen Zellen aus den Weichgeweben erreicht werden konnte, hatte man sowohl das Knochenmark, als auch 2 cm des angrenzenden Periosts entfernt. Die Fraktur wurde mit einem intramedullären Nagel stabilisiert. Je 6 Tiere wurden nach 1 und nach 2 Wochen euthanasiert. Es wurden Röntgenaufnahmen der Tibiae, sowie eine Osteokalzinfärbung von histologischen Schnitten angefertigt. Keine der Frakturen war am Ende des Untersuchungszeitraums geheilt. An den Perioststümpfen bildete sich ein Kallus mit Knochen- und Knorpelgewebe, der auch radiologisch nachgewiesen werden konnte. Im Frakturspalt hingegen, sowie im angrenzenden Muskel und den zahlreichen Blutgefäßen, konnten keine Osteoblasten immunhistochemisch angefärbt werden. Stafford et al. kamen zum Schluss, dass zumindest in der Frühphase der Frakturheilung das Periost und der Markraum eine wesentlich bedeutendere Rolle spielen, als die Weichteile. Der angrenzende Muskel konnte das fehlende Periost und Knochenmark innerhalb der ersten beiden Wochen nicht kompensieren (STAFFORD et al., 1992).

Eine Studie von Reynders et al. untersuchte die osteogenetische Potenz freier, autologer Periostgrafts im Kaninchenmodell. Ein bedeutender Weichteilschaden wurde sowohl durch eine Periostentfernung, sowie eine Silastic- Membran (Silikon) simuliert. Die jeweils rechte und linke Tibia eines männlichen Neuseeland- Kaninchens (n= 57) dienten als Verum und Kontrolle. Nach Einbringen eines intramedullären Marknagels wurde die Tibia transversal osteotomiert und jeweils 1 cm Periost proximal und distal des Defekts entfernt. Um das Einwachsen periostalen oder extraossären Gewebes zu verhindern, wurde eine Silastic- Membran (2 mm dickes Silikon) um 2/3 des posteromedialen Knochenumfangs genäht. In der einen Gruppe (A) wurde auf das Silastic- freie Knochenfenster autologes Periost gespannt und mit dem angrenzenden Periost distal und proximal vernäht. Das Transplantat hatte somit lediglich Kontakt zur Haut, nicht zum Muskel. In der zweiten Gruppe (B) wurde das Periost in transversaler Richtung gespannt, ohne Kontakt zu den Perioststümpfen. Die Kontrollgruppe blieb ohne Periosttransplantat. Die Revaskularisierung des grafts wurde mittels „colored mikrosphere“- Technik untersucht (C). Die Tiere wurden nach 4, 6, 15, 19, 28, 40, 49, 54, 62 und 67 Wochen euthanasiert und ein 2 cm Segment der Tibia inklusive der Membran entnommen. Die Auswertung erfolgte radiologisch und histomorphometrisch. Der Blutfluss im Periostgraft wurde in 8 Kaninchen nach 1, 2 und 3 Wochen post OP gemessen. Dazu wurden 5 cm³ von farbigen Polystyrennanokugeln in die linke Herzkammer injiziert, 5 Minuten später wurde das Kaninchen getötet, die Nieren wurden entfernt und analysiert um die gleichmäßige Verteilung des Kontrastmittels im gesamten Körper zu gewährleisten. Das Periosttransplantat und die Kontrolle der kontralateralen Tibia wurden nach Hämatoxylin-Eosin- Färbung ausgewertet („colored mikrosphere“- Technik). Es wurde im Hinblick auf einen spaltüberbrückenden Kallus ausgewertet. Nach vier Wochen war diesbezüglich kein signifikanter Unterschied in den Tibiae mit oder ohne longitudinale Periosttransplantation. Nach 6, 15, 19 und 26 Wochen zeigten Tiere mit Periostlappentransplantation eine signifikant bessere Heilung mit erhöhter Durchblutung der Periostlappenplastik. Nach 40 Wochen lagen dann keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf ein überbrückendes Kallusgewebe mehr vor. Diese Arbeit kam zum Schluss, dass transplantiertes Periost sein osteogenetisches Potential behält, vor allem, wenn es in direktem Kontakt zum ortständigen Periost steht (REYNDERS et al., 1999). Allerdings hat das Kaninchen eine primitive Knochenstruktur und bildet im Gegensatz zum Menschen in großer Menge

Knorpel zur Frakturüberbrückung. Auch belastet dieser Nager eine Fraktur im Vergleich zum Mensch sehr früh und anders. Die Daten sind daher nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar.

2.6.6 Ratte

Ratten sind schon seit längerem als Modelltiere für die Knochenbruchheilung etabliert. Es wurden dabei Femur, Tibia, Schädel, Metatarsale, Radius und Ulna als Frakturlokalisierung genutzt (GURGEL et al., 2005; HEINO et al., 2008). Der große Vorteil der Ratte gegenüber der Maus liegt, ähnlich wie der des Kaninchens, in der Körpergröße, was vor allem die operative Handhabung, aber auch die biomechanische Testung deutlich vereinfacht. Grundsätzlich kann man die Tibia- und Femur- Frakturmodelle an der Ratte mit denen an der Maus vergleichen. Instabile Pin- Osteosynthesen (BONNARENS, EINHORN, 1984) werden zwischenzeitlich auch an der Ratte sukzessive durch stabile Fixationstechniken unter Verwendung von Platten, Verriegelungsmarknägeln sowie externen Fixateuren ergänzt (WILLIE et al., 2009).

Landry et al. publizierten im Jahr 2000 eine Arbeit an Ratten, die den Effekt eines Weichgewebsschadens auf die frühe Reaktion des Periosts bei einem Knochen trauma untersucht (LANDRY et al., 2000). Hier wurde ein Kortikalisdefekt in die anteromediale Tibia gefräst (1,1 mm Durchmesser, 0,5 mm Tiefe). In einer weiteren Gruppe wurde ein Stück des M. tibialis anterior, zur Simulation eines Weichteilschadens, über dem Knochen defekt reseziert. In einer weiteren Gruppe von Ratten wurde lediglich der Muskel reseziert ohne einen Knochen defekt zu erzeugen. Es erfolgte eine quantitative, histologische Bestimmung der Zellproliferation, der Osteoblastenkonzentration (Methylgrün/ Thionin-Färbung) und der Kallusbildung (Dicke vom Boden des Defekts bis zur Kallusoberfläche) innerhalb eines 3 mm Radius vom Mittelpunkt des Defekts. Der Kortikalisdefekt induzierte einen Anstieg der Proliferationsrate der Periostzellen im Zeitverlauf. Diese Zellen wurden zuvor als Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten anhand morphologischer und histochemischer Charakteristika identifiziert. Ein zusätzlicher Muskelschaden führte nur am ersten Tag zu einer weiteren Steigerung der Periostproliferation, jedoch nicht zu späteren Zeitpunkten. Der zusätzliche Muskelschaden führte zu einer signifikant erhöhten Osteoblastenkonzentration ($p < 0,05$) vom 2. bis zum 5. Tag im Kortikalisdefekt, hatte

jedoch keinen Einfluss auf die gebildete Kallusmenge. Der Knochendefekt heilte von der Peripherie ausgehend ohne Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. In diesem Modell führte ein Weichteilschaden durch die Resektion eines Muskels nicht zu einer verminderten Knochenbildung im Kortikalisdefekt. Im Gegenteil führte ein zusätzlicher Muskelschaden zu vermehrter Periostproliferation und mehr Osteoblasten (LANDRY et al., 2000).

Utvåg et al. haben mehrere Frakturstudien im Rattenmodell publiziert. Unter anderem untersuchten sie die Rolle von Periost und umgebendem Muskelmantel auf die Frakturheilung im Femur der Ratte (UTVAG et al., 1998). Es wurde jeweils eine offene Osteotomie des medialen Femur durchgeführt und der verbleibende Knochensteg manuell frakturiert. Die Fraktur wurde nach Auffräsen des Markraums mit einem intramedullären Pin stabilisiert. In einer Gruppe (1) wurde das Periost von der kompletten Femurdiaphyse abgelöst, jedoch nicht entfernt. In einer weiteren Gruppe (2) wurde diese Trennung zwischen Periost und Muskel vollzogen. In einer dritten Gruppe (3) wurde analog zu Gruppe (2) vorgegangen, wobei zusätzlich eine 16 mm lange PTFE- Membran manschettenartig um die Diaphyse genäht wurde, wodurch Knochen und Muskelmantel getrennt waren. Nach 4 Wochen erfolgte nach Euthanasie die Explantation und Auswertung der Femora. Es wurde die Kallusdicke mit einer Schublehre bestimmt, eine röntgenologische sowie eine biomechanische Auswertung (Biegetest) durchgeführt. Die Osteotomien in Gruppe (1) und (2) heilten über einen periostalen Kallus, wohingegen die Kallusbildung nach Separierung des Muskelmantels durch eine PTFE -Membran (Gruppe 3) sehr gering ausfiel und signifikant kleiner war als in den beiden anderen Gruppen. Tiere der Gruppe 3 zeigten auch eine signifikant geringere biomechanische Steifigkeit im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen.

2.6.7 Maus

Wegen der geringen Kosten für Anschaffung, Zucht und Haltung der Spezies (geringe Körpergröße) sind im Gegensatz zu größeren Tieren große Versuchsgruppen gut umzusetzen. Durch die Existenz biomedizinischer Werkzeuge (Primer und spezifische Antikörper), sowie durch die Verfügbarkeit von transgenen Tieren und Knock-out Stämmen, ist die Maus vor allem für molekularbiologische Studien besonders geeignet

(ROSSANT, NAGY, 1995). Die Mechanismen der durch einen Weichteilschaden gestörten Frakturheilung sind noch unklar, sodass mit transgenen Tieren oder Knock-out Stämmen hier speziell die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen in der Maus untersucht werden können.

In den bisher veröffentlichten Frakturmodellen an der Maus wurde die Knochenbruchheilung vor allem an der Rippe, der Tibia sowie dem Femur untersucht (HILTUNEN et al., 1993; HOLSTEIN et al., 2007). Rippen eignen sich wegen ihrer ungünstigen Form schlecht für biomechanische Tests und wurden daher fast nur für Genexpressionsanalysen während der Frakturheilung verwandt (YAMAGIWA et al., 1999). Im Gegensatz zur Rippe eignen sich die Tibia sowie das Femur gut für biomechanische Tests. Die anatomischen Vorteile des Mäusefemur gegenüber der Tibia liegen in einem einheitlichen runden Querschnitt bei guter Weichteildeckung (CHEUNG et al., 2003).

Tibia- und Femur- Frakturmodelle an der Maus können grundsätzlich unterteilt werden in Modelle bei denen die Fraktur geschlossen oder offen erzeugt wird. Die geschlossenen Frakturmodelle können wesentlich auf das von Bonnarens und Einhorn 1984 an der Ratte beschriebene Modell zurückgeführt werden (BONNARENS, EINHORN, 1984). Mithilfe einer stumpfen Guillotine wird eine standardisierte transversale Fraktur unter minimalem Weichteilschaden erzeugt. Das korrespondierende Modell an der Maus wurde von Hiltunen und Kollegen 1993 an der Tibia (HILTUNEN et al., 1993) und von Manigrasso und O'Connor 2004 am Oberschenkelknochen erstmalig beschrieben (MANIGRASSO, O'CONNOR, 2004). Für die offene Femurfrakturierung wird überwiegend ein lateraler longitudinaler Zugang geschaffen, um unter Sicht zu frakturieren oder zu osteotomieren (GARCIA et al., 2008). In den meisten Frakturmodellen an Ratte und Maus werden das Femur beziehungsweise die Tibia nach definierten Zeitabschnitten entnommen; die Knochenbruchheilung wird dann zumeist mit radiologischen, biomechanischen und histologischen Methoden analysiert. Die biomechanische Testung wird vorwiegend als Drei- Punkt-, Vier- Punkt- oder Rotationsmessung durchgeführt (HOLSTEIN et al., 2007).

Trotz der zunehmenden Anzahl an Frakturstudien in der Maus gibt es einen großen Mangel an Modellen zur Untersuchung des Weichteilschadens auf die Frakturheilung. Dies ist

jedoch von großem klinischem Interesse, da Frakturen mit begleitenden Weichteilverletzungen mit einer hohen Pseudarthroserate vergesellschaftet sind.

Die einzige Studie zur Untersuchung eines Weichteilschadens auf die Frakturheilung wurde von Harry et al. zeitgleich mit der vorliegenden Arbeit publiziert (HARRY et al., 2008). Harry et al. führten eine offene Osteotomie an der Tibia der Maus durch, welche mittels eines einfachen intramedullären Pins stabilisiert wurde. Harry et al. konnten zeigen, dass es durch Separation der Osteotomie von den Weichteilen zu einer Verzögerung der Frakturheilung nach 28 Tagen kam. Bis auf das von Harry et al. beschriebene Modell gibt es derzeit keine weiteren Modelle in der Maus zur Untersuchung der Rolle der Weichteile auf die Frakturheilung.

2.7 Zielsetzung der Arbeit - Fragestellung

Während ein negativer Effekt eines Weichteilschadens auf die Frakturheilung bekannt ist, sind die zugrunde liegenden Mechanismen ungeklärt. Ziel der Arbeit ist die Entwicklung eines tierexperimentellen Modells zur Erforschung der Rolle der Weichteile bei der Frakturheilung. Um die molekularen Prozesse studieren zu können, erfolgte die Modellentwicklung in der Maus. Zur Simulation eines maximalen Weichteilschadens erfolgt die Separation von Knochen und Muskulatur mittels einer PTFE- Membran. Hierdurch wird ein Verlust der Muskulatur simuliert ohne funktionell den Bewegungsablauf der Maus zu beeinflussen.

Unsere Hypothese lautet:

„Durch Trennung von Muskulatur und Knochen durch eine PTFE Membran kommt es zu einer Verzögerung der Frakturheilung.“

Unsere entsprechende Nullhypothese lautet:

„Es gibt keinen Unterschied in der Frakturheilung zwischen Tieren mit intaktem Weichteilmantel und Tieren bei denen Knochen und Muskulatur durch eine PTFE Membran getrennt wurden.“

3 MATERIAL UND METHODIK

3.1 Tiere und Tierhaltung

Die Versuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz und nach Genehmigung durch die Saar-Pfalz-Kreis-Kreispolizeibehörde am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes an weiblichen CD-1-Mäusen durchgeführt. Die Tiere mit einem Alter von 9- 14 Wochen und einem Gewicht zwischen 30 und 40g wurden unter klimatisierten Bedingungen bei einer Temperatur von 22-24°C, 12-stündigem Tag- Nachtrhythmus und einer Luftfeuchtigkeit von etwa 60% gehalten. Die Mäuse hatten unbegrenzten Zugang zu Trinkwasser und Standardlaborfutter.

3.2 Studienaufbau

Insgesamt wurden 48 Tiere analysiert. In 24 Tieren wurde die Muskulatur vom Knochen mittels einer PTFE- Membran (Cytoplast®, REGENTEX GBR-200, ORALTRONICS®, Dental Implant Technology GmbH, Bremen) getrennt (Membrangruppe). Bei weiteren 24 Tieren wurde die Muskulatur wieder dem Knochen angelagert (Kontrollgruppe). In jeder Gruppe wurde nach 2, 5 und 10 Wochen die Frakturheilung radiologisch, histologisch und biomechanisch analysiert (n= 8 pro Gruppe und Zeitpunkt, s. Abb. 2). Von allen Tieren wurde post mortem eine Röntgenaufnahme des rechten Hinterbeines angefertigt (Heliodent DS, 60mV, 0.08 ms Belichtungszeit, 50/60 Hz, Sirona Dental Systems, Besheim). Nach Durchführung der nicht- destruktiven biomechanischen Testung wurden die Knochen der histologischen Auswertung zugeführt.

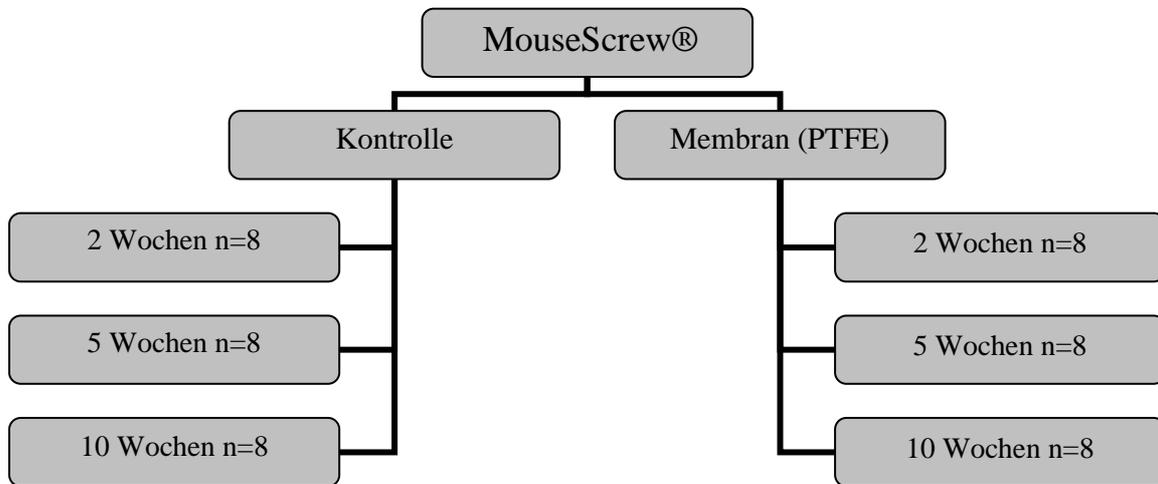


Abb. 2.: Studienaufbau

3.3 Anästhesie und Operationsvorbereitung

Von allen Mäusen ermittelte man präoperativ das Gewicht zur korrekten Narkosedosierung. Die Tiere wurden mit einer intraperitonealen Injektion von Ketamin (Ketavet, 75 mg/ kg KG, Pfizer, Karlsruhe) und Xylazin (Rompun, 25 mg/ kg KG, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) anästhesiert. Um ein Austrocknen der Augen zu verhindern, bestrich man jeweils die Kornea mit Dexpanthenol- Augensalbe (Bepanthen, Bayer Vital GmbH, Leverkusen). Nach elektrischer Rasur (Electra II, Aesculap AG, Tuttlingen) des rechten Beines bis über die Hüfte hinaus und Epilieren mit Enthaarungscreme (Elca med, Asid Bonz GmbH, Herrenberg, 15 Minuten Einwirkzeit) wurde die Enthaarungscreme abgewaschen und anschließend das Bein mit Softasept-Spray (Braun AG, Melsungen) desinfiziert.

Das Instrumentarium bestand aus einem feinen Nadelhalter und Pinzette, einem Einwegskalpell (Größe 15), einer Schere, einer gebogenen Klemme sowie einer gebogenen Pinzette. Außerdem wurden ein Seitenschneider sowie eine Gigli- Drahtsäge ($\varnothing = 0,22\text{mm}$) verwendet. Hinzu kam ein elektrisch betriebener Bohrer (Proxxon®, 0,5 mm), sowie Nahtmaterial (Prolene® entweder 5/0 oder 6/0, Ethicon®, Germany). Alle verwendeten Instrumente und Materialien wurden vor Operationsbeginn mit alkoholischer Desinfektionslösung (Softasept®) desinfiziert. Bei der Operation wurden unsterile Handschuhe (Peha-soft® Powderfree, Paul Hartmann AG, Heidenheim/Deutschland) getragen sowie OP-Oberbekleidung.

3.4 Operation

Implantation der Schraube:

Medial der Patellarsehne erfolgt ein ungefähr 4 mm langer Hautschnitt zur Darstellung des Knies. Die Sehne wird medial, bei gestrecktem Bein, gelöst, nach lateral luxiert und durch Beugung des Beines in dieser Position gehalten (s. Abb. 3 A, B). Die Femurkondylen sind nun gut dargestellt. Zwischen diesen wird die Cortikalis mit einem 0,5 mm dicken, elektrischen Bohrer (Proxxon®) eröffnet und somit ein Zugang zum Markraum geschaffen. Mit einer Kanüle (24 G) wird der Markraum sondiert und durch Drehen der Kanüle ein Kanal für das Gewinde der Zugschraube geschaffen, die Kanüle steckt dann ganz im Trochanter major der Maus (s. Abb. 3 C, D).

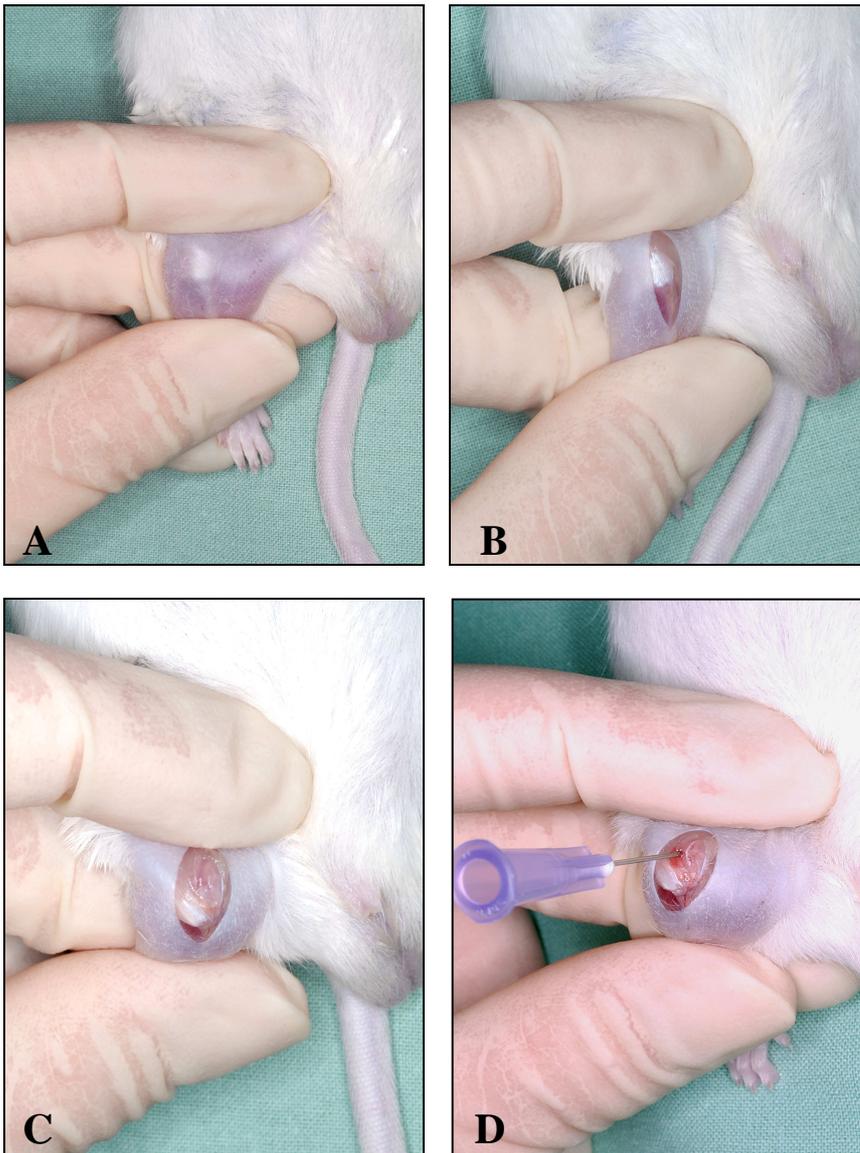


Abb 3: A: Nach Enthaarung des Beines ist die Patella durch die Haut zu sehen , das Op.- Gebiet wird mit dem dargestellten Griff fixiert. B: Parapatellare Hautinzision mit Sicht auf das Ligamentum patellae. C: Luxation der Patella nach lateral mit Sicht auf die Fossa intercondylaris. D: eröffneter Markraum mit liegender Kanüle ($\varnothing = 0,55$ mm, 24G).

Nach Entfernen der Kanüle wird eine Zugschraube (Abb.4, MouseScrew®) eingebracht. Danach entfernt man den Schraubendreher und es erfolgt ein lateralen Zugang zum Femur.

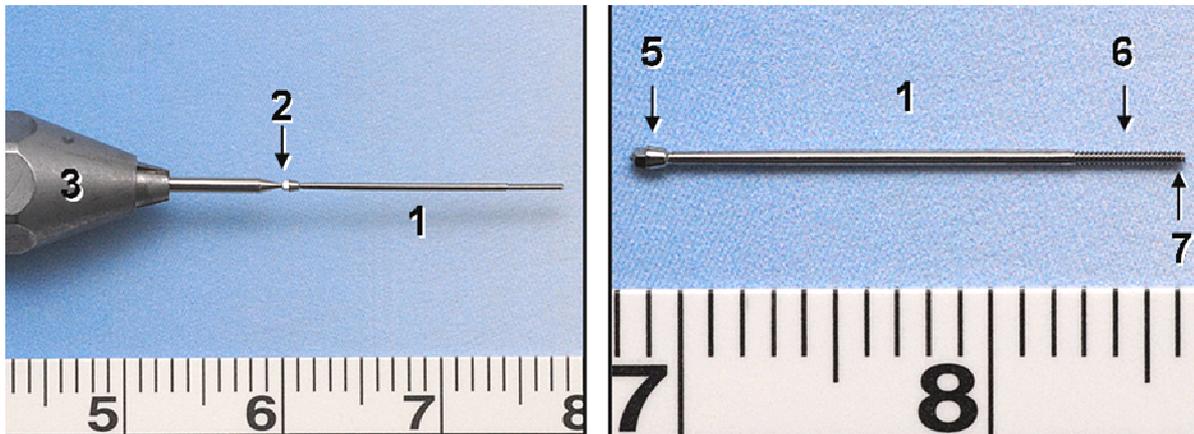


Abb. 4: Intramedulläre Zugschraube. Die Titanschraube (1) ist mit einem konischen Schraubenkopf (5) sowie einem distalen Gewinde (6) versehen. Über eine Sollbruchstelle (2) ist die Schraube mit einem Eindrehinstrumentarium (3) verbunden. Bei einem definierten Drehmoment kommt es zum Versagen der Sollbruchstelle, so dass alle Frakturen mit der gleichen Kompression verschraubt werden. Beginn des Gewindes am distalen Schraubenende (7).

Femurzugang:

Das Tier ist in Bauchlage gelagert, das rechte Bein abgespreizt. Durch Tasten erkennt man die Lage des Femur. Nun wird die Haut etwa 15 mm lang inzidiert, das Femur intermuskulär freipräpariert. Die Dissektion erfolgt zwischen Periost und Muskulatur. Die Gewebe werden dabei maximal geschont.

Osteotomie:

Eine Gigli- Draht-Säge (AO Development Institute Davos, Schweiz, $\varnothing = 0,22$ mm) wird hinter dem Knochen durchgeführt, sägt ihn durch umschlingen und pendelnden Zug entzwei. Durch Vorandrehen der intramedullären Zugschraube wird die Fraktur reponiert und der Osteotomiespalt geschlossen. Durch die eingebaute Sollbruchstelle der Mousescrew® am Eintrittspunkt am Knie ist die Kompression auf die Fraktarenden standardisiert (s. Abb. 4).

Implantation der PTFE- Membran :

Während in der Kontrollgruppe die abgelöste Muskulatur wieder dem Knochen angelagert wurde, erfolgte in der Membrangruppe die Separation von Knochen und Muskulatur durch eine PTFE- Membran (Cytoplast®, REGENTEX GBR-200, ORALTRONICS®, Dental

Implant Technology GmbH, Bremen). Dies erfolgte im Anschluss an die Osteotomie und die Implantation der intramedullären Zugschraube mittels eines 4 x 7 mm großen, nicht resorbierbaren PTFE- Membranstückes, welches um den gesamten Knochen genäht wird (Prolene® 6/0, Eticon, Germany). Hierdurch wird der Knochen zwei Millimeter proximal und distal der Osteotomie von der Muskulatur und den Weichteilen getrennt. Der Porendurchmesser der Membran beträgt 0,2 μm und erlaubt somit keine Durchwanderung von Zellen oder Blutgefäßen. Ein schichtweiser Wundverschluss am Femur und am Knie beendet die Operation.

Postoperative Versorgung:

Bis zum Aufwachen standen die Mäusekäfige vor einer Rotlichtlampe um ein Absinken der Körpertemperatur zu verhindern. Die Tiere erhielten postoperativ, nach 24 und nach 48 Stunden eine subkutane Applikation des Analgetikums Caprofen (Rimadyl, 6,5 mg/kg KG, Pfizer GmbH, Karlsruhe). Unmittelbar nach der Operation wurden die Mäuse in Einzelkäfige verteilt. Wenn sich nach einigen Tagen ihr Bewegungs- und Fressverhalten normalisierte und die Wundheilung eingesetzt hatte, erfolgte die Unterbringung mit insgesamt bis zu vier Tieren in einem Käfig.

Nach Ablauf des gruppenspezifischen Analysezeitraums wurden die Tiere durch Genickbruch getötet und die linken sowie die rechten Femora nach Anfertigung einer Röntgenaufnahme entnommen.

Hierzu wurden die Femora im Hüftgelenk sowie im Kniegelenk exartikuliert und aus den Kadavern entfernt. Bei vorsichtigem Vorgehen unter Bewahrung der Integrität des Frakturbereichs wurden die umgebenden Weichteilreste reseziert.

Die PTFE- Membran wurde beim Anfertigen der histologischen Schnitte am Knochen belassen. Vor der Biomechanischen Untersuchung wurde die Naht eröffnet und die Membran etwas gelöst, jedoch nicht vollständig entfernt.

3.5 Röntgenologische Auswertung

Da die intramedulläre Fixation unter Sicht erfolgt, wurde auf postoperative Röntgenaufnahmen zur Lagekontrolle der Zugschraube verzichtet. Nach Ende der Beobachtungszeiträume wurden Röntgenaufnahmen (Heliodent DS, 60mV, 0.08ms Belichtungszeit, 50/60Hz, Sirona Dental Systems, Besheim) im anterior- posterioren Strahlengang mit einem Abstand von 35 mm zwischen Strahlenquelle und Röntgenfilm (Kodak IP-21 Dentalfilm, Eastman Kodak Company, New York, USA) aufgenommen, welche direkt im Anschluss in einem Automaten für intraorale Röntgenfilme (Periomat Plus, Dürr Dental, Bietigheim-Bissingen) entwickelt wurden. Die Röntgenaufnahmen wurden daraufhin digitalisiert.

Zur Beurteilung der Frakturheilung bestimmte man den Kallus- (Kd.) und Femurdurchmesser (Fd.) mit Hilfe einer Computersoftware (Image J 1.37v, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) und errechnete daraus das Verhältnis aus Kallus- und Femurdurchmesser (Kd./Fd.) des frakturierten Beines. Zusätzlich erfolgte eine Punktevergabe für den Heilungsgrad der Fraktur entsprechend der Klassifikation von Goldberg (GOLDBERG et al., 1985), bei der :

- 0 Punkte für Pseudarthrose bzw. "nicht geheilt",
- 1 Punkt für "potentiell geheilt" und
- 2 Punkte für "geheilt" vergeben wurden.

3.6 Biomechanische Auswertung

Vor Beginn der Testung wurde die intramedulläre Zugschraube entfernt ohne die Strukturen des Knochens in der Frakturzone zu beschädigen. Bei einigen Femora war jedoch nach Entfernung der Schraube keine biomechanische Testung möglich, da keinerlei Zusammenhalt zwischen den Knochenenden mehr bestand. Hier wurde eine Biegesteifigkeit von 0 N/mm angegeben. Bei den Tieren mit PTFE- Membran wurde die

Naht eröffnet und die Membranmanschette leicht gelöst, jedoch nicht vollständig entfernt um eine Beeinflussung der biomechanischen Testung zu vermeiden.

Jedes Femur (rechtes und linkes) wurde einem 3-Punkt-Biegetest unterzogen. Diese Untersuchung wurde mit einer Materialtestungsmaschine der Firma Zwick (Zwick®, Ulm/Deutschland) durchgeführt (s. Abb. 5).

Die Knochen wurden hierzu auf eine Unterlage der Maschine platziert, die zentral eine Lücke von 6 mm aufweist. Die Femora wurden so auf der Unterlage angebracht, dass der Frakturbereich genau in der Mitte dieser Lücke war. Hierbei wurden die Femora so platziert, dass das ventralseitige Femur nach oben zeigte. Auf diese Stelle wurde dann von oben durch einen in vertikaler Richtung beweglichen Stempel eine Kraft auf die Knochen ausgeübt.

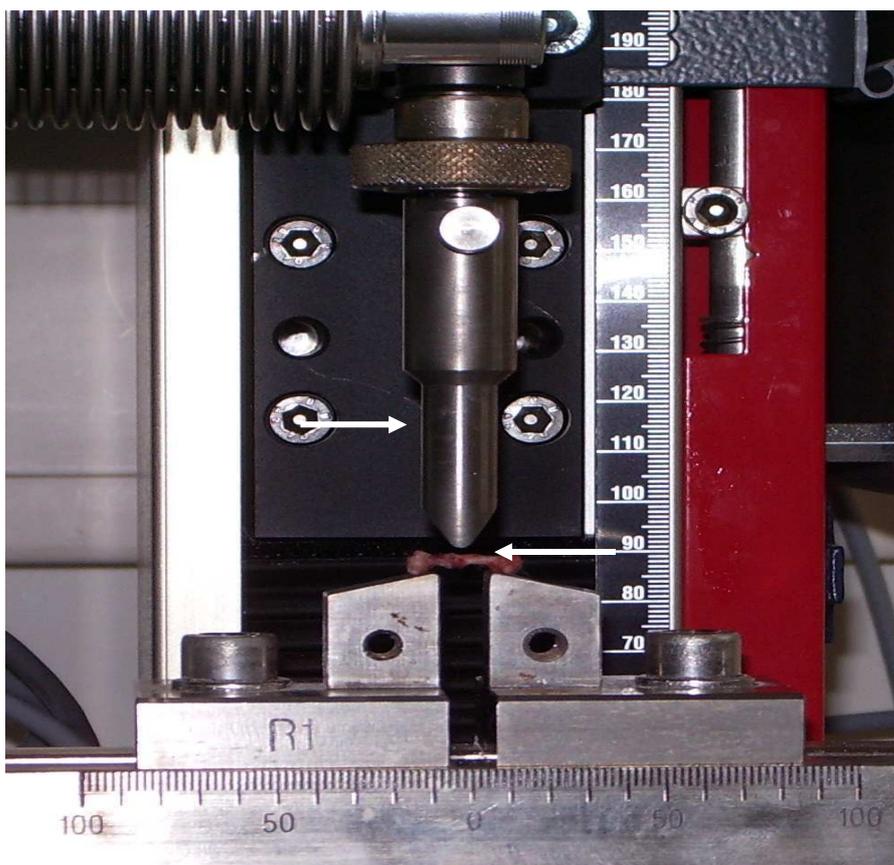


Abb. 5: Darstellung der Testmaschine (Zwick®, Ulm/ Deutschland). Der linke Pfeil weist auf den Kraftstempel. Der rechte Pfeil deutet auf die Lücke der Auflage, die vom Mäuse- Femur überbrückt wird.

Der Kraftstempel bewegt sich mit einem Vorschub von 1mm/ min auf den Knochen, wobei er an der vorderen Femuroberfläche ansetzt, so dass die posteriore Femuroberfläche unter Zug gerät. Das Testungsgerät registrierte hierbei die für die Verformung der Knochen aufzuwendende Kraft.

Während der gesamten Zeit zwischen Ausbau und Testung wurden die Knochen mit isotoner NaCl- Spüllösung feucht gehalten, um eine mögliche Verfälschung der Werte durch Austrocknung der Knochen zu verhindern.

Die Messung wurde abgebrochen, wenn eine lineare Steigung erkennbar war, spätestens jedoch bei Erreichen von 2 mm Auslenkung.

Die Werte wurden in einem Kraft-Weg-Diagramm dargestellt. Auf der Abszisse wurde die Verformung der Knochen, auf der Ordinate die aufgewendete Kraft aufgetragen.

Aus dem Kraft-Weg-Diagramm wurde die Steifigkeit errechnet. Diese wurde definiert als die Steigung im linearen Bereich des Diagramms. Die Steifigkeit jedes Knochenpaares wurde auf diese Weise bestimmt. Anschließend wurde für jedes Paar der Wert für den rechten Oberschenkel in Verhältnis zum Steifigkeitswert des linken Oberschenkels gesetzt, um so den interindividuellen Unterschieden der Knochensteifigkeit gerecht zu werden.

3.7 Histologische Auswertung

Mit Hilfe der Histologie war es möglich die Frakturheilung morphologisch zu beurteilen. Dazu wurden die Knochen nach der biomechanischen Testung in Zink- Fixativ (BD Pharmingen, San Diego, USA) für 24 h fixiert. Dann erfolgte eine vierwöchige Entkalkung in 10%iger EDTA- Lösung bei 4°C. Die entkalkten Knochen wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils eine Stunde mit 70 %, 80 %, 90 %, sowie viermal eine Stunde mit 100 % Alkohol) entwässert. Im Anschluss wurden die Proben dreimal für jeweils eine Stunde mit Xylol behandelt, um das Gewebe paraffingängig zu machen. Abschließend wurden die Proben über den Zeitraum von einer Stunde in heißem Paraffin eingebettet.

Im weiteren Verlauf wurden 5 µm dicke Schnittpräparate im Bereich des maximalen Kallusdurchmessers in longitudinaler Schnittrichtung angefertigt und nach der Masson-Goldner- Methode gefärbt. Hierzu wurden die Proben zunächst 1-2 Minuten in Weigert's Eisenhämatoxylin gefärbt, 10-15 Minuten unter fließendem Wasser gespült und anschließend weitere 5-7 Minuten in Ponceau- Säurefuchsin- Azophloxin gefärbt. Nach Spülung mit 1 % Essigsäure erfolgte die Behandlung mit Molybdätophosphorsäure-Orange bzw. Wolframatophosphorsäure- Orange bis zur völligen Entfärbung des Bindegewebes. Nach erneuter Spülung mit 1 % Essigsäure wurden die Präparate mit Lichtgrün für fünf Minuten gegengefärbt und abschließend mit 1 % Essigsäure für 5 Minuten ausgewaschen sowie in Isopropanol entwässert.

Die Digitalisierung der Präparate für die histologische Auswertung erfolgte mit einem Fotomikroskop (Olympus BX60, Zeiss Axio Cam, Carl Zeiss, Oberkochen) und passender Software (Axio Version 3.1) in 1,25- facher Vergrößerung. Folgende Messwerte werden in Anlehnung an die Empfehlung der amerikanischen Gesellschaft für „Bone and Mineral Research“ bestimmt (PARFITT et al., 1987):

- Der Quotient Kallusdurchmesser/ Femurdurchmesser (Kd./Fd. [%]).
- Die periostale Kallusfläche (PCA) [mm²].
- Der prozentuale Anteil an Knochen, Knorpel und Bindegewebe im periostalen Kallus [%].

Die periostale Kallusfläche definierte sich als Fläche 2 mm proximal und distal der Osteotomie in axialer Richtung und radial begrenzt durch die Außengrenzen des Kallus.

3.8 Statistische Auswertung

Einfache statistische Auswertungen und Berechnungen wie die Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen wurden mit Microsoft® Excel (Windows) durchgeführt. Komplexere Auswertungen und Signifikanzbestimmungen erfolgten mit Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). Die analysierten Daten in den einzelnen Tests wurden auf ihre Normalverteilung hin untersucht. Bei Normalverteilung (normality

test $\alpha = 0,05$) wurden parametrische Tests zur Signifikanzbestimmung verwendet, d.h. bei zwei Variablen der t- Test für verbundene oder unverbundene Stichproben, bei drei Variablen der ANOVA- Test, post test Newman-Keul. Das Signifikanzniveau wurde mit 5% festgelegt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Systemische Parameter

4.1.1 Körpergewicht der Mäuse

Das präoperative Gewicht der Mäuse unterschied sich nicht vom Gewicht bei Versuchsende. Es fand sich ebenfalls kein signifikanter Gewichtsunterschied zwischen Kontrolltieren und Membran- Tieren. Lediglich zu Beginn der Gruppen mit 10 Wochen Standzeit lag ein signifikanter Gewichtsunterschied vor ($p < 0,01$). Am Ende des Analysezeitraumes gab es hier jedoch keinen signifikanten Unterschied mehr (s. Tab. 1).

Weder die Operation selbst, noch die PTFE - Membran zeigten demnach einen signifikanten Einfluss auf die Gewichtsentwicklung.

Standzeit, [Wochen]	OP- Modus	prä- OP	Ende	p- Wert
2 W.	Kontrolle	33,71 ± 1,25	33,57 ± 1,62 n=7	n.s.
2 W.	PTFE- Membran	32,63 ± 0,53	31,75 ± 0,75 n=8	n.s.
5 W.	Kontrolle	33,25 ± 0,84	33,63 ± 0,84 n=8	n.s.
5 W.	PTFE- Membran	33,25 ± 1,09	34,38 ± 1,15 n=8	n.s.
10 W.	Kontrolle	35,29 ± 0,47**	36,00 ± 0,79 n=8	n.s.
10 W.	PTFE- Membran	33,29 ± 0,36	35,00 ± 0,87 n=7	n.s.

Tab. 1: Gewicht [g] der Mäuse vor Operation und bei Versuchsabschluss nach 2, 5 und 10 Wochen. Mittelwert ± SF. Anzahl (n) Versuchstiere pro Gruppe. Statistik: t-test für verbundene Stichproben.
** $p < 0,01$ - signifikanter Gewichtsunterschied zwischen PTFE und Kontrolltieren.

Zwei der 48 Versuchstiere verstarben jeweils ein bzw zwei Tage postoperativ in der Tierhaltungsquarantäne. Die Ursache ist nicht bekannt. Dies entspricht einem Ausfall von 4,17 %. Ein Ausfall aufgrund von intraoperativen Komplikationen bestand nicht.

4.2 Radiologie

In Abbildung 6 sind repräsentative Röntgenaufnahmen der Mäusefemora dargestellt. In der Kontrollgruppe kam es ab der 5. Woche zu einer radiologisch erkennbaren Kallusbildung in typischer spindelförmiger Weise um den Osteotomiespalt (Abb. 6 B). Der Kallus überbrückt den Osteotomiespalt nach 5 und 10 Wochen partiell (Abb. 6 B, C). In der Gruppe mit Membran kommt es nach 2, 5 und 10 Wochen zu keiner radiologisch erkennbaren Kallusbildung um den Osteotomiespalt. Es zeigt sich hier jedoch eine periostale Kallusreaktion proximal und distal der eingebrachten Membran mit angedeutetem Wachstum auf den Osteotomiespalt hin (Abb. 6 E, F).

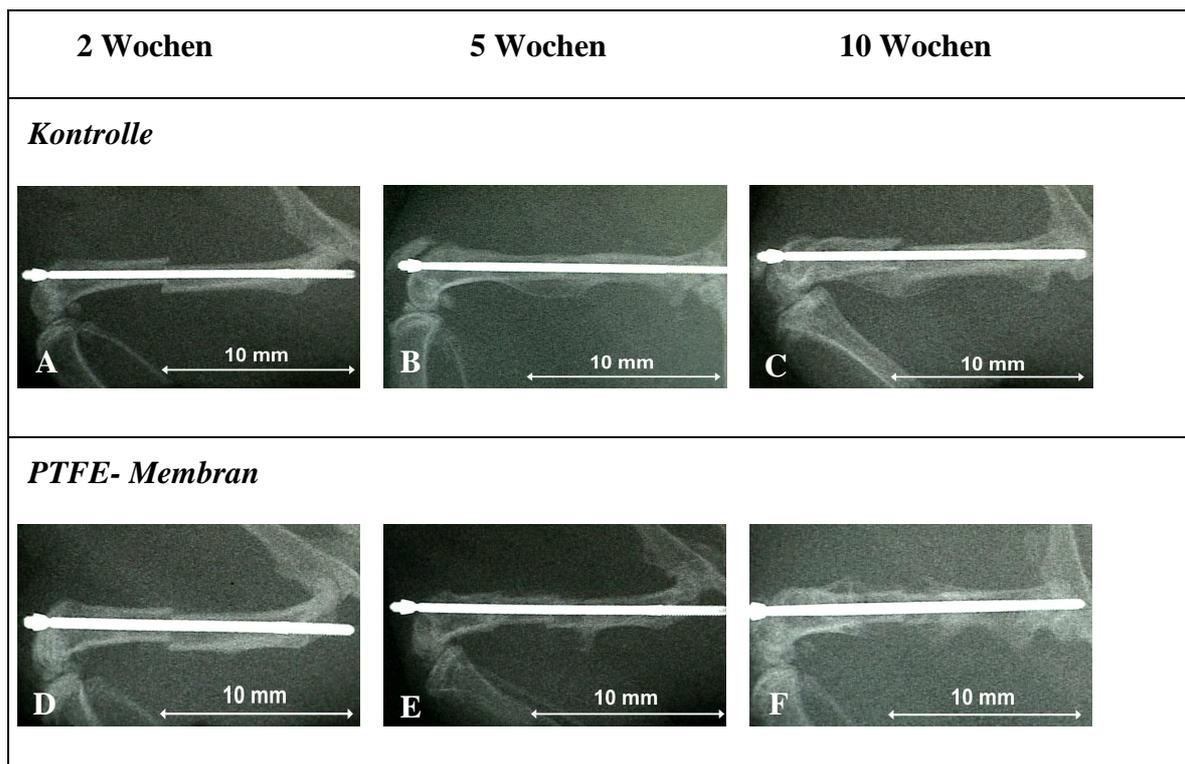


Abb. 6: Repräsentative Röntgenbilder der Femora 2, 5 und 10 Wochen nach Osteotomie; Kontrolle und PTFE- Membran. Die abgebildete intramedulläre Zugschraube hat eine Länge von 17 mm und einen Durchmesser von 0,5mm.

4.2.1 Kallus-/ Femurdurchmesser der radiologischen Auswertung

Nach zwei Wochen zeigte sich in beiden Gruppen keine radiologisch nachweisbare Kallusbildung (Abb. 7 A). Nach 5 und 10 Wochen kam es zu einem Anstieg des radiologischen Kallusdurchmessers in der Kontrollgruppe, welcher in der Membran-Gruppe nicht beobachtet wurde (Abb. 7 B und C).

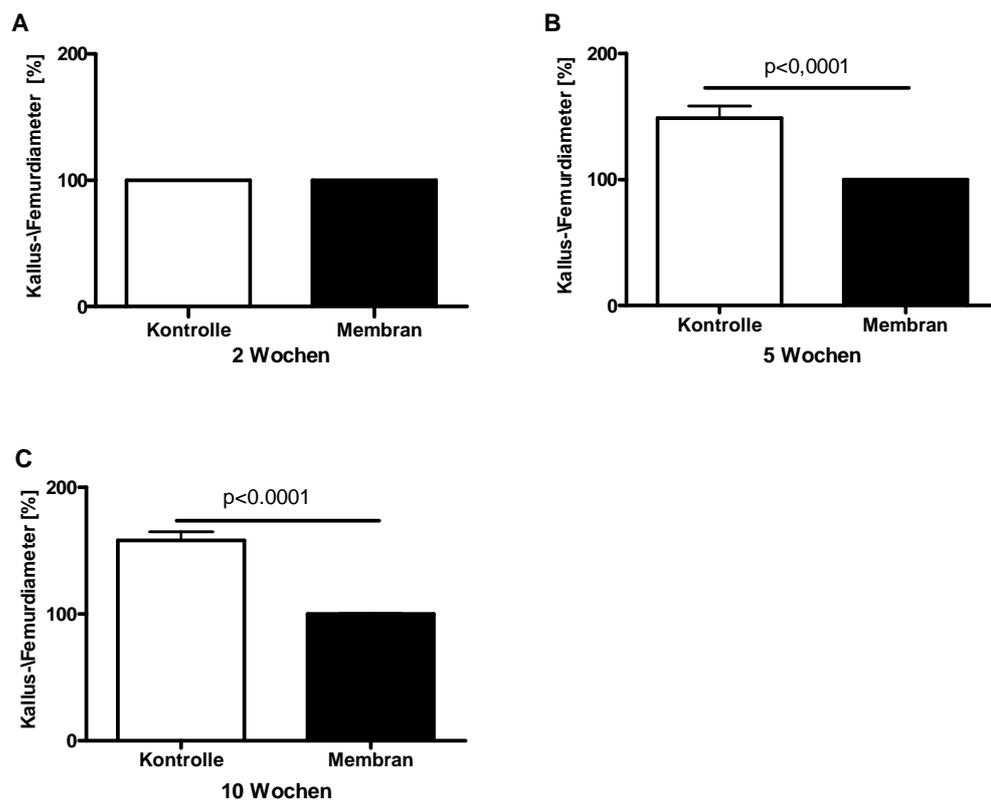


Abb. 7: Darstellung des Quotienten aus radiologischem Kallus- und Femurdurchmesser [%]. Mittelwert \pm SF. Statistischer Test: t-Test für unverbundene Stichproben.

4.2.2 Goldberg-Klassifikation

Nach 2 Wochen war weder die Membran- Gruppe, noch die Kontrollgruppe radiologisch geheilt. Nach 5 und 10 Wochen Analysezeitraum zeigte sich bei Tieren in der Kontrollgruppe eine bessere radiologische Heilung. Dies zeigte sich in einem jeweils signifikant höheren Goldberg-Score nach 5 ($0,50 \pm 0,16$ vs. $0,06 \pm 0,06$; $p < 0,05$) und 10 Wochen ($1,31 \pm 0,17$ vs. $0,14 \pm 0,14$; $p < 0,001$, s. Abb. 8 B, C).

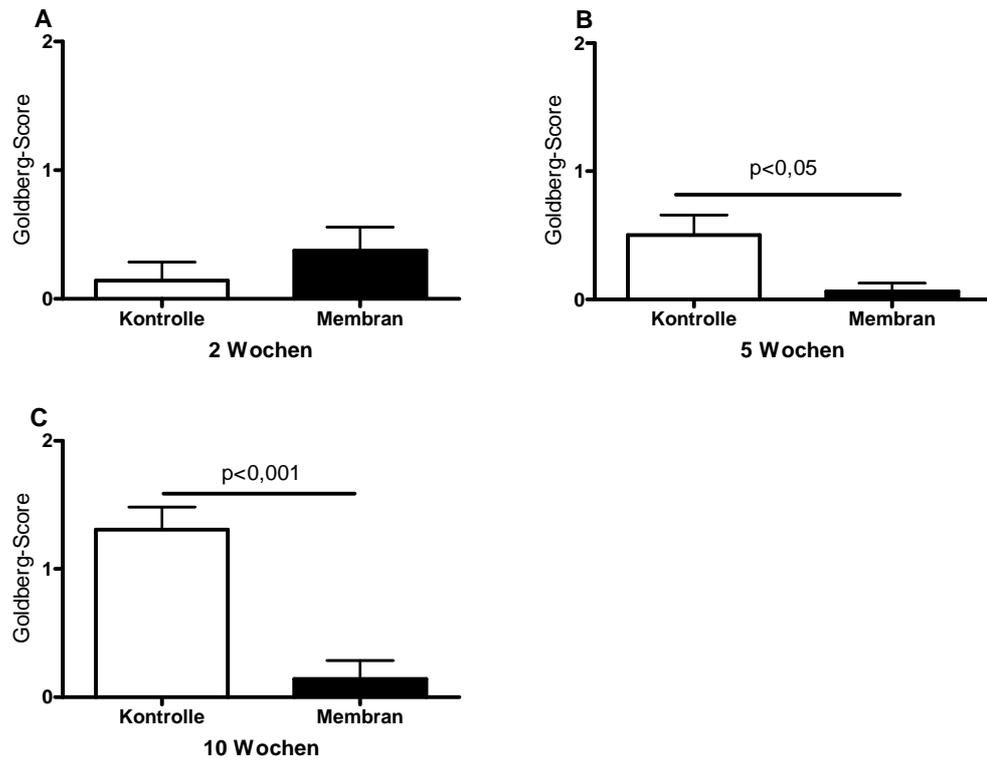


Abb. 8: Radiologische Auswertung der Frakturheilung nach der Goldberg-Klassifikation. Der Punktwert ist mit null Punkten für "nicht geheilt", einem Punkt für "potentiell geheilt" und zwei Punkte für "geheilt" angegeben. Mittelwert \pm SF. Statistischer Test: t- Test für unverbundene Stichproben.

4.3 Biomechanik

4.3.1 Biegesteifigkeit

Nach zwei Wochen konnten die explantierten Femora aufgrund des losen, bindegewebigen Zusammenhaltens keiner biomechanischen Untersuchung zugeführt werden.

Nach fünf Wochen zeigte sich in der Kontrollgruppe eine signifikant größere Biegesteifigkeit als in der Membran- Gruppe ($1,66 \pm 0,23$ vs. $0,35 \pm 0,21$; $p < 0,01$), (s. Abb. 9 A).

Auch nach zehn Wochen war die Biegesteifigkeit in der Kontrollgruppe signifikant größer, als in der Membran- Gruppe ($18,51 \pm 5,65$ vs. $1,305 \pm 0,39$; $p < 0,05$), (s. Abb. 9 B).

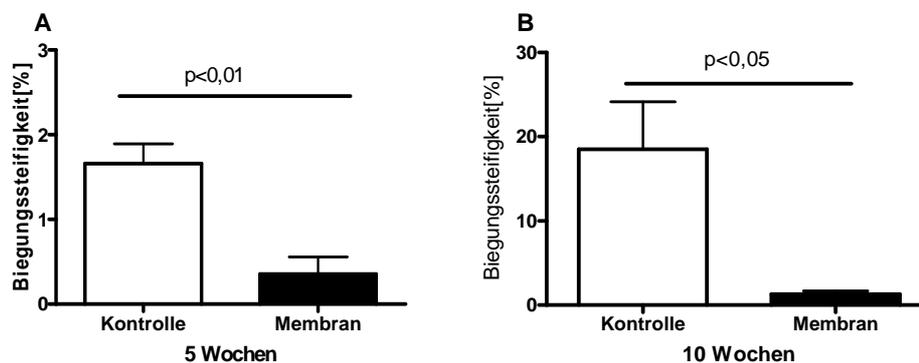


Abb. 9.: Biomechanische Auswertung der Frakturheilung. Die Biegesteifigkeit des osteotomierten Femur im prozentualen Verhältnis zur Biegesteifigkeit des kontralateralen Femur. Mittelwert \pm SF. Statistischer Test: t- Test für unverbundene Stichproben. Sowohl nach 5, als auch nach 10 Wochen ist die Biegesteifigkeit in der Kontrollgruppe signifikant größer, als in der Membran-Gruppe.

4.4 Histologie

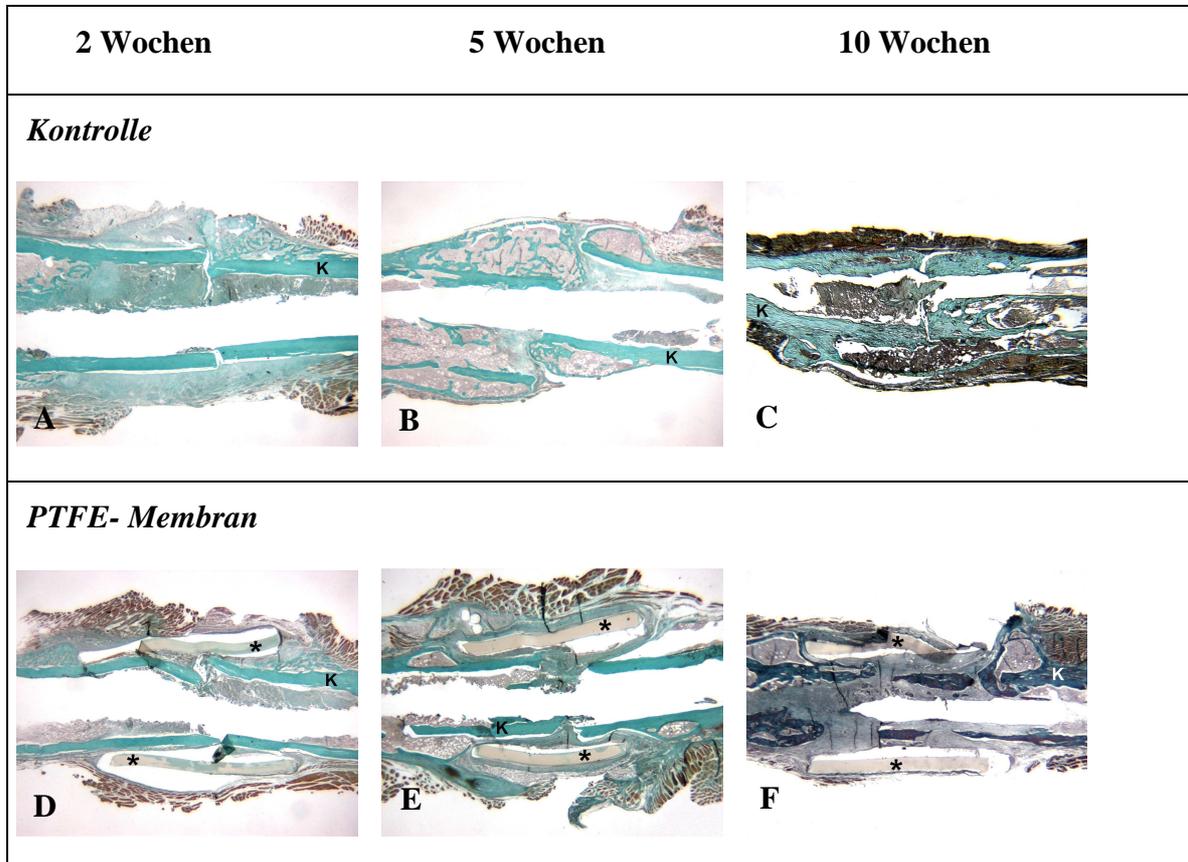


Abb.10: Darstellung histologischer Femurlängsschnitte (Masson- Goldner Färbung) der Kontroll- und der Membran-Gruppe 2, 5 und 10 Wochen postoperativ. In der Bildmitte ist jeweils die Osteotomie zu sehen. Knochengewebe (K) kommt grün zur Darstellung, die PTFE- Membran (*) ist ober- und unterhalb des Kortex längs geschnitten.

In Abbildung 10 sind repräsentative histologische Längsschnitte der Membran- Tiere und der Kontrollgruppe nach 2, 5 und 10 Wochen dargestellt. In der Bildmitte sind die dargestellten Kortices jeweils durch den Osteotomiespalt unterbrochen. In den Kontrolltieren ist eine deutliche periostale Kallusbildung zu erkennen, während bei den Membrantieren unterhalb der PTFE Membran so gut wie keine Kallusbildung zu beobachten ist (Abb. 10).

4.4.1 Periostale Kallusfläche (PCA)

Kontrolltiere zeigten sowohl nach 2 Wochen ($4,33 \pm 0,91 \text{ mm}^2$ vs. $0,14 \pm 0,09 \text{ mm}^2$; $p < 0,01$, s. Abb.11 A), 5 Wochen ($3,617 \pm 0,3770 \text{ mm}^2$ vs. $0,3092 \pm 0,1157 \text{ mm}^2$; $p < 0,0001$, s. Abb.11 B), als auch nach 10 Wochen ($2,789 \pm 0,3143 \text{ mm}^2$ vs. $1,439 \pm 0,1857 \text{ mm}^2$; $p < 0,01$, s. Abb.11 C) eine signifikant größere periostale Kallusfläche, als die entsprechenden Tiere der Membran- Gruppe. In den Kontrolltieren zeigte sich nach 2 Wochen ein Maximum in der periostalen Kallusfläche mit einem Rückgang nach 5 und 10 Wochen. Im Gegensatz hierzu zeigten die Tiere der Membran-Gruppe nach 2 Wochen die kleinste Kallusfläche mit einem sukzessiven Anstieg bis zur 10. Woche. Der Rückgang der PCA in den Kontrolltieren zeigte jedoch statistisch keine Signifikanz, wohingegen sich die Zunahme der PCA in der Membran- Gruppe als statistisch signifikant zeigte ($p < 0,001$) (Abb. 12).

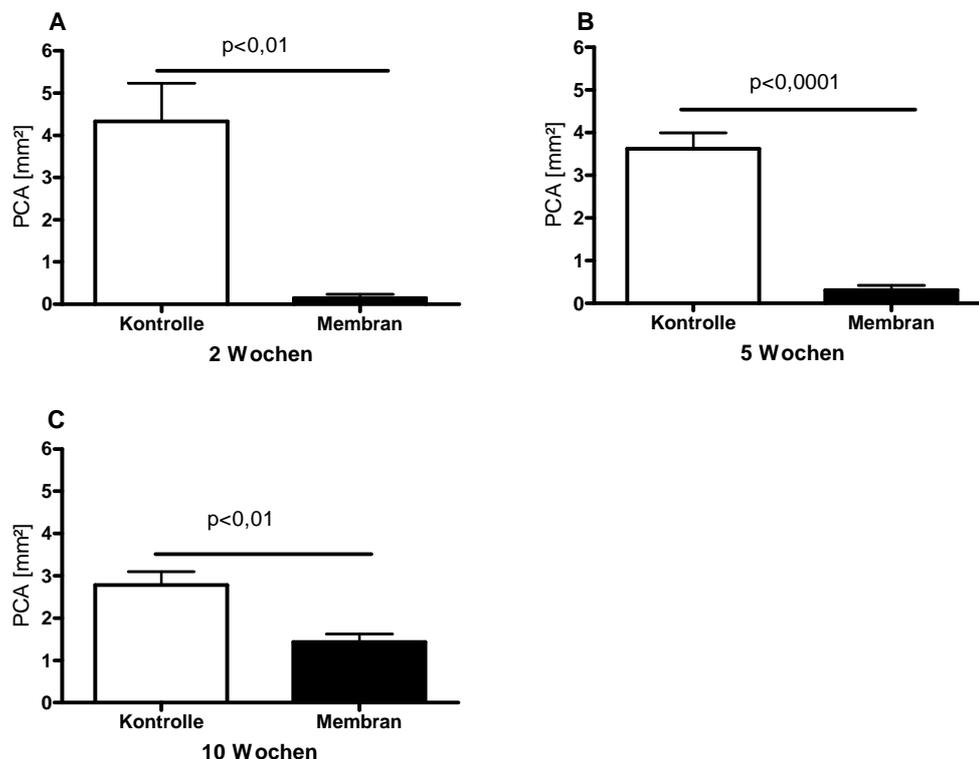


Abb.11: Größe der periostalen Kallusfläche (PCA) in mm^2 im histologischen Femurlängsschnitt (Mittelwert \pm SF). Zu jedem Analysezeitpunkt wurde in der Kontrollgruppe signifikant mehr Kallusgewebe gebildet, als in der Membran- Gruppe. Statistischer Test: T-Test für unverbundene Stichproben.

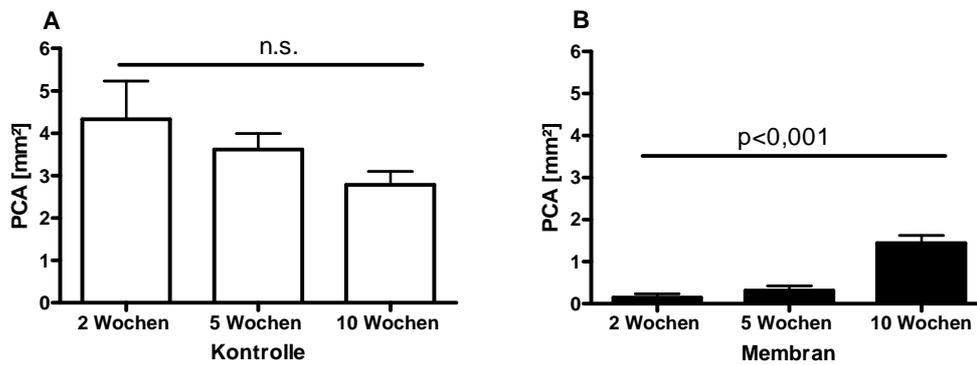


Abb.12: Größe der periostalen Kallusfläche (PCA) in mm² im Zeitverlauf (Mittelwert± SF). In den Kontrolltieren ist die Verkleinerung der PCA im Zeitverlauf nicht signifikant, wohingegen die Zunahme derselben bei den Membran- Tieren mit p<0,001 statistisch hochsignifikant ist. Statistischer Test: One way -ANOVA, post test.

4.4.2 Periostaler Kallusdurchmesser

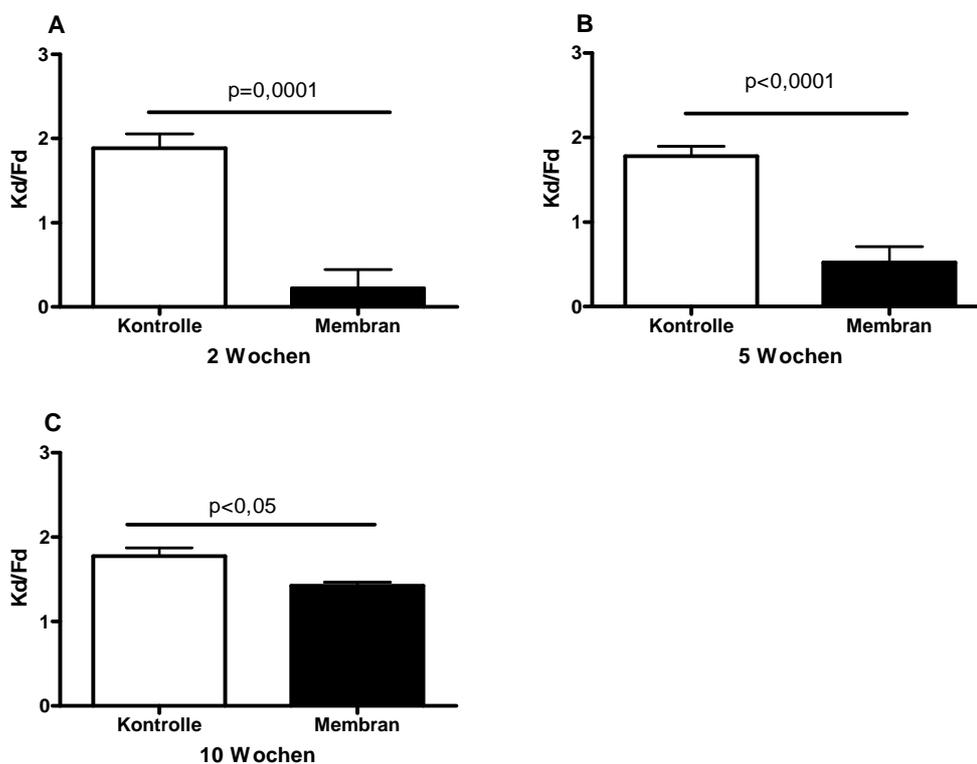


Abb.13: Darstellung des Quotienten aus Kallusdurchmesser/ Femurdurchmesser als Verhältniszahl im histologischen Femurlängsschnitt. Mittelwerte+ SF.

Kontrolltiere zeigten sowohl nach 2 Wochen ($1,89 \pm 0,17$ vs. $0,22 \pm 0,22$; $p=0,0001$) (s.Abb.13 A), 5 Wochen ($1,78 \pm 0,12$ vs. $0,52 \pm 0,19$; $p<0,0001$, s.Abb.13 B), als auch nach 10 Wochen ($1,78 \pm 0,09$ vs. $1,42 \pm 0,04$; $p=0,018$, s. Abb.13 C) einen signifikant größeren Quotienten aus Kallusdurchmesser und Femurdurchmesser, als die entsprechenden Tiere der Membran- Gruppe. In den Kontrolltieren war dieser Quotient nach 2 Wochen am größten mit einem Rückgang nach 5 und 10 Wochen. Im Gegensatz hierzu war der Wert in der Membran- Gruppe nach 2 Wochen am geringsten mit einem sukzessiven Anstieg bis zur 10. Woche. Die Verkleinerung des Kd/ Fd- Quotienten in den Kontrolltieren ist statistisch nicht signifikant, wohingegen seine Zunahme in der Membran- Gruppe eine Signifikanz ($p<0,01$) aufweist (s. Abb. 14 A, B). Zu allen Zeitpunkten war das Verhältnis von Kallus- zu Femurdurchmesser in der Membran- Gruppe signifikant geringer, als in der Kontrollgruppe (s. Abb. 13 A, B, C).

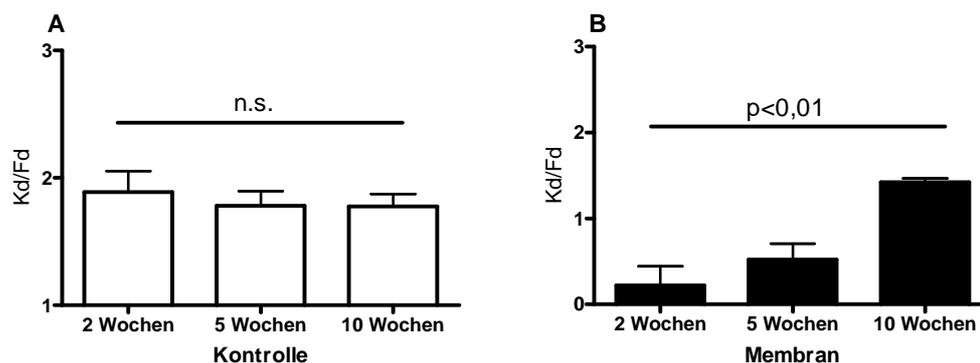


Abb. 14: Quotient aus Kallusdurchmesser und Femurdurchmesser (Kd/Fd) im Zeitverlauf (Mittelwert \pm SF). In den Kontrolltieren ist die Abnahme des Quotienten im Zeitverlauf nicht signifikant, wohingegen seine Zunahme bei den Membran- Tieren mit $p<0,01$ statistisch signifikant ist. Statistischer Test: One way- ANOVA, post test.

4.4.3 Prozentuale Gewebeanteile der PCA

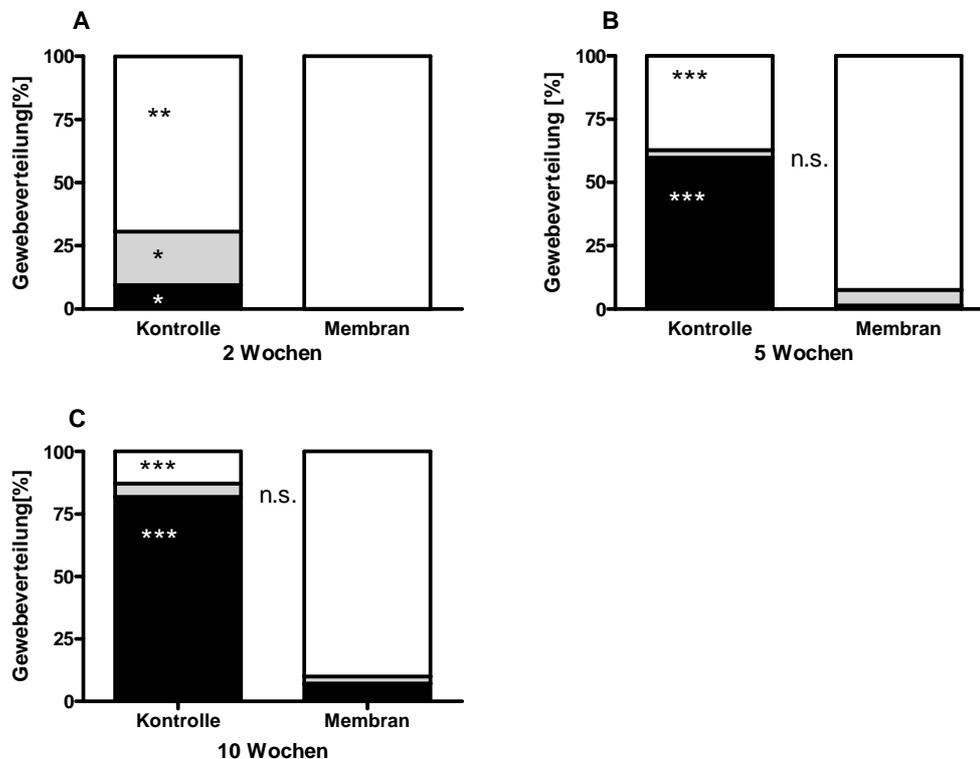


Abb.15: Darstellung der Gewebeanteile der periostalen Kallusfläche (PCA) in Prozent im histologischen Femurlängsschnitt. Es sind die Mittelwerte des Anteils der jeweiligen Gewebeart dargestellt. Das Knochengewebe kommt schwarz zur Darstellung, Knorpel grau und Bindegewebe weiß.(ns.= nicht signifikant, * steht für $p < 0,05$, ** für $p < 0,001$, *** für $p < 0,0001$). Statistischer Test: t-Test für unverbundene Stichproben.

Nach zwei Wochen bestand der Kallus unter der PTFE- Membran aus signifikant weniger Knochen ($0,16 \pm 0,16$ % vs. $9,47 \pm 2,64$ %; $p < 0,05$), signifikant weniger Knorpel ($0,04 \pm 0,04$ % vs. $21,15 \pm 5,81$ %; $p < 0,05$) und signifikant mehr Bindegewebe ($99,80 \pm 0,20$ % vs. $69,39 \pm 6,24$ %; $p < 0,01$) als in der Kontrollgruppe. Der Kallus bestand zu diesem Zeitpunkt vorwiegend aus Bindegewebe sowohl in der Kontroll-, als auch in der Membran- Gruppe (s. Abb. 15 A).

Nach 5 Wochen kam es in der Kontroll- Gruppe zu einem signifikanten Anstieg des Knochenanteils im Kallus im Vergleich zur Membran- Gruppe ($1,49 \pm 1,49$ % vs. $59,81 \pm 5,24$ %; $p < 0,0001$). Zu diesem Zeitpunkt war der Anteil von Knorpel im Kallus bei den

Kontrolltieren tendenziell kleiner, als bei Tieren der Membran-Gruppe ($2,97 \pm 1,29$ % vs. $6,04 \pm 4,13$ %; $p = \text{n. s.}$).

Der Bindegewebsanteil unter der Membran war hochsignifikant größer, als in der Kontrollgruppe ($92,46 \pm 4,93$ % vs. $37,21 \pm 5,36$ %; $p < 0,0001$, s. Abb. 15 B).

Nach 10 Wochen war der Knochenanteil in der Kontrollgruppe ebenfalls signifikant größer als in der Membran- Gruppe ($7,17 \pm 4,18$ % vs. $81,90 \pm 4,70$; $p < 0,0001$), der Bindegewebsanteil signifikant kleiner ($89,97 \pm 4,53$ % vs. $12,70 \pm 4,70$ %; $p < 0,0001$). Es zeigte sich nun in Tieren der Membran-Gruppe tendenziell weniger Knorpel unter der Membran als in den Kontroll-Tieren ($2,86 \pm 1,78$ % vs. $5,41 \pm 3,10$ %; $p = \text{n.s.}$, s. Abb. 15 C).

5 DISKUSSION

5.1 Tiermodell

Aufgrund der Verfügbarkeit von transgenen Tieren und Knockout- Zuchtstämmen, sowie der großen Anzahl molekularbiologischer Werkzeuge (Primer, spezifische Antikörper, etc.) ist die Maus besonders geeignet zur Erforschung molekularer Abläufe während der Frakturheilung. Daher entschieden wir uns in der vorliegenden Studie für dieses Versuchstier zur Entwicklung eines Tiermodells zur Untersuchung der Rolle eines Weichteilschadens bei der Frakturheilung.

Damit ein Tiermodell wissenschaftlichen und ethischen Ansprüchen genügt, wurden von einer Arbeitsgruppe um Auer et al. im Jahre 2007 zehn „goldene Regeln“ formuliert (AUER et al., 2007).

1. „Es sollte ein durchdachtes Studiendesign vorliegen, um zu wissenschaftlich validen Aussagen gelangen zu können.“ Dies ist in der vorliegenden Arbeit gegeben. Nach 2, 5 und 10 Wochen wurde die Frakturheilung durch Separierung von Muskulatur und Knochen, sowie entsprechender Kontrollgruppe standardisiert histologisch, radiologisch und biomechanisch untersucht. Das große klinische Problem der Pseudarthrosen und der sozioökonomische Effekt in der Humanmedizin rechtfertigen die Tierversuche und die Projektkosten.
2. „Die Ausfall- und Sterbequote soll höchstens fünf bis zehn Prozent betragen.“ In der vorliegenden Arbeit wurde die Mindestanforderung an die Ausfallquote mit 4,8% sogar noch unterschritten und entspricht demnach den von Auer et al. gestellten Anforderungen.
3. „Definierte Studienendpunkte sowohl für das Leid der Tiere, als auch für den wissenschaftlichen Nutzen sollten vorliegen.“ Auch dies ist in dieser Arbeit gegeben. Mit 2 Wochen wurde ein früher Untersuchungszeitpunkt zur Beurteilung der Kallusbildung gewählt. Der Untersuchungszeitpunkt nach 5 Wochen wurde zur Beurteilung der knöchernen Überbrückung der Fraktur gewählt. Nach 10 Wochen

ist die Frakturheilung in der Maus normalerweise abgeschlossen, so dass zu diesem Zeitpunkt das Remodeling beurteilt werden sollte.

4. „Über die angewandten Materialien und Methoden sollten genügend Daten zur Verfügung stehen, um valide Ergebnisse zu gewährleisten.“ Innerhalb der Arbeitsgruppe sind die hier verwendeten Techniken ausreichend etabliert (HOLSTEIN et al., 2007; GARCIA et al., 2008).
5. „Potentiellen Störfaktoren auf die Studienergebnisse sollte Rechnung getragen werden: Genetik der Tiere, jahreszeitliche, hormonelle, histologische und biomechanische Variablen sowie der Einfluss verschiedener Körpergrößen der Versuchstiere.“ Die in der vorliegenden Arbeit verwandten Versuchstiere hatten alle ein Alter von 9- 14 Wochen und ein Gewicht zwischen 30 und 40g. Der genetischen Standardisierung wurde durch ausschließliche Verwendung von CD-1-Mäusen Rechnung getragen. Durch jeweiligen Vergleich mit dem contralateralen, gesunden Femur in der biomechanischen, radiologischen und histologischen Auswertung wurden interindividuelle Unterschiede der Tiere weiter berücksichtigt. Da es sich ausschließlich um weibliche Mäuse handelte, kann auch von ähnlichen hormonellen Einflussgrößen ausgegangen werden, wobei jedoch nicht auf den Zyklus der Tiere eingegangen wurde.
6. „Eine suffiziente, postoperative Schmerztherapie und Nachsorgeuntersuchungen.“ Die Tiere erhielten postoperativ, nach 24 und nach 48 Stunden eine subkutane Applikation des Analgetikums Caprofen (Rimadyl, 6,5 mg/kg, Pfizer GmbH, Karlsruhe). Schon am ersten postoperativen Tag war die motorische Aktivität der Tiere weitestgehend normal, nach circa 5- 7 Tagen wurde das osteotomierte Bein beim Laufen wieder voll belastet.
7. „Das Führen von Studienprotokollen um einen gerechtfertigten (sinnvollen) Tierversuch zu gewährleisten.“ In der vorliegenden Arbeit wurde jede Operation handschriftlich protokolliert, und alle weiteren Daten wurden standardisiert erhoben.
8. „Vor Operationen an lebenden Tieren sollte der Operateur hinreichende chirurgische Fertigkeiten besitzen.“ Hier wurde die operative Handhabung zuerst

unter Aufsicht an mehreren toten Tieren trainiert. Dann wurde zum Erlernen des anästhetischen Vorgehens mit lebenden Pilot-Tieren der spätere Eingriff wiederholt eingeübt. Erst nach sicherer Beherrschung der Operationstechnik und des perioperativen Handlings wurde mit den Versuchstieren begonnen.

9. „Der Arbeit sollten Pilotstudien vorausgehen, um die Wertigkeit des Modells und seine spätere Aussagekraft zu steigern.“ Basierend auf zahlreichen vorangegangenen Frakturstudien in der Maus der Arbeitsgruppe (GARCIA et al., 2008; HOLSTEIN et al., 2009), unter anderem unter Verwendung der Mousescrew®, wurde das aktuelle Versuchsvorhaben geplant. Nach Durchführung einer Pilotserie wurde das Modell in der hier vorliegenden Arbeit etabliert.
10. „Es sollten Versuchsbedingungen dokumentiert sein, die von Internationalen Stiftungen (z.B. AO-Foundation, Schweiz), oder staatlichen Behörden zur Bewertung der Studie eingesehen werden können.“ Es sollte hier sukzessive ein international standardisiertes Vorgehen etabliert werden. Die Versuche wurden hier in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz und nach Genehmigung durch die Saar-Pfalz-Kreis-Kreispolizeibehörde durchgeführt, die Versuche wurden sämtlich dokumentiert. Die Entwicklung der Osteosynthesetechnik erfolgte in Zusammenarbeit mit der von Auer et al. Genannten AO Stiftung in der Schweiz.

Das hier entwickelte Frakturmodell erfüllt demnach alle von Auer et al. formulierten Kriterien für ein Frakturmodell im Kleintier (AUER et al., 2007). Es stellt ein standardisiertes und reproduzierbares Modell dar, welches nun in Folgeversuchen zur weiteren Untersuchung des Weichteilschadens auf die Frakturheilung verwendet werden kann.

Es existiert bis dato kein Femur- Mausmodell mit einer intramedullären Kompressionsschraube (die mit vergleichsweise geringem Aufwand implantiert werden kann) und offener Osteotomie. Holstein et al. frakturierten das Femur bei der erstmaligen Beschreibung der Mousescrew geschlossen (HOLSTEIN et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde im Gegensatz dazu erstmals diese Kompressionsschraube nach offener

Osteotomie implantiert. Dies bietet verschiedene Vorteile im Vergleich zur geschlossenen Fraktur.

So werden bei geschlossener Frakturierung immer unterschiedliche Frakturtypen erzeugt, was ein standardisiertes Vorgehen erschwert. Wird hingegen der Knochen offen osteotomiert, kann ein reproduzierbarer Defekt an gleicher Stelle gesetzt werden.

Zudem ist bei einer offenen Osteotomie der Weichteilschaden im Gegensatz zur Verwendung einer Fallapparaturs vergleichsweise gering. Prinzipiell kann bei offenem Vorgehen auf unterschiedliche Weise ein Weichteilschaden erzeugt werden. Neben einem stumpfen Weichteiltrauma durch eine Fallapparaturs oder pneumatische Kraftausübung, können einzelne Muskeln mit definierter Kraft und Dauer gequetscht oder vollständig reseziert werden. Hier besteht jedoch jeweils das Problem der Standardisierung des Weichteilschadens, was durch die gute Regenerationsfähigkeit in der Maus zusätzlich erschwert wird. In der vorliegenden Arbeit entschieden wir uns für die maximale Form eines Weichteilschadens durch Einbringung einer mechanischen Barriere (PTFE-Membran) zwischen Knochen und Weichteile. Dieses Procedere ist gleichfalls nur bei offener Osteotomie möglich.

Die in der vorliegenden Arbeit verwandte MouseScrew® - Schraube bietet im Gegensatz zu vielen anderen Osteosynthesetechniken in der Maus eine rotations- und achsstable intramedulläre Fixation (HOLSTEIN et al., 2009). Da eine stabile Osteosynthesetechnik beim Menschen selbstverständlich ist und die mechanische Steifigkeit einer Osteosynthesetechnik selbst einen signifikanten Einfluss auf die Frakturheilung hat, sollte auch in Mausmodellen eine stabile Osteosynthese gefordert werden. Mit der Mousescrew® erfüllt das hier etablierte Modell zusätzlich zu den von Auer et al. aufgestellten Kriterien auch diesen Punkt.

5.2 Die PTFE - Membran

Die verwendete Membran besteht aus PTFE (Polytetrafluorethylen), einem Polymer, das chemisch sehr reaktionsträge ist und eine extrem glatte Oberfläche aufweist. Dieser thermoplastische Kunststoff nimmt durch seine besonderen Werkstoffeigenschaften im

Vergleich zu anderen Polymeren eine einzigartige Stellung ein. Er ist biologisch inert (SAUVAGE et al., 1971), wodurch er tierexperimentell (u.a. Verwendung in orofazialchirurgischen Studien an Ratten) (BARTEE, CARR, 1995) und klinisch Verwendung findet.

Die hier verwendete Membran findet derzeit v.a. als Barrierenmembran in der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie Anwendung. Man erwirkt hier eine klinisch geführte Knochenneubildung indem das Einwachsen von Weichgewebe durch die PTFE-Membran verhindert wird. Da diese wegen ihrer glatten Oberfläche nicht mit dem Gewebe verwächst, kann sie nach erfolgter Heilung schonend wieder entfernt werden (HAMMERLE et al., 2002).

In allen hier operierten Tieren zeigte die Membran eine gute Gewebsverträglichkeit, es trat kein Einwachsen von Granulationsgewebe in die Membran auf. Es kam in keinem Fall zu einer Infektion oder inflammatorischen Abstoßungsreaktion. Somit eignet sich das hier verwendete PTFE als bewährter Medizinwerkstoff bestens zur Separierung der Weichteile vom Knochen im Mausmodell.

Bereits 2008 wurde zeitgleich mit dem aktuellen Versuchsvorhaben von Harry et al. eine PTFE-Membran zur Trennung einer Fraktur vom Weichgewebe im Mausmodell eingesetzt. Dort wurden gleichfalls keinerlei Komplikationen in Verbindung mit der Membran beschrieben (HARRY et al., 2008). Ebenso verwendeten Utvåg et al. im Rattenmodell zur Gewebstrennung i. R. einer Frakturstudie eine PTFE- Membran, die keinerlei Komplikationen verursachte (UTVAG et al., 1998). Der Porendurchmesser der Membran beträgt $0,2\mu\text{m}$ und erlaubt somit keine Durchwanderung von Zellen oder Blutgefäßen. Inwieweit Makromoleküle die Membran durchwandern können ist nicht bekannt. Prinzipiell ist die Diffusion von Sauerstoff durch die Membran in Abhängigkeit von den Gasdrücken auf beiden Seiten der Barriere jedoch möglich (BOYCE, 1982).

5.3 Periostale Kallusbildung und Weichteilmantel

Tiere, welche mit der PTFE- Membran behandelt wurden, zeigten eine signifikant schlechtere Heilung nach 2, 5 und 10 Wochen. Dies imponierte in einer fast vollständig

ausbleibenden osteotomienahen, periostalen Kallusbildung unterhalb der PTFE- Membran. Dies ging einher mit einer geringeren biomechanischen Biegesteifigkeit nach 5 und nach 10 Wochen.

Dementsprechend muss unsere Nullhypothese verworfen und die Arbeitshypothese, dass es durch Separierung der Weichteile vom Knochen zu einer Verzögerung der Frakturheilung kommt, angenommen werden.

Auch vorherige Studien haben bereits die Rolle der Weichteile auf die Frakturheilung durch Trennung der Weichteile vom Knochen in verschiedenen anderen Spezies untersucht (JARRY L, 1967; UTVAG et al., 1998; MEINIG, 2002). Hierbei wurde einheitlich eine Verzögerung oder ein Ausbleiben der Frakturheilung beschrieben. Die zugrunde liegenden Mechanismen konnten bis dato jedoch noch nicht geklärt werden. Mögliche Mechanismen durch die die Muskulatur zur Frakturheilung beiträgt sind (i) Vaskularisierung des Kallus, (ii) Rekrutierung von Stammzellen aus der Muskulatur oder (iii) Expression von Wachstumsfaktoren durch die Muskulatur.

Stafford et al. untersuchten die Heilung von Osteotomien an der Kaninchentibia, wobei das Periost 2 cm distal und proximal der Osteotomie reseziert wurde. Die per Osteocalzin-Immunhistochemie gefärbten osteogenetischen Zellen des Kallus schienen hierbei ausschließlich von den Perioststümpfen ausgetreten zu sein, nicht jedoch vom Muskelgewebe in dem Bereich der Deperiostierung (STAFFORD et al., 1992). Diese Ergebnisse weisen zusammen mit anderen Studien (WHITESIDE et al., 1978; REYNDERS et al., 1999) darauf hin, dass die periostale Kallusbildung vornehmlich vom Periost ausgeht.

Bei den hier durchgeführten Versuchen wurde das Periost nicht reseziert und während der gesamten Operation geschont. Durch langsames Sägen und Spülen der Osteotomie sollten Gewebsschäden durch Reibungshitze und Austrocknung verhindert werden. Dennoch bildete sich unter der PTFE- Membran trotz intaktem Periost nur extrem wenig periostaler Kallus im Vergleich zu den Kontroll-Tieren. Dies deutet darauf hin, dass das Periost alleine nicht zu einer adäquaten Kallusbildung in der Lage ist. Wir gehen anhand unserer Ergebnisse vielmehr davon aus, dass eine Interaktion zwischen dem Muskelmantel und dem Knochen für die Bildung eines periostalen Kallus entscheidend sein könnte.

Bereits 1978 untersuchten Whiteside et al. den Einfluss einer extraperiostalen oder subperiostalen Dissektion auf die Frakturheilung. Hier heilten von den Tieren, bei denen zwischen Knochen und Periost die Gewebe voneinander getrennt wurden nach 21 Tagen 71%, im Gegensatz zu 7% in Tieren bei denen die Dissektion zwischen Periost und Muskel stattfand (WHITESIDE, LESKER, 1978). Auch diese Ergebnisse deuten darauf hin dass ein funktionelles Zusammenspiel zwischen Muskulatur und Periost für eine adäquate Frakturheilung erforderlich ist.

Unsere Ergebnisse sind auch in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Utvåg et al. in der Ratte (UTVAG et al., 1998). Utvåg et al. verwendeten eine Silikonmembran zur Separation des Muskelmantels vom Knochen und fanden ebenfalls eine signifikant verminderte Kallusbildung unterhalb der Membran im Vergleich zu entsprechenden Kontrolltieren ohne Membran. Im Gegensatz hierzu implantierten Harry et al. in der einzigen Studie zur Rolle des Weichteilschadens in der Maus eine PTFE Membran lediglich um 2/3 des Tibiaumfangs und führten zusätzlich eine Deperiostierung durch (HARRY et al., 2008). Wurde die PTFE Membran dorsal zwischen Muskulatur und Tibia implantiert, kam es auch hier zu einer signifikanten Verschlechterung der Frakturheilung. Erfolgte die Implantation jedoch ventral zwischen Haut/Faszie und Knochen (unter belassen des dorsalen Kontakts zwischen Muskulatur und Knochen) war diese Verschlechterung der Frakturheilung nicht mehr zu beobachten. Eine quantitative Bestimmung der periostalen Kallusbildung oder der Kalluszusammensetzung erfolgte jedoch nicht. Von besonderem Interesse wäre hier gewesen ob Harry et al. eine periostale Kallusreaktion im Bereich der gesamten Tibiazirkumferenz sahen oder lediglich im Bereich des einen Drittels welches nicht von der Membran umhüllt war. Insgesamt ergänzen sich die Ergebnisse unserer Studie und der von Harry et al., dennoch gibt es zwischen der Studie von Harry et al. und dem hier entwickelten Modell Unterschiede die es zu beachten gilt. Im Gegensatz zu Harry et al., welche einen einfachen intramedullären Pin verwendeten, erfolgte die Stabilisierung der Osteotomien in unserem Modell durch eine intramedulläre Zugschraube, welche im Vergleich zum einfachen, intramedullären Pin eine signifikant größere axiale und Rotationsstabilität besitzt (HOLSTEIN et al., 2009). Dies ist für die Beurteilung der Frakturheilung von entscheidender Bedeutung da auch während der Frakturheilung in der Maus die Gewebedifferenzierung durch die Stabilität der

Osteosynthese mitbestimmt wird (GARCIA et al., 2008). Auch im Hinblick auf die Übertragbarkeit zum Menschen spielt die Osteosynthesetechnik im Tierversuch eine bedeutende Rolle, da beim Menschen eine stabile Osteosynthese als Standard gilt. Im Gegensatz zu dem Modell von Harry et al., welches an der Tibia der Maus durchgeführt wurde, verwendeten wir in unserem Modell das Femur der Maus, welches zirkumferenziell von einem großen Muskelmantel umgeben ist. Des Weiteren wurde in unserem Modell das komplette Femur durch die PTFE- Membran von den Weichteilen getrennt, während in dem Modell von Harry et al. lediglich 2/3 des Tibiaumfangs von den Weichteilen separiert wurden.

Letztlich dienen beide Studien der Etablierung eines neuen Modells und geben keine direkten Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Mechanismen. Weitere Studien mit den beschriebenen Modellen sind hier erforderlich um das Zusammenspiel von Muskulatur und Knochenheilung weiter zu untersuchen.

5.4 Weichteile und Frakturheilung - mögliche Pathomechanismen

In der vorliegenden Arbeit wurde in beiden Gruppen, ob mit oder ohne Membran, im Vergleich zu anderen Frakturmodellen in der Maus relativ wenig Kallus gebildet. Auch war die biomechanische Stabilität der geheilten Knochen selbst in der Gruppe ohne Membran nach 10 Wochen im Vergleich mit anderen Frakturmodellen der Maus eher gering. Vor allem geschlossene Frakturmodelle zeigten schon nach 5 Wochen eine biomechanische Steifigkeit von 100% im Vergleich zum unfrakturierten, kontralateralen Femur (MANIGRASSO, O'CONNOR, 2004). Ein Grund für die tendenziell schlechtere Heilung unserer Kontrolltiere mag die offen durchgeführte Osteotomie sein mit Zugang zwischen Periost und Muskulatur. Whiteside et al. (WHITESIDE, LESKER, 1978) beschrieben bereits 1978, dass es durch Trennung dieser beiden Schichten zu einer Verzögerung der Frakturheilung kommt. Aber auch der chirurgische Zugang als solcher stellt einen Weichteilschaden dar, der die Frakturheilung negativ beeinflussen kann.

Park et al. vergleichen die Heilung offen osteotomierter oder geschlossen frakturierter Kaninchenknochen miteinander (PARK et al., 1999). Drei Tiere aus jeder Gruppe wurden 30 Minuten nach dem Eingriff zur makro- und mikroskopischen Beurteilung des Weichteilschadens und Hämatoms getötet. Die Ergebnisse zeigten, dass das Periost bei der Osteotomie (elektrische, oszillierende Säge) zerrissen wurde und sich zusammen zog, sodass kortikaler Knochen freilag. Bei den osteotomierten Tieren wurde ein großer Leerraum in der Markhöhle unterhalb der Osteotomie (Auswaschung), sowie ein von Muskelfaserrissen durchzogenes intramuskuläres Hämatom beobachtet. Im Gegensatz hierzu fand sich bei geschlossen durchgeführten Frakturen ein Hämatom zwischen Muskel und Knochen. Hier waren sowohl der Muskel, als auch das Periost nur minimal geschädigt. Das beträchtliche Frakturhämatom fand sich unter dem Periost und in der Markhöhle; intramuskulär lag kein Hämatom vor. Da gerade das Frakturhämatom eine entscheidende Rolle für eine erfolgreiche Frakturheilung spielt, könnte hier ein weiterer Grund für die von uns beobachtete schlechtere Heilung bei offener Osteotomie liegen. Im vorliegenden Modell wurde der Knochen sowohl während des Sägens, als auch anschließend gespült. Hierdurch und durch die geringe Blutung während der Operation durch eine schonende, intermuskuläre Präparation, bildete sich fast kein Hämatom im Frakturbereich aus. Somit fehlten wahrscheinlich auch für den späteren Frakturheilungsprozess die darin enthaltenen Wachstumsfaktoren (GRUNDNES, REIKERAS, 1993) und Stammzellen (WLODARSKI, 1990). Dies könnte in Übereinstimmung mit der Studie von Park et al. der Grund für die schlechtere Heilung im Vergleich zum geschlossenen Frakturmodell in der Maus sein.

Ein zerstörtes Periost ist bei der vorliegenden Arbeit als Grund für die schlechte Heilung unwahrscheinlich, da bewusst periostschonend operiert wurde. Die Knochenhaut wurde ständig feuchtgehalten und durch intermittierende Spülungen mit isotoner Kochsalzlösung gekühlt. Durch das manuelle osteotomieren ist die Gefahr thermischer Periostschäden, verglichen mit maschinellem Sägen, geringer.

Wie groß eine Durchblutungsstörung des Periosts ist und wann sie nach schwerwiegendem, geschlossenem Weichteiltrauma auftritt, ist nicht völlig geklärt. Es konnte allerdings in Ratten durch Intravitalmikroskopie gezeigt werden, dass schon ein alleiniges, geschlossenes Weichteiltrauma ohne Fraktur lang anhaltende Störungen der periostalen Mikrozirkulation nach sich zieht (SCHASER et al., 2003). Zudem kommt es zu

einer inflammatorischen Antwort auf die Schädigung mit endothelialer Dysfunktion (Kapillarleck), Gewebsödem und erhöhter Leukozytenanhaftung, die ihr Maximum 48h nach dem Trauma hat, aber auch nach sechs Wochen noch nachgewiesen werden kann (SCHASER et al., 2003). Diese Untersuchungen lassen darauf schließen, dass es durch eine offene Osteotomie zu einer Störung der Mikrozirkulation kommen kann, mit nachfolgender Beeinflussung der Frakturheilung.

Während wir ein standardisiertes Modell zur Untersuchung der Rolle des Weichteilschadens auf die Frakturheilung entwickeln konnten, bleiben jedoch ,wie in vorherigen Studien, die zugrunde liegenden Mechanismen unklar.

Ohne sich speziell auf das Periost zu fokussieren, untersuchte eine Ulmer Arbeitsgruppe an 52 Ratten die Revaskularisation bei einer geschlossenen Diaphysenfraktur mit und ohne Weichteilschaden (MELNYK et al., 2008). Der Weichteilschaden wurde nach geschlossener Frakturierung durch ein stumpfes Trauma erzeugt. Mit einer Laser- Doppler-Flussmessung wurde der Blutfluss im Bereich des Frakturspalts und der umgebenden Muskulatur untersucht. Die Untersuchung erfolgte direkt präoperativ, unmittelbar nach der Fraktur, sowie nach 1, 3, 7, 14 und 28 Tagen. Nach 28 Tagen erfolgte eine biomechanische Testung der Knochen, bei der sich kein Unterschied zwischen Tieren mit und ohne Weichteilschaden zeigte. Es fand sich des Weiteren kein Unterschied des Blutflusses im Bereich der Fraktur bei nur temporärer und milder Einschränkung des Blutflusses in der angrenzenden Muskulatur in Tieren mit Weichteilschaden im Vergleich zu Kontrolltieren. Das Ausmaß des Weichteilschadens war demnach für das Heilungspotential der Ratte nicht ausreichend um den Verlauf der Frakturheilung negativ zu beeinflussen. In dem beschriebenen Modell wurde die Verbindung zwischen Knochen/ Periost und umgebendem Weichteilmantel nicht gestört. Ein Weichteilschaden ohne Zerstörung der Verbindung zwischen Knochen und umgebender Muskulatur könnte demnach nur einen begrenzten Einfluss auf die Frakturheilung haben. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Utvåg et al., die 2003 zeigten, dass ein komplettes Entfernen (Resektion) des Muskels eine Heilungsstörung einer Fraktur in Ratten zur Folge hatte, wohingegen eine ausgedehnte Muskelquetschung mit nachfolgend erhaltenem Kontakt zur Fraktur die Knochenheilung nicht negativ beeinflusst (UTVAG et al., 2003).

Diese Studien zeigen alle, dass ein Kontakt zwischen Knochen/ Periost und umgebenden Weichteilen entscheidend ist für eine adäquate Frakturheilung. Die Mechanismen durch die dieser Kontakt die Frakturheilung fördert sind jedoch nicht bekannt. Verschiedene Studien haben gezeigt dass eine rasche und ausreichende Vaskularisierung für eine erfolgreiche Frakturheilung entscheidend ist (SCHASER et al., 2003; MELNYK et al., 2008). Lange wird schon angenommen, dass die Muskulatur eine wichtige Rolle in der Vaskularisierung der Fraktur spielt (RHINELANDER, 1974; TRUETA, 1974). Diese Annahme wurde unterstützt von Studien die zeigen konnten, dass es nach einem Weichteilschaden zu einer verminderten Vaskularisierung kommt (BYRD et al., 1981; RICHARDS et al., 1991). Die Untersuchungen zur Rolle der Muskulatur im Rahmen der Frakturheilung sind hier jedoch nicht einheitlich. Harry et al. untersuchten den Einfluss einer fasziokutanen im Vergleich zu einer muskulären Deckung einer Osteotomie auf den Verlauf der Frakturheilung und der begleitenden Vaskularisierung. Interassenterweise beobachteten sie eine signifikant verbesserte Frakturheilung in der Gruppe bei der die Osteotomie mit Muskulatur gedeckt war. Im Gegensatz hierzu fanden sie eine signifikant vermehrte Vaskularisierung in der Gruppe, wo die Osteotomie lediglich fasziokutan gedeckt war. Dementsprechend schließen die Autoren eine gesteigerte Vaskularisierung für die bessere Heilung nach muskulärer Deckung der Tibiaosteotomie aus.

Neben der ausreichenden Vaskularisierung ist eine suffiziente Rekrutierung von osteogenetischen Zellen für eine erfolgreiche Frakturheilung entscheidend. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Periostzellen während der Frühphase nach einer Fraktur BMPs synthetisieren (BOSTROM et al., 1995; CHENG et al., 2003). Man nimmt an, dass diese Wachstumsfaktoren Stammzellen anlocken und ihre osteogenetische Ausdifferenzierung induzieren. Eine Fülle an Daten lässt darauf schließen, dass mesenchymale Stammzellen außer im Periost auch in der umgebenden Muskulatur zu finden sind. Dies wird unterstützt von Studien die zeigen konnten, dass sowohl demineralisiertes Knochenmehl als auch aufgereinigte BMPs nach Injektion in Muskelgewebe die Bildung ektopen Knochens bewirken (IWATA et al., 2002). Andere Arbeiten haben gezeigt, dass verschiedene Myocyten- Vorläuferzellen die Fähigkeit haben, nach BMP- Applikation in chondrogene oder osteogene Zellen zu differenzieren (GERSTENFELD et al., 2002).

Die Membran-Tiere in der vorliegenden Arbeit zeigten einen signifikant kleineren Kallus unterhalb der Membran, welcher des Weiteren zu einem signifikant geringeren Anteil aus Knochen bestand. Die von uns verwendete PTFE Membran besitzt einen Porendurchmesser von $0,2\mu\text{m}$ und ist somit für Zellen undurchlässig. Hierdurch wäre eine potentielle Migration von Stammzellen oder osteogenen Vorläuferzellen von der Muskulatur zum Knochen/ Periost nicht mehr möglich, was ggf. die verminderte Kallus- und Knochenbildung erklären könnte. Detaillierte Studien zur Rolle von Stammzellen muskulären Ursprungs während der Frakturheilung liegen unseres Wissens keine vor.

Neben den zellulären Bestandteilen spielen biologische Signalstoffe eine wichtige Rolle während der Frakturheilung. Diese unterliegen komplexen, zeitlich und örtlich getrennten Mechanismen und sind noch unzureichend bekannt. V.a. Wachstumsfaktoren wie die Gruppe der BMPs oder proinflammatorische Cytokine wie der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) spielen während der Knochenheilung eine entscheidende Rolle. So führt das Fehlen von TNF- α -Signalen zu einer Hemmung sowohl der intramembranösen, als auch der enchondralen Knochenbildung, wie es in TNF- α -Rezeptoren- knock- out Tieren gezeigt werden konnte (GERSTENFELD et al., 2001). Auch in der Muskulatur wird im Rahmen der Frakturheilung neben verschiedenen anderen Botenstoffen TNF- α synthetisiert. Inwieweit verschiedene Signalmoleküle zwischen Muskulatur und Knochen/ Periost miteinander interagieren ist unzureichend bekannt. Sowohl die Muskulatur als auch das angrenzende Periost sind jedoch in der Lage, eine Vielzahl dieser Signalmoleküle zu synthetisieren, welche für eine erfolgreiche Frakturheilung erforderlich sind. Die meisten Signalmoleküle besitzen eine Masse von 20-100 kDa. Ob die verwendete PTFE-Membran mit einer Porengröße von $0,2\mu\text{m}$ für einzelne Signalmoleküle durchgängig ist, kann nicht gesagt werden, da neben der Porengröße die Ladung der Membran, die Ladung der Moleküle sowie der Filtrationsdruck eine entscheidende Rolle spielen. Zusammenfassend stellt die hier verwendete Membran dennoch eine Barriere dar, die auch die Interaktion zwischen Signalmolekülen des Periost und des Weichteilmantels hemmt.

5.5 Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein Mausmodell zur Untersuchung des Einflusses der Weichteile auf die Frakturheilung etabliert. Nach vollständiger und persistierender Separation der Fraktur vom angrenzenden Muskel mittels einer PTFE-Membran konnte die periostale Kallusbildung fast gänzlich inhibiert werden. Der Anteil an Knochen im Kallusgewebe war in der Gruppe mit PTFE-Membran signifikant erniedrigt bei erhöhtem Bindegewebsanteil. Dies war verbunden mit einer signifikant geringeren biomechanischen Belastbarkeit des heilenden Knochens zu allen Analysezeitpunkten in der Gruppe mit PTFE-Membran.

Offenbar waren weder das Periost alleine noch das Endost in der Lage, den funktionellen Verlust des Muskel-/ Weichteilmantels zu kompensieren. Da eine gestörte Frakturheilung, ggf. mit Ausbildung einer Pseudarthrose, ein großes klinisches Problem darstellt, ist die Erforschung der molekularen Mechanismen dieser Prozesse von großer Bedeutung.

Da das Genom der Maus vollständig entschlüsselt ist, können nun über die Zucht spezieller Knockout-Tiere oder die Anwendung molekularbiologischer Werkzeuge die Rolle des Muskel-/ Weichteilmantels auf die Frakturheilung untersucht werden. Des Weiteren können in dem verwendeten Modell neue Therapieansätze zur Stimulation der Frakturheilung bei fehlendem Weichteilmantel untersucht werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Auer JA, Goodship A, Arnoczky S, Pearce S, Price J, Claes L, von Rechenberg B, Hofmann-Antenbrinck M, Schneider E, Muller-Terpitz R, Thiele F, Rippe KP, Grainger DW (2007) Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. *BMC Musculoskelet Disord* 8:72
2. Bartee BK, Carr JA (1995) Evaluation of a high-density polytetrafluoroethylene (n-PTFE) membrane as a barrier material to facilitate guided bone regeneration in the rat mandible. *J Oral Implantol* 21:88-95
3. Bassett CA, Creighton DK, Stinchfield FE (1961) Contributions of endosteum, cortex, and soft tissues to osteogenesis. *Surg Gynecol Obstet* 112:145-152
4. Bonnarens F, Einhorn TA (1984) Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 2(1):97-101.
5. Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, Missri AA, Tomin E, Weiland A, Doty SB, Glaser D, Rosen VM (1995) Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* 13:357-367
6. Boyce (1982) Physical characteristics of expanded polytetrafluorethylene grafts. *Biological and synthetic vascular prosthesis*:551-562
7. Brinker MR, O'Connor DP (2004) The incidence of fractures and dislocations referred for orthopaedic services in a capitated population. *J Bone Joint Surg Am* 86-A:290-297
8. Brownlow HC, Simpson AH (2000) Metabolic activity of a new atrophic nonunion model in rabbits. *J Orthop Res* 18:438-442
9. Byrd HS, Cierny G, 3rd, Tebbetts JB (1981) The management of open tibial fractures with associated soft-tissue loss: external pin fixation with early flap coverage. *Plast Reconstr Surg* 68:73-82
10. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC (2003) Osteogenic

- activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 85-A:1544-1552
11. Cheung KM, Kaluarachi K, Andrew G, Lu W, Chan D, Cheah KS (2003) An externally fixed femoral fracture model for mice. *J Orthop Res* 21(4):685-690.
 12. Court-Brown CM, Hughes SP (1985) Hughes external fixator in treatment of tibial fractures. *J R Soc Med* 78:830-837
 13. Critchlow MA, Bland YS, Ashhurst DE (1995) The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit. *Bone* 16(5):521-527.
 14. Deibert MC, McLeod BR, Smith SD, Liboff AR (1994) Ion resonance electromagnetic field stimulation of fracture healing in rabbits with a fibular ostectomy. *J Orthop Res* 12(6):878-885.
 15. Einhorn T (1991) Mechanisms of fracture healing. *Hosp Pract (Off Ed)* 26 Suppl 1:41-45
 16. Einhorn TA (1995) Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am* 77:940-956
 17. Einhorn TA (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*:S7-21
 18. Einhorn TA (2005) The science of fracture healing. *J Orthop Trauma* 19:S4-6
 19. Furuya H (2007) [Prevention of perioperative pulmonary thromboembolism: summary]. *Masui* 56:808-809
 20. Garcia P, Holstein JH, Maier S, Schaumloffel H, Al-Marrawi F, Hannig M, Pohlemann T, Menger MD (2008) Development of a reliable non-union model in mice. *J Surg Res* 147:84-91
 21. Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Cruceta J, Graves BD, Einhorn TA (2001) Impaired intramembranous bone formation during bone repair in the absence of tumor necrosis factor-alpha signaling. *Cells Tissues Organs* 169:285-294
 22. Gerstenfeld LC, Cruceta J, Shea CM, Sampath K, Barnes GL, Einhorn TA (2002) Chondrocytes provide morphogenic signals that selectively induce osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* 17:221-230

23. Goldberg VM, Powell A, Shaffer JW, Zika J, Bos GD, Heiple KG (1985) Bone grafting: role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res* 3:389-404
24. Gomberg BF, Gruen GS, Smith WR, Spott M (1999) Outcomes in acute orthopaedic trauma: a review of 130,506 patients by age. *Injury* 30:431-437
25. Grundnes O, Reikeras O (1993) The importance of the hematoma for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 64:340-342
26. Gurgel B, Ribeiro F, Silva M, Nociti F, Sallum A, Sallum E, Toledo S, Casati MZ (2005) Selective COX-2 inhibitor reduces bone healing in bone defects. *Braz Oral Res* 19(4):312-316.
27. 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
28. Hammerle CH, Jung RE, Feloutzis A (2002) A systematic review of the survival of implants in bone sites augmented with barrier membranes (guided bone regeneration) in partially edentulous patients. *J Clin Periodontol* 29 Suppl 3:226-231; discussion 232-223
29. Harry LE, Sandison A, Paleolog EM, Hansen U, Pearse MF, Nanchahal J (2008) Comparison of the healing of open tibial fractures covered with either muscle or fasciocutaneous tissue in a murine model. *J Orthop Res* 26:1238-1244
30. Heino T, Chagin A, Takigawa M, Savendahl L (2008) Effects of alendronate and pamidronate on cultured rat metatarsal bones: failure to prevent dexamethasone-induced growth retardation. *Bone* 42(4):702-709.
31. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT (1993) A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res* 11:305-312
32. Holstein JH, Matthys R, Histing T, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Meier C, Pohlemann T, Menger MD (2009) Development of a Stable Closed Femoral Fracture Model in Mice. *J Surg Res* 153(1):71-75.
33. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T (2007) Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech* 40:215-219
34. Iwata H, Sakano S, Itoh T, Bauer TW (2002) Demineralized bone matrix and native bone morphogenetic protein in orthopaedic surgery. *Clin Orthop Relat Res*:99-109

35. Jarry L UH (1967) Über die Bedeutung des parostealen Gewebes in der Heilung diaphysärer Frakturen. *Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin*:179-188
36. Johnson AL, Stein LE (1988) Morphologic comparison of healing patterns in ethylene oxide-sterilized cortical allografts and untreated cortical autografts in the dog. *Am J Vet Res* 49(1):101-105.
37. Junqueira LC CL, R.O.K (2002) Knochen, Gratz M (ed) *Histologie* (Berlin, Springer).
38. Kettunen J, Makela EA, Turunen V, Suomalainen O, Partanen K (2002) Percutaneous bone grafting in the treatment of the delayed union and non-union of tibial fractures. *Injury* 33:239-245
39. Landry PS, Marino AA, Sadasivan KK, Albright JA (2000) Effect of soft-tissue trauma on the early periosteal response of bone to injury. *J Trauma* 48:479-483
40. Le AX, Miclau T, Hu D, Helms JA (2001) Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures. *J Orthop Res* 19:78-84
41. Manigrasso MB, O'Connor JP (2004) Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma* 18:687-695
42. MARKS S.C. OPR (2003) *Structure and development of the skeleton*, 2 edn (San Diego, Academic press).
43. Meinig RP (2002) Polylactide membranes in the treatment of segmental diaphyseal defects: animal model experiments in the rabbit radius, sheep tibia, Yucatan minipig radius, and goat tibia. *Injury* 33 Suppl 2:B58-65
44. Melnyk M, Henke T, Claes L, Augat P (2008) Revascularisation during fracture healing with soft tissue injury. *Arch Orthop Trauma Surg* 128:1159-1165
45. Michaud CM, McKenna MT, Begg S, Tomijima N, Majmudar M, Bulzacchelli MT, Ebrahim S, Ezzati M, Salomon JA, Kreiser JG, Hogan M, Murray CJ (2006) The burden of disease and injury in the United States 1996. *Popul Health Metr* 4:11
46. Nunamaker DM (1998) Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*:S56-65
47. Nunamaker DM, Richardson DW, Butterweck DM (1991) Mechanical and biological effects of plate luting. *J Orthop Trauma* 5(2):138-145.
48. Parfitt AM (2002) Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* 30:5-7

49. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987) Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2:595-610
50. Park SH, O'Connor K, Sung R, McKellop H, Sarmiento A (1999) Comparison of healing process in open osteotomy model and closed fracture model. *J Orthop Trauma* 13:114-120
51. Peter CP, Cook WO, Nunamaker DM, Provost MT, Seedor JG, Rodan GA (1996) Effect of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs. *J Orthop Res* 14(1):74-79.
52. Piirtola M, Vahlberg T, Isoaho R, Aarnio P, Kivela SL (2007) Incidence of fractures and changes over time among the aged in a Finnish municipality: a population-based 12-year follow-up. *Aging Clin Exp Res* 19:269-276
53. Puech B, Cameli M, Chancrin JL, Pierre C, Dufour M, Elizagaray A (1990) Biointegration of massive bone allografts: imaging and histological studies in cat. *Biomaterials* 11:75-78.
54. Rand JA, An KN, Chao EY, Kelly PJ (1981) A comparison of the effect of open intramedullary nailing and compression-plate fixation on fracture-site blood flow and fracture union. *J Bone Joint Surg Am* 63:427-442
55. Reynders P, Becker JH, Broos P (1999) Osteogenic ability of free periosteal autografts in tibial fractures with severe soft tissue damage: an experimental study. *J Orthop Trauma* 13:121-128
56. Rhinelander FW (1974) Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*:34-81
57. Richards RR, McKee MD, Paitich CB, Anderson GI, Bertioia JT (1991) A comparison of the effects of skin coverage and muscle flap coverage on the early strength of union at the site of osteotomy after devascularization of a segment of canine tibia. *J Bone Joint Surg Am* 73:1323-1330
58. Rossant J, Nagy A (1995) Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat Med* 1(6):592-594.
59. Sauvage LR, Berger K, Wood SJ, Nakagawa Y, Mansfield PB (1971) An external velour surface for porous arterial prostheses. *Surgery* 70:940-953

60. Schaser KD, Zhang L, Haas NP, Mittlmeier T, Duda G, Bail HJ (2003) Temporal profile of microvascular disturbances in rat tibial periosteum following closed soft tissue trauma. *Langenbecks Arch Surg* 388:323-330
61. Schemitsch EH, Kowalski MJ, Swiontkowski MF, Harrington RM (1995) Comparison of the effect of reamed and unreamed locked intramedullary nailing on blood flow in the callus and strength of union following fracture of the sheep tibia. *J Orthop Res* 13(3):382-389.
62. Schenk RK, Willenegger HR (1977) [Histology of primary bone healing: modifications and limits of recovery of gaps in relation to extent of the defect (author's transl)]. *Unfallheilkunde* 80:155-160
63. Schmidt J SI, Winker H (2008) [What role does soft tissue play in callus distraction? an animal experiment]. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie*:498-506
64. Stafford H, Oni OO, Hay J, Gregg PJ (1992) An investigation of the contribution of the extraosseous tissues to the diaphyseal fracture callus using a rabbit tibial fracture model and in situ immunocytochemical localisation of osteocalcin. *J Orthop Trauma* 6:190-194
65. Trueta J (1974) Blood supply and the rate of healing of tibial fractures. *Clin Orthop Relat Res*:11-26
66. Tytherleigh-Strong GM, Keating JF, Court-Brown CM (1997) Extra-articular fractures of the proximal tibial diaphysis: their epidemiology, management and outcome. *J R Coll Surg Edinb* 42:334-338
67. Utvag SE, Grundnes O, Reikeras O (1998) Effects of lesion between bone, periosteum and muscle on fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 69:177-180
68. Utvag SE, Grundnes O, Rindal DB, Reikeras O (2003) Influence of extensive muscle injury on fracture healing in rat tibia. *J Orthop Trauma* 17:430-435
69. Utvag SE, Iversen KB, Grundnes O, Reikeras O (2002) Poor muscle coverage delays fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 73:471-474
70. Volpon JB (1994) Nonunion using a canine model. *Arch Orthop Trauma Surg* 113(6):312-317.
71. Whiteside LA, Lesker PA (1978) The effects of extraperiosteal and subperiosteal dissection. II. On fracture healing. *J Bone Joint Surg Am* 60:26-30

72. Whiteside LA, Ogata K, Lesker P, Reynolds FC (1978) The acute effects of periosteal stripping and medullary reaming on regional bone blood flow. *Clin Orthop Relat Res*:266-272
73. Wildemann B, Schmidmaier G, Brenner N, Huning M, Stange R, Haas NP, Raschke M (2004) Quantification, localization, and expression of IGF-I and TGF-beta1 during growth factor-stimulated fracture healing. *Calcif Tissue Int* 74:388-397
74. Willie B, Adkins K, Zheng X, Simon U, Claes L (2009) Mechanical characterization of external fixator stiffness for a rat femoral fracture model. *J Orthop Res* 27(5):687-693.
75. Wlodarski KH (1990) Properties and origin of osteoblasts. *Clin Orthop Relat Res*:276-293
76. Yamagiwa H, Tokunaga K, Hayami T, Hatano H, Uchida M, Endo N, Takahashi HE (1999) Expression of metalloproteinase-13 (Collagenase-3) is induced during fracture healing in mice. *Bone* 25(2):197-203.