

AUS DER KLINIK FÜR UNFALL-, HAND-, UND
WIEDERHERSTELLUNGSSCHIRURGIE
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. T. Pohlemann

Einfluss der mechanischen Stabilität auf den Frakturheilungsprozess im adulten und geriatrischen Mausmodell

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2018*

Vorgelegt von: Koen Heerschop
geboren am 23.07.1989 in Sneek

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

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Jahr der Promotion: 2018

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung

- 1.1. Deutsche Zusammenfassung
- 1.2. Summary

2. Einleitung

- 2.1. Knochengewebe
 - 2.1.1. Morphologie
 - 2.1.2. Histologie
- 2.2. Frakturheilung
 - 2.2.1. Primäre Frakturheilung
 - 2.2.2. Sekundäre Frakturheilung
- 2.3. Marker der Knochenregeneration
 - 2.3.1. Bone morphogenetic protein
 - 2.3.2. Cystein rich Protein 61
 - 2.3.3. Kollagene
 - 2.3.4. Receptor Activator of NF- κ B Ligand
 - 2.3.5. Osteoprotegerin
 - 2.3.6. Vascular endothelial growth factor
- 2.4. Biomechanik und Frakturheilung
- 2.5. Frakturheilung im Alter
- 2.6. Fragestellung und Zielsetzung

3. Material und Methoden

- 3.1. Versuchsprotokoll
 - 3.1.1. Tiermodell
 - 3.1.2. Operationsverfahren
 - 3.1.3. Peri- und postoperative Analgesie
 - 3.1.4. Tötung
 - 3.1.5. Femurexplantation
- 3.2. Auswertung
 - 3.2.1. Radiologische Analyse
 - 3.2.2. Biomechanische Analyse
 - 3.2.3. Histologische Analyse
 - 3.2.3.1. Anfertigung der histologischen Präparate
 - 3.2.3.2. Histomorphometrie
 - 3.2.4. Western Blot
- 3.3. Statistische Analyse

4. Ergebnisse

4.1. Adulte Mäuse

4.1.1. Postoperativer Verlauf

4.1.2. Makroskopie

4.1.3. Radiologie

4.1.4. Biomechanik

4.1.5. Histologie

4.1.6. Western Blot

4.2. Geriatrische Mäuse

4.2.1. Postoperativer Verlauf

4.2.2. Makroskopie

4.2.3. Radiologie

4.2.4. Biomechanik

4.2.5. Histologie

4.2.6. Western Blot

5. Diskussion

5.1. Diskussion der Methoden

5.2. Diskussion der Ergebnisse

5.2.1. Einfluss der Stabilität in der adulten Maus

5.2.2. Einfluss der Stabilität in der geriatrischen Maus

5.3. Schlussfolgerungen

6. Literaturverzeichnis

7. Publikationen

8. Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
Ø	Durchmesser
µm	Mikrometer
µg	Mikrogramm
Abb.	Abbildung
BDm	Femurdurchmesser
BMP	Bone morphogenetic protein
BMU	Basic multicellular unit
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAr	periostale Kallusfläche
Col	Kollagen
CYR	Cystein rich protein
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
et al.	et alteri
G	Gauge
g	Gramm
gli3	Glioma-associated oncogene family zinc finger protein 3
IHH	Indian hedgehog protein
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kV	Kilovolt

mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
MSCs	Mesenchymale Stammzellen
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid
OD	Optische Dichte
OPG	Osteoprotegerin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RANK	Receptor activator of NF- κ B
RANKL	Receptor activator of NF- κ B ligand
SEM	Standard error of the mean
Tab.	Tabelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

1. Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Obwohl viele definierte Frakturmodelle für die Maus existieren, werden die Mechanismen der Knochenheilung in verschiedenen Studien noch ohne Frakturstabilisierung analysiert. Da es wenig Informationen darüber gibt, inwieweit dies den Heilungsprozess beeinflusst, wurde in dieser Arbeit die Frakturheilung bei nicht stabilisierten Femurfrakturen im Vergleich zu stabilisierten Femurfrakturen sowohl bei adulten als auch bei geriatrischen Mäusen untersucht.

Bei den adulten Mäusen wurden bei einundzwanzig Tieren die diaphysäre Fraktur des Femurs mit einer intramedullären Schraube stabilisiert, die Mikrobewegungen und somit eine enchondrale Heilung ermöglicht. Bei weiteren zweiundzwanzig Mäusen wurden die Femurfrakturen nicht stabilisiert. In der geriatrischen Gruppe wurde das Femur bei dreiundzwanzig 18 Monate alten Mäusen ebenfalls mit einer intramedullären Schraube stabilisiert. In weiteren dreiundzwanzig 18 Monate alten Mäusen wurden die Femurfrakturen nicht stabilisiert. In beiden Gruppen wurde die Knochenheilung mittels radiologischer, biomechanischer, histomorphometrischer und proteinbiochemischer Analyse untersucht.

Bei den adulten Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass in der nicht stabilisierten Gruppe die biomechanische Steifigkeit im Vergleich zu der stabilisierten Gruppe signifikant vermindert war. In der Frühphase der Frakturheilung zeigte sich bei den nicht stabilisierten Femurfrakturen ein signifikant geringerer Anteil an Knochengewebe sowie ein höherer Anteil an Knorpelgewebe im Kallus. Während der späten Phase der Frakturheilung zeigte sich sowohl bei den nicht stabilisierten als auch bei den stabilisierten Frakturen ein nahezu hundertprozentiger Anteil an knöchernem Gewebe im Kallus.

Während sich bei den stabilisierten Frakturen jedoch ein nahezu abgeschlossenes Remodeling mit lamellärem Knochengewebe zeigte, war in der nicht stabilisierten Gruppe größtenteils noch Geflechtknochen nachweisbar. Dies spricht für einen verzögerten Remodelingprozess in der nicht stabilisierten Gruppe.

Interessanterweise zeigten die Western-Blot-Analysen des Kallusgewebes der nicht stabilisierten Gruppe eine signifikant verminderte Expression des vascular endothelial growth factors (VEGF) sowie eine leicht erniedrigte Expression des bone morphogenetic proteins 2 (BMP-2) und Kollagen 10 (Col-10).

Bei den geriatrischen Mäusen zeigte sich in der Gruppe der nicht stabilisierten Femurfrakturen sowohl zwei als auch fünf Wochen postoperativ ein im Vergleich zu den

stabilisierten Femurfrakturen signifikant größeres Kallusvolumen mit einem signifikant geringeren Anteil an Knochengewebe bei erhöhtem Knorpelanteil im Kallus. Dies ging mit einer signifikant niedrigeren biomechanischen Steifigkeit zum Zeitpunkt der frühen Heilungsphase einher. Während der späten Phase der Frakturheilung wiesen jedoch sowohl die nicht stabilisierten als auch die stabilisierten Frakturen eine verminderte biomechanische Steifigkeit von etwa 40 Prozent auf. Die Western-Blot-Analysen des Kallusgewebes zeigten, dass sich die Expression der angiogenen, osteogenen und chondrogenen Marker in beiden Gruppen nicht signifikant unterschieden.

Sowohl bei den adulten als auch bei den geriatrischen Mäusen zeigte sich bei den Tieren ohne Frakturstabilisierung eine Beeinträchtigung der Knochenheilung und ein verzögertes Remodeling. Interessanterweise war dies bei den geriatrischen Mäusen nicht durch eine veränderte Proteinexpression im Kallus verursacht, sondern war eher durch die exzessiven interfragmentären Bewegungen im Frakturspalt bedingt. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass nicht stabilisierte Frakturmodelle heutzutage aufgrund der deutlichen Beeinflussung der Frakturheilung in Tierstudien nicht mehr verwendet werden sollten.

1.2 Summary

Although a variety of suitable fracture models for mice exists, in many studies bone healing was still analyzed without fracture stabilization. Because there is little information whether the healing of non-stabilized fractures differs from that of stabilized fractures, we herein studied the healing process of non-stabilized compared to stabilized femur fractures in adult and geriatric mice.

For the adult study group twenty-one CD-1 mice were stabilized after midshaft fracture of the femur with an intramedullary screw allowing micromovements and endochondral healing. In another twentytwo mice the femur fractures were left unstabilized. For the geriatric study group twenty-three 18-months old CD-1 mice were stabilized after midshaft fracture of the femur with an intramedullary screw. In another twenty-three 18-months old mice the femur fractures were left unstabilized. In both groups bone healing was studied by radiological, biomechanical, histomorphometric and protein expression analyses.

In adult mice non-stabilized femur fractures revealed a significantly lower biomechanical stiffness compared to stabilized fractures. During the early phase of fracture healing non-stabilized fractures demonstrated a significantly lower amount of osseous tissue and a higher amount of cartilage tissue. During the late phase of fracture healing both non-stabilized and stabilized fractures showed almost 100 percent osseous callus tissue. However, in stabilized

fractures remodeling was almost completed with lamellar bone while non-stabilized fractures still showed large callus with great amounts of woven bone, indicating a delay in bone remodeling. Of interest, Western blot analyses of callus tissue in non-stabilized fractures demonstrated a significantly reduced expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and a slightly lowered expression of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and collagen 10 (Col-10).

In geriatric mice after 2 and 5 weeks of healing the callus of non-stabilized fractures compared to stabilized fractures was significantly larger, containing a significantly smaller amount of osseous tissue and a higher amount of cartilaginous tissue. This was associated with a significantly lower biomechanical stiffness during the early phase of healing. However, during the late phase of fracture healing both non-stabilized and stabilized fractures showed a biomechanical stiffness of approximately 40 percent. Of interest, Western blot analyses of callus tissue demonstrated that the expression of proteins related to angiogenesis, bone formation and remodeling did not differ between non-stabilized and stabilized fractures.

In adult as well in aged geriatric mice, non-stabilized fractures show delayed healing and remodeling. Of interest, in geriatric mice this is not caused by an altered protein expression in the callus but rather by the excessive interfragmentary movements. In conclusion, non-stabilized fracture models may not be used to analyze the mechanisms of normal bone healing.

2. Einleitung

2.1 Knochengewebe

2.1.1 Morphologie

Makroskopisch lassen sich grundsätzlich drei Knochentypen differenzieren: die Ossa longa, brevia und plana. Für tierexperimentelle Frakturmodelle und biomechanische Messungen eignen sich insbesondere Röhrenknochen, die aus der Epiphyse, Metaphyse und Diaphyse bestehen (Abb. 1). In der hier vorliegenden Arbeit wurde das Mausfemur verwendet. Hinsichtlich der makroskopischen Anatomie unterscheidet sich das Mausfemur nicht wesentlich vom humanen Femur [Bab et al., 2007].

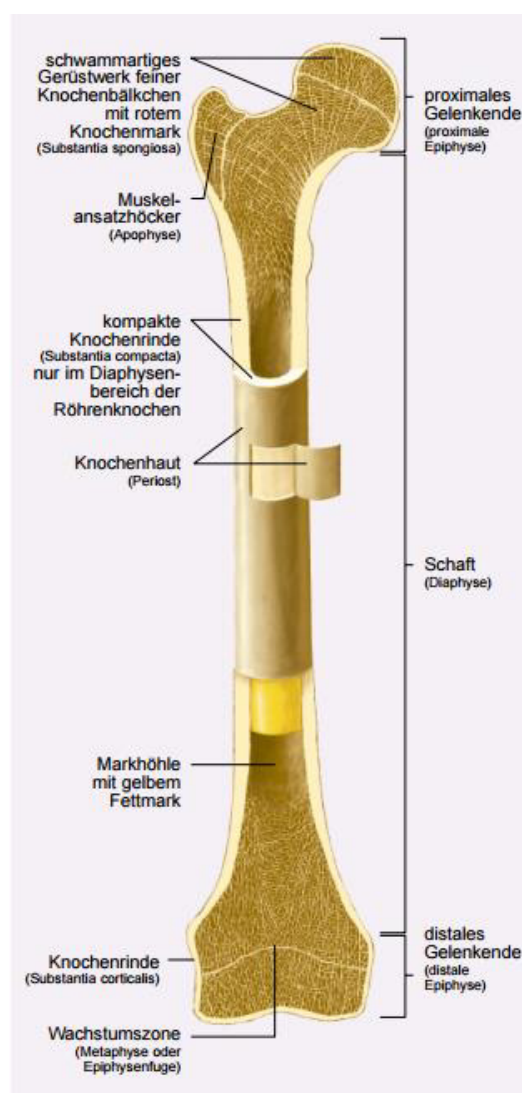


Abb. 1: Bau eines Röhrenknochens am Beispiel des humanen Oberschenkelknochens [Trebsdorf 2002]

2.1.2 Histologie

Das Knochengewebe setzt sich aus der Knochengrundsubstanz, den Knochenzellen, den Knochenhüllen und dem Knochenmark zusammen.

Die Knochengrundsubstanz oder -matrix besteht aus der organischen und anorganischen Substanz. Den Großteil der organischen Substanz bilden die Kollagene, jedoch finden sich auch andere Glycoproteine und Proteoglykane.

Der anorganische Teil der Matrix besteht hauptsächlich aus der Phosphatverbindung Hydroxylapatit. Diese lagert sich in ihrer kristallinen Form an die Kollagenfibrillen an und sorgt so für die charakteristische Festigkeit des Knochengewebes. Zudem finden sich Ionen wie Magnesium, Fluorid oder auch Calciumcarbonat [Junqueira et al., 2006].

Bei den Knochenzellen wird zwischen Osteoprogenitorzellen, Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten unterschieden, die sich jeweils in unterschiedlichen Bereichen des Knochens befinden und unterschiedliche Aufgaben erfüllen.

Die im Peri- und Endost sowie entlang der Havers-Kanäle lokalisierten Vorläuferzellen sind mesenchymalen Ursprungs und differenzieren sich bei entsprechender Stimulation z.B. in Osteoblasten [Junqueira et al., 2006]. Dementsprechend befinden sich die Osteoblasten ebenfalls stets auf den freien Oberflächen der Knochenhüllen. Durch Synthese neuer Knochengrundsubstanz mittels Enzyme, beispielsweise der alkalischen Phosphatase, steuern sie die Mineralisation des Osteoids.

Nach vollständiger Einmauerung eines Osteoblasten in die neugebildete Knochengrundsubstanz erfolgt die weitere Differenzierung der Zelle in einen Osteozyten [Junqueira et al., 2006]. Letztere liegen dann zwischen zwei Knochenlamellen in den Lakunen, wobei ihre Fortsätze in die benachbarten Lamellen ziehen.

Im Gegensatz zu den übrigen Knochenzellen sind die Osteoklasten durch Fusion von Monozyten entstandene mehrkernige Fresszellen und damit hämatopoetischen Ursprungs. Sie finden sich an der Knochenoberfläche in den sogenannten Howship-Lakunen und dienen dem Knochenab- und -umbau [Junqueira et al., 2006].

Die Knochenhüllen lassen sich in Peri- und Endost unterscheiden. Sie überziehen alle äußeren und inneren Knochenoberflächen mit Ausnahme der mit Knorpel oder Synovialmembran bedeckten Gelenke.

Das die äußere Knochenoberfläche überziehende Periost lässt sich dabei in zwei Schichten unterteilen. Das außen gelegene Stratum fibrosum stellt eine bindegewebige Schicht dar. Von ihr strahlen Kollagenfaserbündel, die sogenannten Sharpey-Fasern, in die Kortikalis ein

und sind mit dieser teils fest, teils locker verbunden. Die Ansätze der Sehnen und Bänder strahlen ihrerseits mit ihren Kollagenfasern in das Stratum fibrosum ein [Schiebler und Korf, 2007].

Das innere Stratum osteogenicum enthält kleine Gefäße und Kapillaren. Über sie erfolgt die Versorgung der Volkmann- und Havers-Kanäle und somit die Blutversorgung der Kompakta. Die sensiblen Nervenfasern des Stratum osteogenicums vermitteln das Schmerzempfinden im Bereich des Periosts. Zusätzlich trägt das Stratum osteogenicum insbesondere bei Frakturen zur Knochenneubildung bei und enthält sowohl Osteoprogenitorzellen als auch Osteoblasten und Osteoklasten [Schiebler und Korf, 2007].

Das Endost kleidet die innenliegenden Knochenoberflächen aus, beispielsweise die Spongiosatrabekel oder auch die Havers-Kanäle. Es ist eine nicht mineralisierte Kollagenschicht und enthält ebenfalls Knochenzellen.

Das Knochenmark lässt sich makroskopisch in rotes und gelbes Mark unterscheiden. Es befindet sich in den von Trabekelwerk durchsetzten Markräumen. Das rote Mark dient ab der Fetalzeit der Hämatopoese, wird jedoch in den langen Röhrenknochen bereits im Kleinkindalter sukzessive durch gelbes Fettmark ersetzt. Eine quantitativ relevante Blutbildung findet im Erwachsenenalter nur in den kurzen und platten Knochen, wie beispielsweise dem Sternum oder Beckenkamm, statt.

Grundsätzlich lassen sich zwei Reifegrade des Knochens unterscheiden, Geflechtknochen und Lamellenknochen. Im Zuge der embryonalen Entwicklung oder im Rahmen der Frakturheilung entsteht dabei primär immer Geflechtknochen, der sich erst sekundär im Verlauf zu Lamellenknochen organisiert. Der unreife Geflechtknochen ist durch eine desorganisierte Extrazellulärmatrix charakterisiert. Die Kollagenfaserbündel verlaufen dabei unregelmäßig in der Grundsubstanz. Zudem ist die Mineralisation noch nicht abgeschlossen und der Knochen weist daher noch einen höheren Wassergehalt bei größerem Zellreichtum auf. Auch die Gefäßversorgung erfolgt im Unterschied zu Lamellenknochen noch ungeordnet. Das Wachstum erfolgt entlang der Kapillaren [Junqueira et al., 2006].

Während die Grundbausteine des Lamellenknochens die selben sind, unterscheidet er sich erheblich durch seine histologische Organisation. Zentral dominiert dabei die Substantia spongiosa. Sie stellt ein schwammartiges Geflecht dünner Knochenbälkchen, den sogenannten Trabekeln, dar. Diese richten sich belastungsabhängig in ständigen Umbauprozessen nach den Zug- und Druckkräften aus. Die Randbereiche des Lamellenknochens bestehen hauptsächlich aus der Substantia compacta. Sie bildet die homogene und massive Rindenschicht des Lamellenknochens, die sich aus den Osteonen, Schalt- und Generallamellen zusammensetzt. Die Osteone stellen eine funktionelle Einheit

aus 2-3 μm starken und konzentrisch um einen zentralen Havers-Kanal angeordneten Speziallamellen dar. Die äußere Begrenzung eines Osteons stellt die sogenannte Kittlinie dar. Schaltlamellen hingegen bilden, als Reste alter partiell abgebauter Havers-Systeme, die Trennschicht zwischen den Osteonen. Der Abgrenzung der Kompakta dienen die inneren und äußeren Generallamellen, wobei erstere die Grenzschicht zur Spongiosa darstellt und letztere die Begrenzung zum Periost hin bildet [Junqueira et al., 2006].

Die Blutversorgung des Lamellenknochens ist durch die strikte Ordnung mit Havers- und Volkmann-Gefäßen vorgegeben (Abb. 2). Letztere befinden sich in den vom Periost entspringenden gleichnamigen Kanälen und laufen im rechten Winkel auf die zentral im Osteon gelegenen Havers-Kanäle zu. Die Volkmann-Gefäße werden wiederum von den Vasa nutriticia gespeist, die durch die gleichnamigen Foramina von außen in das Periost eintreten.

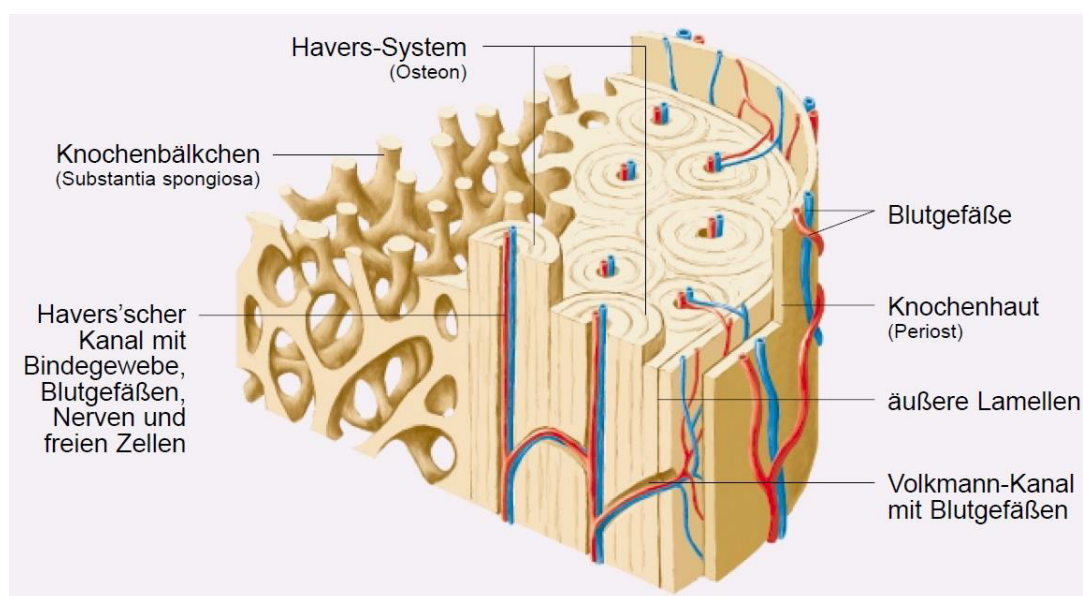


Abb. 2: Schematischer Aufbau eines Lamellenknochens [Trebsdorf, 2002]

2.2 Frakturheilung

Grundsätzlich lassen sich bei der Frakturheilung zwei verschiedene Regenerationsmechanismen unterscheiden: die primäre Frakturheilung, auch direkte Frakturheilung genannt, sowie die sekundäre Frakturheilung mittels enchondraler Ossifikation. Welcher Mechanismus überwiegt, hängt maßgeblich von Art und Qualität der Versorgungstechnik, der Stabilität der Knochenfragmente im Frakturspalt sowie der Komplexität und Lokalisation der Fraktur ab.

2.2.1 Primäre Frakturheilung

Kennzeichnend für die primäre Knochenheilung ist das Fehlen von Kallusgewebe sowie Bindegewebe oder Knorpel im Frakturspalt. Essenziell für eine primäre Frakturheilung sind sowohl eine exakte anatomische Reposition der Fraktur mit direktem Knochenkontakt oder nur wenigen Millimeter großem Frakturspalt als auch eine adäquate Ruhigstellung, wie z.B. durch Osteosyntheseverfahren mit rigider Fixierung, sowie eine ausreichende Gefäßversorgung [Braun et al., 1996; Rhinelander, 1974]. Die primäre Frakturheilung lässt sich je nach Weite des Frakturspalts in Kontaktheilung und Spaltheilung differenzieren.

Bei Vorliegen direkten Knochenkontakts oder einem Abstand zwischen den beiden Frakturenden von weniger als 0,2 mm kommt es zur Kontaktheilung [Rueter et al, 2004]. Die Regeneration erfolgt über longitudinal gerichtete Osteone. Zunächst wird dabei durch kegelförmig angeordnete Osteoklasten ein Resorptionskanal in die Kortikalis des benachbarten Fragments gebohrt. Konsekutiv wandern Kapillare und Osteoprogenitorzellen in den Kanal ein. Letztere differenzieren sich zu Osteoblasten und füllen den Resorptionskanal mit neuem lamellären Knochen. Die so entstehenden Osteone sorgen für eine Durchbauung des Frakturspalts [Braun et al, 1996].

Die Spaltheilung erfolgt bei Abständen größer 0,2 mm und verläuft in zwei Phasen. Zunächst sprießen Kapillaren aus Peri- und Endost in den interfragmentären Spalt ein. Ihnen folgen Osteoprogenitorzellen, die sich differenzieren und als Osteoblasten innerhalb von drei bis vier Wochen ein Konglomerat aus Geflechtknochen bilden. Anschließend wird dieser Knochen in Lamellenknochen umgewandelt, der sich parallel zur Achse der Kortikalis ausrichtet [Rueter et al., 2004].

In der Praxis treten selbst bei sorgfältiger Reposition und interner Fixation einer Fraktur stets sowohl direkte Kontaktzonen als auch Spalträume unterschiedlicher Größe auf. Dies hat zur Folge, dass zumeist beide Modifikationen der primären Knochenheilung parallel auftreten.

2.2.2 Sekundäre Frakturheilung

Bei konservativer Versorgung oder operativer Versorgung mit geringer Stabilität und ohne adäquater Reposition im Bereich des Frakturspalts kommt es zur sekundären Knochenregeneration. Die Mehrheit der Frakturen heilt sekundär [Einhorn, 1998]. Auch bei operativer Stabilisation mittels intramedullärem Marknagel findet eine sekundäre Frakturheilung statt [Beckmann et al., 2014]. Die indirekte Knochenregeneration ist durch sowohl periostale als auch endostale und interfragmentäre Kallusbildung charakterisiert [Einhorn, 1998]. Im Laufe der einzelnen Heilungsstadien setzt sich das Kallusgewebe in

unterschiedlichem Ausmaß aus Knochen-, Knorpel und Bindegewebe zusammen, wodurch sich konsekutiv auch eine Änderung der mechanischen Stabilität ergibt [Marsell und Einhorn, 2011].

Die sekundäre Knochenregeneration lässt sich in fünf Phasen untergliedern, wobei diese nicht strikt voneinander getrennt werden können und partiell überlappend stattfinden [Braun et al., 1996]:

- Frakturphase und Hämatombildung
- Entzündungsphase
- Granulationsphase
- Phase der Kallushärtung
- Umbauphase

Die nur sehr kurze Frakturphase beginnt mit dem ursächlichen Trauma sowie dessen Auswirkung auf Knochen und umliegendes Weichteilgewebe. Sie endet, wenn die gesamte kinetische Energie durch die Verletzung und Frakturierung an das Gewebe abgegeben wurde. Abhängig von Art und Lokalisation des Traumas kommt es zur Schädigung des Weichteilmantels sowie von Periost, Kortikalis, Spongiosa und Knochenmark. Dabei werden Ausmaß, Gestalt und Art der Fraktur bestimmt [Braun et al., 1996]. Durch die Ruptur von Blutgefäßen sowie der Verletzung des Intramedullärraumes kommt es im Anschluss rasch zur Hämatombildung [Rueter et al., 2004; Marsell und Einhorn, 2011].

Aus dem entstandenen Hämatom freigesetzte Wachstumsfaktoren sowie eingewanderte Entzündungszellen, darunter Makrophagen, Granulozyten und Monozyten, leiten den Beginn der Entzündungsphase ein [Beckmann et al., 2014]. Der Höhepunkt der Entzündungsreaktion wird nach etwa 24 Stunden erreicht und hält bis zum siebten Tag nach dem Trauma an [Beckmann et al., 2014].

Proinflammatorische Mediatoren wie Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interleukin (IL) 1, IL-6, IL-11 und IL-18 regulieren die Entzündung [Gerstenfeld et al., 2003]. Eine Schlüsselrolle spielen dabei wohl IL-1 und IL-6 [Marsell und Einhorn, 2011, Huang et al., 2017]. Das Akute-Phase-Protein IL-6 stimuliert mittels des vascular endothelial growth factors (VEGF) die Angiogenese [Cohen et al., 1996] sowie die Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten [Yang et al., 2007].

Eine Besonderheit stellt die erhöhte Perfusion des Frakturbereichs während der Entzündungsphase dar. Die Versorgung der Kortikalis des gesunden Knochens erfolgt zentrifugal, also größtenteils aus den Markraumgefäßen. Bei Vorliegen einer Fraktur wird die Blutversorgung in erster Linie über die periostalen Gefäße gewährleistet.

Neben der Blutversorgung spielen in dieser Phase auch mesenchymale Stammzellen (MSCs), die sich im Verlauf zu Osteoblasten differenzieren, eine wichtige Rolle. So konnte im Mausmodell durch intravenöse (i.v.) Gabe von MSCs eine Beschleunigung des Heilungsprozesses gezeigt werden [Obermeyer et al., 2012]. Zudem besitzen sie ein immunmodulatorisches Potenzial [Iyer und Rojas, 2008]. Prinzipiell ist ein Ursprung der MSCs sowohl aus dem Weichteilgewebe als auch dem Knochenmark sowie dem Periost oder dem Blutsystem möglich [Corselli et al., 2010].

Etwa 2-3 Tage nach dem Frakturereignis klingt die Entzündungsphase ab und geht in die Granulationsphase über. Das Hämatom wird dabei durch ein fibrinreiches Infiltrationsgewebe aus einwandernden Lymphozyten, Fibroblasten, Kapillaren sowie Kollagen ersetzt und daher auch als Phase des weichen Kallus bezeichnet. Dieser überbrückt den Frakturspalt in Form einer Kallusmanschette, besitzt jedoch nur eine geringe Biegesteifigkeit [Marsell und Einhorn, 2011]. Die Rigidität steigt dabei mit zunehmendem Manschettendurchmesser [Perren, 1992].

In dieser Phase zeigen sich bereits erste Mineraldepots innerhalb der Kollagenfibrillen. Das noch weiche Granulationsgewebe wird im Verlauf zu einem knorpeligen Kallus umgebaut und dadurch mechanisch stabiler. Zunächst beginnen Makrophagen mit dem Abbau von Fibrinfäden, parallel wird nekrotisches Knochenmaterial von Osteoklasten abgebaut [Remedios, 1999]. Die Vaskularisation des Kallusgewebes schreitet weiter voran und die Hyperperfusion erreicht in der zweiten Woche nach dem Frakturereignis ihr Maximum [Braun et al., 1996; Rueter et al., 2004].

Aus den eingewanderten MSCs beginnen sich nun Chondro- und Osteoblasten zu differenzieren. Subperiostal findet dabei mittels Osteoblasten der Cambiumschicht des Periosts bereits eine primäre Ossifikation ohne knorpelige Vorstufe statt, wodurch ein Gerüst aus Geflechtknochen entsteht [Rueter et al., 2004]. Die Chondrozyten beginnen mit der Synthese der extrazellulären Matrix und durchbauen den Frakturspalt.

Der vorwiegende Kollagen-Typ ist dabei das von den Knorpelzellen hergestellte Kollagen 2 [Einhorn, 1998]. Auch die bone morphogenetic proteins (BMPs) 2, 4, 5 und 6 werden während dieses Abschnitts vermehrt exprimiert [Al-Aql et al., 2008]. So konnte z.B. in einem Frakturmodell mit BMP-2-Knock-Out-Mäusen eine verzögerte Knorpel- und Knochenbildung mit verminderter Rigidität nachgewiesen werden [Mi et al., 2013]. Nach etwa 3-4 Wochen ist beim Menschen die Bildung des weichen Kallus abgeschlossen [Rueter et al., 2003]. Im Mausmodell dauert dieser Vorgang nur etwa 10-14 Tage [Manigrasso und O'Connor, 2004]. Einhorn beschreibt das Maximum der Bildung des knorpeligen Kallus zwischen 7-9 Tagen nach dem Trauma [Einhorn, 1998].

Im nächsten Schritt wird der weiche Kallus zunehmend mineralisiert und im Verlauf vollständig durch Geflechtknochen ersetzt. Zur Mineralisation wird Kalzium benötigt. Dieses wird von hypertrophierten Chondrozyten bereitgestellt, welche auch vermehrt VEGF exprimieren und dadurch die Neoangiogenese beschleunigen [Weiss et al., 2009].

Durch den erhöhten Blutfluss steigt im Kallusgewebe auch der Sauerstoffpartialdruck an. Dieser begünstigt auch die Differenzierung der MSCs [Hirao et al., 2006]. Bei den in der mineralisierten Matrix verbliebenen Knorpelzellen wird die Apoptose eingeleitet [Einhorn, 1998]. Gleichzeitig sorgt der mineralisierte Kallus für eine erhöhte mechanische Belastbarkeit im Frakturbereich, welche ihrerseits wiederum das Einsprießen neuer Gefäße zur Überbrückung des Frakturspalts begünstigt. Letztere leiten den Beginn der enchondralen Ossifikation ein.

Eingewanderte Chondro- und Osteoklasten resorbieren das Knorpelgewebe während Osteoblasten mit der Synthese von Geflechtknochen beginnen [Probst et al., 1997]. Die in diesem Rahmen gebildeten Trabekel orientieren sich im Gegensatz zum reifen Lamellenknochen in ihrer Lage jedoch nicht anhand der mechanischen Belastung, sondern anhand der nutritiven Kapillaren. Somit ist das entstandene Knochengewebe in seiner Rigidität noch eingeschränkt [Klaushofer und Peterlik, 1994].

In der Umbauphase wird die Knochenregeneration abgeschlossen und in einem langen Remodelingsprozess die vollständige mechanische Integrität wiederhergestellt. Das Remodeling erfolgt durch sogenannte „basic multicellular units“ (BMUs). Sie bestehen aus Osteoblasten, Osteoklasten, Interzellulärschubstanz und Kapillaren. Während die Osteoklasten Geflechtknochen abbauen kommt es zum Einsprießen neuer Kapillare in diese Lücken. Die begleitenden Osteoblasten lagern dort nun Lamellenknochen ein, womit neue Osteone entstehen, die sich longitudinal entlang der Trajektorien ausrichten und dem frakturierten Knochen somit letztlich die ursprüngliche Form zurückgeben [Braun et al., 1996; Rueter et al., 2004].

2.3 Marker der Knochenregeneration

Der Knochenmetabolismus wird durch diverse Wachstumsfaktoren gesteuert. In dieser Arbeit wurden mittels Western-Blot-Analyse BMP 2 und 4, Kollagen 2 und 10, Cystein rich Protein 61 (CYR61), VEGF, Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) und Osteoprotegerin (OPG) bestimmt.

2.3.1 Bone Morphogenetic Protein

Bereits 1965 erfolgte die Erstbeschreibung der BMPs durch Urist [Urist, 1965]. Sie spielen während der Knochenregeneration eine zentrale Rolle. Eine erhöhte Expression von BMP-2, -4, -5 und 6 konnte im Tiermodell im knorpeligen Kallus nachgewiesen werden [Al-Aql et al., 2008]. In Studien mit genmanipulierten Mäusen konnte durch ein Knock-Out von BMP-2 in Chondrozyten eine im Vergleich zu Kontrolltieren verspätete Ossifikation nachgewiesen werden [Mi et al., 2013].

Auch frühere Arbeiten konnten bereits die Induzierung der Ossifikation durch BMP-2 nachweisen [Chen et al., 1997; Einhorn et al., 2003]. Gao et. al [Gao et al., 2013] konnten zeigen, dass BMP-2 effektiver bei der Aktivierung knochenregenerativer Stammzellen ist, als BMP-4. Wei et al. [Wei et al., 2017] konnten bei Ratten eine verbesserte Knochenheilung von Femurfrakturen unter Verwendung eines mit BMP-2-haltiger Hydroxylapatit-/Kollagenpaste imprägnierten Implantats zeigen. Orth et al. [Orth et al., 2017] konnten bei CD-1 Mäusen zeigen, dass BMP-2 beschichtete, mineralisierte Mikropartikel die Frakturheilung bei Knochendefekten verbessert.

Im klinischen Alltag finden BMPs bereits Anwendung in der Behandlung von Pseudarthrosen [Yun et. al., 2012; Giannoudis et al., 2013; Ronga et al, 2013]. Mittlerweile gibt es in diesem Zusammenhang jedoch auch Berichte über erhöhte Risiken für heterotope Knochenbildung, Osteolysen, eine Radikulitis oder auch retrograde Ejakulation nach Behandlung mit BMPs [Carragee et al, 2011; Ferretti et al., 2010; Fu et al., 2013; Simmonds et al., 2013].

2.3.2 Cystein-rich Protein 61

Das CYR61 Protein wird der CCN-Proteinfamilie zugeordnet und ist auch unter dem Synonym CCN1 bekannt. Die Erstbeschreibung erfolgte 1990 durch O'Brien et al. [O'Brien et al., 1990]. Das CYR61 Protein wird im Kallusgewebe exprimiert und stimuliert die

Osteoblastenproliferation und –differenzierung sowie die Angiogenese [Su et al., 2010; Hadjiargyrou et al., 2000].

Histing et al. [Histing et al., 2011b] konnten eine vermehrte Expression des Proteins während der Knorpelbildung im Rahmen der enchondralen Ossifikation nachweisen. Auch Zhang et al. [Zhang et al., 2016] konnten zeigen, dass CYR61 eine wichtige Steuerungsfunktion bei der Chondrozytenreifeung zukommt und dadurch die Entwicklung des Knorpelgewebes reguliert wird. Frey et al. [Frey et al., 2012] konnten einen positiven Einfluss einer im Frakturbereich applizierten CYR61-beschichteten Kollagenmatrix auf die Kallusregeneration bei Ratten nachweisen.

2.3.3 Kollagene

Kollagene sind die am häufigsten vorkommenden Proteine des menschlichen Körpers. Sie sind bedeutende Strukturproteine der extrazellulären Matrix aller Bindegewebsarten sowie der Haut. Bisher wurden bereits 28 unterschiedliche Kollagentypen beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Kollagen 2 und 10 im Frakturkallus analysiert. Typ 2 Kollagen wird vor allem in der frühen Chondrogenese gebildet, Typ 10 Kollagen in der späten Phase der Chondrogenese. Typ 2 Kollagen bildet zudem ein Netzwerk aus Fibrillen, in das sich Proteoglykane einlagern und somit den Hauptbestandteil der Knorpelmatrix bilden [Einhorn, 1998].

2.3.4 Receptor Activator of NF- κ B Ligand

Die Entdeckung des RANKL-Proteins erfolgte Ende der 90er Jahre beinahe zeitgleich durch mehrere Forschungsgruppen [Anderson et al., 1997; Lacey et al., 1998; Wong et al., 1997; Yasuda et al., 1999]. RANKL wird zur Familie der Tumornekrosefaktoren gezählt und wird durch diverse Knochenzellen, darunter Osteoblasten und ihre Progenitorzellen, exprimiert [Hofbauer et al., 2004]. Mittels seines Rezeptors RANK reguliert RANKL die Differenzierung von Osteoklasten und steuert über deren Aktivierung die Knochenresorption [Wright et al., 2009].

2.3.5 Osteoprotegerin

Die Erstbeschreibung des OPG-Proteins erfolgte 1997 im Rattenmodell [Simonet et al., 1997]. Das auch in Osteoblasten nachgewiesene Protein gehört ebenfalls zur Familie der

Tumornekrosefaktoren und stellt den Antagonisten von RANKL dar. Dazu bindet es mit hoher Affinität an das RANKL-Protein und verhindert somit dessen Interaktion mit seinem Rezeptor RANK [Kong et al., 2000]. Somit inhibiert es die RANKL vermittelte Knochenresorption.

2.3.6 Vascular endothelial growth factor

Das VEGF-Protein wurde in den 80er Jahren erstmals isoliert [Senger et al., 1983]. Seine Funktion als wichtiger Faktor für die Neoangiogenese während der Frakturheilung wurde in den 90er Jahren entdeckt [Brighton und Hunt, 1997]. Pufe et al. stellten im Rattenmodell fest, dass sich das Protein im gesunden, nicht fraktionierten Knochen nur in vernachlässigbaren Mengen nachweisen lässt [Pufe et al., 2002].

Während der frühen Phase der Frakturheilung wird VEGF in erster Linie von den Thrombozyten des Hämatoms sezerniert [Maloney et al., 1998]. Im weiteren Verlauf der Knochenregeneration exprimieren auch reife Osteo- und Chondroblasten das VEGF-Protein [Carlevaro et al., 2000]. Bouletreau et al. konnten zudem eine Stimulation der Sekretion von VEGF durch BMP-2 nachweisen [Bouletreau et al., 2002]. Pi et. al [Pi et al., 2016] konnten eine Potenzierung der BMP-9 assoziierten Induktion der Knochendifferenzierung und Knochenbildung durch VEGF zeigen.

2.4 Biomechanik und Frakturheilung

Trotz besserer Kenntnisse der spezifischen Mechanismen und Prozesse der Frakturheilung tritt eine verzögerte Knochenheilung im klinischen Alltag noch bei ca. 10 % der Frakturen von langen Röhrenknochen auf und stellt damit noch immer ein bedeutsames Problem dar [Panteli et al., 2015]. Laut Reis et al. [Reis et al., 2005] treten Pseudarthrosen bei etwa 5 % aller Frakturen der langen Röhrenknochen auf.

Die Ursachen verzögerter Knochenheilung sind multifaktoriell und in ihrer Gesamtheit noch nicht vollständig bekannt. Aufgrund dessen sind weitere Untersuchungen, insbesondere in vivo erforderlich.

Mittlerweile existiert eine Vielzahl von verschiedenen Tiermodellen. Grundsätzlich wird zwischen Groß- und Kleintiermodellen unterschieden. Früher wurden bevorzugt Großtiermodelle verwandt [Lettin, 1965; Nunamaker und Perren, 1979; Veneroni et al., 1962]. Die Favorisierung von Großtiermodellen begründete sich dabei in erster Linie auf die

Tatsache, dass man die Abläufe und Mechanismen der Knochenregeneration besser mit denen beim Menschen vergleichen kann als bei Kleintiermodellen. Zudem können das verwendete Osteosynthesematerial sowie die chirurgischen Verfahren aus dem klinischen Alltag leicht in das Großtiermodell übertragen werden.

In der letzten Dekade wurden in der muskuloskelettalen Forschung vermehrt Mausmodelle verwendet. Ausschlaggebend dafür ist nicht zuletzt die große Anzahl genetisch manipulierter Mausstämme. Auch das breite Spektrum zur Verfügung stehender Antikörper, die eine exakte Analyse der molekularen Mechanismen der Frakturheilung erlauben, tragen dazu bei, dass Mausmodelle immer häufiger Verwendung finden [Histing et al., 2011a].

Andererseits ist die Verwendung von Mausmodellen zur Erforschung der Knochenregeneration eine große Herausforderung, da die geringe Größe des Femurs technisch aufwendige Osteosynthesetechniken und Materialien erfordern. Folglich wurden Frakturen, insbesondere in einigen frühen Studien zur Knochenregeneration, bei Mäusen nicht osteosynthetisch versorgt [Colnot et al., 2003; Tonna und Cronkite, 1963].

Inzwischen wurden jedoch diverse Osteosynthesetechniken für die Verwendung in Mausmodellen eingeführt [Garcia et al., 2011; Histing et al., 2009; Histing et al., 2010; Holstein et al., 2009], welche die Analyse sowohl der enchondralen als auch der intramembranösen Knochenheilung erlauben. Trotz dieser Fortschritte und der Tatsache, dass biomechanische Faktoren den Heilungsprozess beträchtlich beeinflussen [Claes et al., 1998], werden noch immer Frakturmodelle ohne Versorgung bei Mäusen zur Erforschung der Knochenheilung herangezogen [Slade Shantz et al., 2014; Yu et al., 2012].

Tatsächlich ist nur sehr wenig darüber bekannt, in welcher Weise sich die Knochenregeneration bei nicht stabilisierten Frakturen im Vergleich zu stabilisierten Frakturen unterscheidet. Le et al. [Le et al., 2001] analysierten die molekulare Genexpression in stabilisierten und nicht stabilisierten Tibiafrakturen im Mausmodell. Sie konnten eine vermehrte Expression des Indian Hedgehog Proteins (IHH) bei nicht stabilisierten Frakturen nachweisen. Dies war mit einer verzögerten Differenzierung der Knorpelzellen assoziiert. Des Weiteren konnten Lu et al. [Lu et al., 2011] zeigen, dass die Instabilität nicht versorgter Frakturen die Neoangiogenese im frühen Heilungsprozess begünstigt.

Jedoch gibt es bis jetzt keine Informationen darüber, in welcher Weise sich der Frakturheilungsprozess bei nicht versorgten Frakturen gegenüber stabilisierten Frakturen unterscheidet.

2.5 Frakturheilung im Alter

Die Knochenregeneration wird von verschiedenen biologischen und mechanischen Faktoren beeinflusst. Auch das Alter hat einen entscheidenden Einfluss auf die Knochenregeneration. Sowohl in Tiermodellen [Meyer et al., 2003; Lu et al., 2005] als auch in klinischen Studien beim Menschen [Gruber et al., 2006] konnte ein Zusammenhang zwischen dem Alter und der Beeinträchtigung der Frakturheilung nachgewiesen werden.

Als mögliche Ursachen der verzögerten Knochenregeneration im Alter konnten eine geringe Knochenqualität [Mehta et al., 2010], eine verminderte Vaskularisierung [Lu et al., 2008], ein vermindertes regeneratives Potenzial [Yukata et al., 2014] sowie eine veränderte Genexpression [Naik et al., 2009, Hebb et al., 2017] identifiziert werden.

Der Einfluss der mechanischen Stabilität auf die Frakturheilung wurde ebenfalls in vielen Studien bereits umfassend untersucht [Gröngröft et al., 2009; Histing et al., 2010; Histing et al., 2011a; Schell et al., 2005]. Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass die mechanischen Gegebenheiten im Frakturareal entscheidend sind für eine erfolgreiche Knochenregeneration. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass eine interfragmentäre Dynamisierung im Frakturspalt den Heilungsprozess verbessern kann [Claes et al., 1998]. Mikrobewegungen der Fragmente können so die Knochenregeneration deutlich verbessern [Buckwalter, 1996].

Umgekehrt führt eine mechanische Instabilität durch eine unkontrollierte Bewegung im Frakturspalt zu einer verzögerten Frakturheilung bzw. Pseudarthrose. Als Ursache wird eine Zerreißung des den Frakturspalt überbrückenden Gewebes angesehen, wobei auch die versorgenden Blutgefäße geschädigt werden [Mora und Forriol, 2000]. Gerade bei alten Mäusen bewirkt eine verminderte Neoangiogenese und eine verspätete Invasion der Knorpelvorläuferzellen eine Beeinträchtigung der Frakturheilung [Gruber et al., 2006; Lu et al., 2008].

Der Einfluss der mechanischen Stabilität im Pseudarthrosemodell bei geriatrischen Mäusen wurde bereits in vorherigen Studien untersucht [Mehta et al., 2010; Ode et al., 2014; Strube et al., 2010]. Die meisten Studien wurden jedoch an jungen adulten Mäusen durchgeführt. Es existieren nur wenige Studien an geriatrischen Mäusen [Lu et al., 2005; Lu et al., 2008]. In diesen Studien wurde vor allem die Genexpression während der Frakturheilung untersucht. Welchen Einfluss die mechanische Stabilität auf die Kallusbildung, Zusammensetzung und Remodeling hat wurde in geriatrischen Mäusen noch nicht untersucht.

2.6 Fragestellung und Zielsetzung

Es gibt nur wenige Studien, sowohl bei adulten als auch bei geriatrischen Mäusen, die den Heilungsprozess bei stabilisierten und nicht stabilisierten Frakturen untersuchten. Bis dato ist der Einfluss auf die Knochenregeneration und vor allem auf den Remodelingprozess nur unzureichend untersucht.

Zielsetzung:

Ziel der Arbeit war es, zu untersuchen, ob sich der Heilungsprozess bei stabilisierten Frakturen im Vergleich zu nicht stabilisierten Frakturen in der adulten und geriatrischen Maus unterscheidet.

Nullhypothese:

Der Heilungsprozess bei stabilisierten und nicht stabilisierten Frakturen in der adulten und geriatrischen Maus unterscheidet sich nicht.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchsprotokoll

Die Genehmigung des Tierversuches wurde durch die zuständige Behörde (Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittel- und Veterinärwesen – Zentralstelle, Konrad-Zuse-Straße 11, 66115 Saarbrücken) unter dem Aktenzeichen Nr.7 /13 erteilt. Versuchsdurchführung und Tierhaltung fanden am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes statt.

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte unter kontrollierten Bedingungen in einem klimatisierten Raum bei Temperaturen von 22 – 24 Grad Celsius sowie einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 %. Die Tiere unterlagen dabei einem 12-stündigen Tag-/Nacht rhythmus und wurden in Kleintierkäfigen gehalten. Dabei stand den Tieren Wasser und Standarddiätfutter der Firma Altromin (Altromin 1320, Altromin, Lage, Deutschland) in Pelletform ad libitum zur Verfügung.

Als Versuchstiere dienten weibliche CD-1 Mäuse (ICR/CD-1 outbred mice; Harlan Laboratories, Wilmington, USA). Insgesamt wurden 89 Mäuse in die Studie eingeschlossen. Die CD-1 Mäuse wurden in 2 Gruppen, die jungen adulten Mäuse sowie die geriatrischen Mäuse eingeteilt. Das Durchschnittsalter der jungen Tiere lag bei 4 Monaten, das mittlere präoperative Gewicht betrug 34 g. Das durchschnittliche Alter der geriatrischen Tiere lag bei 18 Monaten. Das mittlere präoperative Gewicht betrug 41 g.

Die beiden Altersgruppen wurden jeweils unterteilt. Bei 23 Tieren der geriatrischen Gruppe wurde das Femur osteosynthetisch versorgt. Bei den restlichen Tieren (n=23) erfolgte keine Stabilisierung. Bei den jungen, adulten Tieren erfolgte bei 21 Tieren eine operative Stabilisierung des Femurs. Bei den übrigen Tieren (n=22) wurde das Femur nicht stabilisiert.

Zur Untersuchung der Heilungsphasen wurden die Zeiträume zwei bzw. fünf Wochen nach Intervention gewählt. Aufgrund der maximalen Kallusausbildung eignet sich der Beobachtungszeitraum von zwei Wochen im besonderen Maße zur Darstellung der frühen Frakturheilungsphase. Die knöcherne Konsolidierung kann fünf Wochen post interventionem am besten beurteilt werden [Manigrasso und O'Connor, 2004].

Zur Beurteilung der Frakturheilung wurden radiologische, biomechanische, histomorphometrische und proteinbiochemische Analysemethoden herangezogen. Proteinbiochemische Analysen wurden dabei lediglich am Kallusgewebe der 2-Wochen-Gruppen durchgeführt, da fünf Wochen postoperativ in aller Regel nicht mehr genügend

Kallusgewebe durch das größtenteils bereits abgeschlossene Remodeling vorhanden ist [Holstein et al., 2007a].

	Nicht stabilisiert		Stabilisiert	
	2 Wochen	5 Wochen	2 Wochen	5 Wochen
Radiologie	n = 8	n = 10	n = 9	n = 8
Biomechanik	n = 8	n = 10	n = 9	n = 8
Histologie	n = 8	n = 10	n = 9	n = 8
Western Blot	n = 4		n = 4	

Tab. 1: Versuchsprotokoll der adulten Tiere

	Nicht stabilisiert		Stabilisiert	
	2 Wochen	5 Wochen	2 Wochen	5 Wochen
Radiologie	n = 9	n = 10	n = 9	n = 10
Biomechanik	n = 9	n = 10	n = 9	n = 10
Histologie	n = 9	n = 10	n = 9	n = 10
Western Blot	n = 4		n = 4	

Tab. 2: Versuchsprotokoll der geriatrischen Tiere

3.1.1 Tiermodell

Zur Stabilisierung der Femurfrakturen wurde die MouseScrew® verwendet. Dieses geschlossene Frakturmodell ermöglicht mittels eines proximalen Gewindes und eines distalen Konus im Sinne einer Zugschraube eine Frakturspaltkompression. Das Implantat gewährleistet dadurch sowohl eine Rotationsstabilität als auch axiale Stabilität [Holstein et al., 2009]. Das Frakturmodell wurde bereits in anderen Arbeiten verwendet [Histing et al., 2011b; Histing et al., 2012b].

Das Implantat der MouseScrew® besitzt eine Länge von 18 mm mit einem Durchmesser von 0,5 mm. Die Schraube ist aus medizinischem Stahl gefertigt und verfügt über ein 4 mm langes Gewinde am proximalen Ende. Die MouseScrew® wurde in Zusammenarbeit mit der AO Foundation, Research Implant System (RIS), Davos (Schweiz), entwickelt.

Bei den Tieren ohne Stabilisierung erfolgte nach Frakturierung keine weitere Stabilisierung.

3.1.2 Operationsverfahren

Bei allen Tieren wurde präoperativ das Gewicht bestimmt. Die Anästhesie der Versuchstiere wurde mit einer intraperitonealen Injektion einer gewichtsadaptierten Menge Ketamin (75 mg/kg KG) sowie Xylazin (15 mg/kg KG) durchgeführt. Nach großzügiger Rasur und Enthaarung des rechten Beines sowie Hautdesinfektion des Operationsareals, wurde die Narkosetiefe mittels Auslösung eines Schmerzreflexes an den Pfoten überprüft. Zur Vermeidung einer Hypothermie wurden die Tiere unter einer Rotlichtquelle operiert.

Nach einer etwa 4 mm langen Hautinzision über der Patella (Abb. 3 und Abb. 4), erfolgte die Kapseleröffnung und die Luxation der Kniescheibe nach lateral (Abb. 5). Die Eröffnung des Markraumes erfolgte in der Fossa intercondylaris mittels einer Kanüle (Abb. 6) (BD Microlance 3™ - 24 G 1" - Nr.17, Ø 0,55 x 25 mm - BD Drogheda, Irland).

Anschließend wurde eine zweite 27-Gauge-Dental-Anästhesiekanüle (Sterican® Einmalkanüle für die Dental-Anästhesie- O./U.-Kiefer, Leitungsanästhesie- Größe 30/42- G 27 x 1, Ø 0,40 x 40 mm, Braun, Melsungen, Deutschland) retrograd in den Markraum eingebracht (Abb. 7).

Im Anschluss wurde mit der Kanüle die Kortikalis proximal auf Höhe des Trochanter majors durchbohrt, und dann die Haut penetriert. Über die Kanülenspitze wurde ein Wolfram-Führungsdraht mit einem Durchmesser von 0,2 mm eingefädelt. Die Kanüle wurde anschließend entfernt (Abb.8).

Mittels einer stumpfen Guillotine wurde das Femur mit einliegendem Draht anschließend frakturiert (Abb. 9). Frakturkonfiguration und korrekte Lage des Drahtes wurden im Anschluss radiologisch kontrolliert (Abb. 14) (Röntgenanlage MX-20, Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, Illinois, USA).

Die Schraube wurde nun auf den Führungsdraht aufgesetzt (Abb. 10) und in den Markraum eingebracht. Sobald die Schraube komplett im Knochen versenkt war und ein fester Halt vorlag, wurde die Schraube proximal des Schraubenkopfes an der Sollbruchstelle

durchtrennt (Abb. 11). Anschließend folgte eine erneute radiologische Kontrolle der korrekten Lage des Implantats (Abb. 15).

Abschließend wurde die Patella reponiert, sowie eine Kapsel- und Hautnaht mit einem 5-0 Prolene Faden (Ethicon, Johnson+Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) durchgeführt (Abb. 13).



Abb. 3: Fixation des Beins während der Operation mit Markierung des Hautschnitts über der Patella



Abb. 4: Blick auf das Ligamentum patellae nach mediopatellarem Hautschnitt



Abb. 5: Laterale Luxation der Patella mit freiliegender Fossa intercondylaris



Abb. 6: Eröffnung des Markraums mittels Kanüle



Abb. 7: Aufbohren des Markraums mit der Kanüle



Abb. 8: Einliegender Wolfram-Führungsdraht im Markraum



Abb. 9: Geschlossene Frakturierung des Femurs



Abb. 10: Einbringen der MouseScrew® über den Führungsdraht



Abb. 11: Blick auf die Femurkondylen nach Frakturversorgung mit der Schraube



Abb. 12: Refixierung der Patella mit eine Kapselnaht



Abb. 13: Wundverschluss mit Einzelknopfnähten

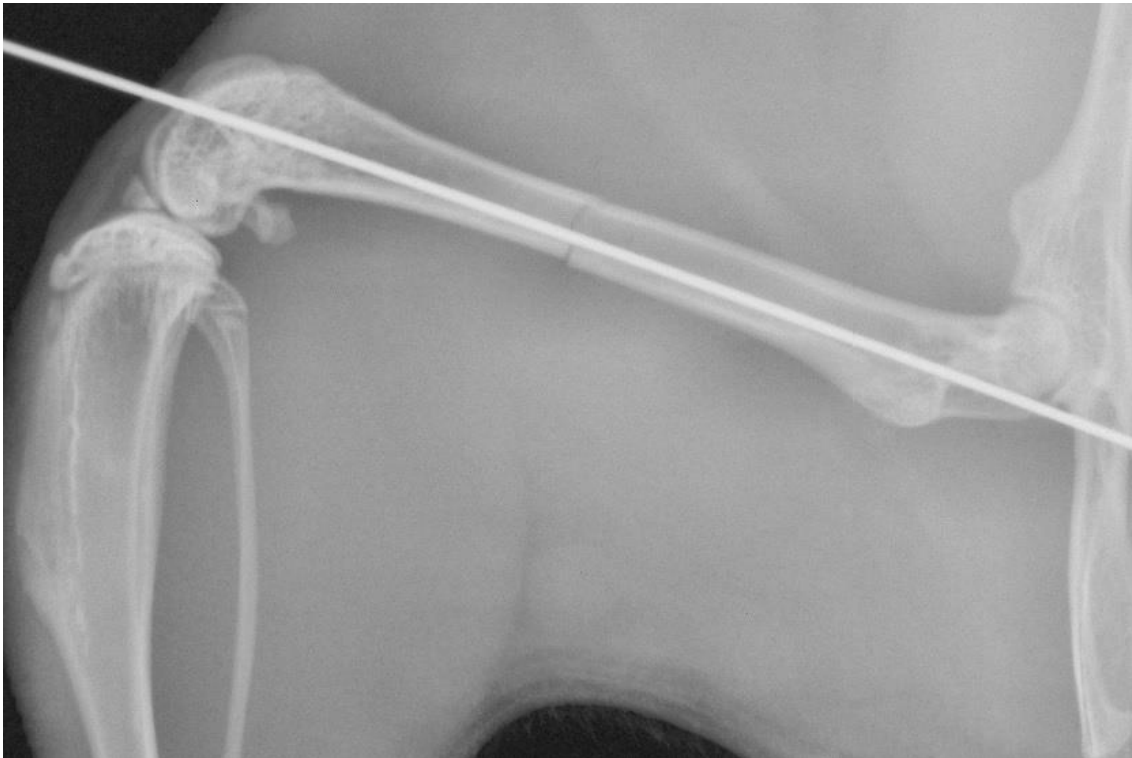


Abb. 14: Röntgenkontrolle nach Frakturierung des Femurs mit einliegendem Führungsdraht

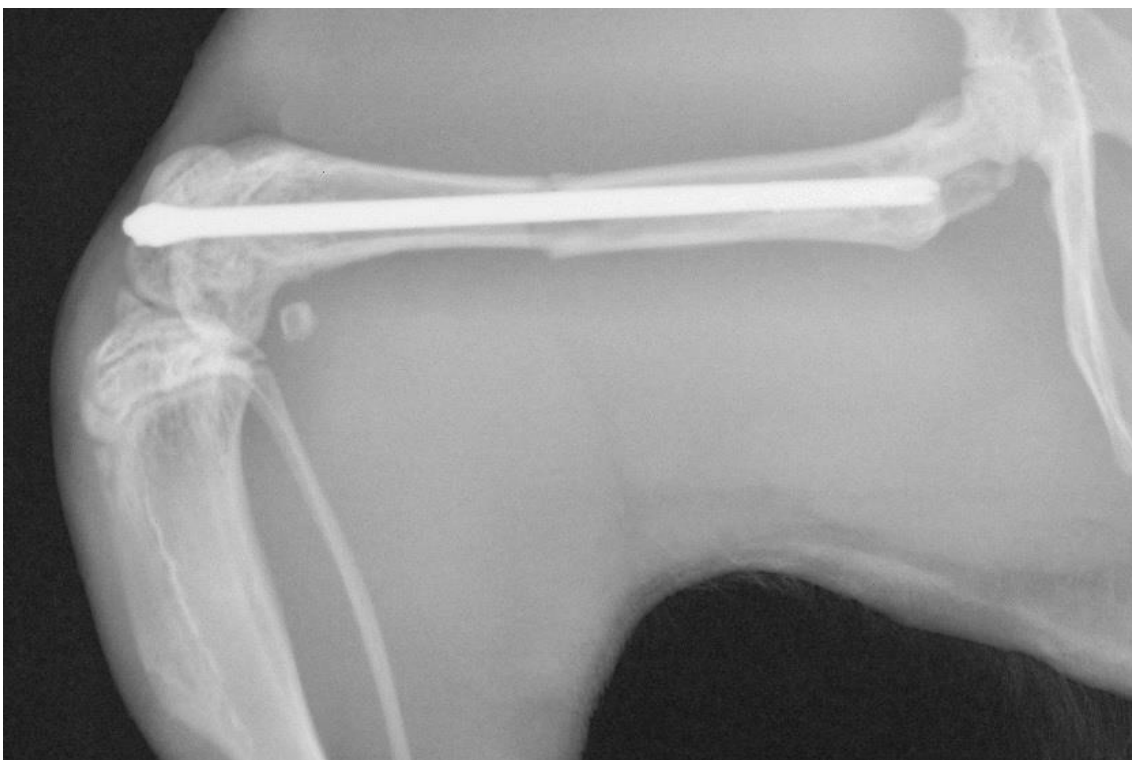


Abb. 15: postoperative Röntgenkontrolle mit einliegender Schraube

Bei den Tieren, bei denen das Femur nicht stabilisiert wurde, erfolgte lediglich die geschlossene Frakturierung des rechten Femurs mittels stumpfer Guillotine (Abb. 16).



Abb. 16: Röntgenkontrolle nach geschlossener Frakturierung ohne Stabilisierung

3.1.3 Peri- und postoperative Analgesie

Alle Versuchstiere erhielten sowohl am Tag der Operation, als auch am ersten postoperativen Tag, eine gewichtsadaptierte, subkutan applizierte Menge Carprofen® (5 mg/kg KG). Die weitere Schmerztherapie erfolgte in den ersten 3 Tagen oral über das Trinkwasser mit Tramadol. Dadurch war postoperativ eine adäquate Analgesie gewährleistet.

3.1.4 Tötung

Die Versuchstiere wurden jeweils nach zwei beziehungsweise fünf Wochen postoperativ mittels einer intraperitoneal verabreichten Überdosis an Narkotika getötet. Zuvor wurde nochmals das Gewicht der Tiere bestimmt, um signifikante Gewichtszu- oder -abnahmen auszuschließen.

3.1.5 Femurexplantation

Nach der Tötung der Tiere wurden sowohl das operierte als auch das gesunde kontralaterale Femur explantiert. Nach sorgfältiger Präparation und Entfernung des Weichteilgewebes folgte die Darstellung der *Articulatio genu et coxae* sowie konsekutiv die Exartikulation in beiden Gelenken. Die Femora wurden mit isotoner Kochsalzlösung befeuchtet und in feuchten Kompressen gelagert. Bei keinem der Tiere konnten Infekte oder Wundheilungsstörungen nachgewiesen werden.

3.2 Auswertung

3.2.1 Radiologische Analyse

Die radiologische Auswertung erfolgte zwei respektive fünf Wochen postoperativ. Es wurden jeweils zwei Röntgenaufnahmen angefertigt (Röntgenanlage MX-20, Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, Illinois, USA). Eine seitliche Aufnahme des rechten frakturierten Femurs sowie eine dorso-ventrale Aufnahme beider (frakturiertes rechtes Femur und kontralaterales gesundes Femur) explantierter Femora. Die Schraube wurde bei den osteosynthetisch versorgten Tieren vor der dorso-ventralen Aufnahme explantiert. Die Belichtungszeit betrug 12 s. Die Spannung betrug 35 kV.

Zur Auswertung und Klassifizierung der Frakturen wurde der Goldberg-Score herangezogen. Dieser beinhaltet eine Beurteilung der Frakturheilung mittels eines Punktesystems [Goldberg et al., 1985]:

- 0 Punkte: keine knöchernen Durchbauung des Frakturspalts
- 1 Punkt: partielle knöchernen Durchbauung des Frakturspalts
- 2 Punkte: komplette knöchernen Durchbauung des Frakturspalts

3.2.2 Biomechanische Analyse

Die biomechanische Testung erfolgte mittels 3-Punkt-Biegemessung (Mini-Zwick 2.5 der Firma Zwick GmbH, Ulm, Deutschland) zerstörungsfrei. Sowohl das frakturierte als auch das gesunde kontralaterale Femur wurden getestet.

Die Messapparatur besitzt eine 20 N-Lastzelle, zwei Auflagestempel zur Positionierung des Knochens sowie einen Stempel zur Belastung der Knochen mit einer definierten Kraft. Die beiden Auflagestempel befanden sich in einem definierten Abstand von 6 mm.

Die Femora wurden während der Testung mit einer NaCl-Lösung befeuchtet. Die Knochen wurden zur Testung so positioniert, dass die ventrale Seite des Femurs nach oben zeigte.

Die Messgeschwindigkeit betrug 1 mm/min. Die Messung wurde solange fortgesetzt, bis aus dem linearen Anteil des Kraft-Weg-Diagramms die Biegesteifigkeit bestimmt werden konnte.

Die absolute Biegesteifigkeit [N/mm] wurde anhand des Steigungsdreiecks im linearen Anteil des Kraft-Weg-Diagramms ermittelt. Zusätzlich wurde die relative Biegesteifigkeit [%] in Bezug zum kontralateralen gesunden Femur bestimmt.

3.2.3 Histologische Analyse

3.2.3.1 Anfertigung der histologischen Präparate

Zunächst wurden die Knochen 24 Stunden lang mit ICH Zink Fixiermittel (BD Pharmingen, San Jose, California, USA) behandelt und im Anschluss 14 Tage lang in 10-prozentiger EDTA-Lösung entkalkt. Danach erfolgte die Einbettung in Paraffin. Es wurden sagittal-longitudinale Schnitte mit einer Schnittdicke von 5 μm angefertigt.

Die Schnitte wurden nun nach der Trichrome Masson-Goldner Methode angefärbt. Zunächst wurden die Proben dazu zwei Minuten lang in Weigerts Eisenhämatoxylinlösung eingelegt und nach etwa zehn minütigem Abspülen unter fließendem Wasser in Goldner-Lösung I gelegt (Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin, fünf bis zehn Minuten). Diese wurde dann mit einprozentiger Essigsäure abgespült. Zur vollständigen Entfärbung des Bindegewebes wurden die Schnitte mit Goldner-Lösung II (Wolframatophosphorsäure-Orange G) behandelt. Diese wurden wiederum durch Spülung mit einprozentiger Essigsäure abgespült und anschließend mit Goldner-Lösung III (Lichtgrün) 5 Minuten lang gegengefärbt. Abschließend wurde nochmals mit einprozentiger Essigsäure ausgewaschen, mit Ethanol entwässert, sowie mit Xylol-Kitt II (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt.

3.2.3.2 Histomorphometrie

Bei 12,5-facher Vergrößerung (Olympus BX60 Mikroskop, Olympus, Tokio, Japan; Zeiss Axio Cam and Axio Vision 3.1, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) erfolgte die Auswertung nach der von Gerstenfeld et al. [Gerstenfeld et al. 2005] beschriebenen Methodik unter Zuhilfenahme des Bildauswertungsprogramms ImageJ (ImageJ Analysis System, NIH, Bethesda, Maryland, USA).

Folgende Parameter wurden bei der mikroskopischen Analyse erhoben:

- BDm : Femurdurchmesser in Höhe des Frakturspaltes [mm]
- CAr : periostale Kallusfläche [mm^2]
- TOTAr : Fläche des knöchernen Anteils innerhalb des periostalen Kallus [mm^2]
- CgAr : Fläche des knorpeligen Anteils innerhalb des periostalen Kallus [mm^2]
- FTAr : Fläche des bindegewebigen Anteils innerhalb des periostalen Kallus [mm^2]
- periostale Kallusfläche/ Femurdurchmesser [CAr/BDm [mm]]
- knöcherne Kallusfläche/ periostale Kallusfläche [TOTAr/CAr (%)]
- knorpelige Kallusfläche/ periostale Kallusfläche [CgAr/CAr (%)]
- bindegewebige Kallusfläche/ periostale Kallusfläche [FTAr/CAr (%)]

3.2.4 Western Blot

Western Blot Analysen erlauben eine Quantifizierung der Proteinexpression in Gewebeproben. Zunächst erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels einer Gelelektrophorese. Im Anschluss wurden die jeweiligen Banden durch eine weitere, horizontale Elektrophorese vom Gel auf eine Protein-bindende Membran übertragen. Dies erfolgt durch ionische und polare Wechselwirkungen zwischen Protein und Membran. Als Membran wurde hier Polyvinylidenfluorid (PVDF) verwendet.

Anschließend erfolgte die Bindung eines Immunkonjugats zur Markierung spezifischer Proteine. Die Quantifizierung der Proteine erfolgte mittels einer Licht emittierenden Enzym-Substrat-Reaktion. Die Lichtemissionen wurden dabei mit einem Röntgenfilm detektiert.

Die Expression folgender Proteine wurde in der vorliegenden Arbeit analysiert:

- Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2): Knochenmarker
- Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4): Knochenmarker
- Kollagen 2 (Col-2): Knorpelmarker und Marker der Chondrogenese
- Kollagen 10 (Col-10): Knorpelmarker und Marker der Chondrogenese
- Cystein rich protein 61 (CYR61): Marker der Osteogenese, Chondrogenese und Angiogenese
- Vascular endothelial growth factor (VEGF): Marker der Angiogenese
- Receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL): Osteoklastenstimulation
- Osteoprotegerin (OPG): Osteoklasteninhibition

Bei der Durchführung der Western-Blot-Analyse wurden folgende Schritte durchlaufen:

Das nach 14 Tagen vorsichtig gewonnene Kallusgewebe wurde zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei einer Temperatur von – 80 Grad Celsius aufbewahrt.

Zur Homogenisierung des Kallusgewebes wurden nun Lysepuffer (10mM Tris pH 7.5, 10mM NaCl, 0.1mM EDTA, 0.5% Triton-X 100, 0.02% NaN_3 , 0.2mM PMSF), eine Protease-Inhibitor-Mischung (1:75 v/v; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) sowie eine Phosphatase-Inhibitor-Mischung (1:100 v/v; Sigma-Aldrich) hinzugefügt. Darauf folgten eine 30-minütige, eisgekühlte Inkubationsphase, sowie im Anschluss eine 30-minütige Ultrazentrifugation bei 16000 x g. Die notwendigen Proteinkonzentrationen wurden mit der

Proteinbestimmung nach Lowry ermittelt, die eine sensitivere Methode der Biuret-Reaktion darstellt. Pro Bande wurde eine Proteinmenge von 10 µg verwendet.

Die aufgetragenen Proteinextrakte wurden nun mittels Gelelektrophorese diskontinuierlich in Natrium- Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelen getrennt und im Anschluss durch eine weitere horizontale Elektrophorese auf eine Polyvinylendifluorid-Membran transferiert. Um ungewollte Reaktionen zu verhindern, erfolgte die Blockade nicht-spezifischer Bindungsstellen.

Im Anschluss folgte die vierstündige Inkubation der Membrane mit den spezifischen Antikörpern:

- Kaninchen Anti-Maus BMP-2 und BMP-4 (1:100, 3,5 h bei Raumtemperatur und 1:50 nachts bei 4 Grad Celsius, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland)
- Kaninchen Anti-Maus Kollagen 2 und 10 (1:300, 3,5 h bei Raumtemperatur und 1:50 nachts bei 4 Grad Celsius, Bioss by Biozol, Eching, Deutschland)
- Ziege Anti-Maus CYR61 (1:100, 3,5 h bei Raumtemperatur und 1:50 nachts bei 4 Grad Celsius, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland)
- Kaninchen Anti-Maus VEGF (1:100, 3,5 h bei Raumtemperatur und 1:50 nachts bei 4 Grad Celsius, A20, Santa Cruz Biotechnology)
- Kaninchen Anti-Maus RANKL (1:500, 3,5 h bei Raumtemperatur und 1:100 nachts bei 4 Grad Celsius, Abcam, Cambridge, UK)
- Kaninchen Anti-Maus OPG (1:500, 3,5 h bei Raumtemperatur und 1:100 nachts bei 4 Grad Celsius, Bioss by Biozol).

Zur Markierung und Sichtbarmachung des nun gebundenen Sekundär-Antikörpers wurde mit luminolverstärkter Chemolumineszenz gearbeitet (ECL, GE Healthcare Amersham, Buckinghamshire, Great Britain). Die entstandenen Signale wurden densitometrisch erfasst (Quantity One, Geldoc, BioRad, München, Deutschland). Abschließend erfolgte eine Normierung bezüglich eines mitgelaufenen Beta-Actin-Signals (1:5000, Maus-Anti-Beta-Aktin, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Dadurch konnte eine Fehlerkorrektur aufgrund etwaiger ungleicher Beladung durchgeführt werden.

3.3 Statistische Analyse

Angegeben sind die Mittelwerte sowie der Standardfehler der Mittelwerte (standard error of the mean, SEM). Die Normalverteilung und Varianzgleichheit wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test bzw. F-Test überprüft. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student-t-Test. Bei fehlender Normalverteilung wurde der Mann-Whitney-U Rangsummen-Test verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Programms SigmaPlot 13.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland). Das Signifikanzniveau lag bei einem p-Wert $< 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1 Adulte Mäuse

4.1.1 Postoperativer Verlauf

Bereits am ersten postoperativen Tag begannen die operativ stabilisierten Mäuse unter adäquater Analgesie mit der Belastung des frakturierten Beines. Nach wenigen Tagen zeigte sich keine nennenswerte Beeinträchtigung im Vergleich zum präoperativen Bewegungsablauf.

Bei den nicht stabilisierten Tieren zeigte sich in den ersten Tagen eine Schonhaltung des frakturierten Beines. Nach etwa einer Woche war keine Beeinträchtigung des Bewegungsablaufes mehr feststellbar.

Das prä- und postoperative Gewicht unterschied sich sowohl bei den stabilisierten Mäusen als auch bei den nicht stabilisierten Mäusen nicht signifikant.

Alle in die Studie eingeschlossenen Tiere zeigten makroskopisch keinen Anhalt für Weichteil- oder Knocheninfekte. Es zeigten sich stets reizlose und trockene Wundverhältnisse.

4.1.2 Makroskopie

Nach Explantation der Femora erfolgte die makroskopische Beurteilung des Knochens. Beim Ausbau zeigte sich eine regelrechte Lage der Schraube ohne Hinweise auf eine Lockerung.

Nach zwei Wochen zeigte sich bei den nicht stabilisierten Femora massives, weiches Kallusgewebe bei teils starker Dislokation der anatomischen Femurachse. Im Gegensatz dazu wiesen die operativ stabilisierten Knochen bereits hartes Kallusgewebe bei wesentlich geringerer Kallusgröße auf.

Nach fünf Wochen ließ sich auch in der nicht stabilisierten Versuchsgruppe ein voranschreitendes Remodeling des Kallus erkennen. Die operativ stabilisierten Femora waren nach fünf Wochen makroskopisch verheilt.

4.1.3 Radiologie

Anhand der angefertigten Röntgenaufnahmen erfolgte die radiologische Auswertung mittels Goldberg-Score. Zwei Wochen postoperativ zeigte sich in der Versuchsgruppe ohne Stabilisierung ein mit $0,5 \pm 0,2$ signifikant erniedrigter Goldberg-Score im Vergleich zu den mittels Schraube stabilisierten Femora (Mittelwert $1,0 \pm 0,0$) ($p < 0,05$) (Abb. 17, 18).

Nach 5 Wochen zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied mit ($1,5 \pm 0,2$ vs. $2,0 \pm 0,0$) ($p < 0,05$). In der stabilisierten Gruppe zeigte sich eine komplette knöchernen Überbauung (Abb. 17, 18).

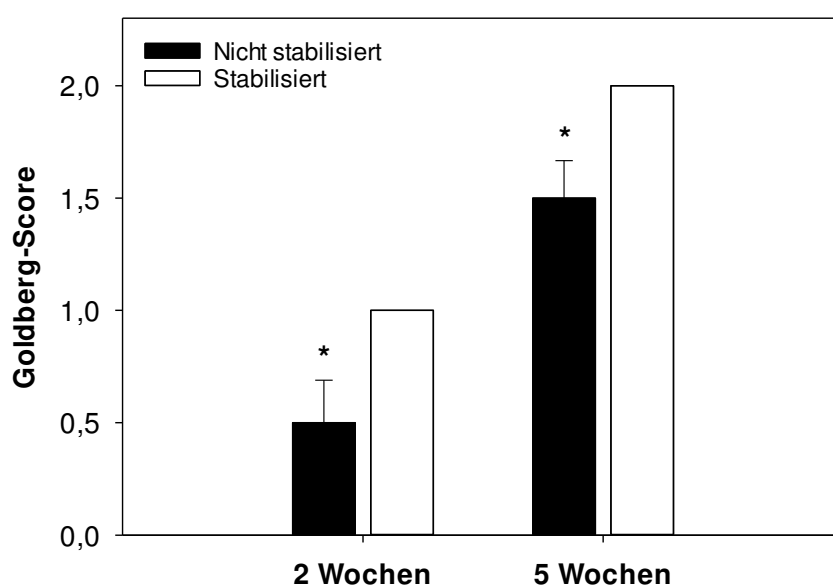


Abb. 17: Radiologische Auswertung mittels Goldberg-Score 2 und 5 Wochen postoperativ: Ausbleibende knöchernen Durchbauung (0 Punkte), partielle knöchernen Durchbauung (1 Punkt), vollständige knöchernen Durchbauung (2 Punkte), * $p < 0,05$ vs. stabilisierte Gruppe

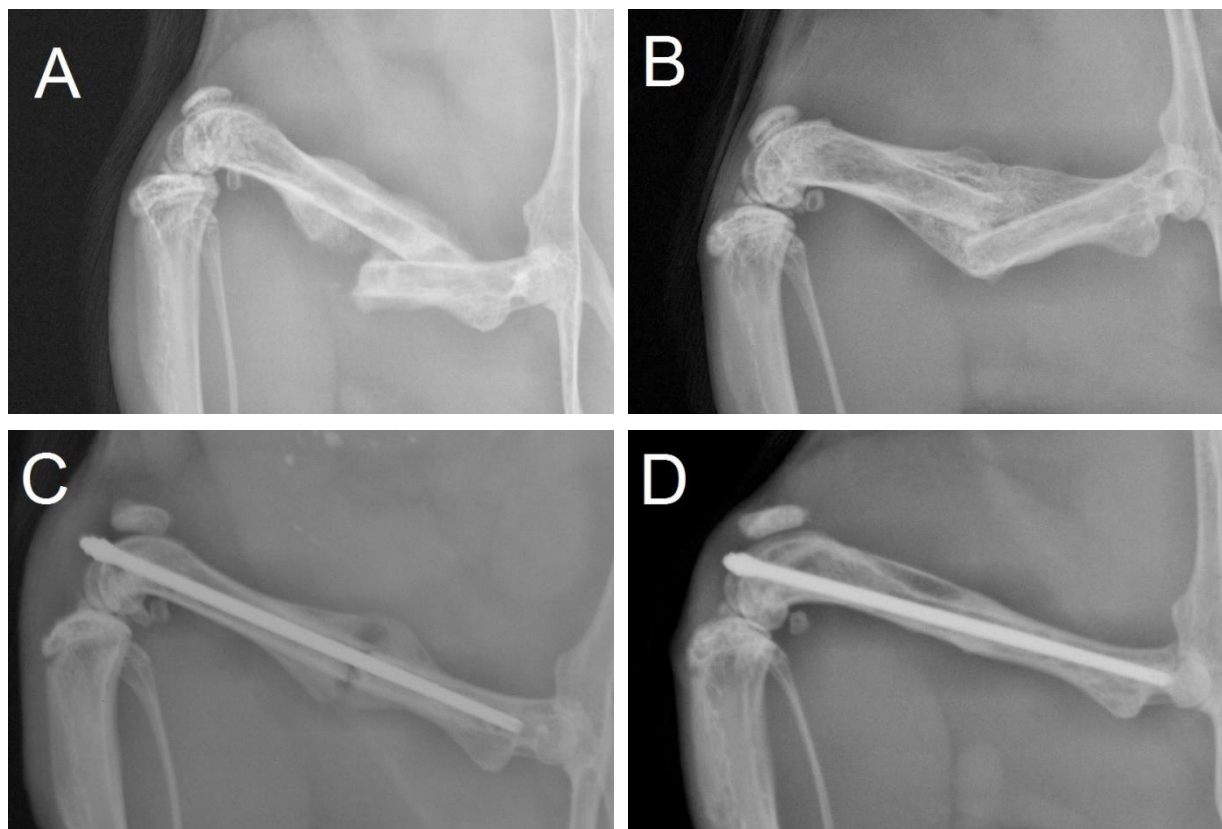


Abb.18: Röntgenbilder der Femora: A: nicht stabilisiert, 2 Wochen postoperativ; B: nicht stabilisiert, 5 Wochen postoperativ; C: stabilisiert, 2 Wochen postoperativ; D: stabilisiert, 5 Wochen postoperativ

4.1.4 Biomechanik

Die biomechanische Analyse der explantierten Femora erfolgte anhand einer 3-Punkt-Biegemessung. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, erfolgte die Bestimmung der Biegesteifigkeit sowohl am frakturierten als auch am kontralateralen gesunden Femurknochen. Bestimmt wurden die absolute Biegesteifigkeit in N/mm sowie die prozentuale relative Biegesteifigkeit in Relation zum gesunden, nicht frakturierten Knochen.

2 Wochen postoperativ zeigte sich eine signifikant erniedrigte Biegesteifigkeit in der nicht stabilisierten Gruppe im Vergleich zu der stabilisierten Gruppe ($17,8 \pm 2,3$ N/mm vs. $29,1 \pm 4,0$ N/mm, $p < 0,05$) (Abb. 19). Die relative Biegesteifigkeit war ebenfalls erniedrigt, jedoch nicht signifikant ($28,9 \pm 5,1$ % vs. $32,0 \pm 4,5$ %, $p > 0,05$) (Abb. 20).

5 Wochen postoperativ war in der nicht stabilisierten Gruppe sowohl die absolute als auch die relative Biegesteifigkeit signifikant erniedrigt im Vergleich zur stabilisierten Gruppe. Die

Mittelwerte lagen bei Betrachtung der absoluten Biegesteifigkeit bei $44,3 \pm 5,6$ N/mm vs. $93,9 \pm 12,5$ N/mm ($p < 0,05$) (Abb. 19), für die relative Biegesteifigkeit ergaben sich Prozentwerte von $55,1 \pm 5,5$ % vs. $114,7 \pm 24,8$ % ($p < 0,05$) (Abb. 20).

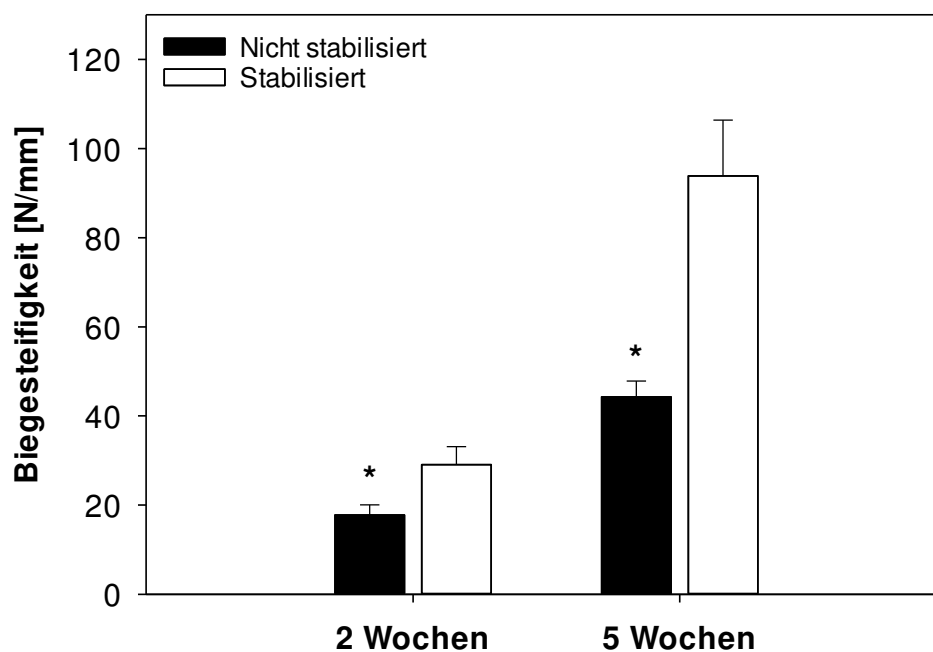


Abb. 19: Absolute Biegesteifigkeit 2 und 5 Wochen postoperativ, Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. stabilisierte Gruppe

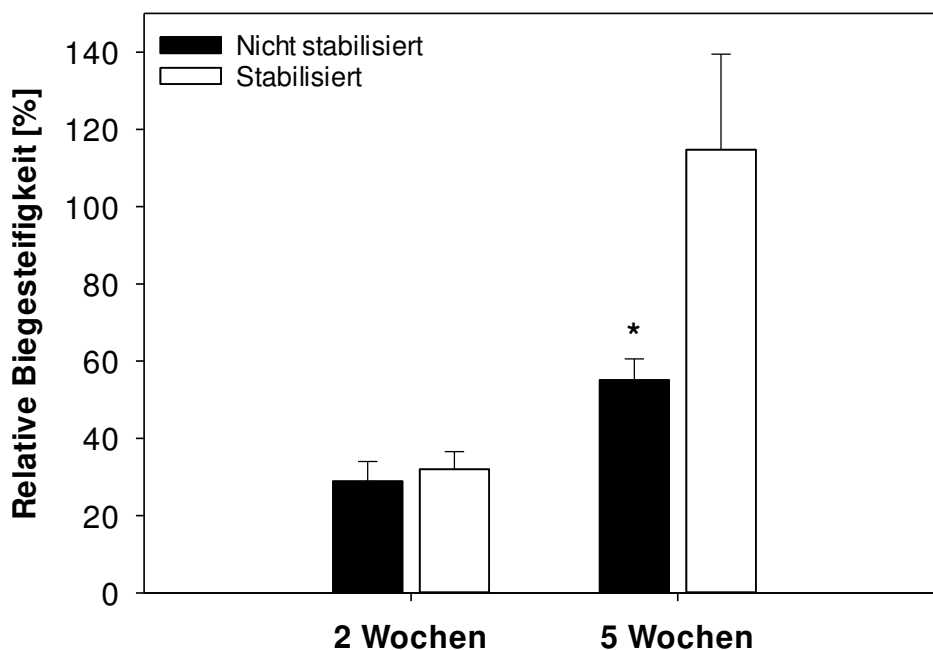


Abb. 20: Relative Biegesteifigkeit 2 und 5 Wochen postoperativ, Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. stabilisierte Gruppe

4.1.5 Histologie

Die histologische Auswertung erfolgte mikroskopisch an sagittal-longitudinalen Schnitten der explantierten Femora.

Zur Berücksichtigung interindividueller Unterschiede wurde die periostale Kallusfläche in Relation zum jeweiligen Femurdurchmesser angegeben.

Zwei Wochen postoperativ war die Kallusfläche in der nicht stabilisierten Gruppe signifikant größer im Vergleich zu der stabilisierten Gruppe ($10,6 \pm 0,7$ mm vs. $6,4 \pm 0,6$ mm, $p < 0,05$) (Abb. 21, 24).

Der Knochenanteil im Kallus war in der nicht stabilisierten Gruppe 2 Wochen postoperativ signifikant erniedrigt. Im Durchschnitt ergab sich ohne Stabilisierung ein Knochengehalt von $48,2 \pm 4,0$ %. In der stabilisierten Gruppe zeigte sich ein Knochengehalt von $74,2 \pm 3,4$ % ($p < 0,05$) (Abb. 22 und 24). Die nicht stabilisierte Gruppe zeigte auch nach 2 Wochen einen im Mittel signifikant erhöhten prozentualen Anteil an Knorpelgewebe ($30,4 \pm 2,9$ % vs. $18,0 \pm$

2,7 %, $p < 0,05$) (Abb. 23 und 24). Diese Ergebnisse sprechen für eine verzögerte Frakturheilung in der nicht stabilisierten Gruppe.

Auch 5 Wochen postoperativ ließ sich eine signifikant größere Kallusfläche in der nicht stabilisierten Gruppe nachweisen ($5,8 \pm 0,4$ mm vs. $3,1 \pm 0,4$ mm, $p < 0,05$) (Abb. 21 und 24). Der Anteil an Knochen- und Knorpelgewebe unterschied sich 5 Wochen postoperativ zwischen beiden Gruppen nicht mehr signifikant. In beiden Gruppen zeigte sich ein Knochenanteil von nahezu 100 % (Abb. 22, 23). In der mikroskopischen Auswertung zeigte sich jedoch in der nicht stabilisierten Gruppe hauptsächlich Geflechtknochen. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach Stabilisierung des Femurs hauptsächlich Lamellenknochen (Abb. 24).

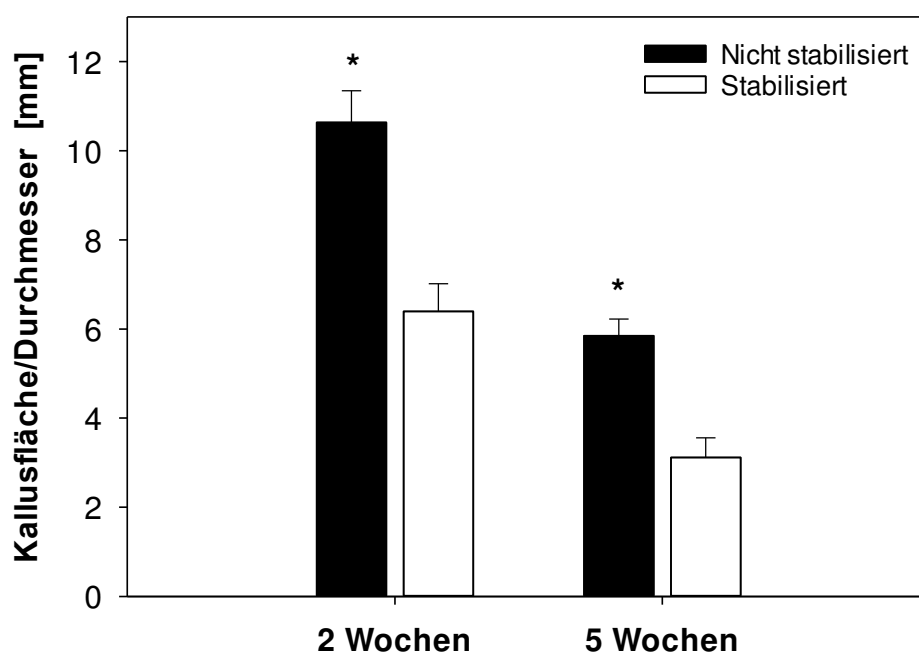


Abb. 21: Periostale Kallusfläche in Relation zum Femurdurchmesser 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ, Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. stabilisierte Gruppe

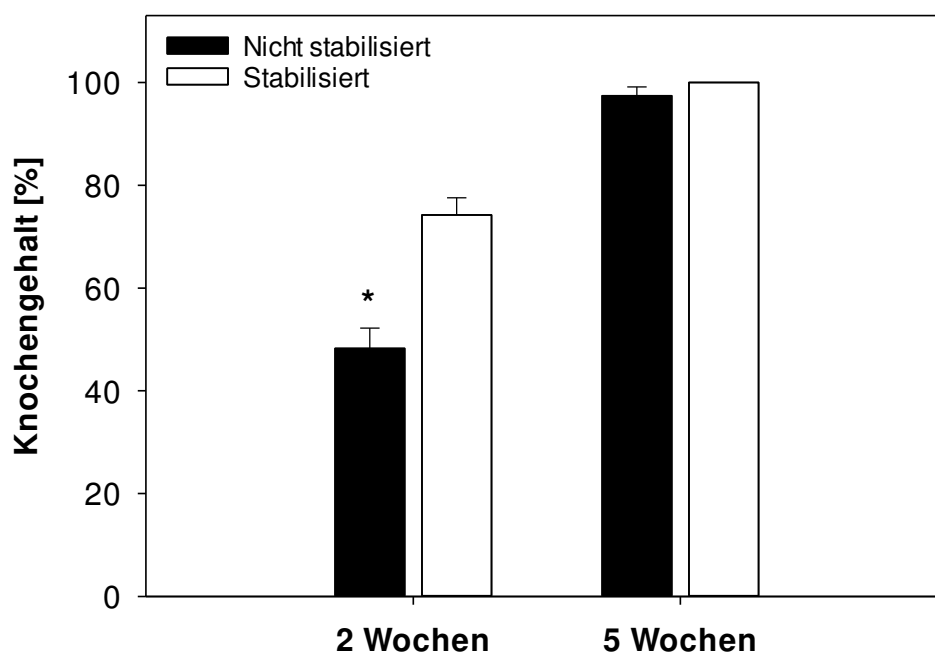


Abb. 22: Prozentualer Anteil an Knochengewebe im periostalen Kallus 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ, Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. stabilisierte Gruppe

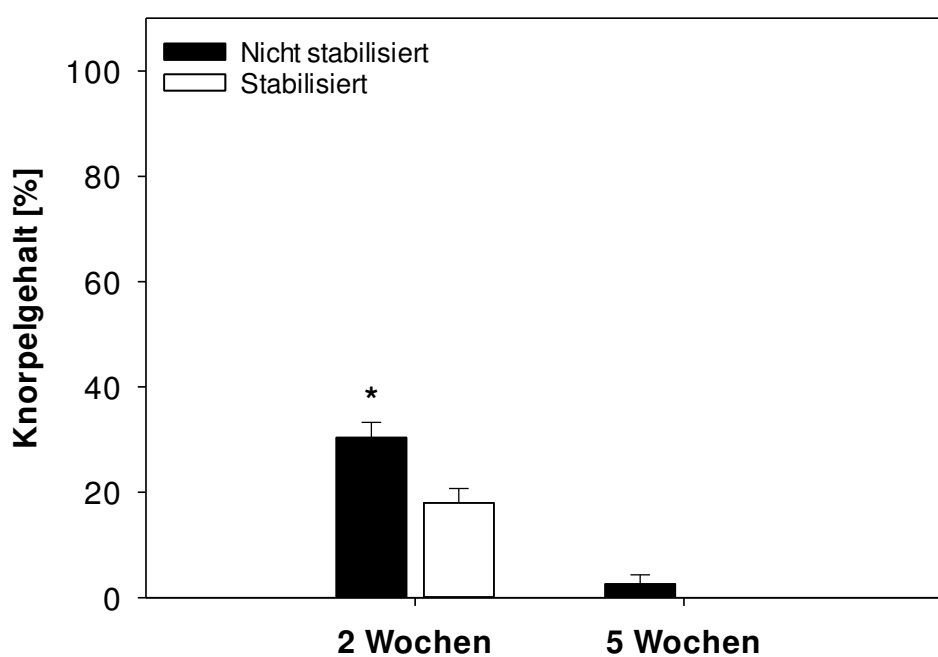


Abb. 23: Prozentualer Anteil an Knorpelgewebe im periostalen Kallus 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ, Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. stabilisierte Gruppe

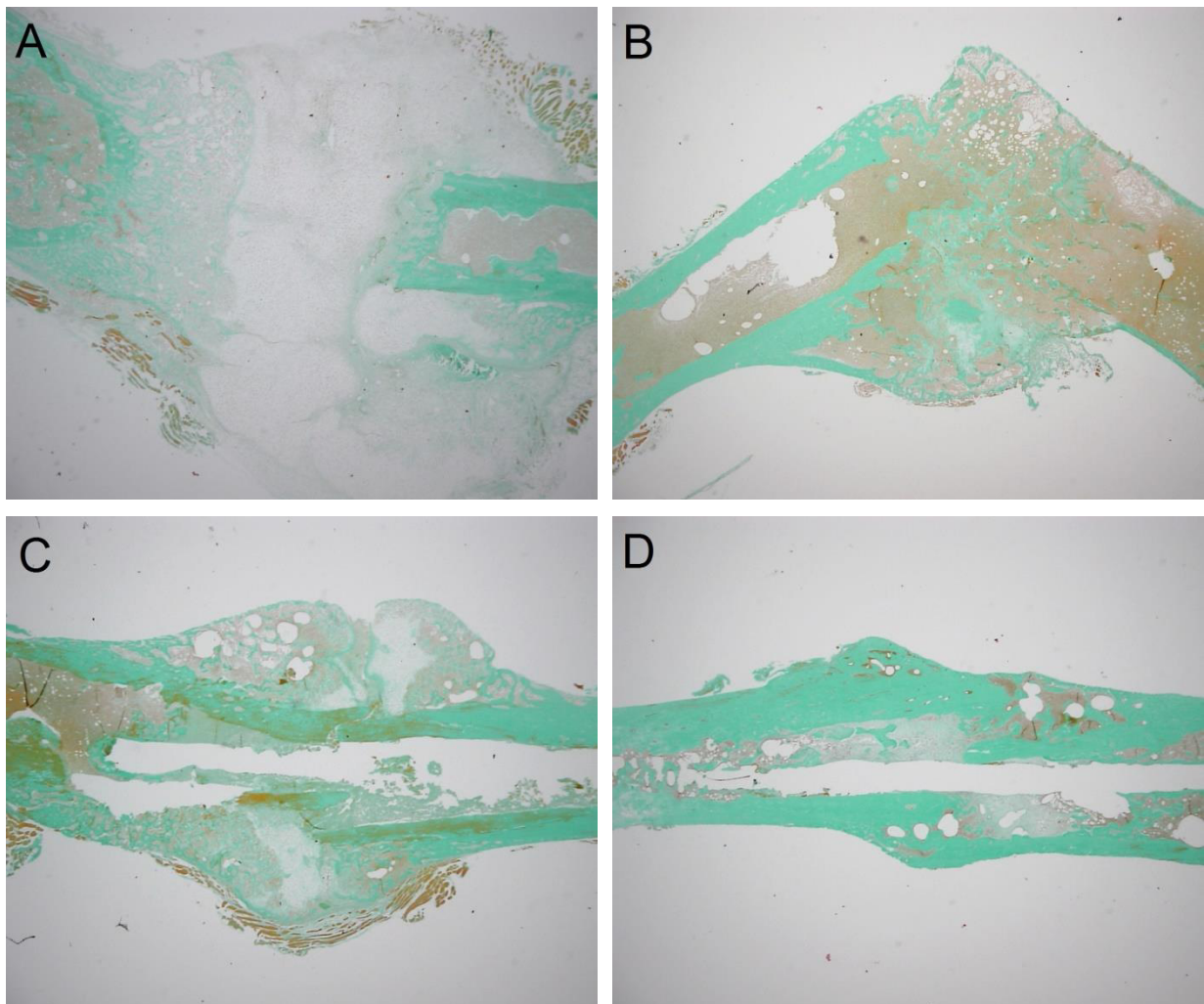


Abb. 24: Sagittale longitudinale Schnittpräparate der Femora auf Höhe des Frakturspalts. A: nicht stabilisierte Gruppe, 2 Wochen postoperativ; B: nicht stabilisierte Gruppe, 5 Wochen postoperativ; C: stabilisierte Gruppe, 2 Wochen postoperativ; D: stabilisierte Gruppe, 5 Wochen postoperativ

4.1.6 Western Blot

In der Western-Blot-Analyse wurde die Expression der Proteine BMP-2, BMP-4, Col-2, Col-10, CYR61, VEGF, OPG und RANKL im Kallusgewebe zwei Wochen postoperativ untersucht.

Die Expression von BMP-2 war in der nicht stabilisierten Gruppe erniedrigt, jedoch zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($8,4 \pm 0,6$ OD x mm² vs. $11,8 \pm 4,1$ OD x mm², $p > 0,05$) (Abb. 25, 26). Im Gegensatz dazu war die BMP-4 Expression in der nicht stabilisierten Gruppe deutlich höher. Es zeigten sich auch hier keine signifikanten Unterschiede ($22,1 \pm 3,2$ OD x mm² vs. $12,2 \pm 2,7$ OD x mm², $p > 0,05$) (Abb. 25, 26).

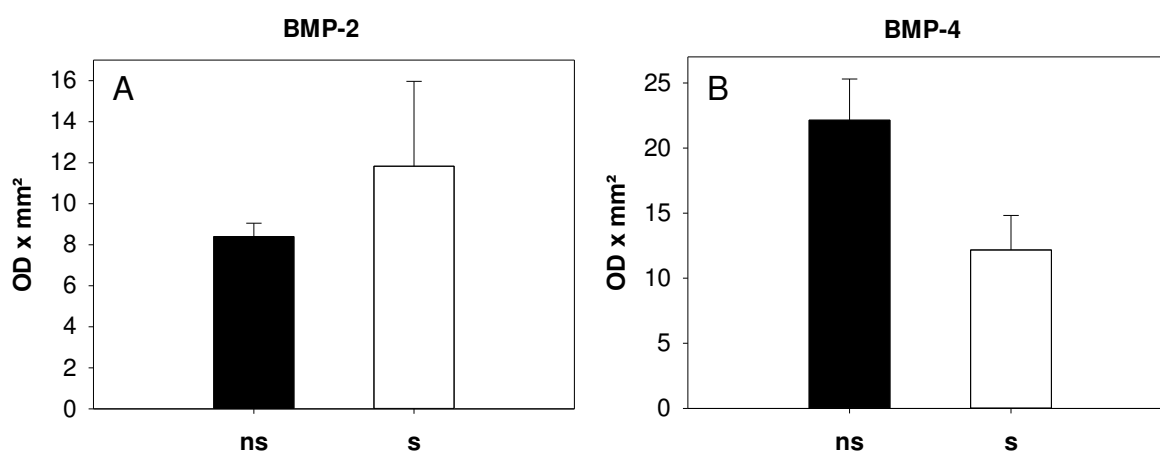


Abb. 25: Quantitative Analyse der Proteinexpression von BMP-2 (A) und BMP-4 (B) 2 Wochen postoperativ, schwarze Balken nicht stabilisierte Gruppe (ns), weiße Balken stabilisierte Gruppe (s), Mittelwerte \pm SEM

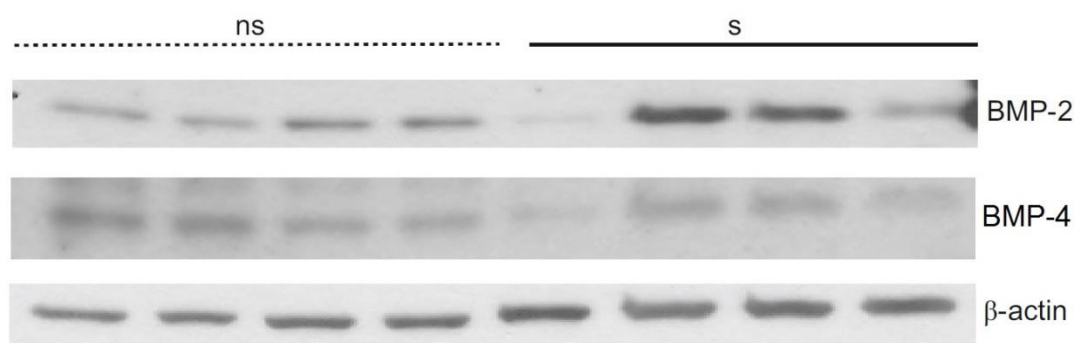


Abb. 26: Western-Blot-Analyse der Proteinexpression im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ, Expression von BMP-2 und BMP-4 im Vergleich zwischen der nicht stabilisierten (ns) und stabilisierten (s) Gruppe

Die Expression von Kollagen 2, einem frühen Knorpelmarker, war in der nicht stabilisierten Gruppe erhöht ($15,2 \pm 4,1$ OD x mm^2 vs. $8,1 \pm 1,7$ OD x mm^2 , $p > 0,05$) (Abb. 27, 28). Kollagen 10, ein Marker, der während der späten Chondrogenese exprimiert wird, war hingegen erniedrigt ($7,6 \pm 1,7$ OD x mm^2 vs. $10,6 \pm 3,6$ OD x mm^2) (Abb. 27, 28).

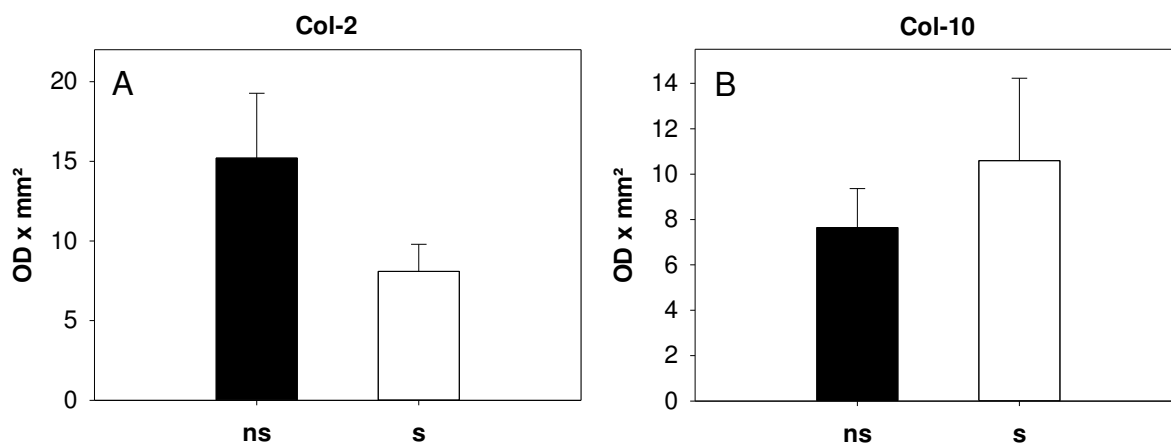


Abb. 27: Quantitative Analyse der Proteinexpression von Kollagen 2 (Col-2) (A) und Kollagen 10 (Col-10) (B) zwei Wochen postoperativ, schwarze Balken nicht stabilisierte Gruppe (ns), weiße Balken stabilisierte Gruppe (s), Mittelwerte \pm SEM

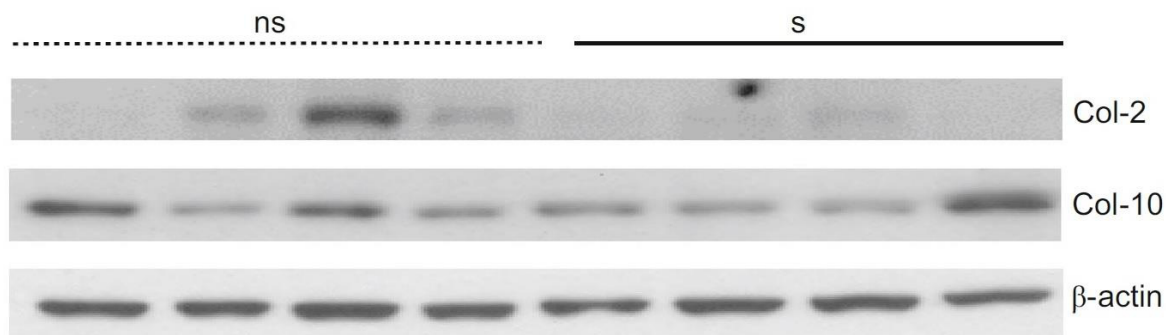


Abb. 28: Western-Blot-Analyse der Proteinexpression im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ, Expression von Col-2 und Col-10 im Vergleich zwischen der nicht stabilisierten (ns) und stabilisierten (s) Gruppe

Die Expression des Proteins CYR61 war in der nicht stabilisierten Gruppe erhöht ($11,0 \pm 2,6$ OD x mm² vs. $7,1 \pm 1,6$ OD x mm²) (Abb. 29, 30).

Im Gegensatz dazu war VEGF in der nicht stabilisierten Gruppe signifikant vermindert im Vergleich zu der stabilisierten Gruppe ($8,1 \pm 1,3$ OD x mm² vs. $13,7 \pm 2,3$ OD x mm², $p < 0,05$) (Abb. 29, 30).

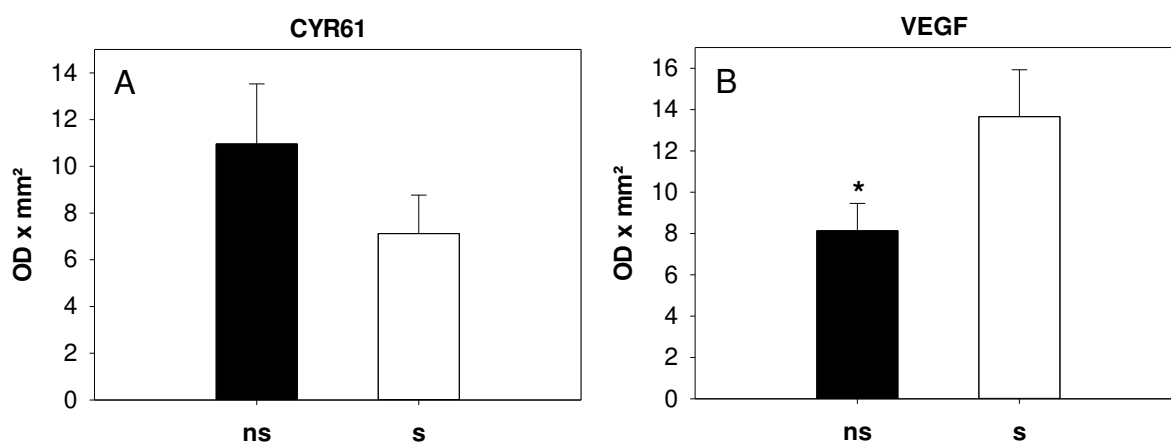


Abb. 29: Quantitative Analyse der Proteinexpression von CYR61 (A) und VEGF (B) 2 Wochen postoperativ, schwarze Balken nicht stabilisierte Gruppe (ns), weiße Balken stabilisierte Gruppe (s), Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. stabilisierte Gruppe

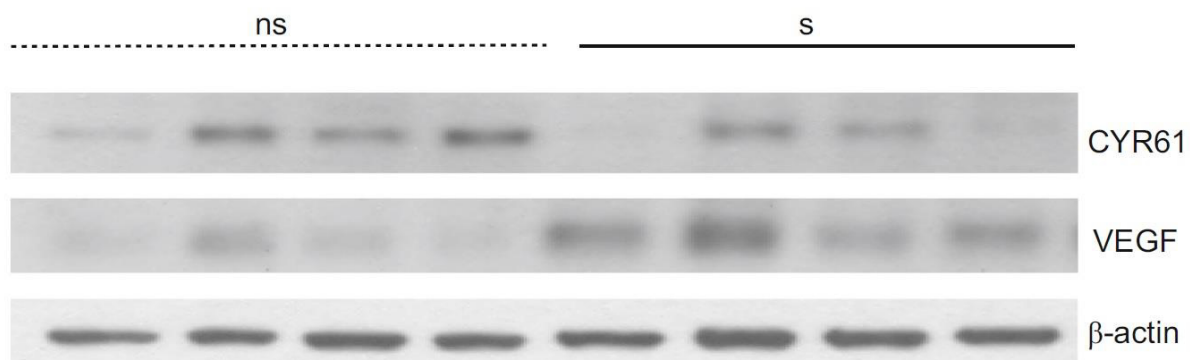


Abb. 30: Western-Blot-Analyse der Proteinexpression im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ, Expression von CYR61 und VEGF im Vergleich zwischen der nicht stabilisierten (ns) und stabilisierten (s) Gruppe

Die Expression von OPG war in der nicht stabilisierten Gruppe vermindert. Aufgrund des hohen Standardfehlers war der Unterschied jedoch nicht signifikant ($11,8 \pm 4,2$ OD x mm² vs. $18,8 \pm 0,8$ OD x mm², $p > 0,05$) (Abb. 31, 32). Die Expression von RANKL unterschied sich nicht wesentlich zwischen beiden Gruppen ($19,7 \pm 0,5$ OD x mm² vs. $19,4 \pm 1,9$ OD x mm², $p > 0,05$) (Abb. 31, 32).

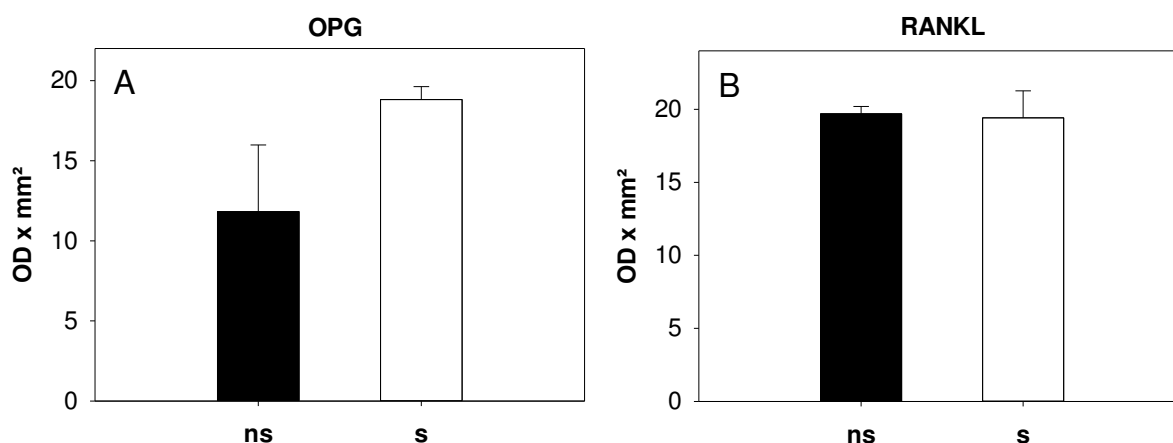


Abb. 31: Quantitative Analyse der Proteinexpression von OPG (A) und RANKL (B) zwei Wochen postoperativ, schwarze Balken nicht stabilisierte Gruppe (ns), weiße Balken stabilisierte Gruppe (s), Mittelwerte \pm SEM

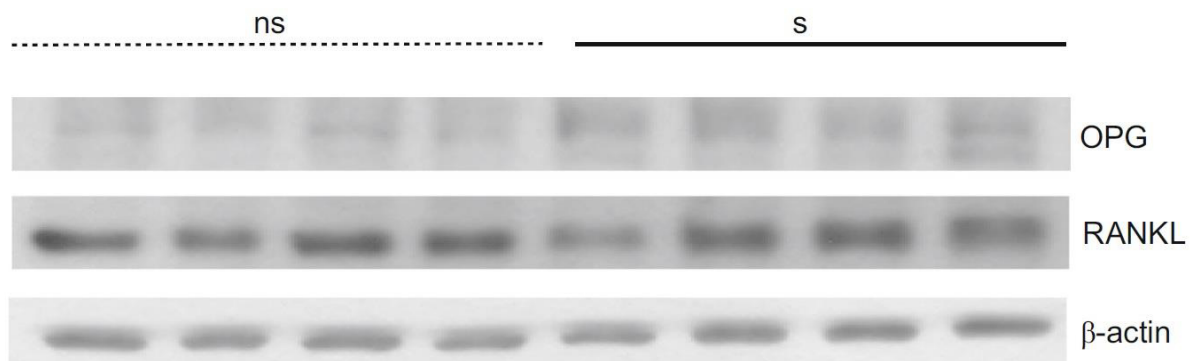


Abb. 32: Western-Blot-Analyse der Proteinexpression im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ Expression von OPG sowie des Osteoklastenstimulators RANKL im Vergleich zwischen der nicht stabilisierten (ns) und stabilisierten (s) Gruppe

4.2 Geriatrische Mäuse

4.2.1 Postoperativer Verlauf

Am ersten postoperativen Tag begannen die operativ stabilisierten Mäuse bereits mit der Belastung des frakturierten Beines. Bereits nach wenigen Tagen zeigte sich keine nennenswerte Einschränkung im Vergleich zum präoperativen Bewegungsablauf.

Bei den nicht stabilisierten Tieren zeigte sich in den ersten Tagen eine Schonhaltung des frakturierten Beines. Nach etwa einer Woche war keine Beeinträchtigung des Bewegungsablaufes mehr feststellbar.

Das prä- und postoperative Gewicht unterschied sich in dieser Versuchsgruppe nicht signifikant. Des Weiteren war bei keinem Tier eine Gewichtsabnahme von mehr als 20 % zu verzeichnen. Weichteil- oder Knocheninfekte waren nicht nachweisbar.

4.2.2 Makroskopie

Die makroskopische Beurteilung des Knochens erfolgte nach Explantation der Femora. Beim Ausbau zeigte sich eine regelrechte Lage der Schraube. Hinweise auf eine Lockerung ergaben sich nicht.

Bei den nicht stabilisierten Femora zeigte sich nach 2 Wochen massives, weiches Kallusgewebe bei teils starker Dislokation der anatomischen Femurachse. Im Gegensatz dazu wiesen die operativ stabilisierten Knochen bereits hartes Kallusgewebe bei wesentlich geringerer Kallusgröße auf.

Nach fünf Wochen ließ sich auch in der nicht stabilisierten Versuchsgruppe ein voranschreitendes Remodeling des Kallus erkennen. Die operativ stabilisierten Femora waren nach fünf Wochen makroskopisch verheilt.

4.2.3 Radiologie

Die röntgenologische Analyse erfolgte anhand des Goldberg-Scores. 2 Wochen postoperativ zeigte sich in der Gruppe der nicht stabilisierten Tiere ein signifikant erniedrigter Score ($0,4 \pm 0,2$ vs. $1,0 \pm 0$, $p < 0,05$) im Vergleich zu der stabilisierten Gruppe. Alle Tiere der stabilisierten Gruppe wiesen nach zwei Wochen eine zumindest partielle knöcherne Überbauung des Frakturspalts auf, während dies in der nicht stabilisierten Gruppe nur teilweise der Fall war (Abb. 33, 34).

5 Wochen postoperativ zeigte sich ebenso ein signifikant geringerer Score in der nicht stabilisierten Gruppe ($1,4 \pm 0,16$ vs. $1,9 \pm 0,1$, $p < 0,05$). Wobei alle Tiere der stabilisierten Gruppe nach diesem Zeitraum eine nahezu komplette knöchernerne Durchbauung zeigten.

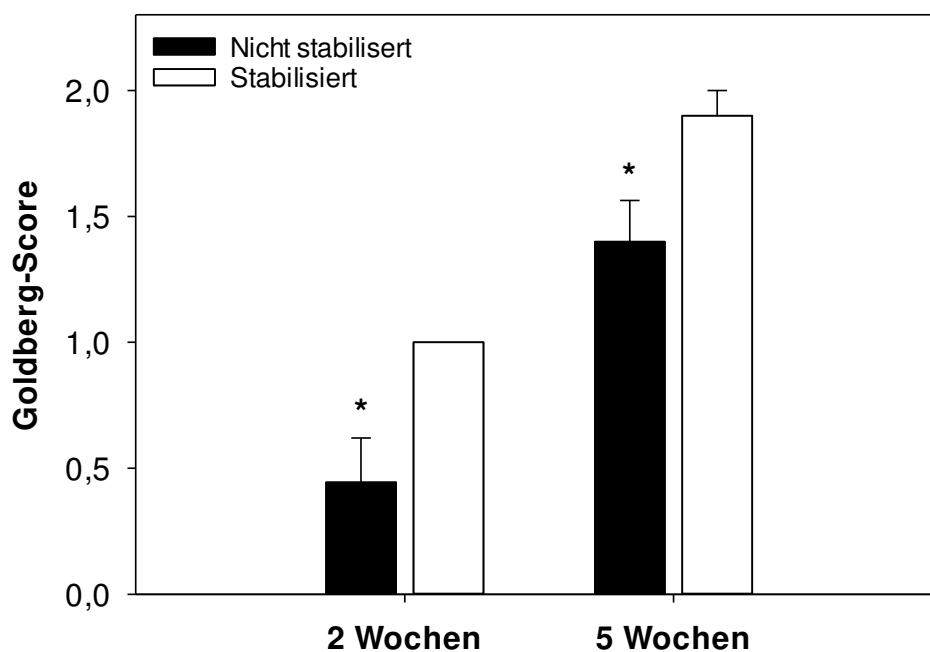


Abb. 33: Radiologische Auswertung mittels Goldberg-Score 2 und 5 Wochen postoperativ: Ausbleibende knöchernerne Durchbauung (0 Punkte), partielle knöchernerne Durchbauung (1 Punkt), vollständige knöchernerne Durchbauung (2 Punkte), * $p < 0,05$ vs. stabilisierte Gruppe

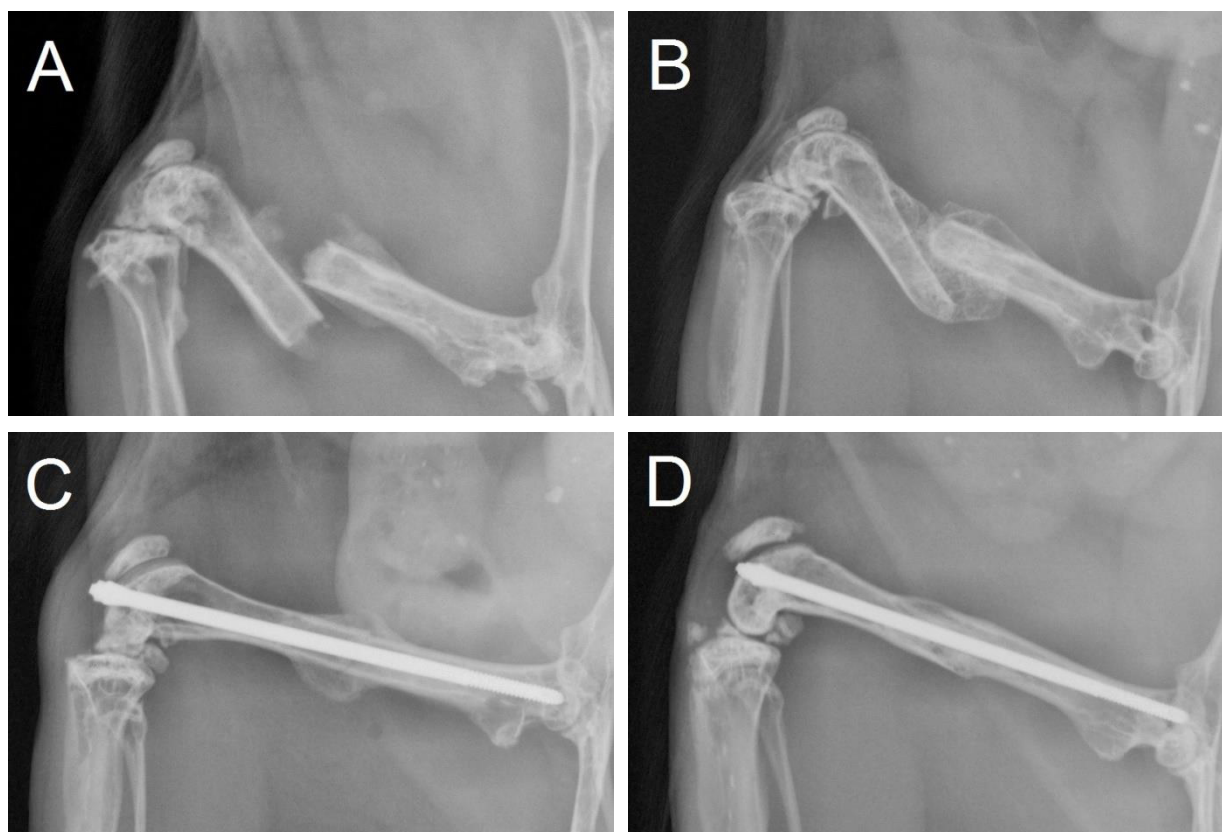


Abb. 34: Röntgenbilder der Femora: A: nicht stabilisiert, 2 Wochen postoperativ; B: nicht stabilisiert, 5 Wochen postoperativ; C: stabilisiert, 2 Wochen postoperativ; D: stabilisiert, 5 Wochen postoperativ

4.2.4 Biomechanik

Die biomechanische Analyse erfolgte mittels 3-Punkt-Biegemessung. Ermittelt wurde die absolute und relative Biegesteifigkeit.

2 Wochen postoperativ zeigte sich eine signifikant geringere absolute ($2,7 \pm 0,7$ N/mm vs. $11,4 \pm 4,0$ N/mm, $p < 0,05$) sowie relative ($2,4 \pm 0,6$ % vs. $12,7 \pm 4,6$ %, $p < 0,05$) Biegesteifigkeit in der nicht stabilisierten Gruppe im Vergleich zu der operativ stabilisierten Gruppe (Abb. 35, 36).

Fünf Wochen postoperativ ließ sich ebenfalls eine signifikant verminderte absolute Biegesteifigkeit der nicht stabilisierten Gruppe verglichen mit der operativ stabilisierten Gruppe nachweisen ($19,4 \pm 5,3$ N/mm vs. $30,5 \pm 3,6$ N/mm, $p < 0,05$). Die relative Biegesteifigkeit war ebenfalls erniedrigt ($30,9 \pm 10,0$ % vs. $37,6 \pm 5,1$ %, $p > 0,05$) (Abb. 35, 36). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

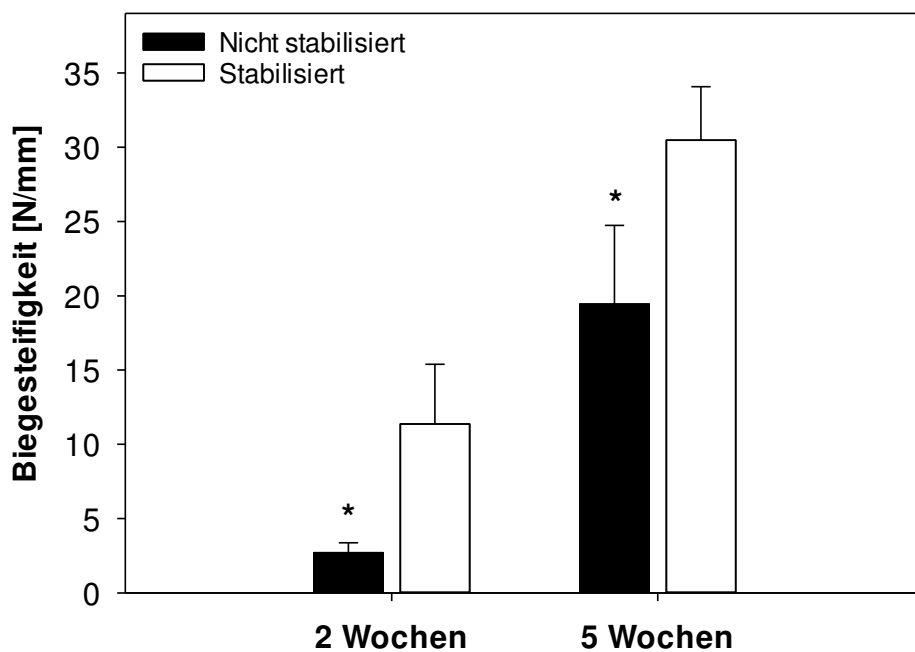


Abb. 35: Absolute Biegesteifigkeit 2 und 5 Wochen postoperativ, Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. stabilisierte Gruppe

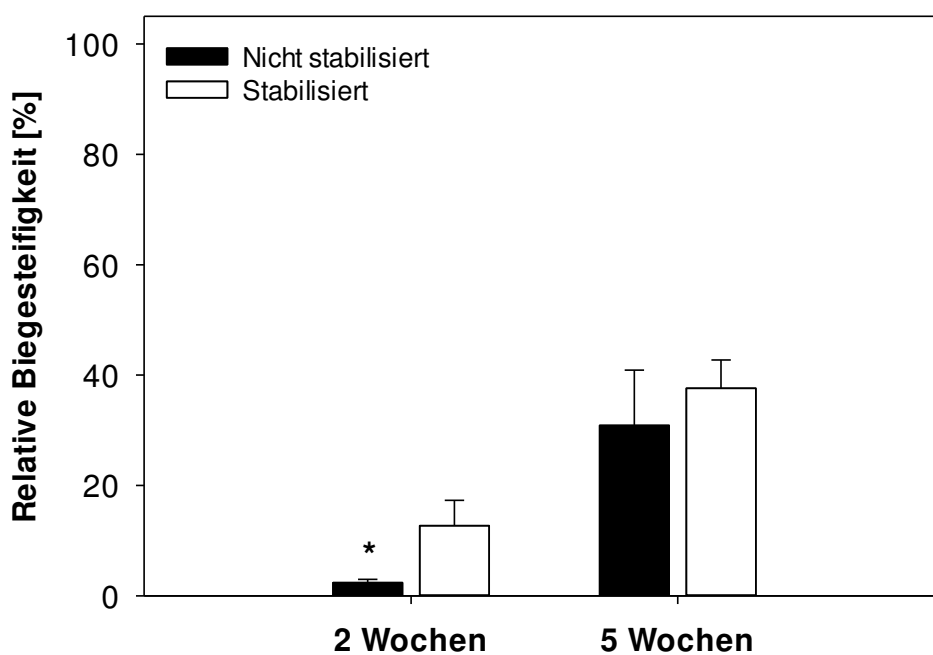


Abb. 36: Relative Biegesteifigkeit 2 und 5 Wochen postoperativ, Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. stabilisierte Gruppe

4.2.5 Histologie

Die histologische Auswertung erfolgte mikroskopisch an sagittal-longitudinalen Schnitten der explantierten Femora. Zwei Wochen postoperativ zeigte sich bei der nicht stabilisierten Gruppe eine signifikant größere Kallusfläche im Vergleich zu den operativ stabilisierten Tieren ($9,3 \pm 0,4$ mm vs $5,1 \pm 0,3$ mm, $p < 0,05$) (siehe Abbildung 37 und 40).

Der Knochengehalt war 2 Wochen postoperativ in der nicht stabilisierten Gruppe signifikant erniedrigt ($28,1 \pm 4,7$ % vs. $58,9 \pm 4,9$ %, $p < 0,05$) (Abb. 38, 40). Des Weiteren war der Anteil an Knorpelgewebe noch deutlich erhöht ($40,5 \pm 4,5$ % vs. $29,7 \pm 3,7$ %, $p > 0,05$). Insgesamt war bei den geriatrischen Tieren sowohl nach 2 als auch nach 5 Wochen der Anteil an Knorpelgewebe deutlich erhöht.

Auch 5 Wochen postoperativ war die Kallusfläche in der nicht stabilisierten Gruppe signifikant erhöht ($7,4 \pm 0,7$ mm vs. $4,2 \pm 0,3$ mm, $p < 0,05$) (Abb. 37 und 40). Der Knochenanteil war signifikant erniedrigt ($70,9 \pm 5,4$ % vs. $95,0 \pm 1,7$ %, $p < 0,05$) (Abb. 38, 40). Der Knorpelanteil zeigte sich signifikant erhöht ($14,5 \pm 2,7$ % vs. $3,4 \pm 1,2$ %, $p < 0,05$) (Abb. 39, 40). Mikroskopisch zeigte sich in der nicht stabilisierten Gruppe in erster Linie Geflechtknochen. Die operativ stabilisierte Gruppe zeigte vermehrt Lamellenknochen (Abb. 40).

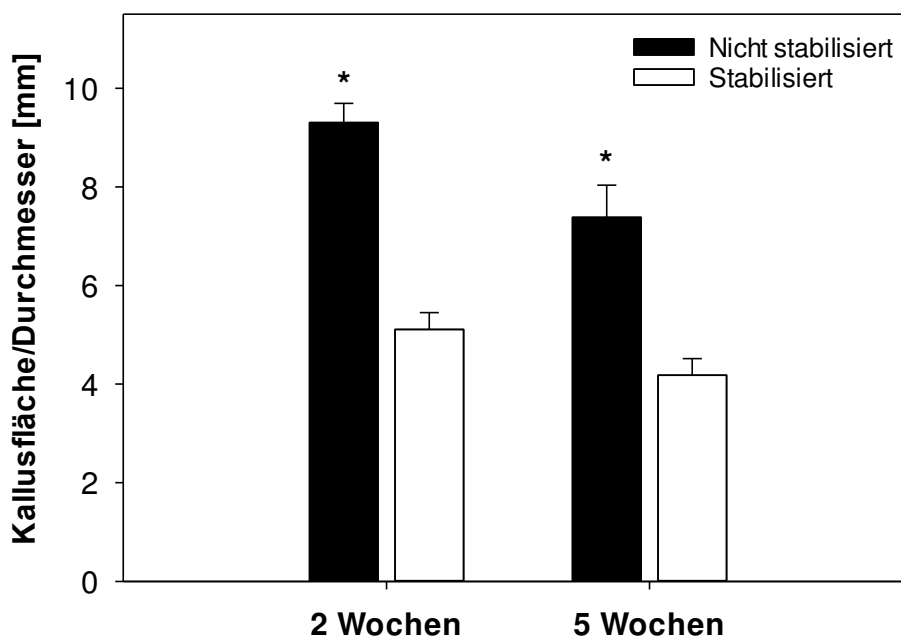


Abb. 37: Periostale Kallusfläche in Relation zum Femurdurchmesser 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ, Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. stabilisierte Gruppe

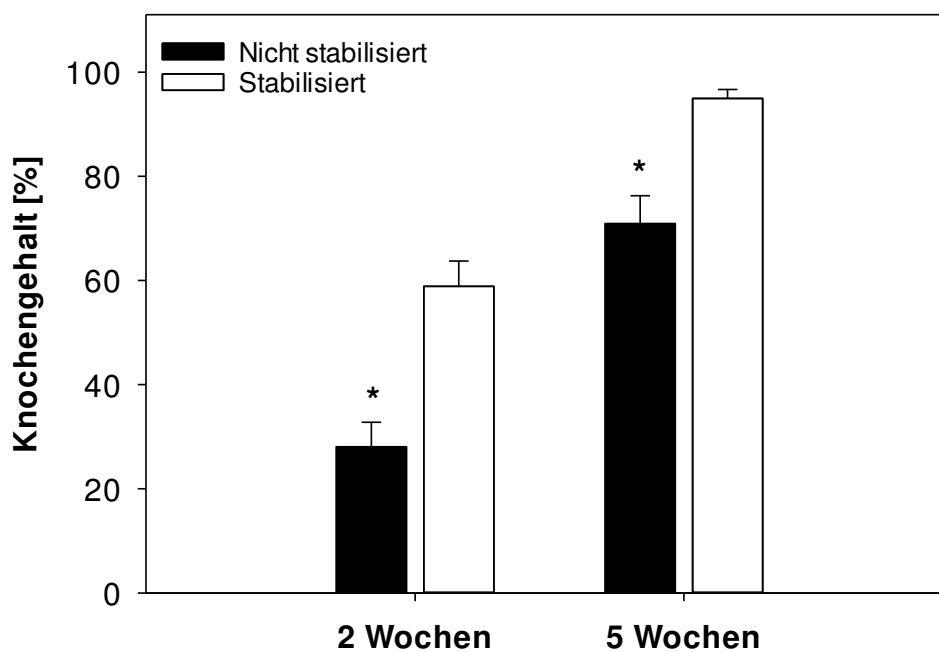


Abb. 38: Prozentualer Anteil an Knochengewebe im periostalen Kallus 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ, Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. stabilisierte Gruppe

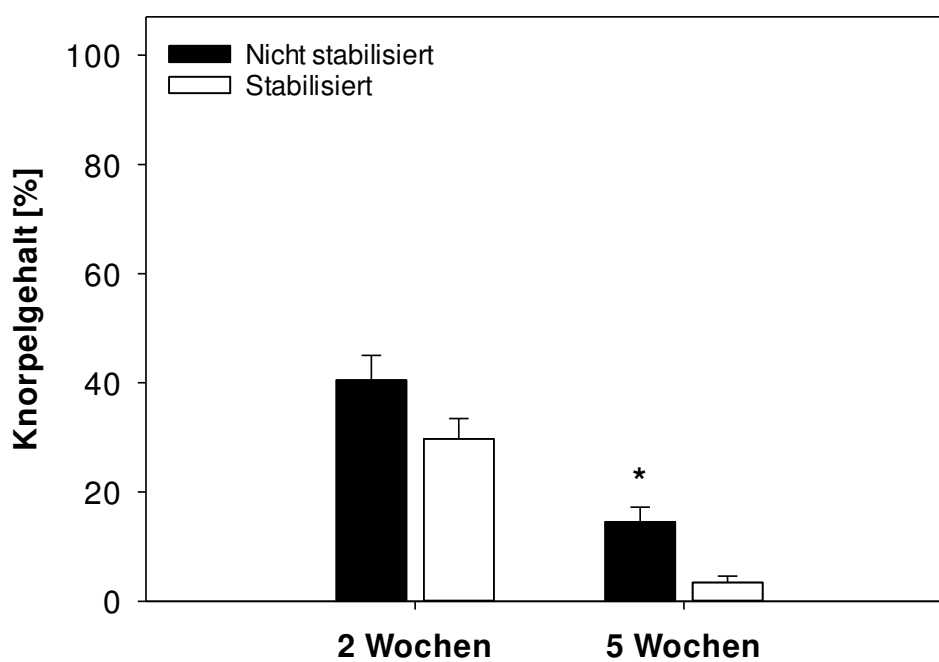


Abb. 39: Prozentualer Anteil an Knorpelgewebe im periostalen Kallus 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ, Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. stabilisierte Gruppe

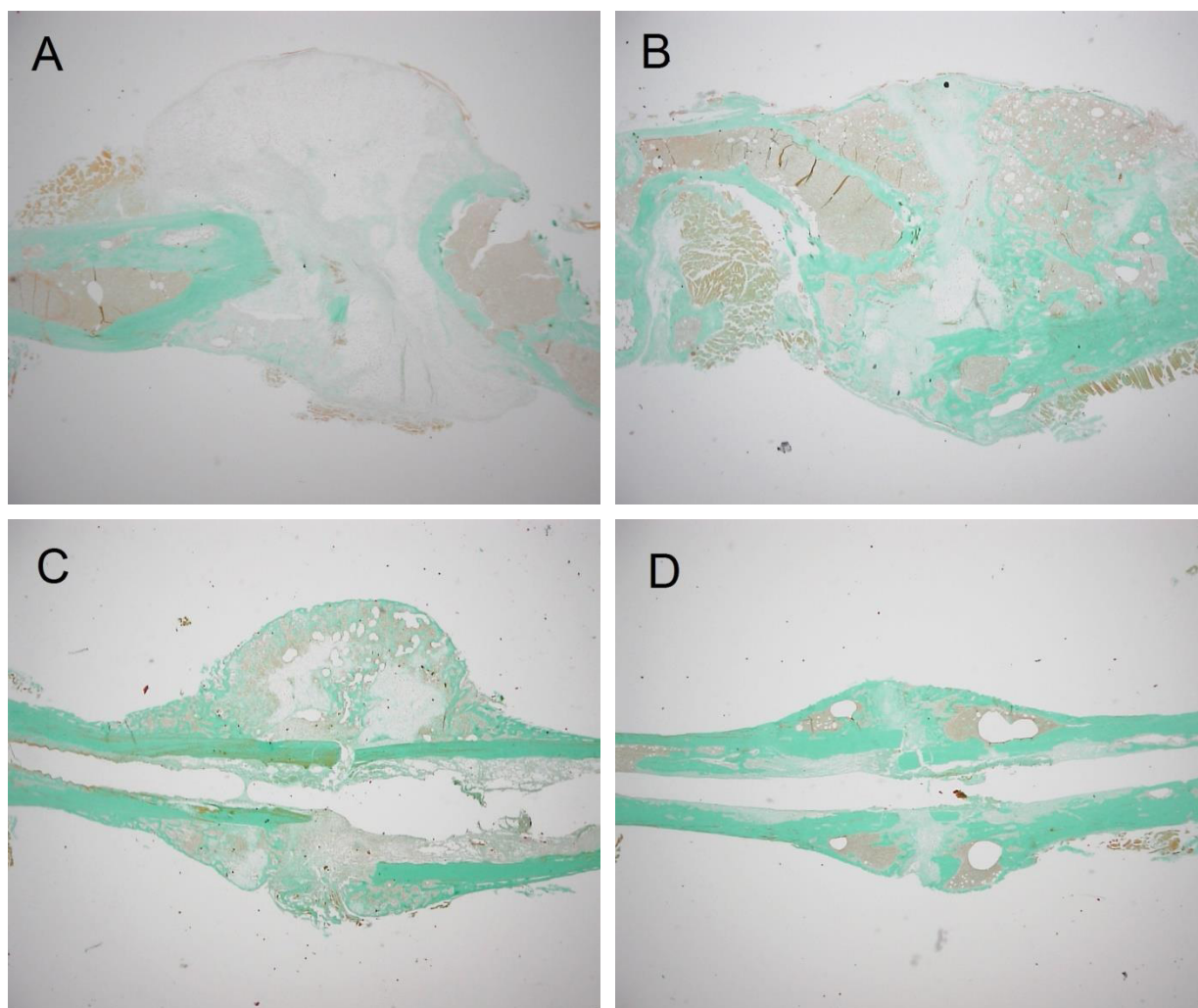


Abb. 40: Sagittale longitudinale Schnittpräparate der Femora auf Höhe des Frakturspalts. A: nicht stabilisierte Gruppe, 2 Wochen postoperativ; B: nicht stabilisierte Gruppe, 5 Wochen postoperativ; C: stabilisierte Gruppe, 2 Wochen postoperativ; D: stabilisierte Gruppe, 5 Wochen postoperativ

4.2.6 Western Blot

Die Western Blot Analysen erfolgten 2 Wochen postoperativ. Untersucht wurde die Proteinexpression von BMP-2, BMP-4, Col-2, Col-10, CYR61, VEGF, OPG und RANKL im Kallusgewebe.

Die Expression von BMP-2 ($5,7 \pm 0,5$ OD x mm² vs. $6,4 \pm 0,6$ OD x mm², $p > 0,05$) und BMP-4 ($6,8 \pm 1,1$ OD x mm² vs. $7,3 \pm 0,9$ OD x mm², $p > 0,05$) war in der nicht stabilisierten Gruppe geringer (Abb. 41, 42). Die Unterschiede waren jedoch nur geringfügig, sodass sich kein statistisch signifikanter Unterschied zeigte.

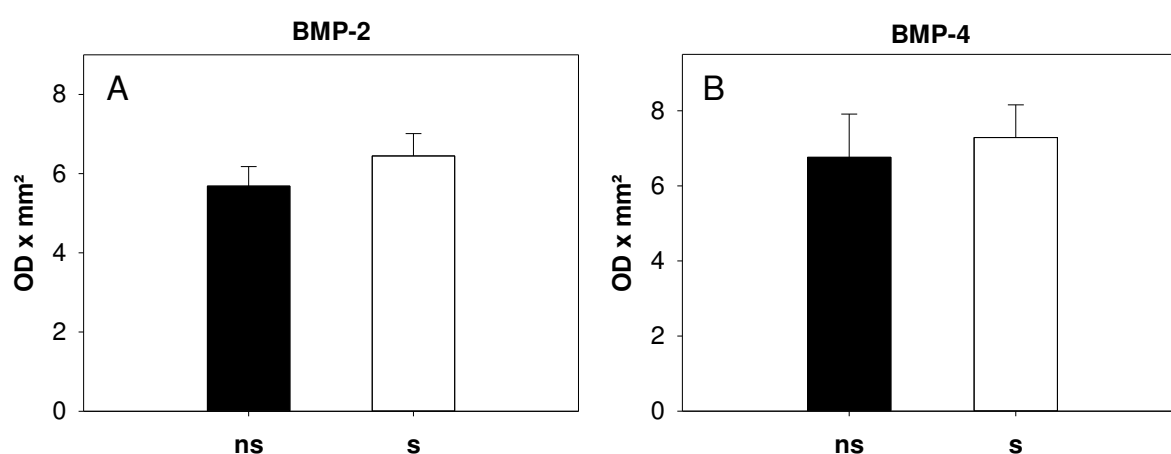


Abb. 41: Quantitative Analyse der Proteinexpression von BMP-2 (A) und BMP-4 (B) 2 Wochen postoperativ, schwarze Balken nicht stabilisierte Gruppe (ns), weiße Balken stabilisierte Gruppe (s), Mittelwerte \pm SEM

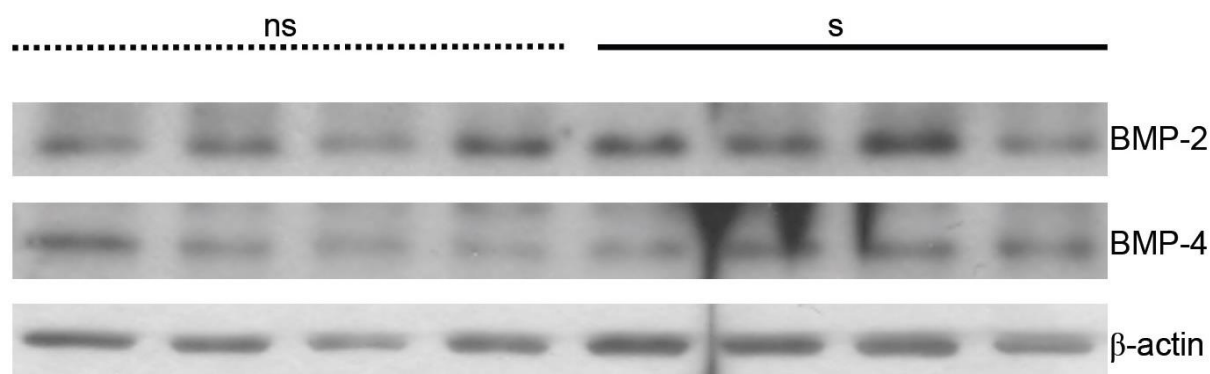


Abb. 42: Western-Blot-Analyse der Proteinexpression im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ, Expression von BMP-2 und BMP-4 im Vergleich zwischen der nicht stabilisierten (ns) und stabilisierten (s) Gruppe

Die Proteinexpression von Kollagen 2 und Kollagen 10 war nicht signifikant unterschiedlich. Sowohl Kollagen 2 ($19,0 \pm 2,8$ OD x mm² vs. $14,5 \pm 2,2$ OD x mm², $p > 0,05$) als auch Kollagen 10 ($12,9 \pm 3,6$ OD x mm² vs. $6,3 \pm 0,5$ OD x mm², $p > 0,05$) waren in der nicht stabilisierten Gruppe erhöht (Abb. 43, 44).

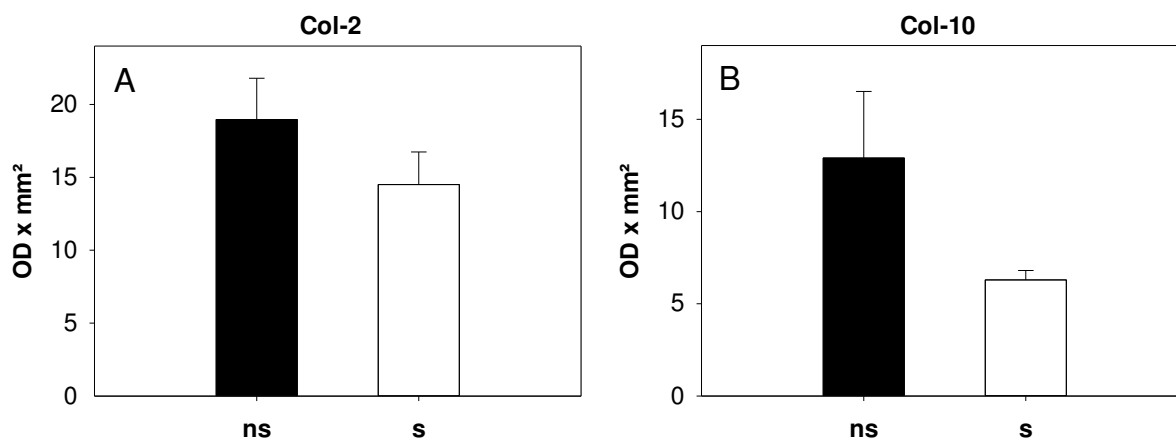


Abb. 43: Quantitative Analyse der Proteinexpression von Kollagen 2 (Col-2) (A) und Kollagen 10 (Col-10) (B) 2 Wochen postoperativ, schwarze Balken nicht stabilisierte Gruppe (ns), weiße Balken stabilisierte Gruppe (s), Mittelwerte \pm SEM

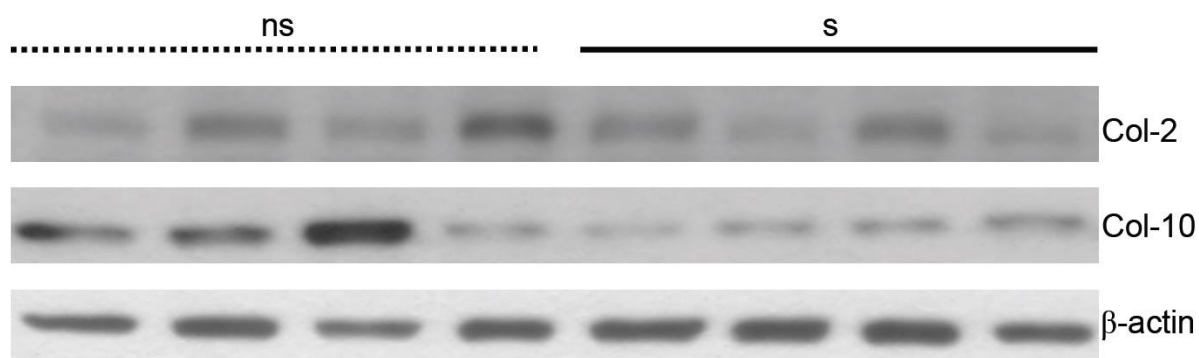


Abb. 44: Western-Blot-Analyse der Proteinexpression im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ Expression von Col-2 und Col-10 im Vergleich zwischen der nicht stabilisierten (ns) und stabilisierten (s) Gruppe

Die Expression der beiden osteosynthetischen sowie angiogenetischen Marker CYR61 ($10,2 \pm 1,6$ OD x mm^2 vs. $7,5 \pm 0,4$ OD x mm^2 , $p > 0,05$) und VEGF ($8,3 \pm 3,4$ OD x mm^2 vs. $6,1 \pm 2,1$ OD x mm^2 , $p > 0,05$) war in der nicht stabilisierten Gruppe jeweils erhöht. Die Unterschiede waren statistisch jedoch nicht signifikant.

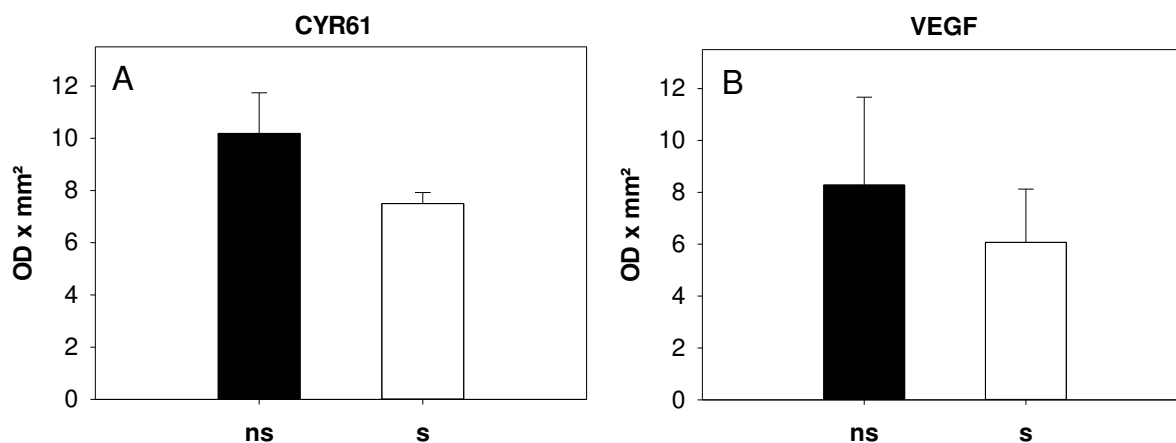


Abb. 45: Quantitative Analyse der Proteinexpression von CYR61 (A) und VEGF (B) 2 Wochen postoperativ, schwarze Balken nicht stabilisierte Gruppe (ns), weiße Balken stabilisierte Gruppe (s), Mittelwerte \pm SEM

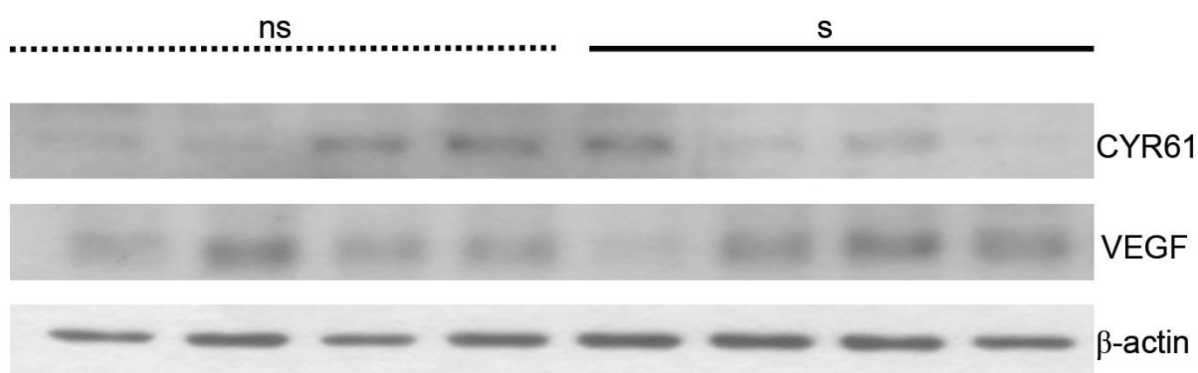


Abb. 46: Western-Blot-Analyse der Proteinexpression im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ, Expression von CYR61 und VEGF im Vergleich zwischen der nicht stabilisierten (ns) und stabilisierten (s) Gruppe

Die Expression von OPG ($10,2 \pm 2,2$ OD x mm² vs. $7,1 \pm 0,7$ OD x mm², $p > 0,05$) als auch von RANKL ($14,0 \pm 2,6$ OD x mm² vs. $12,1 \pm 1,2$ OD x mm², $p > 0,05$) war in der nicht stabilisierten Gruppe erhöht (Abb. 47, 48). Die Unterschiede waren jedoch nur geringfügig, sodass sich kein statistisch signifikanter Unterschied zeigte.

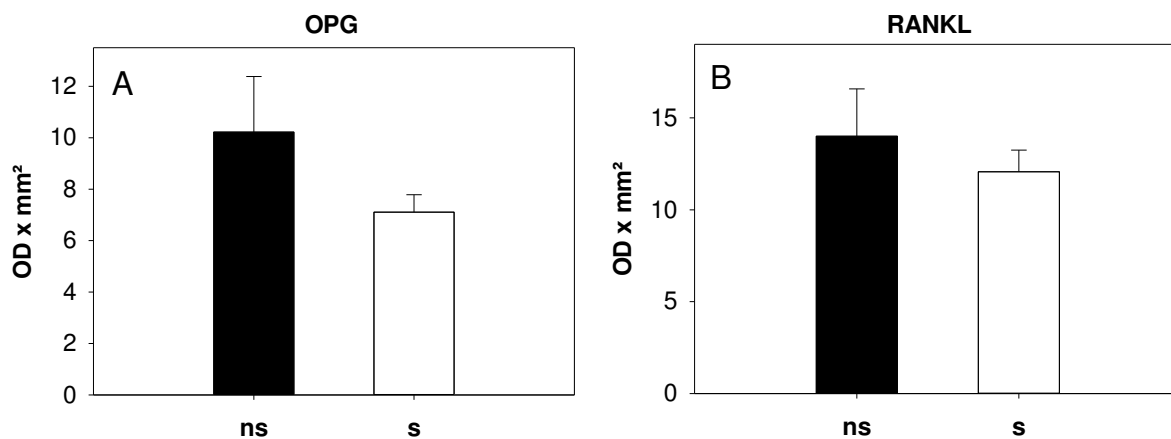


Abb. 47: Quantitative Analyse der Proteinexpression von OPG (A) und RANKL (B) 2 Wochen postoperativ, schwarze Balken nicht stabilisierte Gruppe (ns), weiße Balken stabilisierte Gruppe (s), Mittelwerte \pm SEM

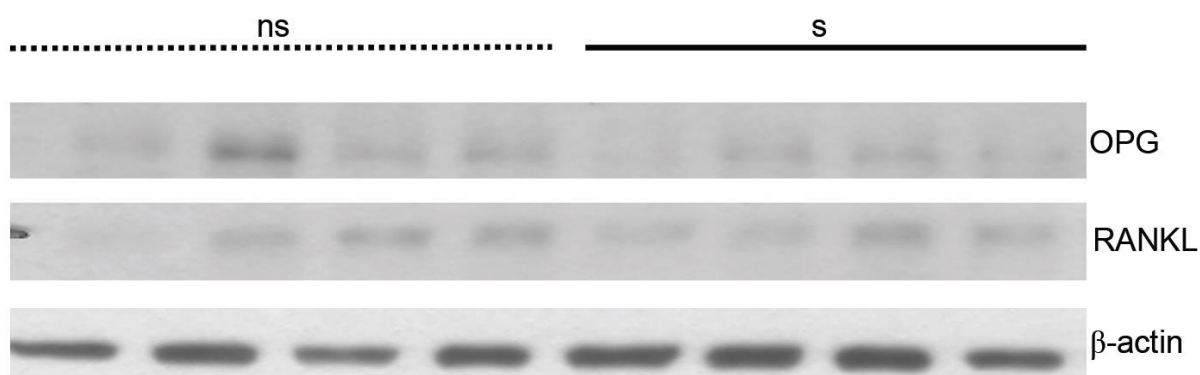


Abb. 48: Western-Blot-Analyse der Proteinexpression im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ. Expression von OPG sowie des Osteoklastenstimulators RANKL im Vergleich zwischen der nicht stabilisierten (ns) und stabilisierten (s) Gruppe

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

Die Mechanismen der Knochenregeneration sind bis dato immer noch nicht vollständig verstanden und Gegenstand zahlreicher Studien. Die bisherigen Erkenntnisse im Bereich der Grundlagenforschung bezüglich Ablauf und Zusammenspiel der beteiligten Zellen, Gewebe und Systeme stammen zu großen Teilen aus Untersuchungen am Tiermodell. Trotz der Bemühungen alternative Modelle, wie z.B. künstliche Organe oder in vitro Gewebemodelle zu entwickeln, ist das in vivo Tiermodell unverzichtbar zur Untersuchung der komplexen Mechanismen der Frakturheilung [Peric et al., 2014]. Grundsätzlich unterscheidet man Großtiermodelle, wie z. B. Schafe und Schweine, und Kleintiermodelle, wie Kaninchen, Ratten und Mäuse. In der hier vorliegenden Arbeit wurde das Mausmodell verwendet.

Der entscheidende Vorteil des Mausmodells liegt in dem bereits vollständig entschlüsselten Mausgenom. Studien an Mäusen, insbesondere genetisch modifizierten Stämme, eignen sich daher vor allem für Untersuchungen der molekularen Mechanismen der Knochenphysiologie und -regeneration [Ning et al., 2017]. Auch existieren für das Mausmodell verschiedene spezifische Antikörper [Rossant und Nagy, 1995]. Insgesamt tolerieren die meisten Mausstämme die chirurgischen Prozeduren gut und belasten z.B. die operierte Extremität in der Regel bereits innerhalb kurzer Zeit [Zhang et al., 2009].

Des Weiteren sind Studien im Mausmodell deutlich kostengünstiger im Vergleich zum Großtiermodell. So sind die Ausgaben sowohl bezüglich Anschaffungskosten als auch Haltung und Zucht der Tiere wesentlich niedriger als bei Großtiermodellen [Aalami et al., 2004]. Auch der Platzbedarf und der entsprechende Zeitaufwand für die Tierpflege sind geringer. Dadurch lassen sich größere Studiengruppen bilden, was letztendlich die Aussagekraft der Studien erhöht.

Von Nachteil ist die Knochenanatomie der Maus, welche die Vergleichbarkeit mit dem Menschen einschränkt. So bleiben zum Beispiel die Epiphysenfugen bei der Maus im Gegensatz zum Menschen oder anderen Großtieren offen. Zusätzlich findet sich ein im Vergleich wenig ausgeprägtes Trabekelwerk im Epiphysenbereich. Entscheidend ist, dass die Maus kein Havers-System besitzt [Gomes et al., 2011; Enlow, 1962; Miller et al., 1995; Frost, 1961]. Stattdessen erfolgt das Remodeling bei der Maus über sogenannte Resorptionshöhlen, deren Funktionsweise durchaus mit dem Havers-System vergleichbar ist [Nunamaker, 1998].

Neben den Rippen und vor allem der Tibia, bietet sich vor allem das Femur aufgrund seiner Größe und Form für Frakturstudien in der Maus an [Manigrasso und O'Connor, 2004]. Mit einer Länge von durchschnittlich nur 15 mm bei einem Durchmesser von 1,5 mm erfordert das Handling des Mausfemurs jedoch ein hohes Maß an operativem Geschick und gute technische Voraussetzungen [Holstein et al., 2007]. Der Vorteil des Femurmodells gegenüber des ebenfalls verwendeten Tibiamodells liegt in der besseren Weichteildeckung. Zudem kann die biomechanische Testung aufgrund des gleichmäßigen runden Querschnitts des Knochens reproduzierbarer durchgeführt werden. Im Gegensatz dazu zeigt die Tibia einen nach distal verjüngenden und dreieckigen Querschnitt [Cheung et al., 2003]. Zusätzlich muss bei Tibiamodellen die Fibula berücksichtigt werden, da eine zusätzliche Fraktur die Knochenregeneration signifikant beeinflusst [Shefelbine et al., 2005].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Knochenregeneration zum einen am Femurmodell nach operativer Versorgung mittels intramedullärer Schraube untersucht. Zum anderen erfolgte die Untersuchung der Knochenregeneration an nicht stabilisierten Femurfrakturen. Ein bereits in früheren Studien dargelegter Nachteil der nicht stabilisierten Frakturmodelle liegt in der fehlenden Kontrolle der mechanischen Gegebenheiten [Claes et al., 1998]. Die Standardisierung des sogenannten „mechanical environment“ ermöglicht es jedoch klare Rückschlüsse auf Zeitpunkte und Abläufe während der Knochenregeneration zu ziehen und ist mit der Frakturversorgung beim Menschen besser vergleichbar.

Vergleichbar mit einer früheren Arbeit von Le et al. [Le et al., 2001] wiesen in der vorliegenden Arbeit die nicht versorgten Femora sowohl in der adulten als auch in der geriatrischen Versuchsgruppe eine auffällige Dislokation der Frakturfragmente auf. Dabei zeigte sich meist eine Verkürzung des Femurs. In der hier vorliegenden Arbeit konnte in der nicht stabilisierten Gruppe ein verzögerter Remodelingprozess und eine signifikante Beeinflussung der Proteinexpression während der Frakturheilung gezeigt werden. Daher sollten, aufgrund der fehlenden Standardisierung der biomechanischen Gegebenheiten, solche Frakturmodelle nicht zur Analyse der Knochenheilung verwendet werden.

Sowohl bei den adulten Tieren als auch bei den geriatrischen Tieren wurde zur Stabilisierung der Femora eine intramedulläre Schraube, die sogenannte MouseScrew® (Holstein et al., 2009), verwendet. Sie wurde bereits in verschiedenen Arbeiten angewandt [Histing et al., 2011b; Histing et al., 2012c; Histing et al., 2012d; Histing et al., 2013; Histing et al., 2012b]. Durch die Versorgung über eine kleine Inzision im Bereich der Femurkondylen und der geschlossenen Frakturierung des Femurs mittels Guillotine gehört die intramedulläre Schraube zu den geschlossenen Frakturmodellen.

Der Vorteil gegenüber den früheren Frakturmodellen mittels Pin, einer einfachen Kanüle, die in das Femur eingebracht wird [Manigrasso und O'Connor, 2004; Timmen et al., 2014,] liegt in einer Kompression des Frakturspalts. Dadurch gewährleistet die Versorgung mittels Schraube eine axiale Stabilität sowie eine Rotationsstabilität [Histing et al., 2009; Holstein et al., 2009].

Des Weiteren erfolgt die Frakturierung des Femurs bei dem hier verwendeten Verfahren vor dem Einbringen des Osteosynthesematerials. Dadurch wird die Frakturkonfiguration nicht durch das Implantat beeinflusst. Zudem erfolgte keine Deformation des Implantats durch die Frakturierung. Der Weichteilschaden ist durch den minimalinvasiven Zugangsweg im Vergleich zu den offenen Frakturmodellen deutlich geringer.

Bei den offenen Verfahren wird das Femur über einen lateralen Zugangsweg freipräpariert. Die Osteotomie erfolgt dann zumeist mit einer Säge unter Sicht [Cheung et al., 2003; Garcia et al., 2008], was eine gute Reproduzierbarkeit der Fraktur ermöglicht. Von Nachteil ist jedoch eine mögliche Verletzung des Periostes durch den Sägevorgang und damit eine Beeinträchtigung der Frakturversorgung [Klein et al., 2015]. Eine offene Versorgung mit einem Fixateur externe oder Plattenosteosynthese ermöglicht durch die rigide Versorgung eine im Vergleich zu den geschlossenen Verfahren höhere Rotationsstabilität [Histing et al., 2009; Histing et al., 2011a]. Als nachteilig wird jedoch die erhöhte Infektionsgefahr infolge des größeren Weichteilschadens gesehen [Claes et al., 2006]. Die Besonderheit bei der Verwendung von Plattenosteosynthesen im Mausmodell liegt in der Möglichkeit, die intramembranöse Knochenregeneration ohne knorpelige Vorstufe [Histing et al., 2012b; Steck et al., 2011] zu untersuchen.

Die Untersuchungszeitpunkte wurden aufgrund der Erfahrung aus früheren Studien auf zwei Wochen postoperativ, zur Beurteilung der frühen Heilungsphase, und fünf Wochen postoperativ, zur Untersuchung der späten Heilungsphase, festgelegt [Bourque et al., 1992; Hiltunen et al., 1993b; Holstein et al., 2008; Histing et al., 2012c; Histing et al., 2011b, Histing et al., 2012b].

Zur mechanischen Analyse der Knochen werden zumeist 3-Punkt-Biegeversuche, 4-Punkt-Biegeversuche oder eine Rotationstestung durchgeführt. Die biomechanischen Eigenschaften des Knochens lassen sich in verschiedene Qualitäten unterteilen. Dabei bestimmt der kortikale Anteil in erster Linie die Zug-, Biege- und Torsionsfestigkeit wohingegen die Weiterleitung und Verteilung der einwirkenden Kräfte vornehmlich über die Spongiosa vermittelt wird [Athanasίου et al., 2000].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Knochen mittels 3-Punkt-Biegetestung untersucht. Mittels Prüfstempel im Bereich des diaphysären Knochens entsteht dabei eine

Druckspannung an der Seite der Auflagefläche sowie eine Zugspannung an der gegenüberliegenden Kortikalis [Turner und Burr, 1993]. Der Vorteil einer 3-Punkt-Biegemessung liegt in der simplen und damit gut reproduzierbaren Durchführung. Sie lässt sich zudem auch bei geringen Knochenlängen unter 20 mm, wie es bei dem hier verwendeten Mausfemur der Fall ist, durchführen. Des Weiteren wurde dieses Verfahren zur Reduktion der Tierzahl verwendet. Der Knochen bleibt bei nicht destruktiver Messung intakt und kann somit für weitere Untersuchungen verwendet werden. Im Vergleich dazu wird bei der Rotationstestung der Knochen bis zum Bruch maximal belastet. Ein Nachteil der 3-Punkt-Biegemessung liegt jedoch in der geringeren Kraftverteilung im Vergleich zur 4-Punkt-Biegemessung [Burstein und Frankel, 1971].

Deshalb bietet sich die 4-Punkt-Biegemessung insbesondere bei größeren Femurlängen an, da bei dieser Methode zwei Prüfstempel verwendet werden. Im Mausmodell ist diese Methode, aufgrund der geringen Größe des Femurs, schwer umsetzbar. Beiden Biegemessverfahren ist jedoch gemein, dass bereits geringe rotatorische Abweichungen zu Messungenauigkeiten führen können [Lind et al., 2001].

Im Gegensatz dazu kann die Rotationstestung auch bei geringen Abweichungen der Geometrie verwendet werden, da diese keine großen Auswirkungen auf die Messung der Rotationssteifigkeit haben, da Drehmomente gemessen werden, die sich auf das gesamte Femur verteilen [Lind et al., 2001].

Die histomorphometrische Differenzierung des Kallusgewebes wurde nach der Methode von Gerstenfeld et al. [Gerstenfeld et al., 2005] durchgeführt. Entsprechend der Empfehlungen der American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) erfolgte die Schnittführung der histologischen Präparate sagittal longitudinal auf Höhe des Frakturspalts sowie im Bereich des größtmöglichen Durchmessers des Oberschenkelknochens [Parfitt et al., 1987]. Durch die nur zweidimensionalen Schnittpräparate wird jedoch die Analyse der an sich dreidimensionalen Kallusstruktur erschwert. Dies ist bei der qualitativen und quantitativen Auswertung zu beachten.

Zur Gewinnung des Kallusgewebe für die proteinbiochemische Analyse wurde der Zeitpunkt zwei Wochen postoperativ gewählt, da fünf Wochen postoperativ infolge des fortgeschrittenen Remodelingprozesses in der Regel nicht mehr ausreichend Kallusgewebe gewonnen werden kann [Holstein et al., 2007].

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Frakturheilung in der adulten Maus

Die Ergebnisse konnten zeigen, dass eine fehlende Stabilisierung der Femurfrakturen bei adulten Mäusen das Remodeling und damit den Heilungsprozess deutlich verzögert. In der nicht stabilisierten Gruppe zeigte sich ein geringerer Anteil an Knochengewebe im Kallus während der frühen Heilungsphase sowie ein verzögerter Umbau von Geflechtknochen zu Lamellenknochen in der späten Heilungsphase. In der biomechanischen Testung zeigte sich zu beiden Untersuchungszeitpunkten eine signifikant geringere Biegesteifigkeit in der nicht stabilisierten Gruppe im Vergleich zur operativ stabilisierten Gruppe.

Nur wenige Studien haben bis dato den Einfluss der mechanischen Stabilität auf den Frakturheilungsprozess im Mausmodell untersucht. Le et al. [Le et al., 2001] untersuchten in im Mausmodell in erster Linie die molekularen Mechanismen. Sie konnten nachweisen, dass die Expression des Indian Hedgehog (ihh) Proteins, welches unter anderem die Chondrozytenmaturation reguliert, im Kallusgewebe der nicht stabilisierten Tiere im Vergleich zu den stabilisierten Tieren sowohl früher erfolgte als auch länger persistierte. 14 Tage nach dem Trauma zeigte sich bei den nicht stabilisierten Tieren eine beginnende Konversion des Knorpelgewebes in Geflechtknochen. Zudem zeigten sich noch Inseln aus hypertrophierten Chondrozyten. Letztere exprimierten vermehrt die Proteine Kollagen 2, Kollagen 10, ihh und das ihh induzierte BMP-6 sowie Glioma-associated oncogene family zinc finger protein 3 (gli3) [Le et al., 2001].

Im Gegensatz dazu wurde das Knorpelgewebe in der stabilisierten Gruppe 14 Tage postoperativ bereits größtenteils in Geflechtknochen umgewandelt. In dieser Gruppe konnte keine vermehrte Expression von ihh, BMP-6 und gli3 nachgewiesen werden [Le et al., 2001]. Diese Ergebnisse entsprechen der histologischen Analyse der hier vorliegenden Studie. Es konnte gezeigt werden, dass der Knorpelanteil in der nicht stabilisierten Gruppe signifikant höher war als in der stabilisierten Gruppe.

Le et al. [Le et al., 2001] schlussfolgerten, dass Chondrozyten im stabilisierten Frakturmodell schneller differenzieren. Sie konnten jedoch auf Grundlage ihrer histologischen Analyse nicht beobachten, dass bei dem Kallusgewebe der stabilisierten Frakturen ein schnelleres Remodeling als bei den nicht stabilisierten Frakturen erfolgt. 28 Tage postoperativ beschreiben sie zwar, dass das Kallusgewebe der stabilisierten Frakturen aus Geflechtknochen besteht, liefern jedoch keine Information darüber, wie die ossäre Zusammensetzung des Kallus der nicht stabilisierten Gruppe zu diesem Zeitraum ist. Zusätzlich findet sich in ihrer Studie weder eine quantitative histologische Analyse der

Kalluszusammensetzung noch eine biomechanische Testung des Knochens. Dementsprechend schlussfolgern sie, dass es ohne definierten histologischen Endpunkt, an dem eine Fraktur als verheilt betrachtet werden kann, keine Aussage zu treffen ist, ob stabilisierte Frakturen eine schnellere Knochengeneration zeigen als nicht stabilisierte Frakturen [Le et al., 2001].

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass eine adäquate Knochenheilung bei Mäusen mit Frakturen von langen Röhrenknochen vier bis fünf Wochen benötigt [Histing et al., 2011; Hiltunen et al., 1993]. Die histomorphologische Analyse der hier vorliegenden Arbeit zeigt jedoch, dass der Kallus, der nicht stabilisierten Frakturen nicht nur einen verminderten Anteil von Knochengewebe während der frühen Heilungsphase aufweist, sondern auch eine fehlende Umwandlung von Geflechtknochen zu Lamellenknochen zum Zeitpunkt der späten Phase zeigt.

Die histologischen Ergebnisse korrelieren diesbezüglich mit der biomechanischen Testung. 5 Wochen postoperativ konnte lediglich eine Biegesteifigkeit von 45 N/mm in der nicht stabilisierten Gruppe nachgewiesen werden. Dies entspricht ca. 50 % der Biegesteifigkeit, die in der stabilisierten Gruppe gemessen wurde. Aus anderen Studien ist bekannt, dass ein nicht frakturiertes Femur von CD-1 Mäusen eine Biegesteifigkeit von durchschnittlich etwa 115-120 N/mm erreicht [Histing et al., 2012b]. Die stabilisierten Femurfrakturen wiesen in der vorliegenden Arbeit 5 Wochen postoperativ bereits eine vergleichbare Biegesteifigkeit mit einem Mittelwert von 93 N/mm auf. Dementsprechend lässt sich aus der vorliegenden Arbeit schlussfolgern, dass operativ stabilisierte Femurfrakturen bei adulten CD1 Mäusen innerhalb von 5 Wochen postoperativ adäquat verheilen.

In der nicht stabilisierten Gruppe konnte 14 Tage postoperativ neben einem signifikant höheren Anteil von Knorpelgewebe im Kallus auch eine vermehrte Expression von Kollagen 2, einem frühen Marker der Chondrogenese, sowie eine verminderte Expression von Kollagen 10, einem Marker der späten Chondrogenese und Chondrozytenreifung, nachgewiesen werden.

Es ist hinreichend bekannt, dass mechanische Stimuli nicht nur die Frakturheilung beeinflussen, sondern auch Prozesse der Angiogenese und Vaskularisation [Lienau et al., 2005]. So untersuchte diese Arbeitsgruppe den Effekt der mechanischen Stabilität auf die Expression proangiogenetischer Wachstumsfaktoren sowie die Bildung von Blutgefäßen. Mittels einer in vitro Analyse konnten Ueda et al. [Ueda et al., 2004] nachweisen, dass Scherbewegungen an der Oberfläche von Endothelzellen, die sich ihrerseits auf einem Kollagengel befanden, das Wachstum eines mikrovaskulären Netzwerks begünstigen und expandieren. Lu et al. [Lu et al., 2011] untersuchten den Heilungsprozess von nicht

stabilisierten versus stabilisierten Tibiafrakturen bei erwachsenen Mäusen. Dabei konnten die Autoren zeigen, dass nicht stabilisierte Frakturen 3 Tage nach Trauma eine signifikant höhere Längen- und Oberflächendichte an Blutgefäßen besaßen.

Daraus schlussfolgerten Sie, dass durch die mechanische Instabilität die Angiogenese stimuliert wird, obwohl die Expression von VEGF zwischen der nicht stabilisierten und stabilisierten Studiengruppen zu den Zeitpunkten drei und zehn Tage nach Frakturierung nicht signifikant unterschiedlich war [Lu et al., 2011]. Im Gegensatz dazu konnte in der hier vorliegenden Studie gezeigt werden, dass 14 Tage postoperativ die Expression von VEGF im Kallusgewebe der nicht stabilisierten Frakturen im Vergleich zu den stabilisierten Frakturen signifikant vermindert war. Dies spricht für eine verminderte Vaskularisation in der nicht stabilisierten Gruppe.

Vergleichbar mit unseren Ergebnissen konnte Lienau et al. [Lienau et al., 2005 und 2009] zeigen, dass bei erwachsenen Schafen eine verminderte Anzahl an Blutgefäßen im Kallusgewebe sowie eine reduzierte VEGF Expression bei instabilen Tibiafrakturen im Vergleich zu rigide versorgten Tibiafrakturen nachweisbar waren. Abgesehen von der VEGF Expression und der Quantität der Bildung eines mikrovaskulären Netzwerks ist es jedoch vorstellbar, dass neugebildete Blutgefäße bei nicht stabilisierten Frakturen aufgrund starker Gewebespannungen, die durch eine Fragmentdislokation am Frakturspalt unter Belastung hervorgerufen werden, rupturieren. Dies könnte eine Ursache für die verzögerte Knochenheilung von nicht stabilisierten Frakturen darstellen.

Die CYR61 Expression im Kallus der nicht stabilisierten versus der Expression der stabilisierten Tiere war zwar erhöht, jedoch nicht signifikant. Ursächlich dafür ist möglicherweise die Tatsache, dass das CYR61 Protein nicht nur die Angiogenese beeinflusst, sondern auch die Differenzierung des Knorpelgewebes fördert. Hadjiargyrou et al. [Hadjiargyrou et al., 2000] konnten zeigen, dass die CYR61 Expression mit einer aktiven Chondrogenese korreliert. Dies konnten sie im Rattenmodell mit Femurfrakturen nachweisen.

Zu den Zeitpunkten drei und fünf Tage postoperativ ergaben sich bereits eine erhöhte Expression, nach sieben, respektive zehn Tagen zeigte sich ein Peak mit wieder abfallenden Werten nach 14 und 21 Tagen. Daher könnte, die in der vorliegenden Studie an Tag 14 erhöhte Expression von CYR61 in der nicht stabilisierten Gruppe, mit der verlängerten chondralen Heilungsphase bedingt sein.

Die Expression der Marker RANKL/RANK und OPG wurde durch die fehlende Stabilisierung der Femurfrakturen nicht signifikant beeinträchtigt. Die mechanische Instabilität der nicht stabilisierten Frakturen war mit einer lediglich gering verminderten OPG Expression

assoziiert. Die RANKL Expression unterschied sich zwischen beiden Gruppen ebenfalls nicht signifikant. Die in dieser Studie nachgewiesene verzögerte Regeneration bei nicht stabilisierten Femurfrakturen ist also wahrscheinlich nicht auf eine Beeinträchtigung der Marker, die die Osteoklastogenese beeinflussen, zurückzuführen.

Des Weiteren sollte eine ausbleibende Versorgung von Femurfrakturen hinsichtlich des Tierschutzes kritisch betrachtet werden. Während der frühen postoperativen Phase sind die Tiere aufgrund mangelnder Stabilität und daraus resultierenden Schmerzen in ihrem Bewegungsumfang merklich eingeschränkt. Davon abgesehen könnte die mechanische Instabilität durch eine exzessive Fragmentdislokation auch zu repetitiven Weichteilschäden führen. Aus ethischer Sicht und im Sinne einer artgerechten Tierhaltung ist die Verwendung eines Tiermodells mit nicht stabilisierten Femurfrakturen bei Mäusen daher abzulehnen.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass nicht stabilisierte Femurfrakturen den Frakturheilungsprozess negativ beeinflussen und den Heilungsprozess verzögern. Aus diesem Grund sollten nicht stabilisierte Frakturmodelle zur Untersuchung der Frakturheilung keine Verwendung finden.

5.2.2 Frakturheilung in der geriatrischen Maus

Die Ergebnisse der Studie konnten zeigen, dass die Frakturheilung in der nicht stabilisierten Gruppe signifikant verzögert war. Dies spiegelt sich sowohl in der Größe des Kallusvolumens als auch in dem geringeren prozentualen Anteil an Knochengewebe und der Persistenz des Knorpelgewebes im Kallus wider. Interessanterweise unterschied sich die Proteinexpression der angiogenen, osteogenen und chondrogenen Marker nicht. Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen bei den adulten Mäusen.

Bei jungen, adulten Mäusen beansprucht eine adäquate Knochenregeneration einen Zeitraum von vier bis fünf Wochen [Histing et al., 2011, Lu et al., 2005]. Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass sich mit zunehmendem Alter der Zeitraum bis zur Durchbauung des Frakturspalts verlängert [Meyer et al., 2001], was mit einer verzögerten Knochenheilung einhergeht [Meyer et al., 2006, Lu et al., 2005, Lu et al., 2008, Lopas et al., 2014, Yukata et al., 2014]. Diese Erkenntnisse sind auch mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit vergleichbar. Dies zeigt sich vor allem in der geringeren biomechanischen Steifigkeit von nur 40 % im Vergleich zum gesunden kontralateralen Femur. Somit ist die Frakturheilung 5 Wochen postoperativ bei den geriatrischen Mäusen noch nicht abgeschlossen.

Insgesamt war 2 Wochen postoperativ in der nicht stabilisierten Gruppe die Biegesteifigkeit im Vergleich zur operativ stabilisierten Gruppe signifikant vermindert. Der Grund dafür ist am ehesten in dem zu diesem Zeitpunkt signifikant niedrigeren prozentualen Anteil an Knochengewebe im Kallus zu sehen. Auch nach 5 Wochen zeigte sich immer noch ein signifikant geringerer Knochenanteil im Kallus. Die Biegesteifigkeit in beiden Gruppen war jedoch zu diesem Zeitpunkt vergleichbar. Eine mögliche Erklärung dafür könnte das deutlich höhere Kallusvolumen der nicht stabilisierten Gruppe sein.

Der Einfluss der Stabilität auf die Frakturheilung spiegelt sich auch in den Ergebnissen von Lienau et al. [Lienau et al., 2005] wider. In der Studie wurde bei Schafen die Heilung von Tibiafrakturen verglichen. In einer Gruppe wurden die Tibiafrakturen mit einer hochgradigen Instabilität in der Rotationsachse versorgt. In der anderen Gruppe erfolgte eine rigide Versorgung mittels Fixateur externe. Nach einem sechswöchigen Beobachtungszeitraum ließ sich ebenfalls eine signifikante Minderung von mineralisiertem Knochengewebe sowie eine konsekutiv erhöhte Bindegewebsfraktion bei ebenfalls signifikant geringerer Steifigkeit des Kallus in der instabilen Gruppe nachweisen. Nach neunwöchigem Beobachtungszeitraum war die Steifigkeit in beiden Gruppen vergleichbar.

Strube et al. [Strube et al., 2008] und Metha et al. [Metha et al., 2010] analysierten die Knochenheilung bei alten Ratten und verglichen dabei eine rigide operative Frakturversorgung mit einer semi-rigiden Versorgung. Nach sechs Wochen konnten die Autoren in beiden Studien keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Steifigkeit und Kallusmineralisation nachweisen. Aufgrund der unterschiedlichen Tiermodelle können die Ergebnisse jedoch nur eingeschränkt beurteilt werden. In der Studie an Ratten wurde ein Knochendefekt von 1,5 mm nach offener Osteotomie sowie eine unterschiedliche Rigidität des verwendeten Implantates untersucht. In der hier vorliegenden Studie wurde hingegen ein geschlossenes Femurfrakturmodell der Maus verwendet. Verglichen wurde die Frakturheilung ohne Stabilisierung der Fraktur mit einer semi-rigiden Versorgung mittels intramedullärer Schraube.

Interessanterweise hatte der Einfluss der Stabilität der Frakturversorgung bei den alten Mäusen keinen Einfluss auf die Proteinexpression. Sowohl die Expression der osteogenen und chondrogenen Marker wie BMP-2, BMP-4, Kollagen 2 und Kollagen 10 als auch die Marker RANKL und OPG, die während des Remodelings exprimiert werden, waren in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Anhand der Ergebnisse lässt sich sagen, dass die verzögerte Heilung nicht durch den Einfluss der untersuchten Wachstumsfaktoren bedingt ist.

Eine ausreichende und adäquate Blutversorgung wird als notwendige Voraussetzung für die Knochenregeneration betrachtet. Die Neoangiogenese und Vaskularisation werden im Rahmen der Frakturheilung auch durch mechanische Stimuli beeinflusst. So untersuchten Lu et al. [Lu et al., 2011] die frühe Vaskularisation des Gewebes sowie die Expression der angiogenen Marker bei nicht stabilisierten und rigide stabilisierten Tibiafrakturen bei Mäusen. Vergleichbar mit den in dieser Arbeit vorliegenden Daten zeigte sich zu den Zeitpunkten drei und zehn Tage nach Trauma kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der VEGF Expression zwischen stabilisierten und nicht stabilisierten Frakturen.

Im Gegensatz dazu konnten Lienau et al. [Lienau et al., 2005 und 2009] bei erwachsenen Schafen eine verminderte Anzahl an Blutgefäßen im Kallusgewebe sowie eine verminderte VEGF Expression bei instabilen Tibiafrakturen im Vergleich zu rigide versorgten Tibiafrakturen nachweisen.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie zeigen, dass bei geriatrischen Mäusen die mechanische Stabilität im Frakturspalt keinen Einfluss auf die Genexpression von VEGF und CYR61 hat. Die Expression der pro-angiogenetischen Proteine VEGF und CYR61 unterschied sich im Kallusgewebe der nicht stabilisierten Studiengruppe nicht signifikant von der Expression in der stabilisierten Studiengruppe.

Es kann jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden, ob eine Beeinflussung der Vaskularisation durch mechanische Einflussfaktoren nicht trotzdem für die verzögerte Knochenregeneration in der nicht stabilisierten Gruppe verantwortlich sein könnte. Bisherige Studien konnten zeigen, dass übermäßige interfragmentäre Bewegungen die Bildung von Blutgefäßen im periostalen Kallusanteil vermindert [Claes et al., 2002]. Möglicherweise behindern Scherbewegungen im interfragmentären Bereich das longitudinale Wachstum der Blutgefäße zur Überbrückung des Frakturspalts [Augat et al., 2003]. Daraus resultiert eine insuffiziente Blutversorgung trotz einer adäquaten Expression angiogenetischer Wachstumsfaktoren. Dadurch erklärt sich möglicherweise die bei nicht stabilisierten Frakturen verzögerte Knochenheilung im Tiermodell mit alten Mäusen.

5.3 Schlussfolgerungen

Sowohl bei adulten Mäusen als auch bei geriatrischen Mäusen zeigte sich, dass die fehlende Stabilisierung, und damit die mechanische Instabilität im Frakturspalt, zu einer signifikant verzögerten Knochenheilung führt. Entsprechend dem verzögerten Remodelingprozess war in der nicht stabilisierten Gruppe das Kallusvolumen signifikant größer. Des Weiteren zeigte sich ein verminderter Knochenanteil mit Persistenz von Knorpelgewebe im Kallus.

Interessanterweise hatte die mechanische Stabilität bei den geriatrischen Mäusen keinen Einfluss auf die Genexpression osteogener, chondrogener und angiogener Wachstumsfaktoren. Bei den adulten Mäusen zeigte sich in der nicht stabilisierten Gruppe eine signifikant geringere Expression des angiogenen Markers VEGF.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nicht stabilisierte Frakturmodelle zur Untersuchung der Frakturheilung nicht verwendet werden sollten, da sie selbst den Heilungsprozess signifikant beeinträchtigen.

6. Literaturverzeichnis

Aalami OO, Nacamuli RP, Lenton KA, Cowan CM, Fang TD, Fong KD, Shi YY, Song HM, Sahar DE and Longaker MT (2004) Applications of a mouse model of calvarial healing: Differences in regenerative abilities of juveniles and adults. *Plast Reconstr Surg* 114: 713-720

Al-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (2008) Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res* 87:107-118

Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al. (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390:175-9

Athanasίου KA, Zhu C, Lanctot DR, Agrawal CM, Wang X (2000) Fundamentals of biomechanics in tissue engineering of bone. *Tissue Eng* 6:361-381

Augat P, Burger J, Schorlemmer S, Henke T, Peraus M, Claes L. (2003) Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model. *J Orthop Res* 21:1011-7

Bab IA, Hajibi-Yonissi C, Gabet Y, Müller R. (2007) *Micro-Tomographic Atlas of the Mouse Skeleton*. Springer Science and Business Media

Beckmann R, Tohidnezhad M, Lichte P, Wruck CJ, Jahr H, Pape HC, Pufe T (2014) New From Old: Relevant Factors for Fracture Healing in Aging Bone. *Orthopäde* 43:298-305

Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA, Longaker MT (2002) Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg* 109: 2384-2397

Bourque WT, Gross M, Hall BK (1992) A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Lab Anim Sci* 42:369-374

Braun W, Rüter A (1996) Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects. *Unfallchirurg* 99:59-67

Brighton CT & Hunt RM (1997) Early histologic and ultrastructural changes in microvessels of periosteal callus. *J Orthop Trauma* 11:244-253

Buckwalter JA (1996) Effects of early motion on healing of musculoskeletal tissues. *Hand Clin* 12:13-24

Burstein AH, Frankel VH (1971) A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech* 4: 155-158

Carlevaro MF, Cermelli S, Cancedda R, Descalzi Cancedda F (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci* 113:59-69

Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK (2011) A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J* 11:471-91

Chen D, Harris MA, Rossini G, Dunstan CR, Dallas SL, Feng JQ, Mundy GR, Harris SE (1997) Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP- 4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 60:283-290

Cheung KMC, Kaluarachi K, Andrew G, Lu W, Chan D, Cheah KSE (2003) An externally fixed femoral fracture model for mice. *J Orthop Res* 21:685-690

Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D, Seidl W, Margevicius KJ, Augat P. (1998) Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clin Orthop Relat Res.* 355Suppl:132-47.

Claes L, Eckert-Hübner K, Augat P (2002) The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J Orthop Res.* 20:1099-105

Claes L, Maurer-Klein N, Henke T, Gerngross H, Melnyk M, Augat P (2006) Moderate soft tissue trauma delays new bone formation only in the early phase of fracture healing. *J Orthop Res* 24:1178-1185

Corselli M, Chen C-W, Crisan M, Lazzari L, Péault B (2010) Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:1104-1109

Cohen, T, Nahari D, Cerem L, Neufeld G, Levi B (1996) Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 271:736-741

Colnot C, Thompson Z, Miclau T, Werb Z, Helms JA (2003) Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development* 130:4123-4133

Einhorn T (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 355Suppl:7-21

Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, Kagel EM, Bouxsein ML, Turek TJ, Wozney JM (2003) A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am* 85:1425-1435

Enlow DH (1962) Functions of the Haversian system. *Am J Anat* 110:269-305

Ferretti C, Ripamonti U, Tsiridis E, Kerawala CJ, Mantalaris A, Heliotis M (2010) Osteoinduction: translating preclinical promise into clinical reality. *Br J Oral Maxillofac Surg* 48:536-9

Frey SP1, Doht S, Eden L, Dannigkeit S, Schuetze N, Meffert RH, Jansen H (2012) Cysteine-rich matricellular protein improves callus regenerate in a rabbit trauma model. *Int Ortho* 36:2387-93

Frost HM (1961) Human Haversian system measurements. *Henry Ford Hosp Med Bull* 9:145-7

Fu R, Selph S, McDonagh M, Peterson K, Tiwari A, Chou R, Helfand M (2013) Effectiveness and harms of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spine fusion: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 158:890-902

Gao X, Usas A, Lu A, Tang Y, Wang B, Chen CW, Li H, Tebbets JC, Cummins JH and Huard J (2013) BMP2 is superior to BMP4 for promoting human muscle-derived stem cell-mediated bone regeneration in a critical-sized calvarial defect model. *Cell transplantat* 22:2393-2408

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* 41:1689-1696

Garcia P, Herwerth S, Matthys R, Holstein JH, Histing T, Menger MD, Pohlemann T (2011) The LockingMouseNail-a new implant for standardized stable osteosynthesis in mice. *J Surg Res* 169:220-226

Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL et al (2003) Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 88:873-884

Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA (2005) Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. *J Bone Miner Res* 20:1715-22

Giannoudis PV, Ahmad MA, Mineo GV, Tosounidis TI, Calori GM, Kanakaris NK (2013) Subtrochanteric fracture non-unions with implant failure managed with the "Diamond"concept. *Injury* 44:76-81

Goldberg V, Powell A, Shaffer J (1985) Bone grafting: Role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res* 3:389

Gomes PS, Fernandes MH (2011) Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim* 45:14-24

Gröngröft I, Heil P, Matthys R, Lezuo P, Tami A, Perren S, Montavon P, Ito K (2009) Fixation compliance in a mouse osteotomy model induces two different processes of bone healing but does not lead to delayed union. *J Biomech* 42:2089-96

Gruber R, Koch H, Doll BA, Tegtmeier F, Einhorn TA, Hollinger JO (2006) Fracture healing in the elderly patient. *Exp Gerontol* 41:1080-93

Hadijargyrou M, Ahrens W, Rubin CT (2000) Temporal expression of the chondrogenic and angiogenic growth factor CYR61 during fracture repair. *J Bone Miner Res* 15:1014-1023

Hebb JH, Ashley JW, McDaniel L, Lopas LA, Tobias J, Hankenson KD, Ahn J (2017) Bone healing in an aged murine fracture model is characterized by sustained callus inflammation and decreased cell proliferation. *J Orthop Res* doi: 10.1002/jor.23652

Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT (1993a) A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res* 11:305-312

Hiltunen A, Aro HT, Vuorio E (1993b) Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice. *Clin Orthop Relat Res* 297:23-27

Hirao M, Tamai N, Tsumaki N, Yoshikawa H, Myoui A (2006) Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification. *J Biol Chem* 281:31079-31092

Histing T, Holstein J, Garcia P, Matthys R, Kristen A, Claes L, Menger M, Pohlemann T (2009) Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture. *J Orthop Res* 27:1152-1156

Histing T, Garcia P, Matthys R, Leidinger M, Holstein JH, Kristen A, Pohlemann T, Menger MD (2010) An internal locking plate to study intramembranous bone healing in a mouse femur fracture model. *J Orthop Res* 28:397-402

Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke MW, Wehner T, Bindl R, Recknagel S, Stuermer EK, Vollmar B, Wildemann B, Lienau J, Willie B, Peters A, Ignatius A, Pohlemann T, Claes L, Menger MD (2011a) Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 49:591-9

Histing T, Marciniak K, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger MD (2011b) Sildenafil accelerates fracture healing in mice. *J Orthop Res* 29:867-873

Histing T, Stenger D, Kuntz S, Scheuer C, Tami A, Garcia P, Holstein J, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2012a) A new model to analyze metaphyseal bone healing in mice. *J Surg Res* 178:715-721

Histing T, Stenger D, Scheuer C, Metzger W, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2012b) Pantoprazole, a proton pump inhibitor, delays fracture healing in mice. *Calcif Tissue Int* 90:507-514

Histing T, Anton C, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger MD (2012c) Melatonin impairs fracture healing by suppressing RANKL-mediated bone remodeling. *J Surg Res* 173:83-90

Histing T, Stenger D, Kuntz S, Scheuer C, Tami A, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2012d) Increased Osteoblast and Osteoclast Activity in Female Senescence-Accelerated, Osteoporotic SAMP6 Mice During Fracture Healing. *J Surg Res* 175:271-277

Histing T, Kuntz S, Stenger D, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2013) Delayed fracture healing in aged senescence accelerated p6 mice. *J Invest Surg* 26:30-35

Hofbauer LC, Schoppet M (2004) Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA* 292:490-5

Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T (2007a) Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech* 40:215-219

Holstein JH, Menger MD, Scheuer C, Meier C, Culemann U, Wirbel RJ, Garcia P, Pohlemann T (2007b) Erythropoietin (EPO): EPO-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing. *Life Sci* 80:893-900

Holstein JH, Klein M, Garcia P, Histing T, Culemann U, Pizanis A, Laschke MW, Scheuer C, Meier C, Schorr H, Pohlemann T und Menger MD (2008) Rapamycin affects early fracture healing in mice. *Br J Pharmacol* 154:1055-1062

Holstein J, Matthys R, Histing T, Becker S, Fiedler M, Garcia P, Meier C, Pohlemann T, Menger MD (2009) Development of a stable closed femoral fracture model in mice. *J Surg Res* 153:71-75

Huang L, Liu S, Song T, Zhang W, Fan J, Liu Y (2017) Blockade of Interleukin 6 by Rat Anti-mouse Interleukin 6 Receptor Antibody Promotes Fracture Healing. *Biochemistry (Mosc)* 82:1193-1199

Iyer SS, Rojas M (2008) Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. *Expert Opin Biol Ther* 8:569-582

Junqueira LC, Carneiro J, Gratzl M (2006) *Histologie*, Springer Verlag, Berlin

Klaushofer K, Peterlik M (1994) Pathophysiology of fracture healing. *Radiologe* 34:709-14

Klein M, Stieger A, Stenger D, Scheuer C, Holstein JH, Pohlemann T, Menger MD, Histing T (2015) Comparison of healing process in open osteotomy model and open fracture model: Delayed healing of osteotomies after intramedullary screw fixation. *J Orthop Res* 33:971-978

Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM (2000) Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today* 21:495-502.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165-76

Lettin AW (1965) The effects of axial compression on the healing of experimental fractures of the rabbit tibia. *Proc R Soc Med* 58:882-886

Le AX, Miclau T, Hu D, Helms JA (2001) Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures. *J Orthop Res* 19:78-84

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* 23:639-45

Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Haschke F, Duda GN, Perka C, Bail HJ, Schütze N, Jakob F, Schell H (2009) Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. *J Orthop Res* 27:1133-40

Lind PM, Lind L, Larsson S, Orberg J (2001) Torsional testing and peripheral quantitative computed tomography in rat humerus. *Bone* 29:265-270

Lopas LA, Belkin NS, Mutyaba PL, Gray CF, Hankenson KD, Ahn J (2014) Fractures in geriatric mice show decreased callus expansion and bone volume. *Clin Orthop Relat Res* 472:3523-32

Lu C, Miclau T, Hu D, Hansen E, Tsui K, Puttlitz C, Marcucio RS (2005) Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *J Orthop Res* 23:1300-7

Lu C, Hansen E, Sapozhnikova A, Hu D, Miclau T, Marcucio RS (2008) Effect of age on vascularization during fracture repair. *J Orthop Res* 26:1384-9

Lu C, Saless N, Hu D, Wang X, Xing Z, Hou H, Williams B, Swartz HM, Colnot C, Miclau T, Marcucio RS (2011) Mechanical stability affects angiogenesis during early fracture healing. *J Orthop Trauma* 25:494-499.

Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, Wang J, Tuder RM, Voelkel NF (1998) In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am J Physiol* 275:1054-1061

Manigrasso M, O'Connor J (2004) Characterization of a closed femurfracture model in mice. *J Orthop Trauma* 18:687-695

Marcucio RS (2011) Mechanical stability affects angiogenesis during early fracture healing. *J Orthop Trauma* 25:494-499

Marsell R, Einhorn T (2011) The biology of fracture healing. *Injury* 42:551-555

Mehta M, Strube P, Peters A, Perka C, Hutmacher D, Fratzl P, Duda GN (2010) Influences of age and mechanical stability on volume, microstructure, and mineralization of the fracture callus during bone healing: is osteoclast activity the key to age-related impaired healing? *Bone* 47:219-228

Meyer RA Jr, Tsahakis PJ, Martin DF, Banks DM, Harrow ME, Kiebzak GM (2001) Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *J Orthop Res* 19:428-435

Meyer RA Jr, Meyer MH, Tenholder M, Wondracek S, Wasserman R, Garges P (2003) Gene expression in older rats with delayed union of femoral fractures. *J Bone Joint Surg Am* 85:1243-1254

Meyer RA Jr, Desai BR, Heiner DE, Fiechtl J, Porter S, Meyer MH (2006) Young, adult, and old rats have similar changes in mRNA expression of many skeletal genes after fracture despite delayed healing with age. *J Orthop Res* 24:1933-1944

- Mi M, Jin H, Wang B, Yukata K, Sheu TJ, Ke QH, Tong P, Im HJ, Xiao G, Chen D (2013) Chondrocyte BMP2 signaling plays an essential role in bone fracture healing. *Gene* 512:211-218
- Miller SC, Bowman BM, Jee WS (1995) Available animal models of osteopenia - small and large. *Bone* 17:117-123
- Mora G, Forriol F (2000) Mechanical analysis of the healing of different osteotomies fixed externally. *Int Orthop* 24:295-298
- Naik AA, Xie C, Zuscik MJ, Kingsley P, Schwarz EM, Awad H, Guldberg R, Drissi H, Puzas JE, Boyce B, Zhang X, O'Keefe RJ (2009) Reduced COX-2 expression in aged mice is associated with impaired fracture healing. *J Bone Miner Res* 24:251-264
- Ning B, Zhao Y, Buza lli JA, Li W, Wang W, Jia T (2017) Surgically-induced mouse models in the study of bone regeneration: Current models and future directions (Review). *Mol Med Rep* 15:1017-1023
- Nunamaker DM (1998) Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 355Suppl:56-65
- 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
- Obermeyer TS, Yonick D, Lauing K, Stock S, Nauer R, Strotman P, Shankar R, Gamelli R, Stover M, Callaci JJ (2012) Mesenchymal stem cells facilitate fracture repair in an alcohol-induced impaired healing model. *J Orthop Trauma* 26:712-718
- O'Brien TP, Yang GP, Sanders L, Lau LF (1990) Expression of *cyr61*, a growth factor-inducible immediate-early gene. *Mol Cell Biol* 10:3569-3577
- Ode A, Duda GN, Geissler S, Pauly S, Ode JE, Perka C, Strube P (2014) Interaction of age and mechanical stability on bone defect healing: an early transcriptional analysis of fracture hematoma in rat. *PLoS One* 9:e106462
- Orth M, Kruse NJ, Braun BJ, Scheuer C, Holstein JH, Khalil A, Yu X, Murphy WL, Pohlemann T, Laschke MW, Menger MD (2017) BMP-2-coated mineral coated microparticles improve bone repair in atrophic non-unions. *Eur Cell Mater* 33:1-12
- Panteli M, Pountos I, Jones E, Giannoudis PV (2015) Biological and molecular profile of fracture non-union tissue: current insights. *J Cell Mol Med* 19:685-713

- Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987) Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR histomorphometry nomenclature committee. *J Bone Miner Res* 2:595-610
- Peric M, Dumic-Cule I, Grcevic D, Matijasic M, Verbanac D, Paul R, Grgurevic L, Trkulja V, Bagi CM, Vukicevic S (2014) The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies. *Bone* 70:73-86
- Perren, S (1992) Biomechanische Grundlagen der Frakturbehandlung. *Orthopäde* 21:3-10
- Pi CJ, Liang KL, Ke ZY, Chen F, Cheng Y, Yin LJ, Deng ZL, He BC, Chen L (2016) Adenovirus-mediated expression of vascular endothelial growth factor- α potentiates bone morphogenetic protein-9-induced osteogenic differentiation and bone formation. *Biol Chem* 397:765-775
- Probst A, Spiegel HU (1997) Cellular mechanisms of bone repair. *J Invest Surg* 10:77-86
- Pufe T, Wildemann B, Petersen W, Mentlein R, Raschke M, Schmidmaier G (2002) Quantitative measurement of the splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor in the time flow of fracture healing: a study in the rat. *Cell Tissue Res* 309:387-392
- Reis FB, Hungria Neto JS, Pires RES (2005). Pseudoarthrose. *Rev Bras Ortop* 40:79-88
- Remedios A (1999) *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29:1029-44
- Rhineland FW (1974) Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin Orthop* 105:34-81
- Ronga M, Fagetti A, Canton G, Pausco E, Surace MF, Cherubino P (2013) Clinical applications of growth factors in bone injuries: experience with BMPs. *Injury* 44:34-39
- Rossant J, Nagy A (1995) Genome engineering: the new mouse genetics. *NatMed* 1:592–594
- Rueter, A., Trentz, O, Wagner M (2004) *Unfallchirurgie*. 2. Auflage, Urban & Fischer, Elsevier.
- Savaridas T, Wallace RJ, Muir AY, Salter DM, Simpson AH (2012) The development of a novel model of direct fracture healing in the rat. *Bone Joint Res*. 1:289-296
- Schell H, Epari DR, Kassi JP, Bragulla H, Bail HJ, Duda GN (2005) The course of bone healing is influenced by the initial shear fixation stability. *J Orthop Res* 23:1022-1028

Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K (1997) Anatomie. 7. Aufl. Springer- Verlag Berlin Heidelberg

Schiebler T, Korf HW (2007) Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie, Steinkopff Verlag Heidelberg

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science 219:983-985

Shelfbine SJ, Augat P, Claes L, Beck A (2005) Intact fibula improves fracture healing in a rat tibia osteotomy model. J Orthop Res 23:489-493

Simmonds MC, Brown JV, Heirs MK, Higgins JP, Mannion RJ, Rodgers MA, Stewart LA (2013) Safety and effectiveness of recombinant human bone morphogenetic protein-2 for spinal fusion: a meta-analysis of individual-participant data. Ann Intern Med 158:877-889

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell 89:309-319

Slade Shantz JA, Yu YY, Andres W, Miclau T 3rd, Marcucio R (2014) Modulation of macrophage activity during fracture repair has differential effects in young adult and elderly mice. J Orthop Trauma. 28Suppl1:10-14

Steck R, Ueno M, Gregory L, Rijken N, Wullschleger ME, Itoman M, Schuetz MA (2011) Influence of internal fixator flexibility on murine fracture healing as characterized by mechanical testing and microCT imaging. J Orthop Res 29:1245-1250

Strube P, Sentuerk U, Riha T, Kaspar K, Mueller M, Kasper G, Matziolis G, Duda GN, Perka C (2008) Influence of age and mechanical stability on bone defect healing: age reverses mechanical effects. Bone 42:758-764.

Su JL, Chiou J, Tang CH, Zhao M, Tsai CH, Chen PS, Chang YW, Chien MH, Peng CY, Hsiao M, Kuo ML, Yen ML. (2010) CYR61 regulates BMP-2-dependent osteoblast differentiation through the $\alpha\beta3$ integrin/integrin-linked kinase/ERK pathway. J Biol Chem 285:31325-36

Timmen M, Hidding H, Wieskötter B, Baum W, Pap T, Raschke MJ, Schett G, Zwerina J, Stange R (2014) Influence of antiTNF-alpha antibody treatment on fracture healing under chronic inflammation. *BMC Musculoskelet Disord* 15:184

Tonna EA, Cronkite EP (1963) The periosteum. Autoradiographic studies on cellular proliferation and transformation utilizing tritiated thymidine. *Clin Orthop Relat Res* 30:218-233

Trebsdorf M (2002) *Biologie, Anatomie, Physiologie*, 7. Auflage, Lau Verlag Reinbek

Turner CH, Burr DB (1993) Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 14:595-608

Ueda A, Koga M, Ikeda M, Kudo S, Tanishita K (2004) Effect of shear stress on microvessel network formation of endothelial cells with in vitro three-dimensional model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:994-1002

Urist MR (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893-899

Veneroni G, Boccadoro B, Pluchino F (1962) Fixation of P-32 in the focus of a fracture and in osseous callus in the long bones in rabbits. *Arch Ortop* 75:1338-1341

Wei X, Egawa S, Matsumoto R, Yasuda H, Hirai K, Yoshii T, Okawa A, Nakajima T, Sotome S. (2017) Augmentation of fracture healing by hydroxyapatite/collagen paste and bone morphogenetic protein-2 evaluated using a rat femur osteotomy model. *J Orthop Res*. doi: 10.1002/jor.23646

Weiss S, Zimmermann G, Pufe T, Varoga D, Henle P (2009) The systemic angiogenic response during bone healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 129:989-997

Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS 3rd, Frankel WN, Lee SY, Choi Y (1997) TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates C-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem* 272:25190-4.

Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ (2009) RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2:56-64

Yang X, Ricciardi B, Hernandez-Soria A, Shi Y, Camacho N, Bostrom M (2007) Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone* 41:928-936

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, Mochizuki SI, Tsuda E, Morinaga T, Udagawa N, Takahashi N, Suda T, Higashio K (1999) A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function. *Bone* 25:109-113

Yu YY, Lieu S, Hu D, Miclau T, Colnot C (2012) Site specific effects of zoledronic acid during tibial and mandibular fracture repair. *PLoS One* 7:e31771

Yukata K, Xie C, Li TF, Takahata M, Hoak D, Kondabolu S, Zhang X, Awad HA, Schwarz EM, Beck CA1, Jonason JH, O'Keefe RJ (2014) Aging periosteal progenitor cells have reduced regenerative responsiveness to bone injury and to the anabolic actions of PTH 1-34 treatment. *Bone* 62:79-89

Yun YR, Jang JH, Jeon E, Kang W, Lee S, Won JE, Kim HW, Wall I (2012) Administration of growth factors for bone regeneration. *Regen Med* 7:369-385

Zhang T, Yu H, Gong W, Zhang L, Jia T, Wooley PH, Yang SY (2009) The effect of osteoprotegerin gene modification on wear debris-induced osteolysis in a murine model of knee prosthesis failure. *Biomaterials* 30:6102-6108

Zhang Y, Sheu TJ, Hoak D, Shen J, Hilton MJ, Zuscik MJ, Jonason JH, O'Keefe RJ (2016) CCN1 Regulates Chondrocyte Maturation and Cartilage Development. *J Bone Miner Res* 31:549-559

7. Publikationen

Histing T, **Heerschop K**, Klein M, Scheuer C, Stenger D, Holstein JH, Pohlemann T, Menger MD (2016) Characterization of the healing process in non-stabilized and stabilized femur fractures in mice. Arch Orthop Trauma Surg 136:203-211

Histing T, **Heerschop K**, Klein M, Scheuer C, Stenger D, Herath SC, Pohlemann T, Menger MD (2016) Effect of Stabilization on the Healing Process of Femur Fractures in Aged Mice. J Invest Surg 29:202-208

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich im Rahmen meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Tina Histing danke ich für die Überlassung des Themas sowie die hervorragende Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit. Sie stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Herrn Prof. Dr. med. Michael D. Menger möchte ich für seine Hilfe und konstruktive Kritik bei der Anfertigung dieser Arbeit sowie für das großzügige Bereitstellen der Räumlichkeiten und Gerätschaften danken.

Bei Frau Dr. rer. nat. Claudia Scheuer und Frau Janine Becker möchte ich mich ganz herzlich für Ihre Mühe und Hilfestellung bei der histologischen und proteinbiochemischen Analyse bedanken.

Frau Dr. med. vet. Monika Frings danke ich für Ihre Hilfe bei der Durchführung der Tierversuche.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie möchte ich mich für die kollegiale Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima bedanken.