

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

**Apolipoprotein E–Defizienz führt zu
verzögertem Kallusremodelling während der Frakturheilung in der
Maus**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2020

vorgelegt von: Sarah Doris Götz
geb. am: 11.03.1987 in Kronach

Tag der Promotion: 5. Oktober 2020

Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Holstein

2. Gutachter: Prof. Dr. S. Landgraeber

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Zusammenfassung	4
1.1 Zusammenfassung	4
1.2 Summary	6
2 Einleitung	8
2.1 Aufbau und Funktion des Knochens	8
2.1.1 Morphologie	8
2.1.2 Histologie	8
2.1.3 Physiologie	11
2.2 Frakturheilung	12
2.2.1 Direkte beziehungsweise primäre Frakturheilung	12
2.2.2 Indirekte beziehungsweise sekundäre Frakturheilung	13
2.3 Die Rolle der Angiogenese während der Knochenheilung	16
2.4 Frakturmodelle	17
2.4.1 Maus	17
2.4.2 Ratte	20
2.4.3 Kaninchen	20
2.4.4 Katze	20
2.4.5 Hund	20
2.4.6 Schaf	21
2.5 Das Apolipoprotein E und der Stoffwechsel der Plasmalipide	21
2.6 Die Folgen einer Apolipoprotein E-Defizienz	22
2.7 Zielsetzung	25
2.8 Fragestellung	25
3 Material und Methodik	26
3.1 Intervention	26
3.1.1 Versuchsprotokoll	26
3.1.2 Tiermodell	26
3.1.3 Operation	27
3.1.4 Tötung der Tiere	34
3.1.5 Präparation des Knochens	34
3.1.6 Blutentnahme	34
3.2 Histomorphometrie	34
3.3 Biomechanik	36

3.4	Western Blot	36
3.5	Serologische Untersuchung	40
3.6	Statistik	41
4	Ergebnisse	41
4.1	Postoperativer Verlauf	41
4.2	Makroskopischer Befund	42
4.3	Histomorphometrie	42
4.4	Biomechanik	47
4.5	Western Blot	49
4.6	Serologische Untersuchung	54
5	Diskussion	55
5.1	Diskussion der Methodiken	55
5.2	Diskussion der Ergebnisse	59
5.3	Schlussfolgerungen	66
6	Literaturverzeichnis	68
7	Publikationen / Danksagung	75
7.1	Publikationen	75
7.2	Danksagung	75
8	Lebenslauf	77
	Abbildungsverzeichnis	78
	Tabellenverzeichnis	79

Abkürzungsverzeichnis

&und
µmMikrometer
% Prozent
°/s Winkelgrad pro Sekunde
°C Grad Celsius
Abb.Abbildung
AOArbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
ApoE Apolipoprotein E
ApoE -/- Knockout beider Allele für das ApoE-Gen
ASIFassociation for the study of internal fixation
AZ Aktenzeichen
BMP-2bone morphogenetic protein-2
BMP-7bone morphogenetic protein-7
BMU basic multicellular unit
BSA bovine serum albumin
bzw. beziehungsweise
ca. circa
CArperiostale Kallusfläche
CD31 cluster of differentiation 31
CgArknorpelige periostale Kallusfläche
CHOD Cholesterinoxidase
CMChylomikronen
cmZentimeter
CMRChylomikronenreste
Cu Kupfer
CXCR-4 CXC-Motiv-Chemokinrezeptor-4
CYR61 cysteine-rich angiogenic inducer 61
d.h. das heißt
dlDeziliter
EDTA Ethylendiaminotetraessigsäure
et al. et alia
FTArbindegewebige periostale Kallusfläche
gGramm
GDF-5 growth/differentiation factor-5

GPO	Glycerophosphatoxidase
H ₂ O	Wasser
HDL	high density lipoprotein
IDL	intermediate density lipoprotein
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
KNa	Kalium-Natrium
LDL	low density lipoprotein
LDLR	low density lipoprotein receptor
LpL	Lipoproteinlipase
LRP	LDL receptor related protein receptor
M	Mittelwert
mA	Milliampere
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
mg	Milligramm
MGP	Matrix Gla Protein
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mRNA	messenger ribonucleic acid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
Nmm	Newtonmillimeter
OC	Osteocalcin
OD	Optische Dichte (optical density)
ON	Osteonectin
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
PAP	4-Aminophenazon
PMSF	Phenylmethylsulfonylflorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RANK	receptor activator of nuclear factor kappa b
RANK-L	receptor activator of nuclear factor kappa b ligand

ROS reactive oxygen species
s Sekunde
SDF-1 stromal cell derived factor-1
SDS-PAGE Sodium Dodecylsulfat Polyacryl-Gelelektrophorese
sog. sogenannter/-es/-e
TGF- β transforming growth factor-beta
TNF- α Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
TOTAr periostale Kallusfläche
TRIS Tris-hydroxymethylaminomethan
U Umdrehungen
u.a. unter anderem
V Volt
v.a. vor allem
VLDL very low density lipoprotein
vs. versus
z.B. zum Beispiel
 μ l Mikroliter

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

In aktuellen Studien konnte belegt werden, dass die beiden Volkskrankheiten Atherosklerose und Osteoporose bei Patienten häufig gleichzeitig vorliegen. Oxidierte Lipide scheinen nicht nur an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt zu sein, sondern begünstigen gleichermaßen die Entstehung der Osteoporose. Dies ist vermutlich auf eine Hemmung der Osteoblastendifferenzierung durch besagte oxidierte Lipide zurückzuführen. In atherosklerotischen Plaques werden allerdings auch Wachstumsfaktoren exprimiert, die für die Knochenmineralisierung und Angiogenese während der Frakturheilung bedeutsam sind. Bislang gibt es unseres Wissens nach keine Erkenntnisse darüber, inwieweit sich vorbestehende atherosklerotische Gefäßveränderungen auf die Knochenheilung auswirken. In der vorliegenden Arbeit sollten nun erstmals Erkenntnisse über den Einfluss atherosklerotischer Veränderungen des Gefäßsystems auf die Knochenheilung mithilfe einer tierexperimentellen Studie gewonnen werden.

Aus den gewonnenen Ergebnissen könnten sich neue Therapieansätze der Frakturbehandlung bei Patienten mit atherosklerotischen Gefäßveränderungen ergeben.

Wie aus vorausgegangen Tierstudien bekannt ist, führt eine Mutation im Apolipoprotein E-Gen über eine Hyperlipidämie zu ausgeprägten atherosklerotischen Gefäßveränderungen im Organismus. Als Versuchstiere wurden deshalb 43 ApoE-Knockout-Mäuse, die aus einem gentechnisch manipulierten Maus-Stamm gezüchtet wurden, herangezogen. Als Kontrolle dienten 44 Mäuse des zugehörigen Wildtyps C57BL/6. Nach einer geschlossenen Frakturierung des rechten Femurs mit anschließender Stabilisierung durch eine intramedulläre Zugschraube wurden die Versuchstiere nach zwei bzw. vier Wochen durch eine Überdosis Phenobarbital getötet. Im Anschluss daran erfolgten histomorphometrische, biomechanische sowie proteinbiochemische Untersuchungen am resezierten Femur.

In der histomorphometrischen Auswertung wurden die Größe und die Gewebezusammensetzung des Frakturkallus quantitativ analysiert. Hierzu wurden in der Region des größten Femurdurchmessers Schnittpräparate in longitudinaler Ausrichtung angefertigt und nach der Masson-Goldner-Methode gefärbt. Nach Digitalisierung mithilfe eines Bildauswertungsprogramms wurden die Fläche des periostalen Kallus sowie die prozentualen Anteile von Knochen-, Knorpel- und Bindegewebe im Gesamtkallus bestimmt.

In der biomechanischen Testung wurde die Rotationsstabilität der frakturierten Knochen analysiert. Dazu wurde bei jedem Knochenpräparat der maximale Torsionswinkel sowie das maximale Drehmoment bis zum Brechen des Knochens bestimmt. Aus diesen Werten konnte die maximale Torsionssteifigkeit errechnet werden, die als Vergleichsparameter der beiden Versuchsgruppen herangezogen wurde.

Die Western-Blot-Analyse diente zur quantitativen Analyse der Expression der Angio- und Osteogeneseparameter CD31, CYR61 sowie BMP-2 im Frakturkallus.

Zusätzlich erfolgte in beiden Versuchsgruppen nach venöser Blutentnahme eine serologische Bestimmung des Gesamtcholesterins sowie der Triglyzeride mithilfe enzymatisch colorimetrischer Tests.

Nach Auswertung der histomorphometrischen, biomechanischen, proteinbiochemischen sowie serologischen Untersuchungen ergaben sich folgende Ergebnisse:

- I. In der histomorphometrischen Analyse zeigten sich bei den ApoE-Knockout-Mäusen eine signifikant höhere periostale Kallusfläche sowohl zwei als auch vier Wochen nach Frakturierung.
- II. Die prozentuale Gewebezusammensetzung zeigte zwei Wochen nach Frakturierung bei den ApoE-Knockout-Mäusen einen tendenziell geringeren Anteil an Knochengewebe sowie einen höheren Anteil an Knorpel- und Bindegewebe im Kallusgewebe.
- III. Nach vier Wochen glichen sich die prozentualen Anteile von Knochen-, Knorpel- sowie Bindegewebe in beiden Versuchsgruppen an.
- IV. In der biomechanischen Auswertung ergaben sich trotz der größeren Kallusfläche bei den ApoE-Knockout-Mäusen in beiden Gruppen vergleichbare Ergebnisse der Torsionssteifigkeit sowohl nach zwei als auch nach vier Wochen. Daraus lässt sich schließen, dass der zu diesem Zeitpunkt neu gebildete Knochen eine im Vergleich zur Kontrollgruppe verminderte biomechanische Belastbarkeit aufweist.
- V. Die proteinbiochemische Analyse zeigte eine verminderte Expression der Angio- und Osteogeneseparameter CD31, CYR61 sowie BMP-2 bei den ApoE-Knockout-Mäusen sowohl zwei als auch vier Wochen nach Frakturierung.
- VI. Die serologische Untersuchung ergab signifikant erhöhte Werte des Serumcholesterins bei den ApoE-Knockout-Mäusen.

Zusammenfassend lässt sich aufgrund der oben genannten Ergebnisse sagen, dass bei Vorliegen eines aufgrund einer ApoE-Defizienz atherosklerotisch veränderten Gefäßsystems

das Kallusremodelling während der Frakturheilung verzögert abläuft. Dies äußert sich in einer signifikant vergrößerten Kallusfläche sowohl zwei als auch vier Wochen nach Frakturierung des Knochens.

Die verringerte Expression von CD31, CYR61 sowie BMP-2 deuten auf eine gestörte Angio- und Osteogenese bei den ApoE-defizienten-Tieren hin, was in Korrelation zum verzögerten Kallus-Remodelling steht.

1.2 Summary

Recent studies have shown that the two common diseases of atherosclerosis and osteoporosis often coexist in patients. Thus, oxidized lipids not only seem to be involved in the pathogenesis of atherosclerosis but also favor the development of osteoporosis. This is probably due to inhibition of osteoblast differentiation by oxidized lipids. However, atherosclerotic plaques also express growth factors that are important for bone mineralization and angiogenesis during fracture healing. So far, to our knowledge, there has been no insight into the extent to which pre-existing atherosclerotic vascular lesions affect bone healing. We aimed to shed light onto the influence of atherosclerotic vascular lesions on bone healing using an animal model study. The results of the present study could lead to new therapeutic approaches to fracture treatment.

As is known from previous animal studies, a mutation in the apolipoprotein E gene leads to hyperlipidemia and thereby to pronounced atherosclerotic vascular lesions in the organism. For the present study, 43 apo E knockout mice are used as animal model. As a control served 44 C57BL/6 mice, the corresponding wild type. After inducing a closed fracture of the right femur with subsequent stabilization by an intramedullary screw, the animals were sacrificed after 2 or 4 weeks by phenobarbital overdose. Following this, further histomorphometric, biomechanical and protein biochemistry studies were performed on the resected femora.

In the histomorphometric analysis the size and tissue composition of the fracture callus were analyzed quantitatively. For this purpose longitudinal sections were made in the region of the maximum femoral diameter and stained according to the Masson Goldner method. After digitalisation, for each specimen, the periosteal callus area as well as the percentage of bone, cartilage and fibrous tissue of the total callus area were determined using an image evaluation program.

For biomechanical testing, the rotational stability of the fractured bones was analysed. For this purpose, the maximum torsion angle and the maximum torque were determined for each bone. From these values, the maximum torsional stiffness was calculated, which was used for comparison of the experimental groups.

The Western blot analysis was used for quantitative analysis of the expression of the angio- and osteogenesis markers CD31, CYR61 and BMP-2 in the fracture callus.

In addition, a serological analysis of the total cholesterol and triglycerides was carried out by enzymatic colorimetric tests in both experimental groups after venous blood sampling. After the evaluation of the histomorphometric, biomechanical, biochemical and serological analysis, the results were as follows:

- I. In the histomorphometric analysis apoE knockout mice showed a significantly increased periosteal callus area at both 2 and 4 weeks after fracture.
- II. Two weeks after the fracture the tissue composition tended to show a lower percentage of bone tissue and a higher proportion of cartilage and fibrous tissue in the callus area of the femora of apoE knockout mice.
- III. After 4 weeks, the percentages of bone, cartilage and fibrous tissue were similar in both experimental groups.
- IV. In the biomechanical evaluation, comparable results of torsional stiffness were observed in both groups after 2 and 4 weeks despite the significantly larger callus area in the apoE knockout mice. This indicates, that the newly formed bone in apoE knockout mice is of reduced biomechanical resilience when compared to the control group.
- V. The biochemical analysis showed a decreased expression of the angio- and osteogenic markers CD31, CYR61 and BMP-2 in the callus of apoE knockout mice both 2 and 4 weeks after fracture.
- VI. The serological examination revealed significantly elevated levels of serum cholesterol in the apoE knockout mice.

In summary, based on the above results, it can be concluded that apoE-deficiency and, consequently the atherosclerotic lesions of the vascular system, are associated with a delay in callus remodelling during fracture repair. This is reflected by the significantly larger callus area at both 2 and 4 weeks as well as the lower bone content and higher proportion of cartilage tissue after 2 weeks in the callus of apoE knockout mice.

The lower expression of CD31, CYR61 and BMP-2 in apoE knockout mice indicates a disruption of angio- and osteogenesis, leading to a delayed callus remodeling.

2 Einleitung

2.1 Aufbau und Funktion des Knochens

2.1.1 Morphologie

Das menschliche Skelett besteht aus insgesamt 210 anatomisch abgrenzbaren Knochen. Ihrer Vielzahl und Funktion entsprechend, weisen diese auch makroskopisch unterschiedliche Formen auf. Man unterscheidet zwischen platten (z.B. Schulterblatt, Schädelknochen), unregelmäßigen (z.B. Wirbelkörper, Kiefer), kurzen (z.B. Hand- und Fußwurzelknochen) und langen Knochen (z.B. Oberschenkelknochen) (Drenckhahn, 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frakturheilung an einem langen Knochen, dem Femur untersucht. Das Femur wird zu den Röhrenknochen gezählt und in folgende Abschnitte unterteilt:

- röhrenförmiges Mittelstück, die Diaphyse
- zwei verdickte Endstücke, die Epiphysen
- die zwischen Epi- und Diaphyse gelegenen Metaphysen

(Schiebler, 2005)

2.1.2 Histologie

Im histologischen Aufbau findet man beim Knochen immer eine kompakte äußere Schicht (Substantia compacta bzw. corticalis) und ein schwammartiges inneres Gerüst von Knochenbälkchen bzw. Trabekeln (Substantia spongiosa). Die Ausprägungsstärke der Schichten ist je nach Knochentyp bzw. Knochenabschnitt unterschiedlich. So bestehen die Epi- und Metaphysen des Röhrenknochens größtenteils aus der Substantia spongiosa, die auch das blutbildende Knochenmark enthält, während in der Diaphyse die Substantia compacta sehr stark ausgeprägt ist. Von ihr wird die Markhöhle umschlossen, in der sich beim Erwachsenen das gelbe, fettzellhaltige Knochenmark befindet (Drenckhahn, 2008; Junqueira & Carneiro, 1996).

Der Knochen wird – bis auf die gelenktragenden Flächen – von Knochenhaut, dem sog. Periost, umhüllt. Man unterscheidet am Periost eine äußere derbe Schicht, die aus straffem, geflechtartigem kollagenem Bindegewebe besteht (Stratum fibrosum) und eine innere zell-

gefäß- und nervenreiche Schicht, von der u.a. die Knochenneubildung ausgeht (Stratum osteogenicum). Das Periost ist über die Sharpey-Fasern, einem Bündel von Kollagenfibrillen, direkt mit der Substantia compacta des Knochens verbunden. Besondere Bedeutung bekommt das Periost bei Knochenbrüchen, da hierbei die Zellen des Stratum osteogenicum proliferieren und sich zu Osteo- und Chondroblasten differenzieren (Drenckhahn, 2008; Lüllmann-Rauch, 2006; Schiebler, 2005).

Die inneren Knochenoberflächen werden vom Endost bedeckt. Es setzt sich aus einer dünnen Schicht von Kollagenfibrillen und endostealen Saumzellen zusammen. Ähnlich wie beim Periost können auch diese Zellen aktiviert werden und bei Bedarf reparative Vorgänge im Knochengewebe einleiten (Drenckhahn, 2008; Lüllmann-Rauch, 2006; Schiebler, 2005).

Histologisch unterscheidet man vier Typen von Knochenzellen:

- Vorläuferzellen
- Osteoblasten
- Osteozyten
- Osteoklasten

(Lüllmann-Rauch, 2006)

Vorläuferzellen sind mesenchymaler Herkunft und an der inneren und äußeren Knochenoberfläche sowie in den Havers-Kanälen (siehe unten) zeitlebens zu finden. Aufgrund ihrer großen Proliferationsfreudigkeit spielen sie eine wichtige Rolle beim Knochenwachstum und bei der Heilung von Knochenbrüchen. Vorläuferzellen besitzen die Fähigkeit sich in Osteoblasten umzuwandeln (Junqueira & Carneiro, 1996; Lüllmann-Rauch, 2006).

Osteoblasten sind die Knochenbildner. Sie bauen die Knochengrundsubstanz (Kollagen, Proteoglykane, Glykoproteine) auf und bilden zunächst den Vorknochen, auch Osteoid genannt, der noch nicht mineralisiert ist. Zur Mineralisation des Knochens werden vom Osteoblasten Matrixvesikel abgeschnürt, die Kalziumphosphatkristalle enthalten. Sobald die Vesikel rupturieren, lagern sich die Kristalle in der Nähe der Kollagenfasern ab. Durch Kalziumphosphatausfällungen entstehen schließlich Hydroxylapatitkristalle, die die Hartsubstanz des Knochens bilden (Junqueira & Carneiro, 1996; Lüllmann-Rauch, 2006).

Osteozyten sind in verkalkter Knochenmatrix eingemauerte Osteoblasten. Ihre Hauptfunktion ist die Erhaltung des Knochens, da die umgebende Matrix abgebaut wird, sobald die Osteozyten zugrunde gehen. Sie liegen in Höhlen, sog. Lakunen, von denen

Knochenkanälchen abgehen. Darin befinden sich die dünnen Fortsätze der Osteozyten, über die sie mit ihren benachbarten Zellen in Verbindung stehen. Über *gap junctions* können Stoffe ausgetauscht werden. Ihrer Funktion nach lassen sich osteoblastische und osteolytische Osteozyten unterscheiden. Erstere sind für die Erhaltung der Knochenmatrix verantwortlich und stellen Substrate für die Hartschubstanz bereit. Letztere verfügen über eine große Zahl von Lysosomen und können damit die Hartschubstanz abbauen (Junqueira & Carneiro, 1996; Lüllmann-Rauch, 2006).

Osteoklasten gehören zum mononukleären Phagozytensystem und sind aus der Verschmelzung von Monozyten entstanden. Ihre Funktion ist der Knochenabbau. Sie liegen häufig in Einbuchtungen der Knochenmatrix, den sog. *Howship*-Lakunen und können über Enzyme Knochen resorbieren. Interessanterweise können sich Osteoblasten und Osteoklasten in ihrer Aktivität gegenseitig beeinflussen. Wenn das membranständige Protein RANK-L, das sich auf dem Osteoblasten befindet, mit dem RANK-Rezeptor auf dem Osteoklast interagiert, führt dies zum Knochenabbau. Bindet jedoch das osteoblasteneigene Protein OPG an RANK-L, unterbleibt die Interaktion zwischen RANK-L und dem RANK-Rezeptor. Zahlreiche Hormone, die Einfluss auf den Knochenumbau nehmen, interagieren mit diesem RANK-L/OPG-Gleichgewicht (Junqueira & Carneiro, 1996; Lüllmann-Rauch, 2006).

Die Knochenmatrix besteht hauptsächlich aus Kollagenfibrillen und Hydroxylapatit-Kristallen. Man unterscheidet zwei verschiedene Organisationsformen der Extrazellulärmatrix: den Geflecht- und den Lamellenknochen. Im Geflechtknochen bilden die Kollagenfibrillen ein ungeordnetes Flechtwerk aus Kollagenfasern. Im Allgemeinen ist beim Geflechtknochen der Anteil an Mineralien geringer, der Anteil an Osteozyten hingegen höher als beim Lamellenknochen. Bei jeder Knochenneubildung, auch im Rahmen der Frakturheilung, entsteht zunächst Geflechtknochen, bevor dieser im weiteren *Remodelling* durch Lamellenknochen ersetzt wird. Der Lamellenknochen, den man in der Substantia compacta vorfindet, unterscheidet sich im Aufbau von dem in der Substantia spongiosa. In der Substantia compacta findet man einzelne 3-7 µm dicke Lamellen, d.h. Knochenschichten aus Kollagenfasern und Osteozyten. Mehrere Lamellen (ca. 5-20 Stück) umschließen einen Havers-Kanal und bilden die Funktionseinheit des Lamellenknochens, das sog. Osteon. Im longitudinal zur Knochenoberfläche verlaufenden Havers-Kanal befinden sich Blutgefäße, Nervenfasern und Bindegewebe. Er ist mit Endost ausgekleidet und steht mit der Markhöhle in Verbindung. Zusätzlich gibt es Querverbindungen, die Volkmann-Kanäle, die senkrecht in den Knochen eintreten und Gefäße aus dem Periost und Endost führen. Die Kollagenfibrillen in den Lamellen des Osteons verlaufen schraubenförmig um den Havers-Kanal, wobei deren

Drehrichtung von Lamelle zu Lamelle wechselt. Das einzelne Osteon hat einen kreisförmigen Querschnitt und einen Durchmesser von 100-400 μm . Knochenkanälchen durchziehen das Osteon radiär. So können die Osteozyten vom Havers-Kanal aus mit wichtigen Stoffen ernährt werden. An den Zwickeln der Osteonen liegen Schalllamellen, die Resten von alten Osteonen entsprechen. Im äußeren Bereich der Substantia compacta sind die Lamellen nicht in Osteonen angeordnet, sondern fassen den Knochen komplett ein. Sie werden als äußere Generallamellen bezeichnet. Teilweise findet man einen vergleichbaren Aufbau auch zum Markraum hin, die sog. inneren Generallamellen. Der Lamellenknochen in der Spongiosa ist hingegen nicht systematisch in Osteonen angeordnet, da hier Havers-Kanäle fehlen. Die einzelnen Lamellen sind vielmehr flächig angeordnet und die Blutversorgung erfolgt aus Gefäßen des Knochenmarks (Junqueira & Carneiro, 1996; Lüllmann-Rauch, 2006).

Der Knochen ist in seiner makro- und mikroskopischen Struktur exakt seinen Beanspruchungen angepasst. An Stellen, wo ein hohes Maß an Festigkeit verlangt wird, findet man sog. Hauptspannungslinien (Trajektorien). Die Spongiosabälkchen sind nach dem Verlauf dieser Trajektorien ausgerichtet, was zu hoher Druck- und Zugfestigkeit des Knochens führt. Ein ähnliches System findet man bei den Lamellen, die steiler bzw. flacher verlaufen, je nachdem ob Druck-, Zug- oder Torsionskräfte überwiegen (Junqueira & Carneiro, 1996).

2.1.3 Physiologie

Knochen hat vorrangig mechanische Funktionen. Als Stützgewebe gibt er dem Körper Halt und Festigkeit, dient der Skelettmuskulatur als Ansatzpunkt für die Sehnen und bildet zusammen mit Gelenken und Bändern den passiven Bewegungsapparat. Muskuläre Kontraktionskräfte können somit auf die verschiedenen Körperpartien übertragen werden. Des Weiteren dient er als schützende Wandstruktur für Gehirn, Brustkorb und Beckenorgane (Drenckhahn, 2008; Junqueira & Carneiro, 1996).

Neben den mechanischen Aufgaben spielt der Knochen auch eine zentrale Rolle in der Blutbildung sowie in der Kalziumspeicherung. Das Knochenmark ist postnatal die Hauptbildungsstätte des Blutes. In allen Knochen überwiegt zunächst das blutbildende rote Knochenmark. Im weiteren Knochenwachstum wandelt sich dieses in den langen Röhrenknochen größtenteils in fettzellhaltiges gelbes Knochenmark um. Die Blutbildung findet nach Abschluss des Körperwachstums nur noch in den kurzen und platten Knochen

sowie in den Epiphysen der Röhrenknochen statt. Das gelbe Knochenmark kann sich jedoch z.B. bei chronischem Blutverlust wieder in rotes blutbildendes umwandeln (Schiebler, 2005).

Wie oben bereits erwähnt ist der Knochen entscheidend an der Kalziumspeicherung des Körpers beteiligt. Das Skelett beinhaltet über 99 % des gesamten Kalziums im Organismus und sorgt durch ein hormonelles Zusammenspiel mit dem Darm und der Niere für einen konstanten Blut-Kalziumspiegel (Junqueira & Carneiro, 1996).

Auch nach Abschluss des Knochenwachstums muss der Knochen stetig umgebaut werden. So werden jährlich 28 % des Gewebes in der Substantia spongiosa und 4 % des Gewebes in der Substantia compacta umgebaut. Dieses sog. *Remodelling* dient u.a. der Reparatur von Mikroschäden sowie einer funktionellen Anpassung der Knochenstruktur. Osteone werden dabei von Osteoklasten abgebaut und von Osteoblasten durch neue ersetzt. Bis zum vollständigen Umbau können mehrere Monate vergehen (Junqueira & Carneiro, 1996; Lüllmann-Rauch, 2006).

2.2 Frakturheilung

Knochen gehört zu den wenigen Geweben, die ohne fibröse Narbenbildung verheilen und vollständig regeneriert werden können. Trotzdem kann es zu Störungen bei der Heilung kommen, wenn einige der folgenden Voraussetzungen nicht gegeben sind:

- ausreichender Kontakt der Fragmente
- ausreichende Ruhigstellung im Frakturbereich
- ausreichende Durchblutung der Fragmente

(Berchthold et al., 2008; Marsell & Einhorn, 2011)

Bezüglich der Frakturheilung unterscheidet man prinzipiell zwei verschiedene Formen:

- direkte oder primäre Knochenheilung
- indirekte oder sekundäre Knochenheilung

(Berchthold et al., 2008; Marsell & Einhorn, 2011)

2.2.1 Direkte beziehungsweise primäre Frakturheilung

Die direkte Knochenheilung bezeichnet die Wiederherstellung des physiologischen Knochengewebes ohne Bildung einer äußeren Kallusmanschette. Man findet sie nur bei

stabilen Frakturen, d.h. nach Stabilisierung mittels Osteosynthese. Hierbei wird zwischen einer Kontakt- und Spaltheilung unterschieden. Wenn sich die Frakturrenden berühren, kommt es zur Kontaktheilung. Die Fragmente werden durch vorwachsende Osteone verzahnt, indem zunächst Osteoklasten den Knochen longitudinal über die Frakturlinie hinweg aushöhlen und im nächsten Schritt Osteoblasten die Resorptionshöhle mit neuem Knochen auffüllen. So entsteht auf direktem Wege Lamellenknochen. Bei der Spaltheilung hingegen wird zunächst Geflechtknochen gebildet, der im Zuge des *Remodellings* zu Lamellenknochen umgebaut wird (Berchthold et al., 2008; Marsell & Einhorn, 2011).

Bisher ist nicht bekannt, ob es bei der Maus zur primären Knochenheilung kommen kann. Alle bisher angewandten Frakturmodelle führen über eine Kallusbildung zur Knochenregeneration (sekundäre Frakturheilung) (Hiltunen et al., 1993; Manigrasso & O'Connor, 2004).

2.2.2 Indirekte beziehungsweise sekundäre Frakturheilung

Die indirekte Knochenheilung ist die häufigste Form der Knochenheilung und setzt sich aus einer enchondralen und einer desmalen Ossifikation zusammen. Eine rigide Stabilität der Frakturrenden – wie sie bei der direkten Knochenheilung vorausgesetzt wird – wird hierfür nicht benötigt. Kleinste Bewegungen im Frakturspalt können sogar den Heilungsprozess beschleunigen. Allerdings führt ein zu hohes Maß an Bewegung zwischen den Frakturrenden zu verzögerter bzw. ausbleibender Heilung (Marsell & Einhorn, 2011).

Im Gegensatz zur direkten verläuft die indirekte Knochenheilung über ein narbiges Zwischengewebe. Die während der embryonalen Entwicklung ablaufenden Prozesse der Skelettbildung werden erneut durchlaufen und führen zur vollständigen Regeneration des ursprünglichen Knochengewebes. Die indirekte Frakturheilung ist qualitativ gleichwertig zur direkten Knochenheilung und tritt vor allem auf bei:

- spontaner Frakturheilung
- bei konservativ behandelten Frakturen
- bei einigen Osteosynthese-Techniken wie z.B. der Marknagelung

(Berchthold et al., 2008; Scharf & Rüter, 2009)

Man unterteilt die sekundäre Frakturheilung in fünf Phasen, die sich teilweise überlappen:

- Frakturphase
- Entzündungsphase
- Phase der Granulation

- Kallushärtung
- Phase des *Modellings* und *Remodellings*

(Rüter et al., 2004)

Die Frakturphase beginnt mit der Einwirkung einer Kraft auf das umliegende Knochen- und Weichteilgewebe und führt zur Durchtrennung von Periost, Kortikalis, Spongiosa und Knochenmark. Dabei werden auch die periostalen und medullären Blutgefäße verletzt und es bildet sich ein Hämatom aus (Rüter et al., 2004; Scharf & Rüter, 2009).

Die Entstehung des Frakturhämatoms leitet das Entzündungsstadium ein. Proinflammatorische Moleküle wie TNF- α und verschiedene Interleukine werden sezerniert, rekrutieren inflammatorische Zellen und induzieren die Angiogenese. Die TNF- α -Konzentration erreicht ihr Maximum nach ca. 24 Stunden und erreicht ihren Ausgangswert nach ca. 72 Stunden wieder. TNF- α wird von Makrophagen und anderen inflammatorischen Zellen sezerniert und rekrutiert für die Knochenheilung notwendige Zellen. Des Weiteren wurde in vitro gezeigt, dass TNF- α die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Osteoprogenitorzellen induzieren kann (Marsell & Einhorn, 2011).

Woher die mesenchymalen Stammzellen genau stammen, ist nicht vollends erklärt. Studien deuten darauf hin, dass sie aus dem umliegenden Weichteilgewebe, dem Knochenmark sowie aus dem zirkulierenden Blutkreislauf hervorgehen. Zur Rekrutierung und Lenkung der mesenchymalen Stammzelle zur Frakturstelle spielen unter den Signalmolekülen das BMP-7, der SDF-1 und sein zugehöriger Rezeptor CXCR-4 eine wichtige Rolle (Marsell & Einhorn, 2011).

Die Angiogenese, die bereits im Entzündungsstadium eingeleitet wird, ist für eine erfolgreiche Knochenheilung essentiell. Posttraumatisch kommt es zunächst zur Vasodilatation des Gefäßbettes. Dies führt an der Verletzungsstelle zur Ödem- und Hämatombildung. Trotz der zunehmenden Durchblutung kommt es durch die mechanische Verletzung des umgebenden Gewebes sowie der den Knochen versorgenden Gefäße zur Nekrose und Hypoxie an der Frakturstelle. Der nekrotische Teil des Knochengewebes muss nun resorbiert und die Frakturstelle revaskularisiert werden (Hankenson et al., 2011).

Durch die zunehmende Vaskularisierung werden nicht nur die vorhandenen Zellen besser versorgt, sondern auch viele neue Zellen eingeschwemmt. Diese treten entweder aus dem vorbeiströmenden Blut oder direkt aus dem Gefäßendothel hervor. Die Durchblutung findet unter einer sog. Flussumkehr statt. Unter physiologischen Bedingungen verläuft sie

überwiegend zentrifugal, d.h. die intakte Kortikalis wird zu etwa zwei Dritteln von den Markraumgefäßen versorgt. Nach einer Fraktur werden jedoch die periostalen Gefäße zu den Hauptlieferanten. Zwei Wochen nach Fraktur wird eine bis um das sechsfache gesteigerte Durchblutung in der Frakturzone erreicht (Rüter et al., 2004; Scharf & Rüter, 2009).

Die Entzündungsphase verläuft etwa über zwei bis drei Tage. Danach findet sich im Frakturhämatom ein liches Netzwerk, welches Fibrin und Kollagenfibrillen enthält. Das genannte Netzwerk wird in der sich nun anschließenden Granulationsphase durch Fibroblasten, Kollagenfasern und zahlreichen Kapillaren ersetzt. Schon zu diesem Zeitpunkt lassen sich erste Mineraldepots in den Kollagenfibrillen erkennen. Der sog. weiche Kallus bildet eine erste Brücke zwischen den Knochenfragmenten. Abgestorbene Frakturrenden werden durch Osteoklasten abgebaut. Des Weiteren differenzieren sich aus den mesenchymalen Stammzellen Chondroblasten. Subperiostal findet zur gleichen Zeit eine durch Osteoblasten vermittelte direkte Neubildung von Knochengewebe statt (desmale Ossifikation oder primäre Kallusreaktion) (Rüter et al., 2004; Scharf & Rüter, 2009).

Aus dem Markraum wandert ein sog. Blastem in das Hämatom ein und füllt die Frakturspalten auf. Nach drei bis vier Wochen sind die Frakturrenden durch Bindegewebe und Knorpel weich miteinander verbunden (Rüter et al., 2004; Scharf & Rüter, 2009).

Zur Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen für die Kallusbildung ist unter den Signalmolekülen die TGF- β -Superfamilie von Bedeutung. TGF- β 2, - β 3 und GDF-5 sind in die Chondrogenese sowie in die enchondrale Ossifikation involviert, während BMP-5 und -6 die Zellproliferierung für die desmale Ossifikation induzieren. Weiterhin scheint BMP-2 für die ersten Schritte der Knochenheilung essentiell zu sein. In Studien zeigte sich, dass Mäuse mit inaktiviertem BMP-2 nicht ausreichend Kallusgewebe bilden können (Marsell & Einhorn, 2011).

Nun schließt sich im Rahmen der enchondralen Ossifikation die Phase der Kallushärtung an. Durch die zunehmende Mineralisierung der Grundsubstanz entsteht der sog. Fixationskallus. Hierbei dienen die Mitochondrien der Chondrozyten als Kalziumlieferanten. An die verkalkte Knorpelsubstanz lagern sich Osteoblasten an und neue Knochenmatrix wird abgelegt. Der Abbau nekrotischen Knochens und der Umbau von mineralisiertem Knorpel zu Knochen erfolgt mithilfe der BMU, die aus Zellen, Interzellulärsubstanz und Kapillaren besteht (Rüter et al., 2004; Scharf & Rüter, 2009).

Die Resorption des mineralisierten Knorpelgewebes wird biochemisch durch M-CSF, RANK-L, OPG und TNF- α initiiert. Weiterhin unterstützen M-CSF, RANK-L und OPG die Rekrutierung der Osteoblasten und Osteoklasten zur Bildung von Geflechtknochen (Marsell & Einhorn, 2011).

Obwohl das neu gebildete harte Kallusgewebe ausreichende Stabilität gewährleistet, stellt es die biomechanischen Eigenschaften des physiologischen Knochengewebes noch nicht vollständig wieder her. Deshalb schließt sich nun die Phase des *Modellings* und *Remodellings* an, die sich über Wochen bis Monate erstrecken kann. Der neu entstandene Geflechtknochen wird zunächst in reifen lamellären Knochen umgebaut (*Modelling*). Die Wiederherstellung einer physiologischen Knochenkontur inklusive eines Markraums stellt den letzten Teilschritt der indirekten Frakturheilung dar (*Remodelling*). Biochemisch wird das *Remodelling* durch IL-1 sowie TNF- α initiiert, während die TGF- β -Faktoren in dieser Phase vermindert exprimiert werden. Weiterhin scheinen einige BMPs, wie z.B. BMP-2 in den Knochenumbau involviert zu sein (Marsell & Einhorn, 2011; Scharf & Rüter, 2009).

2.3 Die Rolle der Angiogenese während der Knochenheilung

Die vaskuläre Versorgung des Knochens ist für die embryonale Knochenentwicklung, das Knochenwachstum und *Remodelling* essentiell. Sie ist u.a. für die Bereitstellung von Nährstoffen, Wachstumsfaktoren, Hormonen, Zyto- und Chemokinen sowie das Entfernen von zellulären Abfallprodukten verantwortlich und fungiert als kommunikatives Netzwerk zwischen dem Knochen und den umliegenden Geweben (Saran et al., 2014).

Neben diesen Funktionen nimmt die Angiogenese wie oben bereits angeklungen auch eine Schlüsselrolle in der Frakturheilung ein. Die Ausbildung neuer Blutgefäße im Kallusgewebe dient neben den oben genannten Aufgaben zur Bereitstellung von Osteoblasten- und Osteoklastenvorläuferzellen (Saran et al., 2014).

Bei einer Fraktur kommt es zu einer abrupten Unterbrechung der Blutzufuhr und folglich zur Hypoxie mit Knochen- und Knochenmarksnekrosen. Durch den Sauerstoffmangel werden angiogenetische Faktoren exprimiert, die zunächst zu einer Vaskularisierung des periostalen Kallusgewebes führen (Augat et al., 2005).

Wie sich in mehreren Studien gezeigt hat, ist die Blutversorgung für eine erfolgreiche Frakturheilung essentiell (Glowacki, 1998; Hausman et al., 2001).

Demnach führte eine insuffiziente Blutversorgung beim frakturierten Knochen zu Verzögerungen der Heilungskaskade und zur Ausbildung von atrophischen Pseudarthrosen (Hausman et al., 2001).

2.4 Frakturmodelle

Tiermodelle sind bis heute von großer Bedeutung für die Erforschung der Knochenheilung. Wenngleich im Rahmen vieler in vitro bzw. klinischer Studien auf diesem Gebiet geforscht wird, sind es vor allem Tiermodelle, die wertvolle Erkenntnisse über die zugrunde liegenden biologischen Prozesse der Frakturheilung liefern. Aus diesem Grund wurden zahlreiche Tiermodelle, beginnend bei kleineren Nagetieren wie der Maus (Hiltunen et al., 1993) bis zu Großtieren wie etwa dem Schaf (Cheal et al., 1991), entwickelt, die ein breites Spektrum der Säugetier- und Vogelarten abdecken. Um die korrekten Rückschlüsse für die menschliche Knochenheilung zu ziehen, müssen die unterschiedlichen anatomischen und biologischen Gegebenheiten der jeweiligen Tiere berücksichtigt werden (Holstein et al., 2009a; Nunamaker, 1998).

Kleine Nagetiere wie Mäuse oder Ratten haben im Vergleich zum Menschen eine einfachere Knochenstruktur ohne Havers-System. Im Gegensatz zu größeren Säugetieren findet man bei ihnen während der Phase des *Remodellings* Resorptionshöhlen, die in unmittelbarer Nachbarschaft zum Frakturspalts entstehen und sich im weiteren Verlauf mit Osteoblasten füllen. Obwohl dies mit dem *Remodelling* bei vorhandenem Havers-System vergleichbar ist, gibt es bislang wenige Erkenntnisse über die Bedeutung dieser anatomischen Unterschiede zwischen Menschen und Nagetieren. Aus diesem Grund können kleine Nagetiere nicht für Studien zur Untersuchung der Form, Funktion und Beschaffenheit der Havers-Systeme herangezogen werden (Nunamaker, 1998).

2.4.1 Maus

Trotz der genannten anatomischen Unterschiede sind vor allem Mäuse in Studien zur Frakturheilung von steigendem Interesse. Für Mäuse existiert ein breites Spektrum an Antikörpern und verfügbaren transgenen Stämmen, die für molekularbiologische Studien herangezogen werden können. Weitere Gründe sind die niedrigen Kosten für Beschaffung, Zucht und Haltung der Mäuse, sodass auch Studien mit größeren Versuchsgruppen durchführbar sind (Holstein et al., 2009a; Manigrasso & O'Connor, 2004).

Die Entwicklung standardisierter Frakturmodelle an der Maus war aufgrund der anatomischen Gegebenheiten eine große Herausforderung. In wissenschaftlichen Untersuchungen wurden u.a. die Tibia (Cho et al., 2002; Hiltunen et al., 1993; Ohta et al., 1999), die Rippe (Nakase et al., 1994; Yamagiwa et al., 1999) und das Femur verwendet (Cheung et al., 2003; Holstein et al., 2007a; Holstein et al., 2009a).

Studien an der Mäuserippe (Nakase et al., 1994; Yamagiwa et al., 1999) dienten bislang v.a. der Untersuchung der Genexpression während der Frakturheilung. Für biomechanische Testungen hingegen ist ihre anatomische Form eher ungeeignet (Holstein et al., 2009a).

Das von Hiltunen et al. (Hiltunen et al., 1993) entwickelte Frakturmodell an der Tibia hat sich unter den Maus-Modellen zunächst am meisten durchgesetzt. Die Verwendung der Tibia ist jedoch aufgrund des dreieckigen, nach distal abnehmenden Kalibers, der gebogenen Longitudinalachse sowie des fehlenden Weichteilgewebes für standardisierte Frakturmodelle im Vergleich zum Femur weniger geeignet. Aufgrund des dünnen Weichteilmantels ist die Tibia zwar relativ leicht zu frakturieren, der Einfluss eines umgebenden Weichteilgewebes bleibt jedoch unberücksichtigt (Cheung et al., 2003; Holstein et al., 2007a, 2009a).

Anders als die Tibia ist das Femur gleichmäßig röhrenförmig. Standardisierte Schafffrakturen sind leichter zu erzeugen und können auch durch Implantate besser stabilisiert werden. Vorteile bringt dies auch für die biomechanische Testung mit sich. Der relativ große Weichteilmantel ist zwar für das Herbeiführen einer geschlossenen Fraktur eher hinderlich, dafür kann aber der Einfluss des umgebenden Weichteilgewebes auf die Knochenheilung berücksichtigt werden. Das Femur scheint daher für Studien zur Knochenheilung insgesamt geeigneter als die Tibia zu sein (Holstein et al., 2009a).

Innerhalb der Tierstudien werden sowohl geschlossene als auch offene Frakturmodelle verwendet. Geschlossene Modelle gehen auf das von Mannigrasso & O'Connor (Manigrasso & O'Connor, 2004) beschriebene Maus-Modell zurück. Dieses ist ein modifiziertes Modell des bereits 1984 veröffentlichten Frakturmodells an der Ratte von Bonnarens & Einhorn (Bonnarens & Einhorn, 1984). In beiden Modellen wird mithilfe einer 3-Punkt-Biegungsmaschine eine standardisierte Querfraktur mit einer stumpfen Guillotine erzeugt. Nach lateraler Luxation der Patella wird ein stabilisierendes Implantat retrograd intramedullär platziert. Vorteilhaft ist der nur gering ausfallende Weichteilschaden. Allerdings kann das Implantat durch seine intramedulläre Lage das Endost bzw. das Knochenmark beschädigen und so die endostale Kallusreaktion behindern (Holstein et al., 2009a).

Im offenen Frakturmodell wird, wie von Cheung et al. (Cheung et al., 2003) beschrieben, ein lateraler longitudinaler Zugang zur Osteotomie des Femurs gewählt. Hierbei müssen große Teile der Muskulatur durchtrennt werden, um das Femur in seiner vollen Länge darzustellen. Ein Fixateur externe wird extramedullär angebracht und beschädigt somit nicht das Endost bzw. Knochenmark. Jedoch kann der entstandene Weichteildefekt die suffiziente Durchblutung des Femurs gefährden. Weitere Nachteile des Fixateurs externe sind im hohen Implantatgewicht, welches die Maus in ihren physiologischen Bewegungsabläufen behindert, sowie in der relativ schwierigen Operationstechnik zu sehen (Cheung et al., 2003; Holstein et al., 2009a).

Im weiter oben beschriebenen geschlossenen Frakturmodell von Manigrasso & O'Connor (Manigrasso & O'Connor, 2004) wird ein einfacher intramedullärer Pin als Implantat eingesetzt. Dies ist bislang die am häufigsten angewandte Osteosynthesetechnik an der Maus. Vorteilhaft sind die einfache Operationstechnik, das geringe Implantat-Gewicht und die niedrigen Kosten. Wie in verschiedenen Studien nachgewiesen wurde, kann er jedoch keine adäquate Frakturstabilisierung gewährleisten, da er weder achs- noch rotationsstabil ist (Garcia et al., 2008; Histing et al., 2011a; Holstein et al., 2007a).

Unsere Arbeitsgruppe entwickelte erstmals ein rotationsstabiles Osteosynthese-Modell für geschlossene Frakturen. Es besteht aus einer Injektionskanüle mit beidseitig abgeflachten Enden, die in das Femur implantiert wird. Im Gegensatz zum Fixateur externe, der ebenfalls Rotationsstabilität gewährleistet, ist das Einbringen dieses intramedullären Implantates technisch einfach und verursacht keine Weichteilgewebeschäden (Holstein et al., 2007a).

Die beschriebene intramedulläre Stabilisierung zeigte sich jedoch in biomechanischen Test als nicht achsstabil. Deshalb entwickelte unsere Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen (Davos, Schweiz) ein weiteres Implantat für geschlossene Frakturmodelle, das neben der Rotationsstabilität auch axiale Stabilität gewährleisten sollte. Es handelt sich hierbei um eine intramedulläre Zugschraube (MouseScrew®, RISystem AG, Davos, Schweiz) aus rostfreiem Stahl mit einer Länge von 18 mm und einem Durchmesser von 5 mm. In einer Vergleichsstudie der Osteosynthesetechniken zeigte sich ein signifikant höheres maximales Drehmoment bei den Knochen, die mit der intramedullären Zugschraube versorgt waren. Damit wurde von unserer Arbeitsgruppe zum ersten Mal eine rotations- und achsstabile Osteosynthese für ein geschlossenes Frakturmodell an der Maus beschrieben (Holstein et al., 2009b).

2.4.2 Ratte

Noch vor der Einführung der Mausmodelle, wurde die Ratte als Tiermodell in Frakturstudien etabliert. An der Ratte wurden nicht nur Femur, Tibia und Fibula, sondern auch Schädel, Metatarsale, Radius und Ulna hinsichtlich der Frakturheilung untersucht (Hietaniemi et al., 1995; Utvåg et al., 1994). Im Vergleich zur Maus sind im Rattenmodell sowohl der operative Eingriff als auch die biomechanischen Testungen aufgrund der größeren Knochen leichter durchführbar. Die Kosten für Anschaffung und Haltung der Ratten sind ebenfalls überschaubar (Nunamaker, 1998).

2.4.3 Kaninchen

Auch das Kaninchen ist als Tiermodell in Frakturstudien verwendet worden (Chu et al., 2008; Han et al., 2012). Aufgrund der geeigneten Größe konnten auch komplexere biophysikalische Experimente, z.B. die Untersuchung der Auswirkung eines Magnet- oder elektrischen Feldes auf die Frakturheilung, durchgeführt werden (Brighton et al., 1985; Deibert et al., 1994). Des Weiteren können beim Kaninchen Implantate wie Fixateur externe, Platte, Schraube oder Verriegelungsmarknagel aufgrund der anatomischen Gegebenheiten ohne größere technische Schwierigkeiten angewandt werden (Nunamaker, 1998).

2.4.4 Katze

Die Katze diente bislang in veterinärmedizinischen Therapiestudien sowie in verschiedenen Forschungsarbeiten als Frakturmodell. Die unterschiedlichsten Methoden der operativen Frakturstabilisierung sowie der konservativen Behandlung sind an der Katze beschrieben worden (Barnhart et al., 2013; Degaspero et al., 2007; Salas & Popovitch, 2011). Auch das Einheilverfahren von Knochen-*Allografts* ist an der Katze untersucht worden (Nather, 2001). Die Größe und Form der Knochen – v.a. des Femurs – erleichtern das Einbringen der intramedullären Implantate, Platten oder Schrauben erheblich (Nunamaker, 1998).

2.4.5 Hund

Frakturheilungsstudien am Hund sind in der Veterinärmedizin von großer Bedeutung, da die meisten wissenschaftlichen Erkenntnisse über die biologischen Abläufe der Frakturheilung sowie deren Therapie aus Studien am Hund hervorgehen. Es existieren zahlreiche Modelle

für interne und externe Stabilisierungstechniken sowie auch Modelle ohne angewandte Stabilisierung bzw. mit ausbleibender oder verzögerter Heilung (Davy & Connolly, 1982; Lenehan et al., 1985; Nunamaker, 1998; Peter et al., 1996).

2.4.6 Schaf

Das Schaf ist ein beliebtes Modell zur Erprobung von Human-Implantaten. So nutzte die ASIF das Schaf für die Untersuchung der Frakturheilung mittels Plattenosteosynthese bzw. intramedullärer Stabilisierungstechnik (Cheal et al., 1991; Schemitsch et al., 1994, 1995; Steen et al., 1988). Im Gegensatz zu den oben aufgeführten Tiermodellen ist beim Schaf eine primäre Knochenheilung, bei der das *Remodelling*, ähnlich wie beim Menschen unter Mitwirkung des Havers-System erfolgt, nachgewiesen worden. Schafe belasten relativ früh die frakturierte Extremität. Wegen des Kompressionseffektes sind sie deshalb auch für intramedulläre Osteosynthesetechniken geeignet. Limitierende Faktoren für die Verwendung des Schafes als Tiermodell sind die hohen Kosten für die Zucht und Haltung (Nunamaker, 1998).

2.5 Das Apolipoprotein E und der Stoffwechsel der Plasmalipide

1973 wurde das ApoE erstmals als Bestandteil der Lipoproteine beschrieben (Shore & Shore, 1973). ApoE ist eines von insgesamt zehn Apolipoproteinen, welche die Lipoproteine umhüllen. Es wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert und besteht aus 317 Aminosäuren. Im menschlichen Plasma liegt es in einer Konzentration von 3-5 mg/dl vor. Es findet sich vor allem auf der Oberfläche der Lipoproteine VLDL, IDL, HDL sowie der Chylomikronen. ApoE kann zwischen den verschiedenen Typen von Lipoproteinen ausgetauscht werden und dient in erster Linie als Ligand für die Rezeptor-vermittelte Entfernung der Lipoproteine aus dem Plasma. Während ApoE die Lipoproteine VLDL und IDL über den Low Density Lipoprotein-Rezeptor aus dem Plasma entfernt, werden die Chylomikronen-Reste entweder über den LDLR oder den LRP beseitigt. Weiterhin ist ApoE am Rücktransport des Cholesterins vom peripheren Gewebe zur Leber sowie an der Verteilung des Cholesterins im peripheren Gewebe beteiligt (Plump & Breslow, 1995; Plump et al., 1992).

Die Hauptfunktionen von ApoE sollen an diesem Schaubild (Wouters et al., 2005) demonstriert werden:

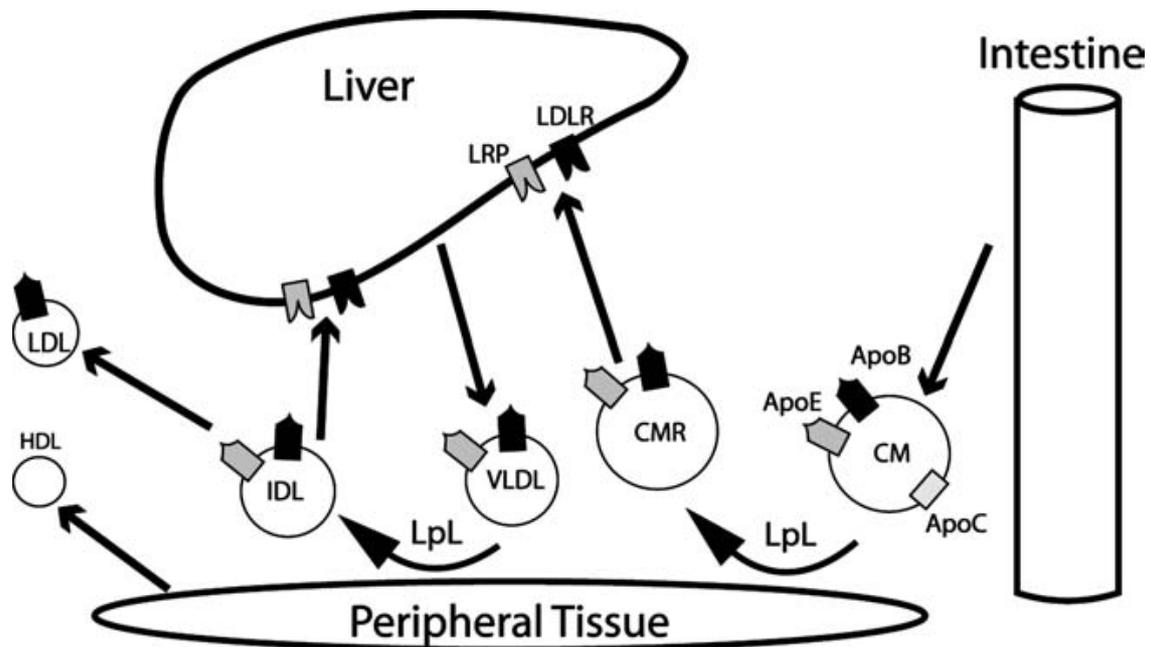


Abb. 1: Die Hauptfunktionen von ApoE (Wouters et al., 2005)

Die mit der Nahrung aufgenommenen Lipide werden nach Darmpassage und Absorption zunächst in Chylomikronen (CM) verpackt und an die Lymphe abgegeben, bevor sie dann über den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf gelangen. Auf ihrer Oberfläche befinden sich die Apolipoproteine ApoB, ApoC und ApoE. Die Lipoproteinlipase (LpL), die sich an den Endothelzellen der Blutbahn befindet, spaltet aus den Chylomikronen Fettsäuren ab, die vor allem von Muskel- und Fettgewebe aufgenommen werden. Die Chylomikronenreste (CMR) werden dann per Endozytose von der Leber aufgenommen, indem ApoE an den LDLR oder LRP bindet. Des Weiteren kann ApoE die Synthese und Sekretion von VLDL in der Leber induzieren. Aus den VLDL, die überwiegend endogene Lipide enthalten, werden über die LpL wiederum Fettsäuren herausgespalten, woraus die VLDL-Reste, die IDL hervorgehen. Die IDL werden erneut von der Leber aufgenommen, indem ApoE und ApoB an die oben genannten Rezeptoren binden. Aus den übrigbleibenden IDL entstehen schließlich LDL. Diese tragen ApoB auf ihrer Oberfläche und können über rezeptorvermittelte Endozytose in den extrahepatischen Geweben aufgenommen werden (Königshoff & Brandenburger, 2007; Wouters et al., 2005).

Wie im Schaubild angedeutet, ist ApoE außerdem an der Entfernung von Cholesterin aus den Zellmembranen der extrahepatischen Gewebe beteiligt, indem es die Aufnahmekapazität von HDL, das für den Rücktransport des Cholesterins zur Leber zuständig ist, erhöht (Curtiss & Boisvert, 2000).

2.6 Die Folgen einer Apolipoprotein E-Defizienz

Hyperlipidämie gilt als wichtigster Risikofaktor der Atherosklerose und damit auch der kardiovaskulären Erkrankung. Auch wenn die Ätiologie der Hyperlipidämie und Atherosklerose komplex ist und von einer Vielzahl an verschiedenen Genen und Umweltfaktoren gesteuert wird, scheinen Mutationen in zwei bestimmten Genen direkt in

den Krankheitsprozess involviert zu sein. Dabei handelt es sich um Genmutationen des LDLR sowie des ApoE, die schon in den frühen 1980er Jahren entdeckt wurden (Wouters et al., 2005).

Um ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen des Lipidstoffwechsels zu erlangen, wurden gentechnisch manipulierte Maus-Stämme entwickelt. Die bekanntesten unter ihnen sind die ApoE- und die LDLR-defizienten-Maus-Stämme (Wouters et al., 2005). Im Folgenden soll nun genauer auf die ApoE-Knockout-Maus eingegangen werden.

Die ersten ApoE-defizienten-Maus-Stämme wurden von Plump et al., 1992 und Zhang et al., 1992 in zwei voneinander unabhängig arbeitenden Laboren entwickelt.

In der Studie von Plump et al. zeigte sich, dass die ApoE-defizienten-Mäuse deutlich erhöhte Cholesterinwerte hatten. So ergaben sich bereits unter einer Standardfütterung (4,5 % Fett, 0,02 % Cholesterin) bei den ApoE-Knockout-Mäusen Gesamtcholesterinwerte von 494 ± 95 mg/dl im Vergleich zu 60 ± 20 mg/dl in den entsprechenden Wildtyp-Mäusen. Weiterhin waren die Serumtriglyzeride auf 110 mg/dl vs. 64 mg/dl erhöht. Verglichen mit der durchschnittlichen Ernährung des Menschen, ist das Standardfutter der Mäuse sehr fettarm. Um gleiche Voraussetzungen zu schaffen, wurden den Versuchstieren fett- und cholesterinreiches Futter vom sog. Western-Typ (21 % Fett, 0,15 % Cholesterin) dargereicht. Unter dieser Fütterung zeigten ApoE-defiziente-Mäuse Gesamtcholesterinwerte von 1821 ± 395 mg/dl im Vergleich zu 132 ± 18 mg/dl in den Kontrollen. Die Triglyzeride waren hingegen unter der cholesterinreichen Ernährung bei den ApoE-Knockout-Mäusen nur gering erhöht (107 ± 24 mg/dl vs. 80 ± 29 mg/dl) (Plump et al., 1992).

Um festzustellen, ob die ApoE-Defizienz neben der Hypercholesterinämie auch zur Atherosklerose führt, untersuchten Plump et al. die Aorta der Versuchstiere im Alter von drei bis vier Monaten. Bereits unter Standardfutter zeigten sich deutliche, atherosklerotische Läsionen der Intima, während die Gefäße der Kontrolltiere unauffällig blieben. Um den Effekt einer cholesterinreichen Ernährung zu beleuchten, wurden im nächsten Schritt die aortalen Gefäße unter der Western-Typ-Fütterung untersucht. Dazu wurden die Versuchstiere im Alter von acht bis zehn Wochen getötet, nachdem sie zuvor etwa vier bis fünf Wochen lang die cholesterin- und fettreiche Ernährung erhalten hatten. Wiederum zeigten sich bei allen ApoE-Knockout-Mäusen atherosklerotische Läsionen in der proximalen Aorta, während die Gefäße der Kontrolltiere unauffällig blieben. Verglichen mit den Gefäßläsionen unter

Standardfutter zeigten sich etwa dreimal größere atherosklerotische Läsionen unter der Western-Typ-Fütterung (Plump et al., 1992).

Nakashima et al. bewiesen, dass sich bei den ApoE-defizienten-Mäusen atherosklerotische Gefäßveränderungen nicht nur in der Aorta, sondern entlang des gesamten arteriellen Gefäßbaumes ausbilden. Mithilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen fanden sich bereits erste Gefäßläsionen mit Schaumzellbildung im Alter von zehn (unter Standardfutter) bzw. acht Wochen (unter Western-Typ-Ernährung). Mit 15 Wochen waren erste fibröse Plaques bei den ApoE-Knockout-Mäusen unter der cholesterin- und fettreichen Ernährung feststellbar. Die Gefäßläsionen nahmen mit fortschreitendem Alter an Größe zu und verschlossen das Gefäßlumen zum Teil bis zu 95 %. Weiterhin wurden die Läsionen histologisch untersucht. Als früheste Veränderungen fanden sich am Endothel haftende Monozyten. Schaumzellen oder sog. *fatty streaks* bildeten sich im weiteren Prozedere aus. Mit zunehmendem Alter entwickelten sich diese zu fibrofettigen Läsionen mit fettbeladenen Makrophagen und Schaumzellen, die letztendlich zur fibrösen Plaquebildung führten. Der beschriebene Ablauf der Atherogenese ähnelt der des Menschen beachtlich, was bislang noch in keinem anderen Mausmodell gezeigt werden konnte (Nakashima et al., 1994).

Somit kann die Entwicklung des ApoE-defizienten-Maus-Stammes als eine wichtige Landmarke für die Erforschung der Atherosklerose anhand von Tiermodellen betrachtet werden. Die ApoE-defiziente-Maus zählt heute zu den meist verwendeten Tiermodellen für die Untersuchung von Hyperlipidämie und Atherosklerose (Wouters et al., 2005).

Die kardiovaskuläre Erkrankung und die Osteoporose sind beides Volkskrankheiten, die häufig miteinander vergesellschaftet sind und zu erhöhter Morbidität und Mortalität in der alternden Bevölkerung führen. In Studien gibt es seit längerer Zeit Hinweise, dass den beiden Krankheitsbildern eine ähnliche Pathophysiologie zugrunde liegt (Banks et al., 1994; Hak et al., 2000; McFarlane et al., 2004).

Bereits vor einigen Jahren fand man in atherosklerotischen Gefäßen Osteoblasten-ähnliche Zellen, die vermutlich zu deren Verkalkung beitragen, die sog. *calcifying vascular cells*. Weiterhin sind in atherosklerotischen Plaques Wachstumsfaktoren wie MGP, OC, BMP, OPN, ON, OPG, RANK-L sowie inflammatorische Zytokine vorhanden, die gleichermaßen eine Rolle im Knochenstoffwechsel spielen (Dhore et al., 2001; McFarlane et al., 2004).

Wie in Studien gezeigt werden konnte, scheinen oxidierte Lipide, die bekanntlich an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt sind, auch für die verminderte Knochendichte im

Rahmen der Osteoporose verantwortlich zu sein. (McFarlane et al., 2004; Witztum & Steinberg, 1991). In vitro und in vivo Studien konnten zeigen, dass hierfür eine Inhibierung der Osteoblastendifferenzierung ursächlich ist (Liu et al., 2005; Parhami et al., 1997). Die Differenzierung der Osteoblasten ist jedoch nicht nur im Knochenstoffwechsel von Bedeutung sondern – wie bereits weiter oben beschrieben wurde – auch essentiell für eine erfolgreiche Frakturheilung.

2.7 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, zu untersuchen, ob im Organismus vorbestehende atherosklerotische Gefäßveränderungen Einfluss auf die Frakturheilung nehmen.

Die entsprechenden Informationen sollten mit Hilfe einer tierexperimentellen Studie an der Maus beantwortet werden. Dazu wurde ein etabliertes Tiermodell verwendet.

2.8 Fragestellung

Die tierexperimentellen Untersuchungen sollten die Frage beantworten, ob bei Mäusen mit atherosklerotischen Gefäßveränderungen gegenüber Mäusen ohne atherosklerotische Gefäßveränderungen hinsichtlich der Knochenheilung Unterschiede festzustellen sind bzw. ob im Bezug auf die Frakturheilung der negative Einfluss der Osteoblastenhemmung oder der positive Effekt der gesteigerten Angiogenese im atherosklerotisch veränderten Organismus überwiegt.

Die Nullhypothese lautet:

„Die Knochenbruchheilung bei Mäusen mit atherosklerotischen Gefäßveränderungen (Verum) weist gegenüber Mäusen ohne atherosklerotische Gefäßveränderungen (Kontrolle) keinerlei Unterschiede auf.“

Die Knochenbruchheilung wurde zwei bzw. vier Wochen nach Frakturierung anhand von histomorphometrischen, biomechanischen sowie proteinbiochemischen Methoden am postmortalen Knochenpräparat untersucht.

3 Material und Methodik

3.1 Intervention

3.1.1 Versuchsprotokoll

Der Tierversuch wurde durch die zuständige Behörde (Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Saarbrücken) unter dem AZ C-12.4.2.2 Versuchsvorhaben 07/2011 genehmigt. Die Versuche wurden am Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes unter Einhaltung der Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Für die Studie wurden insgesamt 87 Mäuse (44 Wildtyp-Mäuse, 43 ApoE-defiziente-Mäuse) verwendet. Zwei bzw. vier Wochen nach Frakturierung des Femurs wurde der Knochen untersucht. Dies erfolgte nach histomorphometrischen, biochemischen und proteinbiochemischen Kriterien. Es wurden insgesamt sechs Versuchsgruppen gebildet (siehe Tabelle).

Maus-Typ	ApoE -/-		Wildtyp	
	2 Wo	4 Wo	2 Wo	4 Wo
Standzeit	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8
Histomorphometrie	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8
Biomechanik	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8
Western-Blot	n = 6	n = 5	n = 6	n = 6

Tab. 1: Versuchsprotokoll

3.1.2 Tiermodell

Als Versuchstiere wurden C57BL/6-Mäuse und ApoE-defiziente-Mäuse mit einem Körpergewicht zwischen 25-39 g verwendet. Die Tierhaltung erfolgte im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes unter klimatisierten Raumbedingungen (Lufttemperatur: 22-24 °C, relative Luftfeuchtigkeit 60 %) bei 12-stündigem Tag-/Nachtrhythmus in Einzel- oder Doppelkäfigen. Während für die C57BL/6-Mäuse Wasser und Standardfutter (3,3 % Rohfett, ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) bereitgestellt wurden, erhielten die ApoE-defizienten-Mäuse die sog. Western-Typ-Ernährung (21 % Fett, 19,5 % Kasein, 1,25 % Cholesterin) (ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Das Futter wurde in Pelletform *ad libidum* bereitgestellt.

3.1.3 Operation

Die Operation wurde in gleicher standardisierter Weise an allen Versuchstieren im Tieroperationsaal des Institutes für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Die Versuchstiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 2 % Xylazin (2 mg/kg Körpergewicht, Bayer, Leverkusen, Deutschland) und Ketamin (75 mg/kg Körpergewicht, Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) narkotisiert. Postoperativ wurden die Tiere für einen Zeitraum von ein bis zwei Tagen mit Carprofen (5 mg/kg Körpergewicht, Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland) analgesiert.

Zunächst wurde jedem Versuchstier die entsprechende gewichtsadaptierte Narkosedosis intraperitoneal injiziert. Nach Narkoseeinleitung wurde das rechte Femur enthaart, um eine optimale Sicht auf die Inzisionsstelle zu erhalten und das Wundinfektionsrisiko zu minimieren. Auf die Augen der Mäuse wurde Bepanthen-Salbe (Bayer, Leverkusen, Deutschland) aufgetragen, um ein Austrocknen zu vermeiden.

Nach ausreichender Hautdesinfektion mit Softasept (B. Braun, Melsungen, Deutschland) erfolgte zunächst ein ca. vier mm großer Hautschnitt medial der Patellarsehne (*Abb. 2-3*). Im nächsten Schritt wurde die Kniegelenkscapsel eröffnet und die Patellarsehne nach lateral luxiert, so dass freie Sicht auf die Kondylen des Femurs bestand (*Abb. 4*).

Die Eröffnung des Markraumes erfolgte zunächst interkondylär mit einer 24-Gauge-Spritzkanüle (B. Braun, Melsungen, Deutschland) (*Abb. 5*). Anschließend wurde eine 27-Gauge-Kanüle (B. Braun, Melsungen, Deutschland) durch kontinuierliche Drehbewegungen retrograd im Markraum vorgetrieben, bis der Trochanter major perforiert wurde (*Abb. 6*). Über die Kanülenöffnung wurde nun ein Wolfram-Führungsdraht (Durchmesser 0,2 mm, Goldfellow, Bad Nauheim, Deutschland) in den Markraum eingefädelt, so dass das Femur bei liegendem Führungsdraht geschlossen frakturiert werden konnte (*Abb. 7-8*).

Die Frakturierung des Femurs erfolgte mit der 3-Punkt-Biegeapparatur (*Abb. 9*). Dabei wurde die Maschine so eingestellt, dass eine geschlossene Querfraktur in Femurschaftmitte (AO-Klassifikation Typ 32A) entstand. Die Fraktur wurde anschließend mit einem Röntgengerät (Kleintier-Röntgenanlage MX-20, Faxitron, Tucson, Arizona, USA) dokumentiert. Nun erfolgte die Implantation der Zugschraube (MouseScrew®, RISystem AG, Davos, Schweiz), die mithilfe eines Schraubendrehers über den Führungsdraht in den Markraum eingebracht wurde (*Abb. 10-11*). Nachdem das distale Schraubenende im

3 Material und Methodik

Trochanter major verankert worden war, wurde das proximale Ende an der Sollbruchstelle abgetrennt (Abb. 12). Um die korrekte Lage der implantierten Zugschraube zu dokumentieren, wurde erneut das Femur geröntgt. Abschließend wurde die reponierte Patellarsehne durch Nähte des medialen Retinaculums refixiert und die Haut mit 5-0 Prolene® (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen (Abb. 13-14).



Abb. 2: Hautinzision medial der Patellarsehne



Abb. 3: Sicht auf die rechte Patellarsehne



Abb. 4: Eröffnung der Kniegelenkskapsel



Abb. 5: Interkondyläre Aufbohrung

3 Material und Methodik



Abb. 6: Sondierung des Markraumes mit einer 27-Gauge-Kanüle



Abb. 7: Einfädeln des Führungsdrahtes

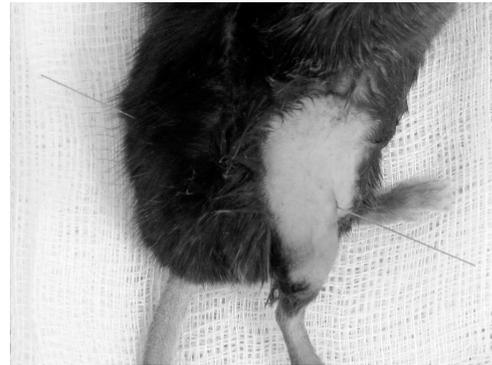


Abb. 8: Liegender Führungsdraht

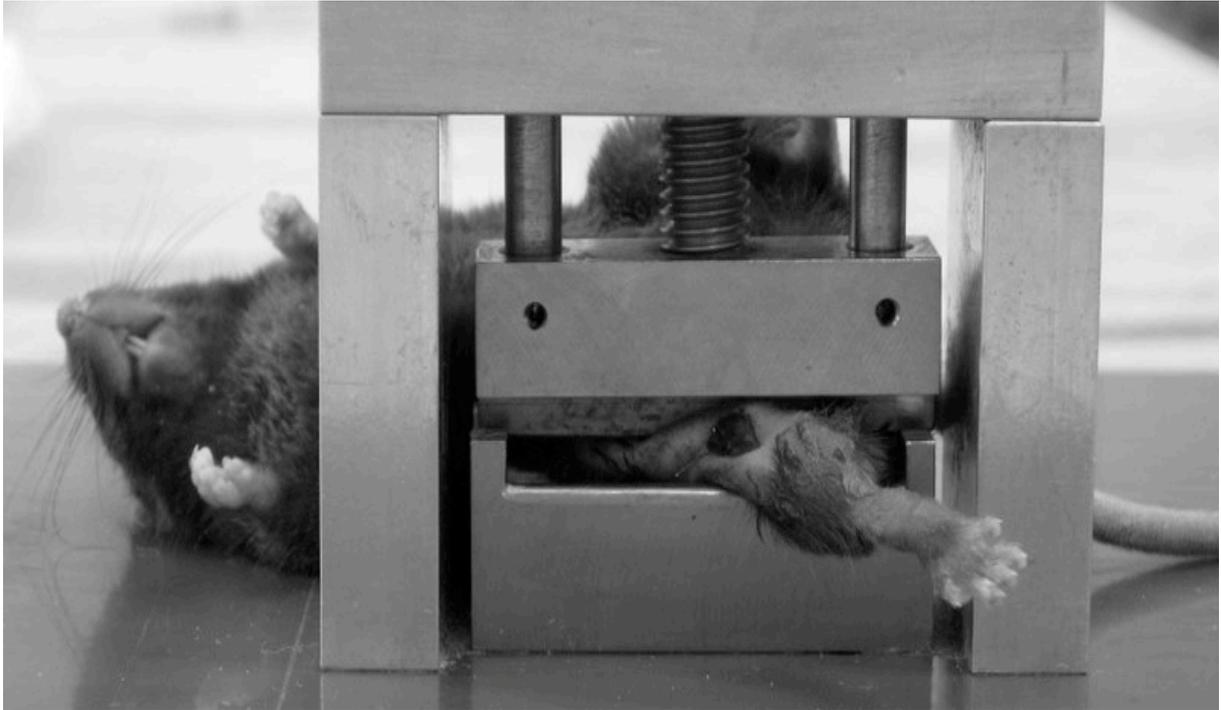


Abb. 9: Frakturierung des rechten Femurs mit der 3-Punkt-Biegeapparatur

3 Material und Methodik



Abb. 10: Implantation der Zugschraube (1)



Abb. 11: Implantation der Zugschraube (2)



Abb. 12: Sicht auf die implantierte Zugschraube



Abb. 13: Refixierung der Patellarsehne



Abb. 14: Hautnaht

3.1.4 Tötung der Tiere

Nach Anfertigung eines Röntgenbildes wurden die Versuchstiere zwei bzw. vier Wochen postoperativ durch eine intraperitoneale Injektion einer Überdosis Phenobarbital getötet.

3.1.5 Präparation des Knochens

Das frakturierte rechte Femur wurde nach Tötung der Tiere explantiert. Zunächst wurde das Femur im Knie- und Hüftgelenk exartikuliert und anschließend der umgebende Weichteilmantel entfernt. Dabei wurde mit größter Sorgfalt der Frakturkallus geschont. Für die weitere histomorphometrische und biomechanische Auswertung wurde das Implantat entfernt. Dazu wurde das Ende der Zugschraube mithilfe eines Nadelhalters fixiert und die Schraube durch vorsichtige Drehbewegungen aus dem Markraum explantiert. Hierbei wurde streng darauf geachtet, dass kein Drehmoment auf die ehemalige Fraktur einwirkt.

3.1.6 Blutentnahme

Zur Untersuchung der Serumlipide wurde bei insgesamt 16 Versuchstieren (acht Wildtyp-Mäuse, acht ApoE-defiziente-Mäuse) vor der Tötung Blut entnommen. Dazu wurde die ausreichend narkotisierte Maus in Rückenlage unter dem Lichtmikroskop (Leica M 65, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) platziert, die Bauchhöhle eröffnet und die Vena cava inferior aufgesucht. An der Mündungsstelle der rechten Vena renalis in die Vena cava inferior wurde das Gefäß unter 10-facher Vergrößerung punktiert und ca. 0,8 ml Blut entnommen. Die Kanüle war zuvor mit Heparin durchspült worden, um eine frühzeitige Gerinnung zu vermeiden. Im Anschluss daran wurde das Blut zentrifugiert (Hettich Universal 30 RF, Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland) und je 100 µl Serum-Überstand in drei Eppendorfgefäße pipetiert. Bis zur weiteren Analyse wurde das Serum bei – 80 °C tiefgefroren.

3.2 Histomorphometrie

Um die Größe und die Gewebezusammensetzung des Frakturkallus quantitativ zu analysieren, wurden die Knochen histomorphometrisch untersucht.

Nachdem das Femur explantiert, präpariert sowie die intramedulläre Zugschraube entfernt worden war, wurde der Knochen zunächst für 24 Stunden in 4 % Formalin fixiert und für

weitere vier Wochen in 10 % EDTA bei 4 °C entkalkt. Anschließend wurden die entkalkten Knochen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils eine Stunde mit 70 %, 80 %, 90 %, sowie viermal eine Stunde mit 100 % Alkohol) entwässert. Um das Gewebe paraffingängig zu machen, wurden die Proben nun dreimal für jeweils eine Stunde mit Xylol behandelt. Danach erfolgte die Einbettung der Proben in heißem Paraffin für ca. eine Stunde.

Im nächsten Schritt wurden 5 µm dicke Schnittpräparate im Bereich des größten Kallusdurchmessers in longitudinaler Schnittführung angefertigt und nach der Masson-Goldner-Methode gefärbt. Zunächst wurden die Präparate ein bis zwei Minuten in Weigerts Eisenhämatoxylin gefärbt, zehn bis 15 Minuten unter fließendem Wasser gespült und weitere fünf bis sieben Minuten in Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin gefärbt. Anschließend wurden die Proben mit 1 % Essigsäure gespült sowie mit Molybdätophosphorsäure-Orange bzw. Wolframatophosphorsäure-Orange bis zur vollständigen Entfärbung des Bindegewebes behandelt. Nun wurden die Präparate erneut mit 1 % Essigsäure gespült und mit Lichtgrün für fünf Minuten gegengefärbt. Im letzten Schritt wurden die Proben mit 1 % Essigsäure für fünf Minuten ausgewaschen und in Isopropanol entwässert.

Zur quantitativen Auswertung wurden nun die histologischen Schnittpräparate unter 1,25-facher Vergrößerung (Olympus BX60 Microscope, Olympus, Tokio, Japan) digitalisiert (Zeiss Axio Cam and Axio Vision 3.1, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und mit einem Bildauswertungsprogramm analysiert (ImageJ Analysis System, NIH, Bethesda, USA).

Bei jedem Präparat wurden gemäß den Ausführungen von Gerstenfeld et al. folgende Parameter bestimmt:

- Fläche des periostalen Kallus (CAr [mm²])
- Fläche des knorpeligen Anteils innerhalb des periostalen Kallus [mm²]
- Fläche des bindegewebigen Anteils innerhalb des periostalen Kallus [mm²]
- Fläche des knöchernen Anteils innerhalb des periostalen Kallus [mm²]
- Knöcherne periostale Kallusfläche/ periostale Kallusfläche (TOTAr/CAr [%])
- Knorpelige periostale Kallusfläche/ periostale Kallusfläche (CgAr/CAr [%])
- Bindegewebige periostale Kallusfläche/ periostale Kallusfläche (FTAr/CAr [%])

(Gerstenfeld et al., 2005)

3.3 Biomechanik

In der biomechanischen Auswertung wurde die Rotationsstabilität der frakturierten Knochen nach einer Heilungsphase von zwei bzw. vier Wochen zwischen den Versuchstieren (ApoE -/- vs. Kontrolle) verglichen.

Die explantierten Knochen wurden nach Entfernung der Zugschrauben zunächst bei - 80 °C bis zum Beginn der Auswertung konserviert. Unmittelbar vor der Testung wurden die Knochen bei Raumtemperatur standardisiert vollständig aufgetaut.

Zunächst wurde das proximale und distale Ende des Femurs in zwei vorgefertigte Aluminiumzylinder (innerer Durchmesser 7 mm, Höhe 5 mm) mit Knochenzement (Palacos®, Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) mittig befestigt. Anschließend wurden die Zylinder mit dem eingebetteten Knochen in eine elektronische Rotations-Messapparatur eingespannt.

Die Messapparatur besteht aus einer fixen und einer frei rotierenden Achse. Nach Einspannung der Aluminiumzylinder in die Apparatur, wurde das Femur an beiden Axen fixiert. Nun wurde an der freien Achse ein ansteigendes Drehmoment angelegt, wobei der Knochen kontinuierlich über eine Winkelscheibe um 0,42 °/s rotiert wurde. Der Verlauf des ansteigenden Drehmomentes wurde mithilfe eines Sensors quantifiziert.

Sobald der Frakturkallus durch die Rotationskräfte zerstört worden war, wurde die Messung beendet. Die gemessenen Drehmomente wurden zusammen mit den Winkelgraden über ein digitales Messgerät in eine Excel Tabelle der Software FMI Connect (Version 3.02 EU, Alluris GmbH) übertragen. Daraus konnten folgenden Werte ermittelt werden:

- Maximales Drehmoment bei (erneutem) Bruch des Knochens
- Maximaler Torsionswinkel vor (erneutem) Bruch des Knochens
- Torsionssteifigkeit des Knochens

3.4 Western Blot

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von CD31, CYR61 sowie BMP-2 nach zwei- und vierwöchiger Frakturheilung im Kallusgewebe ermittelt. Nach Tötung des Versuchstieres wurde das Femur freipräpariert und das den Frakturkallus umgebende Weichteilgewebe vorsichtig reseziert. Das Kallusgewebe wurde nun mit einer Skalpellklinge abgetragen und in ein Eppendorf Gefäß, gefüllt mit 100 µl Lysis-Puffer, einem Proteinaseinhibitor-Cocktail (1:75; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und 100 Millimol PMSF (1:500; Roth,

Karlsruhe, Deutschland) gegeben. Das Eppendorf Gefäß samt Kallusprobe und Lysis-Puffer wurde nun zügig in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei - 80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung kryokonserviert.

Zur Aufarbeitung wurden die aufgetauten Proben nun für 20 Sekunden im Homogenisator (Micra D1, ART Prozess- & Labortechnik GmbH, Müllheim, Deutschland) homogenisiert, 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 30 Minuten bei 13000 U/min (16000 x g) und 4 °C zentrifugiert (Biofuge Fresco, Kendro, Hanau, Deutschland). Die anschließend abpipettierten Überstände wurden verworfen. Das übrigbleibende native Protein wurde bei - 20 °C konserviert bzw. auf Eis gelagert sofort zur Proteinbestimmung eingesetzt.

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode nach Lowry gewählt. Hierzu wurden die gewonnenen Proben zunächst mit Aqua destillata auf 1:10 verdünnt. Die benötigten Messlösungen wurden direkt vor der Konzentrationsbestimmung frisch angesetzt. Zunächst wurden 5 ml von Reagenz A (10 g Na₂CO₃/500 ml 0,1 Mol NaOH) mit 100 µl Reagenz B (0,5 g KNa-Tartrat, 0,25 g Cu-Sulfat x 5 H₂O/50 ml Aqua destillata) gemischt. 250 µl dieser Lösung wurden im nächsten Schritt zu 50 µl der zuvor verdünnten Proteinproben hinzugefügt und für 15 s gemischt (Vortex, Heidolph Reax top, Fisher Scientific).

Anschließend wurden die Proben für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden den Proteinproben je 25 µl einer Folinlösung (Sigma-Aldrich; 1:2 verdünnt mit Aqua destillata) hinzugefügt und sofort mithilfe des Vortex gemischt.

Es erfolgte im Anschluss eine 30-minütige Inkubation der Proben bei Raumtemperatur. Danach wurde die Absorption des entstandenen Farbkomplexes photometrisch (GeneQuant pro, Amersham pharmacia biotech, Freiburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen Aqua destillata gemessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe einer BSA-Standardkurve ermittelt. Es wurde zu jedem Proteinextrakt eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Proteinextrakte wurden zunächst auf eine identische Konzentration von 20 µg/µl eingestellt. Anschließend fügte man den Proteinen zweimal Laemmli Puffer (Sigma-Aldrich) hinzu, sodass sich eine Endkonzentration der Proteine von 10 µg/15 µl ergab. Anschließend wurden die Proteine für fünf Minuten in kochendem Wasserbad denaturiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Western-Blot-Analysen als SDS-PAGE unter diskontinuierlichen Bedingungen nach Laemmli (1970) mit einer Acrylamidkonzentration von 5 % im Sammelgel und einer Acrylamidkonzentration von 10 % im Trenngel durchgeführt (30 % Acrylamid/Bis Solution, 29:1, BioRad, München, Deutschland).

Die Gele wurden in einer vertikalen Flachgelapparatur mit Gießstand für Minigele (Mini-Protean II, BioRad) gegossen. Zusätzlich wurden ca. 200 µl Isopropanol (Roth) zu den Trenngelen hinzugegeben, um eine Hemmung der Polymerisation an der Geloberfläche durch den Sauerstoff der Umgebungsluft zu verhindern sowie die Bildung einer glatten Trennfläche zwischen Trenn- und Sammelgel sicherzustellen.

Nach einer einstündigen Polymerisierung und Entfernung des Alkohols wurde das Sammelgel in die Apparatur gegossen. Anschließend wurden Geltaschen (maximales Beladungsvolumen 15 µl) mit einem Teflon-Kamm (10 Zähne, 4 mm x 1 cm x 0,75 mm, BioRad) ausgeformt.

Nach einer 45-minütigen Polymerisierung wurden je 15 µl der Proben in die Geltaschen aufgetragen. Nun wurden in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Mini-Protean II) die Proteine entsprechend ihrer Molekülgröße in einem TRIS/ Glycinpuffer (0,125 Mol TRIS Base; 0,96 Mol Glycin; 0,5 % SDS, Roth) aufgetrennt. Die benötigte Niederspannung wurde mit einem speziellem Netzgerät für stabilisierten Gleichstrom (Power Pac 200, BioRad) geliefert. Zunächst wurde für 15 Minuten eine Spannung von 100 V angelegt, bevor sie für ca. eine Stunde auf 140 V für die Passage durch das Trenngel erhöht wurde. Sobald die blaue Lauffront der Bromphenolblau-Bande des Sample Buffers das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Auftrennung der Proteine beendet. Nun wurden die Gele aus der Kammer entnommen und in einem Transferpufferbad (12 Millimol TRIS Base, 96 Millimol Glycin, Roth) für das Membranblotting äquilibriert.

Im Anschluss erfolgte das eigentliche *blotting*, also der horizontale Proteintransfer auf eine geeignete Membran, der sog. PVDF-Membran (0,2 µm Porengröße, BioRad) in einer Mini-Trans-Blot-Kammer (BioRad). Zum Ausgleich von Oberflächenspannungen wurde die Membran zunächst in Methanol (Roth) für 20 s gebadet und sofort mit Aqua destillata abgespült. Danach erfolgte eine zehn Minuten dauernde Äquilibration in Transferpuffer (25 Millimol TRIS Base, 192 Millimol Glycin in Aqua destillata).

Die Membran und das Gel wurden nun luftblasenfrei zwischen je zwei mit Transferpuffer getränkten Schwämmen und Filterpapier (Whatman, Schleicher & Schüll, Dassel,

Deutschland) in der Kammer positioniert. Diese sog. Sandwich-Kassette wurde nun so ausgerichtet, dass der angelegte Stromfluss einen Transfer der Proteine vom Gel zur Membran sicherstellte. Durch Einbringung eines Eis-Spacers in die Blotkammer und die Verwendung eines Magnetrührers wurden lokale Überhitzungen vermieden. Die Blotkammer wurde nun über die Elektroden mit Gleichstrom (Power Pac 200, BioRad) versorgt (Anfangsstromstärke 800 mA/zwei Gele). Nach zwei Stunden wurde der Proteintransfer bei einer angelegten konstanten Spannung von 50 V beendet. Zur weiteren Bearbeitung wurde die mit Proteinen beladene Membran über Nacht in TBS-T Puffer (1,5 Millimol TRIS Base pH 7,5; 1 % NaCl; 0,01 % Tween 20 (Roth) in Aqua destillata) bei 4 °C gelagert.

Die Detektion der gesuchten Proteine erfolgte durch eine spezifische Antikörper-Färbung der membrantransferierten Proteine auf einem Horizontalschüttler (Heidolph Polymax 1040, Fisher Scientific). Zunächst wurden die aufbewahrten Membranen noch dreimalig mit TBS-T gewaschen. Des Weiteren wurde die Membran in einer 5 %-igen Lösung aus Milchpulver (Blotting Grade Blocker non-fat dry milk, BioRad) in TBS-T für 30 min inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgten drei weitere Waschschrte mit TBS-T, bevor die ausgewählten Primärantikörper für circa 120 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden.

Primärantikörper	Spezies	Bezugsquelle	Verdünnung/ Inkubation
CD31	Ratte	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland	1:100 über Nacht bei 4 °C und 1:300 für drei Stunden bei Raumtemperatur
CYR61	Ziege	Santa Cruz Biotechnology Heidelberg, Deutschland	1:25 über Nacht bei 4 °C und 1:100 für drei Stunden bei Raumtemperatur
BMP-2	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	1:50 über Nacht bei 4 °C und 1:100 für drei Stunden bei Raumtemperatur

Tab. 2: Primärantikörper für die Western-Blot-Analysen

Nachdem die Membranen für drei weitere Male mit TBS-T gewaschen worden waren, erfolgte die Sekundärantikörper-Inkubation mit Peroxidase-konjugierten Schaf-anti-Maus-IgG-Antikörpern (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland), Esel-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (GE Healthcare) bzw. Kaninchen-anti-Ratte-IgG-Antikörpern (Dako, Hamburg, Deutschland) in einer Konzentration von 1:5000 bei Raumtemperatur. Nach 90 Minuten wurden die Membranen erneut fünfmal mit TBS-T gewaschen und danach der Chemilumineszenzreaktion unterzogen (Enhanced chemiluminescence (ECL) Western Blotting Analysis System, GE Health Care).

Hierzu wurden die Membranen mit einem spezifischen Reagenz für eine Minute inkubiert und anschließend in einer Röntgenkassette positioniert. Dort erfolgte die Exposition eines Röntgenfilms (Hyperfilm ECL, GE Health Care) für einige Minuten. Die Signale wurden schließlich in Entwicklungs- und Fixierbädern (Zahnfilm, Adefo GmbH, Nürnberg, Deutschland) visualisiert und konserviert.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Proteinbeladung und des Proteintransfers wurde der monoklonale β -Actin-Antikörper Klon AC-15 (Sigma-Aldrich) als interner Standard eingesetzt. In allen Western-Blot-Analysen wurde die densitometrisch ermittelte optische Dichte auf gleiche β -Actin-Konzentrationen korrektgerechnet.

Die quantitative Auswertung der Röntgenfilme erfolgte mit dem Gel-Dokumentationssystem (Gel Doc) und dem Quantifizierungsprogramm Quantity One (BioRad). Die quantitative Analyse der Proteinmuster wurde mittels densitometrischer Bestimmung der Lichtabsorption durchgeführt, indem die optische Dichte der Banden über die Fläche ihrer Ausdehnung gemessen wurde. Die erhobenen Daten wurden über den β -Actin-Standard korrigiert.

3.5 Serologische Untersuchung

Die quantitative Analyse des Gesamtcholesterins und der Triglyzeride in den 16 Serumproben erfolgte mithilfe enzymatisch colorimetrischer Tests (F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) an einem modularen Analysegerät (Cobas ® 8000, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz). Es wurden zur Analyse je 200 μ l Serum/ Versuchstier verwendet.

Das Gesamtcholesterin wurde nach der CHOD-PAP-Methode bestimmt. Das zu 70 % als Esther vorliegende Cholesterin wurde zunächst durch Zugabe einer Esterase in freies Cholesterin gespalten. Dieses wurde nun durch die CHOD unter Bildung von

Wasserstoffperoxid oxidiert. Im nächsten Schritt reagierte das Wasserstoffperoxid mit Phenol und PAP zu einem roten Farbstoff. Die gemessene Farbintensität im Analysegerät war proportional zur Konzentration des Gesamtcholesterins (Bruhn et al., 2011).

Zur Bestimmung der Triglyzeride wurde die GPO-PAP-Methode gewählt. Zunächst wurden die Triglyzeride durch Zugabe einer Lipase hydrolysiert. Das gebildete freie Glycerin konnte durch Zugabe der Glycerokinase zu Glycerophosphat umgewandelt werden. Glycerophosphat wiederum wurde durch die GPO zu Dihydroxacetonphosphat und Wasserstoffperoxid umgewandelt. Wasserstoffperoxid reagierte unter Zugabe von PAP und Phenol zu einem roten Farbstoff. Die Farbintensität war wiederum zur Triglyzeridkonzentration proportional und konnte somit quantifiziert werden (Bruhn et al., 2011).

3.6 Statistik

Alle statistischen Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Nach Testung der Normalverteilung (*Kolmogorov-Smirnov-Test*) sowie Varianz (*F-Test*), wurden die beiden Versuchsgruppen anhand des *Student's t-test* miteinander verglichen. Nicht normalverteilte Variablen wurden mithilfe des *Mann-Whitney U-test* untersucht. Die Statistik wurde mit dem *SigmaStat Software Package* (Jandel, San Rafael, USA) durchgeführt. Um signifikante Unterschiede anzuzeigen, wurde ein p-Wert von $< 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Postoperativer Verlauf

Alle Versuchstiere wurden postoperativ bis zum vollständigen Wiedererlangen des Bewusstseins sowie während der gesamten Standzeit beobachtet. Nach einer ca. zweitägigen Schonhaltung der frakturierten Extremität, erfolgte eine vollständige Aufbelastung des rechten Beines im weiteren Verlauf. Das angebotene Futter (Standardfutter bzw. Western-Typ-Ernährung) sowie das Trinkwasser wurden von allen Tieren während der gesamten Versuchszeit in ausreichender Menge aufgenommen. Als postoperative Ausschlusskriterien wurden vor Versuchsbeginn folgende Punkte festgelegt:

- äußere Schmerzzeichen über mehr als drei Tage
- Nahrungsverweigerung und Gewichtsverlust von mehr als 20 % des Körpergewichtes
- makroskopisch bzw. radiologisch festgestellte Implantat-Lockerung

- nachgewiesener Knochen- bzw. Weichteilinfekt

4.2 Makroskopischer Befund

Im Rahmen der postmortalen Explantation des Knochens wurden alle Femora auf mögliche pathologische Veränderungen hin untersucht. Dabei wurden insbesondere die femoro-patellaren sowie femoro-tibialen Gelenke inspiziert. Des Weiteren wurden die Beinmuskulatur hinsichtlich Atrophien sowie die Frakturlokalisierung begutachtet.

Bei den Versuchstieren ergaben sich keine Hinweise auf Luxationen der Patella bzw. des Kniegelenks. Außerdem wurden keine Infektzeichen, Wundheilungsstörungen oder Muskelatrophien an den frakturierten Extremitäten festgestellt.

Die intramedulläre Zugschraube wurde vor ihrer Explantation auf ihre korrekte Lage und festen Sitz hin kontrolliert. Im Falle einer Implantat-Lockerung bzw. Dislokation wurden die Tiere entsprechend obiger Kriterien aus der Studie ausgeschlossen.

Makroskopisch fielen nach einer Standzeit von zwei Wochen in beiden Versuchsgruppen eine Überbrückung des Frakturspaltes sowie eine deutliche Kallusbildung um die Frakturstelle herum auf. Bei den ApoE-defizienten-Mäusen schien der Frakturkallus makroskopisch ausgeprägter zu sein. Unterschiede hinsichtlich der Kallusqualität wurden jedoch nicht bemerkt.

Nach vier Wochen fiel in beiden Gruppen nur noch eine diskrete Kallusfläche um die Frakturstelle herum auf. Es wurden keine Größenunterschiede in der Kallusausprägung wie zuvor in der zweiwöchigen Versuchsgruppe festgestellt. Ebenso schien die Kallusqualität ähnlich zu sein.

4.3 Histomorphometrie

Die histomorphometrische Auswertung erfolgte an longitudinalen Schnittpräparaten im Bereich des größten Kallusdurchmessers.

Die quantitative Analyse der periostalen Kallusfläche ergab sowohl nach einer Standzeit von zwei, als auch nach vier Wochen signifikante Unterschiede zwischen den ApoE-defizienten-Tieren und den Kontrollen.

In der zwei-Wochen-Versuchsgruppe zeigte sich bei den ApoE-defizienten-Mäusen eine signifikant größere periostale Kallusfläche von 4,38 mm² bis 12,67 mm² (M = 9,51 ± 0,97 mm²). Die Kontrollen wiesen eine Kallusfläche von 4,65 mm² bis 11,68 mm² (M = 6,75 ± 0,78 mm², p < 0,05) auf (Abb. 15).

Ebenso signifikante Unterschiede ergaben sich bei der Ausmessung der periostalen Kallusfläche in der vier-Wochen-Versuchsgruppe. Die ApoE-defiziente-Tiere zeigten nach vier Wochen eine deutlich größere Kallusfläche als die Kontrollen (ApoE-defiziente-Mäuse: 3,87 mm² bis 10,60 mm², M = 7,69 ± 0,78 mm² vs. Kontrolle: 1,77 mm² bis 7,10 mm², M = 4,39 ± 0,70 mm², p < 0,05) (Abb. 16).

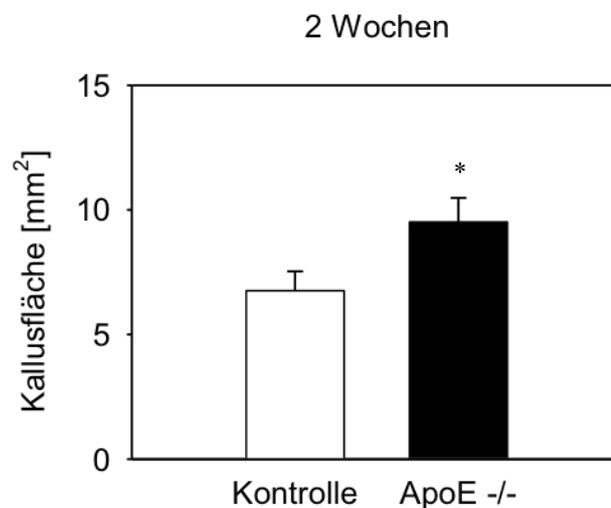


Abb. 15: Periostale Kallusfläche nach einer Standzeit von zwei Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (*p < 0,05).

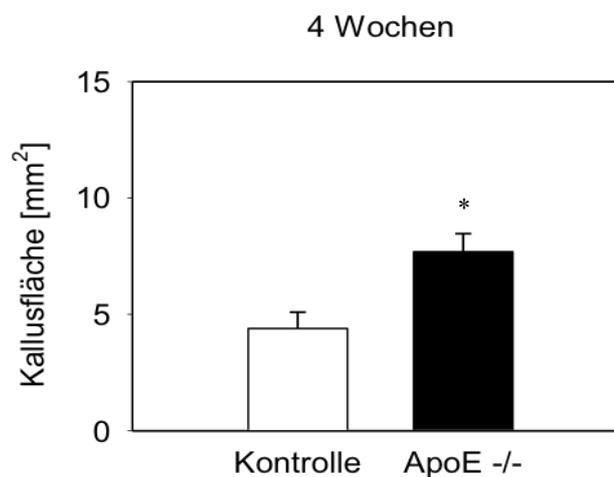


Abb. 16: Periostale Kallusfläche nach einer Standzeit von vier Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (*p < 0,05).

Hinsichtlich der Gewebezusammensetzung im periostalen Kallus zeigte sich nach zwei Wochen bei den ApoE-defizienten-Mäusen ein tendenziell geringerer Anteil an Knochengewebe sowie ein tendenziell höherer Anteil an Knorpelgewebe.

In der zweiwöchigen Versuchsgruppe fand sich bei den ApoE-defizienten-Mäusen ein Knochenanteil von 65,98 % bis 96,12 % ($M = 77,85 \pm 3,41$ %) vs. 73,82 % bis 97,81 % ($M = 83,64 \pm 3,23$ %, $p > 0,05$) in der Kontrollgruppe (Abb. 17). Der Knorpelanteil lag bei den ApoE-defizienten-Mäusen bei 3,88 % bis 33,22 % ($M = 20,93 \pm 3,24$ %) sowie bei 2,19 % bis 25,25 % ($M = 15,24 \pm 3,33$ %, $p > 0,05$) in der Kontrollgruppe (Abb. 18). Bezüglich des Bindegewebes fanden sich nur sehr geringe Unterschiede in beiden Gruppen (ApoE -/-: von 0,00 % bis 2,69 %, $M = 1,19 \pm 0,34$ %, Kontrolle: von 0,00 % bis 4,39 %, $M = 1,12 \pm 0,53$ %, $p > 0,05$) (Abb. 19).

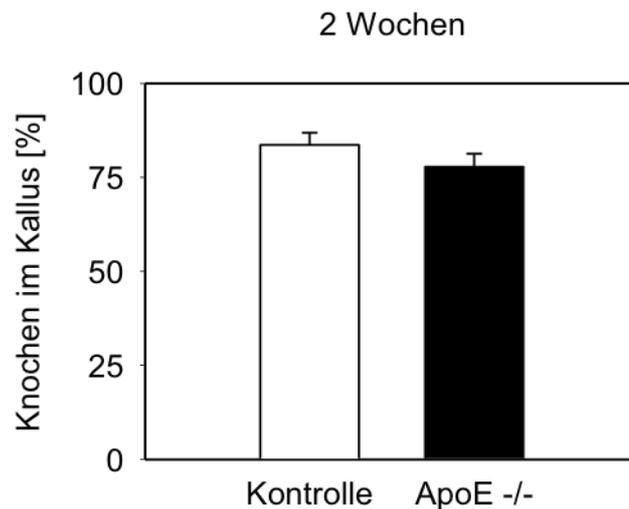


Abb. 17: Prozentualer Anteil an Knochengewebe im Kallus nach zwei Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($p > 0,05$).

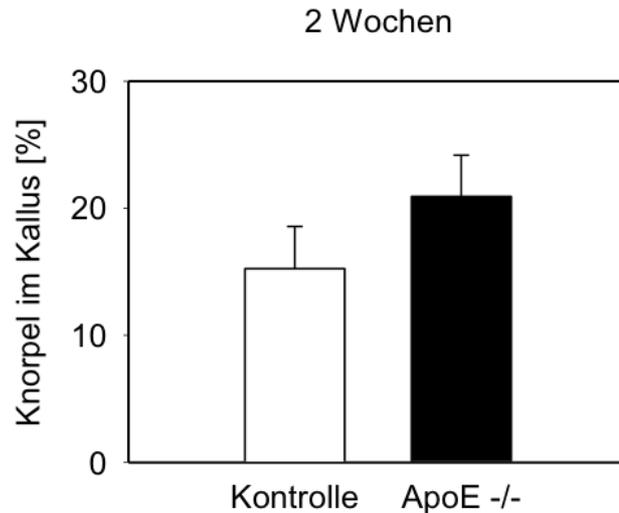


Abb. 18: Prozentualer Anteil an Knorpelgewebe im Kallus nach zwei Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($p > 0,05$).

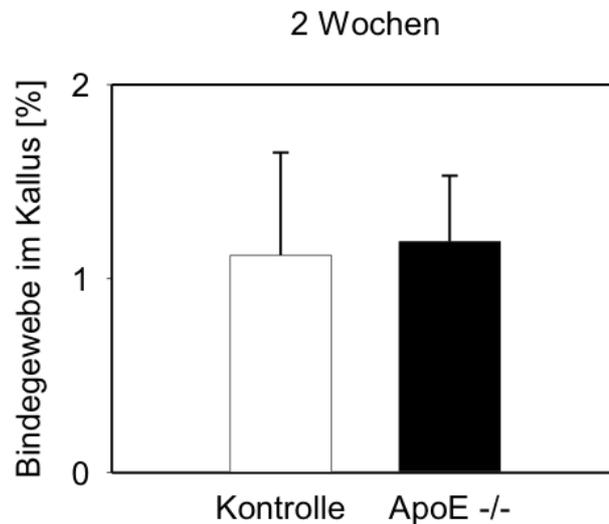


Abb. 19: Prozentualer Anteil an Bindegewebe im Kallus nach zwei Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($p > 0,05$).

Nach einer Standzeit von vier Wochen bestand der Kallus in beiden Versuchsgruppen fast vollständig aus Knochen. So ergab sich ein ähnlicher prozentualer Anteil an Knochen-, Knorpel- und Bindegewebe bei den ApoE-defizienten-Mäusen und den entsprechenden Kontrollen (Knochen: 98,75 % bis 100 %, $M = 99,63 \pm 0,19$ % in ApoE-defizienten-Mäusen vs. 94,77 % bis 100 %, $M = 99,24 \pm 0,65$ % in den Kontrollen (Abb. 20); Knorpel: 0,00 % bis 0,91 %, $M = 0,11 \pm 0,11$ % in ApoE-defizienten-Mäusen vs. 0,00 % bis 4,02 %, $M = 0,50 \pm 0,50$ % in den Kontrollen (Abb.21); Bindegewebe: 0,00 % bis 1,13 %, $M = 0,26 \pm 0,15$ % in den ApoE-defizienten-Mäusen vs. 0,00 % bis 1,21 %, $M = 0,26 \pm 0,17$ % in den Kontrollen, $p > 0,05$) (Abb.22).

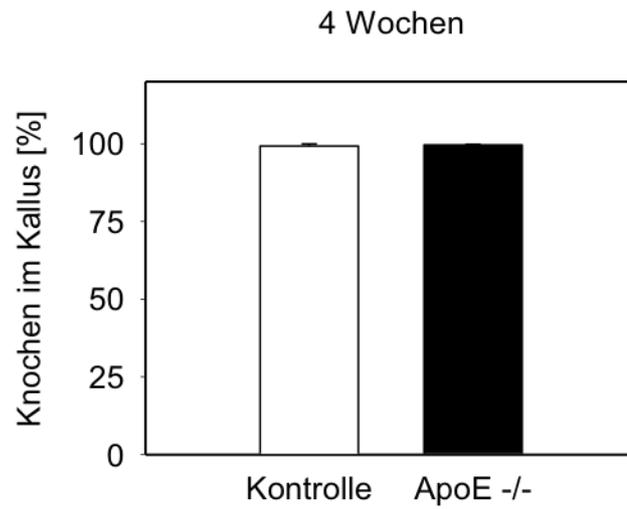


Abb. 20: Prozentualer Anteil an Knochengewebe im Kallus nach vier Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($p > 0,05$).

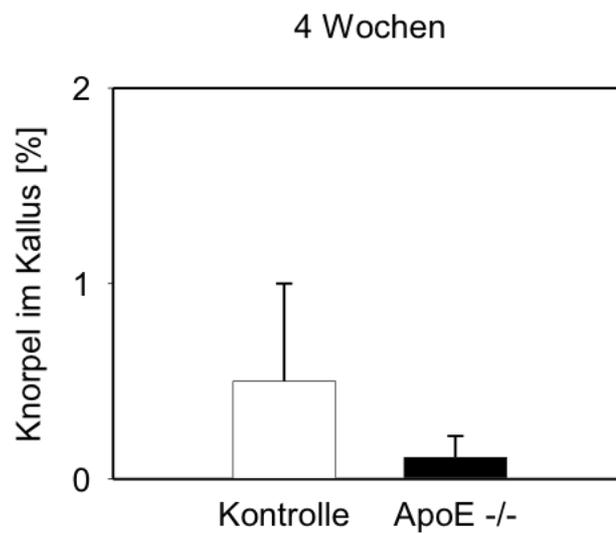


Abb. 21: Prozentualer Anteil an Knorpelgewebe im Kallus nach vier Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($p > 0,05$).

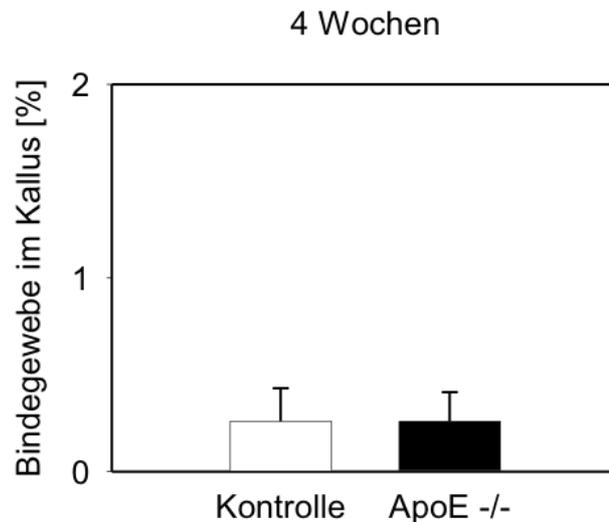


Abb. 22: Prozentualer Anteil an Bindegewebe im Kallus nach vier Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($p > 0,05$).

4.4 Biomechanik

Um die Stabilität der frakturierten Knochen nach zwei bzw. vier Wochen zu quantifizieren, erfolgte die biomechanische Auswertung mithilfe der Rotationstestung. Bei jedem Knochenpräparat wurden das maximale Drehmoment in Nmm und der maximale Torsionswinkel in Winkelgrad bis zum Bruch des Knochens bestimmt. Daraus ließ sich die Torsionssteifigkeit der frakturierten Knochen errechnen (Nmm/°).

Die Bestimmung des maximalen Drehmomentes ergab in der zweiwöchigen Versuchsgruppe bei den ApoE-defizienten-Mäusen vergleichbare Werte von 5,08 Nmm bis 18,02 Nmm ($M = 12,17 \pm 1,52$ Nmm) sowie 5,27 Nmm bis 18,09 Nmm ($M = 10,57 \pm 1,39$ Nmm, $p > 0,05$) in den entsprechenden Kontrollen.

Ebenso wichen die maximalen Drehmomente in der vierwöchigen Versuchsgruppe nicht signifikant auseinander. Während bei der ApoE-defizienten-Gruppe die Werte zwischen 11,50 Nmm und 24,78 Nmm ($M = 19,09 \pm 1,40$ Nmm) lagen, wurden bei der Kontrollgruppe Werte von 13,75 Nmm bis 28,22 Nmm gemessen ($M = 20,75 \pm 1,55$ Nmm, $p > 0,05$).

Des Weiteren ergab die Analyse des maximalen Torsionswinkels nach zwei bzw. vier Wochen keine signifikanten Unterschiede in beiden Versuchsgruppen.

In der zweiwöchigen ApoE-defizienten-Gruppe lagen die Werte zwischen 10,84° und 26,72° ($M = 17,62 \pm 2,41$ °). In den entsprechenden Kontrollen waren maximale Torsionswinkel von 9,72° und 33,77° ($M = 19,72 \pm 2,58$ °, $p > 0,05$) feststellbar.

Nach einer Standzeit von vier Wochen ergaben sich in der ApoE-defizienten-Gruppe ebenso nur gering verminderte maximale Torsionswinkel zwischen $4,11^\circ$ und $20,23^\circ$ ($M = 12,64 \pm 1,78^\circ$, $p > 0,05$) vs. $9,85^\circ$ bis $34,02^\circ$ ($M = 15,40 \pm 2,79^\circ$) in den Kontrollen.

Entsprechend den Ergebnissen vom maximalen Drehmoment und Torsionswinkel, zeigten beide Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der maximalen Torsionssteifigkeit.

In der ApoE-defizienten-Gruppe lag die maximale Torsionssteifigkeit nach zwei Wochen bei $M = 0,77 \pm 0,12 \text{ Nmm/}^\circ$ versus $M = 0,56 \pm 0,07 \text{ Nmm/}^\circ$ ($p > 0,05$) in den entsprechenden Kontrollen (Abb.23).

Nach vier Wochen lag die maximale Torsionssteifigkeit in beiden Versuchsgruppen bei einem höheren Wert, wobei sich die Ergebnisse der ApoE-defizienten-Gruppe und den Kontrollen nicht signifikant unterschieden (ApoE-defiziente-Gruppe: $M = 1,71 \pm 0,22 \text{ Nmm/}^\circ$ vs. Kontrolle: $M = 1,58 \pm 0,21 \text{ Nmm/}^\circ$, $p > 0,05$) (Abb.24).

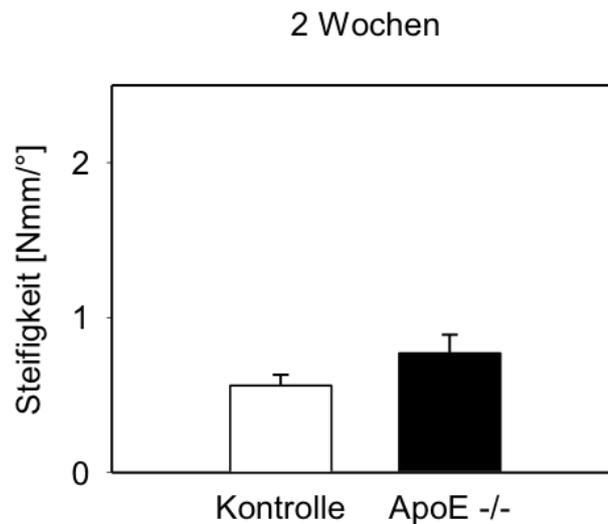


Abb. 23: Torsionssteifigkeit des frakturierten Femurs nach zwei Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($p > 0,05$).

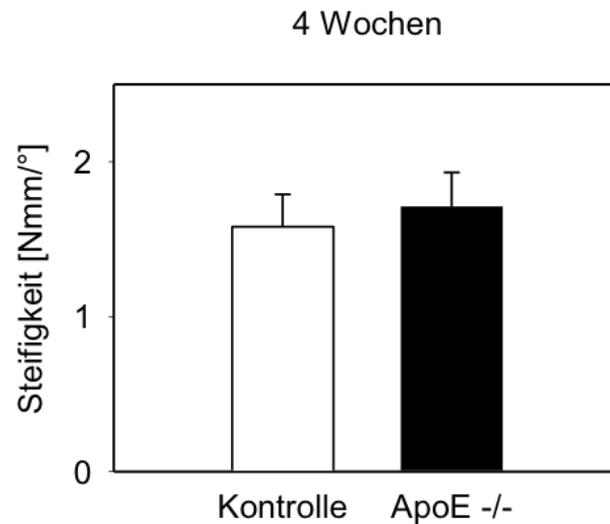


Abb. 24: Torsionssteifigkeit des frakturierten Femurs nach vier Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($p > 0,05$).

4.5 Western Blot

Mittels Western Blot wurde die Expression des Angiogenesemarkers CD31 sowie der Osteo- und Angiogenesemarkers CYR61 und BMP-2 untersucht. Es ließen sich in allen Proben charakteristische Banden entsprechend des Molekulargewichtes der verschiedenen Marker nachweisen.

In der densitometrischen Auswertung von CD31 ergaben sich in der zwei Wochen Versuchsgruppe um mehr als 30 % niedrigere Werte bei den ApoE-defizienten-Mäusen. Der Unterschied erwies sich jedoch statistisch als nicht signifikant (ApoE-defiziente-Gruppe: $M = 11,80 \pm 1,91 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ vs. Kontrolle: $M = 17,88 \pm 2,19 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$, $p > 0,05$) (Abb.25).

Die ApoE-defizienten-Tiere wiesen nach vier Wochen eine signifikant verringerte Expression von CD31 im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe auf:

(ApoE -/- $M = 7,28 \pm 0,62 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ vs. Kontrolle $M = 5,24 \pm 0,47 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$, $p < 0,05$) (Abb.26).

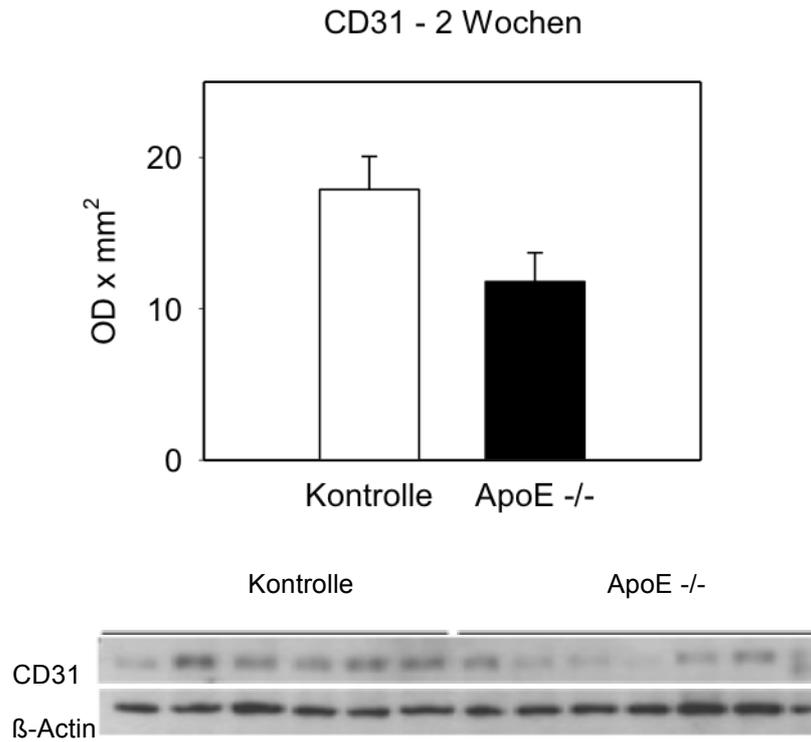


Abb. 25: Western Blot-Analyse der Expression von CD31 nach zwei Wochen. Die densitometrisch bestimmte optische Dichte wurde auf gleiche β-Actin-Konzentration korrigiert. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben ($p > 0,05$).

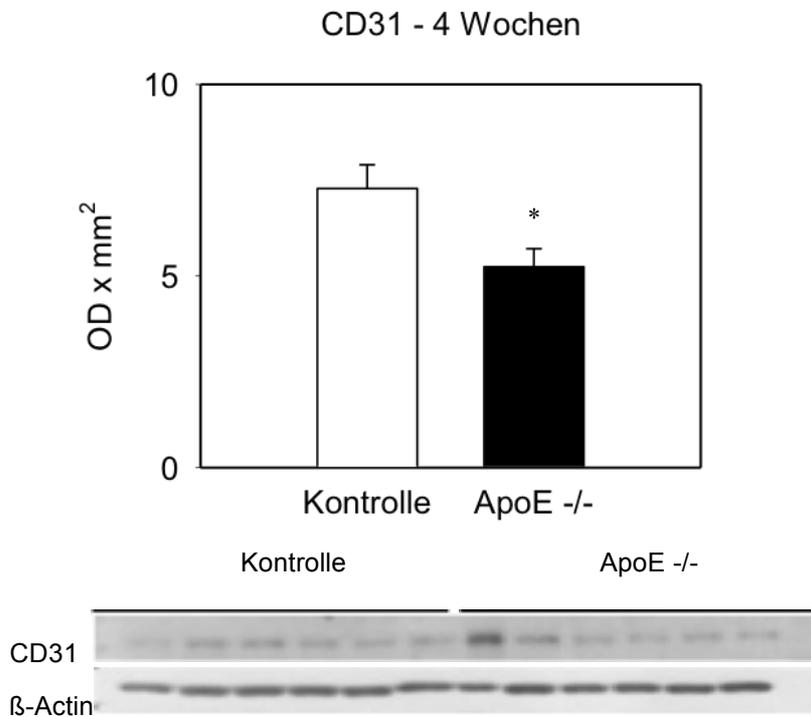


Abb. 26: Western Blot-Analyse der Expression von CD31 nach vier Wochen. Die densitometrisch bestimmte optische Dichte wurde auf gleiche β-Actin-Konzentration korrigiert. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (* $p < 0,05$).

Die Expression von CYR61 zeigte sowohl nach zwei als auch nach vier Wochen signifikante Unterschiede. Nach zwei Wochen wurden bei den ApoE-defizienten-Mäusen Werte von $M = 5,31 \pm 0,65 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ vs. $M = 9,65 \pm 1,24 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ ($p < 0,05$) in den Kontrollen gemessen (Abb.27). Analog dazu war auch nach vier Wochen die Expression von CYR61 signifikant verringert (ApoE-defiziente-Gruppe: $M = 4,00 \pm 0,14 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ vs. Kontrolle: $M = 7,67 \pm 1,48 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$, $p < 0,05$) (Abb.28).

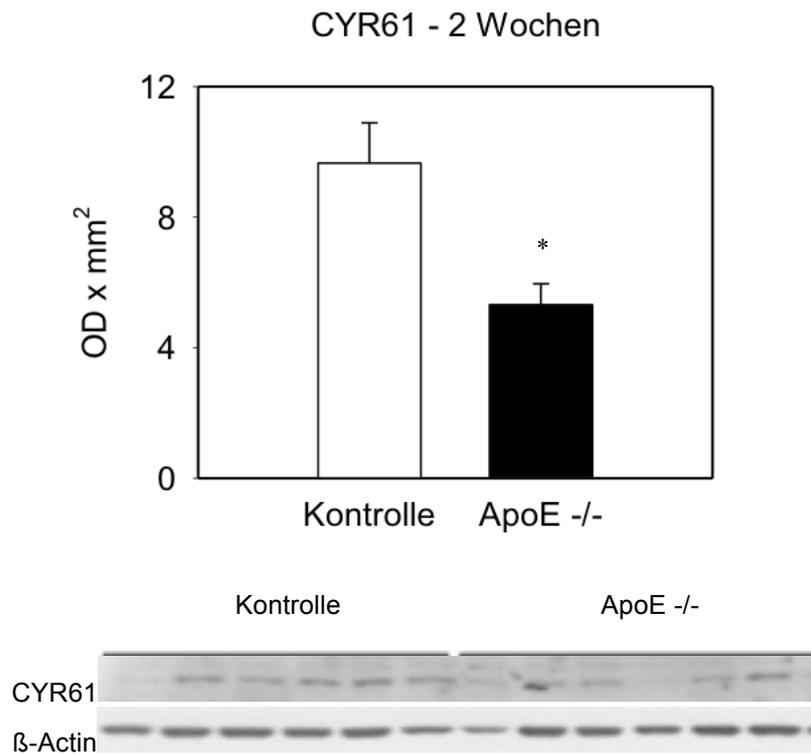


Abb. 27: Western Blot-Analyse der Expression von CYR61 nach zwei Wochen Die densitometrisch bestimmte optische Dichte wurde auf gleiche β -Actin-Konzentration korrigiert. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (* $p < 0,05$).

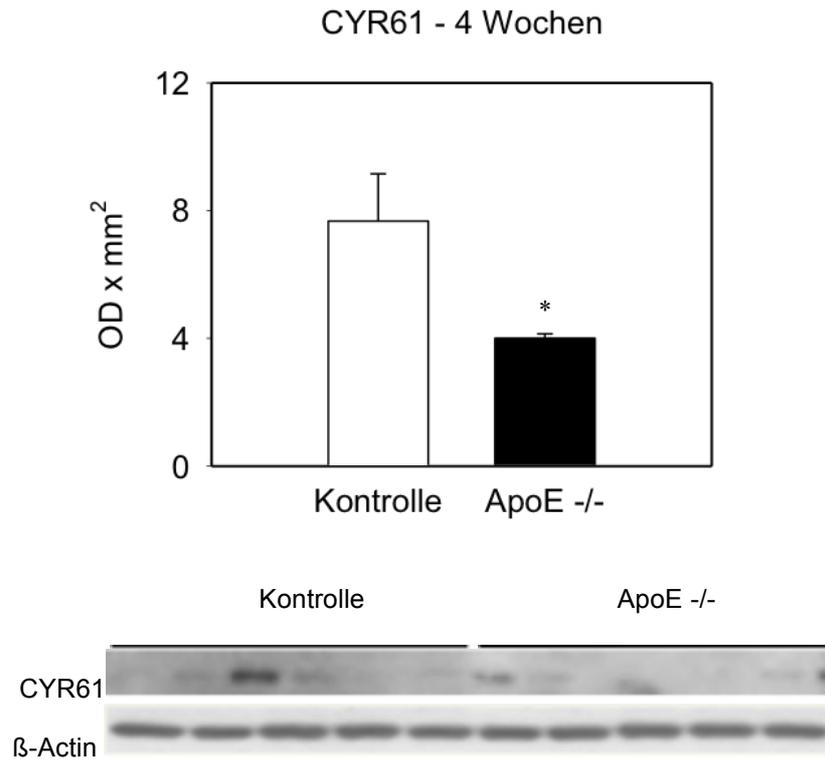


Abb. 28: Western Blot - Analyse der Expression von CYR61 nach vier Wochen. Die densitometrisch bestimmte optische Dichte wurde auf gleiche β -Actin-Konzentration korrigiert. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (* $p < 0,05$).

Signifikante Unterschiede fanden sich auch hinsichtlich der Expression von BMP-2. Nach einer Standzeit von zwei Wochen ergaben sich in der ApoE-defizienten-Gruppe Werte von $M = 4,98 \pm 0,83 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ vs. $M = 8,91 \pm 1,38 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ ($p < 0,05$) in den Kontrollen (Abb.29). Analog dazu wurde BMP-2 auch nach vier Wochen bei den ApoE-defizienten-Mäusen signifikant verringert exprimiert (ApoE-defiziente-Gruppe: $M = 7,78 \pm 1,83 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ vs. Kontrolle: $M = 16,33 \pm 2,12 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$, $p < 0,05$) (Abb.30).

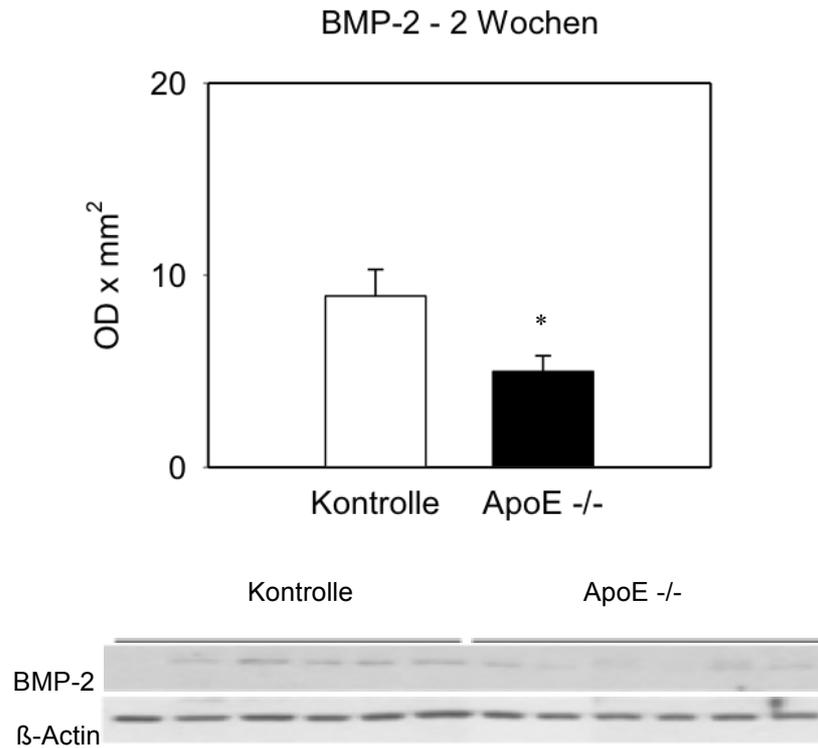


Abb. 29: Western Blot-Analyse der Expression von BMP-2 nach zwei Wochen. Die densitometrisch bestimmte optische Dichte wurde auf gleiche β -Actin-Konzentration korrigiert. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (* $p < 0,05$).

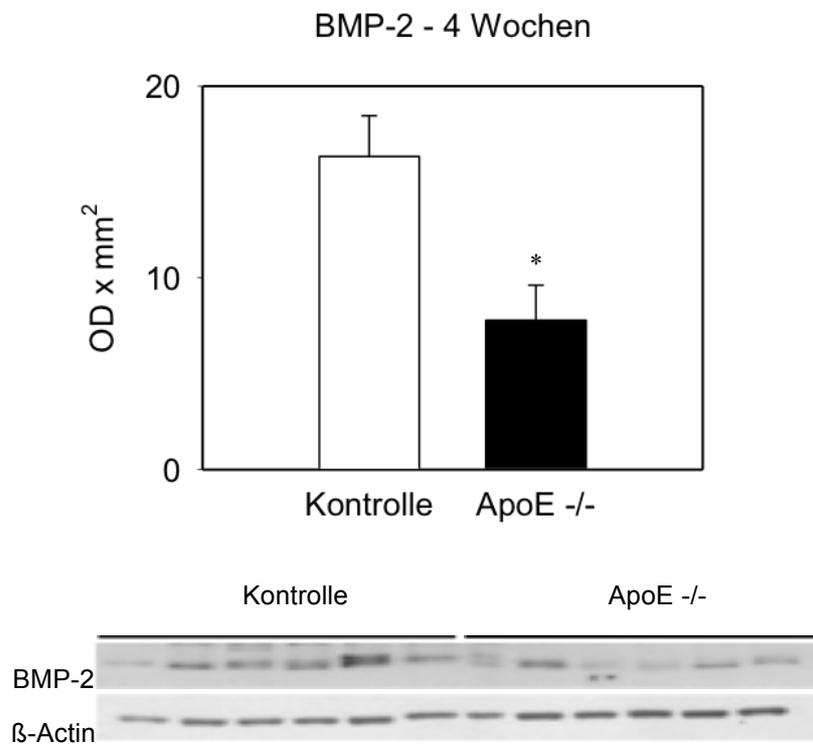


Abb. 30: Western Blot-Analyse der Expression von BMP-2 nach vier Wochen. Die densitometrisch bestimmte optische Dichte wurde auf gleiche β -Actin-Konzentration korrigiert. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (* $p < 0,05$).

4.6 Serologische Untersuchung

Die Untersuchung der Serumlipide ergab erwartungsgemäß deutliche Unterschiede in beiden Versuchsgruppen.

In der zweiwöchigen Versuchsgruppe lagen die Serumtriglyzeride bei $M = 137,5 \pm 39,18$ mg/dl in der ApoE-defizienten-Gruppe vs. $M = 49,25 \pm 8,74$ mg/dl ($p < 0,05$) in den Kontrollen. Nach einer Standzeit von vier Wochen ergaben sich in der ApoE-defizienten-Gruppe Werte von $M = 90 \pm 14,29$ mg/dl vs. $M = 65 \pm 15,65$ mg/dl ($p > 0,05$) in der Kontrollgruppe.

Als zweiter serologischer Vergleichsparameter wurde das Serum-Cholesterin gewählt. Hierbei wiesen sowohl die zwei-Wochen-, als auch die vier-Wochen-Versuchsgruppe signifikante Unterschiede auf. Nach einer Standzeit von zwei Wochen lag das Gesamtcholesterin bei den ApoE-defizienten-Mäusen bei $M = 1482,5 \pm 204,37$ mg/dl vs. $M = 56,75 \pm 2,78$ mg/dl ($p < 0,05$) bei den Kontrollen (Abb.31). In Übereinstimmung dazu ergaben sich nach vier Wochen in der ApoE-defizienten-Gruppe Serumcholesterinwerte von $M = 1520 \pm 27,46$ mg/dl vs. $M = 67,25 \pm 7,5$ mg/dl ($p < 0,05$) in der entsprechenden Kontrollgruppe (Abb.32).

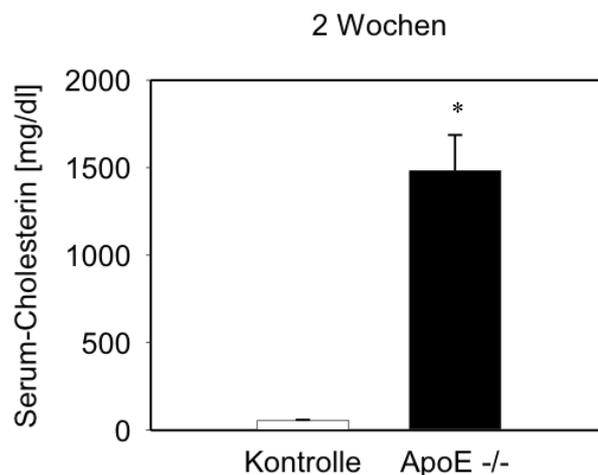


Abb. 31: Quantitative Analyse des Serumcholesterins nach zwei Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (* $p < 0,05$).

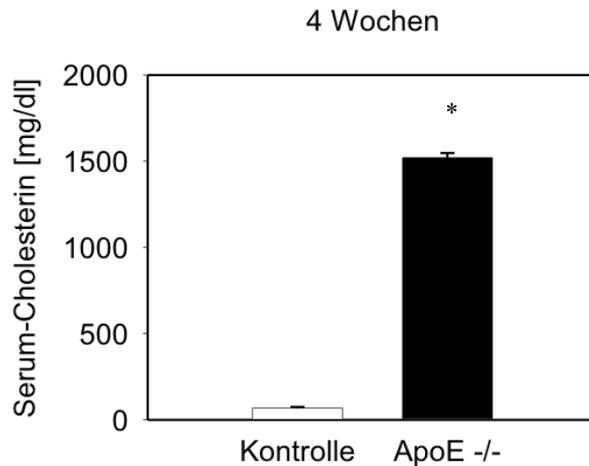


Abb. 32: Quantitative Analyse des Serumcholesterins nach vier Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (* $p < 0,05$).

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methodiken

Die Frakturheilung stellt einen komplexen, fein abgestimmten biologischen Prozess dar. Auch wenn in-vitro-Studien wertvolle Informationen über die Knochenheilung liefern, sind Tierstudien essentiell, um die spezifischen molekularen und zellulären Abläufe während der Frakturheilung zu verstehen (Garcia et al., 2011).

Ursprünglich wurden hauptsächlich Großtiermodelle für die in-vivo-Untersuchung der Knochenheilung eingesetzt. In den letzten Jahren wurden jedoch zunehmend Nagetiere, v.a. Mäuse, für die Forschung herangezogen. Anatomisch gesehen sind Mäuse für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen nachteilig, da sie im Gegensatz zum Menschen eine einfachere Knochenstruktur ohne Havers-System aufweisen. Die Maus bildet jedoch im Rahmen der Frakturheilung sogenannte Resorptionshöhlen aus, die Ähnlichkeiten mit dem *Remodelling* über das Havers-System aufweisen (Nunamaker, 1998). Aufgrund der geringen Kosten hinsichtlich der Vermehrung und Haltung der Mäuse sind anders als bei Großtiermodellen größere Versuchsgruppen realisierbar. Des Weiteren ist der Zeitpunkt bis zur vollständigen Knochenregenerierung im Vergleich zu Großtiermodellen deutlich verkürzt. Von besonderer Bedeutung ist allerdings, dass für die Maus eine Vielzahl an spezifischen Antikörpern sowie gentechnisch veränderte bzw. Knock-out-Stämme verfügbar sind (Garcia et al., 2011; Holstein et al., 2009a). Aufgrund der genannten Vorteile wurde für die vorliegende Studie die Maus als Frakturmodell gewählt.

Das verwendete Tiermodell wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits mehrfach erfolgreich angewandt (Holstein et al., 2007b, 2008). Es geht auf das von Bonnarens & Einhorn, 1984 entwickelte geschlossene Frakturmodell an der Ratte zurück, bei dem mithilfe einer 3-Punkt-Biegungsmaschine eine geschlossene Querfraktur am Femur erzeugt wurde. Dieses Modell wurde in modifizierter Form bereits in zahlreichen Studien angewandt (Hiltunen et al., 1993; Manigrasso & O'Connor, 2004). In den vergangenen Jahren wurden vor allem intramedulläre Pins als Osteosynthese im geschlossenen Frakturmodell verwendet. Sie gewährleisteten jedoch keine ausreichende Rotationsstabilität und führen daher zu einer relativ instabilen Osteosynthese. Ausreichende Stabilität ist jedoch für eine erfolgreiche Knochenheilung unabdingbar (Augat et al., 2005).

Deshalb entwickelte unsere Arbeitsgruppe einen vereinfachten Verriegelungsmarknagel, der erstmals Rotationsstabilität des geschlossen frakturierten Knochens gewährleistete (Holstein et al., 2007a). Dennoch wurde auch mit diesem Modell keine ausreichende axiale Stabilität erreicht, so dass unsere Arbeitsgruppe (Holstein et al., 2009b) eine intramedulläre Zugschraube entwickelte, die neben der Rotationsstabilität auch die notwendige axiale Stabilität garantiert.

In ex-vivo-Analysen von Holstein et al. wurden mit der intramedullären Zugschraube eine signifikant höhere Rotationsstabilität sowie axiale Stabilität des frakturierten Knochens erzielt als mit einem herkömmlichen Pin bzw. Verriegelungsmarknagel. Des Weiteren zeigte die histomorphometrische Auswertung des frakturierten Knochens nach zweiwöchiger Stabilisierung mit der Zugschraube einen signifikant reduzierten Anteil an Bindegewebe sowie einen signifikant höheren Anteil an Knorpelgewebe als nach Stabilisierung mit dem vereinfachten Verriegelungsmarknagel. Nach fünf Wochen glich sich die Gewebezusammensetzung bei der Zugschraube und dem Verriegelungsmarknagel an. Da der höhere Anteil an Bindegewebe nach zweiwöchiger Stabilisierung bei der Verwendung des Verriegelungsmarknagels für eine verzögerte Frakturheilung spricht, kann geschlussfolgert werden, dass die Verwendung der Zugschraube die initiale Frakturheilung beschleunigt (Holstein et al., 2009b).

Wie Histing et al., 2009 in einer Vergleichsstudie zu den bisher angewandten Osteosynthesetechniken an der Maus feststellten, wird jedoch auch mit der Zugschraube eine signifikant niedrigere Rotationsstabilität erreicht als etwa mit dem Fixateur externe in offenen Frakturmodellen.

Offene Frakturmodelle führen jedoch zu einem deutlich größeren Weichteilschaden als geschlossene Modelle. Wie Cheung et al., 2003 in ihrem Frakturmodell beschrieben haben, müssen für die Anbringung des Fixateur externe am Femur große Teile des umgebenden Weichteilgewebes durchtrennt werden. Zwar bleiben durch die extramedulläre Lage des Implantats das Endost und das Knochenmark weitestgehend unbeschadet, der entstandene Weichteilschaden hat jedoch einen relevanten Einfluss auf die Knochenheilung. Des Weiteren behindert das relativ hohe Implantatgewicht die Maus in ihren physiologischen Bewegungsabläufen (Histing et al., 2009; Holstein et al., 2009a).

In unserer Studie entschieden wir uns deshalb für das weichteilschonende geschlossene Frakturmodell mit anschließender Stabilisierung durch eine intramedulläre Zugschraube. Eine Beeinflussung der physiologischen Frakturheilung durch die genannten Faktoren bei anderen Osteosynthesetechniken sollte hierdurch vermieden werden. Die verwendete intramedulläre Zugschraube ist bis dato die einzige rotations- und achsstabile Osteosynthesetechnik im geschlossenen Frakturmodell am Mäusefemur.

Obwohl sich die Tibia im geschlossenen Frakturmodell in verschiedenen Studien bewährt hat (Hiltunen et al., 1993), wurde in der vorliegenden Arbeit das Femur zur Frakturierung verwendet. An der Tibia ist es aufgrund ihres dreieckigen, nach distalen abnehmenden Knochenquerschnittes sowie ihrer gebogenen Longitudinalachse schwieriger standardisierte Frakturen zu erzeugen. Dagegen ist die Röhrenform des Femurs für reproduzierbare Querfrakturen des Schaftes ideal geeignet. Auch die Implantateinbringung wird durch die gleichmäßige Struktur erleichtert. Aufgrund des dünnen Weichteilmantels ist die Tibia im geschlossenen Modell zwar leichter zu frakturieren, der Einfluss des umgebenden Weichteilgewebes bleibt im Gegensatz zum Femur allerdings unberücksichtigt (Cheung et al., 2003; Holstein et al., 2007a, 2009a).

In unserer Studie wurden die frakturierten Femora nach einer Standzeit von zwei und vier Wochen untersucht. Wir wählten diesen Zeitraum aufgrund der Ergebnisse von Manigrasso & O'Connor, 2004, die in einem Frakturmodell an der Maus die zeitliche Abfolge der Frakturheilung darstellten. In ihrer Studie zeigte sich nach ca. zehn bis 14 Tagen eine maximale Kallusausbildung, während nach etwa vier Wochen die Frakturzone komplett mit neuem Knochen überbrückt war. Daher erschien uns der Zeitpunkt von zwei bzw. vier Wochen nach Frakturierung sinnvoll, um die frühe bzw. späte Phase der Frakturheilung bei den ApoE-defizienten-Mäusen im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe zu untersuchen.

Die Untersuchung der explantierten Knochen erfolgte in der vorliegenden Studie nach histomorphometrischen, biochemischen sowie proteinbiochemischen Kriterien. Dies geschah in Anlehnung an bereits erfolgreich durchgeführte Studien aus unserer Arbeitsgruppe (Holstein et al., 2007b, 2008, 2013).

Die histomorphometrische Analyse gehört zu den Standardmethoden in den Studien zur Knochenheilung (Gerstenfeld et al., 2005). Die heterogene dreidimensionale Struktur des Frakturkallus macht es schwierig, die unterschiedlichen Gewebstypen in einem zweidimensionalen histologischen Schnitt darzustellen. Wie Gerstenfeld et al., 2005 beschrieben haben, ist es jedoch möglich, an einem longitudinalen Schnitt die Kallusfläche sowie die Gewebezusammensetzung zu analysieren. Wir entschieden uns deshalb für eine longitudinale middiaphysäre Schnittführung, die sich bereits in zahlreichen vorausgegangen Studien zur histomorphometrischen Analyse etabliert hatte (Holstein et al., 2007b, 2008, 2013).

Generell kann Knochen kalzifiziert oder dekalzifiziert histologisch aufgearbeitet werden (Gerstenfeld et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde der Knochen dekalzifiziert, da die Möglichkeit einer immunhistochemischen Färbung der Schnittpräparate erhalten bleiben sollte. Es muss jedoch angemerkt werden, dass durch die Dekalzifizierung Informationen über den Kalksalzgehalt des Knochens verloren gehen.

Die histomorphometrische Auswertung wurde in der vorliegenden Arbeit gemäß den Ausführungen von Gerstenfeld et al. 2005 durchgeführt.

Für die biomechanische Testung der frakturierten Knochen stehen prinzipiell drei verschiedene Verfahren zur Verfügung: die Biegetestung in 3-Punkt- und 4-Punkt-Technik sowie die Rotationstestung. Wie Burstein und Frankel in einer Vergleichsstudie beschrieben, ist die Rotationstestung das zuverlässigste Verfahren. Während in der 3-Punkt-Biegung nur maximal ein Punkt des Knochens belastet werden kann, wird bei der Biegung mit vier Auflagepunkten die Kraft über eine größere Knochenfläche verteilt. Die Testung mit zwei Belastungspunkten in der 4-Punkt-Testung ist allerdings aufgrund der geringen Knochenlänge des Femurs nur schwer umsetzbar (Burstein & Frankel, 1971).

Gegenüber der 3-Punkt- und 4-Punkt-Biegung bietet die Rotationstestung einige Vorteile. Während der Rotationstestung ist die Verteilung des Drehmomentes über das Femur gleichmäßig. Deshalb haben kleinste Veränderungen in der Knochengeometrie nur einen geringen Einfluss auf die Messung der Rotationssteifigkeit. Im Gegensatz dazu hat eine nur minimale Verdrehung des Knochens in der 3- bzw. 4-Punkt-Biegung große Auswirkungen

auf die Präzision und das Ergebnis der Testung (Lind et al., 2001). Für die vorliegende Studie erschien uns deshalb die Rotationstestung als geeignetste Methode.

In der Western Blot-Analyse untersuchten wir die Expression der proteinbiochemischen Marker CD31, CYR61 sowie BMP-2.

CD31 gehört zur Superfamilie der Immunglobuline. Es ist vor allem an den Verbindungsstellen zwischen den Endothelzellen in den Gefäßen zu finden. Neben der Zelladhäsion ist das Molekül für die Rekrutierung von Leukozyten in entzündetes Gewebe, die Angiogenese sowie Regulierung von Monozyten, neutrophilen Granulozyten und der T-Zell-Aktivierung zuständig (Lutzky et al., 2006; Newman, 1997). Um Erkenntnisse zur Blutversorgung am Kallusgewebe im Rahmen der Frakturheilung bei vorbestehender Atherosklerose zu gewinnen, wählten wir diesen Angiogenesemarker als Parameter.

CYR61 ist ein Molekül, das während der Frakturheilung von verschiedenen Zellen sezerniert wird und angio- und osteogene Eigenschaften aufweist. Es führt u.a. zur Migration von Endothelzellen sowie zur Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten (Histing et al., 2011b).

Mithilfe von CYR61 war es uns somit möglich Unterschiede in der Angio- und Osteogenese während der Frakturheilung zwischen ApoE-defizienten-Mäusen und den Kontrolltieren aufzudecken.

Als dritter Parameter wurde BMP-2 bestimmt. Wie bereits oben erwähnt, spielen die verschiedenen *bone morphogenetic proteins* im Rahmen der Frakturheilung eine wichtige Rolle. Sie werden von Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten sowie extrazellulärer Knochenmatrix freigesetzt und fördern während der Frakturheilung die Proliferation und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen und Osteoprogenitorzellen während der Frakturheilung (Saran et al., 2014).

Ähnlich wie bei CYR61 kann also mit diesem Wachstumsfaktor die Osteo- und Angiogenese im Rahmen der Frakturheilung auf molekularer Ebene untersucht werden.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden tierexperimentellen Studie sollte untersucht werden, ob bei Mäusen mit atherosklerotischen Gefäßveränderungen gegenüber gesunden Mäusen hinsichtlich der Knochenheilung Unterschiede festzustellen sind bzw. der negative Einfluss der Osteoblastenhemmung durch oxidierte Lipide oder der positive Effekt der gesteigerten

Angiogenese im atherosklerotisch veränderten Organismus überwiegt. Mit den Ergebnissen der Studie kann die Hypothese aufgestellt werden, dass eine Apolipoprotein-E-Defizienz zu Störungen des Kallus-*Remodellings* während der Frakturheilung in der Maus führt.

Wie in der Einleitung erwähnt, stellt die ApoE-defiziente-Maus ein bewährtes Tiermodell für die Erforschung der Atherosklerose dar (Wouters et al., 2005). Es wurde in zahlreichen Studien belegt, dass eine ApoE-Defizienz über eine Hypercholesterinämie zur atherosklerotischen Plaquebildung im arteriellen Gefäßsystem der Maus führt (Nakashima et al., 1994; Plump et al., 1992; Zhang et al., 1992).

In neueren Studien gibt es Hinweise darauf, dass den beiden Volkskrankheiten Osteoporose und Atherosklerose eine gemeinsame Pathophysiologie zugrunde liegt (Banks et al., 1994; Barengolts et al., 2014; Hak et al., 2000; McFarlane et al., 2004; Sprini et al., 2014). Oxidierte Lipide scheinen demnach an beiden Krankheitsbildern ursächlich beteiligt zu sein (Brodeur et al., 2008a; McFarlane et al., 2004; Witztum & Steinberg, 1991).

Bekannterweise ist die Atherosklerose multifaktoriell bedingt. Vereinfacht erklärt führt eine Schädigung des Gefäßendothels zur Anhäufung von Lipiden, Makrophagen sowie von glatten Muskelzellen in der subendothelialen Gefäßschicht, was letztendlich zu einer Gefäßstenosierung führt (Lüllmann-Rauch, 2006).

Durch eine lokale Entzündungsreaktion am Gefäßendothel kommt es zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und Expression von Adhäsionsmolekülen. Dies führt zur gesteigerten Anlagerung von Leukozyten, die in die subendotheliale Schicht wandern und sich schließlich zu Makrophagen umwandeln (Salvayre et al., 2016).

Durch die gesteigerte Gefäßpermeabilität gelangen auch vermehrt Lipoproteine in die Intima. Durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) von inflammatorischen Zellen kommt es zur vermehrten Bildung von oxidiertem LDL. Oxidiertes LDL führt letztendlich über seine proinflammatorischen und toxischen Eigenschaften zur weiteren Akkumulierung von Cholesterin in Makrophagen. Dies führt im Weiteren zur sog. Schaumzellbildung und Ausbildung von *fatty streaks*, den ersten atherosklerotischen Gefäßläsionen (Salvayre et al., 2016).

Da Makrophagen eine bedeutende Rolle in der Entstehung und dem Fortschreiten atherosklerotischer Gefäßveränderungen einnehmen, gibt es bereits einige wissenschaftliche Untersuchungen über die Immunzellen während den verschiedenen

Phasen der Atherosklerose. Die Blockierung proinflammatorischer Zytokine, die nach Umwandlung der Makrophagen in Schaumzellen u.a. zum weiteren Einstrom von Lipoproteinen in den subendothelialen Raum führen oder die Aktivierung sog. antiinflammatorischer Makrophagen wären interessante Behandlungsansätze der Atherosklerose (Xu et al., 2019).

Im Rahmen der Osteoporose führen oxidierte Lipide zur Hemmung der Osteoblastendifferenzierung und verschieben somit das physiologische Gleichgewicht aus Knochenab- und -aufbau zugunsten des Knochenabbaus (Liu et al., 2005; Parhami et al., 1997).

Da jedoch die Osteoblastendifferenzierung auch ein Schlüsselmechanismus der Frakturheilung ist (Ferguson et al., 1999; Knight & Hankenson, 2013), wäre es denkbar, dass die bei der Atherosklerose auftretenden oxidierten Lipide zu Heilungsstörungen des Knochens führen. Andererseits wurden in atherosklerotischen Plaques Wachstumsfaktoren nachgewiesen, die auch die Knochenmineralisierung im Rahmen der Frakturheilung initiieren (Dhore et al., 2001; McFarlane et al., 2004). Des Weiteren kommt es im Zuge der atherosklerotischen Gefäßveränderungen zu Gewebeischämien, die zur Ausbildung von Umgehungskreisläufen bzw. zur Angiogenese innerhalb der atherosklerotischen Plaques führen (Khurana et al., 2005; Pugh & Ratcliffe, 2003; Simons & Ware, 2003). Dabei wurden in atherosklerotischen Plaques proangiogene Wachstumsfaktoren identifiziert, die auch für die Angiogenese im Rahmen der Frakturheilung eine wichtige Rolle spielen (Holm et al., 2009; Ribatti et al., 2008).

Aufgrund dieser Überlegungen wären sowohl eine Inhibierung der Frakturheilung durch eine Lipid-vermittelte Hemmung der Osteoblastendifferenzierung, als auch eine positive Beeinflussung der Knochenheilung durch die gesteigerte Expression von angiogenen Wachstumsfaktoren in ApoE-defizienten-Mäusen denkbar.

In den histomorphometrischen Untersuchungen unserer Studie zeigte sich sowohl zwei als auch vier Wochen nach Frakturierung eine signifikant größere Kallusfläche bei ApoE-defizienten-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen. Interessanterweise führte jedoch der größere Fakturkallus nicht zu einer höheren biomechanischen Stabilität.

Die Auswertung der prozentualen Gewebezusammensetzung des Kallusgewebes zwei Wochen nach Frakturierung zeigte in der vorliegenden Arbeit bei den ApoE-defizienten-Mäusen einen tendenziell geringeren Knochenanteil sowie einen höheren Knorpel- und

Bindegewebsanteil. Der Kallus war in seiner Zusammensetzung also noch weicher als in der entsprechenden Kontrollgruppe.

Nach vier Wochen zeigte sich in den histomorphometrischen Ergebnissen in beiden Versuchsgruppen ein deutlicher Rückgang der periostalen Kallusfläche. Die prozentuale Gewebezusammensetzung bestand in beiden Versuchsgruppen nach 28 Tagen fast ausschließlich aus Knochengewebe. Dies deutet darauf hin, dass in dem Zeitraum von Tag 14 bis 28 sowohl bei den ApoE-defizienten-Mäusen als auch bei den Kontrolltieren Umbauvorgänge des weichen Kallusgewebes mit Chondrozytenresorption und Bildung des knöchernen Kallus stattgefunden haben müssen. Da jedoch die periostale Kallusfläche in der histomorphometrischen Auswertung bei den ApoE-defizienten-Mäusen nach vier Wochen signifikant größer als bei den entsprechenden Kontrollen war, die biomechanische Steifigkeit jedoch in beiden Gruppen nahezu identisch ist, kann man schlussfolgern, dass die ApoE-Defizienz das Kallus-*Remodelling* verzögert. Der größere, aber nicht biomechanisch stabilere Kallus der ApoE-defizienten-Tiere muss also im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe von minderer Qualität sein. Eine mögliche Erklärung für die mindere Qualität ist, dass im Kallus der ApoE-defizienten-Tiere zu diesem Zeitpunkt noch weniger weicher Geflechtknochen in harten Lamellenknochen umgewandelt worden ist.

Diese Überlegungen werden von den Ergebnissen der Western Blot-Analyse zu den angio- und osteogenetischen Wachstumsfaktoren gestützt:

Hier waren alle untersuchten Marker (CD31, CYR61, BMP-2) sowohl zwei als auch vier Wochen nach Frakturierung bei den ApoE-defizienten-Mäusen vermindert exprimiert. Dies spricht für eine gestörte Angio- und Osteogenese bei den ApoE-defizienten-Mäusen, die sich in einem verzögertem *Remodelling* des Kallus äußert.

Wie in vorausgegangenen Studien gezeigt werden konnte, spielt CYR61 mit seinen osteo- und angiogenen Eigenschaften eine entscheidende Rolle bei der Frakturheilung (Babic et al., 1998; Si et al., 2006).

Hadjjargyrou et al. stellten in einer Studie am Rattenmodell fest, dass während der Frakturheilung die CYR61 Expression temporär gesteigert wird, wobei nach etwa sieben bis zehn Tagen nach Fraktur der Maximalwert erreicht wird, welcher mit der Chondrogenese im Rahmen der enchondralen Ossifikation korreliert. Im Vergleich zu unverletztem Knochen zeigt sich im frakturierten Knochen nach etwa zehn Tagen eine zehnmal höhere mRNA-Expression von CYR61. Weiterhin wurden während der Frakturheilungsphase auch erhöhte Spiegel von CYR61 im Bindegewebe und Periost sowie in proliferierenden Chondrozyten, Osteoblasten und unreifen Osteozyten detektiert. Diese Erkenntnisse führten zu der

Schlussfolgerung, dass CYR61 eine wichtige Rolle in der Knorpel- und Knochenneubildung spielt und ein wichtiger Regulator der Frakturheilung ist (Hadjjargyrou et al., 2000).

Des Weiteren stellten Lienau et al. in einer Vergleichsstudie zwischen stabiler und semi-stabiler Osteosynthese am Frakturmodell im Schaf fest, dass das längere Vorhandensein von Knorpelzellen im Frakturkallus bei instabiler Osteosynthese mit einer verminderten CYR61-Expression einhergeht. Sie schlussfolgerten, dass die verminderte Expression von CYR61 zu einer Störung der Chondrozytendifferenzierung führt, was die längere Persistenz der Knorpelzellen und Heilungsverzögerung bei instabiler Osteosynthese erklären könnte (Histing et al., 2011b; Lienau et al., 2006).

Interessanterweise scheint CYR61 auch eine Rolle im Rahmen der Atherosklerose zu spielen. So konnte nachgewiesen werden, dass CYR61 in atherosklerotischen Gefäßläsionen von ApoE-defizienten-Mäusen exprimiert wird (Schober et al., 2002).

In unserer Studie war CYR61 sowohl nach zwei als auch nach vier Wochen im Kallusgewebe der ApoE-defizienten-Mäuse signifikant vermindert nachweisbar. Eine vermehrte Expression, wie sie in atherosklerotischen Plaques zu erwarten ist, ließ sich bei ApoE-defizienten-Tieren am heilenden Knochen also nicht feststellen. Histologisch zeigte sich hier zwei Wochen nach Frakturierung ein tendenziell höherer Anteil an Knorpelgewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es kann daraus geschlossen werden, dass die verminderte Expression im frakturierten Knochengewebe zu Verzögerungen im Kallus-Remodelling bei ApoE-defizienten-Mäusen führt.

BMP-2 spielt vor allem in der frühen Frakturheilungsphase eine entscheidende Rolle. Tsuji et al. konnten zeigen, dass BMP-2 die Frakturheilungskaskade auf molekularer Ebene initiiert. Ihre Untersuchungen deuten darauf hin, dass bei BMP-2-defizienten-Mäusen die ersten Schritte der Frakturheilungskaskade wie etwa die Chondrogenese blockiert sind. Die mesenchymalen Vorläuferzellen zeigten in Abwesenheit von BMP-2 keine Ausdifferenzierung. Dies führte folglich zu Heilungsstörungen des frakturierten Knochens (Tsuji et al., 2006).

Der spezifische *knock-down* von BMP-2, d.h. die verminderte Expression in Chondrozyten, führte hingegen in einer weiteren Studie zu einer verlängerten Phase der Chondrogenese und verzögerten Ossifikation (Mi et al., 2013).

Die in unserer Studie festgestellte signifikant verminderte Expression von BMP-2 bei den ApoE-defizienten-Mäusen kann somit den nach zwei Wochen höheren Anteil an Knorpelgewebe und geringeren Anteil an Knochengewebe im Kallus bewirken.

In Studien wurde belegt, dass oxidierte Lipide neben der Atherosklerose auch entscheidend an der Ausbildung der Osteoporose beteiligt sind (Brodeur et al., 2008a; McFarlane et al., 2004). In zahlreichen epidemiologischen Studien wurde gezeigt, dass die beiden Krankheitsbilder Atherosklerose und Osteoporose häufig nebeneinander existieren (Barengolts et al., 2014; Uyama et al., 1997). Daraus schloss man, dass ihnen eine gemeinsame Pathophysiologie zugrunde liegen könnte. Erhöhte Plasmaspiegel von LDL gelten schon lange als Risikofaktor für die kardiovaskuläre Erkrankung. Interessanterweise scheint auch der Knochenstoffwechsel von der Höhe des Serumcholesterins abhängig zu sein. Bei Patienten mit einer reduzierten Knochendichte bzw. Osteoporose lagen regelhaft ebenfalls erhöhte Serumlipide vor und es konnte nachgewiesen werden, dass oxidierte Lipide eine Rolle bei der Entstehung von Osteoporose spielen (Brodeur et al., 2008a).

Parhami et al. zeigten in einer in-vitro-Studie, dass oxidierte Lipide sich unterschiedlich - ja sogar gegensätzlich - auf die Atherosklerose bzw. Osteoporose auswirken.

Sie inhibieren einerseits die Differenzierung und Mineralisierung von Osteoblastenvorläuferzellen und führen damit zu Störungen der Knochenneubildung, während sie andererseits in atherosklerotischen Plaques deren Kalzifizierung fördern (Parhami et al., 1997).

In einer weiteren Studie untersuchten Parhami et al., wie sich oxidierte Lipide auf die Differenzierung der Osteoblasten und Adipozyten aus Knochenmarkszellen auswirken. Es konnte gezeigt werden, dass die Osteoblastendifferenzierung durch oxidiertes LDL inhibiert wird und folglich vermehrt Adipozyten aus der gemeinsamen Vorläuferzelle gebildet werden (Parhami et al., 1999).

Brodeur et al. untersuchten in einer Zellkulturstudie, wie sich oxidiertes LDL auf den Stoffwechsel der Osteoblasten auswirkt. In einer vorausgegangen Studie wiesen sie bereits nach, dass Osteoblasten Rezeptoren für die Aufnahme von oxidiertem LDL exprimieren. Anhand der Ergebnisse zeigte sich, dass sich oxidiertes LDL je nach Konzentration unterschiedlich auf die Osteoblasten auswirkt. So führten niedrige Konzentrationen von oxidiertem LDL zur Proliferierung der Osteoblasten, während hohe Konzentrationen ihre Apoptose induzierten. Weiterhin wiesen sie nach, dass Osteoblasten nach Aufnahme der oxidierten LDL-Partikel nicht in der Lage sind, diese abzubauen. Vermutlich akkumulieren

sie in Lysosomen und zerstören deren Membran, was letztlich zur Apoptose der Osteoblasten führt (Brodeur et al., 2008a, 2008b).

Aufgrund dieser Ergebnisse können wir schlussfolgern, dass eine Apolipoprotein-E-Defizienz vermutlich über oxidierte Lipide negative Auswirkungen auf die Osteoblastendifferenzierung hat, die vor allem durch BMP-2 reguliert wird. Dies korreliert mit dem tendenziell geringeren Knochenanteil im Frakturkallus der ApoE-defizienten-Mäuse.

Des Weiteren untersuchten wir die Expression des Angiogenese-Markers CD31 im Frakturkallus. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, spielt die Angiogenese eine zentrale Rolle während der Frakturheilung (Augat, et al., 2005; Saran et al., 2014). Es konnte in einer vorausgegangenen Studie gezeigt werden, dass die Frakturheilung durch eine beeinträchtigte Blutversorgung negativ beeinflusst wird (Hausman et al., 2001).

Atherosklerotische Veränderungen des Gefäßsystems führen bekanntlich zu Durchblutungsstörungen (Simons & Ware, 2003). Obwohl Gewebeischämien physiologisch mit dem Wachstum neuer Gefäße beantwortet werden (Simons & Ware, 2003), schien die Vaskularisierung des Frakturkallus bei den ApoE-defizienten-Tieren in unserer Studie reduziert zu sein. Vor allem die deutlich verminderte Expression des Endothelzellmarkers CD31 deutet auf eine schlechtere Vaskularisierung des Frakturkallusses der ApoE-Knock-out-Mäuse hin.

In einer in-vitro-Studie wurde nachgewiesen, dass sich der lokale Sauerstoffgehalt auf die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen auswirkt (Beckmann et al., 2014). So zeigten Hirao et al. in einer Zell- und Organkulturstudie, dass eine Hypoxie in Anwesenheit von BMP-2 die mRNA Expression von Col10A1, einem terminalem Differenzierungsmarker unterdrückt und somit die Differenzierung der Chondrozyten während der enchondralen Ossifikation inhibiert wird (Beckmann et al., 2014; Hirao et al., 2006). Hyperoxische Kulturbedingungen scheinen für die Osteoblastenreifung essentiell zu sein (Beckmann et al., 2014). In einer Zellkulturstudie mit der humanen fetalen Osteoblastenlinie SV-HFO testeten Nicolaije et al., inwieweit sich ein niedriger Sauerstoffpartialdruck (2 %) auf die Differenzierung von humanen Osteoblastenvorläuferzellen auswirkt. Sie stellten fest, dass es unter hypoxischen Bedingungen zu Störungen der Osteoblastenreifung und Knochenmineralisierung kommt (Nicolaije et al., 2012).

Während in atherosklerotischen Gefäßläsionen aufgrund der Hypoxie eine starke Angiogenese durch Ausschüttung von proangiogenen Wachstumsfaktoren stattfindet, weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass die Blutversorgung im Frakturkallus bei den

ApoE-defizienten-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe supprimiert ist. Dies beeinflusst wiederum die Frakturheilung negativ.

In der reduzierten Blutversorgung des Knochens mit steigendem Alter wird auch als eine mögliche Ursache für die schlechtere Frakturheilung im höheren Alter in Studien gesehen. So war das Knochenmark bei älteren Ratten nachweislich schlechter durchblutet als bei jüngeren (Prisby, 2014). In einer weiteren Studie (Lu et al. 2008) wurde deutlich, dass der Frakturkallus bei jungen Mäusen besser durchblutet ist als bei den älteren Artgenossen. Neben weiteren bedeutsamen physiologischen Veränderungen im Rahmen des Alterungsprozesses wird deshalb vermutet, dass die reduzierte Knochenvascularisierung im Alter - ähnlich also wie bei den ApoE-defizienten-Mäusen unserer Studie - eine schlechtere bzw. verzögerte Frakturheilung nach sich zieht (Clark et al., 2017).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine ApoE-Defizienz zu Störungen des *Kallus-Remodellings* während der Frakturheilung führt. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass dies auf die schlechtere Vaskularisierung des Frakturkallus bzw. auf die Auswirkungen der oxidierten Lipide im atherosklerotisch veränderten Organismus zurückzuführen ist. Die gestörte Angio- und Osteogenese führt folglich zum verzögerten Umbau des Kallusgewebes.

5.3 Schlussfolgerungen

- I. Die histomorphometrischen und biomechanischen Analysen zeigten in beiden Versuchsgruppen eine fortschreitende Frakturheilung sowie eine höhere mechanische Stabilität nach vier Wochen verglichen mit den Ausgangswerten nach zwei Wochen. Daraus schließen wir, dass in beiden Gruppen ein *Kallus-Remodelling* stattfindet.
- II. Die ApoE-Defizienz führt zu einem verzögerten *Kallus-Remodelling*. Trotz signifikant größerer Kallusfläche bei den ApoE-Knockout-Mäusen sowohl zwei als auch vier Wochen nach Frakturierung zeigte sich keine höhere Steifigkeit in der biochemischen Testung.

Dies spiegelt sich histologisch in dem nach zwei Wochen tendenziell geringeren Knochenanteil und tendenziell höheren Knorpel- und Bindegewebsanteil bei den ApoE-Knockout-Mäusen wieder. Nach vier Wochen glichen sich die prozentualen Gewebeanteile in beiden Gruppen an. Die vergleichbare Steifigkeit der Knochen trotz größerer Kallusfläche lässt sich am ehesten durch submikroskopische Unterschiede der Knochenstruktur erklären. Mutmaßlich ist durch das verzögerte *Remodelling* bei

den ApoE-Knockout-Mäusen vier Wochen nach Fraktur noch weniger weicher Geflechtknochen in harten Lamellenknochen umgewandelt worden.

- III. Die durch Western Blot nachgewiesene verringerte Expression von CD31, CYR61 sowie BMP-2 deuten auf eine gestörte Angio- bzw. Osteogenese bei den ApoE-defizienten-Tieren hin.
- IV. Für die gestörte Angio- und Osteogenese bei den ApoE-Knockout-Mäusen sind vermutlich oxidierte Lipide sowie eine verminderte Blutversorgung im atherosklerotisch veränderten Organismus verantwortlich. Es kommt bei den ApoE-defizienten-Tieren zu einer Osteoblasteninhibierung und Störungen der Knochenmineralisierung.
- V. Die vermehrte Expression von proangiogenen Wachstumsfaktoren in atherosklerotischen Gefäßläsionen scheint keinen positiven Effekt auf die Frakturheilung zu haben.

6 Literaturverzeichnis

1. Augat P, Simon U, Liedert A, Claes, L (2005) Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA* 16 Suppl 2: 36–43
2. Babic AM, Kireeva ML, Kolesnikova TV, Lau LF (1998) CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6355-6360
3. Banks LM, Lees B, MacSweeney JE, Stevenson, JC (1994) Effect of degenerative spinal and aortic calcification on bone density measurements in post-menopausal women: links between osteoporosis and cardiovascular disease? *Eur. J. Clin. Invest.* 24: 813–817
4. Barendolts EI, Berman M, Kukreja SC, Kouznetsova T, Lin C, Chomka EV (2014) Osteoporosis and Coronary Atherosclerosis in Asymptomatic Postmenopausal Women. *Calcif. Tissue Int.* 62: 209–213
5. Barnhart MD, Rides CF, Kennedy SC, Aiken SW, Walls CM, Horstman CL, Mason D, Chandler JC, Brouman JD, Murphy SM, et al. (2013) Fracture repair using a polyaxial locking plate system (PAX). *Vet. Surg. VS* 42: 60–66
6. 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. *Orthop.*43: 298–305
7. Berchthold R, Bruch HP, Trentz O (2008) *Chirurgie.* Elsevier, München
8. Bonnarens F, Einhorn TA (1984) Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 2: 97–101
9. Brighton CT, Hozack WJ, Brager MD, Windsor RE, Pollack SR, Vreslovic EJ, Kotwick JE (1985) Fracture healing in the rabbit fibula when subjected to various capacitively coupled electrical fields. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 3: 331–340
10. Brodeur MR, Brissette L, Falstraalt L, Ouellet P, Moreau R (2008a) Influence of oxidized low-density lipoproteins (LDL) on the viability of osteoblastic cells. *Free Radic. Biol. Med.* 44: 506–517
11. Brodeur MR, Brissette L, Falstraalt L, Luangrath V, Moreau R (2008b) Scavenger receptor of class B expressed by osteoblastic cells are implicated in the uptake of cholesteryl ester and estradiol from LDL and HDL3. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 23: 326–337
12. Bruhn HD, Junker R, Schäfer H, Schreiber S (2011) *LaborMedizin.* Schattauer Verlag, Stuttgart
13. Burstein AH, Frankel VH (1971) A standard test for laboratory animal bone. *J. Biomech.* 4: 155–158

14. Cheal EJ, Mansmann, KA, DiGioia AM, Hayes WC Perren SM (1991) Role of interfragmentary strain in fracture healing: ovine model of a healing osteotomy. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 9: 131–142
15. Cheung KMC, Kaluarachi K, Andrew G, Lu W, Chan D, Cheah KSE (2003) An externally fixed femoral fracture model for mice. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 21: 685–690
16. Cho TJ, Gerstenfeld, LC, Einhorn TA (2002) Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 17: 513–520
17. Chu T, Liu Y, Wang Z, Zhu P, Liu LD (2008) Vascular endothelial growth factor and its receptor expression during the process of fracture healing. *Chin. J. Traumatol. Zhonghua Chuang Shang Za Zhi Chin. Med. Assoc.* 11: 161–164
18. Clark D, Nakamura M, Miclau T, Marcucio R (2017) Effects of Aging on Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep.* 15(6): 601–608
19. Curtiss LK, Boisvert WA (2000) Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 11: 243–251
20. Davy DT, Connolly, JF (1982) The biomechanical behavior of healing canine radii and ribs. *J. Biomech.* 15: 235–247
21. Degasperi B, Gradner G, Dupré G (2007) Intramedullary pinning of metacarpal and metatarsal fractures in cats using a simple distraction technique. *Vet. Surg. VS* 36: 382–388
22. Deibert MC, Mcleod, BR, Smith, SD, Liboff, AR (1994) Ion resonance electromagnetic field stimulation of fracture healing in rabbits with a fibular ostectomy. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 12: 878–885
23. Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, Tordoir JH, Spronk HM, Vermeer C, Daemen MJ (2001) Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 1998–2003
24. Drenckhahn D (2008) *Anatomie.* Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München
25. Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA (1999) Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech. Dev.* 87: 57–66
26. 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
27. 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

28. Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA (2005) Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 20: 1715–1722
29. Glowacki J (1998) Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*: S82-89
30. Hadjiargyrou M, Ahrens W, Rubin CT (2000) Temporal expression of the chondrogenic and angiogenic growth factor CYR61 during fracture repair. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 15: 1014–1023
31. Hak AE, Pols HA, van Hemert AM, Hofman A, Witteman JC (2000) Progression of aortic calcification is associated with metacarpal bone loss during menopause: a population-based longitudinal study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 1926–1931
32. Han N, Zhang P, Wang W, Han D, Chen J, Zhan H, Jiang B (2012) A new experimental model to study healing process of metaphyseal fracture. *Chin. Med. J. (Engl.)* 125: 676–679
33. Hankenson KD, Dishowitz M, Gray C, Schenker M (2011) Angiogenesis in bone regeneration. *Injury* 42: 556–561
34. Hausman MR, Schaffler MB, Majeska RJ (2001) Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone* 29: 560-564
35. Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P (1995) An experimental model for non-union in rats. *Injury* 26: 681–686
36. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT (1993) A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 11: 305–312
37. 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
38. Histing T, Holstein JH, Garcia P, Matthys R, Kristen A, Claes L, Menger MD, Pohlemann T (2009) Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 27: 1152–1156
39. Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke MW, Wehner T, Bindl R et al. (2011a). Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 49: 591–599
40. 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. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 29: 867–873
41. Holm PW, Slart RHJA, Zeebregts CJ, Hillebrands JL, Tio RA (2009) Atherosclerotic plaque development and instability: a dual role for VEGF. *Ann. Med.* 41: 257–264
42. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T (2007a) Development

- of a locking femur nail for mice. *J. Biomech.* 40: 215–219
43. 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
44. Holstein JH, Klein M, Garcia P, Histing T, Culemann U, Pizanis A, Laschke MW, Scheuer C, Meier C, Schorr H et al. (2008) Rapamycin affects early fracture healing in mice. *Br. J. Pharmacol.* 154: 1055–1062
45. Holstein JH, Garcia P, Histing T, Kristen A, Scheuer C, Menger MD, Pohlemann T (2009a) Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration. *J. Orthop. Trauma* 23: 31-38
46. Holstein JH, Matthys R, Histing T, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Meier C, Pohlemann T, Menger MD (2009b) Development of a stable closed femoral fracture model in mice. *J. Surg. Res.* 153: 71–75
47. Holstein JH, Karabin-Kehl B, Scheuer C, Garcia P, Histing T, Meier C, Benninger E, Menger MD, Pohlemann T (2013) Endostatin inhibits Callus remodeling during fracture healing in mice. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 31: 1579–1584
48. Junqueira L, Carneiro J (1996) *Histologie*. Springer, Berlin Heidelberg
49. Khurana R, Simons M, Martin JF, Zachary IC (2005) Role of angiogenesis in cardiovascular disease: a critical appraisal. *Circulation* 112: 1813–1824
50. Knight MN, Hankenson KD (2013) Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration. *Adv. Wound Care* 2: 306–316
51. Lenehan TM, Balligand M, Nunamaker DM, Wood FE (1985) Effect of EHDP on fracture healing in dogs. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 3: 499–507
52. Lienau J, Schell H, Epari DR, Schütze N, Jakob F, Duda GN, Bail HJ (2006) CYR61 (CCN1) protein expression during fracture healing in an ovine tibial model and its relation to the mechanical fixation stability. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 24: 254–262
53. Lind PM, Lind L, Larsson S, Orberg J (2001) Torsional testing and peripheral quantitative computed tomography in rat humerus. *Bone* 29: 265–270
54. Liu H, Yuan L, Xu S, Wang K, Zhang T (2005) Cholestane-3beta,5alpha,6beta-triol inhibits osteoblastic differentiation and promotes apoptosis of rat bone marrow stromal cells. *J. Cell. Biochem.* 96: 198–208
55. Lu C, Hansen E, Sapozhnikova A, Hu D, Miclau T, Marcucio RS (2008) Effect of age on vascularization during fracture repair. *J Orthop Res.* 26(10): 1384–1389
56. Lüllmann-Rauch R (2006) *Histologie*. Thieme, Stuttgart
57. Lutzky VP, Carnevale RP, Alvarez MJ, Maffia PC, Zittermann SI, Podhajcer OL,

- Issekutz AC, Chuluyan HE (2006) Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) recycles and induces cell growth inhibition on human tumor cell lines. *J. Cell. Biochem.* 98: 1334–1350
58. Manigrasso MB, O'Connor JP (2004) Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J. Orthop. Trauma* 18: 687–695
59. Marsell R, Einhorn TA (2011) The biology of fracture healing. *Injury* 42: 551–555
60. McFarlane SI, Muniyappa R, Shin JJ, Bahtiyar G, Sowers JR (2004) Osteoporosis and cardiovascular disease: brittle bones and boned arteries, is there a link? *Endocrine* 23: 1–10
61. 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
62. Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y, Oikawa S, Ono K, Takaoka K (1994) Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 9: 651–659
63. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R (1994) ApoE-Deficient Mice Develop Lesions of All Phases of Atherosclerosis Throughout the Arterial Tree. *J. Vasc. Biol.* 14: 133–140
64. Nather A (2001) Biological Healing of Large Diaphyseal Deep-frozen Allograft Transplants. *Cell Tissue Bank.* 2: 3–7
65. Newman PJ (1997) The biology of PECAM-1. *J. Clin. Invest.* 99: 3–8
66. Nicolaije C, Koedam M, van Leeuwen JPTM (2012) Decreased oxygen tension lowers reactive oxygen species and apoptosis and inhibits osteoblast matrix mineralization through changes in early osteoblast differentiation. *J. Cell. Physiol.* 227: 1309–1318
67. Nunamaker DM (1998) Experimental models of fracture repair. *Clin. Orthop.* 56–65
68. Ohta S, Muramatsu H, Senda T, Zou K, Iwata H, Muramatsu T (1999) Midkine is expressed during repair of bone fracture and promotes chondrogenesis. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 14: 1132–1144
69. Parhami F, Morrow AD, Balucan J, Leitinger N, Watson AD, Tintut Y, Berliner JA, Demer LL (1997) Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 680–687
70. Parhami F, Jackson SM, Tintut Y, Le V, Balucan JP, Territo M, Demer LL (1999) Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and

- promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 14: 2067–2078
71. Peter CP, Cook WO, Nunamaker DM, Provost MT, Seedor JG, Rodan GA (1996) Effect of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 14: 74–79
72. Plump AS, Breslow JL (1995) Apolipoprotein E and the Apolipoprotein E-Deficient Mouse. *Annu. Rev. Nutr.* 15: 495–518
73. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL (1992) Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71: 343–353
74. Prisby RD (2014) Bone marrow blood vessel ossification and "microvascular dead space" in rat and human long bone. *Bone* 64:195–203
75. Pugh CW, Ratcliffe PJ (2003) Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* 9: 677–684
76. Ribatti D, Levi-Schaffer F, Kovanen PT (2008) Inflammatory angiogenesis in atherogenesis--a double-edged sword. *Ann. Med.* 40: 606–621
77. Rüter A, Trentz O, Wagner M (2004) Unfallchirurgie. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München
78. Salas N, Popovitch C (2011) Surgical versus conservative management of patella fractures in cats: a retrospective study. *Can. Vet. J. Rev. Vét. Can.* 52: 1319–1322
79. Salvayre R, Negre-Salvayre A, Camaré C (2016) Oxidative theory of atherosclerosis and antioxidants. *Biochimie* 125: 281-296
80. Saran U, Gemini Piperni S, Chatterjee S (2014) Role of angiogenesis in bone repair. *Arch. Biochem. Biophys.* 561: 109–117
81. Scharf HP, Rüter A (2009) Orthopädie und Unfallchirurgie. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München
82. Schemitsch EH, Kowalski MJ, Swiontkowski MF, Senft D (1994) Cortical bone blood flow in reamed and unreamed locked intramedullary nailing: a fractured tibia model in sheep. *J. Orthop. Trauma* 8: 373–382
83. Schemitsch EH, Kowalski MJ, Swiontkowski MF, Harrington RM (1995) Comparison of the effect of reamed and unreamed locked intramedullary nailing on blood flow in the callus and strength of union following fracture of the sheep tibia. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 13: 382–389
84. Schiebler T (2005) Anatomie. Springer, Heidelberg
85. Schober JM, Chen N, Grzeskiewicz TM, et al. (2002) Identification of integrin alpha(M)beta(2) as an adhesion receptor on peripheral blood monocytes for Cyr61

- (CCN1) and connective tissue growth factor (CCN2): immediate-early gene products expressed in atherosclerotic lesions. *Blood* 99: 4457-4465
86. Shore VG, Shore B (1973) Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry (Mosc.)* 12: 502–507
87. Si W, Kang Q, Luu HH, et al. (2006) CCN1/Cyr61 is regulated by the canonical Wnt signal and plays an important role in Wnt3A-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Mol Cell Biol* 26: 2955-2964
88. Simons M, Ware JA (2003) Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2: 863–872
89. Sprini D, Rini GB, Di Stefano L, Cianferotti L, Napoli N (2014) Correlation between osteoporosis and cardiovascular disease. *Clin. Cases Miner. Bone Metab. Off. J. Ital. Soc. Osteoporos. Miner. Metab. Skelet. Dis.* 11: 117–119
90. Steen H, Fjeld TO, Bjerkreim I, Tevik A, Aldegheri R, Trivella G (1988) Limb lengthening by diaphyseal corticotomy, callus distraction, and dynamic axial fixation. An experimental study in the ovine femur. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 6: 730–735
91. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, Einhorn T, Tabin CJ, Rosen V (2006) BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat. Genet.* 38: 1424–1429
92. Utvåg SE, Grundnes O, Reikerås O (1994) Healing of segmental and simple fractures in rats. *Acta Orthop. Scand.* 65: 559–563
93. Uyama O, Yoshimoto Y, Yamamoto Y, Kawai A (1997) Bone changes and carotid atherosclerosis in postmenopausal women. *Stroke J. Cereb. Circ.* 28: 1730–1732
94. Witztum JL, Steinberg D (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 88: 1785–1792
95. Wouters K, Shiri-Sverdlov R, van Gorp PJ, van Bilsen M, Hofker MH (2005) Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoe and ldlr mice. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM FESCC* 43: 470–479
96. Xu H, Jiang J, Chen W, Li W, Chen Z (2019) Vascular Macrophages in Atherosclerosis. *J Immunol Res.* 4354786
97. Yamagiwa H, Tokunaga K, Hayami T, Hatano H, Uchida M, Endo N, Takahashi HE (1999) Expression of metalloproteinase-13 (Collagenase-3) is induced during fracture healing in mice. *Bone* 25: 197–203
98. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N (1992) Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258: 468–471

7 Publikationen / Danksagung

7.1 Publikationen

Die vorliegende Arbeit wurde auf folgendem nationalem Kongress vorgestellt und als *Abstract* publiziert:

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, Berlin, Deutschland, 2016

S.C. Herath, S. Götz, M. Klein, D. Stenger, C. Scheuer, P. Mörsdorf, T. Histing, T. Pohlemann, M. D. Menger, J.H. Holstein: Apolipoprotein E - Defizienz führt zu verzögertem Kallusremodelling während der Frakturheilung in der Maus.

doi: 10.3205/16dkou432

7.2 Danksagung

Zur Entstehung dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen. Vielen herzlichen Dank an

- meinen Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Jörg H. Holstein für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten.
- Herrn Dr. med. Steven C. Herath, dem Betreuer meiner Doktorarbeit, für seine große Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen anfallenden Fragen und Problemen.
- Herrn Professor Dr. med. Michael D. Menger für die Beratung bei der Durchführung der Arbeit und für das großzügige Bereitstellen der Infrastruktur seines Institutes.
- Herrn Professor Dr. med. T. Pohlemann für die Beratung bei der Durchführung der Arbeit.
- Frau Dr. rer. nat. Claudia Scheuer und Frau Janine Becker für die großartige Unterstützung bei der Durchführung der histologischen und proteinbiochemischen Analysen.

7 Publikationen / Danksagung

- Frau Dr. med. vet. Monika Frings für die Unterstützung während der Tierversuche.
- alle Kollegen des Institutes für klinisch-experimentelle Chirurgie für das freundliche Arbeitsklima und die erstklassige Hilfsbereitschaft und Zusammenarbeit.
- meine Familie und meine Freunde für ihre große Unterstützung.

8 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Hauptfunktionen von ApoE (Wouters et al., 2015).....	22
Abb. 2: Hautinzision medial der Patellarsehne	28
Abb. 3: Sicht auf die rechte Patellarsehne.....	28
Abb. 4: Eröffnung der Kniegelenkscapsel.....	29
Abb. 5: Interkondyläre Aufbohrung	29
Abb. 6: Sondierung des Markraumes mit einer 27-Gauge-Kanüle	30
Abb. 7: Einfädeln des Führungsdrahtes	30
Abb. 8: Liegender Führungsdraht	30
Abb. 9: Frakturierung des rechten Femurs mit der 3-Punkt-Biegeapparatur.....	31
Abb. 10: Implantation der Zugschraube (1)	32
Abb. 11: Implantation der Zugschraube (2)	32
Abb. 12: Sicht auf die implantierte Zugschraube	33
Abb. 13: Refixierung der Patellarsehne	33
Abb. 14: Hautnaht.....	33
Abb. 15: Periostale Kallusfläche nach einer Standzeit von zwei Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (*p < 0,05).	43
Abb. 16: Periostale Kallusfläche nach einer Standzeit von vier Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (*p < 0,05).....	43
Abb. 17: Prozentualer Anteil an Knochengewebe im Kallus nach zwei Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (p > 0,05).....	44
Abb. 18: Prozentualer Anteil an Knorpelgewebe im Kallus nach zwei Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (p > 0,05).....	45
Abb. 19: Prozentualer Anteil an Bindegewebe im Kallus nach zwei Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (p > 0,05).....	45
Abb. 20: Prozentualer Anteil an Knochengewebe im Kallus nach vier Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (p > 0,05).....	46
Abb. 21: Prozentualer Anteil an Knorpelgewebe im Kallus nach vier Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (p > 0,05).....	46
Abb. 22: Prozentualer Anteil an Bindegewebe im Kallus nach vier Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (p > 0,05).....	47
Abb. 23: Torsionssteifigkeit des frakturierten Femurs nach zwei Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (p > 0,05).....	48
Abb. 24: Torsionssteifigkeit des frakturierten Femurs nach vier Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (p > 0,05).....	49
Abb. 25: Western Blot-Analyse der Expression von CD31 nach zwei Wochen. Die densitometrisch bestimmte optische Dichte wurde auf gleiche β -Actin-Konzentration korrigiert. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (p > 0,05).....	50

Tabellenverzeichnis

Abb. 26: Western Blot-Analyse der Expression von CD31 nach vier Wochen. Die densitometrisch bestimmte optische Dichte wurde auf gleiche β -Actin-Konzentration korrigiert. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (*p < 0,05).	50
Abb. 27: Western Blot-Analyse der Expression von CYR61 nach zwei Wochen Die densitometrisch bestimmte optische Dichte wurde auf gleiche β -Actin-Konzentration korrigiert. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (*p < 0,05)	51
Abb. 28: Western Blot-Analyse der Expression von CYR61 nach vier Wochen. Die densitometrisch bestimmte optische Dichte wurde auf gleiche β -Actin-Konzentration korrigiert. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (*p < 0,05).	52
Abb. 29: Western Blot-Analyse der Expression von BMP-2 nach zwei Wochen. Die densitometrisch bestimmte optische Dichte wurde auf gleiche β -Actin-Konzentration korrigiert. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (*p < 0,05).	53
Abb. 30: Western Blot-Analyse der Expression von BMP-2 nach vier Wochen. Die densitometrisch bestimmte optische Dichte wurde auf gleiche β -Actin-Konzentration korrigiert. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (*p < 0,05).	53
Abb. 31: Quantitative Analyse des Serumcholesterins nach zwei Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (*p < 0,05).	54
Abb. 32: Quantitative Analyse des Serumcholesterins nach vier Wochen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (*p < 0,05).	55

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Versuchsprotokoll	26
Tab. 2: Primärantikörper für die Western-Blot-Analysen	39