

Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. T. Pohlemann

**Untersuchung des Einflusses einer Homocysteinämie auf die
Frakturheilung an der Maus**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2009

vorgelegt von: Julia Johanna Schmalenbach
geb. am: 11.01.1982 in Kaiserslautern

Dekan: Prof. Dr. med. M. D. Menger

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Jahr der Promotion: 2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
1. Zusammenfassung.....	4
1.1 Zusammenfassung.....	4
1.2 Summary.....	5
2. Einleitung.....	7
2.1 Knochen.....	7
2.1.1 Morphologie.....	7
2.1.2 Histologie.....	7
2.1.3 Physiologie.....	11
2.2 Frakturheilung.....	12
2.2.1 Primäre Frakturheilung.....	12
2.2.2 Sekundäre Frakturheilung.....	12
2.3 Frakturmodelle.....	15
2.3.1 Maus.....	16
2.3.2 Ratte.....	18
2.3.3 Kaninchen.....	18
2.3.4 Katze.....	19
2.3.5 Hund.....	19
2.3.6 Schaf.....	20
2.3.7 Ziege.....	20
2.3.8 Pferd.....	20
2.3.9 Primaten.....	21
2.4 Homocystein.....	21
2.4.1 Methionin-Homocystein-Stoffwechsel.....	21
2.4.2 Klinische Manifestationen der Hyperhomocysteinämie.....	24
2.4.3 Hyperhomocysteinämie und Knochenstoffwechsel.....	25
2.4.3.1 Klinische Studien.....	25
2.4.3.2 In-vitro-Studien.....	28
2.4.3.3 Tierexperimentelle Studien.....	29
2.5 Zielsetzung der Arbeit.....	30
2.6 Fragestellung.....	30
3. Material und Methodik.....	32
3.1 Versuchstiere.....	32
3.2 Studienprotokoll.....	32
3.3 Diäten.....	33

Inhaltsverzeichnis

3.4 Intervention.....	34
3.4.1 Tiermodell.....	34
3.4.2 Operation.....	35
3.4.3 Blutentnahme und Tötung der Tiere.....	41
3.4.4 Präparation der Knochen	41
3.5 Zielkriterien und Auswertung	42
3.5.1 Serumanalysen.....	42
3.5.1.1 Homocystein	42
3.5.1.2 Vitamin B12 und Folsäure	45
3.5.2 Knochenanalysen	46
3.5.3 Statistik.....	49
4. Ergebnisse	50
4.1 Postoperativer klinischer Verlauf.....	50
4.2 Serumanalysen.....	52
4.2.1 Homocystein.....	52
4.2.2 Vitamin B12 und Folsäure.....	53
4.3 Knochenanalysen	54
4.3.2 Röntgen und Computertomographie	55
4.3.3 Biomechanik	56
5. Diskussion.....	57
5.1 Diskussion der Methoden	57
5.2 Diskussion der Ergebnisse	67
5.3 Schlussfolgerungen	71
6. Literaturverzeichnis	73
7. Publikationen / Danksagung	89
7.1 Publikationen	89
7.2 Danksagung	89

Abkürzungsverzeichnis

∅	Durchmesser
°C	Grad Celsius
μCT	Mikrocomputertomographie
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol
5-MTHF	5-Methyltetrahydrofolsäure
Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of Variance
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese
AP	Alkalische Phosphatase
ASIF	Association for the Study of Internal Fixation
ATP	Adenosintriphosphat
BMD	Bone Mineral Density (Knochendichte)
BRU	Basic Remodeling Unit
CBS	Cystathionin-β-Synthase
cm	Zentimeter
CS	γ-Cystathionase
CTx	C-terminales Telopeptid, das durch den Abbau des Typ-I-Kollagens entsteht
d	Tag
DeltaL	Verformung in mm
DEXA	Dual-Energy X-Ray Absorptiometry
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPD	Desoxypyridinolin-Crosslinks im Urin
DTT	Dithiothreitol-Lösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eV	Elektronenvolt
F	Last in N
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GCMS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
Hcy	Homocystein
Hcy-D4-Std.	Homocystein-D4-Standard
HHcy	Hyperhomocysteinämie

Abkürzungsverzeichnis

Hom	Homocystin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICTP	Carboxy-terminales Telopeptid (Epitop, das das kleinere CTx-Epitop enthält)
kcal	Kilokalorien
KG	Körpergewicht
KoA	Kontrolle Altromin
KoH	Kontrolle Harlan
kPa	Kilopascal
kV	Kilovolt
l	Liter
LASA	Long Aging Study Amsterdam
M/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
mA	Milliampère
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen (der Erythrozyten)
Met	Methionin
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MPa	Megapascal
MS	Methioninsynthase
MTBDSFA	N-Methyl-N-ter-butyldimethylsilyl-trifluoracetamid
MTHFR	Methylentetrahydrofolat-Reduktase
N	Newton
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
Nmol	Nanomol
OC	Osteocalcin
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
Ppi	Pyrophosphat
RNA	Ribonukleinsäure
S	Steifigkeit
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
THF	Tetrahydrofolat
U	Umdrehungen
VM	Vitamin-Mangel

Abkürzungsverzeichnis

W	Watt
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

1. Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

In zahlreichen klinischen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Homocystein-Serumkonzentration (Hyperhomocysteinämie) und einem gestörten Knochenstoffwechsel sowie einem erhöhten Risiko osteoporotischer Frakturen gezeigt werden. Vor diesem Hintergrund wurde die hier vorgestellte Studie konzipiert, um den Einfluss einer alimentär induzierten Hyperhomocysteinämie (HHCY) auf die Frakturheilung an der Maus zu untersuchen.

Als Versuchstiere dienten ausgewachsene Mäuse (Typ CD-1), da für diese Spezies bereits ein standardisiertes und publiziertes Frakturmodell existierte. Für die Versuchsdurchführung wurden 65 Mäuse verwendet. Eine HHCY wurde durch die Gabe einer Homocystin-angereicherten (n=13), einer Methionin-angereicherten (n=13), sowie einer B-Vitamin-defizienten Diät (n=14) erzeugt. Zwei weitere Versuchsgruppen (n=12 und n=13) erhielten entsprechende Kontrolldiäten. Vier Wochen nach geschlossener Femurfrakturierung und -stabilisierung mittels intramedullärer Zugschraubenosteosynthese wurden die Tiere durch eine Überdosis Pentobarbital getötet. Unmittelbar vor Tötung der Versuchstiere wurden Blutproben für die weiteren serologischen Untersuchungen abgenommen. Die Femora der Tiere wurden für die weiteren radiologischen und biomechanischen Untersuchungen explantiert.

In den laborchemischen Untersuchungen wurden die Serumkonzentrationen von Homocystein (HCY), Folsäure und Vitamin B12 bestimmt. Eine biomechanische Drei-Punkt-Biegung diente der Evaluierung der Biegesteifigkeit des Frakturkallus. Diese Messung erfolgte zerstörungsfrei, so dass im weiteren Verlauf zusätzliche histologische Untersuchungen des unbeschädigten Knochengewebes erfolgen konnten (nicht Teil dieser Dissertation).

Nach der Auswertung der laborchemischen, radiologischen und biomechanischen Analysen fanden sich folgende Ergebnisse:

- I. Es konnte gezeigt werden, dass an der Maus durch die Gabe einer Homocystin-angereicherten, einer Methionin-angereicherten, sowie einer B-Vitamin-defizienten Diät eine HHCY hervorgerufen wird. Entsprechend der jeweiligen Diätform konnten unterschiedliche Intensitäten einer HHCY provoziert werden: Eine mit 1,5 %

Homocystin angereicherte Diät führte zu einer schweren HHCY, eine mit 2,5 % Methionin angereicherte Diät induzierte eine intermediäre HHCY und eine B-Vitamin-defiziente Diät rief eine moderate HHCY hervor.

- II. Die Serumanalysen ergaben in allen drei Diät-Gruppen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen signifikant erniedrigte Konzentrationen an Vitamin B12 und Folsäure. Die Vitamin-Mangel-Diät führte hierbei zum stärksten Abfall der Serumkonzentrationen von Vitamin B12 und Folsäure.
- III. In allen Versuchsgruppen konnten nach vierwöchiger Frakturheilung sowohl makroskopisch als auch radiologisch Zeichen einer kompletten knöchernen Frakturüberbrückung gefunden werden.
- IV. In den biomechanischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine schwere HHCY, induziert durch die Homocystin-angereicherte Diät, zu einer signifikant niedrigeren Biegesteifigkeit im Vergleich zu den Kontrollen führt.
- V. In den Versuchstieren mit einer moderaten beziehungsweise intermediären HHCY konnte im Vergleich zu den Kontrolltieren kein signifikanter Unterschied in der Biegesteifigkeit des Frakturkallus gefunden werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine moderate beziehungsweise intermediäre HHCY die Knochenbruchheilung nicht negativ beeinflusst, wohingegen eine schwere HHCY die biomechanische Steifigkeit des heilenden Frakturkallus signifikant beeinträchtigt.

1.2 Summary

Numerous clinical studies have shown that an elevation of serum homocysteine (hyperhomocysteinemia) affects bone metabolism and is related to an increased incidence of osteoporotic fractures. Therefore, the herein introduced study was conducted to analyze the effect of an alimentary hyperhomocysteinemia (HHCY) on bone repair in mice.

We used adult CD-1 mice because a standardized and published fracture model was available for this species. To induce a HHCY, mice were fed a homocystine-supplemented diet (n=13), a methionine-supplemented diet (n=13), or a B vitamin-deficient diet (n=14).

Additional mice received the according standard diets (n=12 and n=13) and served as controls. Four weeks after the intramedullary stabilization of a closed femoral fracture animals were sacrificed by an overdose of pentobarbital to prepare the femora for radiological and biomechanical analyses. Prior to sacrifice, blood samples were obtained for further serum analyses. Serum analyses were performed to determine concentrations of HCY, folate and vitamin B12. The biomechanical analysis was conducted to evaluate the bending stiffness of the fracture callus. We used a non-destructive testing method to enable further histological analyses (not included in this thesis project).

The serological, radiological, and biomechanical analyses revealed the following results:

- I. The homocystine-supplemented diet, the methionine-supplemented diet, and the B vitamin-deficient diet induced a significant HHCY. Thereby, the homocystine-supplemented diet led to a severe HHCY, the methionine-supplemented diet to an intermediate HHCY and the B vitamin-deficient diet to a moderate HHCY.
- II. The serum analyses revealed significantly decreased concentrations of vitamin B12 and folate in animals, which fed the homocystine-supplemented diet, the methionine-supplemented diet, and the B vitamin-deficient diet when compared to animals, which were fed the control diets. The lowest serum concentrations of vitamin B12 and folate were found in animals, which received the vitamin-deficient diet.
- III. At four weeks of fracture healing the radiological analyses demonstrated a bony fracture bridging in all groups.
- IV. The biomechanical testing showed a significantly decreased bending stiffness of the fracture callus in animals that were fed the homocysteine-supplemented diet when compared to animals that received the according control diet.
- V. An intermediate and moderate HHCY, which was induced by the methionine-supplemented diet and the B vitamin-deficient diet, had no effect on the bending stiffness of the fracture callus.

In conclusion, the results of this study demonstrate that a moderate and intermediate HHCY does not disturb fracture healing, while a severe HHCY significantly reduces the bending stiffness of the fracture callus.

2. Einleitung

2.1 Knochen

2.1.1 Morphologie

Knochen werden anhand ihrer Form unterschieden in (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996):

- lange Knochen
- kurze Knochen
- platte Knochen

Für die vorliegende Arbeit wurden lange Knochen, die auch Röhrenknochen genannt werden, untersucht.

An Röhrenknochen werden drei Bereiche unterschieden (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996):

- die längliche, schaffförmige Diaphyse
- die beiden Epiphysen an den Knochenenden
- die, zwischen Diaphyse und Epiphysen gelegenen, Metaphysen

In der vorliegenden Arbeit diente die Diaphyse als Frakturlokalisierung.

2.1.2 Histologie

Histologisch gliedert sich Knochen in (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996):

- eine äußere Substantia compacta (Kompakta), bestehend aus kortikalem Knochen
- eine innere Substantia spongiosa (Spongiosa), bestehend aus trabekulärem Knochen

Die dicht gebaute Kompakta (Kortikalis) setzt sich beim Menschen aus Osteonen beziehungsweise dem Havers-System zusammen. Hierbei handelt es sich um eine etwa 250 µm x 1-5 cm große funktionelle Einheit aus 2-3 µm dicken Knochenlamellen (Havers-Lamellen oder Speziallamellen), die konzentrisch um den Zentralkanal (Havers-Kanal) geschichtet sind. Die, im Zentralkanal laufenden, Blutgefäße (Havers-Gefäße) sind über

seitliche Verzweigungen, die so genannten Volkmann-Kanäle, miteinander verbunden. Neben Gefäßen enthält der Zentralkanal Bindegewebe und vegetative Nerven. Zwischen den Osteonen befinden sich die Schaltlamellen, Reststücke von alten, teilweise abgebauten Havers-Systemen. Die äußeren, an das Periost angrenzenden, Lamellen werden als äußere Generallamellen, die inneren, an die Spongiosa angrenzenden, Lamellen als innere Generallamellen bezeichnet (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996).

Die Maus besitzt im Gegensatz zum Menschen eine recht primitive Knochenstruktur ohne Havers-System. Der Knochenumbau nach einer Knochenverletzung erfolgt über so genannte Resorptionshöhlen. Diese entstehen in der Nähe der Fraktur und füllen sich dann im Laufe der Frakturheilung mit Osteoblasten auf (NUNAMAKER, 1998).

Die Spongiosa ist aus einem komplexen System aus Knochenbälkchen und Knochenplatten aufgebaut und beherbergt in ihren Zwischenräumen das Knochenmark (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996).

Grundsätzlich unterscheidet man zwei verschiedene Arten von Knochengewebe:

- Geflecht- oder Faserknochen
- Lamellenknochen

Bei jeder Knochenneubildung entsteht zunächst Geflechtknochen, der sich im weiteren Verlauf zu Lamellenknochen umdifferenziert (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996).

Im Vergleich zu Lamellenknochen weist Geflechtknochen, dessen Kollagenfaserbündel unregelmäßig in der Grundsubstanz verlaufen, einen größeren Zellreichtum, eine diffuse Verteilung der Osteozyten und einen geringeren Anteil anorganischer Bestandteile auf. Während Lamellenknochen entlang mechanischer Kraftlinien wächst, erfolgt das Wachstum des Geflechtknochens entlang der Kapillaren (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996).

Lamellen beschreiben 3-7 µm dicke Knochenschichten aus Osteozyten und parallel verlaufenden, schraubenförmig angeordneten Kollagenfasern. Dieses Bauprinzip dient der Modellierung von Zug- und Druckbelastungen auf den Knochen (BUCHER, WARTENBERG, 1997).

Zwischen zwei Lamellen liegen in den Knochenhöhlen (Lacunae osseae) die Osteozyten. Von den Lakunen ziehen radiär Knochenkanälchen (Caniculi ossei) mit eingeschlossenen

Osteozytenfortsätzen zu benachbarten Osteonen und stellen so eine Verbindung zum Havers-Kanal her (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996).

Neben den Osteozyten enthält der Knochen mesenchymale Vorläuferzellen, Osteoblasten und Osteoklasten. Die mesenchymalen Vorläuferzellen, die an der inneren und äußeren Knochenoberfläche sowie in den Havers-Kanälen liegen, verwandeln sich bei entsprechender -hauptsächlich hormoneller- Stimulation in Osteoblasten (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996). An der Oberfläche der Knochenbälkchen wird von den Osteoblasten neue Knochengrundsubstanz gebildet und im weiteren Verlauf mit Hilfe der alkalischen Phosphatase mineralisiert (beim Menschen in der Spongiosa nach etwa 25, in der Kortikalis nach etwa 35 Tagen).

Inaktive Osteoblasten liegen der Knochenoberfläche auf und werden in diesem Zusammenhang auch Belegzellen (Lining Cells) genannt. Diese Osteoblasten wandeln sich in Osteozyten um, nachdem sie vollständig von neu produziertem Osteoid umschlossen wurden (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996).

Osteoklasten entwickeln sich im Gegensatz zu den übrigen Knochenzellen, die mesenchymalen Ursprungs sind, aus hämatopoetischen Vorläuferzellen. Sie dienen in Form von mehrkernigen Riesenzellen dem Abbau mineralisierter Knochengrundsubstanz. Osteoklasten liegen in Vertiefungen an der Knochenoberfläche (Howship-Lakunen) oder in der Kortikalis, in der sie Gefäßkanäle für neue Osteonen formen. So baut ein Osteoklast dieselbe Menge an Knochen ab, die etwa 100-150 Osteoblasten zeitgleich produzieren (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996).

Die Interzellulärsubstanz (Knochengrundsubstanz) besteht zu 65 % aus anorganischen und zu 35 % aus organischen Komponenten. Die anorganische Knochengrundsubstanz setzt sich vor allem aus Knochenmineralien wie Calciumphosphaten und Calciumcarbonaten zusammen. Die organische Matrix unterteilt sich zu etwa 90 % in Kollagen und zu etwa 10 % in nicht-kollagene Proteine und Lipide (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996).

Mit Ausnahme der knorpeligen Gelenkflächen wird der Knochen von Periost überzogen. Das Periost wird funktionell in zwei unterschiedliche Schichten unterteilt:

- Stratum fibrosum
- Stratum osteogenicum

Das Stratum fibrosum ist durch Kollagenfaserbündel (Sharpey-Fasern) mit der Kortikalis teils fest, teils locker verbunden. Am Ansatz der Sehnen und Bänder wird die Zugbelastung auf den Knochen verringert, indem die Kollagenfasern der Sehnen und Bänder in das Stratum fibrosum einstrahlen und somit die Zugkräfte auf eine größere Ansatzfläche verteilen (SCHIEBLER, SCHMIDT, 2003).

Das, auch als Kambiumschicht bezeichnete, Stratum osteogenicum enthält kleine Gefäße und Kapillaren, die die Volkmann- und Havers-Gefäße der Kompakta versorgen und somit die Ernährung der Knochensubstanz ermöglichen. Außerdem führt es sensible Nervenfasern, die die Schmerzempfindungen im Bereich des Periosts hervorrufen. Des Weiteren trägt das Stratum osteogenicum zur Neubildung von Knochensubstanz bei, da hier eine Differenzierung der Osteoblasten während des periostalen Knochenwachstums stattfindet. Die Osteoblastendifferenzierung nimmt nach Abschluss des physiologischen Knochenwachstums ab, setzt allerdings erneut im Rahmen der Frakturheilung ein (periostale Knochenneubildung) (SCHIEBLER, SCHMIDT, 2003).

Das Knochenmark wird beim Menschen während der Embryogenese zunächst als so genanntes rotes blutbildendes Mark angelegt, in dem sich ab dem 5.-6. Fetalmonat die Hämatopoese etabliert. Während primär das Knochenmark aller Knochen an der Blutneubildung beteiligt ist, wird in den langen Röhrenknochen das rote Mark ab dem vollendeten ersten Lebensjahr zunehmend von gelbem Fettmark ersetzt. Somit beschränkt sich die Blutbildung im höheren Lebensalter weitestgehend auf die kurzen und platten Knochen. Im Bedarfsfall (chronische Hypoxie und Anämie) ist eine Umkehr dieser Entwicklung möglich (BÖCKER et al., 2004).

Histologisch besteht das Knochenmark aus hämatopoetischen Zellen, Stroma und Blutgefäßen. Das Stroma enthält zudem Retikulozyten, Lipozyten und Osteoblasten. Die, von den Retikulozyten gebildete, Matrix bindet hämatopoetische Wachstumsfaktoren und Interleukine und präsentiert sie in biologisch aktiver Form den hämatopoetischen Zellen (BÖCKER et al., 2004).

2.1.3 Physiologie

Die Hauptaufgaben des Knochens sind:

- Stützfunktion
- Strukturfunktion
- Mobilitätsfunktion
- Calciumhomöostase

Unabdingbare Voraussetzung für die Aufrechterhaltung dieser Funktionen sind, sich ständig wiederholende, Formations- und Resorptionsvorgänge, die durch die folgenden Abläufe gekennzeichnet sind:

- Wachstum
- Modeling
- Remodeling

Das Knochenwachstum findet vor allem an den Epiphysenfugen statt und führt dort zu einem Längenzuwachs sowie zu einer Zunahme der Knochenmasse an sich (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996).

Die Fähigkeit des Knochens, auf spezifische mechanische Erfordernisse mit gezielten Formveränderungen zu reagieren, bezeichnet man als Modeling. Diese Fähigkeit ist besonders während der Wachstumsphase ausgeprägt und nimmt mit zunehmendem Alter stark ab (FLEISCH, 1997).

Remodeling beschreibt dynamische Umbauprozesse im Knochen, die belastungsunabhängig sind und somit auch zu keiner Zunahme an Knochenvolumen führen. Ziel dieses Vorganges, der ein Leben lang abläuft, ist unter anderem die Reparatur von Mikrofrakturen. Unter Coupling versteht man das ständige Gleichgewicht von Knochenresorption und neuem Knochenanbau; die dazugehörige morphologische Struktur wird als Basic Remodeling Unit (BRU) bezeichnet (FLEISCH, 1997).

2.2 Frakturheilung

2.2.1 Primäre Frakturheilung

Unter primärer Frakturheilung versteht man die Vereinigung von Frakturfragmenten unter Umgehung einer äußeren Kallusmanschette. In Abhängigkeit von der absoluten Frakturspaltweite (beim Menschen größer oder kleiner als etwa 0,2 mm) unterscheidet man Kontaktheilung und Spaltheilung.

Im Rahmen der Kontaktheilung erfolgt die Knochenregeneration durch longitudinal einwachsende Osteone. Dabei „bohren“ Osteoklasten einen so genannten Resorptionskanal in die Kortikalis des gegenüberliegenden Fragmentes und ebnen somit den Weg für Osteoblasten, welche konsekutiv im Zuge der Wiederauffüllung des Resorptionskanals, Lamellenknochen bilden. Auf diesem Wege werden die Knochenfragmente direkt miteinander vereinigt (RÜTER et al., 2003).

Im Rahmen der Spaltheilung wird der Frakturspalt innerhalb von 3-4 Wochen zunächst mit Geflechtknochen aufgefüllt. Anschließend wird in einer zweiten Phase das neu gebildete Knochengeflecht zu Lamellenknochen, der parallel zur Schaftachse ausgerichtet ist, umgebaut (RÜTER et al., 2003).

Voraussetzung für eine primäre Frakturheilung ist eine ausreichende Vaskularität sowie eine mechanische Frakturstabilität. Das medulläre Gefäßsystem wird dabei innerhalb weniger Tage im Sinne einer Kapillaraussprossung wiederhergestellt. Dies wird im Allgemeinen nur nach einer Frakturstabilisierung mittels Osteosynthese erreicht (RÜTER et al., 2003).

Ob unter den oben genannten Voraussetzungen an der Maus ebenfalls eine primäre Knochenbruchheilung möglich ist, ist bislang nicht bekannt. Bis dato angewandte Frakturmodelle an der Maus führen zu einer sekundären Frakturheilung (HILTUNEN et al., 1993; MANIGRASSO, O'CONNOR, 2004).

2.2.2 Sekundäre Frakturheilung

Die Mehrzahl der Frakturen heilt durch eine sekundäre Frakturheilung aus. Diese Art der Frakturheilung erfolgt immer dann, wenn keine anatomische Reposition der

Knochenfragmente erreicht wird. Die sekundäre Knochenbruchheilung lässt sich in fünf, sich teilweise überlappende, Phasen gliedern:

- Frakturphase
- Entzündungsphase
- Granulationsphase
- Phase der Kallushärtung
- Phase des Modeling und Remodeling

Die Frakturphase erstreckt sich vom Einsetzen einer Gewalteinwirkung auf den Knochen und das ihn umgebende Weichteilgewebe bis zu dem Augenblick, in dem die gesamte Kraft durch den brechenden Knochen und das umliegende Gewebe aufgehoben wird. Dieser Vorgang verletzt Kortikalis, Spongiosa, Knochenmark, Periost und in unterschiedlichem Ausmaß angrenzende Weichteile und führt so zu einem Hämatom im Frakturbereich (RÜTER et al., 2003).

Unmittelbar im Anschluss an die Frakturphase setzt eine überschießende Kapillaraussprossung sowie eine Kaskade der Proliferation, Migration und Differenzierung von überwiegend pluripotenten Stammzellen, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen ein. Die Rolle der Mastzellen ist bisher nicht eindeutig geklärt, es wird aber vermutet, dass sie über die Ausschüttung von Heparin und heparinähnlichen Substanzen die lokale Vaskularisation und Zellmigration beeinflussen. Verschiedene Studien propagieren zudem, dass die, aus dem hämatopoetischen System stammenden, Mastzellen als Vorläuferzellen der Osteoklasten angesehen werden können (BOYLE et al., 2003; RÜTER et al., 2003; TEITELBAUM, ROSS, 2003).

In dieser frühen Phase der Frakturheilung scheint die Angiogenese eine wichtige Rolle für die Zellmigration und die Zellnutrition zu spielen. Zudem wird diskutiert, dass mesenchymale Vorläuferzellen direkt dem einsprießenden Gefäßendothel entstammen (TREMAIN et al., 2001). Die gesteigerte Gewebesperfusion während der Entzündungsphase erfolgt unter einer so genannten „Flussumkehr“. Unter physiologischen Bedingungen wird die Kortikalis zentrifugal, das heißt zu etwa zwei Drittel über die Markraumgefäße ernährt. Nach Frakturierung wird die Kortikalis dagegen hauptsächlich über die periostalen Gefäße perfundiert. Beim Menschen erreicht die Durchblutung in der zweiten Woche nach dem Trauma ein Maximum mit Werten um das Sechsfache der Norm (RÜTER et al., 2003).

Zwischen der Kambiumschicht des Periosts und der Knochenoberfläche liegen so genannte Spindelzellen. Morphologisch sind Spindelzellen von normalen Fibroblasten nicht zu unterscheiden. Da aus Spindelzellen allerdings Osteoblasten hervorgehen können, werden sie auch Osteoprogenitorzellen genannt (RÜTER et al., 2003).

Nach 2-3 Tagen ist beim Menschen die Entzündungsphase abgeklungen. Das Hämatom, in dem sich bereits ein liches Netz von Fibrin und Kollagenfibrillen nachweisen lässt, wird rasch durch Granulationsgewebe, bestehend aus Lymphozyten, Fibroblasten, neu gebildetem Kollagen und zahlreichen Kapillaren, ersetzt. In unmittelbarer Nachbarschaft zu Fibroblasten finden sich innerhalb von Kollagenfibrillen bereits in diesem frühen Stadium der Frakturheilung Mineraldepots. Der so genannte weiche Kallus wird durch erste Granulationsgewebsbrücken zwischen den Knochenfragmenten gebildet. In dieser Phase beginnt auch der Abbau der abgestorbenen Fragmentenden durch Osteoklasten. Aus mesenchymalen Vorläuferzellen differenzieren Chondroblasten, während subperiostal eine direkte Knochenneubildung durch Osteoblasten einsetzt (desmale Ossifikation oder „primäre Kallusreaktion“) (RÜTER et al., 2003).

Zur gleichen Zeit wandert ein so genanntes Blastem aus dem Markraum in das Frakturhämatom ein und füllt den Frakturspalt als medullärer Kallus. Beim Menschen sind nach etwa 3-4 Wochen die Fragmente durch Bindegewebe und Knorpel weich miteinander verbunden (RÜTER et al., 2003). An der Maus ist dieses Stadium der Frakturheilung bereits nach 10-14 Tagen zu beobachten (MANIGRASSO, O'CONNOR, 2004).

Durch die zunehmende Mineralisation der Grundsubstanz „härtet der Kallus aus“. Die Mitochondrien hypertropher Chondrozyten liefern das hierfür notwendige Calcium. Im Gegensatz zu reifem Lamellenknochen verläuft der entstehende Geflechtknochen (enchondrale Ossifikation) nicht entlang mechanischer Belastungslinien, sondern entlang neuer Kapillarsprosse. Zeitgleich erfolgt frakturspaltfern eine periostale Osteoblastenproliferation und somit eine Ablagerung von Geflechtknochen zwischen der Diaphysenoberfläche und dem Periost (intramembranöse Ossifikation) (RÜTER et al., 2003).

Auch während der Frakturheilung ist für den Abbau des nekrotischen Knochens sowie für den Umbau des mineralisierten Knorpels in Knochen die so genannte BRU verantwortlich. Zusammengefasst wird calcifizierter Knorpel durch Osteoklasten resorbiert und durch osteoblastär gebildeten Geflechtknochen ersetzt (RÜTER et al., 2003).

Der, im Rahmen der Kallusbildung entstandene, Geflechtknochen wird entsprechend seiner mechanischen Belastung in Lamellenknochen umgewandelt (Modeling). Den Abschluss der Knochenbruchheilung stellt die Wiederherstellung der normalen Knochenkontur sowie des ursprünglichen Markraums dar (Remodeling) (RÜTER et al., 2003).

2.3 Frakturmodelle

Obwohl in der Vergangenheit zahlreiche Erkenntnisse über die Physiologie der Knochenbruchheilung durch klinische Studien am Menschen sowie durch In-vitro-Studien gewonnen werden konnten, sind Tiermodelle bis heute essentieller Bestandteil der Frakturheilungsforschung. In diesem Zusammenhang wurden zahlreiche Frakturmodelle an verschiedenen Säugetierarten entwickelt. In Abhängigkeit von der jeweiligen Fragestellung der Studie wurden Spezies unterschiedlicher Größe und Anatomie von Kleinnagetieren wie der Maus (HILTUNEN et al., 1993) bis hin zu Großtiersäugern wie etwa dem Schaf (CHEAL et al., 1991; KIRKER-HEAD et al., 1995) als Versuchstiere gewählt. Konsekutiv sollten Unterschiede in der Anatomie der Spezies sowie der entsprechenden Biologie der Knochenbruchheilung in dem Aufbau der Experimente und in der Interpretation der Ergebnisse Beachtung finden, da eine Übertragbarkeit der Studie auf den Menschen immer diskutiert werden muss (RHINELANDER, 1974).

Seitens der Anatomie haben kleine Nagetiere wie Mäuse und Ratten den Nachteil, dass sie eine recht primitive Knochenstruktur ohne Havers-System aufweisen. Kleine Nagetiere benutzen für das Remodeling im Rahmen der Knochenbruchheilung Resorptionshöhlen, die sich in der Nähe der Fraktur bilden und sich in späteren Stadien der Knochenbruchheilung mit Osteoblasten auffüllen. Obwohl dieser Vorgang dem Remodeling bei vorhandenem Havers-System sehr ähnlich ist, ist über die Relevanz dieser biologischen Unterschiede noch wenig bekannt. Entsprechend können kleine Nagetiere nicht für Studien verwendet werden, die die Form, die Funktion und die Beschaffenheit des Havers-Systems untersuchen. Phylogenetisch tritt das Havers-System erst bei Kaninchen auf, wenn auch hier mit anatomischen Unterschieden zum Havers-System des Menschen (NUNAMAKER, 1998).

Trotz großer Ähnlichkeiten im Genom der verschiedenen Säugetiere werden bestimmte Gene in Abhängigkeit von der jeweiligen Spezies zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert. In tierexperimentellen Studien sollten daher Spezies-abhängige Unterschiede in der zeitlichen Expression von Zytokinen stets Beachtung finden. Entsprechend ist die

Dosierung sowie der Applikationszeitpunkt von Zytokinen im Rahmen tierexperimenteller Studien immer zu diskutieren (NUNAMAKER, 1998).

Ein weiteres wichtiges Kriterium in der Auswahl eines entsprechenden Tiermodells ist die unterschiedliche Response verschiedener Spezies auf Medikamente. So weisen verschiedene Tierarten ein völlig unterschiedliches Metabolisierungspotential bestimmter Wirkstoffe auf. Dies führt zu differenten Effekten der Medikamente auf den Organismus der jeweiligen Spezies und erfordert somit auch eine Anpassung der Applikationsdosis. Ein Beispiel hierfür ist die toxische Wirkung von nichtsteroidalen Antiphlogistika auf Katzen und Hunde (HERRGESELL, 1967; JONES et al., 1992).

Des Weiteren ist bekannt, dass das Alter der Versuchstiere einen entscheidenden Einfluss auf die Frakturheilung hat. So weist etwa ein juveniler Knochen einen schnelleren Heilungsablauf auf, als ein seniler Knochen (LU et al., 2005; LU et al., 2008). Als Hinweis auf ein abgeschlossenes Knochenwachstum sollte ein Schluss der Wachstumsfuge radiologisch nachweisbar sein (NUNAMAKER, 1998).

Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden zahlreiche Tiermodelle für die Reproduktion und Analyse physiologischer und pathologischer Prozesse während der Frakturheilung entwickelt.

2.3.1 Maus

Während primär Großtiermodelle zur Untersuchung der Knochenbruchheilung benutzt wurden, haben sich in jüngerer Vergangenheit zunehmend Kleintiermodelle vor allem an der Maus etabliert. Aufgrund der geringen Kosten für die Beschaffung, Zucht und Haltung dieser Spezies sind große Versuchsgruppen gut realisierbar. Das Genom der Maus ist in seiner Gesamtheit entschlüsselt, was einen enormen Vorteil in der Durchführung molekularbiologischer Studien darstellt. Konsekutiv existiert für keine andere Spezies ein derart großes Spektrum verfügbarer transgener Stämme sowie spezifischer Antikörper (ROSSANT, NAGY, 1995). Wie oben bereits erwähnt, besitzt die Maus –wie auch die Ratte– im Gegensatz zu größeren Tieren eine recht primitive Knochenstruktur ohne Havers-System. Diese anatomische Besonderheit sollte im Hinblick auf die Übertragbarkeit von Ergebnissen auf den Menschen stets beachtet werden. Eine große Herausforderung in der Entwicklung von Frakturmodellen an der Maus stellt die diffizile Anatomie dieser Spezies dar. So verlangt die Frakturierung und osteosynthetische Stabilisierung eines Mäusefemurs mit einer Länge

von etwa 15 mm und einem Durchmesser von etwa 1,5 mm ein hohes Maß an handwerklichem und operativem Geschick (HOLSTEIN et al., 2007).

In den bis dato publizierten Frakturmodellen an der Maus wurde die Knochenbruchheilung vor allem an der Rippe, der Tibia sowie dem Femur untersucht (BOURQUE et al., 1992; HILTUNEN et al., 1993; NAKASE et al., 1994; MANIGRASSO, O'CONNOR, 2004; HOLSTEIN et al., 2007).

Frakturmodelle an Rippen eignen sich aufgrund der ungünstigen Anatomie schlecht für biomechanische Testmethoden und wurden daher fast ausschließlich für Genexpressionsanalysen während der Frakturheilung angewandt (NAKASE et al., 1994; ITO et al., 1999; YAMAGIWA et al., 1999).

Im Gegensatz zur Rippe eignen sich die Tibia sowie das Femur gut für biomechanische Testungen. Die anatomischen Vorteile des Mäusefemur gegenüber der Tibia liegen in einem einheitlichen runden Querschnitt bei guter Weichteildeckung (CHEUNG et al., 2003). Grundsätzlich wird bei Tibia- und Femur-Frakturmodellen an Maus und Ratte zwischen geschlossener und offener Frakturierung unterschieden. Die geschlossenen Frakturmodelle lassen sich im Wesentlichen auf das von Bonnarens und Einhorn 1984 an der Ratte beschriebene Modell zurückzuführen (BONNARENS, EINHORN, 1984). Basierend auf einer stumpfen Guillotine wird hierbei ein standardisierter transverser Frakturverlauf unter minimalem Weichteilschaden erzeugt. Das entsprechende Modell an der Maus wurde von Hiltunen und Kollegen 1993 an der Tibia (HILTUNEN et al., 1993) sowie von Manigrasso und O'Connor 2004 am Femur publiziert (MANIGRASSO, O'CONNOR, 2004). Für die offene Femurfrakturierung wird meist ein lateraler longitudinaler Zugang gewählt, um den Knochen unter Sicht zu frakturieren oder zu osteotomieren (CHEUNG et al., 2003). In den meisten Frakturmodellen an Maus und Ratte werden der Femur beziehungsweise die Tibia nach definierten Zeitabschnitten explantiert, und die Knochenbruchheilung mit radiologischen, biomechanischen und histologischen Methoden analysiert. Die biomechanische Testung wird mehrheitlich als Drei-Punkt-, Vier-Punkt- oder Rotationsmessung durchgeführt (HOLSTEIN et al., 2007).

Als großer Nachteil der intramedullären Pin-Stabilisierung, die mehrheitlich als Osteosynthesetechnik an der Maus eingesetzt wird, ist die unzureichende Rotationsstabilität im Frakturbereich anzusehen. Außerdem wurde aufgrund der schwierigen Reposition eine Frakturierung ursprünglich nur nach vorheriger Implantateinbringung durchgeführt (NUNAMAKER, 1998; RÜTER et al., 2003). Durch die Entwicklung eines Fixateur externes (CHEUNG et al., 2003) sowie einer winkelstabilen Platten-Osteosynthese für das

Mäusefemur (MATTHYS, PERREN, 2008) konnte im Gegensatz zur Marknagelung eine suffiziente Stabilität im Frakturspalt erzielt werden. Da die genannten Implantate allerdings offen eingebracht werden müssen, besitzen diese Osteosyntheseverfahren eine höhere Invasivität als die Marknagelung (CHEUNG et al., 2003).

Um das „mechanical environment“ innerhalb des Frakturspaltes zu standardisieren, entwickelte unsere Arbeitsgruppe kürzlich ein Verriegelungsmarknagel-Modell, in dem durch eine beidseitige Abflachung einer herkömmlichen Spritzkanüle erstmals eine rotationsstabile, geschlossene Osteosynthese erreicht wurde (HOLSTEIN et al., 2007). Im Gegensatz zu dem Fixateur externe, als dem bis dato einzigen rotationsstabilen Osteosyntheseverfahren an der Maus, erfordert das Verriegelungsmarknagel-Modell keinen offenen lateralen Zugang. Unter Verwendung eines Führungsdrahtes ist zudem eine geschlossene Frakturierung ohne liegendes Implantat möglich (HOLSTEIN et al., 2007). In Weiterentwicklung dieses Modells wurde eine rotations- und zusätzlich achsstable intramedulläre Kompressionsschraube konzipiert, welche in der vorliegenden Arbeit für die Frakturstabilisierung verwendet wurde (HOLSTEIN et al., 2009b).

2.3.2 Ratte

Im Gegensatz zur Maus ist die Ratte schon seit längerer Zeit als Tiermodell für die Untersuchung der Frakturheilung etabliert. Dabei werden vor allem Femur, Tibia, Schädel, Metatarsale, Radius und Ulna als Frakturlokalisation genutzt (BAK, JENSEN, 1992; UTVAG et al., 1994; HIETANIEMI et al., 1995; GURGEL et al., 2005; HEINO et al., 2008). Der große Vorteil der Ratte gegenüber der Maus liegt in ihrer Körpergröße, was vor allem das operative Handling, aber auch die biomechanische Knochentestung deutlich erleichtert. Grundsätzlich sind die Tibia- und Femur-Frakturmodelle an der Ratte mit denen an der Maus vergleichbar. Instabile Pin-Osteosynthesen (BONNARENS, EINHORN, 1984) werden mittlerweile auch an der Ratte zunehmend durch stabile Fixationstechniken unter Verwendung von Verriegelungsmarknägeln, Platten, sowie externen Fixateuren ergänzt (KOLLN et al., 1983; KASPAR et al., 2007; RUSSELL et al., 2007; SCHOEN et al., 2007; WINGERTER et al., 2007; DROSSE et al., 2008; WILLIE et al., 2009).

2.3.3 Kaninchen

Neben Ratte und Maus ist das Kaninchen die dritte Nagetier-Spezies, die häufig für Studien zur Knochenbruchheilung genutzt wird (ASHHURST et al., 1982; STRONG et al., 1992;

STAFFORD et al., 1994). Aufgrund der Körpergröße dieser Tierart sind biophysikalische Untersuchungen praktikabler als bei Klein-Nagern. Stabilisierungssysteme, die vor allem an der Maus eine hohe technische Herausforderung darstellen, wie etwa Fixateur externe, Platte, Schraube, oder Verriegelungsnagel sind am Kaninchen ohne allzu großen technischen Aufwand zu konstruieren und anzuwenden (DANCKWARDT-LILLIESTROM et al., 1970; BRIGHTON et al., 1985; KAPLAN et al., 1985; PILLA et al., 1990; DEIBERT et al., 1994). Im Gegensatz zu größeren Säugetieren wie etwa dem Hund oder Schaf erlaubt die Körpergröße des Kaninchens die Applikation höherer Dosen kostenintensiver Substanzen. Entsprechend sind auch die Kosten für Anschaffung, Zucht und Haltung von Kaninchen gegenüber Groß-Säugetieren überschaubar (CRITCHLOW et al., 1995).

2.3.4 Katze

Die Knochenbruchheilung an der Katze wurde bislang sowohl im Rahmen von veterinärmedizinischen Therapiestudien als auch im Rahmen von Forschungsarbeiten an Frakturmodellen untersucht (NEWTON, ZEITLIN, 1977; HENRY et al., 1985; TOOMBS et al., 1985; PUECH et al., 1990). Dabei wurden verschiedenste Methoden hinsichtlich operativer Stabilisierung sowie konservativer Behandlung von Frakturen, aber auch hinsichtlich des Einheilverhaltens von Knochentransplantaten beschrieben (HENRY et al., 1985; PUECH et al., 1990). Die Anatomie der langen Röhrenknochen der Katze, insbesondere des Femurs begünstigt aufgrund einer langen und geraden Konfiguration die Einbringung von intramedullären Implantaten aber auch von Platten- und Schrauben-Osteosynthesen (TOOMBS et al., 1985).

2.3.5 Hund

Da die Frakturheilung am Hund von großem Interesse für die Veterinärmedizin ist, sind viele Informationen über die Behandlung und die biologischen Heilungsabläufe von Frakturen am Hund verfügbar (JOHNSON, STEIN, 1988). Aber auch im Rahmen von tierexperimentellen Studien ist der Hund ein beliebtes Modell für die Untersuchung der Frakturheilung. Hierbei wurden zahlreiche Frakturmodelle mit internen und externen Stabilisierungstechniken, aber auch Modelle ohne Stabilisierung sowie Modelle mit verzögerter und ausbleibender Frakturheilung entwickelt (MULLER et al., 1968; DAVY, CONNOLLY, 1982; DAUM et al., 1983; LEWALLEN et al., 1984; LENEHAN et al., 1985; CHAO et al., 1989; GEORGIADIS et al., 1990; ROUSH, WILSON, 1990; HECKMAN et al., 1991; EGGER et al., 1993; VOLPON, 1994; PETER et al., 1996).

2.3.6 Schaf

Vor allem für die Entwicklung und Testung neuer Human-Implantate ist das Schaf ein beliebtes Versuchstier (NUNAMAKER, PERREN, 1979; STEEN et al., 1988; CHEAL et al., 1991; RICHARDSON, NUNAMAKER, 1991; KIRKER-HEAD et al., 1995). So nutzten sowohl die *Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese (AO)* als auch die *Association for the Study of Internal Fixation (ASIF)* wiederholt das Schaf als Versuchstier für die Untersuchung der Frakturheilung unter Verwendung einer Platten-Osteosynthese (PERREN et al., 1969; SCHENK, WILLENEGGER, 1977; NUNAMAKER, PERREN, 1979). Entsprechend ist die primäre Knochenbruchheilung an dieser Spezies, bei der das Remodeling über das Havers-System erfolgt, gut beschrieben (SCHENK, WILLENEGGER, 1977). Des Weiteren wurden Schafe aber auch für Studien zur intramedullären Marknagelung verwendet (STEEN, FJELD, 1989; SCHEMITSCH et al., 1994; SCHEMITSCH et al., 1995). Da Schafe die behandelte Extremität früh belasten, sind Studien, die die sekundäre Frakturheilung nach intramedullärer Stabilisierung untersuchen, am Schaf aufgrund des erwünschten Kompressionseffektes gut durchführbar. Die relativ hohen Kosten für Zucht und Haltung der Tiere limitieren allerdings die Verwendung großer Versuchsgruppen (NUNAMAKER, 1998).

2.3.7 Ziege

Im Gegensatz zum Schaf hat sich die Ziege als Versuchstier zur Untersuchung der Knochenbruchheilung bis dato nicht durchgesetzt (CURTIS et al., 1995). Unter anderem die hohe Inzidenz von Pathologien und Erkrankungen des Bewegungs- und Stützapparates -wie etwa die infektiöse Ziegenarthritis- limitieren die Aussagekraft von konventionellen Frakturheilungsstudien an dieser Spezies (ADAMS et al., 1983).

2.3.8 Pferd

Aufgrund des hohen Körpergewichtes und der hohen Haltungs- und Zuchtkosten ist das Pferd als Versuchstier für Frakturheilungsstudien nicht geeignet. Als Folge einer mangelnden Compliance ist eine suffiziente Frakturheilung selbst unter hohem veterinärmedizinischem Aufwand häufig nicht möglich. Entsprechend ist der Versuch einer osteosynthetischen Frakturversorgung am Pferd eine enorme technische und veterinärmedizinische Herausforderung, die tierexperimentelle Studien an dieser Spezies nicht rechtfertigt (NUNAMAKER et al., 1991).

2.3.9 Primaten

Die Knochenstruktur von Primaten ist entsprechend der Phylogenese mit der des Menschen größtenteils vergleichbar. Aus ethischen Gründen sind Studien zur Frakturheilung an Primaten dennoch weitestgehend obsolet (NUNAMAKER, 1998).

2.4 Homocystein

2.4.1 Methionin-Homocystein-Stoffwechsel

Homocystein (HCY) ist ein schwefelhaltiges Intermediärprodukt im Stoffwechsel der essentiellen Aminosäure Methionin (Abb. 1) (FINKELSTEIN, MARTIN, 1984; FINKELSTEIN, 1990, 1998). Mit der Nahrung aufgenommene Proteine stellen die exklusive exogene Methioninquelle des menschlichen Organismus dar. Methionin spielt eine zentrale Rolle bei der Bereitstellung von Methylgruppen für eine Vielzahl von Akzeptoren, wie z. B. die Desoxyribonukleinsäure (DNA), die Ribonukleinsäure (RNA), Epinephrin, Melatonin oder Kreatin (CHIANG et al., 1996). Der erste Schritt der Metabolisierung von Methionin ist seine Aktivierung durch eine Kopplung an einen Adenosylrest aus Adenosintriphosphat (ATP). Dabei wird energiereiches S-Adosylmethionin (SAM) gebildet, das seine Methylgruppe leicht abgeben kann. SAM ist der wichtigste Methylgruppendonator im Zellstoffwechsel. Bei der Methylgruppenübertragung (Transmethylierung) auf potentielle Akzeptoren werden meist Stickstoff- oder Sauerstoffatome methyliert. Bei der Transmethylierung entsteht S-Adosylhomocystein (SAH), das durch Hydrolyse in Adenosin und HCY aufgespalten wird (FINKELSTEIN, 1990, 1998).

Da HCY toxisch ist, muss seine Konzentration in der Zelle niedrig gehalten werden. Dafür stehen der Zelle prinzipiell drei Möglichkeiten zur Verfügung: der Export aus der Zelle, die Remethylierung zu Methionin oder der irreversible Abbau über eine Transsulfurierung zu Cystein und Glutathion (FINKELSTEIN, 1990, 1998).

Bei der Remethylierung wird eine, von dem Vitamin 5-Methyltetrahydrofolsäure (5-MTHF) bereitgestellte, Methylgruppe durch das Vitamin-B12-abhängige Enzym Methioninsynthase (MS) auf HCY übertragen. Im Rahmen der Transsulfurierung kondensieren HCY und Serin zu Cystathionin. Diese Reaktion wird durch das Enzym Cystathionin- β -Synthase (CBS) katalysiert. Anschließend wird das gebildete Cystathionin durch das Enzym γ -Cystathionase (CS) irreversibel in Cystein und Glutathion abgebaut. CBS und CS benötigen als Kofaktor

Vitamin B6. Hieraus erklärt sich, dass Folsäure, Vitamin B6 und Vitamin B12 für die Gewährleistung einer konstant niedrigen HCY-Konzentration im Organismus essentiell sind. Mängel an Folsäure, Vitamin B6 und Vitamin B12 führen somit durch eingeschränkte Enzymaktivitäten zu einer Abbauphemmung mit einer konsekutiven intrazellulären Konzentrationserhöhung von HCY. Wegen seiner Zytotoxizität wird HCY in diesem Fall zunehmend aus der Zelle exportiert, so dass es im Plasma vermehrt nachweisbar wird (SELHUB et al., 1993; JACQUES et al., 1996; DURAND et al., 2001).

Die Metabolisierung von HCY erfolgt hauptsächlich (zu etwa 70 %) in der Niere (Nierenepithelien). Im Harn gesunder Probanden lassen sich aber nur geringe Mengen HCY nachweisen. Eine Einschränkung der Nierenfunktion ist von einer Verminderung der Remethylierungs- und Transsulfurierungsrate begleitet, was zu einer Akkumulation von HCY mit konsekutiver Hyperhomocysteinämie (HHCY) führt (VAN GULDENER, ROBINSON, 2000; VAN GULDENER et al., 2001, 2005). Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion haben deshalb besonders häufig eine HHCY und besitzen ein besonders hohes kardiovaskuläres und osteoporotisches Risiko (HERRMANN et al., 1999; VAN GULDENER, ROBINSON, 2000; VAN GULDENER et al., 2005).

Hinsichtlich der Bewertung der HHCY werden eine moderate (12-30 $\mu\text{mol/l}$), eine intermediäre (30-100 $\mu\text{mol/l}$) und eine schwere ($> 100 \mu\text{mol/l}$) HHCY voneinander unterschieden (STANGER et al., 2003). Ursachen der moderaten HHCY sind meist ein Mangel an Folsäure, Vitamin B6 und Vitamin B12. Eine intermediäre und schwere HHCY wird im Wesentlichen durch homozygote Enzymdefekte oder chronische Nierenerkrankungen hervorgerufen (STANGER et al., 2003). Die häufigsten Ursachen für einen Mangel an B-Vitaminen stellen eine unzureichende Zufuhr über die Nahrung, eine reduzierte Absorption über den Darm, sowie Medikamenten-Interaktionen dar. Personen, die sich einseitig ernähren (z.B. Vegetarier, Alkoholiker), alte Menschen, Schwangere, Patienten mit Nierenerkrankungen oder malignen Erkrankungen sind besonders gefährdet, eine HHCY auszubilden (STANGER et al., 2003). Der Folatmangel ist der häufigste Vitaminmangel in unseren Breitengraden. Er wird durch einen Mangel beziehungsweise einen unzureichenden Verzehr von frischem Obst und Gemüse begünstigt (STANGER, 2002). Die täglich empfohlene Zufuhr von 400 μg Folsäureäquivalenten wird somit häufig unterschritten (STANGER et al., 2003). In einigen Ländern wird die Nahrung zunehmend mit Folsäure angereichert. In den westlichen Ländern, in denen keine Anreicherung mit Folsäure erfolgt, schwankt die Prävalenz einer HCY-Serumkonzentration von über 12 $\mu\text{mol/l}$ zwischen 10 % und 30 % bei Personen über 40 Jahren (HERRMANN et al., 1999; DE BREE et al., 2001).

Zusätzlich zu ihren Funktionen als Kofaktoren für die, am Stoffwechsel von HCY beteiligten, Enzyme haben die Vitamine B6 und B12 sowie Folsäure weitere wichtige HCY-unabhängige Eigenschaften (BENDER, 1994; CHASAN-TABER et al., 1996; ROBINSON et al., 1998; VOUTILAINEN et al., 2001). Mängel an Folsäure und Vitamin B6 sind eigenständige Risikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Folsäuremangel führt zudem zu Hypomethylierungen, DNA-Schäden (Chromosomenstrangbrüchen) und einer gestörten Zellproliferation mit einem deutlich erhöhten Malignomrisiko (KIM, 1999; STANGER, 2002). Aufgrund der Kofaktorfunktion für die MS und der Verknüpfung mit der Folatutilisation kann ein Mangel an Vitamin B12 trotz ausreichender Folatversorgung zu einer verminderten Remethylierung und folglich zu einer Hypomethylierung führen. Dadurch wird HCY erhöht und Folat, trotz suffizienter Plasmaspiegel, funktionell defizitär (Folatfalle) (SHANE, STOKSTAD, 1985).

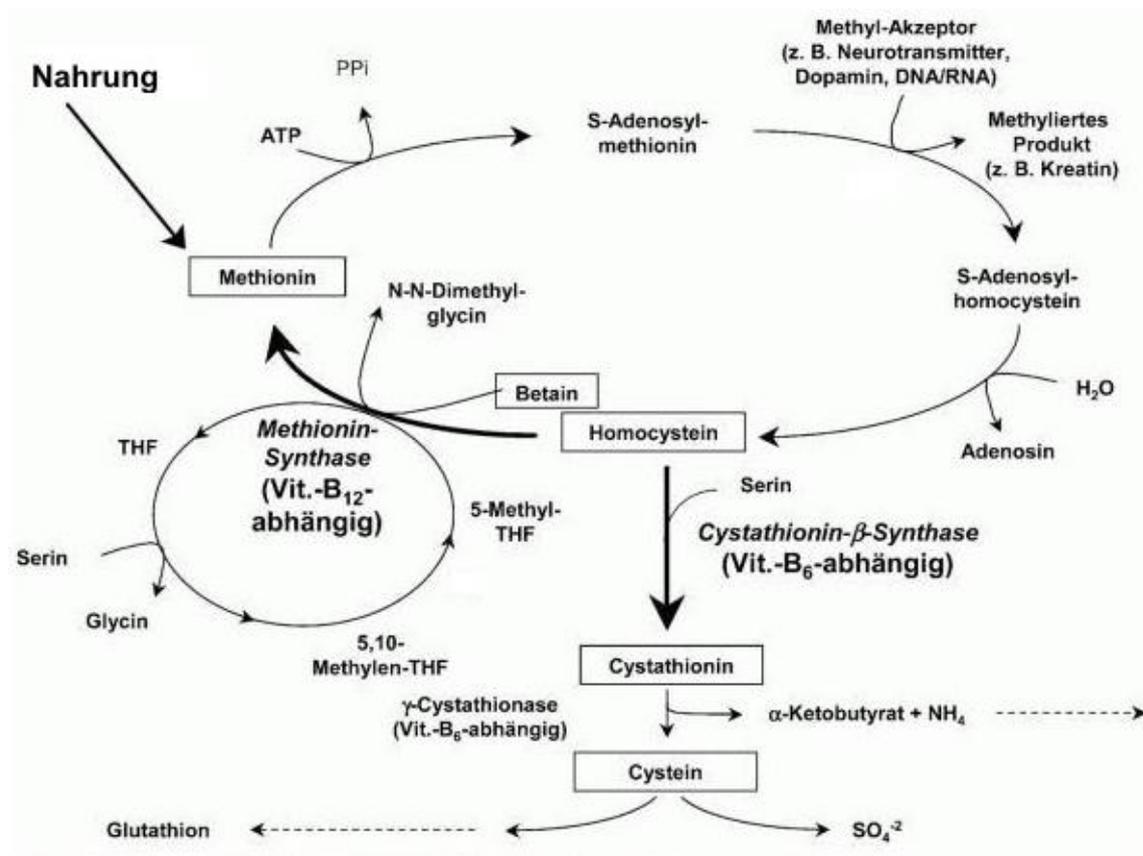


Abb. 1: Schematische Darstellung des Methionin-HCY-Stoffwechsels (STANGER et al., 2003). ATP – Adenosintriphosphat, PPi – Pyrophosphat, THF – Tetrahydrofolat.

2.4.2 Klinische Manifestationen der Hyperhomocysteinämie

Ein Zusammenhang zwischen erhöhten HCY-Serumspiegeln und krankhaften Veränderungen im menschlichen Organismus wurde erstmals im Jahr 1962 beschrieben. Carson und Neil berichteten über das gehäufte Auftreten von erhöhten HCY-Konzentrationen im Urin von geistig retardierten Kindern in Belfast (CARSON, NEILL, 1962). Diese Pathologie wurde zeitgleich auch noch von zwei weiteren Arbeitsgruppen in Philadelphia und Milwaukee entdeckt und erhielt den Namen Homocystinurie (GERRITSEN et al., 1962; SPAETH, BARBER, 1965). Erste pathologische Untersuchungen ergaben ausgeprägte Gefäßläsionen, Thrombosen und eine Leberverfettung bei Patienten mit Homocystinurie (GIBSON et al., 1964). Die Gefäßveränderungen glichen denen von Patienten mit Marfan-Syndrom. In der Folge wurden weitere klinische Manifestationen der Erkrankung gefunden, wie z. B. Linsenektopie, Osteoporose, Skelettdeformitäten und ein beschleunigtes Körperwachstum (MCCULLY, 2005). Biochemische Analysen zeigten, dass der Homocystinurie ein Mangel des Vitamin B6-abhängigen Enzyms CBS zu Grunde liegt (MUDD et al., 1964). Mittlerweile sind etwa 100 Mutationen beschrieben, die mit dieser Erkrankung assoziiert sind (KRAUS et al., 1999).

Bislang wurde ein erhöhter HCY-Serum-Spiegel vor allem in Verbindung mit Gefäßerkrankungen wie koronaren Herzerkrankungen, cerebrovaskulären Gefäßerkrankungen oder thrombotischen Ereignissen in Zusammenhang gebracht (HERRMANN, 2001, 2005; HERRMANN et al., 2007c). So konnte in zahlreichen retro- und prospektiven Studien eine unabhängige Beziehung zwischen einer HHCY und kardiovaskulären Erkrankungen gefunden werden (GRAHAM et al., 1997; WALD et al., 2002). Bei 20-50 % der Patienten mit koronaren Herzerkrankungen, cerebrovaskulären Gefäßerkrankungen, thrombotischen Ereignissen und peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) wurden erhöhte HCY-Serum-Werte festgestellt (CAVALCA et al., 2001; KNEKT et al., 2001; QUERE et al., 2002; SHIMIZU et al., 2002). In Tierversuchen konnte darüber hinaus auch eine mechanistische Rolle des HCY bei der Atherogenese gezeigt werden (ZHOU et al., 2001; EL-SWEFY et al., 2002; ZULLI et al., 2004). Eine weitere kardiale Manifestation der HHCY ist die chronische Herzinsuffizienz. Anhand der Framingham-Studie ergibt sie eine erhöhte Inzidenz der chronischen Herzinsuffizienz bei Personen mit einem HCY-Plasmaspiegel $> 11-12 \mu\text{mol/l}$ (VASAN et al., 2003).

Die besondere Rolle der HHCY als vaskulärer Risikofaktor liegt wahrscheinlich an der fehlenden Transsulfurierung in menschlichen Endothelzellen (CHEN et al., 1999). Dadurch sind diese Zellen ausschließlich auf die Folat- und Vitamin B12-abhängige Remethylierung

angewiesen. In der Folge kann die HCY-Synthese den Export leicht übersteigen und es kommt zu einer intrazellulären HCY-Akkumulation, die zu einer spezifischen Zellschädigung bis hin zum Zelluntergang führen kann. Daraus resultieren eine veränderte Gefäßmorphologie, eine erhöhte Entzündungsaktivität, eine Aktivierung der Gerinnungskaskade sowie eine Hemmung der fibrinolytischen Eigenschaften des Endothels. Insgesamt kommt es zu einer gestörten Endothelfunktion und zur Induktion eines prokoagulatorischen Milieus (HERRMANN, 2005).

2.4.3 Hyperhomocysteinämie und Knochenstoffwechsel

Trotz klarer Indizien aus Studien an Patienten mit Homocystinurie aus den 1960er Jahren wurde der Zusammenhang zwischen einer HHCY und Knochenerkrankungen über Jahrzehnte nicht weiter untersucht. Erst im Jahr 2004 erschienen zwei große epidemiologische Studien, die eine starke Korrelation zwischen einer HHCY und dem Risiko für osteoporotische Frakturen zeigten (MCLEAN et al., 2004; VAN MEURS et al., 2004).

Im Laufe der letzten Jahre wurde eine Vielzahl klinischer Studien veröffentlicht, die den Zusammenhang zwischen einer HHCY und einem gestörten Knochenwechsel aufzeigen (CAGNACCI et al., 2003; GOLBAHAR et al., 2004; MCLEAN et al., 2004; VAN MEURS et al., 2004; DHONUKSHE-RUTTEN et al., 2005; HERRMANN et al., 2005a; MORRIS et al., 2005; NILSSON et al., 2005; GJESDAL et al., 2006; GERDHEM et al., 2007; PERIER et al., 2007). Ergebnisse aus aktuellen Tierversuchen und Studien an Zellkulturen liefern zudem erste Daten über die entsprechenden zugrunde liegenden pathophysiologischen Grundlagen (HERRMANN et al., 2005b; HERRMANN et al., 2007b; OZDEM et al., 2007).

2.4.3.1 Klinische Studien

Aktuelle Daten aus der so genannten Rotterdam- und Framingham-Studie belegen eine starke Zunahme des Frakturrisikos mit steigender HCY-Serumkonzentration (MCLEAN et al., 2004; VAN MEURS et al., 2004). In der Rotterdam-Studie wurden 2.406 Personen über 11.253 Personenjahre beobachtet (VAN MEURS et al., 2004). Das relative Risiko für Frakturen betrug 1,4 für jede Zunahme der HCY-Konzentration um eine Standardabweichung. In der höchsten HCY-Quartile wurde das relative Risiko mit 1,9 berechnet. Unterschiede zwischen Männern und Frauen wurden nicht festgestellt (VAN MEURS et al., 2004). Die Framingham-Studie untersuchte 1.999 Personen über einen Zeitraum von 12,3 Jahren (MCLEAN et al., 2004). Männer und Frauen in der jeweils

höchsten HCY-Quartile hatten im Vergleich zu Individuen in der 1. Quartile ein vier-, beziehungsweise zweifach erhöhtes Risiko, eine Oberschenkelhalsfraktur zu erleiden (MCLEAN et al., 2004).

Ergebnisse weiterer klinischer Studien legen zudem einen Zusammenhang zwischen einem Mangel an B-Vitaminen und einer reduzierten Knochenqualität nahe. So konnte für Patienten mit einer perniziösen Anämie (verursacht durch einen chronischen Vitamin-B12-Mangel) eine signifikant erhöhte Rate an proximalen Femurfrakturen, Wirbelkörperfrakturen und Unterarmfrakturen aufgezeigt werden (MELHUS et al., 1999). Reynolds et al. berichten über eine hohe Prävalenz an chronischem Vitamin-B6-Mangel bei Patienten mit Oberschenkelhalsfrakturen (LUMBERS et al., 2001). Auch bei Patienten mit einer Folat-Verwertungsstörung aufgrund einer reduzierten Aktivität des Enzyms Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) konnte eine HHCY verbunden mit einem erhöhten Frakturrisiko beobachtet werden (ABRAHAMSEN et al., 2003; CAGNACCI et al., 2003; VILLADSEN et al., 2005). Eine Placebo-kontrollierte Doppelblind-Studie aus Japan, in der 600 Schlaganfall-Patienten mit einer reduzierten Knochendichte (Bone Mineral Density; BMD) über zwei Jahre Folsäure und Vitamin B12 substituiert wurden, ergab eine Reduktion der Frakturinzidenz unter Vitamingabe um 75 % im Vergleich zu Placebo-behandelten Patienten. Im Gegensatz dazu konnte in anderen Studien ein allenfalls schwacher Zusammenhang zwischen HCY, B-Vitaminen und der BMD gefunden werden (CAGNACCI et al., 2003; GOLBAHAR et al., 2004; VAN MEURS et al., 2004; MORRIS et al., 2005).

Die Bestimmung der BMD mittels Dual-Energy X-Ray Absorptiometry (DEXA) spiegelt im Wesentlichen die Höhe der Knochenmineralisation wieder. Sie gibt allerdings keine Auskunft über die Mikroarchitektur und die Komposition der organischen Knochenmatrix. Aber gerade die Mikroarchitektur und die Zusammensetzung der Knochenmatrix sind für die biomechanischen Eigenschaften des Knochens von zentraler Bedeutung (ZIOUPOS et al., 1999; SMALL, 2005; HERNANDEZ, KEAVENY, 2006). Des Weiteren ist die BMD ein sehr träger Parameter, der nur ein integrales Abbild des Knochenstoffwechsels über die letzten Monate und Jahre ermöglicht (DEAL, 2001; LENCHIK et al., 2002). Biochemische Serum-Knochenmarker gelten deshalb als additives Frühdiagnostikum von Veränderungen im Knochenstoffwechsel (DELMAS et al., 2000). Sie ermöglichen, den Knochenstoffwechsel indirekt zu beurteilen und das individuelle Frakturrisiko von Patienten mit Osteoporose abzuschätzen (DELMAS et al., 2000). Biochemische Knochenmarker werden unterschieden in Knochenformations- und Knochenresorptionsmarker. Die meisten Knochenresorptionsmarker sind Kollagen-I-Abbauprodukte, wie etwa Kollagen-I-C-terminale Crosslinks (CTx), und können sowohl im Urin als auch im Serum nachgewiesen werden.

Knochenformationsmarker werden von Osteoblasten synthetisiert und beinhalten beispielsweise Enzyme (z.B. Alkalische Phosphatase), Kollagene (z.B. Pro-Kollagen-Typ-I sowie N- und C-terminales Peptid) und nicht-Kollagen-haltige Proteine der extrazellulären Knochenmatrix (z.B. Osteocalcin) (HERRMANN et al., 2007a).

Die Gesamtheit der existierenden Daten zu einer potentiellen Korrelation zwischen einer HCY und Knochenmarkern lässt keine eindeutige Schlussfolgerung zu (HERRMANN et al., 2005a). So konnten Herrmann et al. eine signifikante Korrelation zwischen dem Knochenresorptionsmarker Desoxypyridinolin-Crosslinks (DPD) und HCY in peri- und postmenopausalen Frauen nachweisen. Für den Knochenformationsmarker Osteocalcin konnte jedoch keine Korrelation nachgewiesen werden. Die Korrelation von HCY und DPD konnte von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden (BODE et al., 2000; DHONUKSHE-RUTTEN et al., 2005). Bode et al. berichteten über eine Beziehung zwischen HCY und Kollagen-I-C-terminalen Crosslinks (ICTP) bei atherosklerotischen Patienten (BODE et al., 2000). Jüngste Daten aus der Longitudinal Aging Study Amsterdam (LASA) untermauern eine Korrelation zwischen HCY und DPD. Darüber hinaus wurde in dieser Studie auch eine signifikante Korrelation zwischen Vitamin B12 und DPD gefunden (DHONUKSHE-RUTTEN et al., 2005). Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der oben genannten Studie von Herrmann et al. fanden die Autoren der LASA zusätzlich einen signifikanten Zusammenhang zwischen HCY und dem Knochenformationsmarker Osteocalcin. Allerdings waren diese Zusammenhänge nur bei gleichzeitig niedrigem Vitamin B12-Serumspiegel nachweisbar, was auf eine wichtige Rolle des Vitamin B12 im Knochenstoffwechsel hinweist. Perier et al. untersuchten 671 postmenopausale Frauen und fanden eine schwache Korrelation zwischen HCY und dem Knochenresorptionsmarker CTx, die aber nach einem entsprechenden Altersabgleich keine Signifikanz aufwies (PERIER et al., 2007).

Zusammenfassend zeigt die Mehrheit der Studien eine signifikante Korrelation zwischen HCY und Knochenresorptionsmarkern, aber keinen signifikanten Zusammenhang zwischen HCY und Knochenformationsmarkern. Die Beziehung zwischen B-Vitaminen und Knochenmarkern ist bislang unzureichend erforscht, so dass weitere Studien auf diesem Gebiet nötig sind (HERRMANN et al., 2007a).

Neben den beschriebenen Effekten von HCY auf den Osteoblasten-Osteoklasten-Stoffwechsel wird zusätzlich ein Einfluss von HCY auf die extrazelluläre Knochenmatrix diskutiert. Die extrazelluläre Knochensubstanz repräsentiert quantitativ den größten Teil des Knochengewebes und verleiht dem Knochen seine biomechanischen Eigenschaften. Typ-I-Kollagen ist die Hauptkomponente der organischen extrazellulären Knochenmatrix. Es wird

von Osteoblasten als einzelne Kette synthetisiert und sezerniert. Nach verschiedenen extrazellulären Modifikationen verschmelzen drei Einzelketten zur Form einer Triple-Helix. Ein bedeutender Schritt während der Bildung der Triple-Helix ist die Quervernetzung (Crosslinking) der drei einzelnen Ketten mit Hilfe enzymatischer Crosslinks (OXLUND et al., 1995; BANSE et al., 2002). Diese Crosslinks tragen wesentlich zu den biomechanischen Eigenschaften des Knochens bei (HERRMANN et al., 2007a).

Kollagen-Crosslinks können in zwei Typen unterschieden werden:

- enzymatische Crosslinks, gebildet durch das Enzym-Lysyl-Oxidase (LOX)
- nicht-enzymatische Crosslinks, gebildet durch Glykation (advanced glycation products)

Während enzymatische Crosslinks für die Knochenstabilität wichtig sind, üben nicht-enzymatische Crosslinks einen schädigenden Einfluss auf die mechanischen Knocheneigenschaften aus (VASHISHTH et al., 2001). Schon 1966 spekulierten McKusick et al., dass hohe HCY-Serumkonzentrationen in Patienten mit Homocystinurie das kollagene Crosslinking hemmen könnten (MCKUSICK, 1966). 2006 analysierten Saito und Kollegen den Zusammenhang zwischen HCY und Kollagen-Crosslinks in menschlichem Knochengewebe (SAITO et al., 2006). Hierbei konnten sie zeigen, dass bei Patienten mit erhöhtem HCY-Serumspiegel die Konzentration an nicht-enzymatischen Crosslinks erhöht und die Konzentration an enzymatischen Crosslinks erniedrigt ist.

2.4.3.2 In-vitro-Studien

Die vorhandenen klinischen Daten werden durch Zellkulturstudien bestätigt. Eine Studie von Herrmann et al. zeigte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Osteoklasten-Aktivität von bis zu 50 % bei HCY-Konzentrationen zwischen 10 und 100 $\mu\text{mol/l}$ (HERRMANN et al., 2005b). Eine spätere Studie von Koh et al. bestätigte diese Ergebnisse. Da eine HHCY in der Regel auf dem Boden eines B-Vitamin-Mangels entsteht und nicht durch eine exzessive exogene Zufuhr von HCY, führte die Arbeitsgruppe von Herrmann et al. eine weitere Zellkulturstudie durch, in der die Aktivität der Osteoklasten im Zusammenhang mit abnehmenden B-Vitamin-Konzentrationen untersucht wurde (HERRMANN et al., 2008). Hierbei konnte ein signifikanter Anstieg der osteoklastären Resorptionsaktivität unter einem B-Vitamin-Mangel gefunden werden. Hiermit assoziiert war ein vermehrter Nachweis des Tartrat-resistenten Isoenzym der sauren Phosphatase (TRAP) sowie des Enzyms Kathepsin K, welche beide etablierte Osteoklastenmarker darstellen. Das vollständige Fehlen aller drei B-Vitamine (Vitamin B6, Vitamin B12 und Folsäure) steigerte die

osteoklastäre Resorptionsleistung auf über 200 %. Die TRAP- und die Kathepsin-K-Aktivität nahmen um maximal 25 % zu (HERRMANN et al., 2008). Hieraus lässt sich schließen, dass sowohl erhöhte HCY-Konzentrationen als auch erniedrigte B-Vitamin-Konzentrationen in Zusammenhang mit einer erhöhten Knochenresorption stehen.

In-vitro-Daten hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen HCY sowie B-Vitaminen und der Funktion von Osteoblasten sind limitiert. Herrmann et al. zeigten den Einfluss einer steigenden HCY-Konzentration und einer sinkenden B-Vitamin-Konzentration auf die Aktivität humaner Osteoblasten. Die Ergebnisse offenbaren eine moderate Stimulation der Osteoblasten durch geringe HCY-Konzentrationen, wohingegen hohe HCY-Konzentrationen einen toxischen Effekt auf die Osteoblastentätigkeit haben (HERRMANN et al., 2005b). In einer weiteren Studie kultivierten Kim et al. prä-osteoblastäre Humanzellen unter steigenden HCY-Konzentrationen. Hierbei konnte eine HCY-induzierte Zunahme der Apoptose der prä-osteoblastären Zellen gezeigt werden, begleitet von einer reduzierten Formation mineralisierter Knochenmatrix sowie einer verminderten Expression der Knochenformationsmarker alkalische Phosphatase (ALP) und Osteopontin (KIM et al., 2006). Korrespondierend hiermit berichteten Carmel et al. über eine Abhängigkeit von Vitamin B12 und den Knochenformationsmarkern ALP und Osteocalcin (CARMEL et al., 1988).

Zusammenfassend zeigen die existierenden Zellkulturstudien, dass HCY den Knochenstoffwechsel zu Gunsten einer vermehrten Resorption beeinflusst (HERRMANN et al., 2007a).

2.4.3.3 Tierexperimentelle Studien

Bis dato gibt es erst wenige Studien, in denen anhand von Tiermodellen der Effekt einer HHcy auf den Knochenstoffwechsel analysiert wurde. Özdem und Kollegen behandelten Ratten mit Methionin-angereichertem Futter und konnten so in den Tieren eine HCY-Serumkonzentration von durchschnittlich 16 µmol/l hervorrufen (OZDEM et al., 2007), was einer moderaten HHcy entspricht (STANGER et al., 2003). Herrmann und Kollegen konnten durch die Verabreichung einer Methionin-angereicherten Diät ebenfalls eine moderate HHcy (27,0 ± 8,8 µmol/l) in Ratten provozieren. Durch Gabe einer Homocystin-angereicherten Diät induzierten sie in der gleichen Studie eine intermediäre HHcy (54,0 ± 46,0 µmol/l) (HERRMANN et al., 2007b). Die Ergebnisse dieser Studie zeigten histomorphometrisch ein reduziertes Knochenvolumen verbunden mit einer verminderten biomechanischen Knochenstabilität in hyperhomocysteinämischen Ratten. Interessanterweise verursachte die Induktion einer moderaten HHcy hierbei eine geringe Veränderung der Mikroarchitektur und

Stabilität des Knochens, wohingegen eine intermediäre HHCY die Mikroarchitektur und Stabilität des Knochens massiv beeinträchtigte (HERRMANN et al., 2007b). In einer weiteren Studie an hyperhomocysteinämien Ratten fand sich eine knöcherne Akkumulation von HCY korrelierend mit einer reduzierten Knochenqualität (HERRMANN et al., 2009).

Obwohl in zahlreichen Studien eine Beeinflussung des Knochenstoffwechsels durch HCY aufgezeigt werden konnte (CARMEL et al., 1988; GOERSS et al., 1992; REYNOLDS et al., 1992; KIM et al., 1996; MELHUS et al., 1999; BODE et al., 2000; STANGER et al., 2003; MCLEAN et al., 2004; REFSUM et al., 2004; VAN MEURS et al., 2004; HERRMANN et al., 2005a; HERRMANN et al., 2005b; HERRMANN et al., 2005c; SATO et al., 2005), ist bislang völlig unbekannt, inwieweit die erwähnten Wechselwirkungen einen Einfluss auf die Frakturheilung nehmen. Gerade vor dem Hintergrund einer gesteigerten Frakturprävalenz bei Patienten mit einer HHCY ist diese Fragestellung von hoher klinischer Relevanz. Daher soll durch unsere Untersuchungen erstmals der Einfluss einer HHCY sowie eines B-Vitamin-Mangels auf die Knochenbruchheilung anhand eines etablierten Frakturmodells an der Maus überprüft werden (HOLSTEIN et al., 2007).

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, zu untersuchen, ob eine HHCY einen Einfluss auf die mechanische Stabilität von heilenden Knochenbrüchen hat. Die entsprechenden Informationen dazu sollten durch tierexperimentelle Versuche an der Maus nach einem bewährten Modell gewonnen werden. Eine HHCY sollte hierbei durch die Applikation einer Homocystin-, beziehungsweise Methionin-angereicherten oder einer B-Vitamin-defizienten Diät erzeugt werden. Homocystin ist das Produkt zweier, über Disulfidbrücken verlinkte, HCY-Moleküle (HERRMANN et al., 2009).

2.6 Fragestellung

Die durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen sollten die Frage beantworten, ob eine HHCY die mechanische Stabilität von heilenden Femurschaft-Frakturen an der Maus beeinträchtigt.

Die Nullhypothese lautet:

„Die mechanische Stabilität von heilenden Femurschaft-Frakturen weist keine Unterschiede auf zwischen Mäusen, die mit einer Homocystin-, beziehungsweise Methionin-angereicherten oder einer B-Vitamin-defizienten Diät ernährt werden (Verum) und Mäusen, die mit einer entsprechenden Standarddiät ernährt werden (Kontrollen).“

Die Stabilität des heilenden Knochens wurde durch eine biomechanische Drei-Punkt-Biegetestung am postmortalen Femur-Präparat untersucht.

3. Material und Methodik

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten ausgewachsene männliche und weibliche CD-1 Mäuse (Charles River WIGA, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 35-45 g. Die Tierhaltung der Mäuse erfolgte im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar unter klimatisierten Raumbedingungen (Lufttemperatur: 22-24°C, relative Luftfeuchtigkeit 60 %) bei zwölfstündigem Tag-Nacht-Rhythmus. Wasser und das entsprechende Futter wurden ad libitum bereitgestellt. Der Tierversuch wurde von der zuständigen Behörde (Dezernat 5, Saarpfalz-Kreis, 66406 Homburg/Saar) unter dem AZ K110/180-07, Vers.-Nr. 24/2005 genehmigt und am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

3.2 Studienprotokoll

Die Versuchstiere wurden randomisiert in fünf Futtergruppen aufgeteilt: Homocystin-angereichertes Futter (Altromin, Lage, Deutschland), Methionin-angereichertes Futter (Altromin), B-Vitamin-defizientes Futter (Harlan-Teklad, Madison, USA), Kontrollfutter der Firma Altromin, und Kontrollfutter der Firma Harlan-Teklad. In jeder Futtergruppe standen Tiere beider Geschlechter in einem ausgewogenen Verhältnis zur Verfügung.

Tieren der Homocystin- und Methionin-Gruppe sowie der entsprechenden Kontrollgruppe (Kontrolle Altromin) wurde drei Wochen vor der Frakturierung bis zum Tötungstag (vier Wochen nach der Frakturierung) das jeweilige Diätfutter zur Verfügung gestellt. Tieren der Vitamin-Mangel-Gruppe sowie der entsprechenden Kontrollgruppe (Kontrolle Harlan) wurde fünf Wochen vor der Frakturierung bis zum Tötungstag das jeweilige Diätfutter verabreicht (Tab. 1).

	Diätbeginn	Diätende
<i>Homocystin</i>	3 Wochen vor Fraktur	4 Wochen nach Fraktur
<i>Methionin</i>	3 Wochen vor Fraktur	4 Wochen nach Fraktur
<i>Kontrolle Altromin</i>	3 Wochen vor Fraktur	4 Wochen nach Fraktur
<i>Vitamin-Mangel</i>	5 Wochen vor Fraktur	4 Wochen nach Fraktur
<i>Kontrolle Harlan</i>	5 Wochen vor Fraktur	4 Wochen nach Fraktur

Tab. 1: Zeitraum der jeweiligen Futterverabreichung an die Versuchstiere

Einmal wöchentlich wurde das Gewicht der Tiere sowie das Gewicht des verbliebenen Futters kontrolliert. Daraus wurde die Fressmenge ermittelt und neues Futter in kalkulierter Menge bereitgestellt. Weiterhin konnte während dieser Zeit der Einfluss des Diätfutters auf das Aktivitätsniveau der Tiere beobachtet werden.

Die Blutabnahme, die Tötung der Tiere und der Ausbau der Knochen fand vier Wochen nach Frakturierung ebenfalls im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar statt. Die biomechanische Auswertung der Knochen erfolgte im Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm.

Neben der Untersuchung der mechanischen Belastbarkeit des Knochens wurde zusätzlich eine histomorphometrische Auswertung des Frakturkallus durchgeführt. Diese ist jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit, sondern wird in einer gesonderten Dissertation dargestellt.

Die serologischen Analysen der Blutproben wurden im Labor für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar durchgeführt.

3.3 Diäten

Den Homocystin- und Methionin-angereicherten Diäten lag eine Basisdiät zu Grunde (Altromin C1000, Altromin), die in Form von Pellets dargereicht wurde. Der Energiegehalt dieser Diät liegt bei 3500 kcal/kg. Die entsprechende Anreicherung erfolgte mit 2,5 % L-Methionin beziehungsweise 1,5 % Homocystin.

Die Kontrollgruppe wurde mit einer Standarddiät der Firma Altromin (Altromin 1324) mit einem Energiegehalt von etwa 3000 kcal/kg gefüttert.

Das Diätfutter der Vitamin-Mangelgruppe (TD.06422) und der entsprechenden Kontrollgruppe (TD.06250) wurde von der Firma Harlan-Teklad bezogen. Die Kontrolldiäten der Hersteller Altromin und Harlan sind in ihrer Zusammensetzung vergleichbar. Die Kontrolldiät der Firma Harlan-Teklad stellt laut Hersteller eine Modifikation der Vitamin-Mangel-Diät dar mit entsprechender Vitamin-Supplementation. Der Energiegehalt beider Diäten der Firma Harlan-Teklad liegt bei etwa 3600 kcal/kg.

3.4 Intervention

3.4.1 Tiermodell

Für die Untersuchung der Frakturheilung am Tiermodell ist ein zuverlässiges Frakturmodell unabdingbare Voraussetzung (EINHORN, 1998). Während in Großtiermodellen die Anatomie, die Knochenstruktur sowie der morphologische und zeitliche Ablauf der Frakturheilung mit dem Menschen relativ gut vergleichbar ist, haben diese Modelle den großen Nachteil, dass im Vergleich zu Mäusen auf keine definierten genetischen Stämme und genetisch manipulierten Tiere zurückgegriffen werden kann (ELMSTEDT, SVAHN, 1981; JACENKO, OLSEN, 1995). Aus diesen Gründen wurde in Vorversuchen ein standardisiertes Femur-Frakturmodell für die Maus entwickelt, das in Folgeversuchen auch zu Versuchen an Knockout-Stämmen herangezogen werden kann.

Somit gelang es unserer Arbeitsgruppe erstmalig, eine rotations- und achsstable intramedulläre Kompressionsschraube für das Mäusefemur zu entwickeln (Abb. 2) (HOLSTEIN et al., 2009b). Über einen zuvor eingebrachten Führungsdraht wurde in diesem Modell eine Frakturierung ohne einliegendes Implantat ermöglicht. Somit konnte ein leicht reproduzierbares Frakturmodell geschaffen werden, das weitestgehend einem klinischen Trauma-Szenario entspricht. Durch die geschlossene Frakturierung und Implantateinbringung wird ein minimaler Weichteilschaden verursacht. Für die Versuchstiere erwies sich dieses Modell aufgrund der hohen Frakturstabilität und der minimalen Weichteiltraumatisierung als vergleichsweise gering belastend. So konnte bereits 1-2 Tage nach der Operation eine volle Mobilität der Tiere bei meist physiologischem Bewegungsablauf beobachtet werden.

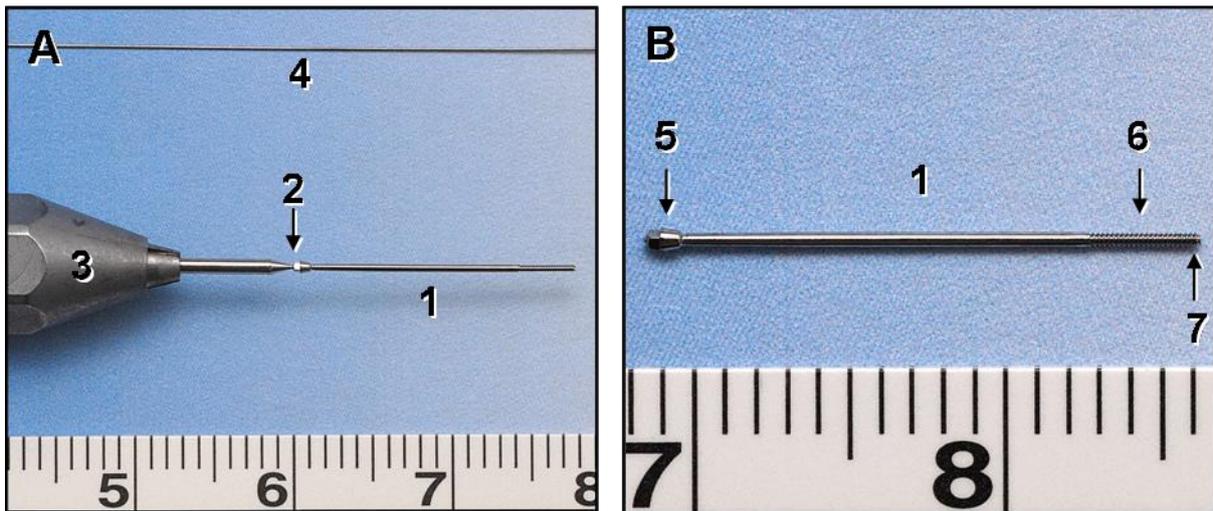


Abb. 2: Intramedulläre Zugschraube. Die Titanschraube (1) ist mit einem konischen Schraubenkopf (5) sowie einem distalen Gewinde (6) versehen. Am Gewindeende wurde die Schraube mit einem longitudinalen Lumen (7) ausgestattet, in das ein Führungsdraht (4) eingebracht werden kann. Über eine Sollbruchstelle (2) ist die Schraube mit einem Eindrehinstrumentarium (3) verbunden. Bei einem definierten Drehmoment kommt es zum Versagen der Sollbruchstelle, so dass alle Frakturen mit der gleichen Kompression verschraubt werden.

3.4.2 Operation

Die Operation wurde im Tieroperationssaal des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes an allen Versuchstieren in gleicher standardisierter Weise durchgeführt.

Die Versuchstiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion von Xylazin und Ketamin narkotisiert. Die Narkoselösung bestand aus 1 ml Xylazin 2 % (Rompun, Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland), 0,75 ml Ketamin 0,1 % (Ketavet, Pharmacia, Erlangen, Deutschland) und 8,25 ml physiologischer Kochsalzlösung. Die Narkoselösung wurde in einer Dosis von 0,01 ml pro 1 g Körpergewicht injiziert. Die Versuchstiere waren hierdurch nach etwa 10 min für eine Dauer von etwa 30 min analgosediert.

Unter Analgosedierung wurde die vordere rechte Kniegelenksregion rasiert und die Haut sorgfältig mit Softasept N (Braun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert (Abb. 3). Unter semisterilen Bedingungen erfolgte medial der Patella eine etwa 4 mm lange Längsinzision der Haut (Abb. 4). Danach wurde die Kniegelenkskapsel eröffnet und die Patella nach lateral luxiert (Abb. 5). Über die Fossa intercondylaris wurde der Markraum mit einer Injektionsnadel ($\varnothing = 0,55$ mm) eröffnet (Abb. 6). Konsekutiv wurde eine weitere Injektionsnadel ($\varnothing = 0,4$

mm) transmedullär durch die proximale Kortikalis im Bereich des Trochanter major perkutan ausgeleitet (Abb. 7). Über das Nadellumen wurde ein Wolfram-Führungsdraht ($\varnothing = 0,2$ mm) vorgeschoben (Abb. 8). Wolfram zeichnet sich durch eine hohe Härte aus (Vickers-Härteindex: 500, Zugfestigkeit: 1920 MPa), sodass eine Verbiegung im Rahmen der nachfolgenden Frakturierung weitestgehend vermieden wird. Nach Entfernung der Nadel wurde das Femur bei einliegendem Führungsdraht mit einer Guillotine-ähnlichen Drei-Punkt-Vorrichtung (Abb. 9 und Abb. 14) frakturiert (BONNARENS, EINHORN, 1984; SCHMIDMAIER et al., 2004). Die Zugschraube wurde über den Führungsdraht vorgeschoben und mit einem definierten Drehmoment eingedreht (Abb. 10 und Abb. 11). Abschließend wurde die Patella reponiert (Abb. 12), die Wunde verschlossen (Abb. 13) und Fraktur (entsprechend AO/ASIF-Klassifikation Typ A2-3) (KOCH et al., 1990) sowie Implantatlage radiologisch kontrolliert (Abb. 15). Hierzu wurden in der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde der Universität des Saarlandes seitliche Röntgenaufnahmen der betroffenen Femora angefertigt (Dentalröntgengerät Heliodent DS, Sirona Dental Systems, Bensheim, Deutschland; Inside IP-21 high resolution dental films, Kodak, Rochester, USA; Entwickler Periomat plus, Dürr Dental, Bietigheim-Bissingen, Deutschland). Die Aufnahmen wurden unter einer Belichtungszeit von 0,08 s bei einer Stromstärke von 7 mA und einer Spannung von 60 mV durchgeführt.

Zur Linderung operationsbedingter Schmerzen wurden die Tiere unmittelbar nach der Operation durch eine subcutane Injektion von 0,05 ml Carprofen (Rimadyl, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) analgesiert.

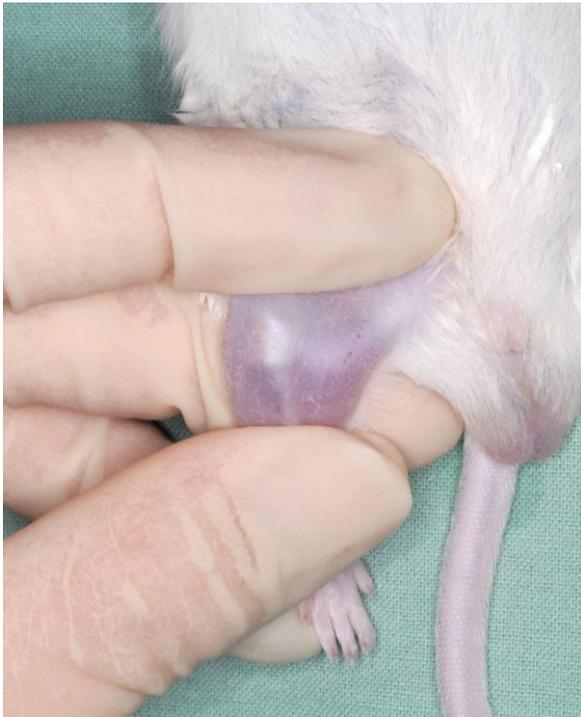


Abb. 3: Fixierung des Beines während der OP



Abb. 4: Parapatellare Hautinzision mit Sicht auf das Ligamentum patellae



Abb. 5: Luxation der Patella nach lateral mit Sicht auf die Fossa intercondylaris

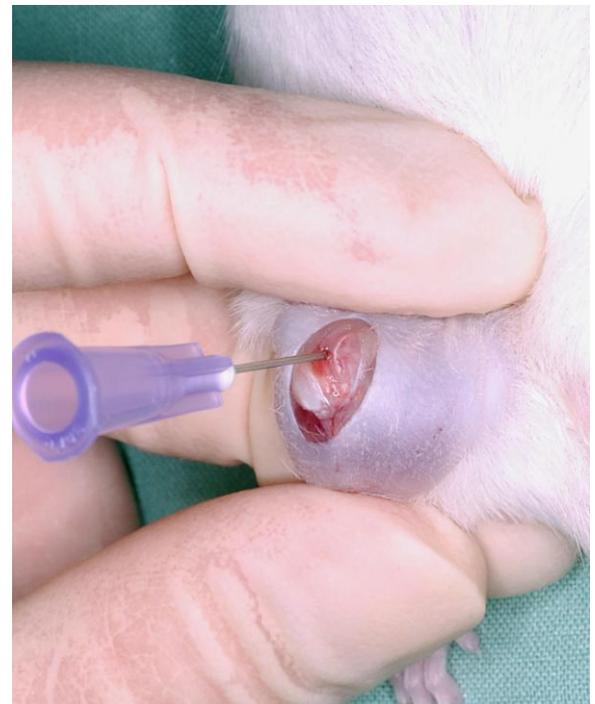


Abb. 6: Eröffnung des Markraums mit einer Spritzenkanüle ($\varnothing = 0,55$ mm)

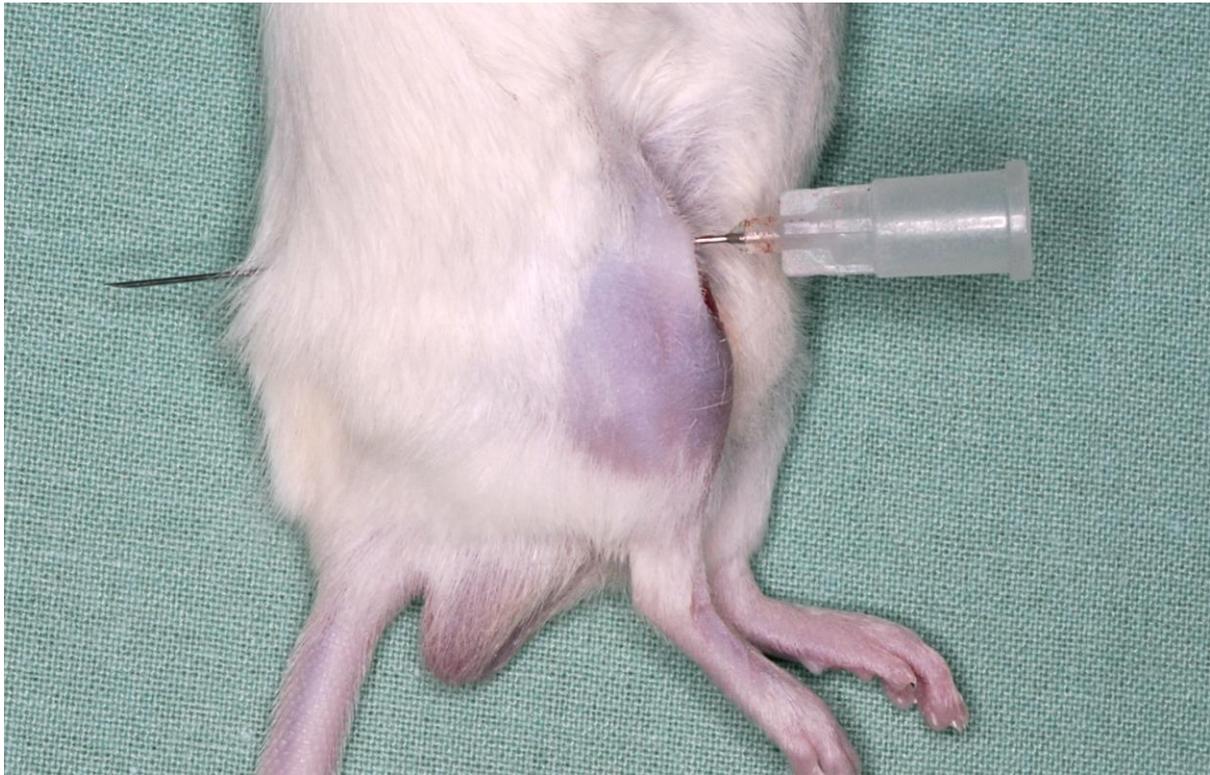


Abb. 7: Retrograde transmedulläre Einbringung einer weiteren Injektionsnadel ($\varnothing = 0,4 \text{ mm}$) mit perkutaner Ausleitung durch die proximale Kortikalis im Bereich des Trochanter major



Abb. 8: Intramedullär liegender Führungsdraht nach Entfernung der Injektionsnadel



Abb. 9: Positionierung des Beines in der Frakturapparatur



Abb. 10: Einbringung der Schraube über den Führungsdraht in den Markraum



Abb. 11: Einliegende Schraube nach Abtrennung des Eindrehinstrumentariums



Abb. 12: Reposition und Refixation der Patellarsehne



Abb. 13: Hautnaht

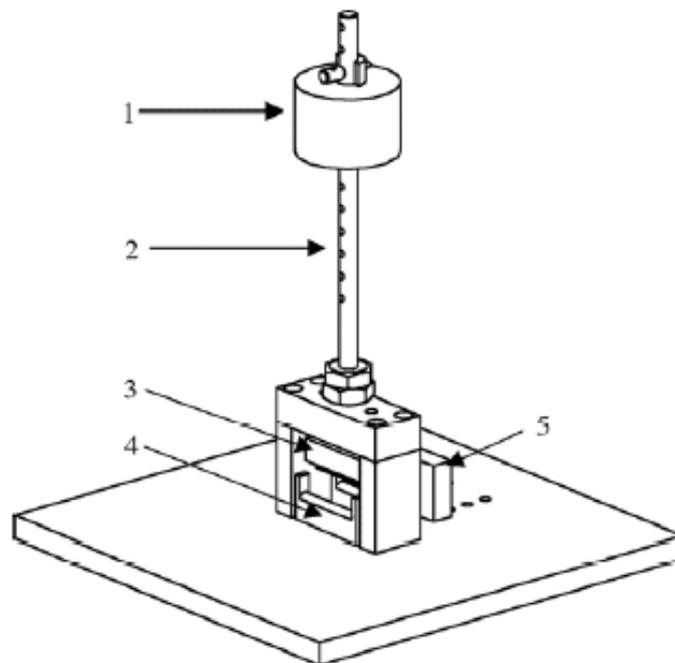


Abb. 14: Frakturapparatur nach Schmidmaier et al. (SCHMIDMAIER et al., 2004). (1) Fallgewicht von 80g, (2) Führungsstab, (3) Stempelplatte, (4) Gegenhalter, (5) Fixierungsplatte

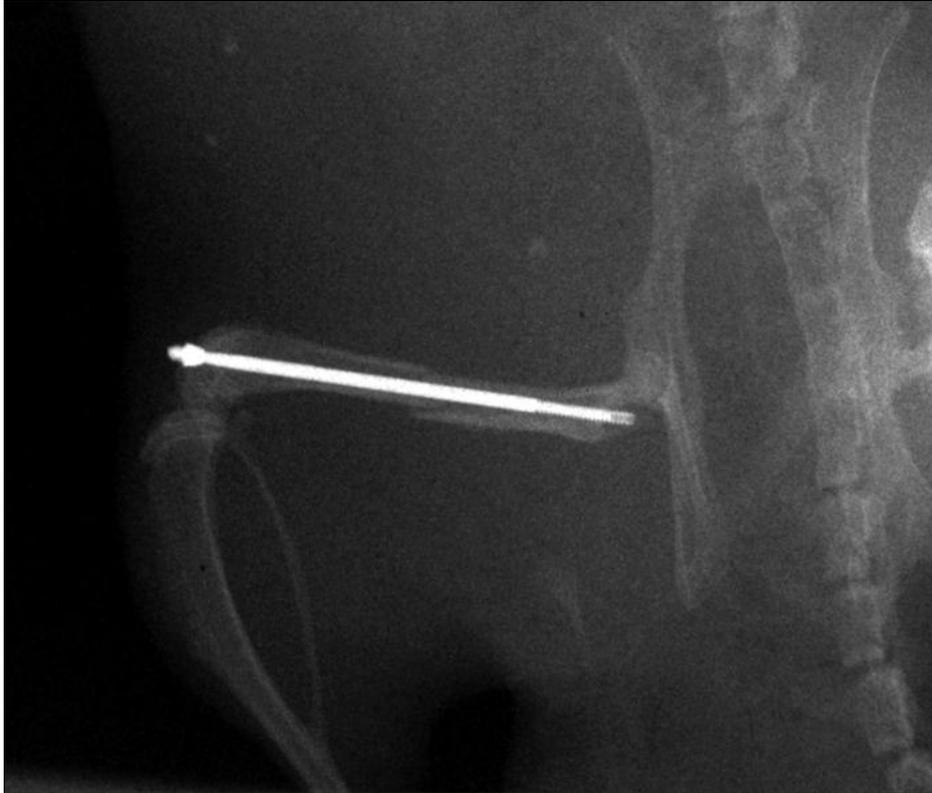


Abb. 15: Postoperative Röntgendokumentation der Fraktur und Implantatlage

3.4.3 Blutentnahme und Tötung der Tiere

Vier Wochen nach Frakturierung erfolgte die Blutabnahme und Tötung der Versuchstiere. Die Blutentnahme für die weiteren serologischen Untersuchungen wurde über eine Punktion der unteren Hohlvene unter Analgosedierung durchgeführt. Hierzu wurde eine mediane Laparotomie vorgenommen und die untere Hohlvene im Bereich des Nierenvenen-Abganges freigelegt. Durch die entsprechende Punktion konnte ein Blutvolumen von etwa 0,8 ml gewonnen werden. Nach sofortiger Zentrifugation (3000 U/min, 3 min) wurde das Plasma separiert und bei -80°C gelagert. Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden die Versuchstiere durch eine intraperitoneale Injektion mit Pentobarbital getötet.

3.4.4 Präparation der Knochen

Unmittelbar nach Tötung der Versuchstiere wurde das jeweils rechte Femur explantiert. Hierzu wurden die Femora über einen medialen Zugang freigelegt und im Hüft- und Kniegelenk exartikuliert. Nach Resektion des verbliebenen Weichteilmantels wurde die

einliegende Schraube vorsichtig ohne Beeinträchtigung des Frakturkallus entfernt. Die resezierten Femora wurden bei -20°C bis zum Beginn der biomechanischen Auswertung gelagert.

3.5 Zielkriterien und Auswertung

Mit der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob eine HHCY die mechanische Stabilität von heilenden Femurfrakturen im Mausmodell beeinträchtigt. Eine HHCY sollte hierbei durch eine Homocystin-, beziehungsweise Methionin-angereicherte sowie durch eine B-Vitamin-defiziente Diät erzeugt werden.

Folgende Zielkriterien wurden herangezogen:

- laborchemische Analyse der HCY-Serumkonzentration
- laborchemische Analyse der Serumkonzentration von Vitamin B12
- laborchemische Analyse der Serumkonzentration von Folsäure
- biomechanische Drei-Punkt-Biegetestung des Knochens

3.5.1 Serumanalysen

3.5.1.1 Homocystein

Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Die HCY-Konzentration im Blutserum wurde mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GCMS) bestimmt. Technisch besteht das GCMS-System aus einem HP 6890 Gaschromatographen mit Autosampler und Split-Einlass (Hewlett Packard, USA), einem HP 5973 Massenspektrometer (mit Ionenquelle, Quadrupol-Massenfilter und Detektor; Hewlett Packard, USA) und einer ChemStation für die Steuerung und Ergebnisauswertung (Hewlett Packard, USA) (STABLER et al., 1993).

Der Gaschromatograph enthält einen Ofen, über den die Gaschromatographie (GC)-Säule beheizt wird. Die GC-Säule ist über ein Interface mit dem Massenspektrometer verbunden. Das Massenspektrometer wird mit Hilfe einer Vorvakuumpumpe und einer Hochvakuumpumpe (Turbomolekularpumpe) auf einen Druck von 1,3 MPa evakuiert. Das

Hochvakuum im Massenspektrometer sorgt für kollisionsfreie Ionenbahnen, erzeugt eine sogenannte mittlere freie Weglänge, die mindestens so groß sein muss wie der Abstand zwischen Ionenquelle und Detektor, verhindert elektrische Entladungen und erhöht die Nachweisempfindlichkeit (STABLER et al., 1993).

Im Massenspektrometer werden die, über das Interface aus dem Gaschromatographen austretenden, Moleküle durch Elektronen mit einer Energie von 70 eV beschossen. Aufgrund der Elektro-Ektrowechselwirkungen verlieren die Moleküle ein gebundenes Elektron (Elektronen-Ionisation). Das entstehende Ion ist in der Regel einfach positiv geladen, die Ionisations-Ausbeute liegt allerdings nur bei 0,01 %. Die molekularen Ionen fragmentieren in kleinere Teilchen, so dass die Masse und die Intensität der einzelnen Fragmente genaue Rückschlüsse auf die Beschaffenheit der Ausgangsmoleküle erlauben (STABLER et al., 1993).

Auf dem Weg zum Detektor müssen die Ionen einen Quadrupol-Massenfilter passieren. Die Bewegung eines Ions, das zwischen die Quadrupolstäbe eintritt, wird bestimmt durch die elektrischen Felder der vorliegenden Gleich- und Hochfrequenz-Spannungen. Nur die Ionen mit einem bestimmten Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) oszillieren im Massenfilter konstant, erreichen den Ausgang des Massenfilters und werden von einem Elektronen-Multiplier detektiert. Durch den Elektronen-Multiplier wird eine Signalverstärkung um den Faktor 10^5 erzielt (STABLER et al., 1993).

Die verwendete GCMS-Methode für die Bestimmung der HCY-Serumkonzentration lehnt sich an die von Stabler et al. beschriebenen GCMS-Methoden an (STABLER et al., 1988; STABLER et al., 1993). Die Ionenfragmente des silylierten HCY (Retentionszeit etwa 13 min) haben ein Masse/Ladungs-Verhältnis von 420,20 zu 424,20 (für den deuterierten internen Standard).

Probenvorbereitung

Für die Analyse der HCY-Serumkonzentration mittels GCMS wurden je nach Versuchsgruppe die in Tab. 2 abgebildeten Basislösungen hergestellt (Tab. 2). Für die Reduktion von HCY wurden die Proben 30 min bei 42°C inkubiert. Als interne Kontrolle diente bei jedem Probendurchlauf ein Aliquot eines standardisierten Poolserums.

	Interne Kontrolle	Vitamin- Mangel	Homocystin	Methionin	Kontrollen
<i>Wasser</i>	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
<i>Probe</i>	200 µl	20 µl	20 µl	20 µl	100 µl
<i>DTT</i>	25 µl	28 µl	28 µl	28 µl	28 µl
<i>HCY-D4-Std.</i>	10 µl	20 µl	50 µl	50 µl	20 µl
<i>Faktor</i>	39,2	39,2	98	98	7,84

Tab. 2: Basislösungen für die Analyse der HCY-Serumkonzentration mittels GCMS. HCY-D4-Std. = Homocystein-D₄-Standard (392 µmol/l, im Verhältnis 1:20 vorverdünnt); DTT = Dithiothreitol-Lösung (10 mg Dithiothreitol in 1 ml 1N NaOH)

Die einzelnen Chromatographiesäulen wurden mit jeweils 100 mg eines getrockneten Anionenaustauscher-Harzes (AG MP-1M, mesh 100-200, Bio-Rad, München) gefüllt. Dieses wurde zuvor mit HCl und Methanol gewaschen und getrocknet. Im Anschluss wurden die gefüllten Säulen nochmals mit 1 ml Methanol und 3 ml destilliertem Wasser für die Chromatographie gewaschen. Nach der Reduktion wurden die gesamten Proben auf die vorbereiteten Chromatographiesäulen pipettiert. Nun wurde jede Säule zunächst dreimal mit jeweils 3 ml destilliertem Wasser und anschließend einmal mit 3 ml Methanol gewaschen. Für die Elution wurden 1,1 ml 0,4 N Essigsäure-Methanol-Lösung (10 ml 4 N Essigsäure und 90 ml Methanol) auf die Säule pipettiert und das Eluat unter der Säule in einem Glasgefäß aufgefangen. Die auf diese Weise gewonnenen Proben wurden in einem Eppendorf-Konzentrator bei 60°C vollständig getrocknet. Für die Derivatisierung wurden die getrockneten Proben mit jeweils 20 µl Acetonitril und 10 µl MTBDSFA (N-Methyl-N-tert.-butyldimethylsilyl-trifluoracetamid) versetzt und anschließend im Mikrowellen-Herd für 5 min bei 440 W erhitzt.

Messung und Auswertung

Für die Bestimmung von HCY wurde eine HP 5 MS 5 % Phenyl-methyl-siloxan Säule mit 30 m Länge (250 µm innerer Durchmesser und 0,25 µm Beschichtungsdicke) verwendet. Als Trägergas wurde Helium mit einem Einlassdruck von 64,9 kPa verwendet. Nach Bestückung des Autosamplers mit den derivatisierten Proben wurde die Messung unter folgenden Geräteeinstellungen durchgeführt:

- Ofentemperatur: 80°C-310°C
- Einlasstemperatur: 230°C
- Injektionsvolumen: 1 µl
- Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min

Die Proben wurden vollautomatisch nacheinander injiziert, chromatographiert und im Massenspektrometer analysiert.

Nach Beendigung des Probenlaufes wurden die aufgezeichneten Massenspektrogramme ausgewertet. Die Peakfläche der jeweiligen Fragmente verhält sich proportional zur Konzentration der entsprechenden Analyten. Mit Hilfe der bekannten Konzentration des internen deuterierten Standards und der entsprechenden Peakfläche konnte so die Konzentration des Analyten berechnet werden. Für die Quantifizierung von HCY wurden folgende Peaks der Fragmente herangezogen: 420,20 und 424,20 (interner Standard).

Die Analytkonzentration wurde mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$\text{HCY} = \text{Peakfläche}_{\text{Probe}} / \text{Peakfläche}_{\text{Standard}} \times \text{Konzentration}_{\text{interner Standard}} \text{ oder Faktor}$$

3.5.1.2 Vitamin B12 und Folsäure

Die Bestimmung von Vitamin B12 und Folsäure erfolgte mit einem kompetitiven Chemilumineszenz-Immunoassay unter Verwendung des ADVIA Centaur-Systems (Bayer Diagnostics, Fernwald, Deutschland).

Für die Bestimmung von Vitamin B12 und Folsäure wurden die Proben zuvor mit einem entsprechenden Diluent verdünnt. Dabei konnte keine einheitliche Verdünnungsstufe gewählt werden, da zum einen nicht ausreichend Blutserum zur Verfügung stand und zum anderen die Werte der Vitamin-Mangel-Gruppe so niedrig waren, dass das Gerät mit einer hohen Verdünnungsstufe keine Messung durchführen konnte. In Abhängigkeit von Ergebnissen aus Vorversuchen wurden entsprechend Versuchsgruppen-abhängig für die Folsäure-Messung Verdünnungsreihen von 1:21 und 1:31 sowie für die Vitamin-B12-Messung von 1:31, 1:21, 1:4 und 1:2 gewählt.

Vitamin-B12-Bestimmung am ADVIA Centaur

Beim Vitamin-B12-Test am ADVIA Centaur (Bayer Diagnostics) handelt es sich um einen kompetitiven Immunoassay unter Anwendung der direkten Chemilumineszenz. Zur Freisetzung des Vitamin B12 aus endogenen Bindungsproteinen wird die Probe mit Natriumhydroxid und DTT (Dithiothreitol-Lösung) behandelt. Vitamin B12 in der Probe konkurriert mit einem mit Acridiniumester markierten Vitamin B12 im Reagenz um eine begrenzte Menge an gereinigtem Intrinsic Factor, der kovalent an paramagnetische Partikel gebunden ist. Nachdem die paramagnetischen Partikel gewaschen worden sind, wird die Chemilumineszenz-Reaktion durch Zugabe eines Startreagenz initiiert. Zwischen der Vitamin-B12-Konzentration der Probe und den detektierten relativen Lichteinheiten besteht ein umgekehrt-proportionales Verhältnis.

Folatbestimmung am ADVIA Centaur

Die Bestimmung der Folsäure am ADVIA Centaur (Bayer Diagnostics) beruht ebenfalls auf einem kompetitiven Immunoassay unter Verwendung der direkten Chemilumineszenz. Zur Freisetzung der Folsäure aus endogenen Bindungsproteinen in der Probe wird die Probe mit einem Freisetzungreagenz vorbehandelt. Die Folsäure in der Probe konkurriert mit einer mit Acridiniumester-markierten Folsäure im Reagenz um eine begrenzte Menge folsäurebindender Proteine, die kovalent an paramagnetische Partikel gebunden sind. Schließlich werden die paramagnetischen Partikel gewaschen und mit einem Reagenz behandelt, das mit Acridiniumester zu einer chemiluminometrischen Reaktion führt. Die Lichtintensität verhält sich dabei umgekehrt-proportional zur Folsäurekonzentration der Probe.

3.5.2 Knochenanalysen

Um die Morphologie des Knochens und des Frakturkallus darzustellen, wurde im Vorfeld der biomechanischen Testungen eine Röntgenaufnahme (Belichtungszeit: 5 min, Spannung: 20 kV; Faxitron 43805 Hewlett Packard, USA) sowie eine Mikro-Computertomographie (μ CT) (Schichtdicke: 12 μ m, Spannung: 70 kV, Stromstärke: 114 mA; μ CT 40 und Bildverarbeitungsprogramm μ CT Ray V3.0, Scanco Medical, Bassersdorf, Schweiz) der Femora durchgeführt.

Die mechanische Stabilität der heilenden Femurfrakturen wurde durch eine Drei-Punkt-Biegetestung untersucht. Hierzu wurden die Knochen am proximalen Ende mit Polymethylmetacrylat (Technovit 3040, Heraeus Kulzer, Wertheim, Deutschland) in Aluminiumzylinder eingegossen, die wiederum in eine spezielle Drei-Punkt-Biegeapparatur eingespannt wurden (Abb. 17). Die entsprechende Halterung erlaubte durch ein Gelenk das Kippen des Knochens unter Belastung. Das distale Ende des Knochens wurde auf einer festen Auflage abgestützt. Die Stützweite zwischen der proximalen Halterung und der distalen Auflage betrug 9,25 mm. In der Mitte zwischen der proximalen Halterung und der distalen Auflage, auf Höhe der früheren Frakturlinie, erfolgte eine Druckbelastung mit einem Stempel. Die Druckkraft wurde durch eine Materialprüfmaschine (1454, Zwick, Ulm, Deutschland) erzeugt, in die die Biegeprüfeinrichtung integriert war. Nachdem eine Vorlast von 0,1 N aufgebracht war, wurde die Biegekraft (Druckkraft) durch ein Absenken des Biegestempels mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/min bis auf eine Kraft von 10 N kontinuierlich erhöht. Die Kraft (Messdose 50N, AST, Dresden, Deutschland) und die Biegung (Messsystem der Materialprüfmaschine) wurden in einem Kraft-Weg-Diagramm aufgezeichnet (Abb. 18). Der lineare Teil der Kurven stellte hierbei die Steifigkeit (S) der Knochen dar, so dass die Steifigkeit entsprechend aus dem Quotienten von Last (F [N]) und der dazugehörigen Verformung (ΔL [mm]) berechnet wurde:

$$S \text{ [N/mm]} = F \text{ [N]} / \Delta L \text{ [mm]}$$



Abb. 17: Drei-Punkt-Biegetestung: Die Knochen (1) wurden am proximalen Ende in Aluminiumzylinder eingegossen (4). Die entsprechende Halterung erlaubte durch ein Gelenk das Kippen des Knochens unter Belastung. Das distale Ende des Knochens wurde auf einer festen Auflage abgestützt (2). In der Mitte zwischen der proximalen Halterung und der distalen Auflage, auf Höhe der früheren Frakturlinie, erfolgte eine Druckbelastung mit einem Stempel (3).

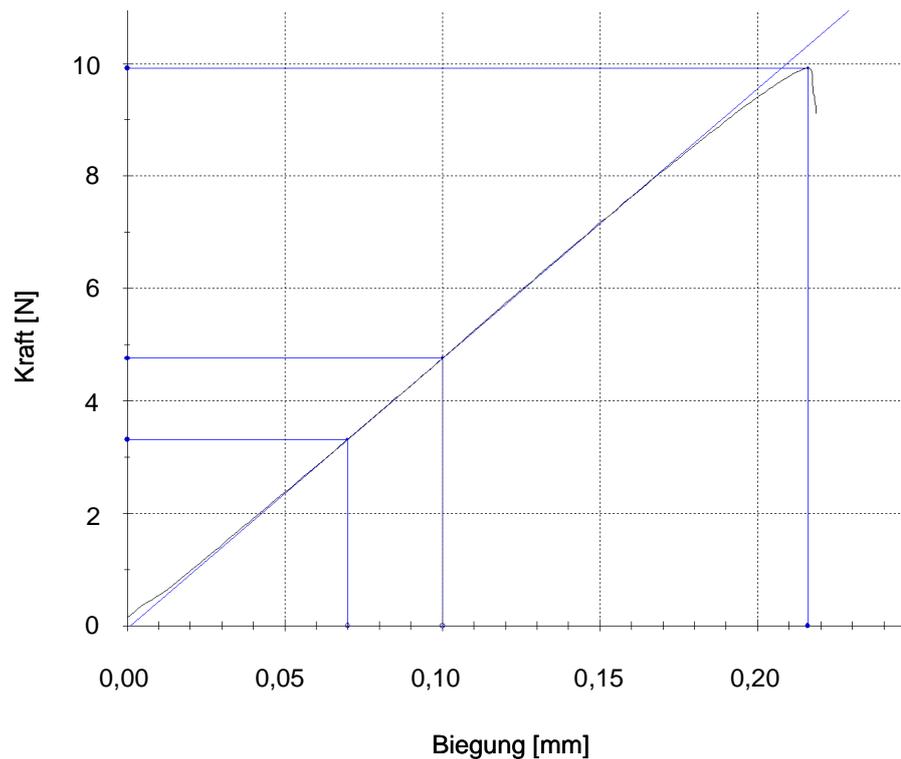


Abb.18: Kraft-Weg-Diagramm der Drei-Punkt-Biegung eines repräsentativen Femur-Präparats. Der lineare Teil der Kurven stellt Steifigkeit der Knochen dar, so dass die Steifigkeit entsprechend aus dem Quotienten von Kraft [N] und der dazugehörigen Biegung [mm] berechnet werden kann.

3.5.3 Statistik

Alle statistischen Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die Versuchsgruppen wurden mittels U-Tests (Mann-Whitney) unter Verwendung des SAS-Software-Package (JMP, SAS Institute, Cary, USA) miteinander verglichen. Um eine Alpha-Fehler-Kumulierung bei multiplen Paarvergleichen aufzuheben, wurde eine Bonferroni-Korrektur vorgenommen. Es wurde ein p-Wert von $< 0,05$ festgelegt, um signifikante Unterschiede anzuzeigen.

4. Ergebnisse

4.1 Postoperativer klinischer Verlauf

Die angebotenen Futterdiäten wurden von allen Versuchstieren sowohl präoperativ als auch postoperativ in adäquater Menge aufgenommen. So betrug die durchschnittliche Futteraufnahme eines Tieres 3,1 g/d in der Homocystin-Gruppe, 3,7 g/d in der Methionin-Gruppe, 3,8 g/d in der Vitamin-Mangel-Gruppe, sowie 3,8 g/d beziehungsweise 3,7 g/d in den Kontroll-Gruppen (Diät der Firma Altromin beziehungsweise Harlan) (Abb. 19). Es zeigten sich im vierwöchigen postoperativen Verlauf in keiner Versuchgruppe größere Veränderungen des Körpergewichtes (Homocystin: -0,5 g, Methionin: -2,1 g, Vitamin-Mangel: -0,4 g, Kontrolle Altromin: +0,3 g, Kontrolle Harlan: $\pm 0,0$ g) (Abb. 20).

Im postoperativen Verlauf kam es innerhalb von ein bis zwei Tagen zu einer Aufbelastung des frakturierten Beines. Die Tiere waren mobil und wiesen innerhalb der Versuchsgruppen ein dem präoperativen Zustand vergleichbares Verhalten auf ohne wesentliche erkennbare Beeinträchtigung des Bewegungsablaufes oder äußere Schmerzzeichen. Tiere, die mit einer Homocystin- und Methionin-angereicherten Diät gefüttert wurden, zeigten im Vergleich zu den Tieren der anderen Versuchsgruppen sowohl präoperativ als auch postoperativ ein erhöhtes Aktivitätsniveau.

Als postoperative Ausschlusskriterien dienten ein nachgewiesener Knochen- oder Weichteilinfekt, eine Gewichtsabnahme von mehr als 20 % des Körpergewichtes sowie eine makroskopisch oder radiologisch erkennbare Implantatdislokation. Zudem wurden Tiere, in denen keine Frakturkonfiguration Typ A2 oder A3 gemäß der AO/ASIF-Klassifikation (KOCH et al., 1990) in Schaftmitte erzielt wurde, von der Studie ausgeschlossen.

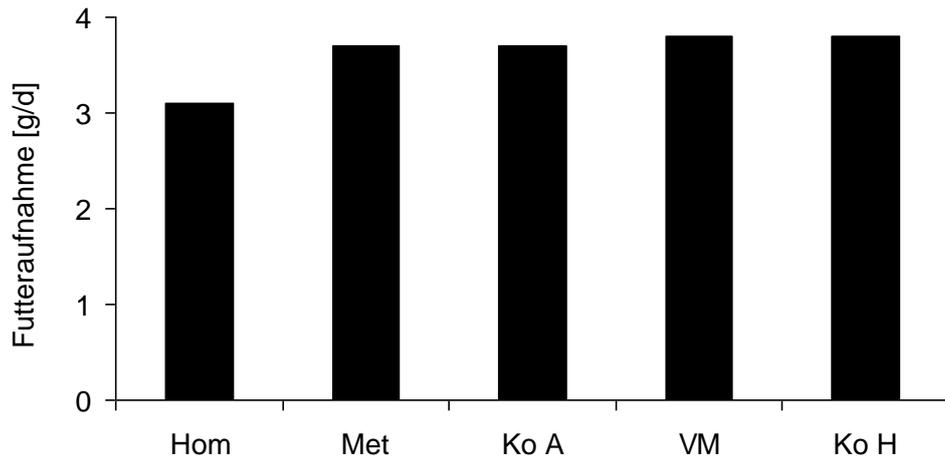


Abb. 19: Durchschnittliche tägliche Futtermittelaufnahme eines Tieres (Homocystin-angereicherte Diät [Hom], Methionin-angereicherte Diät [Met], Kontroll-Diät der Firma Altromin [Ko A], Vitamin-B-defiziente Diät [VM] sowie Kontroll-Diät der Firma Harlan-Teklad [Ko H]).

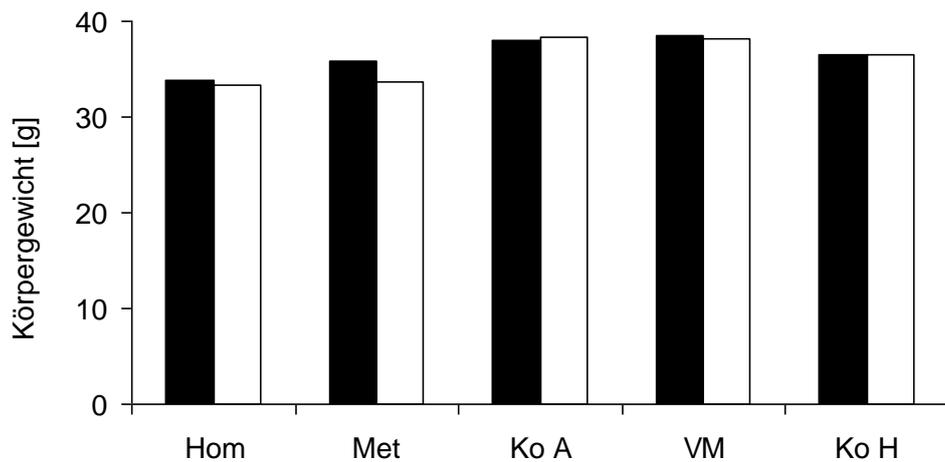


Abb. 20: Durchschnittliches Körpergewicht der Versuchstiere (Fütterung mit Homocystin-angereicherter Diät [Hom], Fütterung mit Methionin-angereicherter Diät [Met], Fütterung mit Kontroll-Diät der Firma Altromin [Ko A], Fütterung mit Vitamin-B-defizienter Diät [VM] sowie Fütterung mit Kontroll-Diät der Firma Harlan-Teklad [Ko H]) am Operationstag (schwarze Säulen) sowie am Tötungstag (weiße Säulen).

4.2 Serumanalysen

4.2.1 Homocystein

Sowohl Versuchstiere, denen eine Homocystin- und Methionin-angereicherte Diät verabreicht wurde, als auch Tiere, die mit einer B-Vitamin-defizienten Diät gefüttert wurden, wiesen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren signifikant erhöhte HCY-Serumkonzentrationen auf (Homocystin: $102,2 \pm 64,5 \mu\text{mol/l}$ versus $2,8 \pm 1,5 \mu\text{mol/l}$; Methionin: $38,4 \pm 30,8 \mu\text{mol/l}$ versus $2,8 \pm 1,5 \mu\text{mol/l}$; Vitamin-Mangel: $14,6 \pm 5,0 \mu\text{mol/l}$ versus $2,5 \pm 0,8 \mu\text{mol/l}$, p jeweils $< 0,05$) (Abb. 21).

Während die Homocystin-angereicherte Diät im Mittel eine massive HHCY (HCY-Serumkonzentration $> 100 \mu\text{mol/l}$) hervorrief, verursachte die Methionin-angereicherte Diät im Mittel eine intermediäre HHCY (HCY-Serumkonzentration $30\text{-}100 \mu\text{mol/l}$), die Vitamin-Mangel-Diät hingegen im Mittel nur eine moderate HHCY (HCY-Serumkonzentration $12\text{-}30 \mu\text{mol/l}$) (HERRMANN et al., 2007c) (Abb. 21).

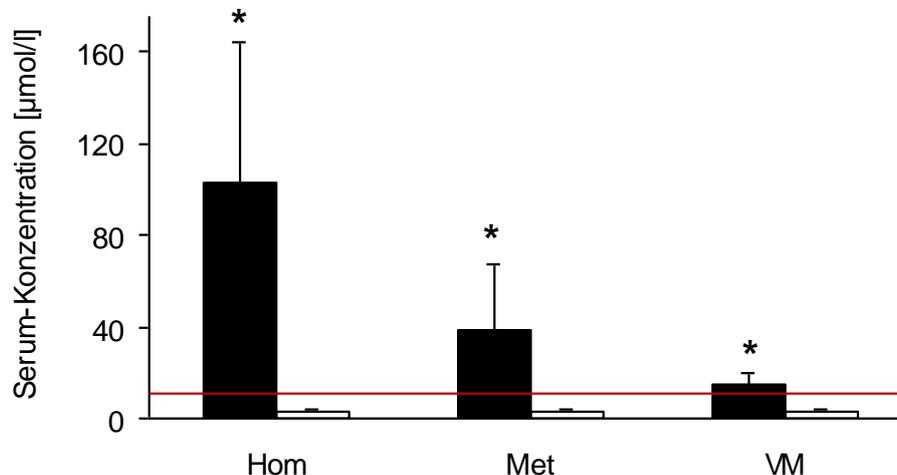


Abb. 21: Bestimmung der HCY-Serumkonzentration von Tieren, die mit einer Homocystin-angereicherten [Hom], einer Methionin-angereicherten [Met] sowie einer B-Vitamin-defizienten [VM] Diät gefüttert wurden (schwarze Säulen) sowie von Tieren, denen die entsprechende Kontroll-Diät verabreicht wurde (weiße Säulen). Im Menschen ist eine HCY-Serumkonzentration $> 12 \mu\text{mol}$ (rote Kennlinie) als HHCY definiert. * $p > 0,05$ gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe.

4.2.2 Vitamin B12 und Folsäure

Die Serumkonzentration von Vitamin B12 zeigte sich in der Homocystin-, der Methionin- sowie der Vitamin-Mangel-Gruppe signifikant vermindert im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen (Homocystin: $9,6 \pm 2,8$ ng/ml versus $14,6 \pm 4,0$ ng/ml; Methionin: $9,7 \pm 3,0$ ng/ml versus $14,6 \pm 4,0$ ng/ml; Vitamin-Mangel: $0,5 \pm 0,2$ ng/ml versus $12,4 \pm 4,0$ ng/ml; p jeweils $< 0,05$). Erwartungsgemäß führte die Vitamin-Mangel-Diät hierbei zu dem stärksten Abfall der Vitamin-B12-Serumkonzentration (Abb. 22).

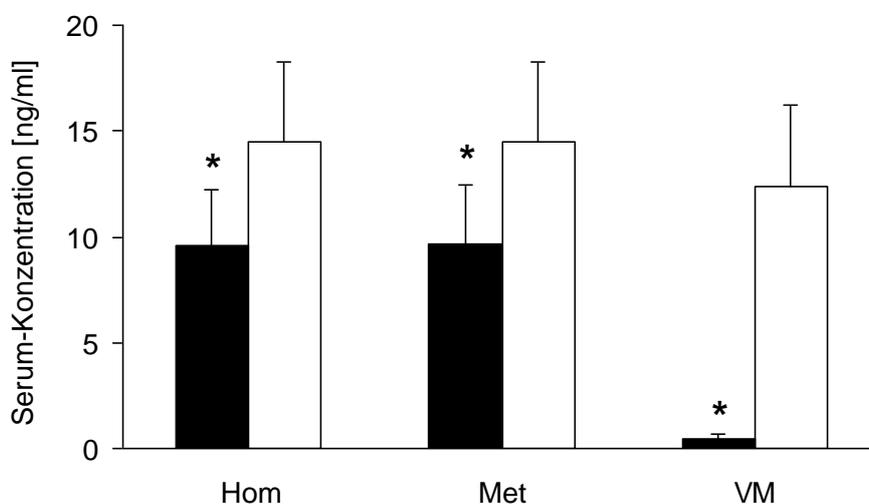


Abb. 22: Bestimmung der Vitamin-B12-Serumkonzentration von Tieren, die mit einer Homocystin-angereicherten [Hom], einer Methionin-angereicherten [Met] sowie einer B-Vitamin-defizienten [VM] Diät gefüttert wurden (schwarze Säulen) sowie von Tieren, denen die entsprechende Kontroll-Diät verabreicht wurde (weiße Säulen). *p $> 0,05$ gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe

Korrespondierend zu diesen Ergebnissen wiesen Tiere, die mit einer Homocystin- und Methionin-angereicherten Diät, beziehungsweise einer B-Vitamin-defizienten Diät gefüttert wurden, eine signifikant herabgesetzte Folsäure-Serumkonzentration verglichen mit den entsprechenden Kontrollgruppen auf (Homocystin: $165,8 \pm 59,7$ ng/ml versus $271,0 \pm 161,0$ ng/ml; Methionin: $167,1 \pm 41,8$ ng/ml versus $271,0 \pm 161,0$ ng/ml; Vitamin-Mangel: $44,7 \pm 12,4$ ng/ml versus $140,5 \pm 50,7$ ng/ml; p jeweils $< 0,05$). Auch hier fand sich die geringste Folsäure-Serumkonzentration in der Vitamin-Mangel-Gruppe (Abb. 23).

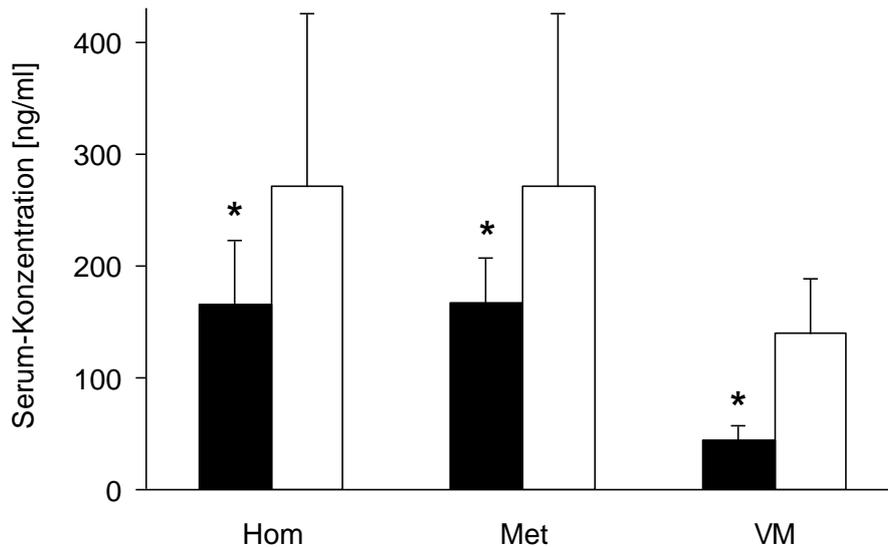


Abb. 23: Bestimmung der Folsäure-Serumkonzentration von Tieren, die mit einer Homocystin-angereicherten [Hom], einer Methionin-angereicherten [Met] sowie einer B-Vitamin-defizienten [VM] Diät gefüttert wurden (schwarze Säulen) sowie von Tieren, denen die entsprechende Kontroll-Diät verabreicht wurde (weiße Säulen). * $p > 0,05$ gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe.

4.3 Knochenanalysen

4.3.1 Makroskopie

Alle Tiere wurden post mortem im Rahmen der Explantation der operierten Femora auf eventuelle Pathologien hin untersucht. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf die femoro-patellaren und femoro-tibialen Gelenkverhältnisse, die Beinmuskulatur sowie die Frakturlokalisierung gelegt. Bei keinem der Tiere zeigten sich in diesem Zusammenhang Hinweise auf Patella- oder Kniegelenksluxationen, Infekte, Wundheilungsstörungen oder Muskelatrophien. Des Weiteren wurde bei jedem Tier die korrekte Lage der Schraube und deren fester Sitz überprüft. Alle in die Studie eingeschlossenen Tiere wiesen makroskopisch eine stattgehabte middiaphysäre Femurschaftfraktur ohne erkennbare Implantatdislokation auf.

Nach Resektion des Weichteilmantels wurde die Überbauung des Frakturspaltes begutachtet. Makroskopisch zeigten sich hierbei im Hinblick auf die Kallusgröße und die Kallusbeschaffenheit keine erkennbaren Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.

4.3.2 Röntgen und Computertomographie

Korrespondierend mit den makroskopischen Untersuchungen wiesen alle Tiere nach vierwöchiger Frakturheilung radiologische und computertomographische Zeichen einer knöchernen Frakturüberbrückung auf. Hierbei ergaben sich keine ersichtlichen Unterschiede im Hinblick auf die Größe und die radiologische Dichte des Frakturkallus. In keinem Versuchstier zeigten sich radiologische Zeichen einer verzögerten oder ausbleibenden Knochenbruchheilung. Alle Versuchstiere, die in die Auswertung einbezogen wurden, wiesen eine achsgerechte Frakturstellung auf (Abb. 24 und Abb. 25).

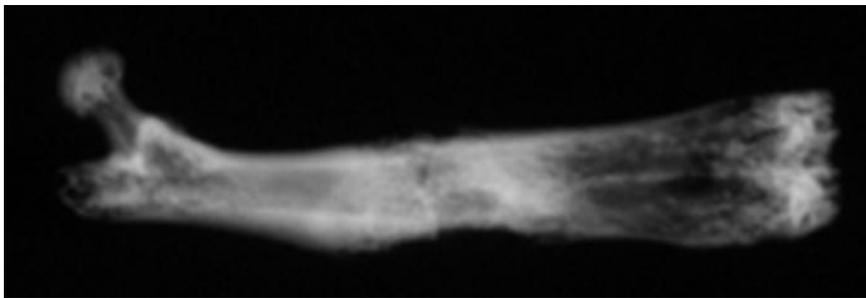


Abb. 24: Repräsentative Röntgenaufnahme eines Femurs nach vierwöchiger Frakturheilung. Es zeigte sich in allen Versuchstieren eine komplette knöcherne Durchbauung des Frakturspaltes ohne Zeichen einer verzögerten oder ausbleibenden Frakturheilung.

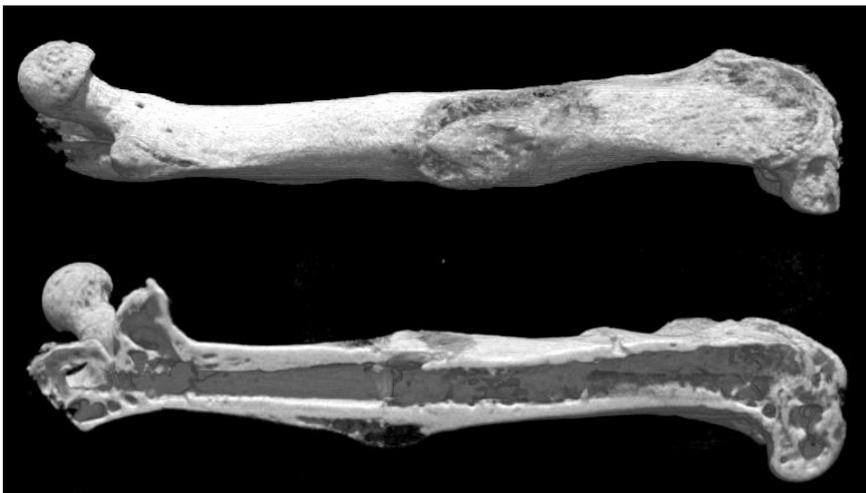


Abb. 25: Repräsentative Computertomographie eines Femurs nach vierwöchiger Frakturheilung. Korrespondierend mit den Röntgenaufnahmen zeigte sich in allen Versuchstieren eine komplette knöcherne Durchbauung des Frakturspaltes ohne Zeichen einer verzögerten oder ausbleibenden Frakturheilung.

4.3.3 Biomechanik

Nach vierwöchiger Frakturheilung zeigte sich die Steifigkeit des Frakturkallus in Versuchstieren, die mit einer Homocystin-angereicherten Diät gefüttert wurden signifikant vermindert im Vergleich zu Versuchstieren, denen die entsprechende Kontrolldiät verabreicht wurde ($45,5 \pm 17,4$ Nmm versus $65,2 \pm 15,7$ Nmm; $p < 0,05$) (Abb. 26).

Im Gegensatz dazu wies die Steifigkeit des Frakturkallus in Tieren, die eine Methionin-angereicherte Diät erhielten und in Tieren, die die entsprechende Kontrolldiät erhielten, keine signifikanten Unterschiede auf ($57,0 \pm 24,3$ N/mm versus $65,2 \pm 15,7$ N/mm; $p > 0,05$) (Abb. 26).

Versuchstiere, die mit einer B-Vitamin-defizienten Diät gefüttert wurden, zeigten ebenso keine signifikanten Unterschiede in der Steifigkeit des Frakturkallus verglichen mit den entsprechenden Kontroll-Tieren ($57,0 \pm 24,3$ N/mm versus $52,2 \pm 24,3$ N/mm; $p > 0,05$) (Abb. 26).

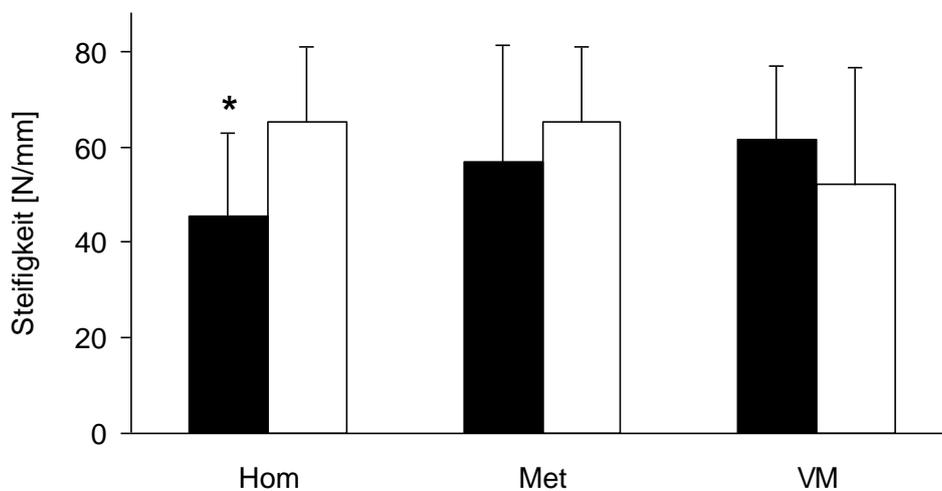


Abb. 26: Bestimmung der Steifigkeit des Frakturkallus von Tieren, die mit einer Homocystin-angereicherten [Hom], einer Methionin-angereicherten [Met] sowie einer B-Vitamin-defizienten [VM] Diät gefüttert wurden (schwarze Säulen) sowie von Tieren, denen die entsprechende Kontroll-Diät verabreicht wurde (weiße Säulen). * $p > 0,05$ gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe.

5. Diskussion

Erhöhte HCY-Serumkonzentrationen scheinen mit Veränderungen des Knochenstoffwechsels vergesellschaftet zu sein. So scheint eine HHCY ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung einer Osteoporose und das Auftreten osteoporotischer Frakturen zu sein (HERRMANN et al., 2007b). Allerdings gibt es bis dato keine Informationen, inwieweit eine HHCY die Knochenbruchheilung beeinflusst. Ziel dieser Studie war es daher, erstmals den Einfluss einer HHCY auf die Knochenbruchheilung an der Maus zu untersuchen.

5.1 Diskussion der Methoden

Die Knochenbruchheilung stellt einen komplexen biologischen Prozess dar, der die Interaktion zahlreicher auch knochenfremder Gewebstypen, wie etwa des periostären Weichteilgewebes oder des Gefäß-Kreislauf-Systems, erfordert (STREET et al., 2002). Aufgrund des komplexen örtlichen und zeitlichen Zusammenspiels der verschiedenen Phasen der Frakturheilung und aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit des ossären „micro-environments“ sind In-vitro-Untersuchungen zur Knochenbruchheilung nur sehr begrenzt aussagekräftig (FRIEDMAN et al., 1996). Daher wurde der Einfluss einer HHCY auf die Frakturheilung anhand eines Tiermodells an der Maus untersucht.

Es gibt zahlreiche Gründe, weshalb Kleintiermodelle und speziell Modelle an der Maus von Vorteil gegenüber Großtiermodellen für Studien zur Frakturheilung sind. Aufgrund der geringen Kosten für die Beschaffung, Zucht und Haltung dieser Spezies sind große Versuchsgruppen gut realisierbar. Das Genom der Maus ist in seiner Gesamtheit entschlüsselt, was einen enormen Vorteil für die Durchführung molekularbiologischer Studien zur Untersuchung der Knochenbruchheilung darstellt. Konsekutiv existiert für keine andere Spezies ein derart großes Spektrum verfügbarer transgener Stämme sowie spezifischer Antikörper (JACENKO, OLSEN, 1995; HOUDEBINE, 2007). Daher wurde bereits zuvor von unserer Arbeitsgruppe ein Frakturmodell an der Maus entwickelt, anhand dessen in weiteren Studien auch die molekularen Mechanismen der Interaktion zwischen einer HHCY und der Knochenbruchheilung untersucht werden können (HOLSTEIN et al., 2009b).

Eine große Herausforderung in der Entwicklung von Frakturmodellen an der Maus stellt deren geringe Größe dar. Demzufolge sind die großen Röhrenknochen, wie Femur und Tibia, am besten geeignet für Studien zur Frakturheilung (HILTUNEN et al., 1993;

MANIGRASSO, O'CONNOR, 2004). Frakturmodelle an Rippen eignen sich aufgrund der ungünstigen Anatomie schlecht für biomechanische Testmethoden und wurden daher fast ausschließlich für Genexpressionsanalysen während der Frakturheilung angewandt (NAKASE et al., 1994; ITO et al., 1999; YAMAGIWA et al., 1999).

Das von Hiltunen et al. 1993 beschriebene Frakturmodell an der Mäusetibia ist das wohl etablierteste Mausmodell zur Untersuchung der Frakturheilung (HILTUNEN et al., 1993). Allerdings entstehen aufgrund des nach distal abnehmenden Durchmessers der Tibia durch nur leicht abweichende Frakturhöhen merklich unterschiedliche Kallusgrößen. Weiterhin ist durch den triangulären Querschnitt und die gebogene Achse der Tibia die Genauigkeit biomechanischer Tests eingeschränkt. In geschlossenen Tibia-Frakturmodellen wird meist auch die Fibula frakturiert, was entweder in zwei getrennten Kalli oder in einem kombinierten Kallusverbund resultiert (Abb. 27). Entsprechend unterliegt die Kallusgröße und Kallusbeschaffenheit in diesen Modellen einer großen Heterogenität. Um eine Fraktur der Fibula zu verhindern muss die Tibia sehr weit distal, nahe der Metaphyse frakturiert werden, was jedoch in geschlossener Form nicht in standardisierter Form praktikabel ist (HOLSTEIN et al., 2009a).



Abb. 27: In geschlossenen Tibia-Frakturmodellen wird meist auch die Fibula frakturiert, was entweder in zwei getrennten Kalli oder in einem kombinierten Kallusverbund resultiert (HILTUNEN et al., 1993).

Die anatomischen Vorteile des Mäusefemur gegenüber der Tibia liegen in einem einheitlichen runden Querschnitt bei guter Weichteildeckung (CHEUNG et al., 2003). Aus diesem Grund zeigen diaphysäre Frakturen auf unterschiedlicher Höhe eine vergleichbare Kallusgröße. Somit ist anhand der geraden longitudinalen Achse am Mäusefemur mit großer Sicherheit eine standardisierte Fraktur zu erreichen. Die biomechanische Testung ist

aufgrund der anatomischen Gegebenheiten am Femur ebenfalls zuverlässiger als an der Tibia. Zusammengefasst ist das Mäusefemur, das in der hier vorgestellten Arbeit als Frakturlokalisierung gewählt wurde, im Vergleich zu der Tibia als geeigneter für Studien zur Frakturheilung anzusehen (HOLSTEIN et al., 2009a).

Um die Knochenbruchheilung zu untersuchen werden sowohl offene als auch geschlossene Frakturmodelle verwendet. Der Vorteil von geschlossenen Modellen liegt in dem relativ einfachen Zugangsweg, durch den nur ein minimaler Weichteilschaden verursacht wird. In offenen Frakturmodellen wird das Femur meist durch einen lateralen longitudinalen Zugang unter Sicht frakturiert oder osteotomiert (CHEUNG et al., 2003; GARCIA et al., 2008). Diese deutlich invasivere Operation ruft einen relativ großen Weichteilschaden hervor, welcher die Frakturheilung potentiell beeinflusst. Allerdings kann das intramedulläre Implantat, das in geschlossenen Frakturmodellen angewandt wird, im Gegensatz zu extramedullären Implantaten, die mehrheitlich im Rahmen offener Frakturmodelle benutzt werden, das Endost sowie das Knochenmark verletzen. In den meisten geschlossenen Frakturmodellen wird der Knochen bei liegendem intramedullärem Implantat frakturiert, da eine Implantateinbringung nach geschlossener Frakturierung sehr schwierig ist. Über einen zuvor eingebrachten Führungsdraht wurde in unserem geschlossenen Modell allerdings eine Frakturierung ohne einliegendes Implantat ermöglicht. Somit repräsentiert unser Modell in hohem Maße ein klinisches Trauma-Szenario.

Aufgrund der fehlenden Möglichkeiten einer stabilen Osteosynthese wurden viele der früheren Frakturstudien an Mäusen mit Hilfe von instabilen intramedullären Pin-Fixationstechniken (BHANDARI et al., 2000; STREET et al., 2002; MANIGRASSO, O'CONNOR, 2004) oder ganz ohne Stabilisierung der Fraktur (LE et al., 2001; COLNOT et al., 2003; OPOLKA et al., 2007) durchgeführt. In Großtiermodellen konnte gezeigt werden, dass exzessive Relativbewegungen zwischen den Knochenfragmenten zu einer signifikant erniedrigten Knochensubstanz innerhalb des Frakturkallus führen und somit in der Ausbildung einer hypertrophen Pseudarthrose resultieren können (CLAES et al., 2002; LIENAU et al., 2006). Scherkäfte zwischen den Frakturrenden führen zudem zu einer herabgesetzten Knochensteifigkeit im Bereich des Frakturspaltes. Eine axiale Stauchung der Frakturrenden hingegen verursacht eine höhere Knochendichte des Frakturkallus (AUGAT et al., 2003). Weitere Studien wiesen nach, dass übermäßige Relativbewegungen zwischen den Frakturrenden eine Hemmung der Angiogenese hervorrufen (CLAES et al., 2002; LIENAU et al., 2005). Konsekutiv konnte gezeigt werden, dass die Expression angiogener und osteogener Zytokine durch das „biomechanical environment“ im Frakturspalt beeinflusst wird (NOMURA, TAKANO-YAMAMOTO, 2000; LIENAU et al., 2005). Auch an der Maus

konnte demonstriert werden, dass mechanische Faktoren während der Frakturheilung den Ablauf der chondrogenen und osteogenen Zytokin-Induktion, die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen, sowie die Größe und Gewebszusammensetzung des Frakturkallus beeinflussen (LE et al., 2001; GARCIA et al., 2008). Standardisierte Osteosynthesetechniken, die definierte biomechanische und biologische Konditionen zur Untersuchung der Frakturheilung garantieren, sind in Großtiermodellen mittlerweile selbstverständlich (AUER et al., 2007). Im Gegensatz dazu wird oft diskutiert, dass in Mausmodellen keine biomechanischen Standards benötigt werden, weil die Hauptanwendung von Mausmodellen in der Erforschung der molekularen Aspekte der Frakturheilung liegt (HOLSTEIN et al., 2008; HOLSTEIN et al., 2009a). Da die Stabilität der Osteosynthese allerdings auch an der Maus einen enormen Einfluss auf den Ablauf der Knochenbruchheilung und insbesondere auf die Expression angiogener und osteogener Zytokine hat, sind entsprechende Argumente nicht nachvollziehbar, so dass stabile Osteosynthesetechniken auch an der Maus anzustreben sind (HOLSTEIN et al., 2009a). Aufgrund des kritischen Einflusses von mechanischen Faktoren auf die Frakturheilung wurde in der vorliegenden Arbeit eine rotations- und achsstable intramedulläre Kompressionsschraube zur Frakturstabilisierung verwendet (HOLSTEIN et al., 2009b). Durch die Entwicklung und Anwendung dieses Frakturmodells konnten somit standardisierte Bedingungen geschaffen werden, um die Effekte einer HHCY auf die Knochenbruchheilung zu untersuchen.

Der operative Eingriff, die Allgemeinnarkose und die postoperative Analgesierung wurden von den Versuchstieren gut toleriert. Die Narkosedauer von 30 Minuten erwies sich für den durchgeführten Eingriff und die postoperative Röntgenkontrolle zeitlich ausreichend kalkuliert. Da die Versuchstiere bereits ein bis drei Tage nach der Operation einen physiologischen Bewegungsablauf aufwiesen, ist davon auszugehen, dass die Extremität postoperativ bei stabiler Osteosynthese adäquat belastet wurde. Bei Tötung der Tiere zeigten sich bei keinem der Versuchstiere Anzeichen von Wundheilungsstörungen, Infekten oder sonstigen Pathologien bei standardisiert reproduzierbarer Frakturheilung. Retrospektiv kann das gewählte Tiermodell somit ohne wesentliche Einschränkungen als reproduzierbar und für die Fragestellung geeignet beurteilt werden.

Entsprechend der radiologischen und computertomographischen Abbildungen führte das beschriebene Modell zu einem typischen sekundären Frakturheilungsverlauf mit knöcherner Frakturüberbauung nach vierwöchiger Frakturheilung. Manigrasso und O'Connor analysierten 2004 in einem Femurmarknagel-Modell den zeitlichen Ablauf der Frakturheilung an der Maus (MANIGRASSO, O'CONNOR, 2004). Hierbei zeigte sich eine maximale

Kallusbildung nach zwei Wochen. Nach vier Wochen wiesen in der erwähnten Studie die meisten Versuchstiere eine knöcherne Durchbauung des Frakturkallus auf, während sich der Knochen nach einer Dauer von sechs Wochen in der Phase des Remodelings befand. Unter klinischen Bedingungen gilt eine Fraktur ab dem Zeitpunkt einer sicheren knöchernen Durchbauung als weitestgehend stabil verheilt (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996). Dieser Zeitpunkt ist nach vierwöchiger Frakturheilung an der Maus gegeben. Vor diesem Hintergrund wählten wir den Vier-Wochen-Zeitpunkt in unserer Studie aus, um den Einfluss einer HHCY auf die mechanische Stabilität des heilenden Knochens zu analysieren.

Die Knochensteifigkeit wurde mittels einer Drei-Punkt-Biegetestung bestimmt. Generell stehen zur biomechanischen Testung der Frakturheilung verschiedene Methoden zur Verfügung. Die verbreitetsten Testverfahren zur Untersuchung der Knochenbruchheilung im Kleintiermodell stellen die Rotationstestung, die Vier-Punkt-Biegetestung sowie die, in dieser Studie verwendete, Drei-Punkt-Biegetestung dar (BURSTEIN, FRANKEL, 1971). Im Rahmen der Vier-Punkt-Biegetestung wird die maximale Kraft über eine relativ große Fläche verteilt (BURSTEIN, FRANKEL, 1971). Für diese Messmethode muss jedoch bei einem Knochen mit einem Durchmesser von etwa 1,9 mm die einwirkende Kraft auf eine etwa 30 mm lange Messfläche verteilt werden. Da das Mäusefemur allerdings nur eine Länge von etwa 15 mm besitzt, ist die Vier-Punkt-Biegetestung an der Maus praktisch nicht anwendbar (MANIGRASSO, O'CONNOR, 2004). Im Gegensatz hierzu ist die Rotationstestung am Mäusefemur gut durchführbar (HOLSTEIN et al., 2007; HOLSTEIN et al., 2009b). Ein überschüssiges Drehmoment wird in der klinischen Praxis als ein gängiger Frakturmechanismus betrachtet (BURSTEIN, FRANKEL, 1971). Die Rotationstestung stellt somit eine realitätsnahe Imitation eines klinischen Fraktur-Szenarios dar, so dass die Rotationstestung zusammengefasst als geeignete Alternativ-Messmethode zu der, in dieser Arbeit beschriebenen, Drei-Punkt-Biegetestung angesehen werden kann (MANIGRASSO, O'CONNOR, 2004). Während der Drei-Punkt-Biegetestung liegt die maximale Belastung des Knochens über nur einem einzigen Punkt (BURSTEIN, FRANKEL, 1971). Vergleichbar mit der Vier-Punkt-Biegetestung führt ein minimales Verdrehen des Femurs zu einer signifikanten Reduktion der Testpräzision (LIND et al., 2001). Um ein Verdrehen des Femurs zu vermeiden, fixierten wir in unserem Testaufbau das proximale Femurende in einen Aluminiumzylinder, so dass nur das distale Ende des Knochens auf einer festen Auflage positioniert wurde. Die Aluminiumzylinder wurden dabei auf einem Gelenk gelagert, um ein achsgerechtes Kippen des Knochens unter Belastung dennoch zu ermöglichen. Die Messung erfolgte zerstörungsfrei, so dass im Anschluss zusätzliche histologische Untersuchungen des unbeschädigten Knochengewebes erfolgen konnten.

Vorversuche zeigten, dass in der Maus die Verabreichung einer Homocystin- sowie einer Methionin-angereicherten Diät über einen Zeitraum von etwa 3 Wochen erfolgen sollte, um eine signifikante HHCY zu erzielen. Die Applikation der B-Vitamin-defizienten Diät war über einen Zeitraum von 5 Wochen notwendig, um eine signifikante Reduktion der Vitamin B12- und der Folsäure-Konzentration im Serum zu erreichen. Aufgrund dieser Vorversuche war sichergestellt, dass die Versuchstiere über den gesamten Zeitraum der Frakturheilung unter einer HHCY, beziehungsweise einem B-Vitamin-Mangel litten.

Aufgrund der, im Vergleich zu größeren Tierspezies, geringen Menge an zirkulierendem Gesamtblutvolumen stellt die Blutentnahme an der Maus eine gewisse Herausforderung dar. Als etablierte Blutentnahmelokalisationen an der Maus gelten die Aorta, die Vena cava, die Schwanzvene, der retrobulbäre Venenplexus, sowie das Herz (DESJARDINS, 1986; HERBERT, KRISTENSEN, 1986). Die Schwanzvene und der retrobulbäre Venenplexus sind dabei zur wiederholten Entnahme kleiner Blutmengen (1-2 Tropfen) geeignet (DESJARDINS, 1986; HERBERT, KRISTENSEN, 1986). Die sonstigen genannten Lokalisationen dienen der letalen Blutentnahme. Das durchschnittliche Blutvolumen einer Maus beläuft sich auf 0,07-0,08 ml/g Körpergewicht (DESJARDINS, 1986; HERBERT, KRISTENSEN, 1986). Die Entnahme von bis zu 10 % des Blutvolumens wird von den Tieren in der Regel ohne erkennbare Nebenwirkungen toleriert (DESJARDINS, 1986; HERBERT, KRISTENSEN, 1986). Wiederholte Blutentnahmen sind am besten durch Punktion des retrobulbären Venenplexus möglich (DESJARDINS, 1986; HERBERT, KRISTENSEN, 1986). Hierbei können täglich bis zu maximal 0,001 ml/g KG Blut gewonnen werden (DESJARDINS, 1986; HERBERT, KRISTENSEN, 1986). Die finale Blutentnahme durch Punktion der Aorta, der Vena cava oder des Herzens liefert eine maximale Blutmenge von etwa 0,7-1,0 ml (DESJARDINS, 1986; HERBERT, KRISTENSEN, 1986). Um eine Blutmenge von 0,8 ml zu gewinnen, wurde somit in unserem Fall eine letale Punktion der unteren Hohlvene durchgeführt. Im Vergleich zur Ratte ist die Gesamtblutmenge der Maus relativ gering. So erlaubt die Ratte wiederholte Blutentnahmen von wöchentlich maximal 1,4 ml, beziehungsweise von terminal 10 ml (DESJARDINS, 1986; HERBERT, KRISTENSEN, 1986). In Studien an Ratten konnte die HCY-Serumkonzentration somit unter kontrollierter Futtergabe regelmäßig gemonitort werden, indem einmal wöchentlich aus dem retrobulbären Venenplexus eine nicht-letale Blutentnahme durchgeführt wurde (HERRMANN et al., 2007b). In der hier vorgestellten Studie musste die notwendige Dauer der Futterperiode, um Futter-spezifische Veränderungen der HCY- und B-Vitamin-Konzentration im Serum zu erzielen, anhand von Vorversuchen ermittelt werden.

Die vergleichsweise geringen Blutvolumina wirkten sich auch auf die verschiedenen Methoden der Serumanalyse aus. Zum einen konnten nur wenige Parameter bestimmt werden, zum anderen mussten hohe Verdünnungsstufen gewählt werden, um ausreichend große Analysevolumina für die Durchführbarkeit der entsprechenden Messmethoden zu gewährleisten (DESJARDINS, 1986; HERBERT, KRISTENSEN, 1986).

Vorangegangene Studien wiesen nach, dass HCY im EDTA-Vollblut sehr instabil ist. So ist eine sofortige Trennung des Blutplasmas von den zellulären Komponenten erforderlich, da es anderenfalls bei Raumtemperatur zu einem Anstieg der HCY-Serumkonzentration von etwa 10 % pro Stunde kommt (NAUCK et al., 2001). Nach Trennung des Plasmas von den Blutzellen zeigt sich HCY stabil, so dass es bis zu vier Tage bei Raumtemperatur (FISKERSTRAND et al., 1993), bis zu einigen Wochen bei 4°C und bis zu mehreren Jahren bei -20°C aufbewahrt werden kann (RASMUSSEN, MOLLER, 2000). Entsprechend den Empfehlungen von Refsum und Kollegen führten wir eine sofortige Zentrifugation nach Blutentnahme mit konsekutiver Lagerung des Plasmas bei -80°C durch (REFSUM et al., 2004). Somit können wir eine artifizielle Erhöhung der HCY-Serumkonzentration durch eine fehlerhafte Proben-Asservierung in unserer Studie weitestgehend ausschließen.

In den entnommenen Blutproben wurden die Serumkonzentrationen von HCY, Folsäure und Vitamin B12 bestimmt. Etwa 98 % des HCY liegen im Serum oxidiert als Disulfid vor. In der Zelle befindet sich hauptsächlich freies, reduziertes HCY, das ca. 2 % des Gesamt-HCY ausmacht. Dieses ist sehr instabil und bindet außerhalb der Zelle an Plasmaproteine (STANGER et al., 2003). Demzufolge wird in den meisten klinischen und epidemiologischen Studien das Gesamt-HCY bestimmt. Vor der endgültigen Analyse wird HCY in die nicht-protein-gebundene Form reduziert. Zurzeit sind folgende Methoden zur Quantifizierung von HCY verfügbar:

- *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*: Die HPLC-Methode basiert auf einem chromatographischen Trennverfahren, bei dem in einer Trennsäule die Derivatisierung, das heißt die Trennung in die einzelnen Bestandteile einer Substanz, stattfindet (PFEIFFER et al., 1999a). Diese werden dann mittels Fluoreszenz oder ultraviolettem Licht ausgelesen. Diese Methode wurde immer wieder in verschiedenen Ansätzen verändert, indem alternative Reagenzien, Standards oder Detektionswege gefunden wurden (FISKERSTRAND et al., 1993; FRANTZEN et al., 1998; PFEIFFER et al., 1999b).

- *Immunoassays*: Als Immunoassays werden zusammengefasst eine Reihe von Methoden in der Bioanalytik bezeichnet, deren gemeinsames Grundprinzip der Nachweis eines Analyten in einer flüssigen Phase durch die Bindung eines Antigens an einen Antikörper ist (WILD, 2005). Durch die Gabe von Adenosin und SAH-Hydrolase kommt es zu einer Konversion von HCY zu SAH. Anhand von monoklonalen anti-SAH-Antikörpern kann in unterschiedlichen Ansätzen das resultierende SAH ermittelt und quantifiziert werden (FRANTZEN et al., 1998; YU et al., 2000).
- *Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GCMS)*: Die Gaschromatographie ist eine Verteilungschromatographie, die als Analysemethode zum Auftrennen von Gemischen in einzelne chemische Verbindungen weite Verwendung findet. Der Gaschromatograph dient der Auftrennung des zu untersuchenden Stoffgemisches. Anhand des Massenspektrometers werden die einzelnen Komponenten identifiziert und quantifiziert. Jede Komponente des Stoffgemisches hat durch seine physikalisch-chemischen Eigenschaften eine charakteristische Mobilität in der Trennsäule, die unter anderem vom Verteilungskoeffizienten zwischen stationärer und mobiler Phase bestimmt wird. So können auch sehr komplexe Stoffgemische in ihre Komponenten aufgetrennt werden. HCY wird im Rahmen der GCMS reduziert, in einer fest-flüssigen Chromatographie-Säule getrennt, derivatisiert sowie mit Hilfe eines GCMS-Systems separiert und quantifiziert. Als interner Standard dient dabei deuteriertes HCY. Die hohen Kosten gelten als limitierende Faktoren dieser Methode (ALLEN et al., 1993; STABLER et al., 1993).

Sowohl die GCMS als auch die HPLC stellen etablierte Verfahren zur Bestimmung von HCY dar. Beide Methoden basieren auf einem Chromatographie-Verfahren und erlauben eine weitere Quantifizierung der einzelnen Bestandteile der zu untersuchenden Substanz. Für die Detektion von HCY wurden im Rahmen der Massenspektrometrie zwei definierte Peaks verwendet, anhand derer die Konzentration des Analyten berechnet wurde. Die Gaschromatographie ist nur anwendbar für Komponenten, die gasförmig sind oder verdampfen (Siedebereich bis 400°C). Im Unterschied zur HPLC sind somit nur ausreichend flüchtige Substanzen nachweisbar (HÜBSCHMANN, 2001). Die GCMS wurde in einer internationalen Multicenter-Studie als Referenz-Methode angesehen (PFEIFFER et al., 1999a), ist im Vergleich zu den automatisierten Systemen der Routine-Labordiagnostik allerdings mit einem höheren Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden. Dagegen kommt die GCMS auch mit sehr geringen Mengen an Probenmaterial im Vergleich zu den Automaten aus, was sich gerade bei den geringen Blutmengen der Mäuse als hilfreich erwies.

In der hier vorgestellten Studie wurde die Folsäure-Serumkonzentration mit einem vollautomatischen ADVIA-Centaur-System aus der Routine-Diagnostik bestimmt. Der ADVIA-Centaur arbeitet auf der Basis eines kompetitiven Immunoassays unter Anwendung der direkten Chemilumineszenz-Technologie. Die erforderliche Mindestblutmenge von 150 µl erreichten wir durch eine entsprechende Verdünnungsstufe. Als alternative Methode, um die notwendige Mindestblutmenge von 150 µl für die entsprechende Messung zu erhalten, ist ein Pooling der Serumproben mehrerer Tiere zu diskutieren (TROEN et al., 2003).

Grundsätzlich ist die Messung der Folsäurekonzentration im Serum sowie in Erythrozyten möglich (BAILEY, 1990). Die Analyse der Folsäurekonzentration in Erythrozyten repräsentiert das zelluläre Folatangebot und kann somit als der relevantere Index für die Detektion eines Folsäuremangels angesehen werden. Die Halbwertszeit von Folat in Erythrozyten beträgt allerdings etwa 100 Tage, so dass die Messung der Folsäurekonzentration in Erythrozyten keine kurzfristigeren Veränderungen des Folatangebots anzeigt. Folglich ist das Erythrozytenfolat ein träger Indikator für einen akuten Folsäuremangel. Bei gleichzeitigem Vitamin-B12-Mangel steigt 5-Methyl-THF an (Folsäurefalle) und diffundiert als Monoglutamat aus der Zelle in das Serum. Deshalb werden in dieser Situation relativ geringe Folatkonzentrationen in den Erythrozyten gemessen, während die Folsäure-Serumkonzentration deutlich höher ist. Die Messung des Serumfolats erfasst also besser Schwankungen in der alimentären Folatversorgung mit der Nahrung, der Erythrozytenfolatspiegel reflektiert dagegen die Gewebekonzentration beziehungsweise die langfristige alimentäre Versorgung (BAILEY, 1990; STABLER et al., 1993; DONNELLY, 2001).

Nach oraler Aufnahme von 15 bis 20 g Histidin scheiden Patienten vermehrt N-Formiminoglutamat über den Urin aus, was eine weitere Diagnosemöglichkeit zur Feststellung eines Folsäuremangels darstellt (Histidinbelastungstest). Unter physiologischen Bedingungen werden weniger als 30 µg/ml beziehungsweise maximal 18 mg/Tag Formiminoglutamat im Urin ausgeschieden. Bei einem Mangel von aktivem Folat ist die Ausscheidung stark erhöht (bis zu 2 g/Tag). Aufgrund der oben beschriebenen direkten quantitativen Nachweismethoden hat dieses indirekte Testverfahren jedoch an Bedeutung verloren (LÖFFLER, PETRIDES, 2003).

Es besteht eine enge inverse Korrelation zwischen Folat und HCY mit einer diagnostischen Sensitivität von etwa 91 %. Bei diätisch induziertem Folatmangel steigt unter physiologischen Bedingungen die HCY-Serumkonzentration schon nach kurzer Zeit an. Die Messung der

HCY-Serumkonzentration kann daher als eine weitere indirekte Methode zur Analyse des Folsäurestatus angesehen werden (HERRMANN, 2001).

Vitamin B12 ist im Serum zu 25 % an Transcobalamin II (Holotranscobalamin, aktive Form des Vitamin B12) und zu 75 % an Transcobalamin I und III (Holotranscobalamin I und III, inaktive Formen des Vitamin B12) gebunden (GIMSING, NEXO, 1989). Im klinischen Alltag wird meist die Serumkonzentration des Gesamt-Vitamin-B12 als Indikator eines Vitamin-B12-Mangels bestimmt, obwohl hierdurch nur begrenzte Informationen über die Serumkonzentration der aktiven Form des Vitamin B12 gewonnen werden können (HERRMANN, 2001). In der hier vorgestellten Studie wurde die Serumkonzentration des Gesamt-Vitamin-B12 mit einem vollautomatischen ADVIA-Centaur-System –vergleichbar der Folsäure-Messung– bestimmt. Die erforderliche Mindestblutmenge von 100 µl für die Vitamin-B12-Analyse wurde ebenfalls durch eine entsprechende Verdünnungsstufe gewährleistet.

Die Messung der HCY-Serumkonzentration kann als eine indirekte Methode auch zur Analyse des Vitamin-B12-Status genutzt werden. Darüber hinaus kann die Serumkonzentration der Methylmalonsäure als weiterer indirekter Hinweis eines Vitamin-B12-Mangels herangezogen werden (HERRMANN, 2001).

Im Rahmen des sogenannten Schilling-Tests kann die Aufnahme von Vitamin B12 im Ileum durch die orale Gabe von radioaktiv markiertem Vitamin B12 bestimmt werden. Hierbei wird die im 24-Stunden-Urin ausgeschiedene Menge an radioaktivem Vitamin B12 gemessen. Eine verminderte Ausscheidung spricht für eine Resorptionsstörung im unteren Ileum (RENZ-POLSTER et al., 2006). Auch wenn anhand dieses Testverfahrens eine Vitamin-B12-Resorptionsstörung diagnostiziert werden kann, gibt die beschriebene Methode keine direkte Auskunft über die tatsächliche Vitamin-B12-Serumkonzentration.

Die durch Folsäure- und Vitamin-B12-bedingte Beeinträchtigung der DNA-Synthese verursacht eine makrozytäre Anämie (SNOW, 1999). Entsprechend kann die Bestimmung des mittleren korpuskulären Volumens von Erythrozyten (MCV) als Marker einer megaloblastären Anämie zur Analyse des Folsäure- und Vitamin-B12-Status angewandt werden (SNOW, 1999).

Durch den Deoxyuridin-Suppressionstest wird in Leukozyten oder Knochenmarkszellen die Kapazität zur Inkorporation von 3[H]-Thymidin in die DNA nach Zufuhr der Kofaktoren Folsäure oder Vitamin B12 gemessen (METZ et al., 1968). Auch wenn es sich hierbei um

eine sehr sensitive und spezifische Analysemethode eines Folsäure- und Vitamin-B12-Mangels handelt, ist die Anwendung dieses Verfahrens inzwischen weitestgehend durch die oben beschriebenen Immunoassays abgelöst worden (CARMEL et al., 1988).

Trotz der Vielzahl an indirekten Analysemethoden eines Folsäure- und Vitamin-B12-Mangels kann die direkte Messung der entsprechenden Vitaminkonzentrationen mittel Immunoassays im Tiermodell als Standardverfahren angesehen werden (HERRMANN, 2001). So zeigten auch die Ergebnisse dieser Studie, dass die angewandten Immunoassays zuverlässige und reproduzierbare Messungen des Folsäure- und Vitamin-B12-Status im Mausmodell ermöglichen.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass die Applikation einer Homocystin-, beziehungsweise einer Methionin-angereicherten Diät sowie einer B-Vitamin-defizienten Diät im Mausmodell eine HHCY hervorruft. Hierbei führte die Homocystin-angereicherte Diät zu einer schweren HHCY, die Methionin-angereicherte Diät sowie die B-Vitamin-defiziente Diät allerdings nur zu einer moderaten bis intermediären HHCY (STANGER et al., 2003).

Die Induktion einer HHCY durch die Applikation einer Homocystin-, beziehungsweise einer Methionin-angereicherten Diät sowie einer B-Vitamin-defizienten Diät wurde im Mausmodell bereits in verschiedenen Studien beschrieben (HOFMANN et al., 2001; TROEN et al., 2003; ZHOU et al., 2003; BERNARDO et al., 2007; ROGERS et al., 2007; TROEN et al., 2008). Troen und Kollegen fütterten Mäuse über einen Zeitraum von 10 Wochen mit einer Methionin-angereicherten und einer B-Vitamin-defizienten Diät. Hierbei konnten sie in der Methionin-Gruppe eine intermediäre HHCY ($86,7 \pm 25,3 \mu\text{mol/l}$) und in der Vitamin-Mangel-Gruppe eine schwere HHCY ($243,0 \pm 82,0 \mu\text{mol/l}$) hervorrufen (TROEN et al., 2003). Im Gegensatz zu diesen Daten wurde von der gleichen Arbeitsgruppe in einer weiteren Studie durch Gabe einer B-Vitamin-defizienten Diät nur eine intermediäre HHCY ($35,2 \pm 28,7 \mu\text{mol/l}$) und durch Gabe einer Methionin-angereicherten Diät eine moderate HHCY ($13,9 \pm 3,6 \mu\text{mol/l}$) induziert (TROEN et al., 2008). Die Behandlung mit dem entsprechenden Diät-Futter erfolgte in dieser Studie über einen Zeitraum von 10 Wochen. Zhou et al. konnten durch die Applikation eines Methionin-angereicherten Futters eine intermediäre HHCY ($53,6 \pm 8,7 \mu\text{mol/l}$) und durch die Bereitstellung von Homocystin-angereichertem Trinkwasser eine moderate HHCY in Mäusen hervorrufen (ZHOU et al., 2003). Die Gabe des Methionin-angereicherten Futters sowie die Bereitstellung von Homocystin-angereichertem Trinkwasser

erfolgte über 18 Wochen. Hofmann und Kollegen induzierten in der Maus durch die Gabe einer Methionin-angereicherten Diät über einen Zeitraum von 8 Wochen eine intermediäre HHCY ($47,3 \pm 3,2 \mu\text{mol/l}$). Interessanterweise führte die Gabe einer B-Vitamin-defizienten Diät in der gleichen Studie zwar zu einer Reduktion der Vitamin-B12- und Folsäure-Serumkonzentration um das Zehnfache gegenüber der Kontrollgruppe, jedoch nicht zu einer HHCY (HOFMANN et al., 2001). Im Rattenmodell konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Applikation einer Homocystin-angereicherten Diät eine intermediäre HHCY und die Gabe einer Methionin-angereicherten Diät eine moderate HHCY hervorruft (OZDEM et al., 2007).

Die große Heterogenität der HCY-Serumkonzentration in den zitierten Studien weist darauf hin, dass das Ausmaß einer alimentär induzierten HHCY im Tiermodell von zahlreichen Faktoren abhängt. So spielt beispielsweise die Applikationsdauer, aber auch die Applikationsform und die spezifische Zusammensetzung der Homocystin-, beziehungsweise Methionin-angereicherten Diäten sowie der B-Vitamin-defizienten Diäten eine entscheidende Rolle. Aber auch die Aufbereitung der Serumproben und die unterschiedlichen Messmethoden sind im Hinblick auf die Divergenz der oben aufgeführten Messdaten zu diskutieren. So wurde zum Beispiel ein Teil der Messungen aus den zitierten Studien an gepoolten Serumproben durchführt (TROEN et al., 2003).

Beim Menschen wird eine HHCY in den meisten Fällen durch einen Mangel an Vitamin B6, Vitamin B12 und Folsäure hervorgerufen (KIM et al., 2003; STANGER et al., 2003; CLARKE et al., 2004) sowie durch eine Abnahme der Nierenfunktion mit zunehmendem Alter (SELHUB et al., 1993; HERRMANN et al., 1999; VAN GULDENER et al., 2005). Entsprechend spiegelt die Applikation einer B-Vitamin-defizienten Diät im Tiermodell ein klinisches Szenario wieder. In diesem Zusammenhang ist von besonderem Interesse, dass ein B-Vitamin-Mangel vor allem zu einer intrazellulären Akkumulation von HCY führt, während die exogene Applikation von Homocystin primär einen extrazellulären Anstieg der HCY-Konzentration bewirkt (HERRMANN et al., 2007a). Somit kann davon ausgegangen werden, dass auch in dem in dieser Studie angewandten Tiermodell an der Maus die Applikation der Homocystin-angereicherten Diät vor allem zu einem extrazellulären Anstieg der HCY-Konzentration führte, während die Gabe der B-Vitamin-defizienten Diät eher eine intrazelluläre Akkumulation von HCY hervorrief.

Die biomechanischen Knochenanalysen dieser Studie zeigten, dass eine schwere HHCY zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Steifigkeit des Frakturkallus führt. Die biomechanischen Eigenschaften des Knochens werden primär durch die Beschaffenheit der extrazellulären Knochenmatrix bestimmt (VASHISHTH et al., 2001). Typ-I-Kollagen, welches

die Hauptkomponente der organischen extrazellulären Matrix darstellt, wird in drei Einzelketten synthetisiert, die durch sogenannte Crosslinks verbunden sind. Unterschieden werden enzymatische Crosslinks, die die Knochenstabilität erhöhen, von nicht-enzymatischen Crosslinks, die einen negativen Einfluss auf die biomechanischen Eigenschaften des Knochens haben (VASHISHTH et al., 2001). Interessanterweise wurde in Knochenproben von hyperhomocysteinämien Patienten eine erhöhte Konzentration an nicht-enzymatischen Crosslinks gefunden (LUBEC et al., 1996; SAITO et al., 2006). Die Synthese von Typ-I-Kollagen spielt auch während der Frakturheilung eine wichtige Rolle (VASHISHTH et al., 2001; BANSE et al., 2002; OPOLKA et al., 2007). Somit könnte die herabgesetzte Stabilität des Frakturkallus in hyperhomocysteinämien Mäusen durch eine vermehrte Bildung von nicht-enzymatischen Crosslinks im Rahmen der Synthese von Typ-I-Kollagen bedingt sein. Folgestudien werden entsprechend zu klären haben, ob eine HHCY die Synthese von Typ-I-Kollagen, und insbesondere die Beschaffenheit der Kollagen-Crosslinks innerhalb des Frakturkallus beeinflusst.

Kürzlich konnte sowohl in vitro als auch in vivo gezeigt werden, dass eine erhöhte HCY-Konzentration mit einem katabolen Knochenstoffwechsel assoziiert ist (HERRMANN et al., 2005a; HERRMANN et al., 2005b; HERRMANN et al., 2007b). So konnten verschiedene klinische Studien einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer HHCY und einer gesteigerten Konzentration von Knochenresorptionsmarkern nachweisen (DHONUKSHERUTTEN et al., 2005; GERDHEM et al., 2007). Diese klinischen Ergebnisse wurden durch Zellkultur-Studien bestätigt, welche einen HCY-abhängigen Anstieg der Osteoklasten-Aktivität zeigten (HERRMANN et al., 2005b). Einschränkend muss allerdings festgehalten werden, dass die Effekte einer HHCY auf Osteoklasten kontrovers diskutiert werden, da in anderen Studien keine signifikante Korrelation zwischen einer HHCY und einer erhöhten Osteoklasten-Aktivität nachgewiesen werden konnte (ABRAHAMSEN et al., 2003; PERIER et al., 2007). Osteoklasten spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der Frakturheilung. So sind Osteoklasten für die Resorption des knorpeligen Kallus und damit für die Verknöcherung des weichen Frakturkallus im Rahmen der enchondralen Ossifikation verantwortlich (NESBITT, HORTON, 1997; VAANANEN et al., 2000; VAARANIEMI et al., 2004). Des Weiteren stellen Osteoklasten den entscheidenden Zelltyp im Rahmen des Remodelings während der späten Frakturheilung dar (NESBITT, HORTON, 1997; VAANANEN et al., 2000; VAARANIEMI et al., 2004). Da die biomechanischen Studien in der hier vorgestellten Studie nach vierwöchiger Frakturheilung durchgeführt wurden, ist vor allem der mögliche Effekt einer HHCY auf die Osteoklasten-Aktivität während der enchondralen Ossifikation zu diskutieren. Entsprechend kann die Hypothese aufgestellt werden, dass eine HHCY die osteoklastäre Resorption des knorpeligen Kallus beeinträchtigt, was konsekutiv in

einer verminderten Steifigkeit des Frakturkallus resultiert. Um diese Hypothese zu evaluieren sind in Folgestudien weitere histologische, immunhistochemische und proteinbiochemische Untersuchungen notwendig, die den Einfluss einer HHCY auf die Gewebekomposition des Kallus und die Osteoklasten-Aktivität innerhalb des Frakturkallus analysieren.

Weitere Studien weisen darauf hin, dass eine HHCY auch die Aktivität von Osteoblasten beeinflusst (HERRMANN et al., 2007a). Allerdings widerspricht sich auch diesbezüglich die Datenlage. In-vitro-Studien offenbaren eine moderate Stimulation der Osteoblasten-Aktivität durch geringe HCY-Konzentrationen, während hohe HCY-Konzentrationen eher einen toxischen Effekt auf Osteoblasten zu haben scheinen (HERRMANN et al., 2005b). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse ist zu diskutieren, ob eine HHCY über eine Osteoblasten-Hemmung die Frakturheilung beeinträchtigt. Entsprechende histologische, immunhistochemische und proteinbiochemische Analysen des Frakturkallus sind erforderlich, um den Zusammenhang einer HHCY und der Osteoblasten-Aktivität während der Frakturheilung zu untersuchen.

Im Gegensatz zu der massiven HHCY, die durch die Homocystin-supplementierte Diät verursacht wurden, hatten die intermediäre beziehungsweise moderate HHCY, die durch die Methionin-angereicherte beziehungsweise B-Vitamin-defiziente Diät induziert wurden, keinen Einfluss auf die Steifigkeit des Frakturkallus. Herrmann und Kollegen untersuchten 2007 den Effekt einer HHCY auf die Knochenqualität mit biomechanischen und histologischen Methoden an Ratten (HERRMANN et al., 2007b). Die Ergebnisse dieser Studie zeigten zusammengefasst einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Grad der HCY-Serumkonzentration und der Knochenqualität. So führte die Applikation einer Methionin-angereicherten Diät zu einer moderaten HHCY, welche die Knochenqualität nur geringfügig beeinflusste. Im Gegensatz dazu rief die Fütterung einer Homocystin-angereicherten Diät eine deutlich höhere HCY-Serumkonzentration hervor verbunden mit einer massiven Beeinträchtigung der Knochenqualität (HERRMANN et al., 2007b). Somit scheint eine sehr ausgeprägte HHCY den Knochenstoffwechsel des intakten Knochens ebenso wie die Frakturheilung stärker zu beeinflussen, als eine nur mäßig ausgeprägte HHCY. Der fehlende Effekt der Methionin-angereicherten und B-Vitamin-defizienten Diät auf die Frakturheilung in unserer Studie könnte also durch den zu gering ausgeprägten Grad der HHCY in diesen Versuchsgruppen bedingt sein.

Eine weitere aktuelle Studie von Herrmann und Kollegen an Ratten konnte nachweisen, dass HCY gewebsspezifisch im Knochen akkumuliert. Der Knochen-schädigende Einfluss einer HHCY scheint hierbei mit dem Maß der knöchernen Akkumulation von HCY zu korrelieren.

Der Großteil des im Knochen angereicherten HCY ist an Kollagen gebunden (HERRMANN et al., 2009). Andere Studien konnten zeigen, dass HCY über eine Interaktion von Aldehyd-Gruppen an Kollagen bindet und gleichzeitig so die Formierung von stabilen Kollagen-Crosslinks verhindert (KANG, TRELSTAD, 1973). Basierend auf diesen Untersuchungen ist davon auszugehen, dass HCY auch im Rahmen der Frakturheilung an Kollagen bindet und somit in neu gebildetem Knochengewebe akkumuliert. Des Weiteren geben die aufgeführten Studien einen weiteren Hinweis darauf, dass eine HHCY die Frakturheilung über ein gestörtes Kollagen-Crosslinking beeinträchtigen könnte. Weitere proteinbiochemische Analysen sind erforderlich, um die These einer Akkumulation von HCY im Frakturkallus und einer damit assoziierten Störung des Kollagen-Crosslinking zu untersuchen.

5.3 Schlussfolgerungen

1. Das angewandte Tiermodell ist geeignet, um den Effekt einer alimentär induzierten HHCY auf die Knochenbruchheilung an Mäusen zu untersuchen.
2. Die laborchemischen Auswertungen konnten bestätigen, dass die Applikation einer Homocystin-, beziehungsweise einer Methionin-angereicherten Diät sowie einer B-Vitamin-defizienten Diät im Mausmodell eine HHCY hervorruft. Hierbei führte die Homocystin-angereicherte Diät zu einer schweren HHCY, die Methionin-angereicherte Diät zu einer intermediären HHCY und die B-Vitamin-defiziente Diät zu einer moderaten HHCY.
3. Sowohl radiologisch als auch computertomographisch fanden sich in allen Tieren nach vierwöchiger Frakturheilung Zeichen einer kompletten knöchernen Frakturüberbrückung. Es konnten radiologisch und makroskopisch keine Zeichen einer verzögerten oder ausbleibenden Frakturheilung beobachtet werden.
4. Die Methionin-angereicherte und die B-Vitamin-defiziente Diät zeigten keinen Einfluss auf die Steifigkeit des Frakturkallus nach vierwöchiger Frakturheilung.
5. Nach vierwöchiger Frakturheilung ergab die biomechanische Auswertung der Knochen eine signifikant reduzierte Biegesteifigkeit des Frakturkallus in Tieren, die mit einer Homocystin-angereicherten Diät gefüttert wurden.
6. Die hier gewonnenen Ergebnisse korrespondieren mit Daten aus vorangegangenen tierexperimentellen Studien, welche zeigten, dass eine moderate HHCY nur zu einer

geringeren Beeinflussung des Knochenstoffwechsels führt, während eine schwere HCY den Knochenstoffwechsel signifikant beeinträchtigt.

6. Literaturverzeichnis

1. Abrahamsen B, Madsen JS, Tofteng CL, Stilgren L, Bladbjerg EM, Kristensen SR, Brixen K, Mosekilde L (2003) A common methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) polymorphism is associated with low bone mineral density and increased fracture incidence after menopause: longitudinal data from the Danish osteoporosis prevention study. *J Bone Miner Res* 18(4):723-729.
2. Adams DS, Klevjer-Anderson P, Carlson JL, McGuire TC, Gorham JR (1983) Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am J Vet Res* 44(9):1670-1675.
3. Allen RH, Stabler SP, Savage DG, Lindenbaum J (1993) Elevation of 2-methylcitric acid I and II levels in serum, urine, and cerebrospinal fluid of patients with cobalamin deficiency. *Metabolism* 42(8):978-988.
4. Ashhurst DE, Hogg J, Perren SM (1982) A method for making reproducible experimental fractures of the rabbit tibia. *Injury* 14(3):236-242.
5. Auer JA, Goodship A, Arnoczky S, Pearce S, Price J, Claes L, von Rechenberg B, Hofmann-Antenbrinck M, Schneider E, Muller-Terpitz R, Thiele F, Rippe KP, Grainger DW (2007) Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. *BMC Musculoskelet Disord* 8:72.
6. 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(6):1011-1017.
7. Bailey LB (1990) Folate status assessment. *J Nutr* 120 Suppl 11:1508-1511.
8. Bak B, Jensen KS (1992) Standardization of tibial fractures in the rat. *Bone* 13(4):289-295.
9. Banse X, Sims TJ, Bailey AJ (2002) Mechanical properties of adult vertebral cancellous bone: correlation with collagen intermolecular cross-links. *J Bone Miner Res* 17(9):1621-1628.
10. Bender DA (1994) Novel functions of vitamin B6. *Proc Nutr Soc* 53(3):625-630.
11. Bernardo A, McCord M, Troen AM, Allison JD, McDonald MP (2007) Impaired spatial memory in APP-overexpressing mice on a homocysteinemia-inducing diet. *Neurobiol Aging* 28(8):1195-1205.
12. Bhandari M, Guyatt GH, Tong D, Adili A, Shaughnessy SG (2000) Reamed versus nonreamed intramedullary nailing of lower extremity long bone fractures: a systematic overview and meta-analysis. *J Orthop Trauma* 14(1):2-9.
13. Böcker W, Denk H, Heitz PU (2004) *Pathologie*. Urban & Fischer bei Elsevier.

14. Bode MK, Laitinen P, Risteli J, Uusimaa P, Juvonen T (2000) Atherosclerosis, type 1 collagen cross-linking and homocysteine. *Atherosclerosis* 152(2):531-532.
15. Bonnarens F, Einhorn TA (1984) Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 2(1):97-101.
16. Bourque WT, Gross M, Hall BK (1992) A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Lab Anim Sci* 42(4):369-374.
17. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423(6937):337-342.
18. 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(3):331-340.
19. Bucher O, Wartenberg H (1997) *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Huber Verlag, Bern.
20. Burstein AH, Frankel VH (1971) A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech* 4(2):155-158.
21. Cagnacci A, Baldassari F, Rivolta G, Arangino S, Volpe A (2003) Relation of homocysteine, folate, and vitamin B12 to bone mineral density of postmenopausal women. *Bone* 33(6):956-959.
22. Carmel R, Lau KH, Baylink DJ, Saxena S, Singer FR (1988) Cobalamin and osteoblast-specific proteins. *N Engl J Med* 319(2):70-75.
23. Carson NA, Neill DW (1962) Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child* 37:505-513.
24. Cavalca V, Cighetti G, Bamonti F, Loaldi A, Bortone L, Novembrino C, De Franceschi M, Belardinelli R, Guazzi MD (2001) Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. *Clin Chem* 47(5):887-892.
25. Chao EY, Aro HT, Lewallen DG, Kelly PJ (1989) The effect of rigidity on fracture healing in external fixation. *Clin Orthop Relat Res* (241):24-35.
26. Chasan-Taber L, Selhub J, Rosenberg IH, Malinow MR, Terry P, Tishler PV, Willett W, Hennekens CH, Stampfer MJ (1996) A prospective study of folate and vitamin B6 and risk of myocardial infarction in US physicians. *J Am Coll Nutr* 15(2):136-143.
27. 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(1):131-142.
28. Chen P, Poddar R, Tipa EV, Dibello PM, Moravec CD, Robinson K, Green R, Kruger WD, Garrow TA, Jacobsen DW (1999) Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. *Adv Enzyme Regul* 39:93-109.

29. Cheung KM, Kaluarachi K, Andrew G, Lu W, Chan D, Cheah KS (2003) An externally fixed femoral fracture model for mice. *J Orthop Res* 21(4):685-690.
30. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP (1996) S-Adenosylmethionine and methylation. *Faseb J* 10(4):471-480.
31. Claes L, Eckert-Hubner K, Augat P (2002) The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J Orthop Res* 20(5):1099-1105.
32. Clarke R, Grimley Evans J, Schneede J, Nexo E, Bates C, Fletcher A, Prentice A, Johnston C, Ueland PM, Refsum H, Sherliker P, Birks J, Whitlock G, Breeze E, Scott JM (2004) Vitamin B12 and folate deficiency in later life. *Age Ageing* 33(1):34-41.
33. Colnot C, Thompson Z, Miclau T, Werb Z, Helms JA (2003) Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development* 130(17):4123-4133.
34. Critchlow MA, Bland YS, Ashhurst DE (1995) The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit. *Bone* 16(5):521-527.
35. Curtis MJ, Brown PR, Dick JD, Jinnah RH (1995) Contaminated fractures of the tibia: a comparison of treatment modalities in an animal model. *J Orthop Res* 13(2):286-295.
36. Danckwardt-Lilliestrom 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.
37. Daum WJ, Chang SL, Simmons DJ, Webster D, Shoenecker PL (1983) Healing of canine femoral osteotomies. Effects of compression plates versus Eggers' plates. *Clin Orthop Relat Res* (180):291-300.
38. Davy DT, Connolly JF (1982) The biomechanical behavior of healing canine radii and ribs. *J Biomech* 15(4):235-247.
39. De Bree A, Verschuren WM, Blom HJ, Kromhout D (2001) Lifestyle factors and plasma homocysteine concentrations in a general population sample. *Am J Epidemiol* 154(2):150-154.
40. Deal CL (2001) Using bone densitometry to monitor therapy in treating osteoporosis: pros and cons. *Curr Rheumatol Rep* 3(3):233-239.
41. Deibert MC, McLeod BR, Smith SD, Liboff AR (1994) Ion resonance electromagnetic field stimulation of fracture healing in rabbits with a fibular ostectomy. *J Orthop Res* 12(6):878-885.
42. Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stepan J (2000) The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int* 11 Suppl 6:2-17.

43. Desjardins D (1986) Indwelling vascular cannulas for remote blood sampling, infusion, and long-term instrumentation of small laboratory animals. *Methods of Animal Experimentation Vol. VII Part A*:143-194.
44. Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, de Groot LC, Lips P, Smit JH, van Staveren WA (2005) Homocysteine and vitamin B12 status relate to bone turnover markers, broadband ultrasound attenuation, and fractures in healthy elderly people. *J Bone Miner Res* 20(6):921-929.
45. Donnelly JG (2001) Folic acid. *Crit Rev Clin Lab Sci* 38(3):183-223.
46. Drosse I, Volkmer E, Seitz S, Seitz H, Penzkofer R, Zahn K, Matis U, Mutschler W, Augat P, Schieker M (2008) Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective. *Tissue Eng Part C Methods* 14(1):79-88.
47. Durand P, Prost M, Loreau N, Lussier-Cacan S, Blache D (2001) Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Invest* 81(5):645-672.
48. Egger EL, Gottsauner-Wolf F, Palmer J, Aro HT, Chao EY (1993) Effects of axial dynamization on bone healing. *J Trauma* 34(2):185-192.
49. Einhorn TA (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* (355 Suppl):7-21.
50. El-Swefy SE, Ali SI, Asker ME, Mohamed HE (2002) Hyperhomocysteinaemia and cardiovascular risk in female ovariectomized rats: role of folic acid and hormone replacement therapy. *J Pharm Pharmacol* 54(3):391-397.
51. Elmstedt E, Svahn T (1981) Skeletal complications following renal transplantation. *Acta Orthop Scand* 52(3):279-286.
52. Finkelstein JD (1990) Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1(5):228-237.
53. Finkelstein JD (1998) The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 157 Suppl 2:40-44.
54. Finkelstein JD, Martin JJ (1984) Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *J Biol Chem* 259(15):9508-9513.
55. Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, Ueland PM (1993) Homocysteine and other thiols in plasma and urine: automated determination and sample stability. *Clin Chem* 39(2):263-271.
56. Fleisch H (1997) Bisphosphonates: mechanisms of action and clinical use in osteoporosis--an update. *Horm Metab Res* 29(3):145-150.
57. Frantzen F, Faaren AL, Alfheim I, Nordhei AK (1998) Enzyme conversion immunoassay for determining total homocysteine in plasma or serum. *Clin Chem* 44(2):311-316.

58. 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(3):455-464.
59. Garcia P, Holstein JH, Histing T, Burkhardt M, Culemann U, Pizanis A, Wirbel RJ, Pohlemann T, Menger MD (2008) A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: impact of stability on fracture healing. *J Biomech* 41(8):1689-1696.
60. Georgiadis GM, Minster GJ, Moed BR (1990) Effects of dynamization after interlocking tibial nailing: an experimental study in dogs. *J Orthop Trauma* 4(3):323-330.
61. Gerdhem P, Ivaska KK, Isaksson A, Pettersson K, Vaananen HK, Obrant KJ, Akesson K (2007) Associations between homocysteine, bone turnover, BMD, mortality, and fracture risk in elderly women. *J Bone Miner Res* 22(1):127-134.
62. Gerritsen T, Vaughn JG, Waisman HA (1962) The identification of homocystine in the urine. *Biochem Biophys Res Commun* 9:493-496.
63. Gibson JB, Carson NA, Neill DW (1964) Pathological Findings In Homocystinuria. *J Clin Pathol* 17:427-437.
64. Gimsing P, Nexø E (1989) Cobalamin-binding capacity of haptocorrin and transcobalamin: age-correlated reference intervals and values from patients. *Clin Chem* 35(7):1447-1451.
65. Gjesdal CG, Vollset SE, Ueland PM, Refsum H, Drevon CA, Gjessing HK, Tell GS (2006) Plasma total homocysteine level and bone mineral density: the Hordaland Homocysteine Study. *Arch Intern Med* 166(1):88-94.
66. Goerss JB, Kim CH, Atkinson EJ, Eastell R, O'Fallon WM, Melton LJ, 3rd (1992) Risk of fractures in patients with pernicious anemia. *J Bone Miner Res* 7(5):573-579.
67. Golbahar J, Hamidi A, Aminzadeh MA, Omrani GR (2004) Association of plasma folate, plasma total homocysteine, but not methylenetetrahydrofolate reductase C667T polymorphism, with bone mineral density in postmenopausal Iranian women: a cross-sectional study. *Bone* 35(3):760-765.
68. Graham I, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, Palma-Reis RJ, Boers GH, Sheahan RG, Israelsson B, Uiterwaal CS, Meleady R, McMaster D, Verhoef P, Witteman J, Rubba P, Bellet H, Wautrecht JC, de Valk HW, Sales Luis AC, Parrot-Rouland FM, Tan KS, Higgins I, Garcon D, Andria G, et al. (1997) Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA* 277(22):1775-1781.
69. Gurgel B, Ribeiro F, Silva M, Nociti F, Sallum A, Sallum E, Toledo S, Casati MZ (2005) Selective COX-2 inhibitor reduces bone healing in bone defects. *Braz Oral Res* 19(4):312-316.

70. Heckman JD, Boyan BD, Aufdemorte TB, Abbott JT (1991) The use of bone morphogenetic protein in the treatment of non-union in a canine model. *J Bone Joint Surg Am* 73(5):750-764.
71. Heino T, Chagin A, Takigawa M, Savendahl L (2008) Effects of alendronate and pamidronate on cultured rat metatarsal bones: failure to prevent dexamethasone-induced growth retardation. *Bone* 42(4):702-709.
72. 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(8):1714-1720.
73. Herbert WJ, Kristensen F (1986) Laboratory animal techniques for immunology. In: Weir, DM(Ed), *Handbook of experimental immunology* 4 Ed, Volume 4: Applications of immunological methods in biomedical sciences:133.131-133.136.
74. Hernandez CJ, Keaveny TM (2006) A biomechanical perspective on bone quality. *Bone* 39(6):1173-1181.
75. Herrgesell JD (1967) Aspirin poisoning in the cat. *J Am Vet Med Assoc* 151(4):452-455.
76. Herrmann M, Kraenzlin M, Pape G, Sand-Hill M, Herrmann W (2005a) Relation between homocysteine and biochemical bone turnover markers and bone mineral density in peri- and post-menopausal women. *Clin Chem Lab Med* 43(10):1118-1123.
77. Herrmann M, Peter Schmidt J, Umanskaya N, Wagner A, Taban-Shomal O, Widmann T, Colaianni G, Wildemann B, Herrmann W (2007a) The role of hyperhomocysteinemia as well as folate, vitamin B6 and B12 deficiencies in osteoporosis: a systematic review. *Clin Chem Lab Med* 45(12):1621-1632.
78. Herrmann M, Tami A, Wildemann B, Wolny M, Wagner A, Schorr H, Taban-Shomal O, Umanskaya N, Ross S, Garcia P, Hubner U, Herrmann W (2009) Hyperhomocysteinemia induces a tissue specific accumulation of homocysteine in bone by collagen binding and adversely affects bone. *Bone* 44(3):467-475.
79. Herrmann M, Umanskaya N, Wildemann B, Colaianni G, Widmann T, Zallone A, Herrmann W (2008) Stimulation of osteoblast activity by homocysteine. *J Cell Mol Med* 12(4):1205-1210.
80. Herrmann M, Widmann T, Colaianni G, Colucci S, Zallone A, Herrmann W (2005b) Increased osteoclast activity in the presence of increased homocysteine concentrations. *Clin Chem* 51(12):2348-2353.
81. Herrmann M, Widmann T, Herrmann W (2005c) Homocysteine-a newly recognised risk factor for osteoporosis. *Clin Chem Lab Med* 43(10):1111-1117.

82. Herrmann M, Wildemann B, Claes L, Klohs S, Ohnmacht M, Taban-Shomal O, Hubner U, Pexa A, Umanskaya N, Herrmann W (2007b) Experimental hyperhomocysteinemia reduces bone quality in rats. *Clin Chem* 53(8):1455-1461.
83. Herrmann W (2001) The importance of hyperhomocysteinemia as a risk factor for diseases: an overview. *Clin Chem Lab Med* 39(8):666-674.
84. Herrmann W (2005) Hyperhomocysteinämie, B-Vitamin-Mangel und Gefäß-sowie neurodegenerative Erkrankungen; In: Thomas, L (Ed): Labor und Diagnose. Frankfurt/Main, TH Books Verlagsgesellschaft mbH:pp 586-618.
85. Herrmann W, Herrmann M, Obeid R (2007c) Hyperhomocysteinaemia: a critical review of old and new aspects. *Curr Drug Metab* 8(1):17-31.
86. Herrmann W, Quast S, Ullrich M, Schultze H, Bodis M, Geisel J (1999) Hyperhomocysteinemia in high-aged subjects: relation of B-vitamins, folic acid, renal function and the methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Atherosclerosis* 144(1):91-101.
87. Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P (1995) An experimental model for non-union in rats. *Injury* 26(10):681-686.
88. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT (1993) A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res* 11(2):305-312.
89. Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, Gleason MR, Wolf BM, Tanji N, Ferran LJ, Jr., Kohl B, Rao V, Kisiel W, Stern DM, Schmidt AM (2001) Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest* 107(6):675-683.
90. Holstein JH, Garcia P, Histing T, Kristen A, Scheuer C, Menger MD, Pohlemann T (2009a) Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration. *J Orthop Trauma* 23(5 Suppl):31-38.
91. 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(5):1055-1062.
92. Holstein JH, Matthys R, Histing T, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Meier C, Pohlemann T, Menger MD (2009b) Development of a Stable Closed Femoral Fracture Model in Mice. *J Surg Res* 153(1):71-75.
93. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T (2007) Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech* 40(1):215-219.
94. Houdebine LM (2007) Transgenic animal models in biomedical research. *Methods Mol Biol* 360:163-202.
95. Hübschmann HJ (2001) Handbook of GC/MS. Weinheim.

96. Ito H, Akiyama H, Shigeno C, Iyama K, Matsuoka H, Nakamura T (1999) Hedgehog signaling molecules in bone marrow cells at the initial stage of fracture repair. *Biochem Biophys Res Commun* 262(2):443-451.
97. Jacenko O, Olsen BR (1995) Transgenic mouse models in studies of skeletal disorders. *J Rheumatol Suppl* 43:39-41.
98. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R (1996) Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 93(1):7-9.
99. Johnson AL, Stein LE (1988) Morphologic comparison of healing patterns in ethylene oxide-sterilized cortical allografts and untreated cortical autografts in the dog. *Am J Vet Res* 49(1):101-105.
100. 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(3):475-477.
101. Junqueira L, Carneiro J (1996) *Histologie*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York.
102. Kang A, Trelstad R (1973) A collagen defect in homocystinuria. *J Clin Invest* 52(10):2571-2578.
103. 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(3):325-330.
104. Kaspar K, Schell H, Toben D, Matziolis G, Bail HJ (2007) An easily reproducible and biomechanically standardized model to investigate bone healing in rats, using external fixation. *Biomed Tech (Berl)* 52(6):383-390.
105. Kim DJ, Koh JM, Lee O, Kim NJ, Lee YS, Kim YS, Park JY, Lee KU, Kim GS (2006) Homocysteine enhances apoptosis in human bone marrow stromal cells. *Bone* 39(3):582-590.
106. Kim GS, Kim CH, Park JY, Lee KU, Park CS (1996) Effects of vitamin B12 on cell proliferation and cellular alkaline phosphatase activity in human bone marrow stromal osteoprogenitor cells and UMR106 osteoblastic cells. *Metabolism* 45(12):1443-1446.
107. Kim MK, Ordovas JM, Selhub J, Campos H (2003) B vitamins and plasma homocysteine concentrations in an urban and rural area of Costa Rica. *J Am Coll Nutr* 22(3):224-231.
108. Kim YI (1999) Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. *J Nutr Biochem* 10(2):66-88.

109. 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* (318):222-230.
110. Knekt P, Reunanen A, Alfthan G, Heliovaara M, Rissanen H, Marniemi J, Aromaa A (2001) Hyperhomocystinemia: a risk factor or a consequence of coronary heart disease? *Arch Intern Med* 161(13):1589-1594.
111. Koch P, Müller ME, Nazarian S (1990) *The Comprehensive Classification of Fractures of Long Bones*. Springer-Verlag, Berlin.
112. Kolln S, Schottle H, Dallek M, Jungbluth KH (1983) Functional adaptation of the bones. Animal experiment studies on rats. *Unfallchirurgie* 9(3):120-124.
113. Kraus JP, Janosik M, Kozich V, Mandell R, Shih V, Sperandeo MP, Sebastio G, de Franchis R, Andria G, Kluijtmans LA, Blom H, Boers GH, Gordon RB, Kamoun P, Tsai MY, Kruger WD, Koch HG, Ohura T, Gaustadnes M (1999) Cystathionine beta-synthase mutations in homocystinuria. *Hum Mutat* 13(5):362-375.
114. Le AX, Miclau T, Hu D, Helms JA (2001) Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures. *J Orthop Res* 19(1):78-84.
115. Lenchik L, Kiebzak GM, Blunt BA (2002) What is the role of serial bone mineral density measurements in patient management? *J Clin Densitom* 5 Suppl:29-38.
116. Lenehan TM, Balligand M, Nunamaker DM, Wood FE, Jr. (1985) Effect of EHDP on fracture healing in dogs. *J Orthop Res* 3(4):499-507.
117. 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(7):1084-1091.
118. Lienau J, Schell H, Duda GN, Seebeck P, Muchow S, Bail HJ (2005) Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability. *J Orthop Res* 23(3):639-645.
119. Lienau J, Schell H, Epari DR, Schutze N, Jakob F, Duda GN, Bail HJ (2006) CYR61 (CCN1) protein expression during fracture healing in an ovine tibial model and its relation to the mechanical fixation stability. *J Orthop Res* 24(2):254-262.
120. Lind PM, Lind L, Larsson S, Orberg J (2001) Torsional testing and peripheral quantitative computed tomography in rat humerus. *Bone* 29(3):265-270.
121. Löffler G, Petrides P (2003) *Biochemie & Pathobiochemie*. 7. Auflage. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York.
122. Lu C, Hansen E, Sapozhnikova A, Hu D, Miclau T, Marcucio RS (2008) Effect of age on vascularization during fracture repair. *J Orthop Res* 26(10):1384-1389.
123. 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(6):1300-1307.

124. Lubec B, Fang-Kircher S, Lubec T, Blom HJ, Boers GH (1996) Evidence for McKusick's hypothesis of deficient collagen cross-linking in patients with homocystinuria. *Biochim Biophys Acta* 1315(3):159-162.
125. Lumbers M, New SA, Gibson S, Murphy MC (2001) Nutritional status in elderly female hip fracture patients: comparison with an age-matched home living group attending day centres. *Br J Nutr* 85(6):733-740.
126. Manigrasso MB, O'Connor JP (2004) Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma* 18(10):687-695.
127. Matthys R, Perren S (2008) Internal fixation systems for improved genetic and biomechanical studies in mice. 54th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society: San Francisco, CA: Poster No. 1005.
128. McCully KS (2005) Hyperhomocysteinemia and arteriosclerosis: historical perspectives. *Clin Chem Lab Med* 43(10):980-986.
129. McKusick VA (1966) Heritable disorders of connective tissue. St Louis, MO: Mosby CV:155 pp.
130. McLean RR, Jacques PF, Selhub J, Tucker KL, Samelson EJ, Broe KE, Hannan MT, Cupples LA, Kiel DP (2004) Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *N Engl J Med* 350(20):2042-2049.
131. Melhus H, Michaelsson K, Holmberg L, Wolk A, Ljunghall S (1999) Smoking, antioxidant vitamins, and the risk of hip fracture. *J Bone Miner Res* 14(1):129-135.
132. Metz J, Kelly A, Swett V, Waxman S, Herbert V (1968) Deranged DNA synthesis by bone marrow from vitamin B-12-deficient humans. *Br J Haematol* 14 (6):575-592.
133. Morris MS, Jacques PF, Selhub J (2005) Relation between homocysteine and B-vitamin status indicators and bone mineral density in older Americans. *Bone* 37(2):234-242.
134. Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverre F, Laster L (1964) Homocystinuria: An Enzymatic Defect. *Science* 143:1443-1445.
135. Muller J, Schenk R, Willenegger H (1968) Experimental studies on the development of reactive pseudarthroses on the canine radius. *Helv Chir Acta* 35(1):301-308.
136. 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(5):651-659.
137. Nauck M, Bisse E, Nauck M, Wieland H (2001) Pre-analytical conditions affecting the determination of the plasma homocysteine concentration. *Clin Chem Lab Med* 39(8):675-680.
138. Nesbitt SA, Horton MA (1997) Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. *Science* 276(5310):266-269.

139. Newton CD, Zeitlin S (1977) Avian fracture healing. *J Am Vet Med Assoc* 170(6):620-625.
140. Nilsson K, Gustafson L, Isaksson A, Hultberg B (2005) Plasma homocysteine and markers of bone metabolism in psychogeriatric patients. *Scand J Clin Lab Invest* 65(8):671-680.
141. Nomura S, Takano-Yamamoto T (2000) Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol* 19(2):91-96.
142. Nunamaker DM (1998) Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* (355 Suppl):56-65.
143. Nunamaker DM, Perren SM (1979) A radiological and histological analysis of fracture healing using prebending of compression plates. *Clin Orthop Relat Res* (138):167-174.
144. Nunamaker DM, Richardson DW, Butterweck DM (1991) Mechanical and biological effects of plate luting. *J Orthop Trauma* 5(2):138-145.
145. Opolka A, Ratzinger S, Schubert T, Spiegel HU, Grifka J, Bruckner P, Probst A, Grassel S (2007) Collagen IX is indispensable for timely maturation of cartilage during fracture repair in mice. *Matrix Biol* 26(2):85-95.
146. Oxlund H, Barckman M, Ortoft G, Andreassen TT (1995) Reduced concentrations of collagen cross-links are associated with reduced strength of bone. *Bone* 17(4 Suppl):365-371.
147. Ozdem S, Samanci S, Tasatargil A, Yildiz A, Sadan G, Donmez L, Herrmann M (2007) Experimental hyperhomocysteinemia disturbs bone metabolism in rats. *Scand J Clin Lab Invest* 67(7):748-756.
148. Perier MA, Gineyts E, Munoz F, Sornay-Rendu E, Delmas PD (2007) Homocysteine and fracture risk in postmenopausal women: the OFELY study. *Osteoporos Int* 18(10):1329-1336.
149. Perren SM, Huggler A, Russenberger M, Allgower M, Mathys R, Schenk R, Willenegger H, Muller ME (1969) The reaction of cortical bone to compression. *Acta Orthop Scand Suppl* 125:19-29.
150. Peter CP, Cook WO, Nunamaker DM, Provost MT, Sedor JG, Rodan GA (1996) Effect of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs. *J Orthop Res* 14(1):74-79.
151. Pfeiffer CM, Huff DL, Gunter EW (1999a) Comparison of plasma total homocysteine measurements in 14 laboratories: an international study. *Clin Chem* 45(8 Pt1):1261-1268.

152. Pfeiffer CM, Huff DL, Gunter EW (1999b) Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. *Clin Chem* 45(2):290-292.
153. Pilla AA, Mont MA, Nasser PR, Khan SA, Figueiredo M, Kaufman JJ, Siffert RS (1990) Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. *J Orthop Trauma* 4(3):246-253.
154. Puech B, Cameli M, Chancrin JL, Pierre C, Dufour M, Elizagaray A (1990) Biointegration of massive bone allografts: imaging and histological studies in cat. *Biomaterials* 11:75-78.
155. Quere I, Perneger TV, Zittoun J, Bellet H, Gris JC, Daures JP, Schved JF, Mercier E, Laroche JP, Dauzat M, Bounameaux H, Janbon C, de Moerloose P (2002) Red blood cell methylfolate and plasma homocysteine as risk factors for venous thromboembolism: a matched case-control study. *Lancet* 359(9308):747-752.
156. Rasmussen K, Moller J (2000) Total homocysteine measurement in clinical practice. *Ann Clin Biochem* 37 (Pt 5):627-648.
157. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexo E, Clarke R, McPartlin J, Johnston C, Engbaek F, Schneede J, McPartlin C, Scott JM (2004) Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 50(1):3-32.
158. Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J (2006) *Basislehrbuch Innere Medizin*. 3. Auflage. Urban & Fischer bei Elsevier.
159. Reynolds TM, Marshall PD, Brain AM (1992) Hip fracture patients may be vitamin B6 deficient. Controlled study of serum pyridoxal-5'-phosphate. *Acta Orthop Scand* 63(6):635-638.
160. Rhinelander FW (1974) Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* (105):34-81.
161. Richardson DW, Nunamaker DM (1991) Evaluation of plate luting, using an in vivo ovine osteotomy model. *Am J Vet Res* 52(9):1468-1473.
162. Robinson K, Arheart K, Refsum H, Brattstrom L, Boers G, Ueland P, Rubba P, Palma-Reis R, Meleady R, Daly L, Witteman J, Graham I (1998) Low circulating folate and vitamin B6 concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. European COMAC Group. *Circulation* 97(5):437-443.
163. Rogers EJ, Chen S, Chan A (2007) Folate deficiency and plasma homocysteine during increased oxidative stress. *N Engl J Med* 357(4):421-422.
164. Rossant J, Nagy A (1995) Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat Med* 1(6):592-594.
165. Roush JK, Wilson JW (1990) Effects of plate luting on cortical vascularity and development of cortical porosity in canine femurs. *Vet Surg* 19(3):208-214.

166. Russell G, Tucci M, Conflitti J, Graves M, Wingerter S, Woodall J, Jr., Ragab A, Benghuzzi H (2007) Characterization of a femoral segmental nonunion model in laboratory rats: report of a novel surgical technique. *J Invest Surg* 20(4):249-255.
167. Rüter A, Trentz O, Wagner M (2003) *Unfallchirurgie*. Urban & Fischer bei Elsevier.
168. Saito M, Fujii K, Marumo K (2006) Degree of mineralization-related collagen crosslinking in the femoral neck cancellous bone in cases of hip fracture and controls. *Calcif Tissue Int* 79(3):160-168.
169. Sato Y, Honda Y, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K (2005) Effect of folate and mecobalamin on hip fractures in patients with stroke: a randomized controlled trial. *Jama* 293(9):1082-1088.
170. Schemitsch EH, Kowalski MJ, Swiontkowski MF, Harrington RM (1995) Comparison of the effect of reamed and unreamed locked intramedullary nailing on blood flow in the callus and strength of union following fracture of the sheep tibia. *J Orthop Res* 13(3):382-389.
171. Schemitsch EH, Kowalski MJ, Swiontkowski MF, Senft D (1994) Cortical bone blood flow in reamed and unreamed locked intramedullary nailing: a fractured tibia model in sheep. *J Orthop Trauma* 8(5):373-382.
172. Schenk RK, Willenegger HR (1977) Histology of primary bone healing: modifications and limits of recovery of gaps in relation to extent of the defect. *Unfallheilkunde* 80(5):155-160.
173. Schiebler TH, Schmidt W (2003) *Anatomie*. Springer Verlag, Berlin.
174. Schmidmaier G, Wildemann B, Melis B, Krummrey G, Einhorn T, Haas N, Raschke M (2004) Development and characterization of a standard closed tibial fracture model in the rat. *Eur J Trauma* 30:35-42.
175. Schoen M, Rotter R, Schattner S, Mittlmeier T, Claes L, Vollmar B, Gradl G (2007) Introduction of a new interlocked intramedullary nailing device for stabilization of critically sized femoral defects in the rat: A combined biomechanical and animal experimental study. *J Orthop Res* 26(2):184-189.
176. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH (1993) Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *Jama* 270(22):2693-2698.
177. Shane B, Stokstad EL (1985) Vitamin B12-folate interrelationships. *Annu Rev Nutr* 5:115-141.
178. Shimizu H, Kiyohara Y, Kato I, Tanizaki Y, Ueno H, Kimura Y, Iwamoto H, Kubo M, Arima H, Ibayashi S, Fujishima M (2002) Plasma homocyst(e)ine concentrations and the risk of subtypes of cerebral infarction. The Hisayama study. *Cerebrovasc Dis* 1:9-15.

179. Small RE (2005) Uses and limitations of bone mineral density measurements in the management of osteoporosis. *MedGenMed* 7(2):3.
180. Snow CF (1999) Laboratory diagnosis of vitamin B12 and folate deficiency: a guide for the primary care physician. *Arch Intern Med* 159(12):1289-1298.
181. Spaeth GL, Barber GW (1965) Homocystinuria. In a mentally retarded child and her normal cousin. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 69(5):912-930.
182. Stabler SP, Lindenbaum J, Savage DG, Allen RH (1993) Elevation of serum cystathionine levels in patients with cobalamin and folate deficiency. *Blood* 81(12):3404-3413.
183. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J (1988) Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Invest* 81(2):466-474.
184. 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(1):29-39.
185. Stanger O (2002) Physiology of folic acid in health and disease. *Curr Drug Metab* 3(2):211-223.
186. Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, Weger M (2003) DACH-LIGA homocystein (german, austrian and swiss homocysteine society): consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. *Clin Chem Lab Med* 41(11):1392-1403.
187. Steen H, Fjeld TO (1989) Lengthening osteotomy in the metaphysis and diaphysis. An experimental study in the ovine tibia. *Clin Orthop Relat Res* (247):297-305.
188. 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(5):730-735.
189. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH (2002) Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(15):9656-9661.
190. 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(2):173-176.
191. Teitelbaum SL, Ross FP (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4(8):638-649.

192. 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(2):513-518.
193. 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(5):408-418.
194. Troen AM, Chao WH, Crivello NA, D'Anci KE, Shukitt-Hale B, Smith DE, Selhub J, Rosenberg IH (2008) Cognitive impairment in folate-deficient rats corresponds to depleted brain phosphatidylcholine and is prevented by dietary methionine without lowering plasma homocysteine. *J Nutr* 138(12):2502-2509.
195. Troen AM, Lutgens E, Smith DE, Rosenberg IH, Selhub J (2003) The atherogenic effect of excess methionine intake. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(25):15089-15094.
196. Utvag SE, Grundnes O, Reikeras O (1994) Healing of segmental and simple fractures in rats. *Acta Orthop Scand* 65(5):559-563.
197. Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM (2000) The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 113 (Pt 3):377-381.
198. Vaaraniemi J, Halleen JM, Kaarlonen K, Ylipahkala H, Alatalo SL, Andersson G, Kaija H, Vihko P, Vaananen HK (2004) Intracellular machinery for matrix degradation in bone-resorbing osteoclasts. *J Bone Miner Res* 19(9):1432-1440.
199. van Guldener C, Robinson K (2000) Homocysteine and renal disease. *Semin Thromb Hemost* 26(3):313-324.
200. van Guldener C, Stam F, Stehouwer CD (2001) Homocysteine metabolism in renal failure. *Kidney Int Suppl* 78:234-237.
201. van Guldener C, Stam F, Stehouwer CD (2005) Hyperhomocysteinaemia in chronic kidney disease: focus on transmethylation. *Clin Chem Lab Med* 43(10):1026-1031.
202. van Meurs JB, Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, van der Klift M, de Jonge R, Lindemans J, de Groot LC, Hofman A, Witteman JC, van Leeuwen JP, Breteler MM, Lips P, Pols HA, Uitterlinden AG (2004) Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Engl J Med* 350(20):2033-2041.
203. Vasan RS, Beiser A, D'Agostino RB, Levy D, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, Wilson PW (2003) Plasma homocysteine and risk for congestive heart failure in adults without prior myocardial infarction. *JAMA* 289(10):1251-1257.
204. Vashishth D, Gibson GJ, Khoury JI, Schaffler MB, Kimura J, Fyhrie DP (2001) Influence of nonenzymatic glycation on biomechanical properties of cortical bone. *Bone* 28(2):195-201.

205. Villadsen MM, Bunger MH, Carstens M, Stenkjaer L, Langdahl BL (2005) Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism is associated with osteoporotic vertebral fractures, but is a weak predictor of BMD. *Osteoporos Int* 16(4):411-416.
206. Volpon JB (1994) Nonunion using a canine model. *Arch Orthop Trauma Surg* 113(6):312-317.
207. Voutilainen S, Rissanen TH, Virtanen J, Lakka TA, Salonen JT (2001) Low dietary folate intake is associated with an excess incidence of acute coronary events: The Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study. *Circulation* 103(22):2674-2680.
208. Wald DS, Law M, Morris JK (2002) Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 325(7374):1202.
209. Wild D (2005) *The Immunosassay Handbook*. 3. Auflage. Elsevier Science Publishing, Amsterdam, Boston, Oxford.
210. Willie B, Adkins K, Zheng X, Simon U, Claes L (2009) Mechanical characterization of external fixator stiffness for a rat femoral fracture model. *J Orthop Res* 27(5):687-693.
211. Wingerter S, Calvert G, Tucci M, Tsao A, Russell G, Benghuzzi H (2007) Comparison of two different fixation techniques for a segmental defect in a rat femur model. *J Invest Surg* 20(3):149-155.
212. Yamagiwa H, Tokunaga K, Hayami T, Hatano H, Uchida M, Endo N, Takahashi HE (1999) Expression of metalloproteinase-13 (Collagenase-3) is induced during fracture healing in mice. *Bone* 25(2):197-203.
213. Yu HH, Joubran R, Asmi M, Law T, Spencer A, Jouma M, Rifai N (2000) Agreement among four homocysteine assays and results in patients with coronary atherosclerosis and controls. *Clin Chem* 46(2):258-264.
214. Zhou J, Moller J, Danielsen CC, Bentzon J, Ravn HB, Austin RC, Falk E (2001) Dietary supplementation with methionine and homocysteine promotes early atherosclerosis but not plaque rupture in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(9):1470-1476.
215. Zhou J, Moller J, Ritskes-Hoitinga M, Larsen ML, Austin RC, Falk E (2003) Effects of vitamin supplementation and hyperhomocysteinemia on atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 168(2):255-262.
216. Zioupos P, Currey JD, Hamer AJ (1999) The role of collagen in the declining mechanical properties of aging human cortical bone. *J Biomed Mater Res* 45(2):108-116.
217. Zulli A, Hare DL, Buxton BF, Black MJ (2004) High dietary methionine plus cholesterol exacerbates atherosclerosis formation in the left main coronary artery of rabbits. *Atherosclerosis* 176(1):83-89.

7. Publikationen / Danksagung

7.1 Publikationen

Aus der vorgestellten Arbeit ging bis dato folgende Publikation hervor:

Claes L, Schmalenbach J, Herrmann M, Ölkü I, Garcia P, Histing T, Obeid R, Schorr H, Herrmann W, Pohlemann T, Menger MD, Holstein JH. Hyperhomocysteinemia is associated with impaired fracture healing in mice. *Calcif Tissue Int.* 2009 Jun 2. [Epub ahead of print].

Ergebnisse der vorgestellten Arbeit wurden auf folgenden nationalen und internationalen Kongressen vorgestellt:

Holstein JH, Schmalenbach J, Garcia P, Histing T, Herrmann M, Obeid R, Ölkü I, Pohlemann T, Menger MD, Claes L. The effect of a disturbed homocysteine metabolism on bone repair. *Biomechanics and Biology of Bone Healing, International Symposium, Berlin, 15.-17. Mai 2008.*

Holstein JH, Schmalenbach J, Herrmann M, Obeid R, Ölkü I, Garcia P, Histing T, Menger MD, Pohlemann T, Claes L. Methionine-enriched and B vitamin-deficient diet does not affect experimental fracture healing in mice. *International Society for Fracture Repair, 11th Biennial Meeting, South Lake Tahoe, NV, USA, 13.-16. Juli 2008.*

Holstein JH, Herrmann M, Schmalenbach J, Ölkü I, Obeid R, Garcia P, Histing T, Menger MD, Pohlemann T, Claes L. Hyperhomocysteinemia disturbs fracture healing in mice. *Orthopaedic Research Society, 55th Annual Meeting, Las Vegas, NV, USA, 22.-25. Februar 2009.*

7.2 Danksagung

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

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Tim Pohlemann danke ich ganz besonders für die Überlassung des Themas und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten.

Meinem Betreuer Dr. med. Jörg H. Holstein danke ich für seine Freundschaft. Ohne seine Hilfe und Unterstützung wäre die Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen.

Bei Herrn PD Dr. med. Markus Herrmann möchte ich mich für die Idee zum Thema und die stets kompetente Beratung bedanken.

Herrn Professor Dr. med. Michael D. Menger danke ich für das Bereitstellen der Räumlichkeiten und der technischen Hilfsmittel und für die große Hilfe bei der Durchführung meiner Arbeit. Ferner möchte ich mich bei allen Kollegen aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie für das freundliche Arbeitsklima und die erstklassige Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Professor Dr. rer. biol. hum. Lutz E. Claes danke ich ganz besonders für die Bereitstellung der Instrumente zur biomechanischen Testung und der μ CT-Untersuchungen, Herrn Dipl.-Ing. Michael Ohnmacht für die Durchführung der biomechanischen Testungen und seine stete Hilfsbereitschaft.

Frau Dr. med. vet. Monika Frings möchte ich für die große Unterstützung während der Tierversuche danken.

Herrn Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig und Herrn Dr. med. dent. Fuad Al Marrawi danke ich für die große Unterstützung bei der Anfertigung der Röntgenaufnahmen.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Herrmann möchte ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Gerätschaften in seinem Labor sowie die professionelle Hilfe danken. Einen großen Dank schulde ich auch Frau Dr. med. Rima Obeid, Frau Dr. med. Heike Schorr und Frau Marga Sand-Hill für die tatkräftige Hilfe bei den laborchemischen Analysen.

Meinen Eltern danke ich für Ihre Liebe und Unterstützung.