

---

Aus dem Bereich

Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. med. Tim Pohlemann

**Forcierte körperliche Aktivität steigert die  
Angiogenese während der Knochenheilung an der  
Maus**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2011

Vorgelegt von: Steven Christian Becker

geboren am: 24.09.1981 in Ottweiler

---

Dekan: \_\_\_\_\_

1. Gutachter: \_\_\_\_\_

2. Gutachter: \_\_\_\_\_

Jahr der Promotion: \_\_\_\_\_

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>4</b>
1.1 Zusammenfassung . . . . .	4
1.2 Summary . . . . .	6
<b>2 Einleitung</b>	<b>8</b>
2.1 Knochen . . . . .	8
2.1.1 Morphologie . . . . .	8
2.1.2 Histologie . . . . .	8
2.1.3 Physiologie . . . . .	13
2.2 Frakturheilung . . . . .	14
2.2.1 Primäre Frakturheilung . . . . .	14
2.2.2 Sekundäre Frakturheilung . . . . .	15
2.2.3 Einflussfaktoren auf die Knochenheilung . . . . .	18
2.3 Metabolische und regenerative Effekte physischer Aktivität . . . . .	23
2.4 Tiermodelle zur Knochenheilung und Angiogenese . . . . .	25
2.4.1 Maus . . . . .	26
2.4.2 Ratte . . . . .	27
2.4.3 Kaninchen . . . . .	28
2.4.4 Katze . . . . .	29
2.4.5 Hund . . . . .	29
2.4.6 Schaf . . . . .	30

2.5	Zielsetzung . . . . .	30
2.6	Fragestellung . . . . .	31
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>32</b>
3.1	Intervention . . . . .	32
3.1.1	Versuchsprotokoll . . . . .	32
3.1.2	Tiermodell . . . . .	33
3.1.3	Operation . . . . .	34
3.1.4	Lauftradtraining . . . . .	39
3.1.5	Intravitalmikroskopie . . . . .	40
3.1.6	Tötung der Tiere . . . . .	41
3.1.7	Präparation der Knochen . . . . .	41
3.2	Zielkriterien und Auswertung . . . . .	42
3.2.1	Intravitalmikroskopie . . . . .	42
3.2.2	Histomorphometrie . . . . .	43
3.2.3	Immunhistochemie . . . . .	44
3.3	Statistik . . . . .	45
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
4.1	Postoperativer Verlauf und Laufstrecke . . . . .	47
4.2	Makroskopischer Befund . . . . .	48
4.3	Intravitalmikroskopie . . . . .	49
4.4	Histomorphometrie . . . . .	57
4.5	Immunhistochemie . . . . .	60
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>61</b>
5.1	Diskussion der Methoden . . . . .	61
5.2	Diskussion der Ergebnisse . . . . .	66
5.3	Schlussfolgerungen . . . . .	70
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>71</b>

<b>7 Publikationen/Danksagung</b>	<b>84</b>
7.1 Publikationen . . . . .	84
7.2 Danksagung . . . . .	85
<b>8 Lebenslauf</b>	<b>87</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>90</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>93</b>

# Abkürzungsverzeichnis

$\mu\text{m}$ .....	Mikrometer
% .....	Prozent
” .....	Zoll
$\emptyset$ .....	Durchmesser
$^{\circ}\text{C}$ .....	Grad Celsius
Aa. ....	Arteriae
Abb. ....	Abbildung
ACTH .....	adrenocorticotropes Hormon
ANOVA .....	analysis of variance
ASBMR .....	American Society for Bone Mineral Research
ATP .....	Adenosintriphosphat
BMP .....	bone morphogenetic protein
BRU .....	bone remodelling unit
bzw. ....	beziehungsweise
ca. ....	circa
CCD .....	charge-coupled device
DAB .....	Diaminobenzidin

d	Tag(e)
DVD	digital versatile disc
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FGF	fibroblast growth factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IGF	insulin-like growth factor
IgG	Immunglobulin Klasse G
IVM	Intravitalmikroskopie
kg	Kilogramm
km	Kilometer
LS	Laufstrecke
M.	Musculus
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mm	Millimeter
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDGF	platelet derived growth factor
pH	pondus Hydrogenii
ROI	region of interest

r .....	Korrelationskoeffizient
s.o. ....	siehe oben
s. ....	siehe
s.u. ....	siehe unten
SEM .....	Standardfehler der Mittelwerte
sog. ....	sogeannter/-es/-e
STH .....	somatotropes Hormon
Tab. ....	Tabelle
TGF .....	transforming growth factor
u.a. ....	unter anderem
U/min. ....	Umdrehungen pro Minute
VEGF .....	vascular endothelial growth factor
vs. ....	versus
Vv. ....	Venae
W .....	Watt
z.B. ....	zum Beispiel

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Zusammenfassung

Die durchgeführten tierexperimentellen Studien hatten zum Ziel, den Einfluss gesteigerter physischer Aktivität auf die Angiogenese während der Knochenheilung in der Maus zu untersuchen.

Hierfür sollte ein geeignetes Tiermodell zur Analyse der Angiogenese während der Knochenheilung etabliert werden.

Die Angiogenese während der Knochenheilung wurde im Rahmen der durchgeführten Studien mit Hilfe eines neu etablierten Schädelfenster-Modells durch Intravitalmikroskopie (IVM) am Operationstag (Tag 0) sowie den postoperativen Tagen 3, 6, 9, 12, 15, 18 und 21 untersucht.

Für die Etablierung des Modells wurden histomorphometrische Untersuchungen an den postoperativen Tagen 3, 6, 9 und 15, sowie immunhistochemische Analysen an den Tagen 6, 9 und 15 vorgenommen, um Art und zeitlichen Verlauf der Knochenheilung zu evaluieren.

Die IVM-Untersuchungen wurden an Mäusen durchgeführt, welche in Käfigen gehalten wurden, die mit Laufrädern ausgestattet waren (Laufradgruppe; n=7), sowie an Mäusen, welche in Standardkäfigen ohne Laufrad gehalten wurden (Kontrollgruppe; n=7). Die Laufstrecke der Tiere der Laufradgruppe wurde mit Hilfe eines digitalen Tachometers gemessen.

Die Ergebnisse der IVM-Untersuchungen beider Gruppen wurden durch einen Student-t-Test verglichen. In der Laufradgruppe wurde zusätzlich eine Korrelationsanalyse (Pearson) zwischen Ergebnissen der IVM-Messungen und der Laufstrecke durchgeführt.

Die IVM- und histomorphometrischen Untersuchungen erbrachten folgende Ergebnisse:

1. Das entwickelte Schädelfenster-Modell bietet eine geeignete Methode, um die Angiogenese während der Knochenheilung in der Maus zu untersuchen.
2. Die histomorphometrischen Untersuchungen zeigten ein typisches Bild desmalen Knochenheilung mit Überbauung des Defektes am 9. Tag. Der neu gebildete Knochen war von einem Neo-Periost bedeckt, welches die intravitalmikroskopisch sichtbaren Gefäße enthielt.
3. Die Tiere der Laufradgruppe legten durchschnittlich eine Strecke von 3,6 km/d zurück. Die IVM-Analyse zeigte eine signifikant schnellere Abnahme der Knochendefektgröße in der Laufradgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe.
4. Die schnellere Abnahme der Knochendefektgröße war an den Tagen 9 und 12 mit einem signifikant höheren Blutgefäßdurchmesser bei Tieren der Laufradgruppe assoziiert.
5. In der Laufradgruppe zeigte sich am Tag 9 eine signifikante positive Korrelation zwischen Laufstrecke und Blutgefäßdichte im Defektareal ( $r=0,74$ ).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das neu etablierte Tiermodell eine geeignete Methode zur Untersuchung der Angiogenese während der desmalen Knochenheilung in der Maus darstellt.

Weiterhin lässt sich aus den durchgeführten Untersuchungen schließen, dass gesteigerte körperliche Aktivität die Knochendefektheilung beschleunigt und die Angiogenese während der Knochenheilung steigert.

## 1.2 Summary

The aim of the present study was to investigate the effect of physical exercise on angiogenesis during bone defect healing in mice.

For this purpose, we established a new model to analyze angiogenesis during bone defect healing in mice.

We evaluated angiogenesis during bone repair in a cranial bone window model by intravital fluorescence microscopy (IVM) at days 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 and 21.

In addition, we performed histomorphometric analyses at days 3, 6, 9 and 15 as well as immunohistochemical analyses at days 6, 9 and 15 to characterize the type and time course of bone repair.

IVM analyses were conducted in mice, which were housed in cages supplied with running wheels (exercise group; n=7) and in mice, which were housed in standard cages without running wheels (controls; n=7). The running distance of each animal in the exercise group was calculated by a digital rev counter.

Results of the IVM analyses were compared between the two groups by Student's-t-Test. In the exercise group, we additionally performed correlation analyses (Pearson) between results of the IVM and the running distance.

The IVM and histomorphometrical analyses revealed the following results:

1. The introduced cranial window model provides an appropriate tool to evaluate angiogenesis during intramembranous bone repair in mice.
2. Histomorphometry showed a typical pattern of intramembranous bone repair with osseous bridging of the defect at day 9. The newly woven bone was covered by a neo-periosteum containing the blood vessels which were visible by IVM.

3. Mice of the exercise group ran a mean distance of 3.6 km/d. IVM showed an accelerated decrease of bone defect area in the exercise group when compared to the control group.
4. The accelerated decrease of bone defect area was associated with a significantly higher blood vessel diameter in animals undergoing exercise at days 9 and 12.
5. In the exercise group, a significant positive correlation between running distance and blood vessel density could be observed at day 9 ( $r=0.74$ ).

In conclusion, we demonstrated that the introduced cranial window model provides a valuable method to evaluate angiogenesis during intramembranous bone repair in mice.

Furthermore, we conclude that physical exercise accelerates bone defect healing and stimulates angiogenesis during bone repair.

# 2 Einleitung

## 2.1 Knochen

### 2.1.1 Morphologie

Morphologisch unterscheidet man Knochen in:

- platte Knochen, ossa plana (z.B. Os ilium, Os parietale)
- kurze Knochen, ossa brevia (z.B. Os triquetrum, Os scaphoideum)
- lange Knochen, ossa longa (Röhrenknochen, z.B. Femur, Humerus)

(Welsch [117])

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden an platten Knochen durchgeführt.

### 2.1.2 Histologie

Knochen gliedert sich histologisch in zwei Gewebetypen:

- die äußere Substantia corticalis (Kompakta), aufgebaut aus kortikalem Knochen
- die innere Substantia spongiosa (Spongiosa), aufgebaut aus trabekulärem Knochen

(Welsch [117])

Die kleinste funktionelle Einheit der dichten Kompakta (Kortikalis) ist beim Menschen das Osteon (Havers-System). Hierbei handelt es sich um 4-20 konzentrisch um einen Zentralkanal (Canalis centralis) angeordnete Speziallamellen von 3-7  $\mu\text{m}$  Breite. Ein Osteon erreicht eine Ausdehnung von etwa 250  $\mu\text{m}$  x 1-5 cm. Der Durchmesser des Zentralkanals kann zwischen 20 und 100  $\mu\text{m}$  schwanken. Im Zentralkanal verlaufen Blutgefäße (Havers-Gefäße), welche den Gefäßnetzen des Periosts als Aa. nutritiae entspringen bzw. als Vv. nutritiae in sie münden. Die Havers-Gefäße sind über senkrecht zur Knochenoberfläche verlaufende Volkmann-Kanäle (Canales perforantes) untereinander verbunden. Neben Blutgefäßen finden sich im Zentralkanal Nerven und lockeres Bindegewebe. Zwischen den intakten Osteonen liegen Reste älterer, abgebauter Osteone, die so genannten Schaltlamellen. Als Generallamellen bezeichnet man jeweils mehrere Lamellen, welche als äußere Generallamellen unter dem Periost liegen und den ganzen Knochen umfassen. Innere Generallamellen hingegen grenzen an die Spongiosa, sind weniger zahlreich und weisen viele Unterbrechungen auf (Schiebler und Schmidt [97], Welsch [117]).

Im Gegensatz zum Menschen besitzt die Maus eine relativ primitive Knochenstruktur, in der das Havers-System fehlt. Nach einer Verletzung des Knochens erfolgt der Knochenumbau bei der Maus über so genannte Resorptionshöhlen, welche in der Umgebung des Knochendefektes entstehen und sich im Zuge der Knochenheilung mit Osteoblasten auffüllen (Nunamaker [78]).

Die Kortikalis wird mit Ausnahme der Knorpel tragenden Gelenkflächen von Periost überzogen. Funktionell wird das Periost in zwei Schichten unterteilt:

- Stratum fibrosum
- Stratum osteogenicum

Zwischen Stratum fibrosum und der Kortikalis besteht über Kollagenfaserbündel (Sharpey-Fasern) eine teils lockere, teils feste Verbindung. Die Zugbelastung, die am Ansatz von Bändern und Sehnen auf den Knochen wirkt, wird durch das Einstrahlen der Kollagenfasern der Bänder und Sehnen in das Stratum fibrosum verringert. Auftretende Zugkräfte werden somit auf eine größere Fläche verteilt (Schiebler und Schmidt [97]).

Im Stratum osteogenicum (Kambiumschicht) verlaufen kleine Gefäße und Kapillaren, welche mit den Volkmann- und Havers-Gefäßen in Verbindung stehen und somit wesentlich zur Ernährung der Knochensubstanz beitragen. Weiterhin finden sich sensible Nervenfasern in der Kambiumschicht, die Schmerzempfindungen im Bereich des Periosts vermitteln. Das Stratum osteogenicum spielt auch bei der Neubildung von Knochensubstanz eine Rolle, da hier während des Knochenwachstums eine Differenzierung der Osteoblasten stattfindet. Diese Differenzierung nimmt zwar zunächst nach Abschluss des physiologischen Knochenwachstums ab, setzt im Rahmen der Frakturheilung jedoch wieder ein (periostale Knochenneubildung) (Schiebler und Schmidt [97]).

Die Substantia spongiosa besteht aus einem dreidimensionalen System verzweigter Knochenbälkchen (Trabekel), zwischen denen Freiräume bestehen, in welchen sich Knochenmark oder Fettgewebe befindet. Die Ausrichtung der Trabekel orientiert sich an der größten auf den Knochen wirkenden Druck- bzw. Biegebeanspruchung. Auf diese Weise wird eine hohe mechanische Widerstandsfähigkeit mit vergleichsweise niedrigem Materialverbrauch und geringem Gewicht erreicht (Welsch [117]).

Das Knochenmark besteht aus von weiten Lücken durchzogenem retikulärem Bindegewebe und umfasst etwa 5 % des Körpergewichtes. In den Lücken des Bindegewebes beginnt ab dem 5.-6. Fetalmonat die Hämatopoese. Während beim Neugeborenen noch das gesamte Knochenmark an der Differenzierung von Blutzellen beteiligt ist, wird bereits nach Abschluss des ersten Lebensjahres in den langen Röhrenknochen das rote, blutbildende Knochenmark zunehmend durch gelbes, sogenanntes Fettmark ersetzt. Somit ist beim Erwachsenen die Hämatopoese im Wesentlichen auf kurze und platte Knochen begrenzt. Die beschriebene Degeneration des roten Knochenmarkes ist in besonderen Situationen, wie etwa bei chronischer Hypoxie und Anämie, reversibel (Boecker et al. [8], Welsch [117]).

Neben hämatopoetischen Zellen beinhaltet das Knochenmark Blutgefäße und Stroma. Im Stroma finden sich Osteoblasten, Retikulozyten, Makrophagen und Lipozyten. In der von den Retikulozyten gebildeten Matrix werden hämatopoetische Wachstumsfaktoren und Interleukine gebunden und in biologisch aktiver Form den hämatopoetischen Zellen

präsentiert. Die Blutgefäße (Knochenmarkssinus), welche die Matrix durchziehen, haben einen Durchmesser von etwa 50-75  $\mu\text{m}$ . Das Endothel ihrer Wand besitzt keine durchgehende Basallamina, sodass hier ausgereifte Blutzellen in das Sinuslumen übertreten können. Dazu bilden sich im Endothel vorübergehend wenige  $\mu\text{m}$  weite Poren (Migrationsporen), die sich unmittelbar nach Durchtritt einer Zelle wieder schließen (Boecker et al. [8], Welsch [117]).

Anhand der histologischen Struktur unterscheidet man zwei Arten von Knochengewebe:

- Geflecht- oder Faserknochen
- Lamellenknochen

Bei der Neubildung von Knochengewebe entsteht zunächst Geflechtknochen, der sich dann zu Lamellenknochen umstrukturiert (Welsch [117]).

Im Geflechtknochen liegen die Kollagenfasern in ungeordneter Form vor, histologisch zeigt sich ein Geflecht anastomosierender Knochenbälkchen. Das gefäßführende Bindegewebe zwischen den Knochenbälkchen wird als primäres Knochenmark bezeichnet. Im Geflechtknochen findet das Wachstum entlang der Kapillaren und nicht wie beim Lamellenknochen entlang mechanischer Kraftvektoren statt. Verglichen mit Lamellenknochen weist Geflechtknochen einen größeren Zellreichtum sowie eine diffusere Verteilung von Osteozyten und weniger anorganische Bestandteile auf (Junqueira et al. [56], Welsch [117]).

Die 3-7  $\mu\text{m}$  dicken Knochenlamellen (Speziallamellen) bestehen aus Osteozyten, welche in linsenförmigen Knochenhöhlen (Lakunen) der verkalkten Knochenmatrix liegen, und aus parallel verlaufenden, schraubenförmig angeordneten Kollagenfasern. Durch dieses Bauprinzip ist eine Anpassung der Struktur an auf den Knochen wirkende Zug- und Druckbelastungen möglich (Bucher und Wartenberg [15], Welsch [117]).

Im Bereich der Lakunen (Lacunae osseae) haben radiäre Knochenkanälchen (Canaliculi ossei) ihren Ursprung, welche bevorzugt so ausgerichtet sind, dass sie auf die äußere oder innere Oberfläche des Knochens zulaufen. Die Knochenkanälchen beinhalten Fortsätze der Osteozyten und stellen über benachbarte Osteone eine Verbindung zum Havers-Kanal

her. Über Knochenkanälchen und Fortsätze erfolgt die Ernährung der Osteozyten, da eine Diffusion von Nährstoffen durch die Matrix aufgrund der Kalzifizierung nicht möglich ist (Junqueira et al. [56], Welsch [117]).

Im Knochengewebe finden sich neben Osteozyten auch mesenchymale Vorläuferzellen (Osteoprogenitorzellen), Osteoblasten und Osteoklasten. Unter dem Einfluss hauptsächlich hormoneller Stimulation differenzieren die an der inneren und äußeren Knochenoberfläche sowie in den Havers-Kanälen liegenden Osteoprogenitorzellen über Präosteoblasten zu Osteoblasten. Auch im ausgewachsenen Organismus finden sich noch Osteoprogenitorzellen, die als schmale hellkernige Zellen im Endost und Periost lokalisiert sind. Bei struktureller Verletzung des Knochengewebes werden sie aktiviert und beginnen, sich zu Osteoblasten zu differenzieren (Junqueira et al. [56], Welsch [117]).

Osteoblasten sind die Matrix bildenden Zellen des wachsenden, aber auch des ausgereiften Knochens. In aktivem Zustand liegen sie epithelähnlich in kubischer oder prismatischer Form an der Oberfläche der Knochenbälkchen. Die gebildete Knochengrundsubstanz (Osteoid) wird unter Einwirkung der alkalischen Phosphatase mineralisiert. Dieser Prozess nimmt beim Menschen in der Spongiosa etwa 25, in der Kortikalis etwa 35 Tage in Anspruch. Auch beim Knochenabbau spielen Osteoblasten eine gewisse Rolle, indem sie den stets der Oberfläche der Matrix aufgelagerten Osteoidsaum abbauen können. Damit ermöglichen sie Osteoklasten den Zugang zur verkalkten Knochengrundsubstanz. Weiterhin besitzen Osteoblasten als einzige Knochenzellen Rezeptoren für Parathormon, unter dessen Wirkung die Knochenresorption eingeleitet wird. Nach Bindung von Parathormon produzieren Osteoblasten Enzyme zum Abbau von Osteoid sowie osteoklastenstimulierende Zytokine (Junqueira et al. [56], Welsch [117]).

Inaktive Osteoblasten liegen als stark abgeflachte Zellen mit wenigen Organellen als Knochendeckzellen (bone lining cells) der Knochenoberfläche auf. Sobald die Osteoblasten vollständig von Osteoid umschlossen sind, werden sie als Osteozyten bezeichnet (Schiebler und Schmidt [97], Welsch [117]).

Osteoklasten sind vielkernige, bis ca. 150  $\mu\text{m}$  große Riesenzellen, die von Monozyten (Makrophagen) abstammen. Im Gegensatz zu den übrigen Knochenzellen sind sie also nicht mesenchymalen Ursprungs, sondern differenzieren aus Vorläuferzellen der Hämatopoese. Sie dienen dem Abbau mineralisierter Knochengrundsubstanz. Neben zahlreichen Lysosomen finden sich in Osteoklasten heterophage Vakuolen, die oftmals Bruchstücke aufgenommener Kollagenfibrillen und Knochenkristalle enthalten. Osteoklasten liegen in Vertiefungen an der Oberfläche des abzubauenen Knochens (Howship-Lakunen) oder in der Kortikalis, in der sie Gefäßkanäle neu entstehender Osteone formen. Ein einzelner Osteoklast baut dieselbe Menge Knochen ab, die 100-150 Osteoblasten in der gleichen Zeit produzieren (Junqueira et al. [56], Schiebler und Schmidt [97], Welsch [117]).

Die Knochengrundsubstanz (Interzellulärsubstanz) besteht zu 65 % aus anorganischem und zu 35 % aus organischem Material. Dabei machen Kollagenfasern vom Typ I 95 % der organischen Bestandteile aus, die übrigen 5 % setzen sich aus verschiedenen Proteinen und Lipiden zusammen. Der anorganische Anteil der Interzellulärsubstanz besteht vor allem aus Knochenmineralien wie Calciumphosphaten und -carbonaten (Schiebler und Schmidt [97], Welsch [117]).

### 2.1.3 Physiologie

Die Hauptaufgaben des Knochens sind:

- Stützfunktion
- strukturelle Funktion
- Mobilitätsfunktion
- Calciumhomöostase

Um diese Funktionen gewährleisten zu können bedarf es sich ständig wiederholender Formations- und Resorptionsvorgänge, bei denen folgende Prozesse ablaufen:

- Wachstum
- Modelling
- Remodelling

Ort des Knochenwachstums sind die Epiphysenfugen, wobei die Anlagerung von neuem Knochengewebe fast ausschließlich auf der diaphysären Seite der Epiphysenfuge erfolgt. Neben einem Längenwachstum kommt es dabei auch zu einer Zunahme der Knochenmasse (Junqueira et al. [56], Welsch [117]).

Unter Modelling versteht man die Fähigkeit des Knochens, auf mechanische Beanspruchungen mit gezielter Formveränderung zu reagieren. Während diese Fähigkeit in der Wachstumsphase sehr stark ausgeprägt ist, nimmt sie mit zunehmendem Alter deutlich ab (Fleisch [29]).

Der Begriff Remodelling bezeichnet dynamische Umbauprozesse im Knochen, welche weder belastungsabhängig sind, noch zu einer Zunahme des Knochenvolumens führen. Im Zuge des lebenslang ablaufenden Remodelling werden u.a. Mikrofrakturen des Knochengewebes repariert. Das Gleichgewicht von Knochenresorption und parallel ablaufendem Anbau neuen Knochengewebes wird als Coupling bezeichnet. Die dazugehörige morphologische Struktur wird bone remodelling unit (BRU) genannt (Fleisch [29]).

## 2.2 Frakturheilung

### 2.2.1 Primäre Frakturheilung

Primäre Frakturheilung bezeichnet die Vereinigung von Frakturfragmenten ohne die Ausbildung einer äußeren Kallusmanschette. Gemessen an der absoluten Weite des Frakturspaltes (beim Menschen größer oder kleiner als 0,2 mm) unterscheidet man Spaltheilung und Kontaktheilung.

Die Knochenregeneration wird im Rahmen der Kontaktheilung durch longitudinal einwachsende Osteone vermittelt. Aktive Osteoklasten bilden dabei in der Kortikalis des gegenüber liegenden Fragmentes einen so genannten Resorptionskanal, welcher anschließend durch Osteoblasten unter Bildung neuen Lamellenknochens wieder aufgefüllt wird. Somit entsteht eine direkte Wiedervereinigung der Knochenfragmente (Rüter et al. [94]).

Im Rahmen der Spaltheilung erfolgt zunächst über einen Zeitraum von 3-4 Wochen die Auffüllung des Frakturspaltes mit Geflechtknochen. In einer zweiten Phase kommt es zum Umbau des neuen Knochengeflechtes zu Lamellenknochen, welcher parallel zur Schaftachse ausgerichtet ist (Rüter et al. [94]).

Neben ausreichender Vaskularisierung ist mechanische Frakturstabilität eine Voraussetzung für das Ablaufen primärer Frakturheilung. Durch Kapillaraussprossung wird hierbei das medulläre Gefäßsystem innerhalb weniger Tage wiederhergestellt. Primäre Frakturheilung kann in der Regel nur nach anatomischer Frakturreposition und Stabilisierung durch eine Osteosynthese erreicht werden (Rüter et al. [94]).

Bislang ist nicht bekannt, ob unter oben genannten Voraussetzungen auch in der Maus eine primäre Frakturheilung möglich ist. Sämtliche bis dato angewandten murinen Frakturmodelle führen zu einer sekundären Frakturheilung (Hiltunen et al. [42], Histing et al. [43, 44], Holstein et al. [46, 49] Manigrasso und O'Connor [69]).

### **2.2.2 Sekundäre Frakturheilung**

Die Mehrzahl der Frakturen heilt über sekundäre Frakturheilung aus. Diese Art der Frakturheilung läuft immer dann ab, wenn keine anatomische Reposition der Knochenfragmente erreicht wird. Die sekundäre Knochenbruchheilung kann in fünf Phasen unterteilt werden, welche sich teilweise überlappen:

- Frakturphase
- Entzündungsphase

- Granulationsphase
- Phase der Kallushärtung
- Phase des Modelling und Remodelling

Die Frakturphase beginnt mit dem Einsetzen einer Gewalteinwirkung auf den Knochen und das umgebende Weichteilgewebe und endet mit der Aufhebung der gesamten einwirkenden Kraft. Bei diesem Vorgang kommt es zur Verletzung von Periost, Kortikalis, Spongiosa, Knochenmark und in unterschiedlichem Ausmaß auch angrenzender Weichteile. Dabei entsteht im Frakturbereich ein Hämatom (Rüter et al. [94]).

Im Anschluss an die Frakturphase setzen eine überschießende Aussprossung von Kapillaren sowie eine Kaskade von Proliferation, Migration und Differenzierung überwiegend pluripotenter Stammzellen, aber auch polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen ein. Welche Rolle die Mastzellen in diesem Prozess spielen, ist bislang nicht endgültig geklärt, es gibt jedoch Hinweise darauf, dass sie die Zellmigration und lokale Vaskularisierung über die Ausschüttung von Heparin und heparinähnlichen Substanzen beeinflussen. Des weiteren kommt den Mastzellen eine Bedeutung als Vorläuferzellen der Osteoklasten zu (Boyle et al. [11], Rüter et al. [94], Teitelbaum und Ross [107]).

Der Angiogenese scheint eine entscheidende Bedeutung für die Zellmigration und Zellnutrition in dieser frühen Phase der Frakturheilung zuzukommen. Weiterhin wird diskutiert, dass mesenchymale Progenitorzellen direkt aus dem einsprießenden Gefäßendothel hervorgehen. Im Rahmen der gesteigerten Gewebepfusion in der Entzündungsphase kommt es zu einer so genannten Flussumkehr: Während die intakte Kortikalis unter physiologischen Bedingungen zentrifugal, das heißt zu zwei Dritteln über die Markraumgefäße ernährt wird, erfolgt die Perfusion der Kortikalis des frakturierten Knochens hauptsächlich über die periostalen Gefäße. Die Durchblutung erreicht beim Menschen in der zweiten Woche nach Fraktur ihr Maximum von etwa dem sechsfachen Wert der Norm (Rüter et al. [94], Tremain et al. [112]).

Zwischen der Knochenoberfläche und der Kambiumschicht der Periosts liegen so genannte Spindelzellen (s.o.). Sie sind morphologisch nicht von Fibroblasten zu unterscheiden, können sich jedoch zu Osteoblasten differenzieren, weshalb sie auch als Osteoprogenitorzellen bezeichnet werden (Rüter et al. [94]).

Sobald beim Menschen nach 2-3 Tagen die Entzündungsphase abgeklungen ist, wird das Hämatom, in dem sich zu diesem Zeitpunkt bereits ein Netz aus Fibrin und Kollagenfibrillen nachweisen lässt, rasch durch Granulationsgewebe ersetzt. In diesem Granulationsgewebe finden sich neben Lymphozyten, Fibroblasten und neu gebildeten Kollagenfasern auch zahlreiche Kapillaren. Innerhalb der Kollagenfibrillen liegen in unmittelbarer Nachbarschaft zu Fibroblasten bereits in diesem frühen Stadium der Frakturheilung Mineraldepots. Durch die Entstehung erster Brücken von Granulationsgewebe zwischen den Knochenfragmenten wird der so genannte weiche Kallus gebildet. Zu diesem Zeitpunkt beginnt auch der durch Osteoklasten vermittelte Abbau der avitalen Fragmentenden. Weiterhin differenzieren sich Chondroblasten aus mesenchymalen Vorläuferzellen. Subperiostal setzt eine direkte Knochenneubildung durch Osteoblasten ein (desmale Ossifikation oder primäre Kallusreaktion) (Rüter et al. [94]).

Etwa zeitgleich wandert ein so genanntes Blastem aus dem Markraum in das Frakturhämatom ein und füllt somit als medullärer Kallus den Frakturspalt aus. Während beim Menschen nach ungefähr 3-4 Wochen die Knochenfragmente durch Bindegewebe und Knorpel weich miteinander verbunden sind, wird diese Stufe der Frakturheilung in der Maus bereits 10-14 Tage nach Fraktur erreicht (Manigrasso und O'Connor [69], Rüter et al. [94]).

Die Aushärtung des Kallusgewebes wird durch die zunehmende Mineralisierung der Grundsubstanz erreicht. Das hierzu benötigte Calcium wird durch die Mitochondrien hypertrophierter Chondrozyten bereitgestellt. Der entstehende Geflechtknochen (enchondrale Ossifikation) verläuft entlang neuer Kapillarsprosse (s.o.), während sich die Ausrichtung reifen Lamellenknochens an mechanischen Belastungsvektoren orientiert. Frakturspaltfern erfolgt eine Proliferation von Osteoblasten, wodurch sich Geflechtknochen zwischen Periost und Diaphysenoberfläche ablagert (Rüter et al. [94]).

Für den Abbau nekrotischen Knochengewebes sowie den Umbau des mineralisierten Knorpels in Knochen ist auch während der Frakturheilung die so genannte BRU verantwortlich (s.o.). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass kalzifizierter Knorpel durch Osteoklasten resorbiert und zunehmend durch von Osteoblasten gebildeten Geflechtknochen ersetzt wird (Rüter et al. [94]).

Entsprechend der einwirkenden mechanischen Belastung erfolgt die Umwandlung des im Rahmen der Kallusbildung entstandenen Geflechtknochens in lamellären Knochen (Modelling). Die folgende Wiederherstellung der physiologischen Knochenkontur sowie des ursprünglichen Markraumes (Remodelling) stellt den Abschluss der Frakturheilung dar (Rüter et al. [94]).

### **2.2.3 Einflussfaktoren auf die Knochenheilung**

Um eine erfolgreiche Frakturheilung zu ermöglichen sind gewisse Voraussetzungen im Bereich des Knochendefektes nötig. Die Gegebenheiten müssen dabei so geartet sein, dass Proliferation und Differenzierung von Zellen und Geweben möglichst effektiv erfolgen können (Augat et al. [4]).

Es sind eine Reihe von Einflussgrößen bekannt, welche eine Rolle bei der Knochenheilung spielen. Dazu gehören:

- biologische Faktoren
- Ernährungsfaktoren
- physikalische Einflüsse
- genetische Faktoren

(Augat et al. [4])

Biologische Faktoren, welche die Frakturheilung beeinflussen sind z.B. die Vaskularisierung im Bereich des Knochendefektes und die Wirkung von Wachstumshormonen und

Zytokinen. Weiterhin ist bekannt, dass Vitaminangebot und Aufnahme von Giftstoffen als nutritive Faktoren im Zusammenhang mit der Regeneration von Knochengewebe stehen. Als physikalische Faktoren sind im Hinblick auf die Knochenheilung lokale mechanische Belastungen, aber auch die Wirkung von elektrischen Feldern oder Ultraschall zu nennen. Genetische Prozesse spielen in sofern eine Rolle bei der Knochenheilung, als die Expression verschiedener Proteine nach Fraktur eines Knochens über spezielle Signaltransduktionswege moduliert wird (Augat et al. [4]).

Die dominierenden biomechanischen Faktoren im Hinblick auf die Knochenheilung sind die Geometrie des Defektes sowie Ausmaß, Richtung und zeitlicher Verlauf der auf ihn einwirkenden Kräfte. Diese Einflussgrößen bestimmen die lokale mechanische Belastung des sich regenerierenden Gewebes. Die mechanische Belastung wiederum ist ein zentrales Signal zur Regulierung des Heilungsprozesses und bedingt verschiedene Reaktionen auf zellulärer Ebene (Augat et al. [4]).

Der herausragende biomechanische Faktor bei der Knochenheilung ist die Defektgeometrie, welche durch Größe und Art des Defektes bestimmt wird. Die Fähigkeit des Organismus, einen Knochendefekt zur Ausheilung zu bringen, sinkt mit zunehmender Entfernung der Fragmentoberflächen. Somit führen größere Frakturspaltweiten im Vergleich zu kleineren zu einer reduzierten Neubildung von Knochengewebe im Frakturspalt sowie zu einer geringeren Kallusgröße (Augat et al. [4]).

Die Knochenheilung wird stark durch interfragmentäre Bewegung beeinflusst, welche durch die mechanische Belastung des Defektes und die Stabilität der Fragmente zueinander bestimmt wird. Die Auswirkungen interfragmentärer Bewegung hängen dabei von der Größe des Defektes (des Frakturspaltes) ab. Während bei kleineren Frakturspaltweiten durch interfragmentäre Bewegung die Bildung eines größeren Kallus induziert wird, hemmt interfragmentäre Bewegung bei großen Frakturspalten die Kallusbildung und führt somit zu einer verzögerten Frakturheilung (Augat et al. [4], Claes et al. [22]).

Nicht nur das Vorhandensein interfragmentärer Bewegung an sich, sondern auch die Richtung der Bewegungen hat Einfluss auf die Knochenheilung. Moderate axiale Belastung

der Fragmente verbessert die Frakturheilung durch eine Stimulation der Bildung von periostalem Kallus. Das Einwirken von Scherkräften hingegen führt zu einer verminderten periostalen Kallusbildung sowie zu einer verzögerten Neubildung von Knochengewebe. Der Einfluss von Scherkräften auf die Frakturheilung scheint jedoch zusätzlich vom Ausmaß der wirkenden Kraft, sowie vom Zeitpunkt des Einwirkens und der Größe des Frakturspaltes abhängig zu sein (Augat et al. [4], Kenwright und Albinana [58], Larsson et al. [64]).

Betrachtet man Qualität und Richtung der auf einen Knochendefekt einwirkenden Kräfte genauer, so wird deutlich, dass sie einen starken Einfluss auf die Differenzierung der im Rahmen der Knochenheilung auftretenden Gewebe haben. In Bereichen niedriger Belastung und Beanspruchung ist direkte (desmale) Ossifikation möglich. Wiederkehrende zyklische Druckbelastungen induzieren die Bildung von Knorpelgewebe. Hohe Zugbelastung führt zur Bildung von Bindegewebe. Wird die Zugbelastung intermittierend von Druckbelastung überlagert, wird dadurch die Bildung von Faserknorpel begünstigt. In Zonen der Knorpelbildung erfolgt im Verlauf der Knochenheilung physiologischer Weise die enchondrale Ossifikation. Dieser Vorgang kann durch das intermittierende Einwirken von Druckbelastung beschleunigt, durch einwirkende Scherkräfte hingegen unterdrückt werden (Augat et al. [3], Carter et al. [17]).

Die am besten untersuchten biologischen Faktoren, die zum Erfolg der Knochenheilung beitragen, sind die Regeneration der Gefäßversorgung sowie das lokale biochemische Milieu (Augat et al. [4]).

Die Fraktur eines Knochens unterbricht die Blutversorgung und führt somit zur Hypoxie und Nekrose des umliegenden Knochengewebes und des Knochenmarks. Der Bildung neuer Blutgefäße und der Etablierung einer suffizienten Blutversorgung kommt folglich eine Schlüsselrolle bei der Knochenheilung zu (Glowacki [35]).

Das biochemische Milieu beinhaltet komplexe Interaktionen zwischen lokal und systemisch wirkenden Mediatoren wie Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Zu den unmittelbar an der Stimulation der Angiogenese beteiligten Mediatoren gehören:

- der fibroblast growth factor (FGF)
- so genannte transforming growth factors (TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ )
- der vascular endothelial growth factor (VEGF)

(Carano und Filvaroff [16], Geiger et al. [31])

Es wurde gezeigt, dass die Suppression angiogener Mediatoren zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Knochenheilung führt, während ihre Substitution die Bildung von Knochengewebe steigern kann (Augat et al. [4], Geiger et al. [31], Hausman et al. [38], Holstein et al. [48]).

Weitere Bestandteile des biochemischen Milieus, die eine zentrale Rolle bei der Frakturheilung spielen, sind neben den oben genannten Mediatoren:

- insulin-like growth factors (IGFs)
- der platelet derived growth factor (PDGF)
- bone morphogenetic proteins (BMPs)

(Augat et al. [4])

Diese Mediatoren werden im Rahmen der Frakturheilung von verschiedenen Zellen produziert und regulieren synergistisch die Migration, Proliferation und Differenzierung der an der Heilung beteiligten Zellen (Augat et al. [4]).

Zu den einflussreichsten Faktoren der Frakturheilung zählen TGF- $\beta$  und BMP, die beide zur TGF- $\beta$ -Superfamilie gehören. TGF- $\beta$ s werden von Osteoblasten produziert und in die mineralisierte Knochengrundsubstanz aufgenommen. Sie bewirken eine gesteigerte Produktion von Knochengrundsubstanz sowie eine Stimulation der enchondralen Ossifikation (Joyce et al. [55]). BMPs sind an den entscheidenden Schritten der Knochenneubildung, wie Chemotaxis, Mitose, Differenzierung zu Knorpel und Umbau zu Knochengewebe, beteiligt. Weiterhin wirken sie bei der Regulation der Hämatopoese, der Synthese von

Knochengrundsubstanz sowie bei der Apoptose mit (Reddi [88]). BMP-2 und BMP-7 binden dabei an mesenchymale Zellen und bewirken deren Differenzierung zu knorpel- oder knochenbildenden Zellen (Valentin-Opran et al. [115]). Dadurch vermögen BMP-2 und BMP-7, die Neubildung von Knochengewebe zu induzieren und die Fraktur- und Defektheilung positiv zu beeinflussen (Mizumoto et al. [74], Sciadini et al. [99], Yudell und Block [122]).

Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen den genannten biomechanischen und biologischen Faktoren bei der Knochenheilung. So vermindert Instabilität der Frakturzone die Vaskularisierung im Areal der Kallusmineralisierung und führt zur Bildung von Faserknorpel im Frakturspalt (Claes et al. [20], Claes et al. [21]). Ein gewisses Maß an Belastung der Fraktur hingegen ist jedoch nötig, um Angiogenese und Osteogenese zu induzieren, da Mikrobewegungen im Frakturbereich den Blutfluss im Bereich des Knochendefektes erhöhen (Kirchen et al. [60], Wallace et al. [116]).

Osteoblasten und Osteozyten reagieren auf mechanische Einflüsse mit der Expression spezifischer Wachstumsfaktoren, die in den Prozess der Knochenregeneration eingreifen. So konnte gezeigt werden, dass auf Osteoblasten einwirkende Druckbelastung die Expression von Genen, deren Produkte bei der Osteogenese mitwirken, zu steigern vermag (Rath et al. [87]). Gesteigerte Genexpression durch mechanische Stimuli wird über spezifische Signaltransduktionswege, wie etwa Proteinkinase-Kaskaden vermittelt. Dabei führen Phosphorylierung und Dephosphorylierung verschiedener biochemischer Substanzen zur Bindung von Transkriptionsfaktoren an die Promotorregion eines jeweiligen Zielgens. Die genauen Mechanismen der Verarbeitung von einem mechanischen Signal zu einer zellulären Antwort sind bislang nicht endgültig geklärt und werden in aktuellen Studien untersucht (Banes et al. [5], Mikuni-Takagaki [73], Nomura und Takano-Yamamoto [77]).

## 2.3 Metabolische und regenerative Effekte physischer Aktivität

In Phasen gesteigerter physischer Aktivität finden Anpassungsvorgänge fast aller Körpersysteme statt, um etwa den erhöhten Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen decken zu können, aber auch, um den Abtransport von Stoffwechselprodukten zu gewährleisten (Huppelsberg und Walter [52]).

Eine wesentliche regulatorische Funktion kommt verschiedenen Hormonen zu, deren Ausschüttung sich unter physischer Aktivität verändert. So steigen bei körperlicher Aktivität z.B. die Blutspiegel von Katecholaminen, ACTH, STH, und Glucagon, während der Insulin-Spiegel fällt (Huppelsberg und Walter [52]).

Um den vermehrten Energiebedarf zu decken, beginnt der Organismus, den intrazellulären ATP-Vorrat aufzubrechen. Sind diese Speicher erschöpft, so wird neues ATP aus gespeichertem Kreatinphosphat gewonnen. In weiteren Schritten setzt im Verlauf zunächst die anaerobe Glykolyse, dann schließlich die aerobe Energiegewinnung durch Glykolyse und Fettsäure-Oxidierung ein (Huppelsberg und Walter [52]).

Da eine Dauerleistung nur unter aerober ATP-Regenerierung möglich ist, müssen Kreislaufsystem und Atmung zur vermehrten Sauerstoffbereitstellung angepasst werden (Huppelsberg und Walter [52]).

Die Anpassung des Herz-Kreislaufsystems wird über eine Sympathikusaktivierung vermittelt. Dabei werden im Nebennierenmark Katecholamine freigesetzt, welche u.a. eine Vasokonstriktion der Haut- und Splanchnikusgefäße bewirken. Am Herzen selbst findet sich eine Zunahme von Frequenz und Kontraktilität, sodass im Zusammenspiel mit gesteigertem venösem Rückstrom Schlagvolumen und Herzzeitvolumen zunehmen. Durch periphere Vasokonstriktion und gesteigertes Herzzeitvolumen steigt der arterielle Blutdruck unter physischer Aktivität (Huppelsberg und Walter [52]).

Unter Belastung steigt die Sauerstoffaufnahme des Organismus um den Faktor 10 bis 20

an. Neben dem gesteigerten Herzzeitvolumen kommt diese Steigerung durch ein erhöhtes Atemzeitvolumen zustande, welches sich aus erhöhter Atemfrequenz und größerem Atemzugvolumen ergibt. Des Weiteren findet eine durch den Sympathikus vermittelte Bronchodilatation statt. Gesteigerter Blutstrom durch die Lungengefäße und größeres Atemzugvolumen bewirken eine Rekrutierung zusätzlicher Alveolen, sodass die Diffusionskapazität der Lunge vergrößert wird (Huppelsberg und Walter [52]).

Im Bereich der arbeitenden Muskulatur wird im Rahmen körperlicher Aktivität die Durchblutung stark gesteigert. Weiterhin wird die Sauerstoffausschöpfung des Blutes massiv erhöht, sodass sich unter physischer Aktivität eine deutlich erhöhte arteriovenöse Sauerstoffdifferenz findet (Huppelsberg und Walter [52]).

Regelmäßige körperliche Belastung führt zu umfassenden Anpassungsvorgängen, nicht nur der beanspruchten Muskulatur, sondern auch des Sauerstoff transportierenden Systems sowie zu Ökonomisierungsvorgängen der Speichersysteme und insgesamt zu einer dauerhaften Steigerung der Leistungsfähigkeit des Organismus (Huppelsberg und Walter [52]).

Gesteigerte körperliche Aktivität beeinflusst weiterhin längerfristig den Metabolismus beanspruchter Gewebe. So wurde gezeigt, dass Angiogenese und vaskuläres Remodelling sowohl im Herz- als auch im Skelettmuskel unter Belastung durch eine Hochregulation von VEGF gesteigert werden (Bloor [7]).

Auch auf den Knochenmetabolismus wirkt sich gesteigerte körperliche Aktivität in verschiedener Weise aus. In Untersuchungen an Schweinen zeigten sich nach körperlichem Training größere Periostoberflächen und eine gesteigerte Knochenmineralisation im Vergleich zu Tieren mit normaler körperlicher Aktivität (Smith und Gilligan [101]). Ebenso steigt die Knochenmasse im physisch aktiven Organismus signifikant an (Raab et al. [86]).

Es wurde gezeigt, dass die Blutgefäßdichte in der proximalen Tibia bei Ratten unter gesteigerter körperlicher Aktivität in Form von Laufradtraining gegenüber Tieren mit normaler Aktivität signifikant ansteigt (Yao et al. [120]).

Als ein wesentlicher Faktor zur Vermittlung gesteigerter Angiogenese und Osteogenese als Effekt körperlicher Aktivität konnte eine erhöhte Expression von VEGF identifiziert werden (Yao et al. [120]).

## 2.4 Tiermodelle zur Knochenheilung und Angiogenese

In letzter Zeit wurden zahlreiche Erkenntnisse zur Frakturheilung anhand von in-vitro-Studien an humanen Knochenzellen gewonnen. Bis heute sind Tiermodelle jedoch ein wesentlicher Bestandteil der Forschung zur Frakturheilung. In diesem Zusammenhang wurden verschiedene Modelle an Säugetier- und Vogelarten entwickelt. Je nach Fragestellung wurden Spezies unterschiedlicher Größe und Anatomie als Versuchstiere gewählt. Das Spektrum reicht hier von Kleinnagern wie der Maus (Hiltunen et al. [42]) bis hin zu Großtieren wie etwa dem Schaf (Cheal et al. [19], Kirker-Head et al. [61]). Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse tierexperimenteller Studien auf den Menschen muss wegen der Unterschiede in der Anatomie der verschiedenen Spezies sowie der entsprechenden Biologie der Knochenheilung immer diskutiert werden (Rhineland [90]).

Betrachtet man kleine Nagetiere wie Maus und Ratte, so fällt im Hinblick auf die Anatomie auf, dass eine recht primitive Knochenstruktur mit fehlendem Havers-System vorliegt. Das Remodelling im Rahmen der Knochenheilung wird hier über Resorptionshöhlen vermittelt, welche sich in der Nähe einer Fraktur bilden und im Verlauf der Heilung mit Osteoblasten aufgefüllt werden. Dieser Vorgang ist dem Remodelling bei vorhandenem Havers-System zwar relativ ähnlich, jedoch liegen über die Relevanz dieser biologischen Unterschiede noch wenig Erkenntnisse vor. Somit können kleine Nagetiere nicht für Studien herangezogen werden, welche die Form, Funktion und Beschaffenheit des Havers-System untersuchen. Das Havers-System ist phylogenetisch erst beim Kaninchen zu finden, wobei auch hier anatomische Unterschiede zum menschlichen Havers-System bestehen (Nunamaker [78]).

Trotz großer Ähnlichkeiten im Genom verschiedener Säugetiere unterscheiden sich die Zeitpunkte der Expression bestimmter Gene von Spezies zu Spezies. Aus diesem Grund

müssen in tierexperimentellen Studien eben diese speziesabhängigen zeitlichen Unterschiede in der Expression von Zytokinen stets Beachtung finden. Somit sind Dosierung und Applikationszeitpunkt von Zytokinen bei tierexperimentellen Untersuchungen immer zu diskutieren (Nunamaker [78]).

Des Weiteren sprechen unterschiedliche Spezies auf verschiedene Weise auf die Applikation von Medikamenten an. Dies hängt mit teilweise erheblichen Unterschieden im Metabolisierungspotential für bestimmte Wirkstoffe zusammen. Die daraus resultierenden differenten Effekte der Medikamente auf den Organismus machen eine speziesabhängige Dosisanpassung notwendig. Als Beispiel ist hier die toxische Wirkung nichtsteroidaler Antiphlogistika auf Hunde und Katzen zu nennen (Herrgesell [40], Jones et al. [54]).

Auch das Alter der Versuchstiere hat einen entscheidenden Einfluss auf die Frakturheilung. Juveniler Knochen weist einen schnelleren Heilungsverlauf als seniler Knochen auf. Als Indiz für ein abgeschlossenes Knochenwachstum sollte ein Schluss der Wachstumsfugen radiologisch nachzuweisen sein (Lu et al. [68], Nunamaker [78], Rossant und Nagy [93]).

### **2.4.1 Maus**

Während im Laufe der letzten Jahrzehnte primär Großtiermodelle zur Reproduktion physiologischer und pathologischer Prozesse während der Frakturheilung eingesetzt wurden, haben sich in jüngerer Vergangenheit zunehmend auch Kleintiermodelle, insbesondere an der Maus, etabliert. Im Mausmodell sind aufgrund vergleichsweise geringer Kosten für Beschaffung, Zucht und Haltung der Tiere große Versuchsgruppen sehr gut realisierbar. Ein enormer Vorteil liegt in der Tatsache, dass das Genom der Maus vollständig entschlüsselt ist. Dies macht die Maus als Versuchstier insbesondere für molekularbiologische Studien interessant. Für keine andere Spezies existiert ein vergleichbar breites Spektrum an verfügbaren transgenen Stämmen und spezifischen Antikörpern (Rossant und Nagy [93]).

Wie bereits erläutert besitzt die Maus, wie auch die Ratte, im Vergleich zu größeren Tieren eine relativ primitive Knochenstruktur ohne Havers-System. Im Hinblick auf die

Übertragbarkeit von im Mausmodell gewonnenen Erkenntnissen auf den Menschen muss diese Besonderheit stets beachtet werden. Die diffizilen anatomischen Gegebenheiten der Maus stellen eine große Herausforderung in der Entwicklung von Maus-Frakturmodellen dar. Die Frakturierung und osteosynthetische Stabilisierung etwa eines Mäusefemurs mit einer Länge von ca. 15 mm und einem Durchmesser von ungefähr 1,5 mm verlangt ein hohes Maß an technischem und operativem Geschick (Holstein et al. [46]).

In den bislang publizierten Frakturmodellen an der Maus wurde die Knochenheilung vor allem an der Rippe, der Tibia sowie dem Femur untersucht (Bourque et al. [9], Hiltunen et al. [42], Holstein et al. [46], Manigrasso und O'Connor [69], Nakase et al. [75]).

Zur Untersuchung der Mikrozirkulation sind verschiedene Modelle an der Maus beschrieben. Hier reicht das Spektrum von einem Femurfenster zur intravitalem Mikroskopie der Mikrozirkulation im Knochen (Hansen-Algenstaedt et al. [37]) bis zum Schädelfenster ähnlich dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Modell. Dabei wurde die Mikrozirkulation von in das Fenster implantierten Mammakarzinomen und Glioblastomen untersucht (Yuan et al. [121]), wofür die Kalotte vollständig entfernt wurde. Auch Knochentumoren wurden bereits in ein Schädelfenster implantiert, um ihre Angiogenese untersuchen zu können (Klenke et al. [62]). Weitere Untersuchungen analysierten die Angiogenese im Rahmen der Osteointegration von Knochenersatzmaterialien (Klenke et al. [63]) oder die Angiogenese an mit verschiedenen Wachstumsfaktoren versehenen Gels (Dellian et al. [27]).

## 2.4.2 Ratte

Die Ratte ist bereits länger als die Maus als Tiermodell zur Untersuchung der Frakturheilung etabliert. Im Vergleich zur Maus bietet sie aufgrund der Körpergröße etwas erleichterte Arbeitsbedingungen bei der Präparation. Hier werden Schädel, Radius, Ulna, Femur, Tibia und Metatarsale als Lokalisation für die Frakturierung genutzt (Hietaniemi et al. [41], Thaller et al. [109], Utvåg et al. [114]). Auch wurde ein Modell analog zu dem zuvor erwähnten Schädelfenster bereits an Ratten beschrieben. Anhand dieses Modells wurden Angiogenese und vaskuläre Permeabilität verschiedener Tumoren untersucht (Yuan et al. [121]).

### 2.4.3 Kaninchen

Das Kaninchen wird neben Maus und Ratte als drittes Nagetier zur Untersuchung der Frakturheilung genutzt (Ashhurst et al. [2], Stafford et al. [103], Strong et al. [106]). Operative Interventionen, die besonders im Mausmodell eine hohe technische Herausforderung darstellen, sind am Kaninchen wegen der wesentlich höheren Körpergröße mit vergleichbar geringem Aufwand anwendbar (Brighton et al. [14], Danckwardt-Lillieström et al. [25], Deibert et al. [26], Kaplan et al. [57], Terjesen und Johnson [108]). Im Vergleich zu größeren Säugetieren wie Hund oder Schaf erlaubt die Körpergröße des Kaninchens die Applikation höherer relativer Dosen kostenintensiver Substanzen. Dementsprechend sind auch die Kosten für Anschaffung, Zucht und Haltung von Kaninchen deutlich geringer als bei Großsäugern (Critchlow et al. [23]).

Seit geraumer Zeit werden auch im Kaninchenmodell Untersuchungen zur Mikrozirkulation durchgeführt. Bereits 1924 wurde eine Kammer im Kaninchenohr beschrieben, mit deren Hilfe es möglich war, mikroskopische Untersuchungen wachsender Gewebestrukturen durchzuführen (Sandison [95]). Mit verschiedenen Modifikationen dieser Kammer wurden später unter anderem die Angiogenese beim Einwachsen verschiedener Gewebetransplantate und die Wirkungen vasoaktiver Substanzen auf die Mikrozirkulation untersucht (Branemark und Lindstrom [12]). Durch in die Ohrkammer implantierte Knochenfragmente konnten verschiedene Prozesse der Kallusbildung beobachtet werden (Kirby-Smith [59]). Ein weiteres Modell beschreibt die Implantation einer Knochenkammer in die Kaninchtibia. Mit dieser Technik ist es zum Beispiel möglich, intravitalmikroskopische Beobachtungen am Knochenmark durchzuführen (McCuskey et al. [71]). Die Knochenkammer in der Kaninchtibia wurde des Weiteren für verschiedene Studien zur Untersuchung der Mikrozirkulation des Knochens und der Integration von Knochentransplantaten herangezogen (Albrektsson [1], Boyde et al. [10], Winet [118]).

#### 2.4.4 Katze

Sowohl veterinärmedizinische Therapiestudien als auch Forschungsarbeiten mit Frakturmodellen haben bislang die Knochenheilung an der Katze untersucht. Es sind sowohl verschiedene Methoden operativer Frakturstabilisierung und konservativer Therapie von Frakturen als auch Verfahren zur Analyse der Einheilung von Knochen-Allografts beschrieben (Henry et al. [39], Newton und Nunamaker [76], Puech et al. [85], Toombs et al. [111]).

An Katzen wurden intravitalmikroskopische Studien der Kapillartopographie und der Mikrozirkulation am zerebralen Cortex durchgeführt (Pawlik et al. [81]). Diese Untersuchungen verwendeten jedoch keine auf Dauer angelegten Fenster oder Kammern, sondern erfolgten als Finalversuche über eine ausgedehnte Kraniotomie.

#### 2.4.5 Hund

Da die Frakturheilung beim Hund von großen Interesse für die Veterinärmedizin ist, liegen viele Informationen über Heilungsabläufe und Therapiemöglichkeiten von Knochenbrüchen am Hund vor (Johnson und Stein [53]). Der Hund ist auch für tierexperimentelle Studien zur Frakturheilung ein häufig herangezogenes Modell. Es existieren zahlreiche Modelle zu internen und externen Stabilisierungstechniken, sowie Modelle ohne Stabilisierung und Modelle zur verzögerten und ausbleibenden Frakturheilung (Black et al. [6], Chao et al. [18], Georgiadis et al. [32], Lenehan et al. [65], Lewallen et al. [66], Peter et al. [83]).

Im Hundemodell sind Untersuchungen der Knochenmikrozirkulation anhand von Mikroangiographien am explantierten Kadaverknochen beschrieben. Hier wurden neben der physiologischen Vaskularisation insbesondere Veränderungen der Mikrozirkulation bei frakturierten Knochen betrachtet (Rhinelanders [89], Rhinelanders und Baragry [91]).

### 2.4.6 Schaf

Das Schaf ist insbesondere für die Entwicklung und Erprobung neuer Humanimplantate ein beliebtes Versuchstier (Cheal et al. [19], Kirker-Head et al. [61], Nunamaker et al. [79], Richardson und Nunamaker [92], Steen et al. [105], Steen und Fjeld [104]). Die primäre Knochenheilung ist für diese Spezies, bei der das Remodelling wie beim Menschen über das Havers-System erfolgt, sehr gut untersucht (Schenk und Willenegger [96]). Auch die sekundäre Frakturheilung nach intramedullärer Osteosynthese ist am Schaf gut zu untersuchen, da die Tiere die frakturierte Extremität relativ früh belasten und somit den gewünschten Kompressionseffekt ermöglichen. Die relativ hohen Kosten für Zucht und Haltung von Schafen hingegen erschweren die Realisierung großer Versuchsgruppen (Nunamaker [78]).

Das Schafmodell wurde zur Untersuchung der Heilung von Knochendefekten und der Integration von Knochentransplantaten am Femur herangezogen. Dabei wurde der Einfluss von Hyaluronsäure und BMP auf die Angiogenese untersucht (Maus et al. [70]).

## 2.5 Zielsetzung

Zielsetzung der Arbeit war es, zu untersuchen, ob forcierte physische Aktivität die Angiogenese im Rahmen der Knochenheilung beeinflusst.

Die entsprechenden Informationen dazu sollten durch tierexperimentelle Versuche an der Maus gewonnen werden.

Zur Untersuchung der Angiogenese während der Knochenheilung wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neues Tiermodell etabliert.

## 2.6 Fragestellung

Die durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen sollten die Frage beantworten, inwiefern sich die Angiogenese im Rahmen der Knochenheilung bei gesteigerter physischer Aktivität der Versuchstiere gegenüber derjenigen bei Tieren mit nicht gesteigertem Maß an Aktivität unterscheidet. Es sollte herausgefunden werden, ob vermehrte physische Aktivität die Angiogenese im Bereich eines Knochendefektes unbeeinflusst lässt, verschlechtert oder zu steigern vermag.

Die Nullhypothese lautet:

**„Die Angiogenese im Rahmen der Knochenheilung bei Mäusen mit gesteigerter physischer Aktivität (Verum) weist verglichen mit der Angiogenese im Rahmen der Knochenheilung bei Mäusen mit normalem Maß an physischer Aktivität (Kontrolle) keinerlei Unterschiede auf.“**

Die Angiogenese wurde über einen Zeitraum von 21 Tagen durch Intravitalmikroskopie eines Knochendefektes der Schädelkalotte untersucht. Weiterhin erfolgten histomorphometrische Untersuchungen nach 3, 6, 9 und 15 Tagen sowie immunhistochemische Analysen nach 6, 9 und 15 Tagen am postmortalen Knochenpräparat, um Art und zeitlichen Verlauf der Knochenheilung in dem neu entwickelten Modell zu charakterisieren.

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Intervention

### 3.1.1 Versuchsprotokoll

Der Tierversuch wurde von der zuständigen Behörde (Dezernat 5, Saarpfalz-Kreis, 66406 Homburg) unter dem AZ 110/180-07 genehmigt und am Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes nach den aktuellen Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Für die Etablierung des Modells wurden an 22 Mäusen Schädelfenster präpariert und intravitalmikroskopische, histomorphometrische und immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt (Tab. 1, oberer Abschnitt).

Im weiteren Verlauf der Studien wurden Knochendefekte von jeweils sieben Mäusen mit normaler und gesteigerter physischer Aktivität intravitalmikroskopisch untersucht (Tab. 1, unterer Abschnitt).

Zur immunhistochemischen Analyse wurden dabei jeweils Schnittpräparate aufbereitet (s.u.), welche zuvor für histomorphometrische Untersuchungen genutzt worden waren.

Standzeit	Kontrollen					Laufradtraining
	3d	6d	9d	15d	21d	21d
Intravitalmikroskopie	-	-	-	-	n=14	-
Histomorphometrie	n=2	n=2	n=2	n=2	-	-
Immunhistochemie	-	n=2	n=2	n=2	-	-
Intravitalmikroskopie	-	-	-	-	n=7	n=7

**Tab. 1:** Versuchsprotokoll; Im Rahmen der Vorversuche (oberer Abschnitt) wurde das Modell etabliert. Der untere Abschnitt zeigt die Versuche zum Einfluss gesteigerter physischer Aktivität auf die Angiogenese im Rahmen der Knochenheilung.

### 3.1.2 Tiermodell

Als Versuchstiere wurden ausgewachsene Mäuse (CD-1) mit einem durchschnittlichen Alter von 20 Wochen und einem Körpergewicht zwischen 30 und 40 g verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte in Einzelkäfigen im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes bei klimatisierten Raumbedingungen (Lufttemperatur 22 - 24 °C, relative Luftfeuchtigkeit 60 %). Der Tag- / Nachtrhythmus betrug 12 Stunden. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Standarddiätfutter in Pelletform (Altromin, Lage, Deutschland).

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde ein standardisiertes Kalotten-Defektmodell an der Maus entwickelt, welches in Folgeversuchen auch für Untersuchungen an Knock out-Stämmen eingesetzt werden kann.

Standardisierte Versuchsbedingungen sind für die Analyse physiologischer und pathophysiologischer Prozesse der Knochenheilung eine grundlegende Voraussetzung. Unsere Arbeitsgruppe hat in der Vergangenheit bereits Frakturmodelle am Mäusefemur etabliert und in verschiedenen Studien erfolgreich eingesetzt (Histing et al. [43, 45], Holstein et al. [46, 48, 49]). Ziel war es nun, die Heilungsvorgänge am Knochen unter weitgehender Ausschaltung direkter mechanischer Einflüsse zu untersuchen, wie sie durch die auf den Knochendefekt am belasteten Femur wirkenden Kräfte entstehen.

### 3.1.3 Operation

Die Operation wurde an allen Tieren im Tieroperationssaal des Institutes für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in gleicher standardisierter Vorgehensweise durchgeführt.

Alle Versuchstiere wurden für den Eingriff durch eine intraperitoneale Injektion von 2 % Xylazin (entsprechend 2 mg/kg Körpergewicht; Bayer, Leverkusen, Deutschland) und Ketamin (75 mg/kg Körpergewicht; Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) narkotisiert. Zusätzlich wurden die Tiere am Operationstag und am ersten postoperativen Tag mit 0,05 ml Caprofen analgetisch behandelt.

Nach sorgfältiger Rasur der Kopfhaut wurden die Mäuse auf einer Plexiglasplatte gelagert. Dabei erfolgte eine Unterpolsterung des Kopfes durch gefaltete Mullkompressen, sodass das Schädeldach horizontal zum Liegen kam. Zusätzlich wurden die Mäuse auf Schulterhöhe durch einen Streifen Rollenpflaster fixiert. Zum Schutz der Augen vor Austrocknung wurden beide Bulbi mit Bepanthen®-Augensalbe (Bayer, Leverkusen, Deutschland) benetzt.

Nach ausgiebiger Desinfektion mit Softasept® (B. Braun, Melsungen, Deutschland) wurde die Kopfhaut kreisförmig über einen Durchmesser von etwa 10 mm exzidiert. Unter kontinuierlicher Befeuchtung mit 0,9 % NaCl (B. Braun, Melsungen, Deutschland) wurden durch vorsichtige Entfernung der Galea aponeurotica mit Schere und Pinzette die cranialen Anteile des Os frontale sowie beider Ossa parietalia freigelegt (Abb. 1).

Unter weiterer kontinuierlicher Spülung mit 0,9 % NaCl wurde nun im cranialen Abschnitt des rechten Os parietale mit ausreichendem Abstand zur Sutura sagittalis und frontalis ein annähernd kreisrunder monokortikaler Knochendefekt erzeugt. Dies geschah unter Verwendung eines Mikro-Handbohrgerätes mit diamantiertem Kugelfräseinsatz von 1 mm Durchmesser (20000 U/min. Proxxon, Niersbach, Deutschland; Abb. 2). Der so erzeugte Defekt wies einen Durchmesser von etwa 0,75 mm auf. Es wurde streng darauf geachtet, die innere Kortikalis nicht zu verletzen, um eine Blutung im Bereich der Meningen zu vermeiden (Abb. 3).

An beiden Ossa parietalia wurde nach Spülung mit 0,9 % NaCl mit oben erwähntem Fräser jeweils eine Vertiefung in der äußeren Kortikalis geschaffen (Abb. 4). Rechtsseitig wurde hierbei auf einen ausreichenden Abstand zum Knochendefekt geachtet. Nun wurde ein rundes Deckglas mit 12 mm Durchmesser und 0,15 mm Dicke (Abb. 2) mit Hilfe einer Pinzette auf die Kalotte aufgelegt und die Position der gefrästen Kortikalis-Vertiefungen auf dem Glas markiert. Anschließend wurden nach erneuter Entfernung des Deckglases zwei Löcher im Bereich der Markierungen in das Glas gefräst (Abb. 5).

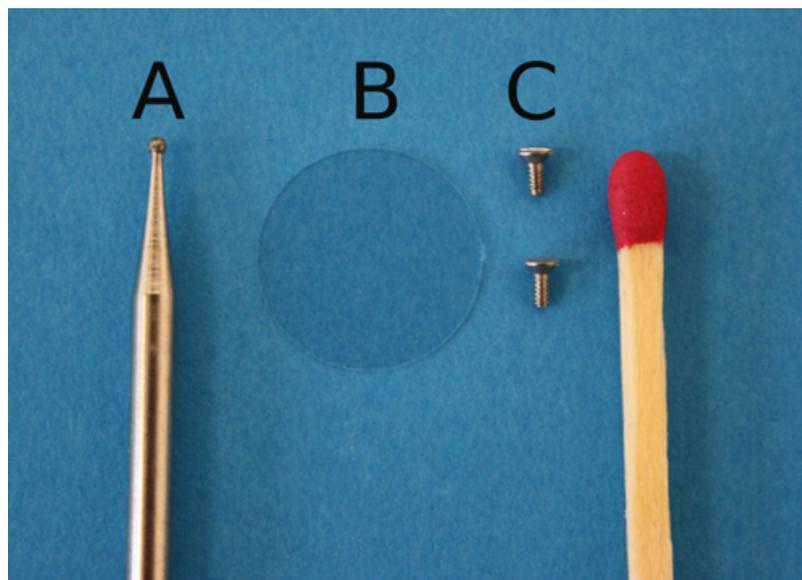
Nach sorgfältiger Reinigung, Desinfektion mit Softasept® und Spülung mit 0,9 % NaCl wurde das Deckglas so auf die Kalotte aufgelegt, dass die Bohrlöcher auf den Vertiefungen der Kortikalis zu liegen kamen. Die Hautränder wurden dabei über den Rand des Deckglases gezogen, um eine ausreichende Bedeckung der Schädelkalotte zu gewährleisten.

Die Befestigung des Deckglases an der Kalotte erfolgte durch zwei Edelstahl-Schlitzschrauben mit 1 mm Gewindedurchmesser und 2 mm Gewindelänge (Schraubenlager, Aschendorf, Deutschland; Abb. 2), welche durch die Bohrlöcher des Deckglases und die Kortikalisvertiefungen eingebracht wurden (Abb. 6).

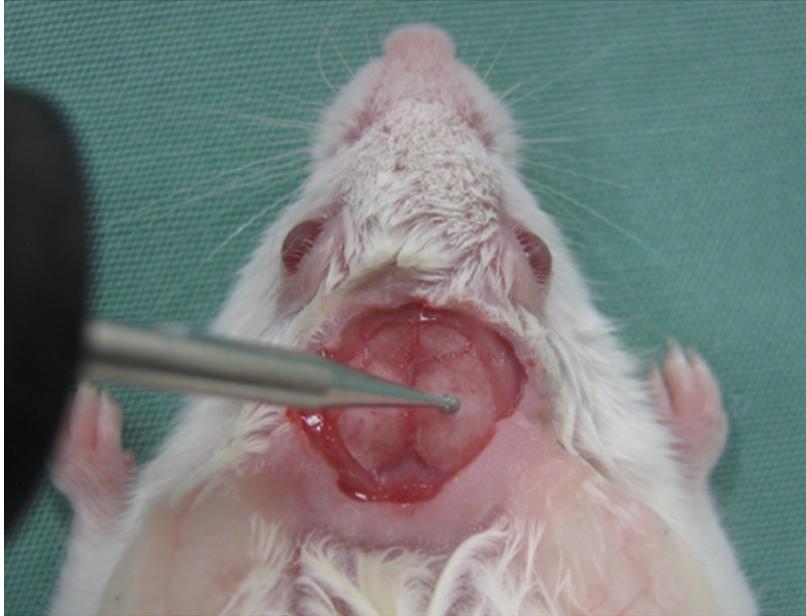
Abschließend wurde die Haut auf der Oberfläche des Deckglases mit einer Tabaksbeutelnaht (5-0 Prolene®, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) adaptiert (Abb. 7).



**Abb. 1:** Freilegung der Schädelkalotte über eine zirkuläre Exzision



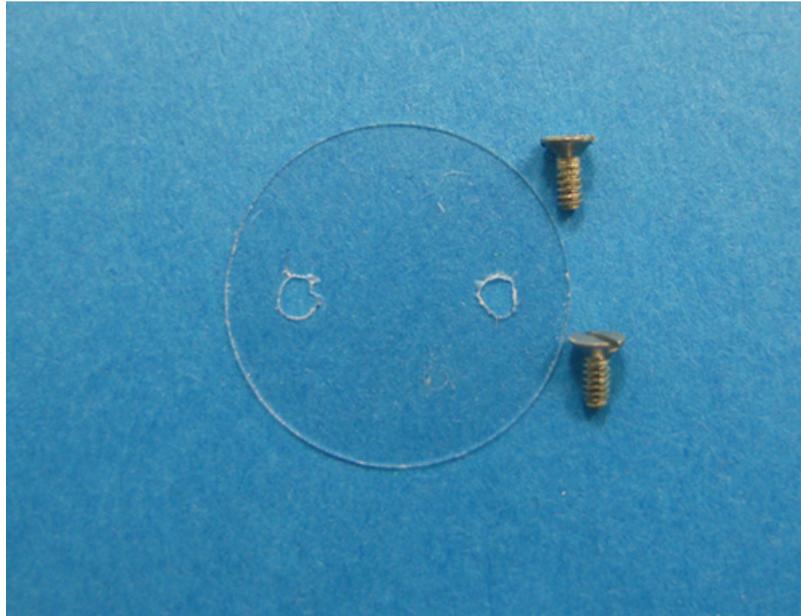
**Abb. 2:** Operationsutensilien: Diamant-Kugelfräser (A), Deckglas (B) und Mikro-Schrauben (C)



**Abb. 3:** *Im rechten Os parietale wird ein monokortikaler Defekt erzeugt.*



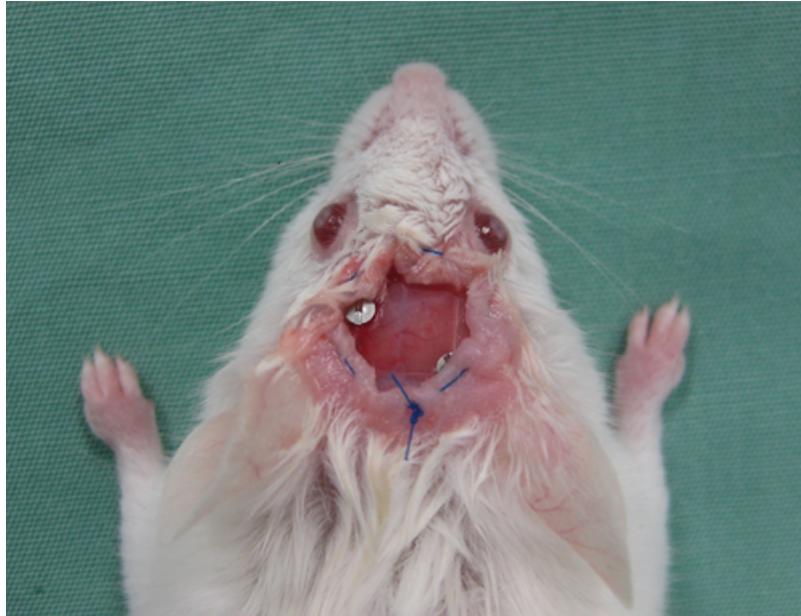
**Abb. 4:** *Fräsen von 2 Vertiefungen (4 und 10 Uhr) zur Einbringung der Schrauben*



**Abb. 5:** Nach Markierung der korrekten Positionen wird das Deckglas mit 2 Löchern zur Einbringung der Schrauben versehen.



**Abb. 6:** Aufbringen des Deckglases auf die Kalotte und Fixierung durch Schrauben



**Abb. 7:** *Adaptierung der Kopfhaut durch eine Tabaksbeutelnaht*

### 3.1.4 Laufradtraining

Die Tiere, bei denen eine gesteigerte physische Aktivität erwünscht war, wurden postoperativ in einem Käfig gehalten, der mit einem handelsüblichen Metalllaufrad für Kleinnager ausgestattet war.

Da unsere Vorversuche gezeigt hatten, dass nicht alle Mäuse das Laufrad annehmen, wurden sämtliche Versuchstiere vor Einschluss in eine der Gruppen über einen Zeitraum von 2 Tagen darauf getestet, ob sie spontan ein angebotenes Laufrad benutzen. Tiere, welche dies nicht taten, wurden nicht in den Versuch eingeschlossen.

Zur Quantifizierung der physischen Aktivität wurden die Laufräder auf einer Metallplatte befestigt und mit einem digitalen Tachometer ausgestattet (Stinnes-Intertec, Landau, Deutschland), das die zurück gelegte Strecke aufzeichnete (Abb. 8).



**Abb. 8:** Körperliche Aktivität durch Laufradtraining. Die zurückgelegte Strecke wird durch ein Tachometer dokumentiert.

### 3.1.5 Intravitalmikroskopie

An allen Versuchstieren wurden am Operationstag sowie an den postoperativen Tagen 3, 6, 9, 12, 15, 18 und 21 intravitalmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Tiere wie oben beschrieben narkotisiert und auf einer Plexiglasplatte gelagert. Anschließend erfolgte die intravenöse Injektion von 0,1 ml mit Fluorescein-isothiocyanat (FITC) markiertem Dextran 150000 (5 %) in den rechten retrobulbären Venenplexus.

Zur Auflichtmikroskopie wurde eine 100 W-Quecksilberlampe mit FITC-Fluoreszenzfilter (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet. Zur Erfassung der Knochendefektgröße und Quantifizierung der Angiogenese wurde ein Weitwinkelobjektiv mit zehnfacher Vergrößerung gewählt (Plan-NeoFluar, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Die mikroskopischen Bilder wurden mit einer CCD-Kamera (charge-coupled device; FK 6990, Pieper, Schwerte, Deutschland) aufgenommen und auf einem 14"-Bildschirm (KV-14C T1E, Sony, Tokyo, Ja-

pan) abgebildet. Um eine spätere Auswertung zu ermöglichen, wurden die Bilder zusätzlich auf DVD gespeichert (DVD-HR775, Samsung, Seoul, Südkorea).

Nach sorgfältiger Reinigung der Deckglasoberfläche mit 0,9 % NaCl erfolgte die mikroskopische Betrachtung des Defektareals sowohl als Übersichtsaufnahme als auch in vier Quadrantenausschnitten, was eine zentriertere Darstellung des Defektrandes ermöglichte.

### **3.1.6 Tötung der Tiere**

Die Versuchstiere wurden 21 Tage post operationem durch intraperitoneale Injektion einer Überdosis Phenobarbital getötet. Die zur histologischen Analyse herangezogenen Tiere wurden je nach vorgesehenem Analysezeitpunkt in gleicher Weise an den postoperativen Tagen 3, 6, 9 bzw. 15 getötet.

### **3.1.7 Präparation der Knochen**

Nach Tötung der Versuchstiere, welche für histologische Untersuchungen herangezogen wurden, wurde zunächst die Tabaksbeutelnaht der Kopfhaut entfernt. Anschließend wurden die beiden fixierenden Schrauben ausgedreht. Nach vorsichtiger Freilegung wurde das Deckglas mit einer Pinzette entfernt. Hierbei wurde streng darauf geachtet, das Glas senkrecht abzuheben um eine Beschädigung des Gewebes im Bereich des Knochendefektes durch Scherkräfte zu vermeiden. Die Kopfhaut wurde anschließend großzügig exzidiert um einen freien Zugang zur Schädelkalotte zu erlangen.

Die Explantation des Schädeldaches erfolgte mit Hilfe des oben beschriebenen Mikro-Bohrgerätes unter Verwendung einer Diamant-Trennscheibe ( $\varnothing$  20 mm, Dicke 0,6 mm; Proxxon, Niersbach, Deutschland). Es wurde eine annähernd quadratische Knochenplatte unter kontinuierlicher Spülung mit 0,9 % NaCl ausgefräst. Dabei wurde streng darauf geachtet, zu allen Seiten einen ausreichenden Abstand zum Knochendefekt einzuhalten. Die Knochenplatte wurde mit einer Pinzette gefasst und angehoben, sodass die Innenseite von der Dura abgelöst und der Knochen entnommen werden konnte.

## 3.2 Zielkriterien und Auswertung

### 3.2.1 Intravitalmikroskopie

Die Auswertung des mikroskopischen Bildmaterials erfolgte nach Speicherung auf DVD mit Hilfe des computergestützten CapImage-Messsystems (Zeintl, Heidelberg, Deutschland).

Dabei wurden folgende Parameter am Operationstag sowie 3, 6, 9, 12, 15, 18 und 21 Tage post operationem bestimmt:

- Defektfläche [ $\text{mm}^2$ ]
- Gefäßdichte im Defektareal [ $\text{mm}/\text{mm}^2$ ]
- Durchschnittlicher Gefäßdurchmesser im Defektareal [ $\mu\text{m}$ ]

Die Defektfläche zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt wurde nach manueller Markierung der Begrenzung des Knochendefektes computergestützt berechnet.

Die Gefäßdichte wurde als Quotient von sichtbarer Gesamtgefäßstrecke [ $\text{mm}$ ] und Defektfläche [ $\text{mm}^2$ ] errechnet. Dabei wurde die Defektfläche am Operationstag als region of interest (ROI) definiert und den Berechnungen zu Grunde gelegt. Hierzu wurde anhand der mikroskopischen Videobilder vom Operationstag eine Schablone des Defektareals auf durchsichtiger Overheadfolie angefertigt, welche zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt auf den Monitor aufgelegt werden konnte. Die Bestimmung der Gefäßstrecke erfolgte durch manuelle Markierung aller perfundierten Gefäße und computergestützte Berechnung der Summe aller Strecken.

Zur Ermittlung des durchschnittlichen Gefäßdurchmessers im Defektareal wurde in gleicher Weise die Defektfläche am Operationstag als ROI eingesetzt. Unter Verwendung eines Rasters wurden zufällig 15 Blutgefäße im Referenzareal ausgewählt und ihr Durchmesser bestimmt. Anschließend wurde das arithmetische Mittel dieser 15 Messwerte berechnet.

### 3.2.2 Histomorphometrie

Die histomorphometrische Analyse der Präparate diente der Beurteilung der Gewebesammensetzung im Bereich des Knochendefektes zu verschiedenen Zeitpunkten.

Nach Explantation wurden die Knochen für 24 Stunden in 4 % gepuffertem Formalin fixiert und für 5 Wochen in 10 % EDTA bei 4 °C entkalkt. Anschließend wurden die entkalkten Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (jeweils eine Stunde mit 70 %, 80 %, 90 % und vier Mal eine Stunde mit 100 % Alkohol). Um das Gewebe paraffingängig zu machen, erfolgte die dreimalige, jeweils einstündige Behandlung der Präparate mit Xylol. Danach wurden die Knochen in heißes Paraffin eingebettet.

Nach Aushärtung wurden 5 µm dicke Schnittpräparate in sagittaler Schnittführung angefertigt und nach der Masson-Goldner-Methode gefärbt. Dazu wurden die Präparate zunächst zwischen 1 und 2 Minuten in Weigerts Eisenhämatoxylin gefärbt und nach 10- bis 15-minütiger Spülung unter fließendem Wasser weitere 5 bis 7 Minuten in Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin gefärbt. Nach Spülung mit 1 % Essigsäure erfolgte die Behandlung mit Molybdätosphorsäure-Orange bzw. Wolframatophosphorsäure-Orange bis zur kompletten Entfärbung der Bindegewebsstrukturen. Es folgte eine 5-minütige Gegenfärbung mit Lichtgrün nach Spülung mit 1 % Essigsäure. Abschließend wurden die Präparate nochmals 5 Minuten mit 1 % Essigsäure gespült und in Isopropanol entwässert.

Die histologischen Schnittpräparate wurden mit Hilfe eines 10x Weitwinkelobjektives (Olympus BX60 Microscope, Olympus, Tokyo, Japan) aufgezeichnet und computergestützt digital gespeichert (Zeiss Axio Cam und Axio Vision 3.1, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Zur Auswertung wurden diejenigen Schnitte ausgewählt, welche den größten Durchmesser des Knochendefektes abbildeten. Die Auswertung erfolgte mit dem Bildvermessungsprogramm ImageJ Analysis System (NIH, Bethesda, USA).

Es wurden folgende Parameter bestimmt:

- Defektfläche [mm<sup>2</sup>]

- Fläche des neu gebildeten Bindegewebes im Knochendefekt [mm<sup>2</sup>]
- Fläche des neu gebildeten Knochens im Knochendefekt [mm<sup>2</sup>]

Die Bestimmung erfolgte durch manuelle Markierung der jeweiligen Areale und computer-gestützte Errechnung des Flächenmaßes. Anschließend wurden die prozentualen Anteile der verschiedenen Gewebefractionen an der gesamten Defektfläche berechnet.

### **3.2.3 Immunhistochemie**

Im Rahmen der durchgeführten Studie wurde die Expression des Proliferationsmarkers proliferating cell nuclear antigen (PCNA) sowie des osteo- und angiogenen Wachstumsfaktors VEGF innerhalb des Knochendefektes mit immunhistologischen Methoden untersucht.

Die zur histomorphometrischen Analyse hergestellten Präparate wurden zunächst deparaffiniert. Dazu wurden die Schnitte drei Mal 3 Minuten mit Xylol behandelt und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe von 100 % bis 70 % für jeweils 2 bis 3 Minuten rehydriert. Nach Spülung in destilliertem Wasser wurde die endogene Peroxidase durch 10-minütiges Einlegen der Präparate in 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geblockt. Als Blockierungsreagenz diente eine Mischung aus 1 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und 30 µl Normalserum. Es wurden 75 µl dieser Mischung auf das Präparat pipettiert, anschließend wurde dieses für 30 Minuten in feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Schnitte wurden im Folgenden nach wiederholter Spülung mit destilliertem Wasser angedaut. Dies geschah durch Kochen der Präparate in 200 ml Citratpuffer pH 6,0 bei 700 W in einer großen Küvette. Während und nach dem Kochen wurde destilliertes Wasser aufgefüllt. Die Schnitte wurden nach 25-minütiger Abkühlung bei Raumtemperatur zunächst mit destilliertem Wasser, anschließend mit PBS gespült.

Die Präparate wurden nach Applikation der jeweiligen Primärantikörper gegen PCNA (monoklonaler Maus-Antikörper, 1:50, Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark) und VEGF (monoklonaler Maus-Antikörper, 1:100, Abcam, Cambridge, UK) über Nacht in feuchter

Kammer inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Schnitte 3 Minuten mit PBS gespült. Nach Ausguss des Puffers erfolgte die erneute, nun 5-minütige Spülung mit PBS.

In einem nächsten Schritt wurden 100 ml eines peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpers (Ziege-anti-Maus-IgG 1:200, Abcam, Cambridge, UK) aufgetragen und 30 Minuten in feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt erfolgte mit Sekundärantikörpern sowohl gegen PCNA als auch gegen VEGF. Die folgende Spülprozedur entsprach dem oben für den Primärantikörper beschriebenen Vorgehen.

Diaminobenzidin (DAB) diente als Chromogen. Zur Herstellung wurde destilliertes Wasser mit je einer Tablette DAB und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vermischt. 100 µl des so hergestellten Reagenz wurden appliziert. Es folgte die 3-minütige Inkubation der Präparate in feuchter Kammer bei Raumtemperatur sowie die Spülung in destilliertem Wasser für 5 Minuten.

Die histologischen Schnitte wurden mit der Hämalaunmethode nach Mayer gegengefärbt. Hierzu erfolgte die Spülung in destilliertem Wasser sowie die 8-minütige Wässerung unter fließendem Leitungswasser. Nach erneuter Spülung mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe, beginnend mit 70 % Ethanol, endend bei 100 % Ethanol für jeweils 3 Minuten entwässert.

Abschließend wurden die Schnitte erneut drei mal 3 Minuten mit Xylol behandelt und schließlich eingedeckt.

Im Rahmen der Auswertung wurden die histologischen Schnitte auf das Vorliegen positiv gefärbter Zellen untersucht.

### **3.3 Statistik**

Alle statistischen Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben. Nach Testung der Normalverteilung und Varianz wurden im Rahmen der Vorversuche zur Modelletablierung die Messergebnisse der einzelnen postoperativen Untersuchungstage verglichen. Dies

erfolgte bei normal verteilten Variablen wie Gefäßdichte durch einseitige Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Tukey-Test. Nicht normal verteilte Variablen wie Defektfläche oder Gefäßdurchmesser wurden mittels Kruska-Wallis-Test (ANOVA on ranks) mit anschließendem Tukey-Test untersucht.

Die späteren Kontroll- und Verumgruppen wurden durch einseitige Varianzanalyse mit anschließendem Student-t-Test untereinander verglichen. Weiterhin wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson genutzt, um die Korrelation zwischen zurückgelegter Laufstrecke und Ergebnissen der IVM zu überprüfen. Zur Erstellung der Statistik wurde das SigmaStat Software Package (Jandel, San Rafael, USA) genutzt.

Es wurde ein p-Wert von  $< 0,05$  festgelegt, um signifikante Unterschiede anzuzeigen.

# 4 Ergebnisse

## 4.1 Postoperativer Verlauf und Laufstrecke

Alle Versuchstiere wurden nach dem operativen Eingriff bis zum völligen Wiedererlangen des Bewusstseins und im weiteren Verlauf über die gesamte Standzeit beobachtet. Hierbei wurde insbesondere auf das Auftreten pathologischer Verhaltensmuster geachtet.

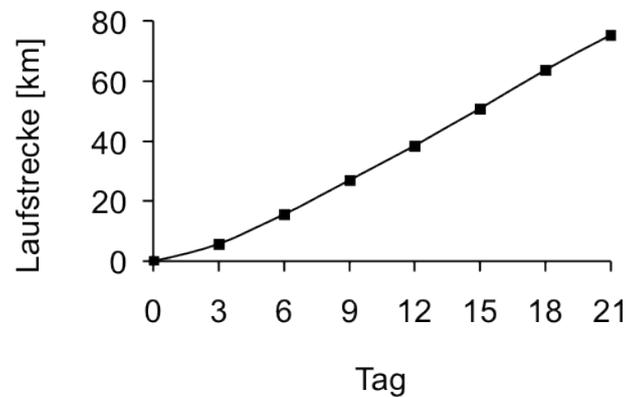
Postoperative Ausschlusskriterien waren Knochen- oder Weichteilinfekte, eine signifikante Gewichtsabnahme sowie eine Dislokation des Deckglases bzw. ein Defekt des Schädelfens-ters.

Das Futter wurde postoperativ ebenso wie das Trinkwasser von allen Tieren in angemessener Menge angenommen.

Eine am Operationstag sowie gelegentlich am ersten postoperativen Tag zu beobachtende leicht verminderte Aktivität der Versuchstiere normalisierte sich spätestens ab dem zweiten postoperativen Tag. Das Verhalten der Mäuse entsprach postoperativ somit einem mit dem präoperativen Zustand vergleichbaren physiologischen Verhalten ohne wesentliche Beeinträchtigung oder äußere Schmerzzeichen.

Die gute Rekonvaleszenz der Tiere zeigte sich im Weiteren daran, dass die Mäuse der entsprechenden Versuchsgruppe am dritten postoperativen Tag durchschnittlich bereits eine Strecke von 5,7 km im Laufrad zurücklegten. Dies entsprach in etwa der in der präoperativen Testung gemessenen durchschnittlichen Laufstrecke.

Im weiteren postoperativen Verlauf zeigte sich in der entsprechenden Gruppe eine kontinuierliche Benutzung des angebotenen Laufrades durch die Versuchstiere (Abb. 9).



**Abb. 9:** Kumulative Darstellung der zurückgelegten Laufstrecke, angegeben als Mittelwerte

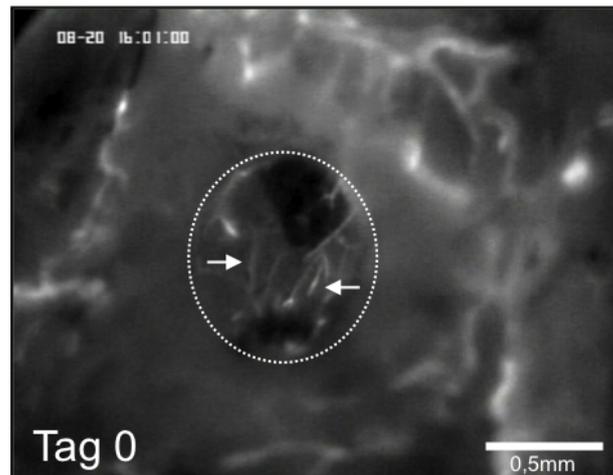
## 4.2 Makroskopischer Befund

Die Versuchstiere wurden post mortem auf das Vorliegen eventueller pathologischer Veränderungen hin untersucht. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf Anzeichen einer Destruktion des Schädelfensters sowie auf lokale Gewebereaktionen im Bereich des Schädelfensters gelegt. Bei keinem der Tiere fanden sich Hinweise auf eine Lockerung der fixierenden Schrauben, Infektionen oder andere postoperative Ausschlusskriterien.

Nach Entfernung der Schrauben und des Deckglases wurde zusätzlich der Knochendefekt makroskopisch untersucht. Zu frühen Untersuchungszeitpunkten, wie etwa am 9. postoperativen Tag, war der Defekt noch gut erkennbar, was im weiteren Verlauf zunehmend schwieriger wurde. Nach 21 Tagen konnte das ehemalige Defektareal makroskopisch nicht mehr vom umgebenden Knochen unterschieden werden.

### 4.3 Intravitalmikroskopie

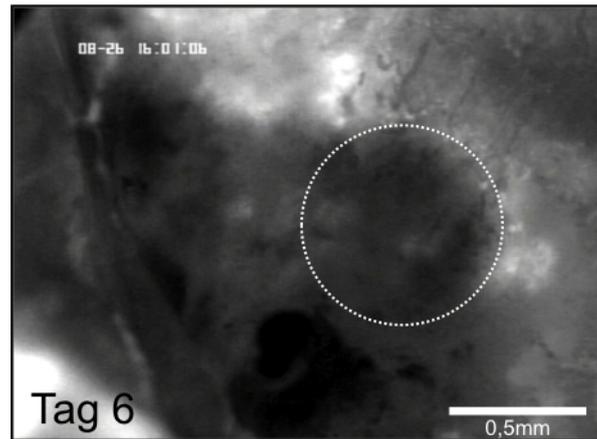
Die erste intravitalmikroskopische Untersuchung am Operationstag zeigte lediglich einige vorbestehende Blutgefäße auf der inneren Oberfläche der intakt gebliebenen Kortikalis am Boden des Knochendefektes (Abb. 10).



**Abb. 10:** Blutgefäße (Pfeile) auf der intakt gebliebenen inneren Oberfläche der Kortikalis am Boden des Knochendefektes (gepunkteter Kreis)

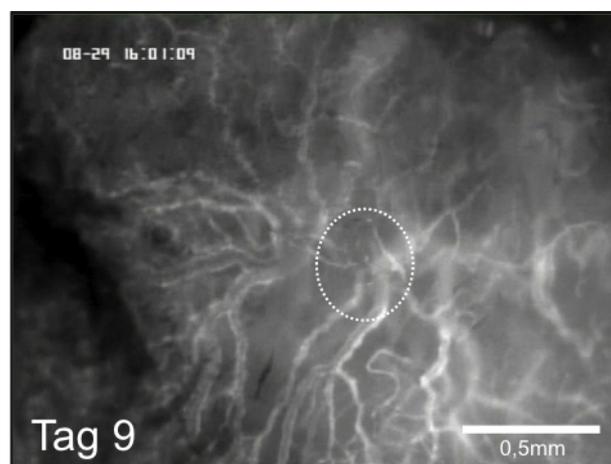
Auch am 3. postoperativen Tag konnten noch keine neu gebildeten perfundierten Gefäße nachgewiesen werden. In der Mehrzahl der Fälle waren zu diesem Untersuchungszeitpunkt auch die oben erwähnten Kortikalisgefäße nicht mehr sichtbar.

Einige der untersuchten Knochendefekte wiesen auch am 6. postoperativen Tag noch ein vollständiges Fehlen von neu entstandenen Blutgefäßen auf (Abb. 11). Bei anderen Tieren konnten zu diesem Zeitpunkt jedoch bereits erste Gefäßaussprossungen nachgewiesen werden.



**Abb. 11:** Fehlender Nachweis einer Neoangiogenese am 6. postoperativen Tag

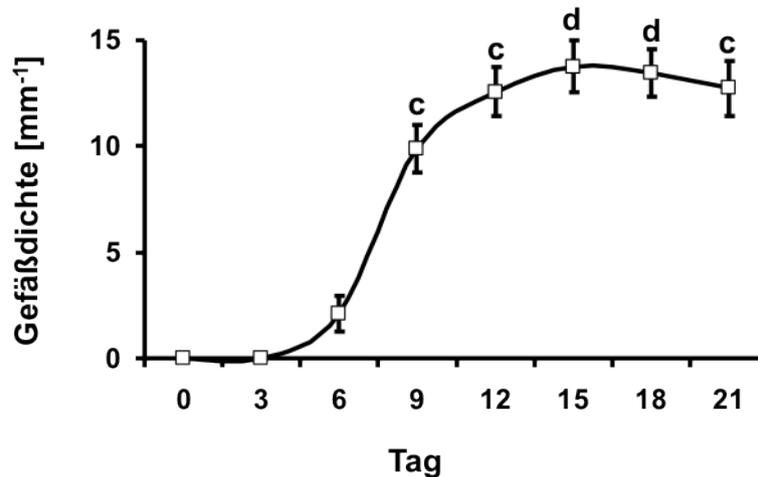
Alle untersuchten Tiere zeigten am 9. postoperativen Tag ein dichtes Geflecht neu entstandener Blutgefäße mit zahlreichen Aussprossungen als Zeichen aktiver Neoangiogenese. Dabei war die Neubildung von Blutgefäßen nicht auf das Defektareal begrenzt, sondern betraf auch die Oberfläche des umgebenden Knochens der Schädelkalotte (Abb. 12).



**Abb. 12:** Dichtes Netzwerk neu gebildeter Gefäße am 9. postoperativen Tag

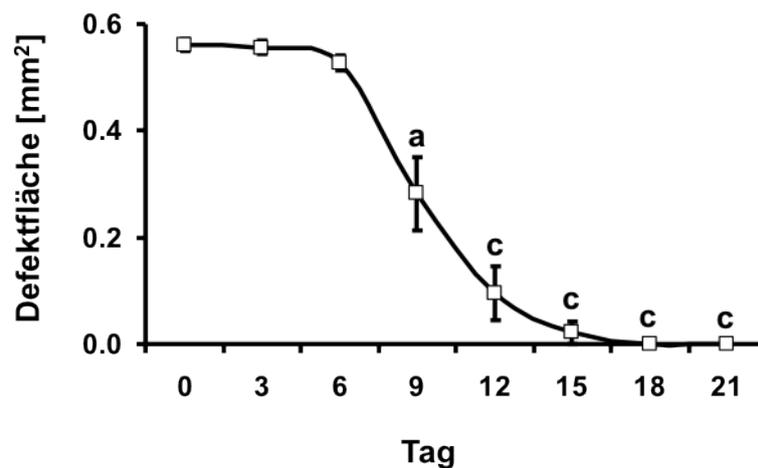
Die Blutgefäßdichte nahm bis zum 15. postoperativen Tag kontinuierlich zu, um dann im Verlauf des verbleibenden Untersuchungszeitraumes bis zum 21. postoperativen Tag wieder leicht abzunehmen. Dabei zeigte sich an den Tagen 15 und 18 eine im Vergleich zu

den Zeitpunkten 0, 3, 6 und 9 signifikant erhöhte Gefäßdichte im Defektareal ( $p < 0,05$ ). An den postoperativen Tagen 9, 12 und 21 war die Gefäßdichte signifikant höher als an den Tagen 0, 3 und 6 ( $p < 0,05$ ) (Abb. 13).

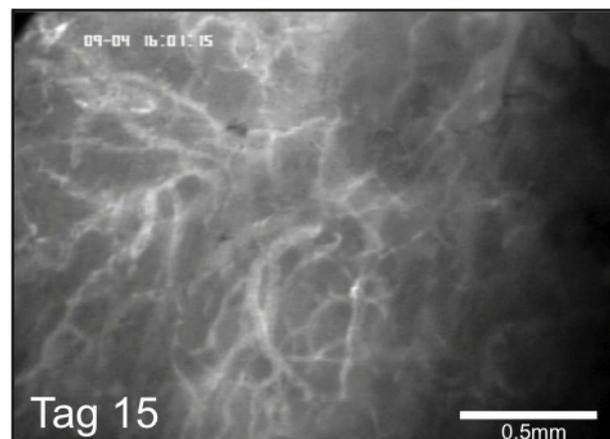


**Abb. 13:** Bestimmung der Gefäßdichte durch IVM. Angaben als Mittelwerte  $\pm$  SEM. <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0, 3 und 6, <sup>d</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0, 3, 6 und 9.

Die Vermessung der Defektgröße ergab keine signifikante Änderung bis zum 6. postoperativen Tag (Tag 0:  $0,562 \pm 0,045$  mm<sup>2</sup> vs. Tag 6:  $0,528 \pm 0,057$  mm<sup>2</sup>,  $p > 0,05$ ). Im Zeitraum vom 6. bis zum 18. postoperativen Tag fand sich jedoch eine signifikante Abnahme der Defektgröße im Vergleich zur Größe am Operationstag. Dabei war die Defektgröße an den postoperativen Tagen 12, 15, 18 und 21 signifikant geringer als an den Tagen 0, 3 und 6 ( $p < 0,05$ ; Abb. 14). Ab dem 18. postoperativen Tag war der Defekt intravitalmikroskopisch nicht mehr abgrenzbar. Zu diesen Zeitpunkten überzog ein durchgehendes dichtes Geflecht aus neu entstandenen Blutgefäßen die im Schädelfenster sichtbare Schädeldecke (Abb. 15).

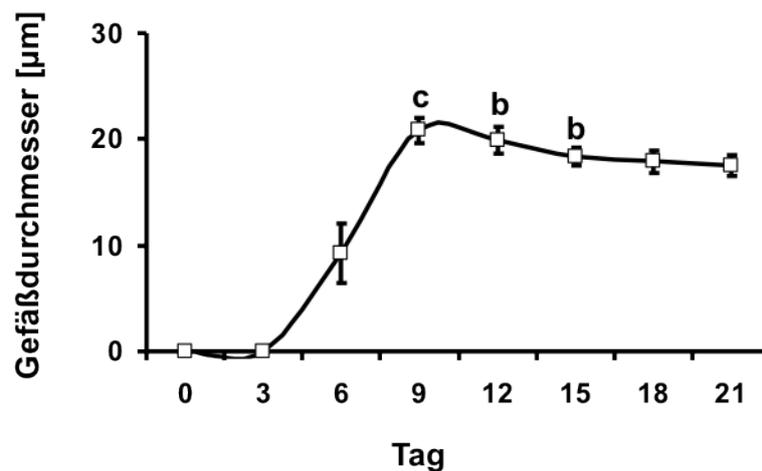


**Abb. 14:** Bestimmung der Defektfläche durch IVM. Angaben als Mittelwerte  $\pm$  SEM. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0, <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0, 3 und 6.



**Abb. 15:** Nicht mehr abgrenzbarer Defektrand am 15. postoperativen Tag

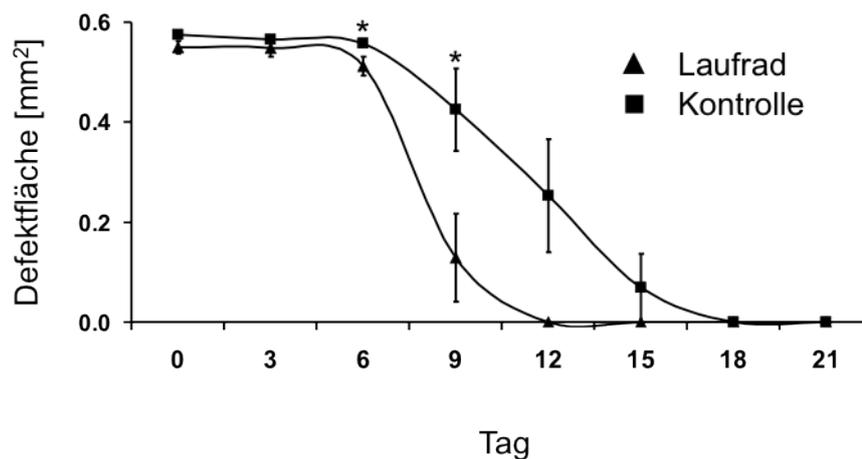
Die Auswertung des durchschnittlichen Durchmessers der neu gebildeten Gefäße im Defektareal zeigte, dass bis zum 9. postoperativen Tag eine Zunahme des Gefäßdurchmessers zu verzeichnen war. Im weiteren Verlauf war der durchschnittliche Gefäßdurchmesser im Bereich des Knochendefektes wieder leicht rückläufig. Es fand sich am 9. postoperativen Tag ein im Vergleich zu Tag 0, 3 und 6 signifikant größerer durchschnittlicher Gefäßdurchmesser ( $p < 0,05$ ). Am 12. und 15. postoperativen Tag war der Gefäßdurchmesser im Vergleich zu den Tagen 0 und 3 signifikant größer ( $p < 0,05$ ; Abb. 16).



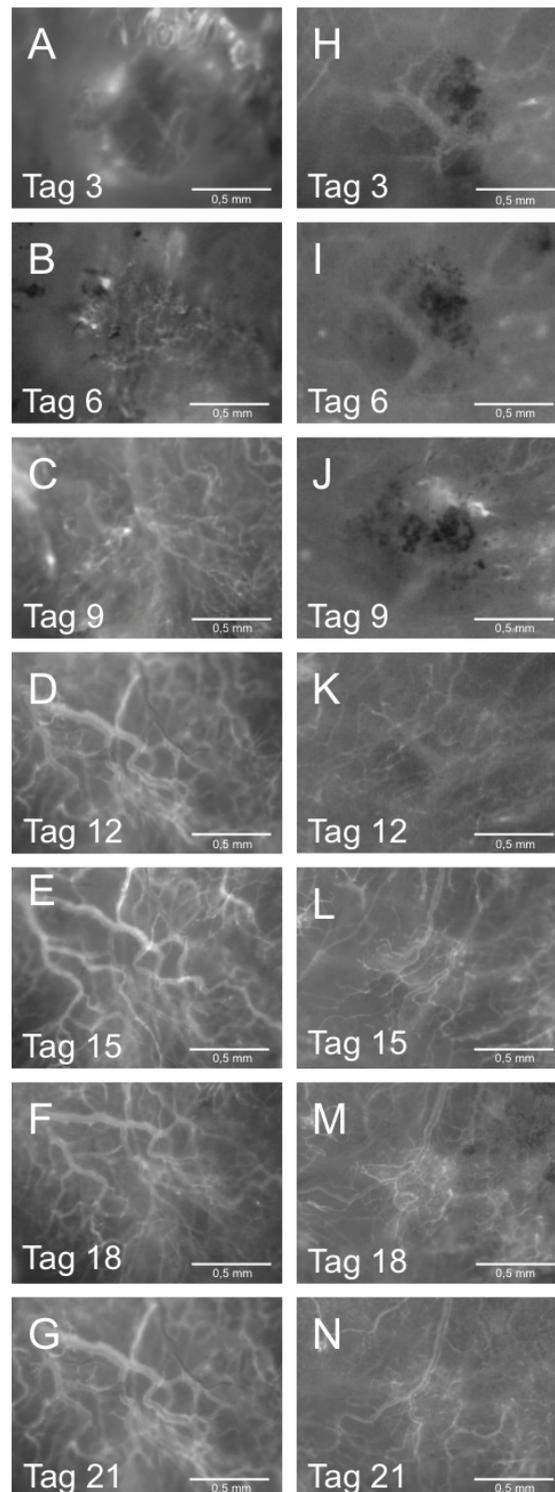
**Abb. 16:** Bestimmung des durchschnittlichen Gefäßdurchmessers durch IVM. Angaben als Mittelwerte  $\pm$  SEM. <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0 und 3, <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0, 3 und 6.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Ergebnisse der Versuchstiere mit normaler körperlicher Aktivität (Kontrollen) mit den Daten von Tieren mit gesteigerter körperlicher Aktivität (Laufradtiere) verglichen.

Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen zeigten an den postoperativen Tagen 6 und 9 bei Tieren mit gesteigerter physischer Aktivität eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verringerte Defektfläche ( $p < 0,05$ ; Abb. 17 und 18).

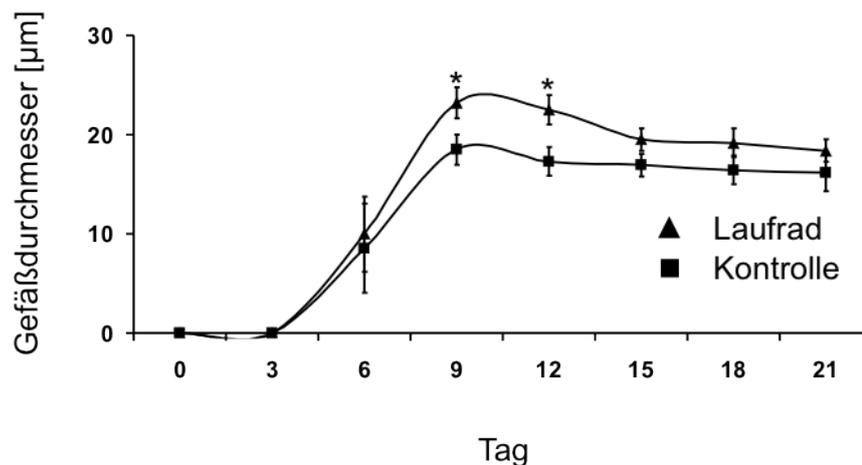


**Abb. 17:** Bestimmung der Defektfläche durch IVM bei Tieren mit normaler (Quadrate) und gesteigerter (Dreiecke) physischer Aktivität. Angaben als Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  im Vergleich zum entsprechenden Wert der Laufradgruppe.



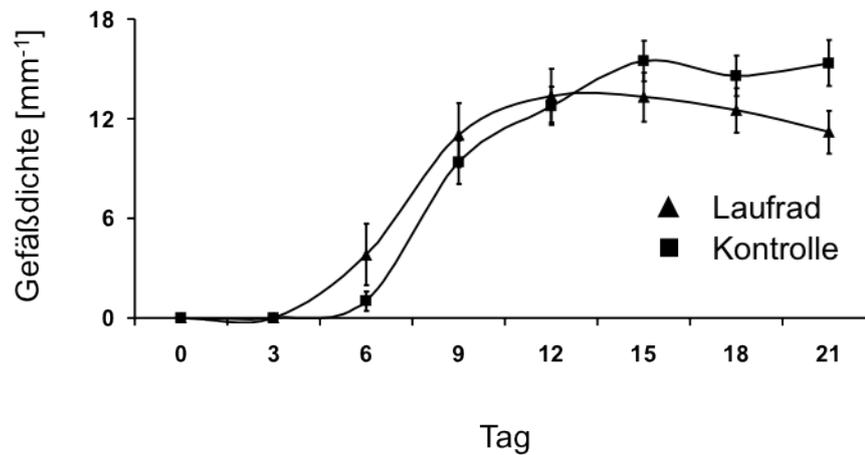
**Abb. 18:** IVM-Darstellung des Knochendefektes bei einem Tier mit gesteigerter (A-G) und einem Tier mit normaler physischer Aktivität (H-N). Bei dem Tier mit normaler Aktivität besteht am 6. postoperativen Tag noch ein ausgeprägtes Ödem (I), während die Maus mit gesteigerter Aktivität bereits neu gebildete Gefäße aufweist (B). Bei beiden Tieren nimmt die Blutgefäßdichte kontinuierlich zu, der durchschnittliche Durchmesser der Gefäße ist bei dem Tier mit gesteigerter Aktivität größer. Gleichzeitig verkleinert sich der Knochendefekt bei diesem Tier schneller als bei der Maus mit normaler physischer Aktivität.

Bei Tieren mit gesteigerter physischer Aktivität fand sich darüber hinaus am 9. und 12. postoperativen Tag ein im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhter durchschnittlicher Durchmesser der im Defektareal neu gebildeten Blutgefäße ( $p < 0,05$ ). Dieser Effekt ließ sich bis zum 21. Tag durchgehend beobachten, wies ab dem 15. postoperativen Tag jedoch keine Signifikanz mehr auf ( $p < 0,05$ , Abb. 18 und 19).



**Abb. 19:** Bestimmung des durchschnittlichen Gefäßdurchmessers durch IVM bei Tieren mit normaler (Quadrate) und gesteigerter (Dreiecke) physischer Aktivität. Angaben als Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  im Vergleich zum entsprechenden Wert der Kontrollgruppe.

Die vergleichende Analyse der Blutgefäßdichte im Bereich des Knochendefektes zeigte zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen Versuchstieren mit normaler und gesteigerter physischer Aktivität ( $p > 0,05$ , Abb. 18 und 20).

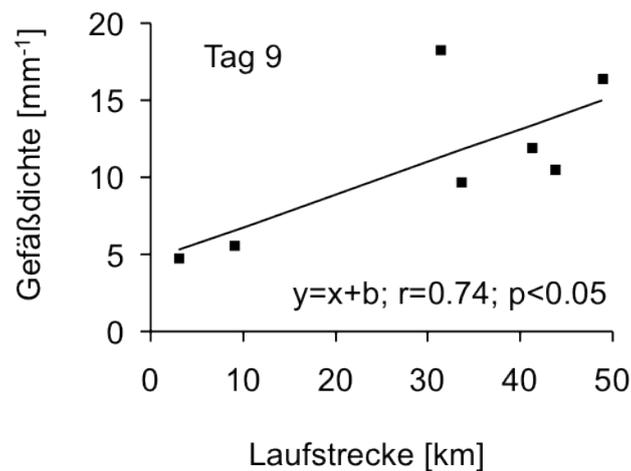


**Abb. 20:** Bestimmung der Gefäßdichte durch IVM bei Tieren mit normaler (Quadrate) und gesteigerter (Dreiecke) physischer Aktivität. Angaben als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ) zwischen den beiden Versuchsgruppen.

Neben den vergleichenden Analysen zwischen Laufrad- und Kontrolltieren wurde in der Versuchsgruppe mit gesteigerter physischer Aktivität die Korrelation zwischen zurückgelegter Laufstrecke und den durch IVM erhobenen Daten untersucht. Dabei zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen Laufstrecke und gemessener Fläche des Knochendefektes ( $p > 0,05$ ) sowie durchschnittlichem Gefäßdurchmesser ( $p > 0,05$ ). Es ergab sich jedoch eine signifikante Korrelation zwischen zurückgelegter Laufstrecke und der Blutgefäßdichte im Knochendefekt am 9. postoperativen Tag ( $p < 0,05$ , Tab. 2 und Abb. 21).

	Korrelationskoeffizient						
	Tag 3	Tag 6	Tag 9	Tag 12	Tag 15	Tag 18	Tag 21
LS - Defektfläche	0,051	-0,496	-0,485	-	-	-	-
LS - Gefäßdichte	-	0,248	0,737*	-0,024	0,547	0,548	0,429
LS - Gefäßdurchmesser	-	0,622	0,125	-0,165	-0,191	0,006	-0,234

**Tab. 2:** Korrelationsanalyse (Pearson-Koeffizient) zwischen Laufstrecke (LS) und Ergebnissen der IVM (Defektfläche, Gefäßdichte und durchschnittlicher Gefäßdurchmesser) in der Gruppe mit gesteigerter Aktivität. \* $p < 0,05$ .



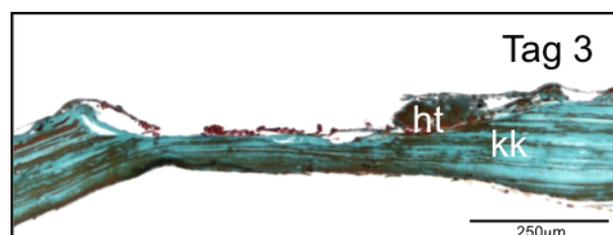
**Abb. 21:** Korrelation (Pearson-Koeffizient) zwischen Laufstrecke und Gefäßdichte am 9. postoperativen Tag.

## 4.4 Histomorphometrie

Die histomorphometrische Auswertung erfolgte am sagittalen Schnittpräparat im Bereich des maximalen Durchmessers des Knochendefektes.

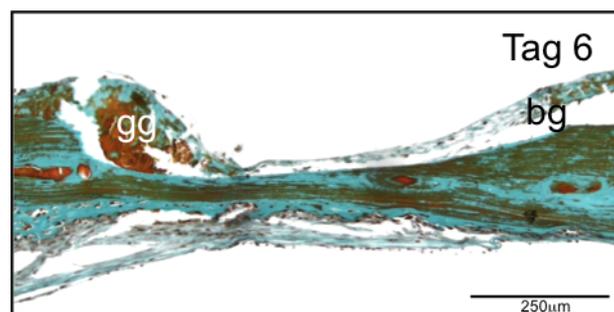
Es fand sich bei allen untersuchten histologischen Schnittpräparaten das typische Muster einer desmalen Knochenregeneration ohne knorpelige Zwischenstufen.

Am 3. postoperativen Tag waren im Bereich des Knochendefektes keinerlei Blutgefäße nachweisbar. Es fanden sich Anteile eines posttraumatischen Hämatoms (Abb. 22).

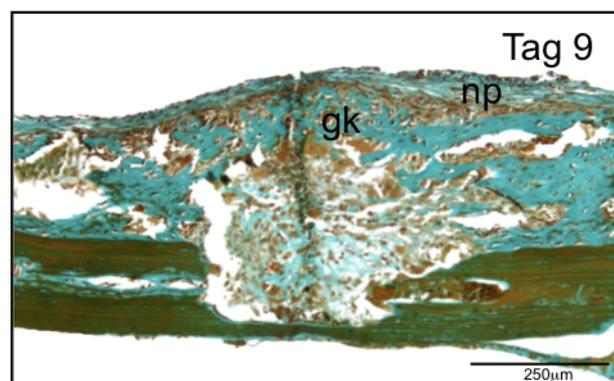


**Abb. 22:** Histologischer Schnitt eines Knochendefektes am 3. postoperativen Tag. Der Defekt des kortikalen Knochens (kk) enthält hauptsächlich Anteile eines Hämatoms (ht).

Der Knochendefekt war am 6. postoperativen Tag vorwiegend mit Bindegewebe ausgefüllt (Abb. 23). Im weiteren Verlauf war ab dem 9. Tag nach Operation eine ausgeprägte Knochenneubildung zu beobachten, welche den Defekt überbrückte. Dabei reichte die Kallusformation deutlich über die Defektränder hinaus. Der neu gebildete Geflechtknochen wurde von einer Bindegewebsschicht bedeckt, welche zahlreiche Blutgefäße enthielt und die charakteristischen Eigenschaften von Periost aufwies (Abb. 24).



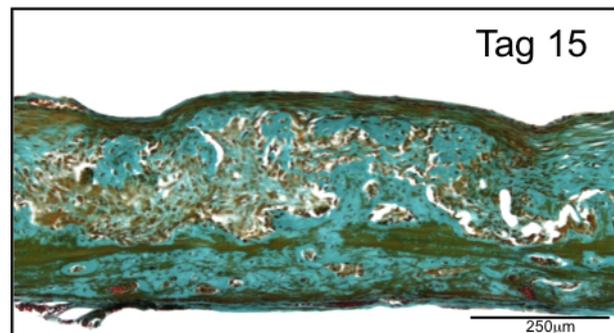
**Abb. 23:** Histologischer Schnitt eines Knochendefektes am 6. postoperativen Tag. Es finden sich Bindegewebe (bg) und Granulationsgewebe (gg).



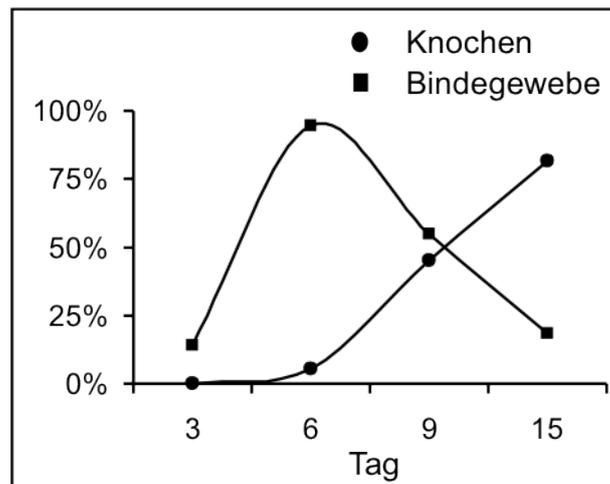
**Abb. 24:** Histologischer Schnitt eines Knochendefektes am 9. postoperativen Tag. Der Defekt ist von Geflechtknochen (gk) überbrückt, welcher von einem Neo-Periost (np) mit zahlreichen Blutgefäßen bedeckt ist.

Das Bindegewebe, welches den Knochendefekt am 9. postoperativen Tag noch zu mehr als 50 % ausfüllte, war am 15. Tag fast vollständig durch Knochen ersetzt worden, der sich im Stadium eines intensiven Remodelling befand (Abb. 25).

Die quantitative Auswertung der Verteilung der einzelnen Gewebefractionen im Knochen- defekt zeigte, dass der Anteil an neu gebildetem Knochen bis zum spätesten ausgewerteten Zeitpunkt (Tag 15) kontinuierlich anstieg. Die Bindegewebsfraction erreichte ihren Ma- ximalwert am 6. postoperativen Tag und nahm im weiteren Verlauf wieder deutlich ab (Abb. 26).



**Abb. 25:** Histologischer Schnitt eines Knochendefektes am 15. postoperativen Tag. Das Bindegewebe ist nahezu vollständig durch Geflechtknochen ersetzt.



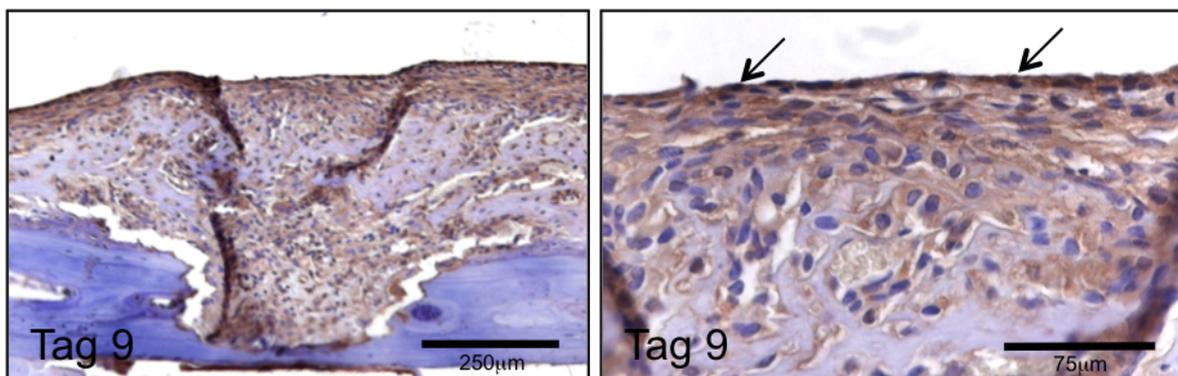
**Abb. 26:** Quantitative Analyse der Verteilung der einzelnen Gewebefractionen im Knochendefekt.

## 4.5 Immunhistochemie

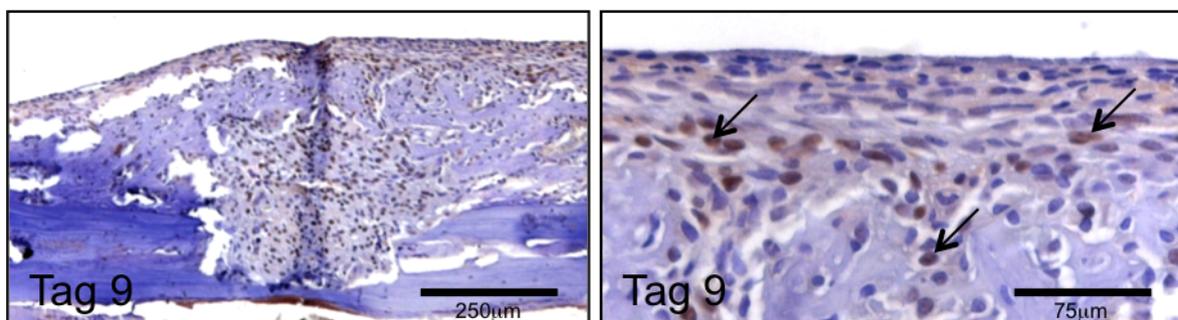
In immunhistochemischen Untersuchungen wurde die Expression des angio- und osteogenen Wachstumsfaktors VEGF sowie des Proliferationsmarkers PCNA innerhalb des Knochendefekts untersucht.

Am 9. postoperativen Tag waren ebenso wie 6 Tage später zahlreiche VEGF-positive Zellen im neu gebildeten Geflechtknochen und Neo-Periost nachweisbar. Die intensivste Färbung wiesen dabei Zellen im Neo-Periost am 9. postoperativen Tag auf (Abb. 27).

Ein vergleichbares Ergebnis zeigte sich in der PCNA-Färbung. Insbesondere am 9. postoperativen Tag wurden in den immunhistochemischen Schnittpräparaten PCNA-positive Osteoblasten gefunden (Abb. 28).



**Abb. 27:** Immunhistochemische Färbung für VEGF am 9. postoperativen Tag. Übersichtsbild (links) und Ausschnitt der Oberfläche des heilenden Defektes (rechts). Pfeile markieren VEGF-positive Zellen.



**Abb. 28:** Immunhistochemische Färbung für PCNA am 9. postoperativen Tag. Übersichtsbild (links) und Ausschnitt der Oberfläche des heilenden Defektes (rechts). Pfeile markieren PCNA-positive Osteoblasten.

# 5 Diskussion

## 5.1 Diskussion der Methoden

Die Knochenheilung ist ein komplexer biologischer Prozess, bei dem die Interaktion auch knochenfremder Gewebetypen erforderlich ist. Hierzu zählen neben dem Gefäßsystem das periostäre Weichteilgewebe und das Periost. Insbesondere wegen der komplexen örtlichen und zeitlichen Interaktionen während der verschiedenen Phasen der Frakturheilung sowie des nur schlecht reproduzierbaren ossären “micro-environment” sind *in vitro*-Untersuchungen zur Knochenheilung als nur begrenzt aussagekräftig einzustufen (Friedman et al. [30]). Da auch eine gesteigerte physische Aktivität mit den resultierenden Anpassungsvorgängen des Organismus nicht *in vitro* simuliert werden kann, wurden die Studien im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Tiermodell durchgeführt.

Im Gegensatz zum Menschen findet sich im murinen Knochen kein Havers-System. Im Hinblick auf die Übertragbarkeit von Untersuchungsergebnissen aus Studien an der Maus auf den Menschen kann diese Tatsache durchaus als nachteilig gewertet werden. Der Remodelling-Prozess während der murinen Frakturheilung, der unter Ausbildung von Resorptionshöhlen abläuft, weist jedoch deutliche Parallelen zum Remodelling auf, wie es für die Knochenheilung beim Menschen charakteristisch ist (Nunamaker [78]). Damit wird die Limitation des Mausmodells relativiert. Weiterhin ist die Durchführung von Studien an der Maus wegen relativ geringer Zucht- und Haltungskosten von Vorteil. So können größere Gruppen realisiert werden als im Großtiermodell. Die Tatsache, dass das Genom der Maus vollständig entschlüsselt ist, stellt neben der Verfügbarkeit von zahlreichen spezifischen

Antikörpern einen weiteren Vorteil des Mausmodells dar. Auch kann das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Mausmodell künftig für Folgeversuche an verschiedenen der zahlreichen für die Maus existierenden transgenen Stämme verwendet werden (Rossant und Nagy [93]).

Bei der Verwendung von Tiermodellen sollte stets die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die klinische Situation diskutiert werden. Im Bezug auf das vorgestellte Schädelfenstermodell müssen hierbei insbesondere Unterschiede zwischen platten Knochen wie der Schädelkalotte und Röhrenknochen beachtet werden. Dies betrifft hauptsächlich die Bereiche Anatomie, Morphologie, Blutversorgung und den Ablauf des Heilungsprozesses.

Verglichen mit Röhrenknochen ist die Kalotte relativ schlecht vaskularisiert, eigene Aa. nutriciae fehlen (Prolo et al. [84], Sirola [100]). Das Schädeldach erhält seine Blutversorgung hauptsächlich aus Ästen der A. meningea media sowie aus Arteriolen, welche aus den Arterien der Dura mater hervorgehen (Cutting et al. [24]). Lediglich ein geringer Anteil der Blutversorgung erfolgt durch Arteriolen an der äußeren Oberfläche der Kalotte und durch Gefäße des M. temporalis (Schmitz und Hollinger [98]).

Beim Menschen heilen selbst kleine Knochendefekte der Kalotte oftmals nicht knöchern aus, was durch die relativ schlechte Blutversorgung zu erklären ist. Die histomorphometrische Analyse der Knochendefekte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte jedoch bereits am 9. postoperativen Tag eine vollständige knöcherne Überbauung, sodass davon auszugehen ist, dass die murine Kalotte ein höheres regeneratives Potential aufweist, als die menschliche. Dieser Tatsache muss bei der Bewertung der gewonnenen Ergebnisse Rechnung getragen werden.

Das verwendete Modell erlaubte die intravitalmikroskopische Analyse der Angiogenese im Bereich eines Knochendefektes der Schädelkalotte über einen Zeitraum von 3 Wochen. Da unsere Vorversuche gezeigt hatten, dass nach 18 Tagen sowohl ein *Steady State* im Hinblick auf Blutgefäßdichte und Gefäßdurchmesser, als auch eine vollständige Heilung des Knochendefektes erreicht waren, kann dieser Untersuchungszeitraum als angemessen erachtet werden.

Es ist bekannt, dass die biomechanischen Gegebenheiten im Bereich eines Frakturspaltes oder Knochendefektes großen Einfluss auf die Knochenheilung haben (Claes et al. [22]). Die Ergebnisse von Studien zur Angiogenese an Frakturmodellen, bei denen der verletzte Knochen belastet wird, sind somit stets durch die einwirkenden äußeren Kräfte beeinflusst, welche wiederum stark von der Stabilität der gewählten Osteosynthese abhängen.

In früheren Studien wurde bereits ein positiver Einfluss körperlicher Aktivität auf den Knochenstoffwechsel beschrieben. Da diese Untersuchungen jedoch an Röhrenknochen durchgeführt wurden, welche mechanischer Belastung ausgesetzt waren, kann hier nicht sicher ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Effekt auch durch die direkt auf den Frakturspalt einwirkende Kraft beeinflusst wurde (Horcajada et al. [50], Menuki et al. [72], Peng et al. [82], Tøndevold und Bülow [110], Tuukkanen et al. [113], Yao et al. [120]).

Unser Ziel war es, die Angiogenese im Rahmen der Knochenheilung unter Ausschaltung mechanischer, auf den Knochen einwirkender Kräfte zu untersuchen. Anders als bei Frakturmodellen am Femur oder an der Tibia können wir durch den Einsatz eines Schädelfensters ausschließen, dass lokale mechanische Belastungen die Prozesse der Knochenregeneration und damit die gewonnenen Ergebnisse beeinflussen.

Es wurden bereits Knochenkammern im Bereich der Schädelkalotte beschrieben, welche unter anderem zur Implantation zytokinbeladener Gele oder Scaffolds benutzt wurden (Dellian et al. [27], Klenke et al. [63]). Das in der vorliegenden Arbeit etablierte Modell wurde zur Untersuchung der Neoangiogenese eines nicht durch Implantate oder sonstige eingebrachte körperfremde Materialien beeinflussten Knochendefektes benutzt.

Weiterhin analysierten wir die Heilung des Knochendefektes zu verschiedenen Zeitpunkten histologisch und immunhistochemisch. So konnten wir Informationen über die Art der Knochenregeneration, die Zusammensetzung des regenerierenden Gewebes sowie die angiogene und proliferative Aktivität während der Knochenheilung gewinnen. Derartige Informationen wurden nach unserem Wissen bislang durch frühere Arbeiten, bei denen intravitalmikroskopische Untersuchungen an Knochenkammern der Schädelkalotte durchgeführt wurden, nicht erbracht (Dellian et al. [27], Klenke et al. [63]).

Die quantitative histologische Auswertung des regenerierenden Gewebes im Frakturspalt beziehungsweise im Bereich des Knochendefektes stellt die Standardmethode in der Untersuchung der Knochenheilung dar (Gerstenfeld et al. [34]). Zur Sicherstellung standardisierter histomorphometrischer Analysen führten wir unsere Untersuchungen gemäß den Messparametern und der Nomenklatur der American Society for Bone Mineral Research (ASBMR) durch (Parfitt et al. [80]). Als Ergänzung zu histomorphometrischen Untersuchungen können zusätzlich Proteine wie Zytokine und Zellmarker innerhalb regenerierender Gewebe durch immunhistochemische Analysen in-situ dargestellt werden (Holstein et al. [47]).

Die heterogene dreidimensionale Struktur des Knochendefektes erschwert die standardisierte Auswertung anhand zweidimensionaler Schnittpräparate. Die Vergleichbarkeit der Präparate war dennoch gegeben, da jeweils derjenige histologische Schnitt zur Analyse herangezogen wurde, welcher den größten Durchmesser des Knochendefektes aufwies.

Es können grundsätzlich sowohl kalzifizierte als auch dekalzifizierte Knochen histologisch aufgearbeitet werden (Gerstenfeld et al. [34]). Wir verwendeten in der vorliegenden Studie dekalzifizierte Präparate, um auch immunhistochemische Färbungen durchführen zu können. Die fehlende Möglichkeit, eine Aussage zum Kalksalzgehalt des untersuchten Knochens treffen zu können, ist als Nachteil bei der Verwendung dekalzifizierter Knochenpräparate zu nennen.

Dellian et al. und Klenke et al. etablierten in verschiedenen Untersuchungen ein dem in unserer Arbeit beschriebenen Schädelfenster ähnliches Modell (Dellian et al. [27], Klenke et al. [63]). Allerdings wurde in diesem Modell die Schädelkalotte im Defektareal samt der inneren Kortikalis entfernt, sodass die neu gebildeten, in den Knochendefekt einwachsenden Gefäße hier dem Gefäßsystem der Pia mater entstammten. Im Gegensatz dazu wird in dem von uns etablierten Modell die Angiogenese nicht durch die Gefäße der Meningen beeinflusst, da die Penetration der inneren Kortikalis vermieden wurde. Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass das vorliegende Modell als repräsentativ für die Analyse der Knochendefektheilung nicht nur an der Schädelkalotte, sondern an platten Knochen allgemein anzusehen ist.

In beiden zuvor genannten Studien wurden Cyanacrylatkleber und Methylmethacrylat-Polymere benutzt, um das Deckglas der Knochenkammer zu befestigen. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese Stoffe die Knochenheilung beeinflussen, modifizierten wir unser Modell insofern, als dass wir rostfreie Edelstahlschrauben zur Befestigung der Deckgläser verwendeten.

Hansen-Algenstaedt et al. beschrieben 2005 ein Knochenkammermodell, welches die intravitale Mikroskopie der Mikrozirkulation während der Knochenheilung im Mäusefemur erlaubt (Hansen-Algenstaedt et al. [37]). Darüber hinaus untersuchten die Autoren die Bildung kalzifizierten Gewebes unter Verwendung des Fluoreszenzmarkers Oxytetracyclin. Ein wesentlicher Nachteil dieser Studie ist unserer Ansicht nach jedoch das Fehlen einer histologischen Auswertung. So konnten keine detaillierten Informationen zur Art der Knochenheilung (desmal vs. enchondral) und dem Gewebetyp, in dem die neu gebildeten Blutgefäße nachgewiesen wurden, gewonnen werden.

Es ist bekannt, dass sowohl für die Ausbildung eines Frakturkallus als auch für die Heilung eines Knochendefektes die Neoangiogenese essentiell ist (Brighton und Hunt [13], Gerstenfeld et al. [33], Glowacki [35]). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde Neoangiogenese im neu gebildeten Periost nachgewiesen. Diese Schlussfolgerung beruht auf der Tatsache, dass in der IVM Gefäße der Gewebeoberfläche beobachtet wurden. Wie durch die histomorphometrische Analyse gezeigt wurde, bestand diese Oberfläche in dem hier vorgestellten Modell aus neu entstandenem Periost.

Dies wirft die Frage auf, ob es als Nachteil des Modells anzusehen ist, dass zwar periostale, nicht aber intraossäre Blutgefäße analysiert werden können. Nach unserer Ansicht ist dies jedoch sogar ein Vorteil des vorgestellten Modells, da die Vaskularisierung des Periosts eine herausragende Rolle bei der desmalen Knochenregeneration spielt. Ebenso ist bekannt, dass Blutgefäße des Kallus aus dem Gefäßsystem des Periosts gespeist werden. Somit wird deutlich, dass die periostale Vaskularisierung eine wichtige Grundvoraussetzung im Hinblick auf das Ergebnis der Knochenheilung darstellt (Brighton und Hunt [13], Gerstenfeld et al. [33], Glowacki [35], Rhineland [90], Zhang et al. [123]).

Insgesamt weist das im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte Modell dennoch einige Einschränkungen auf. So muss in Betracht gezogen werden, dass die Mehrzahl der im klinischen Bereich relevanten Frakturen an Röhrenknochen und nicht an platten Knochen auftritt. Als weitere Einschränkung im Hinblick auf alle Kammermodelle ist zu nennen, dass bislang nicht ausgeschlossen werden kann, dass die verwendeten Deckgläser den Heilungsprozess beeinflussen. Somit wäre es denkbar, dass mechanische, osteoinduktive oder inflammatorische Eigenschaften des Deckglases auch einen Einfluss auf die Angiogenese während der Knochenheilung haben.

Als weiterer Punkt ist die Gestaltung des in der vorliegenden Studie erzeugten Knochendefektes zu diskutieren. In unseren Versuchen wurde die innere Kortikalis der Schädelkalotte nicht penetriert. Eine solche, monokortikale Verletzung stellt im klinischen Alltag jedoch eine seltene Ausnahme dar. Wir waren uns dieser Tatsache bewusst, wollten jedoch aus oben genannten Gründen eine Beeinflussung der Knochenheilung durch die meningealen Gefäße verhindern.

Zusammenfassend stellt das im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte Modell unserer Meinung nach eine wertvolle Möglichkeit dar, die Angiogenese während der desmalen Knochenheilung im Mausmodell unter reproduzierbaren Bedingungen zu untersuchen. Insbesondere im Hinblick auf die Vielzahl verfügbarer spezifischer Antikörper für Mausmodelle und die große Vielfalt existierender Knock out-Stämme ermöglicht das vorgestellte Modell künftig einen praktikablen Ansatz für Untersuchungen der Angiogenese und Vaskularisation während der Knochenheilung.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Studie bestätigen die Hypothese, dass eine forcierte körperliche Aktivität die Angiogenese während der desmalen Knochenheilung im Mausmodell steigert.

Die intravitalmikroskopische quantitative Analyse der Blutgefäße zeigte im Rahmen der Modelletablierung einen kontinuierlichen Anstieg der durchschnittlichen Blutgefäßdichte

im Knochendefekt bis zum 15. postoperativen Tag. Diese Beobachtung repräsentiert die Ausbildung eines den Defekt bedeckenden Netzwerkes neu gebildeter Blutgefäße. Weiterhin zeigte die Intravitalmikroskopie neu entstandene Blutgefäße auf der Oberfläche des den Defekt umgebenden Knochens. Zum gleichen Zeitpunkt fand sich in der histologischen Untersuchung eine Kallusreaktion des Knochens über die Grenzen des Defektes hinaus. Diese Ergebnisse lassen schließen, dass das Auftreten eines Knochendefektes der Schädelkalotte zu einer angio- und osteogenen Reaktion führt, welche nicht auf den Defekt begrenzt ist, sondern auch die umgebende Region beeinflusst.

Die Beobachtung, dass in unseren intravitalmikroskopischen Analysen am 3. postoperativen Tag keinerlei Blutgefäße nachweisbar waren spricht für eine Involution der unmittelbar postoperativ noch sichtbaren Gefäße am Boden des Knochendefektes. Die Interpretation unserer Ergebnisse wird von vergleichbaren Studien an Knochenkammern bestätigt, in denen Gefäße erst ab dem 4. postoperativen Tag intravitalmikroskopisch nachgewiesen werden konnten (Dellian et al. [27]).

Die Blutgefäßdichte nahm nach Erreichen ihres Maximalwertes am 15. postoperativen Tag wieder ab. Ebenso wurde der durchschnittliche Blutgefäßdurchmesser nach kontinuierlichem Anstieg bis zum 9. postoperativen Tag im weiteren Verlauf wieder geringer. Diese Beobachtungen decken sich mit bereits früher erhobenen Daten zur Angiogenese im Rahmen der Wundheilung und entsprechen der Maturierung neu entstandener Blutgefäße im Verlauf der Heilung (Lindenblatt et al. [67], Sorg et al. [102]).

Die histologischen Untersuchungen zeigten das typische Muster einer desmalen Knochenheilung, sodass von einer physiologischen Heilung des Knochendefektes ausgegangen werden kann. Dabei wurde zunächst vorliegendes Frakturhämatom durch Bindegewebe ersetzt, welches im Zuge der weiteren Heilung zunehmend neu gebildetem Knochen wich. Anhand dieser histologischen Ergebnisse kann somit eine rein bindegewebige Ausheilung des Defekts ausgeschlossen werden.

Die hohe Anzahl an VEGF- und PCNA-positiven Zellen ist als hohe angio- und osteogene Aktivität im Bereich des Knochendefektes zu interpretieren. Die Tatsache, dass insbesondere

im neu entstandenen Neo-Periost zahlreiche VEGF-positive Zellen sichtbar waren, korreliert mit der Beobachtung zahlreicher Blutgefäße in eben dieser Gewebeschicht. Diese Blutgefäße des Periost spielen wie oben beschrieben eine tragende Rolle bei der Knochenregeneration (Brighton und Hunt [13], Glowacki [35], Zhang et al. [123]).

Körperliche Aktivität stellt einen der stärksten Stimuli für den Blutkreislauf dar (Di Francescomarino et al. [28]). Weiterhin ist bekannt, dass körperliche Aktivität die Neoangiogenese und die Expression verschiedener Wachstumsfaktoren während der Regeneration unterschiedlicher Gewebetypen beeinflusst (Bloor [7], Gustafsson und Kraus [36]).

Bei Tieren mit gesteigerter körperlicher Aktivität fanden sich am 9. und 12. postoperativen Tag im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Gefäßdurchmesser. Daraus ist zu schlussfolgern, dass körperliche Aktivität eine Vasodilatation im Rahmen der Knochenheilung bewirkt.

Die vorliegende Studie zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen zurückgelegter Laufstrecke der Versuchstiere und Blutgefäßdichte im Bereich des Knochendefektes. Somit scheint der Umfang körperlicher Aktivität das Ausmaß der Neoangiogenese im Rahmen der Knochenheilung zu bestimmen.

Der positive Effekt gesteigerter körperlicher Aktivität ist am ehesten auf systemische biologische Faktoren zurückzuführen, da in dem verwendeten Modell ein Einfluss lokal auf den Knochendefekt wirkender mechanischer Kräfte ausgeschlossen werden kann. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen früherer Studien, welche zeigen konnten, dass körperliche Aktivität den intravasalen Blutfluss, die Proliferation von Endothelzellen und die Expression von VEGF zu erhöhen vermag. Untersuchungen an verschiedenen Geweben wie Herz- und Skelettmuskulatur haben weiterhin gezeigt, dass gesteigerte körperliche Aktivität auch in einem erhöhten Blutgefäßdurchmesser und einer höheren Gefäßdichte während der Geweberegeneration resultiert (Bloor [7], Yang et al. [119]). Der positive Effekt erhöhter körperlicher Aktivität scheint nach den Ergebnissen unserer Studie auch für die Knochenregeneration zuzutreffen.

Unsere intravitalmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass der höhere Gefäßdurchmesser und die erhöhte Gefäßdichte bei Tieren mit gesteigerter körperlicher Aktivität mit einer schnelleren Heilung des Defektes verglichen mit der Kontrollgruppe assoziiert waren. Dies belegt allerdings nicht einen kausalen Zusammenhang zwischen aktivitätsbedingt erhöhter Angiogenese und verbesserter Knochenheilung. Es ist ebenso möglich, dass andere Effekte vermehrter körperlicher Aktivität hier eine Rolle spielen. So wurde bereits gezeigt, dass körperliche Aktivität die Proliferation von Osteoblasten steigert, den Mineralsalzgehalt und die Festigkeit des Knochens erhöht und den Knochenabbau sowohl am osteoporotischen als auch am nichtosteoporotischen Knochen vermindert (Horcajada et al. [50], Menuki et al. [72], Peng et al. [82], Tøndevold und Bülow [110], Tuukkanen et al. [113], Yao et al. [120]).

Dennoch legen die Ergebnisse dieser Studie einen Zusammenhang zwischen den positiven Effekten körperlicher Aktivität auf die Angiogenese und der Knochenheilung nahe. So ist bekannt, dass vermehrte körperliche Aktivität die Expression von VEGF erhöht (Bloor [7]), was wiederum zu gesteigerter Angiogenese und vaskulärem Remodelling führt. Gleichzeitig stellt die Neoangiogenese eine unabdingbare Grundvoraussetzung für die Knochenregeneration dar (Hausman et al. [38], Hunter [51]). Somit ist es durchaus wahrscheinlich, dass die Angiogenese, wie sie in unserer Studie bei vermehrter körperlicher Aktivität verstärkt beobachtet wurde, eine Stimulation der Knochenheilung vermittelt.

Zur Diskussion steht weiterhin die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die klinische Situation. Gerade auf dem Gebiet der Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie sind Defekte und Frakturen platter Knochen von hoher Relevanz. Darüber hinaus ist der Prozess einer desmalen Knochenheilung am Schädelknochen, wie er in unserem Modell beobachtet wurde, durchaus mit der auch an Röhrenknochen auftretenden desmalen Heilung vergleichbar. Nach unserer Ansicht ergibt sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit somit auch eine klinische Relevanz für die Behandlung von Verletzungen an Röhrenknochen.

Zusammenfassend konnte in der hier vorgestellten Arbeit gezeigt werden, dass gesteigerte körperliche Aktivität die Heilung eines Knochendefektes an der Schädelkalotte von Mäusen beschleunigt. Die verbesserte Heilung ist hierbei mit einer gesteigerten Angiogenese assoziiert.

### 5.3 Schlussfolgerungen

1. Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Tiermodell erwies sich als zuverlässig, um die Angiogenese während der Knochendefektheilung an der Schädelkalotte der Maus zu untersuchen und die Fragestellung der Studie zu beantworten.
2. Die histomorphometrischen Untersuchungen zeigten das typische Muster einer normalen Knochenheilung mit Überbauung des Defektes am 9. postoperativen Tag. Der neu gebildete Knochen war von einem Neo-Periost überzogen, welches die intravital-mikroskopisch darstellbaren Gefäße enthielt und zahlreiche VEGF-positive Zellen aufwies. PCNA-positive Zellen zeigten osteogene Aktivität im Bereich des heilenden Knochendefektes an.
3. Die Versuchstiere der Laufradgruppe legten eine durchschnittliche Strecke von 3,6 km/d zurück. Die intravitalmikroskopische Analyse zeigte eine signifikant schnellere Abnahme der Knochendefektgröße in der Laufradgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe.
4. Die schnellere Abnahme der Defektgröße war an den postoperativen Tagen 9 und 12 mit einem signifikant höheren Blutgefäßdurchmesser bei Tieren der Laufradgruppe assoziiert.
5. In der Gruppe von Tieren mit erhöhter physischer Aktivität zeigte sich am 9. postoperativen Tag eine signifikante positive Korrelation zwischen zurückgelegter Laufstrecke und Blutgefäßdichte im Defektareal.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Albrektsson T (1980) The healing of autologous bone grafts after varying degrees of surgical trauma. A microscopic and histochemical study in the rabbit. *J Bone Joint Surg Br* 62:403–10
2. Ashhurst DE, Hogg J, Perren SM (1982) A method for making reproducible experimental fractures of the rabbit tibia. *Injury* 14:236–42
3. Augat P, Burger J, Schorlemmer S, Henke T, Peraus M, Claes L (2003) Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model. *J Orthop Res* 21:1011–7
4. Augat P, Simon U, Liedert A, Claes L (2005) Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. *Osteoporos Int* 16 Suppl 2:S36–43
5. Banes AJ, Tsuzaki M, Yamamoto J, Fischer T, Brigman B, Brown T, Miller L (1995) Mechanoreception at the cellular level: the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals. *Biochem Cell Biol* 73:349–65
6. Black J, Balligand M, Nunamaker DM, Brighton CT (1985) Electrical Stimulation of fresh fractures: Faradic stimulation of tibial osteotomies in the dog. *Trans Orthop Res Soc* 10:29
7. Bloor CM (2005) Angiogenesis during exercise and training. *Angiogenesis* 8:263–71
8. Boecker W, Denk H, Heitz PU (2004) *Pathologie*. Urban & Fischer, München, Jena

9. Bourque WT, Gross M, Hall BK (1992) A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Lab Anim Sci* 42:369–74
10. Boyde A, Wolfe LA, Maly M, Jones SJ (1995) Vital confocal microscopy in bone. *Scanning* 17:72–85
11. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423:337–42
12. Branemark PI, Lindstrom J (1963) A modified rabbit's ear chamber; high-power high-resolution studies in regenerated and preformed tissues. *Anat Rec* 145:533–40
13. Brighton CT, Hunt RM (1997) Early histologic and ultrastructural changes in microvessels of periosteal callus. *J Orthop Trauma* 11:244–53
14. Brighton CT, Hozack WJ, Brager MD, Windsor RE, Pollack SR, Vreslovic EJ, Kotwick JE (1985) Fracture healing in the rabbit fibula when subjected to various capacitively coupled electrical fields. *J Orthop Res* 3:331–40
15. Bucher O, Wartenberg H (1997) *Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Huber, Bern
16. Carano RAD, Filvaroff EH (2003) Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 8:980–9
17. Carter DR, Beaupré GS, Giori NJ, Helms JA (1998) Mechanobiology of skeletal regeneration. *Clin Orthop Relat Res* pp S41–55
18. Chao EY, Aro HT, Lewallen DG, Kelly PJ (1989) The effect of rigidity on fracture healing in external fixation. *Clin Orthop Relat Res* pp 24–35
19. Cheal EJ, Mansmann KA, DiGioia AM 3rd, Hayes WC, Perren SM (1991) Role of interfragmentary strain in fracture healing: ovine model of a healing osteotomy. *J Orthop Res* 9:131–42

20. Claes L, Eckert-Hübner K, Augat P (2002) The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J Orthop Res* 20:1099–105
21. Claes L, Eckert-Hübner K, Augat P (2003) The fracture gap size influences the local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *Langenbecks Arch Surg* 388:316–22
22. Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D, Seidl W, Margevicius KJ, Augat P (1998) Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clin Orthop Relat Res* pp S132–47
23. Critchlow MA, Bland YS, Ashhurst DE (1995) The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit. *Bone* 16:521–7
24. Cutting CB, McCarthy JG, Berenstein A (1984) Blood supply of the upper craniofacial skeleton: the search for composite calvarial bone flaps. *Plast Reconstr Surg* 74:603–10
25. Danckwardt-Lillieström G, Lorenzi GL, Olerud S (1970) Intramedullary nailing after reaming. An investigation on the healing process in osteotomized rabbit tibias. *Acta Orthop Scand Suppl* 134:1–78
26. 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* 12:878–85
27. Dellian M, Witwer BP, Salehi HA, Yuan F, Jain RK (1996) Quantitation and physiological characterization of angiogenic vessels in mice: effect of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, and host microenvironment. *Am J Pathol* 149:59–71
28. Di Francescomarino S, Sciartilli A, Di Valerio V, Di Baldassarre A, Gallina S (2009) The effect of physical exercise on endothelial function. *Sports Med* 39:797–812
29. Fleisch H (1997) Bisphosphonates: mechanisms of action and clinical use in osteoporosis—an update. *Horm Metab Res* 29:145–50

30. Friedman RJ, An YH, Ming J, Draughn RA, Bauer TW (1996) Influence of biomaterial surface texture on bone ingrowth in the rabbit femur. *J Orthop Res* 14:455–64
31. Geiger F, Bertram H, Berger I, Lorenz H, Wall O, Eckhardt C, Simank HG, Richter W (2005) Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J Bone Miner Res* 20:2028–35
32. Georgiadis GM, Minster GJ, Moed BR (1990) Effects of dynamization after interlocking tibial nailing: an experimental study in dogs. *J Orthop Trauma* 4:323–30
33. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA (2003) Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 88:873–84
34. Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA (2005) Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. *J Bone Miner Res* 20:1715–22
35. Glowacki J (1998) Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* pp S82–9
36. Gustafsson T, Kraus WE (2001) Exercise-induced angiogenesis-related growth and transcription factors in skeletal muscle, and their modification in muscle pathology. *Front Biosci* 6:D75–89
37. Hansen-Algenstaedt N, Schaefer C, Wolfram L, Joscheck C, Schroeder M, Algenstaedt P, R  ther W (2005) Femur window—a new approach to microcirculation of living bone in situ. *J Orthop Res* 23:1073–82
38. Hausman MR, Schaffler MB, Majeska RJ (2001) Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone* 29:560–4
39. Henry WB Jr, Schachar NS, Wadsworth PL, Castronovo FP Jr, Mankin HJ (1985) Feline model for the study of frozen osteoarticular hemijoint transplantation: qualitative and quantitative assessment of bone healing. *Am J Vet Res* 46:1714–20

40. Herrgesell JD (1967) Aspirin poisoning in the cat. *J Am Vet Med Assoc* 151:452–5
41. Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P (1995) An experimental model for non-union in rats. *Injury* 26:681–6
42. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT (1993) A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res* 11:305–12
43. Histing T, Garcia P, Matthys R, Leidinger M, Holstein JH, Kristen A, Pohlemann T, Menger MD (2009) An internal locking plate to study intramembranous bone healing in a mouse femur fracture model. *J Orthop Res*
44. Histing T, Holstein JH, Garcia P, Matthys R, Kristen A, Claes L, Menger MD, Pohlemann T (2009) Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture. *J Orthop Res* 27:1152–6
45. Histing T, Stenger D, Kuntz S, Scheuer C, Tami A, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2011) Increased Osteoblast and Osteoclast Activity in Female Senescence-Accelerated, Osteoporotic SAMP6 Mice During Fracture Healing. *J Surg Res*
46. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T (2007) Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech* 40:215–9
47. Holstein JH, Menger MD, Scheuer C, Meier C, Culemann U, Wirbel RJ, Garcia P, Pohlemann T (2007) Erythropoietin (EPO): EPO-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing. *Life Sci* 80:893–900
48. Holstein JH, Klein M, Garcia P, Histing T, Culemann U, Pizanis A, Laschke MW, Scheuer C, Meier C, Schorr H, Pohlemann T, Menger MD (2008) Rapamycin affects early fracture healing in mice. *Br J Pharmacol* 154:1055–62

49. 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* 153:71–5
50. Horcajada M, Coxam V, Davicco M, Gaumet N, Pastoureau P, Leterrier C, Culioli J, Barlet J (1997) Influence of treadmill running on femoral bone in young orchidectomized rats. *J Appl Physiol* 83:129–33
51. Hunter J (2007) A treatise on the blood, inflammation, and gun-shot wounds. 1794. *Clin Orthop Relat Res* 458:27–34
52. Huppelsberg J, Walter K (2009) *Kurzlehrbuch Physiologie*. Thieme, Stuttgart
53. 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* 49:101–5
54. Jones RD, Baynes RE, Nimitz CT (1992) Nonsteroidal anti-inflammatory drug toxicosis in dogs and cats: 240 cases (1989-1990). *J Am Vet Med Assoc* 201:475–7
55. Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME (1990) Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol* 110:2195–207
56. Junqueira LC, Carneiro J, Gratzl M (2004) *Histologie*. Springer, Berlin
57. Kaplan SJ, Hayes WC, Mudan P, Lelli JL, White AA (1985) Monitoring the healing of a tibial osteotomy in the rabbit treated with external fixation. *J Orthop Res* 3:325–30
58. Kenwright J, Albinana J (1991) Problems encountered in leg shortening. *J Bone Joint Surg Br* 73:671–5
59. Kirby-Smith HT (1933) Bone growth studies—a miniature bone fracture observed microscopically in a transparent chamber introduced into the rabbit's ear. *American Journal of Anatomy* 53:377–402

60. Kirchen ME, O'Connor KM, Gruber HE, Sweeney JR, Fras IA, Stover SJ, Sarmiento A, Marshall GJ (1995) Effects of microgravity on bone healing in a rat fibular osteotomy model. *Clin Orthop Relat Res* pp 231–42
61. Kirker-Head CA, Gerhart TN, Schelling SH, Hennig GE, Wang E, Holtrop ME (1995) Long-term healing of bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2. *Clin Orthop Relat Res* pp 222–30
62. Klenke FM, Merkle T, Fellenberg J, Abdollahi A, Huber PE, Gebhard MM, Ewerbeck V, Sckell A (2005) A novel model for the investigation of orthotopically growing primary and secondary bone tumours using intravital microscopy. *Lab Anim* 39:377–83
63. Klenke FM, Liu Y, Yuan H, Hunziker EB, Siebenrock KA, Hofstetter W (2008) Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. *J Biomed Mater Res A* 85:777–86
64. Larsson S, Kim W, Caja VL, Egger EL, Inoue N, Chao EY (2001) Effect of early axial dynamization on tibial bone healing: a study in dogs. *Clin Orthop Relat Res* pp 240–51
65. Lenehan TM, Balligand M, Nunamaker DM, Wood FE Jr (1985) Effect of EHDP on fracture healing in dogs. *J Orthop Res* 3:499–507
66. Lewallen DG, Chao EY, Kasman RA, Kelly PJ (1984) Comparison of the effects of compression plates and external fixators on early bone-healing. *J Bone Joint Surg Am* 66:1084–91
67. Lindenblatt N, Calcagni M, Contaldo C, Menger MD, Giovanoli P, Vollmar B (2008) A new model for studying the revascularization of skin grafts in vivo: the role of angiogenesis. *Plast Reconstr Surg* 122:1669–80
68. Lu C, Miclau T, Hu D, Hansen E, Tsui K, Puttlitz C, Marcucio RS (2005) Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *J Orthop Res* 23:1300–7

69. Manigrasso MB, O'Connor JP (2004) Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma* 18:687–95
70. Maus U, Andereya S, Gravius S, Siebert CH, Ohnsorge JAK, Niedhart C (2008) Lack of effect on bone healing of injectable BMP-2 augmented hyaluronic acid. *Arch Orthop Trauma Surg* 128:1461–6
71. McCuskey RS, McClugage SG, Younker WJ (1971) Microscopy of living bone marrow in situ. *Blood* 38:87–95
72. Menuki K, Mori T, Sakai A, Sakuma M, Okimoto N, Shimizu Y, Kunugita N, Nakamura T (2008) Climbing exercise enhances osteoblast differentiation and inhibits adipogenic differentiation with high expression of PTH/PTHrP receptor in bone marrow cells. *Bone* 43:613–20
73. Mikuni-Takagaki Y (1999) Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes. *J Bone Miner Metab* 17:57–60
74. Mizumoto Y, Moseley T, Drews M, Cooper VN 3rd, Reddi AH (2003) Acceleration of regenerate ossification during distraction osteogenesis with recombinant human bone morphogenetic protein-7. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 3:124–30
75. Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y, Oikawa S, Ono K, Takaoka K (1994) Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* 9:651–9
76. Newton CD, Nunamaker DM (1985) *Textbook of Small Animal Orthopaedics*. J.B. Lippincott Company, Philadelphia
77. Nomura S, Takano-Yamamoto T (2000) Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol* 19:91–6
78. Nunamaker DM (1998) Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* pp S56–65

79. Nunamaker DM, Richardson DW, Butterweck DM (1991) Mechanical and biological effects of plate luting. *J Orthop Trauma* 5:138–45
80. 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
81. Pawlik G, Rackl A, Bing RJ (1981) Quantitative capillary topography and blood flow in the cerebral cortex of cats: an in vivo microscopic study. *Brain Res* 208:35–58
82. Peng Z, Tuukkanen J, Väänänen HK (1994) Exercise can provide protection against bone loss and prevent the decrease in mechanical strength of femoral neck in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 9:1559–64
83. 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* 14:74–9
84. Prolo DJ, Pedrotti PW, Burres KP, Oklund S (1982) Superior osteogenesis in transplanted allogeneic canine skull following chemical sterilization. *Clin Orthop Relat Res* pp 230–42
85. 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* 11:75–8
86. Raab DM, Smith EL, Crenshaw TD, Thomas DP (1990) Bone mechanical properties after exercise training in young and old rats. *J Appl Physiol* 68:130–4
87. Rath B, Nam J, Knobloch TJ, Lannutti JJ, Agarwal S (2008) Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts. *J Biomech* 41:1095–103
88. Reddi AH (2001) Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1:S1–6

89. Rhinelander FW (1968) The normal microcirculation of diaphyseal cortex and its response to fracture. *J Bone Joint Surg Am* 50:784–800
90. Rhinelander FW (1974) Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* pp 34–81
91. Rhinelander FW, Baragry R (1962) Microangiography in bone healing. I. Undisplaced closed fractures. *J Bone Joint Surg Am* 44-A:1273–98
92. Richardson DW, Nunamaker DM (1991) Evaluation of plate luting, using an in vivo ovine osteotomy model. *Am J Vet Res* 52:1468–73
93. Rossant J, Nagy A (1995) Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat Med* 1:592–4
94. Rüter A, Trentz O, Wagner M (2003) *Unfallchirurgie*. Elsevier, Urban & Fischer, München
95. Sandison JC (1924) A new method for the microscopic study of living growing tissues by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *The Anatomical Record* pp 281–287
96. 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* 80:155–60
97. Schiebler TH, Schmidt W (1999) *Anatomie*. Springer, Berlin
98. Schmitz JP, Hollinger JO (1986) The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* pp 299–308
99. Sciadini MF, Dawson JM, Banit D, Juliao SF, Johnson KD, Lenington WJ, Schwartz HS (2000) Growth factor modulation of distraction osteogenesis in a segmental defect model. *Clin Orthop Relat Res* pp 266–77

100. Sirola K (1960) Regeneration of defects in the calvaria. An experimental study. *Ann Med Exp Biol Fenn* 38(Suppl 2):1–87
101. Smith EL, Gilligan C (1991) Physical activity effects on bone metabolism. *Calcif Tissue Int* 49 Suppl:S50–4
102. Sorg H, Krueger C, Vollmar B (2007) Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber. *J Anat* 211:810–8
103. Stafford HJ, Roberts MT, Oni OO, Hay J, Gregg P (1994) Localisation of bone-forming cells during fracture healing by osteocalcin immunocytochemistry: an experimental study of the rabbit tibia. *J Orthop Res* 12:29–39
104. Steen H, Fjeld TO (1989) Lengthening osteotomy in the metaphysis and diaphysis. An experimental study in the ovine tibia. *Clin Orthop Relat Res* pp 297–305
105. Steen H, Fjeld TO, Bjerkreim I, Tevik A, Aldegheri R, Trivella G (1988) Limb lengthening by diaphyseal corticotomy, callus distraction, and dynamic axial fixation. An experimental study in the ovine femur. *J Orthop Res* 6:730–5
106. Strong ML, Wong-Chung J, Babikian G, Brody A (1992) Rotational remodeling of malrotated femoral fractures: a model in the rabbit. *J Pediatr Orthop* 12:173–6
107. Teitelbaum SL, Ross FP (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4:638–49
108. Terjesen T, Johnson E (1986) Effects of fixation stiffness on fracture healing. External fixation of tibial osteotomy in the rabbit. *Acta Orthop Scand* 57:146–8
109. Thaller SR, Hoyt J, Tesluk H, Stevenson TR (1993) Midfacial fracture repair in the adult rat. *Ann Plast Surg* 31:66–71
110. Tøndevold E, Bülow J (1983) Bone blood flow in conscious dogs at rest and during exercise. *Acta Orthop Scand* 54:53–7

111. Toombs JP, Wallace LJ, Bjorling DE, Rowland GN (1985) Evaluation of Key's hypothesis in the feline tibia: an experimental model for augmented bone healing studies. *Am J Vet Res* 46:513–8
112. Tremain N, Korkko J, Ibberson D, Kopen GC, DiGirolamo C, Phinney DG (2001) MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages. *Stem Cells* 19:408–18
113. Tuukkanen J, Peng Z, Väänänen HK (1992) The effect of training on the recovery from immobilization-induced bone loss in rats. *Acta Physiol Scand* 145:407–11
114. Utvåg SE, Grundnes O, Reikerås O (1994) Healing of segmental and simple fractures in rats. *Acta Orthop Scand* 65:559–63
115. Valentin-Opran A, Wozney J, Csimma C, Lilly L, Riedel GE (2002) Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Orthop Relat Res* pp 110–20
116. Wallace AL, Draper ER, Strachan RK, McCarthy ID, Hughes SP (1994) The vascular response to fracture micromovement. *Clin Orthop Relat Res* pp 281–90
117. Welsch U (2003) *Lehrbuch Histologie*. Urban & Fischer, München, Jena
118. Winet H (1989) A horizontal intravital microscope-plus-bone chamber system for observing bone microcirculation. *Microvasc Res* 37:105–14
119. Yang HT, Prior BM, Lloyd PG, Taylor JC, Li Z, Laughlin MH, Terjung RL (2008) Training-induced vascular adaptations to ischemic muscle. *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 7:57–70
120. Yao Z, Lafage-Proust MH, Plouët J, Bloomfield S, Alexandre C, Vico L (2004) Increase of both angiogenesis and bone mass in response to exercise depends on VEGF. *J Bone Miner Res* 19:1471–80

121. Yuan F, Salehi HA, Boucher Y, Vasthare US, Tuma RF, Jain RK (1994) Vascular permeability and microcirculation of gliomas and mammary carcinomas transplanted in rat and mouse cranial windows. *Cancer Res* 54:4564–8
122. Yudell RM, Block MS (2000) Bone gap healing in the dog using recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Oral Maxillofac Surg* 58:761–6
123. Zhang X, Awad HA, O’Keefe RJ, Guldberg RE, Schwarz EM (2008) A perspective: engineering periosteum for structural bone graft healing. *Clin Orthop Relat Res* 466:1777–87

# 7 Publikationen/Danksagung

## 7.1 Publikationen

Die vorliegende Arbeit wurde auf folgenden nationalen und internationalen Kongressen vorgestellt:

Orthopedic Research Society Annual Meeting, Long Beach, CA, USA, 2011

Holstein JH, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Histing T, Klein M, Pohlemann T, Menger MD: Physical exercise enhances angiogenesis during bone defect healing in mice.

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, Berlin, Deutschland, 2011

Holstein JH, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Histing T, Klein M, Pohlemann T, Menger MD: Forcierte körperliche Aktivität steigert die Angiogenese während der Knochenheilung an der Maus.

Die Arbeit wurde wie folgt publiziert:

Holstein JH, Becker SC, Fiedler M, Scheuer C, Garcia P, Histing T, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2011): Exercise enhances angiogenesis during bone defect healing in mice. J Orthop Res 29(7):1086-92

Holstein JH, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Histing T, Klein M, Laschke MW, Corsten M, Pohlemann T, Menger MD (2011): Intravital microscopic studies of angiogenesis during bone defect healing in mice calvaria.

Injury 42(8):765-71

## 7.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben:

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Tim Pohlemann, danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten.

Herrn Privatdozent Dr. med. Jörg H. Holstein, dem Betreuer meiner Doktorarbeit, danke ich für seine Freundschaft. Ohne seine tatkräftige und umfangreiche Unterstützung und Hilfe wäre die Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Professor Dr. med. Michael D. Menger danke ich für die umfassende Hilfe und Beratung bei der Durchführung der Arbeit und für das großzügige Bereitstellen der Infrastruktur seines Institutes.

Dank gilt auch meinem Kollegen Martin Fiedler für seine Freundschaft und die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Untersuchungen.

Frau Dr. rer. nat. Claudia Scheuer und Frau Janine Becker möchte ich besonders für die großartige Unterstützung bei der Durchführung der histologischen und immunhistochemischen Analysen danken.

Ich bedanke mich weiterhin bei Frau Dr. med. vet. Monika Frings für die Unterstützung während der Tierversuche.

Meinem Kollegen David Stenger möchte ich für die freundliche Beratung im Hinblick auf verschiedene technische Fragen danken.

Ferner möchte ich mich bei allen Kollegen des Institutes für klinisch-experimentelle Chirurgie für das freundliche Arbeitsklima und die erstklassige Hilfsbereitschaft und Zusammenarbeit bedanken.

Abseits der wissenschaftlichen Unterstützung danke ich meinen engen Freunden dafür, dass sie mir seit Jahren helfen, neben aller Arbeit die vielen kleinen, aber sehr wichtigen Dinge des Lebens nicht aus den Augen zu verlieren. Die Betreffenden wissen, dass sie gemeint sind.

# 8 Lebenslauf

## **Persönliche Daten**

Name: Steven Christian Becker  
Geburtsdatum: 24.09.1981  
Geburtsort: Ottweiler  
Nationalität: Deutsch  
Familienstand: ledig

## **Schulbildung**

06/2001 Allgemeine Hochschulreife  
08/1992 - 06/2001 Gymnasium Ottweiler  
09/1988 - 07/1992 Grundschule Friedrich von Schiller, Wiebelskirchen

## **Studium**

05/2009 Approbation als Arzt  
03/2005 Ärztliche Vorprüfung  
10/2002 - 05/2009 Universität des Saarlandes, medizinische Fakultät  
Homburg

**Praktika**

- 10/2008 - 01/2009                      Praktisches Jahr - Innere Medizin,  
PD Dr. A. von Bierbrauer zu Brennstein,  
Städtisches Klinikum Neunkirchen
- 06/2008 - 10/2008                      Praktisches Jahr - Gynäkologie und Geburtshilfe,  
Dr. med. G.-P. Breitbach,  
Städtisches Klinikum Neunkirchen
- 02/2008 - 06/2008                      Praktisches Jahr - Chirurgie,  
Unfallchirurgie und Orthopädie,  
Dr. med. R. Fischer;  
Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie,  
Dr. med. P. Weißenbach,  
Städtisches Klinikum Neunkirchen
- 09/2007 - 10/2007                      Famulatur - Anästhesiologie,  
Anästhesiologische Gemeinschaftspraxis  
André/Bommert,  
Neunkirchen
- 08/2007 - 09/2007                      Famulatur - Urologie,  
Prof. Dr. med. Sch. Alloussi,  
Städtisches Klinikum Neunkirchen
- 03/2007 - 04/2007                      Famulatur - Anästhesiologie,  
Anästhesiologische Gemeinschaftspraxis  
André/Bommert,  
Neunkirchen

08/2006 - 09/2006

Famulatur - Unfall-, Hand- und  
Wiederherstellungschirurgie,  
Prof. Dr. med. T. Pohlemann,  
Klinik für Unfall-, Hand- und  
Wiederherstellungschirurgie,  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg

**Wehrersatzdienst**

2003 - 2004

Wehrersatzdienst,  
Kinder- und Jugendhaus der Arbeiterwohlfahrt,  
Bexbach

# Abbildungsverzeichnis

1	<i>Freilegung der Schädelkalotte über eine zirkuläre Exzision . . . . .</i>	36
2	<i>Operationsutensilien: Diamant-Kugelfräser (A), Deckglas (B) und Mikro-Schrauben (C) . . . . .</i>	36
3	<i>Im rechten Os parietale wird ein monokortikaler Defekt erzeugt. . . . .</i>	37
4	<i>Fräsen von 2 Vertiefungen (4 und 10 Uhr) zur Einbringung der Schrauben . . . . .</i>	37
5	<i>Nach Markierung der korrekten Positionen wird das Deckglas mit 2 Löchern zur Einbringung der Schrauben versehen. . . . .</i>	38
6	<i>Aufbringen des Deckglases auf die Kalotte und Fixierung durch Schrauben . . . . .</i>	38
7	<i>Adaptierung der Kopfhaut durch eine Tabaksbeutelnaht . . . . .</i>	39
8	<i>Körperliche Aktivität durch Laufradtraining. Die zurückgelegte Strecke wird durch ein Tachometer dokumentiert. . . . .</i>	40
9	<i>Kumulative Darstellung der zurückgelegten Laufstrecke, angegeben als Mittelwerte . . . . .</i>	48
10	<i>Blutgefäße (Pfeile) auf der intakt gebliebenen inneren Oberfläche der Kortikalis am Boden des Knochendefektes (gepunkteter Kreis) . . . . .</i>	49
11	<i>Fehlender Nachweis einer Neoangiogenese am 6. postoperativen Tag . . . . .</i>	50
12	<i>Dichtes Netzwerk neu gebildeter Gefäße am 9. postoperativen Tag . . . . .</i>	50
13	<i>Bestimmung der Gefäßdichte durch IVM. Angaben als Mittelwerte <math>\pm</math> SEM. <sup>c</sup><math>p &lt; 0,05</math> vs. Tag 0, 3 und 6, <sup>d</sup><math>p &lt; 0,05</math> vs. Tag 0, 3, 6 und 9. . . . .</i>	51
14	<i>Bestimmung der Defektfläche durch IVM. Angaben als Mittelwerte <math>\pm</math> SEM. <sup>a</sup><math>p &lt; 0,05</math> vs. Tag 0, <sup>c</sup><math>p &lt; 0,05</math> vs. Tag 0, 3 und 6. . . . .</i>	52
15	<i>Nicht mehr abgrenzbarer Defektrand am 15. postoperativen Tag . . . . .</i>	52

16	<i>Bestimmung des durchschnittlichen Gefäßdurchmessers durch IVM. Angaben als Mittelwerte <math>\pm</math> SEM. <sup>b</sup><math>p &lt; 0,05</math> vs. Tag 0 und 3, <sup>c</sup><math>p &lt; 0,05</math> vs. Tag 0, 3 und 6. . . . .</i>	53
17	<i>Bestimmung der Defektfläche durch IVM bei Tieren mit normaler (Quadrate) und gesteigerter (Dreiecke) physischer Aktivität. Angaben als Mittelwerte <math>\pm</math> SEM. *<math>p &lt; 0,05</math> im Vergleich zum entsprechenden Wert der Laufradgruppe. . . . .</i>	53
18	<i>IVM-Darstellung des Knochendefektes bei einem Tier mit gesteigerter (A-G) und einem Tier mit normaler physischer Aktivität (H-N). Bei dem Tier mit normaler Aktivität besteht am 6. postoperativen Tag noch ein ausgeprägtes Ödem (I), während die Maus mit gesteigerter Aktivität bereits neu gebildete Gefäße aufweist (B). Bei beiden Tieren nimmt die Blutgefäßdichte kontinuierlich zu, der durchschnittliche Durchmesser der Gefäße ist bei dem Tier mit gesteigerter Aktivität größer. Gleichzeitig verkleinert sich der Knochendefekt bei diesem Tier schneller als bei der Maus mit normaler physischer Aktivität. .</i>	54
19	<i>Bestimmung des durchschnittlichen Gefäßdurchmessers durch IVM bei Tieren mit normaler (Quadrate) und gesteigerter (Dreiecke) physischer Aktivität. Angaben als Mittelwerte <math>\pm</math> SEM. *<math>p &lt; 0,05</math> im Vergleich zum entsprechenden Wert der Kontrollgruppe. . . . .</i>	55
20	<i>Bestimmung der Gefäßdichte durch IVM bei Tieren mit normaler (Quadrate) und gesteigerter (Dreiecke) physischer Aktivität. Angaben als Mittelwerte <math>\pm</math> SEM. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede (<math>p &gt; 0,05</math>) zwischen den beiden Versuchsgruppen. . . . .</i>	56
21	<i>Korrelation (Pearson-Koeffizient) zwischen Laufstrecke und Gefäßdichte am 9. postoperativen Tag. . .</i>	57
22	<i>Histologischer Schnitt eines Knochendefektes am 3. postoperativen Tag. Der Defekt des kortikalen Knochens (kk) enthält hauptsächlich Anteile eines Hämatoms (ht). . . . .</i>	57
23	<i>Histologischer Schnitt eines Knochendefektes am 6. postoperativen Tag. Es finden sich Bindegewebe (bg) und Granulationsgewebe (gg). . . . .</i>	58
24	<i>Histologischer Schnitt eines Knochendefektes am 9. postoperativen Tag. Der Defekt ist von Geflechtknochen (gk) überbrückt, welcher von einem Neo-Periost (np) mit zahlreichen Blutgefäßen bedeckt ist.</i>	58
25	<i>Histologischer Schnitt eines Knochendefektes am 15. postoperativen Tag. Das Bindegewebe ist nahezu vollständig durch Geflechtknochen ersetzt. . . . .</i>	59
26	<i>Quantitative Analyse der Verteilung der einzelnen Gewebefractionen im Knochendefekt. . . . .</i>	59
27	<i>Immunohistochemische Färbung für VEGF am 9. postoperativen Tag. Übersichtsbild (links) und Ausschnitt der Oberfläche des heilenden Defektes (rechts). Pfeile markieren VEGF-positive Zellen. . . .</i>	60

28 *Immunhistochemische Färbung für PCNA am 9. postoperativen Tag. Übersichtsbild (links) und Ausschnitt der Oberfläche des heilenden Defektes (rechts). Pfeile markieren PCNA-positive Osteoblasten. . 60*

# Tabellenverzeichnis

1	<i>Versuchsprotokoll; Im Rahmen der Vorversuche (oberer Abschnitt) wurde das Modell etabliert. Der untere Abschnitt zeigt die Versuche zum Einfluss gesteigerter physischer Aktivität auf die Angiogenese im Rahmen der Knochenheilung. . . . .</i>	33
2	<i>Korrelationsanalyse (Pearson-Koeffizient) zwischen Laufstrecke (LS) und Ergebnissen der IVM (Defektfläche, Gefäßdichte und durchschnittlicher Gefäßdurchmesser) in der Gruppe mit gesteigerter Aktivität. *p &lt; 0,05. . . . .</i>	56