

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

**Vascular Endothelial Growth Factor-beschichtete
Mineral Coated Microparticles verbessern die
Knochenheilung atrophier Pseudarthrosen
im Mausmodell**

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

vorgelegt von: Amira Katharina Shenar
geb. am: 01.02.1991 in Freiburg

Für meine Eltern.

Dekan: Prof. Dr. med. Michael Menger

1.Gutachter: Prof. Dr. med. Tim Pohlemann

2.Gutachter: Prof. Dr. med. Stefan Landgraeber

Tag der Promotion: 22.03.2021

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung / Abstract	1
2. Einleitung	4
2.1 Biologische Grundlagen des Knochens	4
2.1.1 Anatomie	4
2.1.2 Histologie	5
2.1.3 Physiologie	8
2.2 Frakturarten und Formen der Knochenheilung	9
2.2.1 Frakturarten	9
2.2.2 Primäre Knochenheilung	9
2.2.3 Sekundäre Knochenheilung	10
2.2.4 Defektheilung (Pseudarthrosen)	12
2.2.5 Behandlung der Pseudarthrose	13
2.3 Frakturmodelle	15
2.3.1 Maus	16
2.3.2 Ratte	18
2.3.3 Kaninchen	19
2.3.4 Schaf	20
2.3.5 Hund	20
2.3.6 Primat	21
2.4 Trägermaterialien	21
2.4.1 Mineral Coated Microparticles (MCM)	22
2.5 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	23
2.5.1 Historie	24
2.5.2 Biosynthese und Struktur	25
2.5.3 Funktion und Wirkung	25
2.6 Zielsetzung	30
2.7 Fragestellung	31
3. Materialien & Methoden	32
3.1 Intervention	32
3.1.1 Versuchsprotokoll	32
3.1.2 Tiermodell	32
3.1.3 Präparation der MCM	33
3.1.4 Bindungs- und Freisetzungskinetik von MCM für VEGF	33
3.1.5 Operation	34
3.1.6 Tötung der Tiere	42
3.1.7 Knochenentnahme	42

3.2	Auswertungskriterien	43
3.2.1	Radiologie	43
3.2.1.1	Röntgen	43
3.2.1.2	Mikrocomputertomographie (μ CT)	43
3.2.2	Biomechanik	44
3.2.3	Histomorphometrie	45
3.2.4	Immunhistochemie	46
3.2.5	Western Blot (WB)	46
3.3	Statistik	50
4.	Ergebnisse	52
4.1	Charakterisierung VEGF-beschichteter MCM	52
4.2	Postoperativer Verlauf	53
4.3	Makroskopischer Befund	53
4.4	Radiologie	54
4.4.1	Röntgen	54
4.4.2	Mikrocomputertomographie (μ CT)	55
4.5	Biomechanik	56
4.6	Histomorphometrie	57
4.7	Immunhistochemie	59
4.8	Westen Blot (WB)	60
5.	Diskussion	63
5.1	Diskussion der Methoden	63
5.2	Diskussion der Ergebnisse	69
5.3	Schlussfolgerungen	74
6.	Literaturverzeichnis	75
7.	Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	88
7.1	Abkürzungsverzeichnis	88
7.2	Abbildungsverzeichnis	93
7.3	Tabellenverzeichnis	95
8.	Publikationen	96
9.	Danksagungen	97

1. Zusammenfassung / Abstract

Vascular Endothelial Growth Factor-beschichtete Mineral Coated Microparticles verbessern die Knochenheilung in atrophen Pseudarthrosen

Fragestellung. Pseudarthrosen sind das Ergebnis insuffizienter Heilung frakturierter Knochen. Hypertrophe Pseudarthrosen liegt häufig eine mangelnde Stabilität des Frakturspaltes zugrunde, wohingegen atrophe Pseudarthrosen meist durch eine gestörte Blutversorgung mit konsekutiver Störung der Osteogenese verursacht werden. Während hypertrophe Pseudarthrosen durch eine adäquate Stabilisierung erfolgreich behandelt werden können, besteht die Therapie atropher Pseudarthrosen hingegen in einer Verbesserung der Angiogenese und Osteogenese. Dem Wachstumsfaktor Vascular endothelial growth factor (VEGF) konnten in der Vergangenheit wichtige Einflüsse auf Angiogenese und Zellproliferation während der frühen Phase der Knochenheilung nachgewiesen werden. Um VEGF mit räumlicher und zeitlicher Kontrolle innerhalb des Frakturspaltes zu applizieren, bedarf es eines fortschrittlichen Trägermaterials wie z. B. Mineral Coated Microparticles (MCM). Folglich war das Ziel dieser Studie, zu untersuchen, ob VEGF-beschichtete MCM die Knochenheilung atropher Pseudarthrosen verbessern.

Methoden. Zunächst wurde die Bindungs- und Freisetzungskinetik von MCM für VEGF über einen Zeitraum von 50 Tagen in vitro untersucht. Hiernach wurden VEGF-beschichtete MCM oder unbeschichtete MCM lokal in einem standardisierten Pseudarthrosemodell in Femora von CD-1 Mäusen in vivo appliziert. MCM-freie Pseudarthrosen dienten als Kontrolle. Die Untersuchungszeit je Gruppe betrug in vivo 14 und 70 Tage. Konsekutiv wurden die Knochen explantiert und der Osteotomiespalt radiologisch durch Röntgenaufnahmen und mithilfe einer Mikocomputertomographie (μ CT), biomechanisch, histomorphometrisch, immunhistochemisch und mittels Western Blot (WB) analysiert.

Ergebnisse. Die Bindungseffizienz von MCM für VEGF betrug 46 ± 3 %. Das Freisetzungsprofil zeigte initial eine hohe Freisetzung, gefolgt von einer verzögerten Freisetzung über den restlichen Untersuchungszeitraum. Hierdurch wurde das physiologische Expressionsprofil von VEGF während der Knochenheilung nachgeahmt. In vivo zeigten Knochendefekte, welche mit VEGF-beladenen MCM behandelt wurden, im Vergleich zu Knochendefekten der anderen Gruppen, einen höheren Anteil Knochenvolumen am Gesamtgewebvolumen, eine erhöhte Biegesteifigkeit und eine größere Kallusfläche 14 und 70 Tage postoperativ. WB-Analysen von Kallusgewebe, das mit VEGF-beladenen MCM behandelt wurde, zeigte 14 Tage postoperativ im Vergleich zu Kallusgewebe der anderen Gruppen eine höhere Expressi-

on von VEGF, Erythropoetin (EPO) sowie des Transkriptionsfaktors runt-related transcription factor (RUNX-2), nicht jedoch von EPO-Rezeptor (EPO-R).

Schlussfolgerungen. Die vorliegende Studie zeigt die erste Anwendung von MCM als Trägersubstanz zur therapeutischen Applikation von VEGF in Pseudarthrosen. Die Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass VEGF-beschichtete MCM die Knochenheilung in einem etablierten atrophen Pseudarthrosemodell in Mäusen verbessern. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass die Verwendung von MCM zur Applikation von VEGF aufgrund der Fähigkeit die Proteinstabilität und -funktionalität in vivo zu erhalten ein großes Potenzial aufweist. Daher stellt die Anwendung VEGF-beladener MCM einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung atropher Pseudarthrosen dar.

VEGF-loaded mineral coated microparticles improve bone repair in atrophic non-unions

Background and purpose. Non-unions are the result of insufficient healing of fractured bones. Hypertrophic non-unions are often based on a lack of stability of the fracture gap, whereas in atrophic non-unions a poor vascular supply and, thus, an impaired osteogenesis of the fracture gap are known to be the key factors for insufficient healing. While hypertrophic non-unions can be treated successfully by adequate stabilization of the fracture, the therapeutic approaches of atrophic non-union comprise mainly an improvement of angiogenesis and osteogenesis. In the past, vascular endothelial growth factor (VEGF) has been shown to have a number of important influences on angiogenesis and cell proliferation during the early course of bone regeneration. In order to apply VEGF with spatiotemporal control within the fracture gap, a sophisticated carrier system such as mineral coated microparticles (MCM) is necessary. Hence, the aim of the present study was to investigate whether VEGF-loaded MCM improve bone repair in atrophic non-unions.

Methods. First, binding and release kinetics of MCM for VEGF were analyzed over a period of 50 days in vitro. Thereafter, VEGF-loaded or unloaded MCM were locally applied to a standardized non-union model in femurs of CD-1 mice in vivo. MCM-free non-unions served as controls. The observation period in vivo per group was 14 and 70 days. Subsequently, the bone was explanted and the osteotomy gap was examined by means of radiological as X-ray and microcomputer tomography, biomechanical, histomorphometric, immunohistochemical and western blot (WB) techniques.

Results. The binding efficiency of MCM for VEGF was 46 ± 3 % and the release profile revealed an initial minor burst release, followed by a sustained release over the study period,

thus, mimicking the physiological expression profile of VEGF during bone healing. In vivo, bone defects treated with VEGF-loaded MCM exhibited a higher fraction of bone volume / tissue volume radiologically, an increased bending stiffness and a larger callus area 14 and 70 days after osteotomy compared to bone defects of the other groups. WB analyses 14 days after surgery of callus tissue treated with VEGF-loaded MCM revealed a higher expression of VEGF, erythropoietin (EPO) and runt-related transcription factor 2 (RUNX-2), but not of EPO-receptor (EPO-R) compared to callus tissue of the other groups.

Conclusions. The present study is the first demonstration to use MCM as carriers for therapeutic VEGF delivery in non-unions. Our results confirm the hypothesis that VEGF-loaded MCM are capable of improving bone repair in a well-established atrophic non-union model in mice. The results of the present study further demonstrate that the use of MCM for VEGF delivery shows great potential due to the ability to maintain protein stability and functionality in vivo. Thus, the application of VEGF-loaded MCM represent a promising strategy for the treatment of atrophic non-unions.

2. Einleitung

2.1 Biologische Grundlagen des Knochens

2.1.1 Anatomie

Knochen lassen sich aufgrund ihrer Form in lange, kurze und platte Knochen einteilen (Schiebler & Korf, 2007). Zu den langen Knochen oder auch Röhrenknochen (*Ossa longa*) zählen die meisten Knochen der Extremitäten (z. B. Humerus und Radius). Sie weisen folgende Abschnitte auf:

Die Diaphyse, oder auch Schaft, stellt den mittleren Abschnitt des Knochens dar. Dieser Abschnitt ist röhrenförmig und weist außen eine starke Ummantelung auf, die *Substantia compacta*. Die Diaphyse ist in der Regel mit gelbem oder rotem Knochenmark gefüllt. Während rotes Knochenmark hämatopoetisch aktiv ist, besteht das gelbe Knochenmark hauptsächlich aus Fettgewebe (Junqueira et al., 2005) (Schiebler & Korf, 2007).

Die beiden verdickten Endabschnitte der Röhrenknochen werden Epiphysen genannt und bilden je einen Teil eines Gelenks. Sie sind durch eine dünnere oberflächliche Schicht gekennzeichnet und ebenfalls mit Knochenmark gefüllt (Schiebler & Korf, 2007).

Zwischen den beiden Epiphysen und der Diaphyse findet sich jeweils die Metaphyse. Hier befindet sich bei einem noch nicht ausgewachsenen Knochen unter anderem die Epiphysenfuge. Sie besteht aus hyalinem Knorpelgewebe und dient dem Knochenlängenwachstum. Mit zunehmendem Alter verknöchert sie und beendet somit das Größenwachstum (Schiebler & Korf, 2007). Mit Apophysen werden die Knochenvorsprünge bezeichnet, an denen Muskeln und Bänder ansetzen (Schiebler & Korf, 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Diaphyse des Femurs, also eines Röhrenknochens, verwendet.

Zu den kurzen Knochen (*Ossa brevia*) zählen beispielsweise die Handwurzelknochen sowie die Wirbelkörper (Schiebler & Korf, 2007).

Zu den platten Knochen (*Ossa plana*) zählen z. B. Brustbeine, Rippen, Schulterblätter, Hüftbeine und Schädelknochen. Sie weisen, je nach Form, eine unterschiedlich dicke äußere Schicht auf. *Ossa plana* enthalten häufig rotes Knochenmark, sind also in der Regel hämatopoetisch aktiv.

2.1.2 Histologie

Knochengewebe besteht aus Knochenmatrix, verschiedenen Knochenzellen sowie dem Peri- und Endost. Je nach Anordnung der Knochenmatrix erfolgt die Einteilung in Geflecht- und Lamellenknochen (Junqueira et al., 2005).

Zu den verschiedenen Knochenzellen gehören Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. Für die Synthese der Knochenmatrix spielen Osteoblasten eine wichtige Rolle: Osteoblasten bilden die für den Matrixaufbau essenziellen Kollagen-Typ I Fasern, Proteoglykane und Glykoproteine. Sie befinden sich an der Geflechtknochenoberfläche, an der sie sich in ihrer kubischen Form aneinanderreihen und die neu synthetisierte Matrix freisetzen. Durch Kalziumphosphateinlagerung ist die Knochenmatrixsynthese vervollständigt (Junqueira et al., 2005) (Schiebler & Korf, 2007).

Während des Verkalkungsprozesses werden die Osteoblasten eingeschlossen und differenzieren sich daraufhin zu Osteozyten. Diese Osteozyten liegen in kleinen Lakunen und sind über Fortsätze, die in kleinen Kanalikuli eingelagert sind, miteinander verbunden. Die Ernährung derjenigen Osteozyten, die sich nicht in unmittelbarer Nähe eines Blutgefäßes befinden, erfolgt über sog. Gap Junctions: Sie stellen eine Zellverbindung der einzelnen Osteozyten dar. Voraussetzung für diese Verbindung sind sich gegenüberliegende Zellmembranen mit einem Abstand von etwa 3 nm. Über Poren können somit kleinste Moleküle (< 1000 Da) wie beispielsweise Anionen, Kationen, Glucose und Botenstoffe durchtreten (Junqueira et al., 2005) (Schiebler & Korf, 2007).

Die Aufgabe der Osteozyten besteht in der Aufrechterhaltung der Knochenmatrix. Sterben diese ab, erfolgt die Resorption der Knochenmatrix (Junqueira et al., 2005).

Neben Osteoblasten und Osteozyten sind die Osteoklasten wichtiger Bestandteil des Knochenaufbaus und -abbaus. Osteoklasten sind in der Lage mineralisierten Knochen abzubauen. Sie sind Teil des mononukleären Phagozytensystems und stammen von Monozyten ab (Junqueira et al., 2005).

Die Aktivierung der Osteoklasten erfolgte durch Osteoblasten: Sie setzen den Rezeptor receptor for activation of nuclear factor κ B ligand (RANKL) frei. RANKL bindet an den komplementären Rezeptor receptor for activation of nuclear factor κ B (RANK), welcher sich in der Zellmembran von Osteoklastenvorläuferzellen befindet. Durch die Bindung von RANKL erfolgt eine Differenzierung der Vorläuferzellen in aktive Osteoklasten und somit eine Steigerung der Knochenresorption. Dieser Signalweg wird durch Osteoprotegerin (OPG), das eben-

falls von Osteoblasten sezerniert wird, gehemmt indem es RANKL bindet. Folglich führt OPG zu einem verminderten Knochenabbau durch Osteoklasten (Schiebler & Korf, 2007).

Der Knochenabbau findet in der Resorptionszone statt. Hier befindet sich die faltige Oberfläche (ruffled border) der Osteoklasten sowie die Knochenmatrix. Umgeben wird diese Zone von der sogenannten clear zone, welche Aktinfilamente enthält (Junqueira et al., 2005).

In der ruffled border ist die V-ATPase enthalten, eine Protonenpumpe die die Resorptionszone azidifiziert. Parallel dazu werden lysosomale Enzyme, wie Kathepsine und Kollagenasen in die Abbauzone freigesetzt. Durch das angesäuerte Milieu lösen sich die Hydroxylapatit(HA)-Kristalle, sodass es zu einer Demineralisierung des Knochens kommt. Die nun freigelegten Kollagenfibrillen werden im Anschluss aufgelöst (Junqueira et al., 2005).

Die Knochenmatrix besteht in etwa gleich großen Teilen aus anorganischen und organischen Elementen (Junqueira et al., 2005).

Die anorganischen Bestandteile sind hauptsächlich HA-Kristalle, Zitrat, Bicarbonat, Kalziumphosphat sowie Magnesium-, Natrium- und Kaliumsalze (Junqueira et al., 2005).

Den organischen Teil machen zu 95% Kollagen-Fasern Typ I aus. Daneben finden sich Proteoglykane und Glykoproteine (wie z. B. Osteocalcin und Sialoprotein) (Junqueira et al., 2005).

Die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix ist maßgebend für die Stabilität und Härte des Knochens: Demineralisiert man den Knochen, so führt dies zu vermehrter Biegsamkeit. Wird hingegen das Kollagen entzogen, hat dies eine vermehrte Zerbrechlichkeit zur Folge. Daraus folgt, dass die Kollagenfibrillen für das Ausgleichen von Zugkräften und die Mineralisierung für den Ausgleich von Druckkräften verantwortlich sind (Junqueira et al., 2005).

Das Bindegewebe, das die äußere Oberfläche des Knochens umgibt, wird Periost oder auch Knochenhaut genannt. Die innere Oberfläche des Knochens bezeichnet man als Endost. Beide haben eine nutritive Funktion für das Knochengewebe. Ebenso wird hierdurch eine Zufuhr von Osteoblasten für das Wachstum und den Prozess der Knochenheilung gewährleistet. Das Periost ist fest mit dem Knochen verwachsen. Es wird histologisch in das Stratum fibrosum und das Stratum osteogenicum untergliedert. Das Stratum fibrosum führt Kollagenfaserbündel, die in die Knochenmatrix ragen und somit das Periost befestigen. Dieses Bündel wird auch als Sharpey-Fasern bezeichnet. Im Inneren, knochenwärts des Periostes, befindet sich das Stratum osteogenicum, dessen Aufgabe die Knochenneubildung z. B. im Rahmen der Frakturheilung und des Knochenwachstums ist. Diese Schicht enthält Stammzellen, welche sich in Osteoblasten differenzieren können (Junqueira et al., 2005).

Das Endost bedeckt Kanäle innerhalb des Knochens, wie beispielsweise die Knochenkanälchen und die Knochenmarkshöhle. Es besteht aus einer Schicht mit flachen Vorläuferzellen

und wenig Bindegewebe, weshalb es insgesamt dünner als das Periost ist (Junqueira et al., 2005).

Geflechtknochen kommen nur im Knochenwachstum und im Rahmen der Knochenheilung bzw. anderen ossären Reparaturvorgängen vor und werden deshalb auch Primärknochen genannt. Aufgrund der verminderten Mineralisierung weist Geflechtknochen eine höhere Durchlässigkeit für Röntgenstrahlung auf. Im Verlauf wird er zu Lamellenknochen, auch Sekundärknochen genannt, umgebaut. Im Gegenteil zu Lamellenknochen weist Geflechtknochen einen unstrukturierten, zufälligen Aufbau der Kollagenfibrillen auf. Dieser ungeordnete Aufbau ist für die höhere Instabilität im Vergleich zu Lamellenknochen verantwortlich. Lamellenknochen entspricht dem physiologischen Skelettknochen des Erwachsenen und ist durch die konzentrische Anordnung der Kollagenfibrillen um den sogenannten Havers-Kanal gekennzeichnet. Dieser Kanal führt das zentrale Blutgefäß, Nerven und lockeres Bindegewebe. Die Kollagenfibrillen bilden dadurch Lamellen, die zusammen mit dem Havers-Kanal die funktionelle Einheit des Lamellenknochens, das Osteon, bilden (Junqueira et al., 2005) (Schiebler & Korf, 2007). Die Lamellen, die sich in dem jeweiligen Osteon befinden, werden Osteon- oder auch Speziallamellen genannt. Zwischen ihnen befinden sich Osteozyten, die in Lakunen liegen. Die sogenannten Schaltlamellen liegen hingegen zwischen den Osteonen (Junqueira et al., 2005). Am äußeren und inneren Bereich des Knochens befinden sich die Generallamellen (Junqueira et al., 2005). Durch die verschiedenen Verlaufsrichtungen der einzelnen Lamellen treffen sie nahezu rechtwinkelig an angrenzende Lamellen.

Senkrecht zur Knochenoberfläche verlaufen die Volkmannkanäle durch die Osteone hindurch, um die verschiedenen Schichten zu versorgen und einen Stoffaustausch zu gewährleisten. Durch die Volkmannkanäle besteht eine Verbindung der Havers-Kanäle mit dem Periost und dem Knochenmark (Junqueira et al., 2005) (Schiebler & Korf, 2007).

Makroskopisch lässt sich strukturell die kompakte Außenschicht, die Substantia compacta von der mit schwammartig angelegten Bälkchen gefüllte Substantia spongiosa abgrenzen. Mikroskopisch liegt in beiden Schichten charakteristischer Lamellenknochen vor.

Die Zwischenräume der Knochenbälkchen in der Substantia spongiosa sowie die Knochenmarkshöhle selbst, enthalten das Knochenmark. Das rote, blutbildende Knochenmark in den langen Knochen wird ab dem ersten Lebensjahr zunehmend von gelbem, fettreichem Knochenmark ersetzt. Die Blutbildung findet ab diesem Zeitpunkt überwiegend in den kurzen und platten Knochen statt. Außer den blutbildenden Zellen besteht das Mark aus Fettzellen, Endothelzellen, Osteoblasten, Osteoklasten und den extrazellulärmatrixbildenden Retikulumzellen. Auch Arterien, Venen und Kapillaren verlaufen im Knochenmark (Bicker et al., 2008).

2.1.3 Physiologie

Knochen dienen primär der Stabilität und Biomechanik des Körpers inkl. Übertragung und Weiterleitung von Kräften und Belastungen.

Ebenfalls spielt der Knochen eine essenzielle Rolle in der Kalziumhomöostase des Körpers: Kalziumphosphat ist der wichtigste Bestandteil des Knochens und der Zähne. Im menschlichen Körper befinden sich etwa 25000 mmol (entspricht ca. 1 kg) Kalzium (Ca^{2+}) in Form von HA-Kristallen. Aus diesem reversiblen Speicher lässt sich im Falle eines Mangelzustands Ca^{2+} mobilisieren. Durch Freisetzung von Parathormon aus der Nebenschilddrüse werden knochenabbauende Osteoklasten aktiviert, um Kalziumphosphat aus dem Knochen in den Extrazellulärraum abzugeben. Dies führt zur Steigerung der Blutkonzentration von ionisiertem Ca^{2+} . Der Gegenspieler dieses Mechanismus, Vitamin D-Hormon (1,25-Dihydroxycholecalciferol), fördert hingegen die Phosphatresorption, was langfristig zum Wiedereinbau von Kalziumphosphat in den Knochen führt. Folglich sinkt hierdurch der Spiegel ionisierten Ca^{2+} im Blut (Behrends et al., 2009) (Schiebler & Korf, 2007).

Eine weitere Aufgabe des Knochens besteht im Schutz der inneren Organe. Als Beispiele seien hier die Schädelknochen als Schutz des Gehirns, die Knochen des Brustkorbs als Schutz der Lunge und des Herzens sowie der knöcherne Aufbau der Wirbelsäule als Schutz des Rückenmarks erwähnt (Schiebler & Korf, 2007).

Das Knochengewebe unterliegt dem ständigen Auf- und Abbau. Im Rahmen des Längenwachstums der Knochen ist es wichtig, dass der Aufbau des Knochens im Vergleich zum Abbau überwiegt, sodass man insgesamt von einer positiven Knochenbilanz spricht. Das Längenwachstum der Röhrenknochen endet mit der Pubertät. Es ist durch die charakteristische Abfolge von Ruhe, Proliferation, Hypertrophie und Apoptose von Chondrozyten sowie deren Ersatz durch Osteoblasten gekennzeichnet. Wichtige Mediatoren für das Längenwachstum sind u. a. growth hormone (GH), Insulin-like growth factor 1 (IGF-1), Indian hedgehog (Ihh), parathormone-related peptide (PTHrP), Wachstumsfaktoren wie beispielsweise bone morphogenetic protein (BMP) und fibroblast growth factor (FGF) sowie Schilddrüsenhormone, Androgene und Östrogene (Behrends et al., 2009) (Schiebler & Korf, 2007).

Bei der Knochenheilung spielen weitere Wachstumsfaktoren eine wesentliche Rolle: Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), platelet derived growth factor (PDGF) und Transforming growth factor β (TGF- β). Die für die Knochenheilung essenzielle Angio- und Vaskulogenese wird durch vascular endothelial growth factor (VEGF) induziert (Bahney et al., 2019).

2.2 Frakturarten und Formen der Knochenheilung

2.2.1 Frakturarten

Knochenbrüche lassen sich in verschiedene Arten einteilen: Neben Biegungs-, Dreh- und Torsionsbrüchen gibt es Abriss- und Abscherfrakturen sowie Kompressions-, Trümmer-, Luxations- und unvollständige Brüche (Henne-Bruns & Barth, 2012).

Biegungsbrüche entstehen durch eine Übertretung des physiologischen Biegemoments. Charakteristisch hierfür ist das Abbrechen eines Biegekeils auf der Konkavseite und ein Einreißen des Knochens auf der Konvexseite (Henne-Bruns & Barth, 2012).

Dreh- oder Torsionsbrüche entstehen durch die Wirkung zweier entgegengesetzter Kräfte. Aufgrund der Drehbewegung kommt es zu einer spiralförmigen Frakturlinie ggf. mit Drehkeilbildung (je nach Stärke des Drehmoments) (Henne-Bruns & Barth, 2012).

Abrissfrakturen entstehen aufgrund enormer Zugkräfte an Knochenansatzpunkten von Bändern und Sehnen (Henne-Bruns & Barth, 2012).

Abscherfrakturen liegen Zug-, Scher- und Schubkräfte in gegenteiliger Richtung zugrunde. Parallel zur jeweiligen Schubkraft verläuft infolgedessen die Frakturlinie (Henne-Bruns & Barth, 2012).

Im Rahmen einer Stauchung entstehen sogenannte Kompressionsbrüche. Vor allem spongiöse Knochen (z. B. Wirbelkörper) sind hiervon betroffen (Henne-Bruns & Barth, 2012).

Bei Trümmerbrüchen steht häufig eine Splitterung des Knochens, die Folge massiver Gewalt- bzw. Krafteinwirkung ist, im Vordergrund (Henne-Bruns & Barth, 2012).

Als Luxationsbrüche bezeichnet man eine Kombination aus Auskugelung eines Gelenks und einer gelenknahen Fraktur (Henne-Bruns & Barth, 2012).

Unvollständige Brüche werden Frakturen genannt, welche durch Risse und / oder Fissuren entstehen, jedoch den Knochen in seiner Kontinuität nicht vollständig unterbrechen (Henne-Bruns & Barth, 2012).

2.2.2 Primäre Knochenheilung

Die primäre Knochenheilung ist durch eine direkte Bruchheilung ohne Bildung von Zwischengewebe (Kallusgewebe) gekennzeichnet. Hierzu muss ein Kontakt zwischen den Knochenfragmenten bestehen bzw. der Frakturspalt unter 0,01 mm betragen und stabile Frakturverhältnisse sowie eine gute Hämoperfusion gewährleistet sein. Sind diese Bedingungen erfüllt, kann der Frakturspalt durch Osteone durchdrungen werden und eine Kontaktheilung erfolgen. Hierzu „graben“ sich Osteoklasten durch die Frakturlinie und bilden Hohlräume, welche

durch von Osteoblasten neu gebildeten Knochen gefüllt werden. Diese Heilung tritt im Rahmen von Osteosynthesen nach exakter Reposition und absoluter Stabilität auf. Die Osteoblasten ordnen sich entlang des Resorptionskanals an und füllen ihn so mit Lamellen auf. Dies bedingt nicht nur das Zusammenfügen der Frakturenden, sondern auch die Neubildung der Havers-Systeme. Dies hat zur Folge, dass Blutgefäße eindringen können, welche Osteoblasten-Vorläuferzellen enthalten. Die überbrückenden Osteone entwickeln sich später zu stabilem Lamellenknochen (Berchtold et al., 2006) (Henne-Bruns & Barth, 2012) (Kaderly, 1991) (Marsell & Einhorn, 2011) (Shapiro, 1988).

Verbleibt jedoch eine Distanz zwischen 0,8 - 1 mm, erfolgt die sogenannte Spaltheilung. Sie erfolgt durch Anreicherung von Geflechtknochen, welcher durch Periost, Endost und Umbau des Havers-Systems ein sogenanntes Remodeling, also eine Art Umbau, zu Lamellenknochen erfährt. Im Spalt sprossen Kapillaren aus Peri- und Endost ein. Die so rekrutierten Osteoblasten-Vorläuferzellen differenzieren und verbinden die Fragmentenden longitudinal zum Frakturspalt durch Neubildung von Lamellenknochen. Da das Wachstum senkrecht zur Längsachse ist, ist das Konstrukt weniger stabil als quer verlaufende Osteone. Um die anatomischen und biomechanischen Eigenschaften des Knochens wiederherzustellen, erfolgt die oben genannte Umgestaltung (Berchtold et al., 2006) (Henne-Bruns & Barth, 2012) (Kaderly, 1991) (Marsell & Einhorn, 2011).

2.2.3 Sekundäre Knochenheilung

Die sekundäre oder auch indirekte Knochenheilung ist die natürliche Form und durch die Bildung eines Zwischengewebes, dem sogenannten Kallusgewebe, charakterisiert. Diese Art der Knochenheilung erfolgt bei Mikrobewegungen und Belastung wie es bei Spontanheilung, konservativer Behandlung von Frakturen oder Osteosyntheseverfahren (z. B. bei der Marknagelung oder Fixateur externe) der Fall ist (Berchtold et al., 2006).

Die sekundäre Knochenheilung lässt sich in unterschiedliche Phasen gliedern:

Unmittelbar nach dem Trauma entsteht ein Frakturhämatom im Bruchspalt und um diesen herum. In der darauffolgenden Entzündungsphase kommt es durch den Einstrom von Entzündungszellen wie Leukozyten, Granulozyten, Monozyten und Makrophagen zur Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Die Botenstoffe führen zu einer Rekrutierung weiterer Entzündungszellen und fördern indirekt die Angiogenese durch Ausschüttung von VEGF und Angiopoetin. Die Entzündungsphase beginnt unmittelbar nach dem Trauma und ist i. d. R.

nach 72 Stunden (h) abgeschlossen (Berchtold et al., 2006) (Biberthaler & van Griensven, 2016) (Marsell & Einhorn, 2011) (Scharf et al., 2011).

Die reparative Phase erfolgt im Anschluss an die Entzündungsphase und lässt sich wiederum in eine Granulationsphase und eine Kallushärtungsphase gliedern:

In der Granulationsphase findet im Hämatom eine Umstrukturierung statt: Es erfolgt die Bildung von Granulationsgewebe und Rekrutierung mesenchymaler Vorläuferzellen durch Zytokine. Die mesenchymalen Vorläuferzellen differenzieren sich zu Chondroblasten, Osteoblasten, Fibroblasten und Endothelzellen. Parallel hierzu differenzieren sich Stammzellen periostal zu Osteoblasten und stellen daraufhin Knochenmatrix her. Die Chondroblasten des Granulationsgewebes differenzieren sich zu Chondrozyten, welche fähig sind, kollagene Matrix zu bilden. Somit entsteht der sogenannte weiche Kallus, welcher aus Bindegewebe besteht. Die Chondrozyten hypertrophieren im knorpeligen Kallus und gehen zugrunde. Aufgrund der Sekretion von VEGF durch die hypertrophierten Chondrozyten und Neubildung von Angiopoetin erfolgt eine Einsprossung von Kapillaren im Sinne einer induzierten Angiogenese. Dies führt insgesamt zur enchondralen Ossifikation des Kallus (Gerber et al., 1999). Nach ca. 3 - 4 Wochen ist der Frakturspalt teilweise durch Knorpel, teilweise durch Bindegewebe verbunden und weist hierdurch ein Maximum an Kallusgewebe auf (Scharf et al., 2011).

In der Phase der Kallushärtung findet der Umbau des weichen Kallus in den Fixationskallus, dem sogenannten harten Kallus statt. Dies erfolgt durch Bildung verkalkter Knorpelsubstanz. Osteoblasten lagern sich an den vorhandenen weichen Kallus und bilden eine Knochenmatrix, welche im Verlauf zunehmend mineralisiert. Die multizelluläre Grundeinheit (auch basic multicellular unit, BMU) baut toten Knochen ab und tauscht den zuvor mineralisierten Knorpel durch Knochen aus. Diese BMU besteht aus Interzellulärsubstanz, Zellen und Kapillaren. Durch die verschiedenen Umbauvorgänge entsteht entlang der Kapillaren Geflechtknochen. Erst im Verlauf erfolgt eine Umstrukturierung zu Lamellenknochen (Biberthaler & van Griensven, 2016) (Scharf et al., 2011).

In der letzten Phase der sekundären Knochenheilung, auch Remodelingphase oder Phase des Knochenumbaus genannt, erfolgt ein Umbau des Fixationskallus mithilfe der BMU zu ausgereiftem Lamellenknochen. Von klinisch abgeschlossener Knochenheilung spricht man, wenn der Knochen wieder seine ursprüngliche Festigkeit erlangt hat. Eine biologisch abgeschlossene Knochenheilung besteht jedoch erst, sobald keine Reparaturprozesse mehr nachweisbar sind. Dies kann bis zu mehrere Jahre andauern (Berchtold et al., 2006) (Henne-Bruns & Barth, 2012) (Scharf et al., 2011).

Die murine Knochenheilung ähnelt der Humanen grundsätzlich. Sie weist jedoch im Gegensatz zum Menschen bereits 10 - 14 Tage nach Fraktur ein Kallusmaximum auf. In Vorstudien an Mäusen konnte nach 21 Tagen eine Frakturüberbrückung beobachtet werden. Insgesamt konnte nach einem Zeitraum von etwa 42 - 84 Tagen postfraktuell eine Biegesteifigkeit nachgewiesen werden, welche in etwa einem gesunden Mäuseknochen entsprach (Hiltunen et al., 1993) (Manigrasso & O'Connor, 2004).

2.2.4 Defektheilung (Pseudarthrosen)

Eine Defektheilung (auch verzögerte Heilung genannt) besteht, wenn erst nach 4 - 6 Monaten eine Konsolidierung der Fraktur erfolgt ist (Henne-Bruns & Barth, 2012). Besteht nach 6 - 8 Monaten nur eine fibröse Verbindung zwischen den Bruchenden, also keine knöcherne Überbrückung und sowohl klinisch als auch radiologisch keine Heilung der Fraktur, bezeichnet man dies als Pseudarthrose (Henne-Bruns & Barth, 2012). Als Ursache für die unzureichende Heilung kommen sowohl mechanische als auch biologische und / oder endokrinologische Faktoren in Betracht. Die häufigste, mechanische Ursache ist die Instabilität durch unzureichende Ruhigstellung und daraus resultierenden Scherbewegungen und Stauchungen im Frakturspalt. Der im Rahmen der Knochenheilung entstandene Geflechtknochen wird aufgrund der mangelnden Ruhigstellung immer wieder zerstört und erfährt deshalb keinen Umbau zu Lamellenknochen. Bei der primären Knochenheilung verhindert eine ungenügende Ruhigstellung die Überbrückung durch die Havers-Systeme.

Biologische Ursachen für die Entstehung von Pseudarthrosen können vielfältig sein. Eine der häufigsten Ursachen ist eine mangelnde Durchblutung des Frakturspalts (Scharf et al., 2011). Hierdurch kommt es zum Absterben der Knochenenden. Auch ein Substanzverlust oder die Denervierung können eine defekte Heilung zur Folge haben. Andere Faktoren, die negativen Einfluss auf die Frakturheilung haben können, sind z. B. das Alter, unterschiedliche Medikamente oder auch Nikotinabusus (Scharf et al., 2011).

Liegt der Pseudarthrose eine mechanische Instabilität zugrunde, entsteht eine periostal ausladende Kallusentwicklung an beiden Enden, ohne dass eine knöcherne Überbrückung des Frakturspalts erfolgt. Kennzeichnend in diesem Zusammenhang ist jedoch eine gute Vaskularisierung der Fragmente. Diese, oft elefantenfußähnliche, Pseudarthrose wird hypertrophe Pseudarthrose genannt (Scharf et al., 2011).

Besteht hingegen eine mangelnde Durchblutung, so ist meist kein Heilungsprozess möglich. Die Frakturrenden sind atroph. Man spricht hierbei folglich von einer atrophen oder auch avitalen Pseudarthrose (Scharf et al., 2011).

Bei der Defektpseudarthrose ist der zu überbrückende Frakturspalt zu groß, sodass auch mithilfe der Kallusbildung im Rahmen der sekundären Knochenheilung keine adäquate Überbrückung möglich ist (Scharf et al., 2011).

Klinisch hinweisend ist die pathologische Beweglichkeit des Knochens als Zeichen einer Defektheilung. Liegt hingegen eine „straffe“ Pseudarthrose vor, sind andere klinische Zeichen wie Schmerzen, Schwellung und Belastungsunfähigkeit führend (Scharf et al., 2011).

2.2.5 Behandlung der Pseudarthrose

Die Behandlung von Pseudarthrosen erfolgt abhängig von der zugrunde liegenden Ursache. Besteht eine hypertrophe Pseudarthrose aufgrund fehlender Fixation der Frakturrenden, so ist eine Stabilisierung in Form einer Osteosynthesetechnik zu gewährleisten. Außerdem werden Pseudarthrosemembranen entfernt und die Frakturrenden sparsam reseziert und angefrischt, sodass eine Heilung erfolgen kann (Scharf et al., 2011).

Bei der atrophen Pseudarthrose ist das primäre Therapieziel den physiologischen Ablauf der Knochenheilung zu induzieren. Dies kann durch Wiederherstellung der Vaskularisation des Frakturbereichs und Resektion atropher Bereiche erreicht werden. Technisch ist dies durch verschiedene Operationsverfahren wie z. B. Transplantation von spongiosen Knochen möglich (Scharf et al., 2011).

Bei Defektpseudarthrosen kann eine Heilung durch kortikospongiöse Knochenspantransplantationen erreicht werden. Der Knochenspan überbrückt einerseits den Defekt und beinhaltet andererseits gut vaskularisierte Spongiosa. Die Fixation des Knochenspans erfolgt i. d. R. durch Osteosyntheseverfahren. Alternativ können die Frakturrenden durch verschiedene Fixationssysteme zueinander gezogen werden. Bei infizierten Pseudarthrosen muss zusätzlich das infizierte Gewebe großzügig reseziert werden bevor eine Spongiosaplastik erfolgen kann (Scharf et al., 2011).

Ein wichtiges Zytokin während der Knochenheilung ist VEGF. VEGF fördert die vaskuläre Endothelproliferation, hierdurch die Angiogenese und während der Knochenheilung auch die Osteoblastogenese (Liu et al., 2012). VEGF wird durch hypertrophe Chondrozyten sezerniert, was zu einer Kapillareinsprossung führt (Gerber et al., 1999) (Keramaris et al., 2008). Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Blockierung der Angiogenese durch VEGF-Inhibi-

toren, beispielsweise durch O-(chloroacetylcarbamoyl) fumagillol (TNP-470), zu einer Verhinderung des Heilungsmechanismus, Beeinträchtigung der Kallusbildung und Unterdrückung der periostalen Knochenneubildung führt (Hausman et al., 2001). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass Frakturen eine höhere Knochendichte aufweisen und die Mineralisierung des Knochens positiv beeinflusst wird, wenn diese mit VEGF behandelt wurden (Keramaris et al., 2008). Im Rahmen anderer Studien konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis von VEGF zu BMP eine wesentliche Rolle für den Wirkmechanismus von VEGF spielt und sich somit eine geringe therapeutische Breite ergibt. Ist die Dosis von VEGF zu hoch, kann es zur Bildung von Hämangiomen kommen (Keramaris et al., 2008).

Weitere für die Knochenheilung essenzielle Zytokine sind, wie unter 2.1.3 beschrieben, PDGF, TNF- α , FGF und IL-6. Hieraus könnten sich therapeutische Möglichkeiten ergeben. Eine Studie an geklonten humanen Osteoblasten zeigte, dass PDGF den Thymidin-Einbau und somit die Genexpression und Zellproliferation steigert und dies zu einer Stimulation der Knochenbildung führen kann (Zhang et al., 1991). TNF- α konnte bei richtiger Dosierung der Zugabe in den Frakturspalt eine Beschleunigung der Frakturheilung am Mausmodell nachgewiesen werden (Glass et al., 2011). Die Wirkung der gezielten Expression von FGF in einem Mausmodell zeigte ebenfalls eine beschleunigte Frakturheilung (Hurley et al., 2016). Weitere wichtige Faktoren sind die Gruppe der BMPs, welche die Stammzelldifferenzierung in Chondro- und Osteoblasten induzieren und ebenfalls therapeutisch genutzt werden können (Mi et al., 2013). In einem murinen Pseudarthrosemodell wurde bereits die verbesserte Knochenheilung bei lokaler Injektion von BMP-2 aufgezeigt (Orth et al., 2017).

Ein weiterer Ansatz zur Behandlung von Pseudarthrosen stellt die Genterapie dar. So ist versucht worden die Zytokinkonzentration zu erhöhen, indem die produzierenden Zellen zur Herstellung entsprechender Zytokine angeregt worden sind (Scharf et al., 2011). Beispielsweise konnte durch einen Adenovirusvektor, der Desoxyribonukleinsäure (DNA) enthielt, die für humane VEGF- und BMP-6-Gene kodiert, eine Transduktion auf eine mesenchymale Stammzelle erfolgen. Einige Stammzellen wurden kultiviert, um die Differenzierung zu Osteoblasten zu untersuchen. Andere wurden Ratten verabreicht, um die Knochenbildung zu beurteilen. In beiden Fällen konnte eine Steigerung der Expression von humanem VEGF und BMP-6 detektiert werden, welche zur Potenzierung der Matrixmineralisierung führte (Seamon et al., 2013).

2.3 Frakturmodelle

In vitro-Tests können nützlich sein, um biologische Mechanismen und verschiedene Parameter zu bestimmen. Die Übertragung dieser Ergebnisse auf die Klinik ist jedoch im Allgemeinen schwierig, da die Frakturheilung ein komplexer Prozess ist, welcher eine räumlich und zeitlich koordinierte Wechselwirkung zahlreicher Zelltypen und molekularer Mediatoren erfordert. Neben biologischen Faktoren wird der Heilungsvorgang auch durch das lokale biomechanische Umfeld beeinflusst (Bigham-Sadegh & Oryan, 2015) (Haffner-Luntzer et al., 2019).

Tierversuche sind besser auf den Menschen übertragbar, als in vitro-Testungen (Bigham-Sadegh & Oryan, 2015). Dies ist oft entscheidend für die Aussagekraft der Versuchsergebnisse und die Extrapolation. Die Verwendung von Tiermodellen hilft dabei, die wirksamsten Methoden zur Behandlung des Menschen zu studieren (Bigham-Sadegh & Oryan, 2015).

Die Versuche an verschiedenen Tiermodellen zur Knochenheilung werden sowohl an kleinen als auch an großen Tieren durchgeführt (Bigham-Sadegh & Oryan, 2015).

In der experimentellen Knochenheilungsforschung haben sich in den letzten Jahren verschiedene Methoden und Frakturmodelle etabliert. Zu den am häufigsten gewählten Modellen zählen neben Ratten und Mäusen auch Kaninchen und Schafe (Martini et al., 2001) (Reifenrath et al., 2014).

Generell ist die Reproduzierbarkeit sowie die Aussagefähigkeit des Tiermodells elementar: In jedem Tiermodell unterscheiden sich die Eigenschaften und Umstände zu denjenigen des Menschen. So sind z. B. die Makro- und Mikrostruktur des Knochens different (Reifenrath et al., 2014).

Für die Wahl des geeigneten Tiermodells sollten verschiedene Faktoren berücksichtigt werden. Hierzu gehört die Verfügbarkeit des Tiers, die Kosten der Haltung und Beschaffung wie auch eine möglichst einfache Handhabung und Pflege. Ebenfalls die Tiergröße, die Beständigkeit gegen Operationen, Infektionen und Krankheiten sowie die dem Menschen möglichst analoge biologische Eigenschaften, Knochenstruktur und -zusammensetzung spielen eine wesentliche Rolle (Auer et al., 2007) (Bigham-Sadegh & Oryan, 2015).

Darüber hinaus müssen ethische Grundsätze beachtet werden: Phylogenetisch primitiveren Tieren wird für die experimentelle Forschung im Allgemeinen mehr Akzeptanz geschenkt als höher entwickelten Tieren wie z. B. dem Hund (Porter, 1992).

Im Folgenden werden die in tierexperimentellen Studien am häufigsten verwendeten Frakturheilungsmodelle aufgeführt.

2.3.1 Maus

Die Maus gehört neben der Ratte, dem Kaninchen und dem Schaf zu der am meisten verwendeten Tierart der experimentellen Knochenheilungsforschung (Reifenrath et al., 2014).

Schon 1955 wurden Frakturstudien an Mäusen beschrieben, welche jedoch später aufgrund der Größe zunächst weitestgehend durch das Rattenmodell ersetzt wurden (Histing et al., 2011) (Merezhinskii et al., 1955).

Da sich die Maus jedoch aufgrund der großen Verfügbarkeit spezieller Antikörper besonders für die Erforschung zellulärer Abläufe sowie Enzymen und Signalproteinen der Knochenheilung eignet, gewann die Maus zuletzt zunehmend an Bedeutung (Reifenrath et al., 2014) (Histing et al., 2011).

Auch die geringen Zucht- und Haltungskosten, die kürzeren Zuchtzyklen sowie die Möglichkeit mehrere Tiere in einem Käfig unterzubringen sind weitere Vorteile für die Forschung an der Maus (Histing et al., 2011).

Da das Genom der Maus vollständig entschlüsselt ist, ergeben sich weitere Möglichkeiten zur Analyse molekularer Mechanismen der Knochenheilung sowie zum Einsatz monoklonaler Antikörper, die für andere Tierarten nur begrenzt verfügbar sind (Histing et al., 2011). In diesem Zusammenhang besteht der Vorteil der Kleintierzuchtmodelle darin, dass aufgrund der verminderten Heterogenität im Vergleich zu größeren Tiermodellen wie z. B. dem Kaninchen eine verminderte Anzahl an Tieren benötigt wird um ein statistisch signifikantes Ergebnis zu erzielen (Reifenrath et al., 2014).

Analog zu anderen Tierarten nehmen Faktoren wie z. B. das Alter, das Geschlecht oder der Stamm Einfluss auf den Knochenheilungsprozess der Maus, sodass entsprechende Angaben bei den Ergebnissen stets berücksichtigt werden müssen (Histing et al., 2011).

Mäuse besitzen im Gegensatz zum Menschen kein Havers-System, sondern Resorptionshöhlen, in denen der Knochenumbau stattfindet. Jedoch ähneln diese Höhlen dem Havers-System, sodass sich die Maus trotz dessen zur Untersuchung der Knochenheilung eignet (Histing et al., 2011) (Nunamaker, 1998).

Eine Herausforderung für die technische Durchführbarkeit von Frakturmodellen an der Maus ist die geringe Körpergröße und das damit verbundene nötige manuelle Geschick der chirurgischen Intervention (Histing et al., 2011).

Studien zur Knochenheilung an der Maus werden vor allem an langen Röhrenknochen, wie z. B. der Tibia oder dem Femur durchgeführt. Während die Tibia aufgrund der dreieckigen Form, dem nach distal abnehmenden Kaliber, der gebogenen Längsachse und der geringen Weichteilabdeckung weniger für die vorliegende Studie verwendbar ist, eignet sich das Femur

aufgrund seines tubulären Aufbaus und dem relativ gleichmäßigen und größeren Durchmesser hervorragend für externe und interne Osteosyntheseverfahren sowie für Plattenfixationsmodelle (Holstein et al., 2007). Aufgrund der dickeren Weichteilummantelung ist das Femur auch für die Untersuchung des Einflusses des Weichteilgewebes auf das Frakturgeschehen im Vergleich zur Tibia zu bevorzugen (Histing et al., 2011).

Generell lassen sich zwei Arten von Frakturierung unterscheiden: Der Knochen kann offen osteotomiert werden oder geschlossen mittels 3-Punkt Biegung wie sie z. B. von Manigrasso et al. (2004) angewandt wurde. Die offene Fraktur kann beispielsweise durch die Verwendung einer Gigli Drahtsäge oder mittels Fräsbohrer erfolgen (Garcia et al., 2008) (Orth et al., 2017). Die geschlossene Methode der Frakturierung basiert auf der von Bonnarens und Einhorn 1984 veröffentlichten Methode. Hierbei erfolgte die Frakturierung eines Rattenknochens mittels stumpfer Guillotine, welche eine reproduzierbare Querfraktur mit minimalem Weichteilschaden erzeugte (Bonnarens & Einhorn, 1984). Dieses Verfahren wurde auch für die Tibia der Maus (Hiltunen et al., 1993) und das Femur (Manigrasso & O'Connor, 2004) beschrieben.

In den letzten Jahren haben sich verschiedene Methoden der Frakturfixierung bei Mausmodellen etabliert:

Das intramedulläre Pin-Modell ist ein weit verbreitetes Fixationsmodell das ursprünglich 1984 durch Bonnarens und Einhorn an der Ratte publiziert wurde (Bonnarens & Einhorn, 1984). Der wesentliche Nachteil dieser Methode ist jedoch die ungenügende Rotations- und Achsenstabilität, die Gefahr der Dislokation und die durch den Pin verursachten intramedullären Schäden (Histing et al., 2009) (Histing et al., 2011).

Cheung et al. (2003) publizierten die Frakturfixierung mittels Fixateur externe. Er besteht aus zwei Aluminiumblöcken, welche horizontal durch zwei Stifte verbunden werden. Eine Stabilisierung der Stifte kann über zwei Schrauben in dem jeweiligen Aluminiumblock erfolgen. Um den Fixateur externe mit dem Knochen zu verbinden werden vier weitere Stifte vertikal an den Aluminiumblöcken, bestehend aus 25 G Injektionsnadeln, angebracht. Durch diese Stifte führt ein 0,3 mm Draht, welcher vertikal bikortikal im Knochen verankert wird. Um das Herausrutschen des Drahtes zu verhindern erfolgt ein Crimpen der Injektionsnadeln. Im Vergleich zum Pin-Modell zeigte sich durch den Fixateur externe eine stabilere Fixierung (Cheung et al., 2003).

Holstein und Kollegen entwickelten im Vergleich zum herkömmlichen intramedullären Pin ein stabileres Verriegelungsmarknagelmodell (Holstein et al., 2007). In dieser Fixierungstechnik wird mithilfe einer distal abgeflachten Spritzkanüle, die über einen Wolfram-Draht in den Knochen eingeführt wird, die Fraktur stabilisiert. Bis auf die von Cheung und Kollegen

veröffentlichte externe Stabilisierungsmethode, stellte dies bis dato die erste rotationsstabile Fixierungsmöglichkeit dar (Holstein et al., 2007).

Nachfolgend wurde von unserer Arbeitsgruppe ein Verfahren entwickelt, welches erstmals die Untersuchung von Pseudarthrosen ermöglichte: Im Pin-Clip Modell wird, ähnlich dem intramedullären Pin-Modell, eine Spritzkanüle in den Markraum von distal nach proximal eingeführt und rotationsstabil verankert. Im sekundären Abschnitt des Verfahrens wird der Oberschenkel lateral eröffnet und das Femur freigelegt. Hier wird der Clip nun eingesetzt und der Knochen dazwischen osteotomiert. Abhängig von der Größe des induzierten Defekts kann eine physiologische Knochenheilung oder Pseudarthrose induziert werden (Garcia et al., 2008) (Garcia et al., 2008b). Das Pin-Clip Modell wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet und wird unter 3.1.5 genauer beschrieben.

Ein weiteres, verfügbares Knochenheilungsmodell der Maus stellt die „LockingMouseNail“-Methode dar: Auch hier wird ein intramedullär verankerter Pin in das Femur eingeführt. Anstelle eines Clips wird der Pin jedoch mit zwei bikortikal montierten Stiften stabilisiert, zwischen welchen die Osteotomie erfolgen kann (Garcia et al., 2009). Hierdurch kann ebenfalls eine physiologische oder gestörte Frakturheilung inklusive Pseudarthrosen induziert werden. Eine Alternative, die nicht den Intramedullärraum beschädigt, ist die von Histing und Kollegen veröffentlichte „LockingMousePlate“ (Histing et al., 2010). Hierbei wird eine Platte mit 4 Schrauben an das frakturierte Femur angebracht. Dieses Verfahren ermöglicht die Untersuchung der intramembranösen Knochenheilung (Histing et al., 2010).

Eine weiteres, murines Frakturheilungsmodell wurde 2009 publiziert: Bei dem „MouseScrew“-Verfahren wird das Femur distal und proximal eröffnet und ein Führungsdraht eingeführt. Nach Frakturierung des Knochens wird über den bereits zuvor eingebrachten Draht eine Schraube mit distalem Gewinde eingeführt und am proximalen Femurende verschraubt, so dass eine zusätzliche Komprimierung der Fraktarenden ermöglicht wird (Holstein et al., 2009).

2.3.2 Ratte

Die Ratte gehörte schon vor der Maus zu einer häufig für Knochenheilungsmodelle verwendeten Tierart (Histing et al., 2011). Erste Versuche hierzu erfolgten bereits 1946 (Pritchard, 1946). Der wesentliche Vorteil der Ratte gegenüber der Maus ist die Körpergröße bei vergleichbaren Zucht- und Haltungskosten.

Auch an der Ratte haben sich im bisherigen Verlauf viele Frakturmodelle etabliert: Basierend auf der Pin-Osteosynthese von Bonnarens und Kollegen wurde das Verfahren von An et al. an der Tibia der Ratte modifiziert und überarbeitet (An et al., 1994) (Bonnarens & Einhorn, 1984).

Die externe Fixation sowie die Plattenosteosynthese wurden auch an der Ratte beschrieben (Mark et al., 2003) (Wildemann et al., 2004). Diese weitaus stabileren Verfahren im Vergleich zu der einfachen Marknagelung haben jene weitgehend ersetzt.

Hietaniemi und Kollegen publizierten 1995 ein Pseudarthrosemodell an der Ratte (Hietaniemi et al., 1995). Dieses Modell hat jedoch gegenüber den beschriebenen, murinen Pseudarthrosemodellen den Nachteil der fehlenden Rotationsstabilität (Garcia et al., 2008b). Darüber hinaus ist das Spektrum an verfügbaren monoklonalen Antikörpern im Vergleich zur Maus geringer (Histing et al., 2011) (Holstein et al., 2007) (Petters & Sommer, 2000). Wie bei der Maus besteht bei der Ratte ebenfalls der Vorteil der verminderten Heterogenität im Vergleich zu größeren Tiermodellen, wodurch weniger Tiere zur Erzielung signifikanter Ergebnisse benötigt werden (Reifenrath et al., 2014).

2.3.3 Kaninchen

Das Kaninchen ist eine ebenfalls häufig verwendete Tierart zur Untersuchung der Knochenheilung (Martini et al., 2001). Im Gegensatz zu Mäusen und Ratten besitzt der Kaninchenknochen ein Havers-System und ist vergleichsweise groß, weshalb dieser dem des Menschen ähnlicher ist (Reifenrath et al., 2014).

Im Vergleich zu Maus und Ratte sind Versuche am Kaninchen aufgrund höherer Zucht- und Haltungskosten und längerer Versuchszeiten jedoch teurer (Histing et al., 2011).

Verfahren wie Plattenosteosynthese, Verriegelungsmarknagelung und externe Fixationen sind für das Kaninchen beschrieben (Danckwardt-Lillieström et al., 1970) (Lettin, 1965) (Park et al., 1999). Verschiedene reproduzierbare Defektheilungsmodelle wurden ebenfalls für das Kaninchen etabliert: So publizierten Park und Kollegen eine Studie, in der die Wunde wiederholt bewässert und ein Wunddebridement erfolgte. Die Frakturüberbrückungszeit stieg hierdurch von durchschnittlich 6,2 Wochen auf 7,6 Wochen an (Park et al., 2002).

Ein weiteres Pseudarthrosemodell, welches keine zwischenzeitliche Intervention benötigt, ist das von Oni veröffentlichte Verfahren. Hierbei wurde die Fraktur mittels intramedullären Stift stabilisiert (Oni, 1995).

2.3.4 Schaf

Das Schaf ist das vorwiegend verwendete Großtiermodell der Knochenheilungsforschung (Reifenrath et al., 2014). Das Körpergewicht ähnelt dem des Menschen und auch die Größe der Knochen ist vergleichbar, sodass für das Schaf Implantate und Prothesen, die für den Menschen vorgesehen sind, verwendet werden können (Newman et al., 1995) (Pearce et al., 2007). Der mikroskopische Knochenaufbau des Schafs weicht jedoch dem des Menschen ab: Ein Remodeling über das Havers-System erfolgt erst im Alter. Bis zum 4. Lebensjahr dominiert hingegen eine plexiforme Knochenstruktur (Liebschner, 2004) (Newman et al., 1995) (Pearce et al., 2007).

Neben Osteotomieverfahren mit definierter Frakturspaltgröße wurden auch Pseudarthrosemodelle mit einer Spaltgröße zwischen 10 und 50 mm publiziert (Preininger et al., 2011) (Reifenrath et al., 2014) (Teixeira et al., 2007).

2.3.5 Hund

Der Hund eignet sich aufgrund seines Knochenaufbaus und seiner Größenverhältnisse sehr gut für die Erforschung der Knochenheilung. Sein Knochenaufbau weist eine große Ähnlichkeit zu dem des Menschen auf (Reifenrath et al., 2014).

Schon im Jahre 1968 wurden Tibia und Radius des Hundes osteotomiert und der Knochen auf Vaskularität untersucht (Olerud & Danckwardt-Lillieström, 1968).

Für den Hund wurden vielfältige Operationsverfahren und Stabilisierungstechniken entwickelt wie z. B. das Polyaxial Locking Plate System (PAX), eine Plattenosteosynthese, die durch Verriegelung der Schrauben innerhalb der Platte zur Stabilisation der Fraktur führt. Diese Systeme sind aufgrund des veterinärmedizinischen Interesses von großer Bedeutung (Barnhart et al., 2013).

Ein Pseudarthrosemodell sowohl für die hypertrophe Form als auch für die atrophe Form wurde am Hundemodell beschrieben (Dos Santos Neto et al., 1984) (Markel et al., 1995).

Ir'ianov und Kollegen publizierten eine Studie, in welcher eine offene Trümmerfraktur an Hunden simuliert und ein mit HA beschichteter Draht in den Markraum eingeführt wurde. Sie wiesen einen positiven Effekt auf den Knochenheilungsprozess nach (Ir'ianov et al., 2014).

Der wesentliche Nachteil des Hundemodells ist neben der teuren und anspruchsvollen Haltung der ethische Konflikt. So gilt der Hund als hochintelligentes Begleittier, was die Verwendung für Knochenheilungsstudien limitiert (Porter, 1992) (Reifenrath et al., 2014).

2.3.6 Primat

Der Primat hat den höchsten Ähnlichkeitsgrad des biologischen Knochenaufbaus im Vergleich zum Menschen. Allerdings finden Versuche an Primaten aufgrund der hohen Kosten, der begrenzten Verfügbarkeit und dem Rang auf der phylogenetischen Skala wenig Anwendung in der Knochenheilungsforschung (Nunamaker, 1998).

2.4 Trägermaterialien

In der Erforschung von Fraktur- und Defektheilungen werden verschiedene Wirkstoffe, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, angewandt um den Heilungsprozess zu beeinflussen (Blumenfeld et al., 2002) (Holstein et al., 2011) (Ogilvie et al., 2012) (Orth et al., 2017) (Street et al., 2002). Um diese Faktoren korrekt zu implantieren und eine kontinuierliche Abgabe der Wirkstoffe zu gewährleisten gibt es verschiedene Ansätze. Die Pharmakokinetik der Faktorabgabe spielt eine maßgebliche Rolle für den klinischen Erfolg, die Wirksamkeit und einen kosteneffizienten Verbrauch. Ziel ist es, ein möglichst physiologisches Abgabeverhalten, welches der regelhaften Knochenheilung gleicht, zu erzeugen. Die physiochemischen und biologischen Eigenschaften der Wachstumsfaktoren begründen die Notwendigkeit Trägersysteme zu entwickeln, die die Bioaktivität der Faktoren aufrechterhalten und die Beständigkeit sowie Verfügbarkeit an der Implantationsstelle verbessern (King & Krebsbach, 2012). Ferner müssen Trägersysteme von bioaktiven Stoffen verschiedene Anforderungen erfüllen: Sie sollten idealerweise den Knochendefekt bzw. die Implantationsstelle bestmöglich ausfüllen, aus biokompatiblen und osteokonduktiven Substanzen bestehen, biomechanische Eigenschaften am Ort der Implantation erfüllen, eine dreidimensionale(3D)-Struktur besitzen die den Anforderungen des lokalen Zellstoffwechsels entspricht und über einen bestimmten Zeitraum abgebaut werden (Hollister, 2009) (King & Krebsbach, 2012).

Darüber hinaus sollte die Steuerung und Einstellung der Freisetzung nach individuellen Bedürfnissen adaptierbar sein. Ein unkompliziertes, standardisiertes und reproduzierbares Bindungsprotokoll gewährleistet eine einfache Handhabung und die Möglichkeit zur Anwendung in der Klinik (Orth et al., 2017) (Yu et al., 2014).

Als Trägersysteme von bioaktiven Stoffen sind in den vergangenen Jahren verschiedene Materialien entwickelt worden: Initialen Bolusapplikationssystemen konnte keine signifikante Verbesserung hinsichtlich der Bildung von neuem Knochengewebe nachgewiesen werden (Einhorn, 2003) (King & Krebsbach, 2012). Nachfolgend entwickelte Trägermaterialien wie z. B. Polymerschwämme und auf verschiedenen Substanzen basierende Hydrogele oder Na-

nopartikel ermöglichten eine Freisetzung von Wachstumsfaktoren über einen längeren Zeitraum (Burdick et al., 2002) (Chen & Mooney, 2003) (Friess et al., 1999) (Ghosh et al., 2008) (Rai et al., 2005) (Suárez-González et al., 2012) (Yamamoto et al., 2000). Eine zeitlich koordinierte Freisetzung der Wachstumsfaktoren war jedoch nicht möglich. Um die Art, Menge und den Zeitpunkt der Wirkstofffreisetzung während der Heilungsphase steuern und kontrollieren zu können entwickelte eine amerikanische Arbeitsgruppe sogenannte Mineral Coated Microparticles (MCM), die auch in der vorliegenden Studie verwendet wurden und nachfolgend genauer beschrieben werden (Yu et al., 2014).

2.4.1 Mineral Coated Microparticles (MCM)

MCM stellen mehrschichtige, Elektrolyt-beschichtete Mikropartikel dar, die als neuwertiges, anpassungsfähiges Trägersystem zur Abgabe von einem oder mehreren Wachstumsfaktoren geeignet sind. Sie bestehen aus HA-Partikeln mit einer Größe von etwa 3 - 5 μm , welche mit Elektrolyten beschichtet sind. Die Beschichtung entspricht in etwa der Konzentration von Elektrolyten in humanem Blut und wird durch die Inkubation in einer Lösung, der modified simulated body fluid (mSBF) (Tab. 1), auf die MCM übertragen. Die Elektrolyte sind in der Lage Wachstumsfaktoren elektrostatisch zu binden und diese wieder räumlich und zeitlich kontrolliert abzugeben.

Ion	HCO_3^-	NaCl	KCl	MgSO_4	MgCl_2	NaHCO_3	HEPES	CaCl_2	KH_2PO_4
Konzentration [mM]	4,2	141,0	4,0	0,5	1,0	4,2	20,0	5,0	2,0

Tab. 1: Ionenzusammensetzung der mSBF. Die mSBF enthält Ionen in einer genau definierten Zusammensetzung und wird durch Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure (HEPES) gepuffert.

Je nach Anpassung der Elektrolytzusammensetzung der mSBF ändert sich das Bindungs- und Freisetzungsverhalten der gebundenen Wirkstoffe. So kann beispielsweise durch Veränderung der HCO_3^- Konzentration die Bindungseffizienz und Stabilität beeinflusst werden. Yu und Kollegen zeigten, dass eine geringer gewählte HCO_3^- Konzentration zu einer erhöhten Bindungseffizienz der Wirkstoffe führt (Yu et al., 2014). Außerdem kam es bei einer geringeren HCO_3^- Konzentration zu einer verminderten Ca^{2+} Freisetzung, welche repräsentativ für die Stabilität der MCM steht. Hierdurch wird eine gute Steuerbarkeit und Kontrolle über den zu applizierenden Wirkstoff erreicht (Yu et al., 2014).

Zudem ist die Morphologie der Beschichtung abhängig von der Ionenzusammensetzung und -konzentration der mSBF (Yu et al., 2014) (Abb. 1).

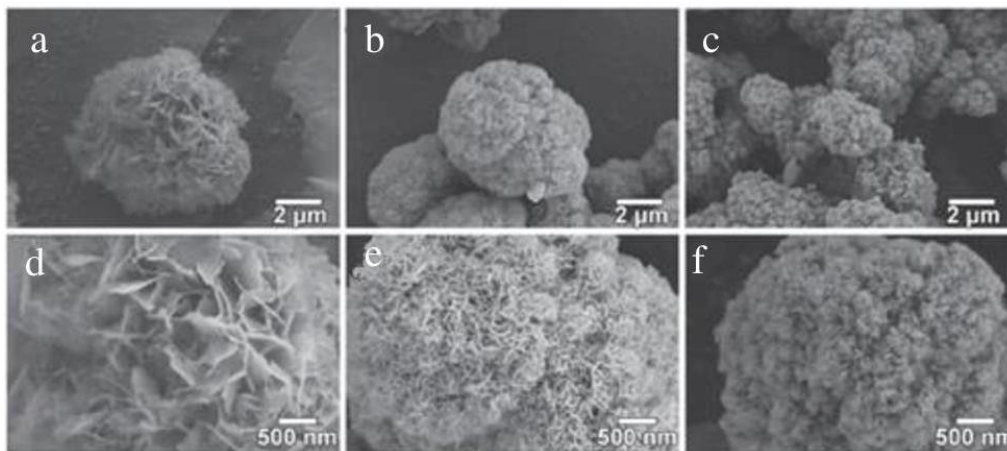


Abb. 1: Morphologie von MCMs mit unterschiedlichen Carbonatkonzentrationen. MCM unter geringer (a, b, c) bzw. hoher (d, e, f) Vergrößerung mit niedriger (4,2 mM; a, b), mittlerer (25 mM; c, d) und hoher (100mM; e, f) HCO_3^- Konzentration (Yu et al., 2014).

Darüber hinaus ist es möglich mehrere Wirkstoffe in verschiedenen Schichten auf MCM zu binden (Yu et al., 2014). In vitro zeigte sich hierbei ein individuell kontrollierbares Freisetzungsprofil für die Wirkstoffe BMP-2 und VEGF (Yu et al., 2014). MCM haben daher im Bereich der regenerativen Medizin ein großes Potential zur definierbaren Applikationsfähigkeit von Wachstumsfaktoren (Yu et al., 2014).

2.5 VEGF

VEGF gehört zu einer Gruppe von Zytokinen, welche für wichtige Schritte in der Vaskulogenese, Lymphangiogenese und in der physiologischen und pathologischen Angiogenese entscheidend sind. Die VEGF-Familie besteht aus den Faktoren VEGF-A, -B, -C, -D, dem Placenta Growth Factor (PlGF) sowie der viralen VEGF Homologe VEGF-E und Schlangengift-VEGF (VEGF-F) (Dvorak, 2002) (Ylä-Herttuala et al., 2007).

Der Hauptvertreter VEGF -A ist für den angiogenen Effekt verantwortlich, indem bei einem bereits bestehenden Gefäßbett neue Gefäße ausgebildet werden (Vempati et al., 2014).

2.5.1 Historie

Bereits Ende der 1970er Jahre haben Dvorak et al. im Rahmen der Tumorforschung an Meerschweinchen einen gefäßpermeabilitätssteigernden Faktor entdeckt, welchen sie zu Beginn vascular permeability factor (VPF) nannten. Um zu überprüfen, ob die Wirkung der Gefäßpermeabilitätssteigerung, wie zunächst vermutet, durch Histaminfreisetzung aus Mastzellen erfolge, wurden in verschiedenen Versuchen zusätzlich Antihistaminika verabreicht. Die Gefäßpermeabilitätssteigerung wurde hierdurch jedoch nicht verhindert, sodass eine unabhängige Wirkung nachgewiesen werden konnte. Die Verdachtshypothese, VPF wirke direkt auf das Gefäßendothel, wurde hierbei ebenfalls bestätigt (Dvorak et al., 1979).

1983 identifizierten Senger et al. jenen Mediator, welcher sowohl in Tumorzellen als auch in Tumor-Aszites von Mäusen, Meerschweinchen und Hamstern nachweisbar war. Der Nachweis der Gefäßpermeabilitätssteigerung, welche im Rahmen der Tumorerkrankung zu Aszites führt, erfolgte anhand der intravenösen Injektion eines kolloidalen Kohlenstoffs. Der Kohlenstoff lagerte sich in diesem Fall an gastrointestinale Oberflächen an, was die Theorie unterstützte, dass die Tumorerkrankung zur Ausschüttung von Mediatoren führen müsse, welche eine gefäßpermeabilitätssteigernde Wirkung aufweisen (Senger et al., 1983).

Sechs Jahre später gelang Ferrara et al. die Isolierung des gefäßsteigernden Mediators aus bovinen Hypophysenfollikelzellen. Aufgrund seiner damals nachgewiesenen Selektivität für Gefäßendothelzellen wurde der Faktor als „vascular endothelial growth factor“ bezeichnet (Ferrara & Henzel, 1989).

Nachfolgend gelangen Ferrara und Leung die Isolierung der Erbinformation für bovines VEGF164 sowie für humanes VEGF121, VEGF165 und VEGF189 (Leung et al., 1989).

Man fand zudem heraus, dass VEGF im menschlichen Körper nicht nur in der Tumorangiogenese eine wichtige Rolle spielt, sondern auch im Rahmen von Entzündungen und in der Wundheilung (Connolly et al., 1989).

Als therapeutische Option bei Tumorerkrankungen erforschte man nachfolgend den Nutzen von monoklonalen Antikörpern gegen VEGF. Die Suppression der Angiogenese führte zu einer Unterdrückung des Größenwachstums verschiedener Tumorentitäten (Kim et al., 1992).

2005 wurde in Deutschland erstmals Bevacizumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen VEGF, für die kombinierte Krebstherapie unter anderem für Kolon-, Mamma-, Nieren- und Bronchialkarzinomen zugelassen (Fachinformation Avastin®, 2019). Off-label werden VEGF-Antikörper außerdem für die feuchte Form der altersabhängigen Makuladegeneration angewandt (Messori, 2014).

2.5.2 Biosynthese und Struktur

Die Biosynthese und Struktur der VEGF-Familie wird repräsentativ durch VEGF-A beschrieben. VEGF-A hat eine Molekülmasse von ca. 34 - 45 kD und weist eine hochkonservierte Struktur auf, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden ist. Das dimere Glykoprotein besteht aus zwei antiparallel ausgerichteten Ketten und besitzt pro Molekül zwei Rezeptorbindungsstellen. Durch alternatives Splicen entstehen die verschiedenen Isoformen von VEGF, dessen Gen sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 befindet (Dvorak, 2002).

Die drei häufigsten Isoformen von VEGF-A in menschlichen Zellen bestehen aus Polypeptiden mit 189, 165 bzw. 121 Aminosäuren. Während die Isoform mit 189 Aminosäuren von allen acht Exons kodiert wird, werden die beiden kürzeren Isoformen von den ersten fünf und zusätzlich Exon acht kodiert. Der Isoform von VEGF-A mit 165 Aminosäuren, welche die führende Isoform darstellt, fehlen die Reste, die von Exon sechs kodiert werden. Im Vergleich dazu fehlen der Isoform mit 121 Aminosäuren die kodierten Reste der Exons sechs und sieben. Die Varianten weisen verschiedene physikalische Eigenschaften auf: VEGF-A 121 bindet kein Heparin, wohingegen die anderen Varianten VEGF-A 165 und 189 Heparin-bindend sind. Liegen die Isoformen frei in einer Lösung vor, weisen sie jedoch dieselbe biologische Aktivität auf (Dvorak, 2002) (Senger et al., 1990).

2.5.3 Funktion und Wirkung

Neue Blutgefäße bilden sich durch zwei miteinander verwandte, aber dennoch unterschiedliche Prozesse: Vaskulogenese und Angiogenese. Die Vaskulogenese ist die Bildung neuer Blutgefäße aus primitiven Hämangioblasten. Angiogenese bezieht sich dagegen auf die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits vorhandenen Gefäßen (Dvorak, 2000).

VEGF ist ein multifunktionales Zytokin welches, neben der Funktion als wichtiger Angiogenese induzierender Faktor in verschiedenen physiologischen Abläufen wie beispielsweise der Wund- und Knochenbruchheilung, eine Steigerung der Gefäßpermeabilität für Plasma und Plasmaproteine in vivo bewirkt (Dvorak, 2002) (Li et al., 2003) (Senger et al., 1983) (Street et al., 2000). Zudem ist VEGF essenziell für die physiologische embryonale Entwicklung der Vaskulogenese, was durch Knockout-Mäuse nachgewiesen wurde: Mäuse, denen homozygot das VEGF-Gen fehlte, starben noch während der Embryonalperiode (Carmeliet et al., 1996).

Im Rahmen des longitudinalen Knochenwachstums bewirkt VEGF die Invasion von Blutgefäßen; Eine Unterdrückung dieses Vorgangs führte am Mausmodell zu einer beeinträchtigt-

ten trabekulären Knochenbildung und einer mangelnden Knorpelresorption (Gerber et al., 1999). Somit ist VEGF ein wesentlicher Koordinator für die Chondrozytenfunktion, die Angiogenese, die Knochenbildung in der Wachstumsfuge und den Umbau der extrazellulären Matrix (Gerber et al., 1999). Auch im Rahmen des Tumorwachstums fungiert VEGF als wichtiger proangiogener Mediator: Es wurde gezeigt das von fast allen soliden Tumoren und tumorassoziierten Stroma als Reaktion auf Hypoxie VEGF sezerniert wird (Moreira et al., 2007) (Veikkola et al., 2000).

Seine Wirkung entfaltet VEGF vorrangig am Gefäßendothel. VEGF interagiert mit hoher Affinität mit zwei Tyrosinkinase-Rezeptoren, die selektiv auf dem Gefäßendothel exprimiert werden. Diese Wechselwirkung löst eine Kaskade aus, zu deren Schritten unter anderem eine erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität gehört, die zur Ablagerung einer proangiogenen extrazellulären Fibrinmatrix und zur Bildung von Mutter- / Tochter-Gefäßen führt (Dvorak, 2000). Ebenfalls werden Endothelzellen zum Teilen und Wandern angeregt, indem sich das Genexpressionsmuster verändert. Auch die Apoptose und Seneszenz unterliegt der VEGF Wirkung, indem das Zytokin Zellen vor ihnen schützt (Dvorak, 2002).

Hauptstimulus für eine Ausschüttung von VEGF ist die Hypoxie. Die Hochregulation des Hypoxie-induzierenden Faktors 1 α (HIF-1 α) in Tumorgewebe oder Osteoblasten bei niedriger Sauerstoffkonzentration führt zur Transkription angiogener Faktoren, darunter auch VEGF (Hu & Olsen, 2016). Ebenfalls können auf Gewebe einwirkende Schubspannungen oder genetische Entwicklungen innerhalb eines Tumorgewebes die Expression von VEGF induzieren (Vempati et al., 2014). Neben der Hypoxie sind jedoch viele weitere Faktoren für die Expression verantwortlich, wie z. B. verschiedene Wachstums- und Transkriptionsfaktoren, Hormone (beispielsweise Östrogen) und mechanische Stimuli (Hu & Olsen, 2016). Die so neu entstandenen Gefäße sorgen für eine erhöhte Perfusion und vermehrter Sauerstoffzufuhr des umliegenden Gewebes (Vempati et al., 2014).

Zu den VEGF-Rezeptoren (VEGFR) gehören VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 und Neuropilin (NRP-1) (Dvorak, 2002). Eine schematische Übersicht der möglichen Ligand-Rezeptor Verbindungen bietet Abbildung 2.

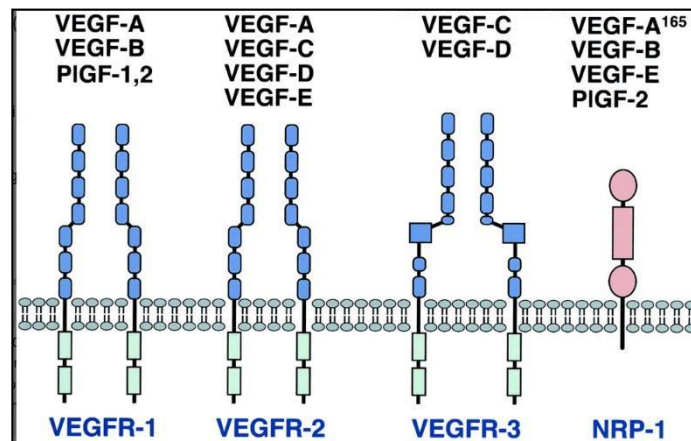


Abb. 2: Schematische Darstellung der VEGF-Rezeptoren und Liganden. VEGFR-1 und VEGFR-2 werden u. a. auf vaskulären Endothelzellen und VEGFR-3 auf lymphatischem Endothel im Erwachsenenalter, aber auch auf Tumorblutgefäßen und anderen Zelloberflächen exprimiert. NRP-1 wird auf vaskulärem Endothel, Neuronen und einigen Tumoren exprimiert (Dvorak, 2002).

Das Signal der Rezeptoren ist auf verschiedenen Ebenen streng reguliert: Die Liganden- und Rezeptorexpression, das Vorhandensein von Co-Rezeptoren und akzessorischen Proteinen (unter anderem Neuropiline, Proteoglykane und Integrine) sowie die Inaktivierung von Tyrosinphosphatasen zusammen steuern die Geschwindigkeit der zellulären Aufnahme, des Abbaus und des Recyclings von VEGF (Simons et al., 2016). Nach Bindung der verschiedenen VEGF Untergruppen an die jeweiligen Rezeptoren wird eine Kaskade induziert, welche zur Autophosphorylierung der Rezeptorkinase führt. Die Kinase aktiviert nun weitere Proteine wie z. B. die Phospholipase C γ , Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-K), das GTPase-aktivierende Protein (GAP) und die Mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Dvorak, 2002).

VEGFR-1 wird in verschiedenen Zelltypen wie z. B. Monozyten, Makrophagen, Osteoblasten, glatten Gefäßmuskelzellen und neuronalen Zellen exprimiert und kann VEGF-A, -B und PIGF binden (Liu et al., 2012) (Simons et al., 2016). Es existieren VEGFR-1 Homodimere oder Heterodimere von VEGFR-1 mit VEGFR-2. Eine Ligandenbindung an VEGFR-1 / VEGFR-2 Heterodimere führt zu einer negativen Rückkopplung der VEGFR-2 Homodimeraktivität. Eine Blockierung des VEGFR-1 in Mäuseembryonen führte aufgrund einer übermäßigen Endothelzellproliferation und unorganisierten Gefäßen bereits nach 9 Tagen zum Tod (Fong et al., 1995). Dies beruht auf der hierdurch vermehrten Bindung von VEGF-A an VEGFR-2 und der daraus resultierenden Endothelzellproliferation (Cudmore et al., 2012) (Fong et al., 1995) (Simons et al., 2016).

VEGFR-2 gilt als wichtigster Vertreter der VEGF-Rezeptoren und führt durch verschiedene intrazelluläre Signalwege zu einer Zellmigration und Proliferation (Simons et al., 2016). Auch

die Zellform, Gefäßpermeabilität und das Überleben der Zelle werden durch VEGFR-2 induzierte Signalwege beeinflusst. Eine durch VEGFR-2 vermittelte Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase führt zur Bildung von Stickstoffmonoxid in Muskelzellen, was eine Vasodilatation bewirkt (Simons et al., 2016). Die Untersuchung von Mäuseembryonen, welchen das Gen für VEGFR-2 fehlte, starben bereits zwischen dem 8. und 9. Embryonaltag infolge eines frühen Defekts in der Entwicklung von hämatopoetischen- und Endothelzellen. Nach 7,5 Tagen fehlten die Dottersack-Blutinseln und es konnten zu keinem Zeitpunkt organisierte Blutgefäße weder im Embryo noch im Dottersack beobachtet werden (Shalaby et al., 1995).

VEGFR-3 wird sowohl in kapillärem und venösem Endothel als auch in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert (Simons et al., 2016). Makrophagen, Osteoblasten und während der frühen Entwicklung auch Blut- und lymphatische Endothelzellen exprimieren ebenfalls VEGFR-3 (Simons et al., 2016). Durch die Interaktion und der damit verbundenen Aktivierung einer Signalkaskade von VEGF-C und -D mit VEGFR-3 erfolgt eine Beteiligung an der Lymphangiogenese sowie der Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems (Dumont et al., 1998) (Dvorak, 2002). Im Rahmen einer Studie erfolgte die gezielte Inaktivierung des für VEGFR-3 kodierenden Gens bei frühen Mäuseembryonen was zu einer fehlerhaften Blutgefäßentwicklung führte (Dumont et al., 1998). Eine Vaskulogenese und Angiogenese traten zwar auf, jedoch organisierten sich große Gefäße abnormal mit defekten Lumen, was zu einer Ansammlung von Flüssigkeit in der Perikardhöhle und einem Herz-Kreislaufversagen am Embryonaltag neun bis zehn führte. Somit spielt VEGFR-3 eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung des embryonalen Herz-Kreislauf-Systems vor dem Entstehen der Lymphgefäße (Dumont et al., 1998) (Simons et al., 2016).

Das Blockieren der VEGFR-3-Signalübertragung mit monoklonalen Antikörpern führte im Mausmodell zu einer verminderten Gefäßsprossung und -dichte sowie einer geringeren Gefäßverzweigung und Endothelzellproliferation (Tammela et al., 2008).

Im Rahmen einer Fraktur ist das interfragmentäre Hämatom von entscheidender Bedeutung: So wiesen Street und Kollegen eine $15 \times$ erhöhte VEGF-Konzentration im Frakturhämatom im Vergleich zum Plasma desselben Patienten nach. Generell waren die Plasmaspiegel von VEGF aller Patienten mit Fraktur im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erhöht. Die im Hämatom herrschende Hypoxie induzierte hierbei die Transkription von VEGF in Knochen- und Entzündungszellen (Street et al., 2000).

Im weiteren Verlauf der Knochenheilung spielt VEGF eine wichtige Rolle für die Rekrutierung von Entzündungszellen. Unter anderem in einer Studie von Ancelin et al. konnte gezeigt

werden, dass VEGF die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten und eine erhöhte Permeabilität des Knochenmarks zur Gewährleistung des Austritts verschiedener Entzündungszellen bewirkt (Ancelin et al., 2004) (Lim et al., 2014). Kurz nach der Knochenverletzung helfen sie dabei Knochenreste und mikrobielle Krankheitserreger durch Phagozytose zu entfernen (Hu & Olsen, 2016).

Die im Anschluss an die neutrophilen Granulozyten rekrutierten Makrophagen führen zur Ausschüttung verschiedener Zytokine wie beispielsweise TNF- α , IL-1 α und IL-1 β . Diese Zytokine aktivieren Endothelzellen und fördern die Revaskularisation an den Verletzungsstellen. Sie sind auch wirksame Induktoren der VEGF-Expression in entzündlichen und osteoblastischen Zellen. VEGF ist ein chemotaktischer Faktor für Makrophagen. Da Makrophagen angiogene Zytokine freisetzen, kann folglich VEGF die Angiogenese sowohl indirekt über Makrophagen als auch direkt über Endothelzellen stimulieren (Hu & Olsen, 2016).

Darüber hinaus ist VEGF in der Lage die Differenzierung von Stammzellen aus umliegenden Muskeln, Knochenmark und Periost zu Osteoblasten und Chondrozyten zu regulieren (Hu & Olsen, 2016).

Während der Knochenheilung wird VEGF durch Osteoblastenvorläuferzellen und in hypertrophen Chondrozyten exprimiert, was zur Einwanderung von Osteoblasten, Blutgefäßen, Osteoklasten und hämatopoetischen Stammzellen in das Ossifikationszentrum führt. VEGF stimuliert nicht nur die Skelettvaskularisation, sondern spielt auch eine wesentliche Rolle für das Überleben von epiphysären Chondrozyten. In den späten Stadien der chondralen Ossifikation vermehren sich die Chondrozyten nicht mehr, sondern hypertrophieren und synthetisieren Kollagen-Typ X sowie Osterix, ein starker Induktor der VEGF-Expression (Tang et al., 2012). VEGF stimuliert die Gefäßinvasion und die Rekrutierung von Chondroblasten, die die hypertrophen Chondrozyten abbauen (Hu & Olsen, 2016). In einem murinen Femurfrakturmodell verzögerte die Hemmung des VEGF-Signals den Knorpelumsatz, störte die Umwandlung von weichem Knorpelkallus in einen harten Knochenkallus und beeinträchtigte insgesamt die Frakturheilung (Street et al., 2002).

Die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten wird überwiegend durch RANKL und den Makrophagenkolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF) reguliert (Hu & Olsen, 2016). Während der Knochenbildung bindet VEGF, das von hypertrophen Chondrozyten stammt, an Makrophagen an VEGFR-1 und fördert somit die Differenzierung der Makrophagen zu Osteoklasten sowie deren Migration. Über Bindung an VEGFR-2 in Osteoklasten wird deren Überleben und Knochenresorptionsaktivität gefördert. So kann die Verringerung von VEGF beim Knochenumbau die angiogenen und osteogenen Signale indirekt durch die Hemmung

der Knochenresorption verringern (Hu & Olsen, 2016). Daher ist während der chondralen Ossifikation VEGF aus hypertrophen Chondrozyten entscheidend für die Invasion von Osteoklasten in die knorpelige Matrice. Zusammengefasst beruht somit die intramembranöse Knochenbildung auf der Kopplung von Angiogenese und Osteogenese. VEGF spielt hierbei eine wesentliche Rolle, da sowohl die Gefäß- als auch die Skelettmorphogenese VEGF-abhängig ist (Hu & Olsen, 2016).

Die erhöhte Vaskulogenese und Angiogenese stellen knochenbildende Vorläufer sowie die für die Mineralisierung notwendigen Nährstoffe, Sauerstoff und Mineralien bereit. Darüber hinaus fördern osteogene Faktoren wie z. B. BMP-2, die aus Blutgefäßen freigesetzt werden, die Differenzierung und Mineralisierung von Osteoblasten. Reifende Osteoblasten wiederum erzeugen angiogene Faktoren wie PDGF und VEGF, um die Angiogenese weiter zu unterstützen (Hu & Olsen, 2016). Hierbei wirkt das von Osteoblasten exprimierte VEGF auf benachbarte Endothelzellen über die Bindung an VEGF-Rezeptoren auf parakrine Weise, um die Endothelmigration, -proliferation und Gefäßpermeabilität zu regulieren. Zusätzlich zu sekretiertem VEGF erzeugen Zellen auch intrazelluläres VEGF, welches an der Transkriptionsregulation und dem Zellüberleben beteiligt ist (Hu & Olsen, 2016).

Mäuse mit einer Deletion von VEGFR-1 oder VEGFR-2 in Osteoblasten wiesen zwei Wochen nach der Geburt eine verringerte Knochendichte auf. Darüber hinaus wurde im Knochenmark dieser Mäuse eine verringerte Anzahl von Osteoprogenitorzellen beobachtet, was darauf hinweist, dass sowohl VEGFR-1 als auch VEGFR-2 in Osteoblasten für die postnatale Knochenbildung wichtig sind (Liu et al., 2012).

Die vielfältigen und untereinander verknüpften Wirkungsweisen und Funktionen von VEGF sind für die Knochenheilung und -neubildung vor allem in der frühen Phase von essenzieller Bedeutung, weshalb wir uns im Rahmen dieser Studie für VEGF als Wirkstoff zur Untersuchung der atrophen Pseudarthrose entschieden.

2.6 Zielsetzung

Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, zu untersuchen, ob VEGF beschichtete MCM die Knochenheilung atropher Pseudarthrosen stimuliert.

Die entsprechenden Ergebnisse sollten anhand tierexperimenteller Versuche an einem bewährten Mausmodell erarbeitet werden.

2.7 Fragestellung

Die durchgeführten tierexperimentellen Studien sollten die Frage beantworten, inwieweit ein Unterschied in der Heilungstendenz atropher Pseudarthrosen, die durch VEGF-beschichtete MCM behandelt wurden, gegenüber unbeschichteten und unbehandelten atrophen Pseudarthrosen besteht.

Die Nullhypothese lautet:

„Die Behandlung der atrophen Pseudarthrose mit VEGF-beschichteten MCM führt an der Maus zu keiner verbesserten Knochenheilung im Vergleich zur Behandlung mit unbeschichteten MCM und unbehandelten atrophen Pseudarthrosen (Kontrollen).“

Die Knochenheilung wurde nach jeweils 14 und 70 Tagen am postmortalen Knochenpräparat mit sowohl radiologischen, biomechanischen, histologischen als auch proteinbiochemischen Methoden untersucht.

3. Materialien & Methoden

3.1 Intervention

3.1.1 Versuchsprotokoll

Die Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde Dezernat 5, Saarpfalz-Kreis, 66424 Homburg (Saar) genehmigt und am Institut für Klinisch - Experimentelle Chirurgie an der Universität des Saarlandes in Homburg (Saar) nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Für die Versuchsdurchführung wurden insgesamt 57 Mäuse verwendet, welche in sechs verschiedene Gruppen aufgeteilt worden sind (Tab. 2). 19 Tiere erhielten VEGF-beschichtete MCM (MCM+VEGF). 19 Mäuse erhielten unbeschichtete MCM (MCM) und weitere 19 Mäuse erhielten keinerlei Therapie (Kontrollgruppe, NONE). Die Auswertung erfolgte nach 14 bzw. 70 Tagen mittels radiologischer Analysen wie Röntgenaufnahmen und Mikrocomputertomographie (μ CT) sowie biomechanischer und histologischer Verfahren (n = 8 je Gruppe). Darüber hinaus wurde zur Untersuchung der Proteinexpression ein Western Blot (WB)-Verfahren nach 14-tägiger Standzeit durchgeführt (n = 3 je Gruppe).

	14 Tage		70 Tage
MCM+VEGF	μ CT, Biomechanik, Histologie n = 8	WB n = 3	μ CT, Biomechanik, Histologie n = 8
MCM	μ CT, Biomechanik, Histologie n = 8	WB n = 3	μ CT, Biomechanik, Histologie n = 8
NONE	μ CT, Biomechanik, Histologie n = 8	WB n = 3	μ CT, Biomechanik, Histologie n = 8

Tab. 2: Versuchsprotokoll. In drei Gruppen wurde das Knochenpräparat jeweils nach 14 und 70 Tagen untersucht. Die Auswertmethoden beinhalteten μ CT, Biomechanik, Histologie und WB. Für die mikrocomputertomographische, biomechanische und histologische Untersuchung konnten dieselben Proben verwendet werden.

3.1.2 Tiermodell

Als Tiermodell dienten adulte Mäuse der Spezies CD-1 mit einem Körpergewicht von 30 - 40 g und einem Alter von 9 - 14 Wochen. Die Haltung erfolgte im Institut für Klinisch - Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, Homburg (Saar) bei 22 - 24 °C, relativer Luftfeuchtigkeit von 60 % und 12 h Tag- / Nachtrhythmus. Trinkwasser sowie Stan-

darddiätfutter in Pelletform (Altromin 1320, Altromin, Lage, Deutschland) wurden ad libitum bereitgestellt. Die tierexperimentelle Untersuchung der Knochenheilung erfolgte nach einem standardisierten Pseudarthrosemodell (Garcia et al., 2008b).

3.1.3 Präparation der MCM

Die MCM wurden von Kollegen des Department of Biomedical Engineering der Universität von Wisconsin-Madison (Madison, USA) im Rahmen einer Kooperationsarbeit zur Verfügung gestellt. Hierfür wurden 100 mg HA-Partikel (Biotal LTD, Derbyshire, England) mit einem Durchmesser von 3 - 5 μm insgesamt 7 Tage lang bei 37 °C in 50 ml mSBF gemäß Vorarbeiten inkubiert (Orth et al., 2017) (Yu et al., 2014). Die mSBF wurde hergestellt, indem die Reagenzien gemäß Angaben der Tab. 1 in entionisiertes Wasser gegeben wurden. Diese Zusammensetzung wurde bereits in früheren Studien verwendet (Orth et al., 2017) (Yu et al., 2014). Aufgrund des langen Beobachtungszeitraums von 70 Tagen verwendeten wir in der vorliegenden Studie MCM mit einer niedrigen Hydrogencarbonatkonzentration von 4,2 mM. Basierend auf Ergebnissen vorangegangener Studien sind diese Art von MCM aufgrund ihrer höheren Stabilität und ihrer prolongierten Freisetzungskinetik für längere Beobachtungszeiträume besser geeignet als MCM mit höherer Hydrogencarbonatkonzentration (Orth et al., 2017). Die mSBF wurde während des Herstellungsprozesses täglich gewechselt, um konstante Ionenkonzentrationen für das Wachstum von Mineralbeschichtungen auf den HA-Partikeln aufrechtzuerhalten. Nach der Inkubationszeit wurden die beschichteten Mikropartikel mit entionisiertem Wasser gespült und lyophilisiert. Die Oberflächenmorphologie von MCM wurde unter Verwendung eines LEO 1530-Feldemissions-Scanning-Mikroskops (Zeiss, Jena, Deutschland) nach Beschichtung mit Gold untersucht.

3.1.4 Bindungs- und Freisetzungskinetik von MCM für VEGF

Zur Bestimmung des Bindungs- und Freisetzungsprofils von MCM wurde radioaktiv markiertes VEGF (^{125}I -markiertes VEGF, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet (Yu et al., 2014). 5 mg MCM wurden in einer Lösung, bestehend aus 1 ml Phosphatpufferkochsalzlösung (PBS) und 1,0 μg / ml VEGF (1 % ^{125}I -VEGF, PerkinElmer) 4 h lang bei 37 °C unter Rotation inkubiert. Die mit VEGF beladenen MCM wurden dann 2 Minuten (min) lang zentrifugiert und mit 1 ml PBS ausgewaschen. Die Radioaktivität im Überstand und im gewaschenen PBS wurde mit einem Packard Cobra II-Gammazähler (PerkinElmer) gemessen,

um die Menge an VEGF in diesen Lösungen zu bestimmen. Die Bindungseffizienz der Mikropartikel wurde aus der Änderung der Proteinkonzentrationen vor und nach der Bindung berechnet.

Zur Bestimmung der VEGF-Freisetzung wurden VEGF-beladene MCM der Bindungsassays in 1 ml mSBF (pH 7,4) bei 37 °C inkubiert und die freigesetzte Proteinmenge durch Messung der Radioaktivität des Freisetzungsmediums mit dem Gammazähler (PerkinElmer) zu vordefinierten Zeitpunkten bestimmt.

Für die *in vivo* Experimente wurden MCM mit rekombinantem humanem VEGF (R & D Systems, Wiesbaden, Deutschland) beladen, indem 2 mg MCM in 2 ml PBS, welches 21,7 µg VEGF enthielt, 4 h lang bei 37 °C inkubiert wurde. Die MCM wurden 3 min zentrifugiert und dann mit PBS ausgewaschen. Aus der zuvor *in vitro* berechneten Bindungseffizienz ergab sich eine Konzentration von VEGF auf MCM für die Experimente *in vivo* von 5 µg / mg MCM. Diese Dosierung wurde auf der Grundlage einer umfangreichen Literaturrecherche zur Wirkung von VEGF auf die Knochenheilung bei Nagetieren gewählt (Amirian et al., 2015) (Ogilvie et al., 2012) (Street et al., 2002).

3.1.5 Operation

Die Operation der Versuchstiere erfolgte im Operationssaal des Instituts für Klinisch - Experimentelle Chirurgie, Homburg (Saar).

Die Tiere wurden mit einer intraperitonealen Injektion von 0,1 ml Narkose-Mischung pro 10 g Körpergewicht narkotisiert. Die Narkosemischung bestand aus 1 ml Ketamin (100 mg / ml; Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) und 0,75 ml Xylazin (20 mg / ml; Rompun; Bayer, Leverkusen, Deutschland) aufgefüllt mit 8,25 ml NaCl 0,9 %.

Die Analgesie erfolgte durch eine subkutane Injektion einer Lösung, welche aus 0,1 ml Carprofen (Rimadyl® Injektionslösung 50 mg / ml, Pfizer, New York, USA) und 9,9 ml NaCl 0,9 % bestand. Es wurden sowohl am Operationstag selbst sowie am ersten postoperativen Tag pro 10 g Körpergewicht 0,1 ml Analgesielösung appliziert.

Nach Narkotisierung wurde das Versuchstier zunächst am rechten Knie und am rechten lateralen Oberschenkel rasiert und mit Softasept® (Softasept® N, B. Braun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert (Abb. 4).

Es erfolgte ein ca. 4 mm großer Hautschnitt sowie ein Schnitt medial des Ligamentum patellae um die Patella nach lateral zu luxieren, sodass das distale Femur exponiert wurde (Abb. 5 und Abb. 6).

Im Anschluss wurde der Markraum in der Fossa intercondylaris mit einem Mikrobohrer ($\varnothing = 0,5$ mm, mit 8000 Umdrehungen (U) / min) eröffnet (Abb. 7).

Eine Kanüle ($\varnothing = 0,45$ mm) wurde in den Markraum eingeführt um die Länge des Femurs abzumessen und auf eine Kanüle mit einem \varnothing von 0,55 mm zu übertragen. An diesem Punkt wurde die dickere Kanüle über eine Strecke von ca. 0,5 cm abgeflacht (Abb. 8 und Abb. 9).

Nachdem die präparierte Kanüle in das Femur bis zum proximalen Femurende eingeführt wurde, wurde ein Röntgenbild angefertigt, um den korrekten Sitz des Pins zu kontrollieren. Anschließend wurde der Pin auf Höhe der Gelenkfläche gekürzt und die Patella reponiert (Abb. 10 und Abb. 11).

Sowohl das Ligamentum patellae als auch die Haut wurden mit 5-0 Prolene® Naht (Ethicon, Somerville, New Jersey, USA) verschlossen (Abb. 12 und Abb. 13).

In einem zweiten Operationsschritt wurde das Versuchstier in Seitenlage umgelagert und der rechte Oberschenkel lateral über einen Hautschnitt von ca. 5 mm eröffnet (Abb. 14).

Mit einer vorsichtigen Stichinzision erfolgte die Eröffnung des muskulären, periostären Weichteilmantels. Mittels stumpfer Präparation wurde das Femur lateral freigelegt, mithilfe einer Klemme fixiert und anschließend das Periost reseziert (Abb. 15 und Abb. 16).

Die folgenden Operationsschritte wurden unter zehnfacher mikroskopischer Vergrößerung durchgeführt.

In das Femur wurde zunächst mit dem Mikrobohrer ($\varnothing = 0,5$ mm mit 8000 U / min) etwa mittig an der Diaphyse, lateral des Pins und medial der lateralen Kortikalis ein Loch gebohrt (Abb. 17). Eine weitere Kanüle ($\varnothing = 0,45$ mm) wurde präpariert, indem die Spitze und der Aufsatz gekürzt und die Enden zu einem U-förmigen Clip gebogen wurden.

Dieser Clip wurde in das zuvor gebohrte Loch eingeführt (Abb. 18). Anschließend erfolgte die zweite Bohrung anhand der Cliplänge, sodass der Clip ventro-dorsal implantiert werden konnte (Abb. 19). Hiernach wurden die Clip-Enden angebogen um eine sekundäre Dislokation des Clips aus dem Knochen während der Studienzeit zu verhindern (Abb. 20).

Der Knochendefekt wurde zwischen den Schenkeln des Clips mittels Fräskopf ($\varnothing = 1,8$ mm) zirkulär um das Femur herum erzeugt. Kleinere Überstände wurden mit einem zweiten Fräskopf ($\varnothing = 0,25$ mm) entfernt, um die Defektgröße von 1,8 mm allseits zu garantieren. Es erfolgte erneut eine Röntgenkontrolle der Implantatlage sowie des ossären Defekts (Abb. 21 und Abb. 22).

Die Wunde wurde abschließend mit NaCl 0,9 % gespült und mit Tupfern und Kompressen getrocknet.

Als nächster Schritt wurden in den Frakturspalt, je nach Gruppe, VEGF-beschichtete MCM oder unbeschichtete MCM mit einer Pipette appliziert (Abb. 23 und Abb. 24). In der Gruppe NONE erfolgte keine Applikation. Die Wunde wurde mit 5-0 Prolene®-Nähten verschlossen (Abb. 25 und Abb. 26).

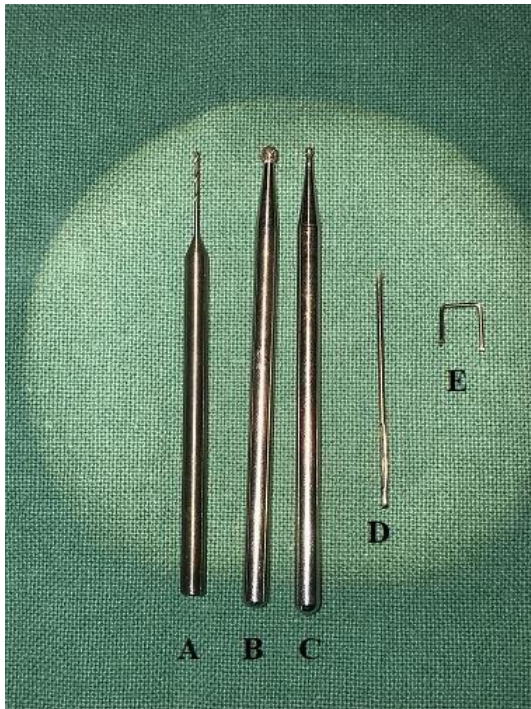


Abb. 3: Operationsinstrumente: Mit dem Mikrobohrer (A) wurden sowohl die Löcher für die abgeflachte Kanüle (Pin; D) als auch für den U-förmigen Clip (E) gebohrt. Die Fräsköpfe B ($\varnothing = 1,8 \text{ mm}$) und C ($\varnothing = 0,25 \text{ mm}$) dienen der Präparation des Defektspalts (eigene Aufnahme, 2017).



Abb. 4: Ventrale Ansicht des fixierten, rechten Beins des Versuchstiers. Das Operationsgebiet wurde zuvor rasiert und mit Softasept® (B. Braun) desinfiziert (eigene Aufnahme, 2017).



Abb. 5: Eröffnung durch Hautinzision. Sicht auf das Ligamentum patellae (eigene Aufnahme, 2017).



Abb. 6: Luxation der Patella nach lateral nach Schnitt medial des Ligamentum patellae (eigene Aufnahme, 2017).



Abb. 7: Markraumeröffnung innerhalb der Fossa intercondylaris mit dem Mikrobohrer (eigene Aufnahme, 2017).



Abb. 8: Abmessung der Markraumlänge anhand einer Kanüle ($\varnothing = 0,45$ mm) (eigene Aufnahme, 2017).



Abb. 9: Einführen der abgeflachten Kaniüle (Pin; $\varnothing = 0,55\text{mm}$) (eigene Aufnahme, 2017).



Abb. 10: Kürzen des Pins am zuvor markierten Bereich (eigene Aufnahme, 2017).



Abb. 11: Sicht von ventral auf die Fossa intercondylaris mit eingebrachtem und gekürztem Pin (eigene Aufnahme, 2017).



Abb. 12: Reposition der Patella sowie Refixation des Kniegelenks mit 5-0 Prolene® (Ethicon) (eigene Aufnahme, 2017).



Abb. 13: Hautnaht mit 5-0 Prolene® (Ethicon) (eigene Aufnahme, 2017).



Abb. 14: Seitliche Lagerung des Versuchstiers mit Eröffnung des lateralen Zugangsweges (eigene Aufnahme, 2017).



Abb. 15: Stumpfe Präparation des Femurs (eigene Aufnahme, 2017).



Abb. 16: Fixation des Femurs mithilfe eines Klemmchens (eigene Aufnahme, 2017).

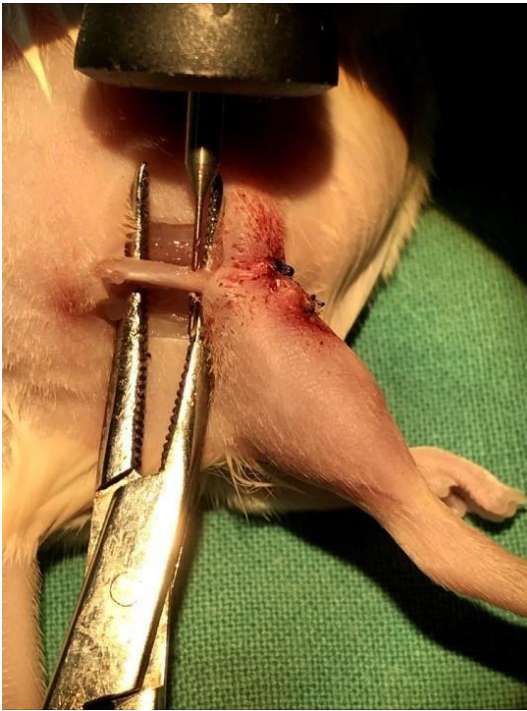


Abb. 17: Perforation des Femurs zur späteren Clip-Implantation (eigene Aufnahme, 2017).



Abb. 18: Einbringen des vorgefertigten Clips und Abmessung der Distanz zur Bohrung des zweiten Lochs (eigene Aufnahme, 2017).



Abb. 19: Bohrung des zweiten Lochs (eigene Aufnahme, 2017).



Abb. 20: Einbringen des Clips sowie Anbiegen der dorsalen Enden zur Stabilisierung (eigene Aufnahme, 2017).

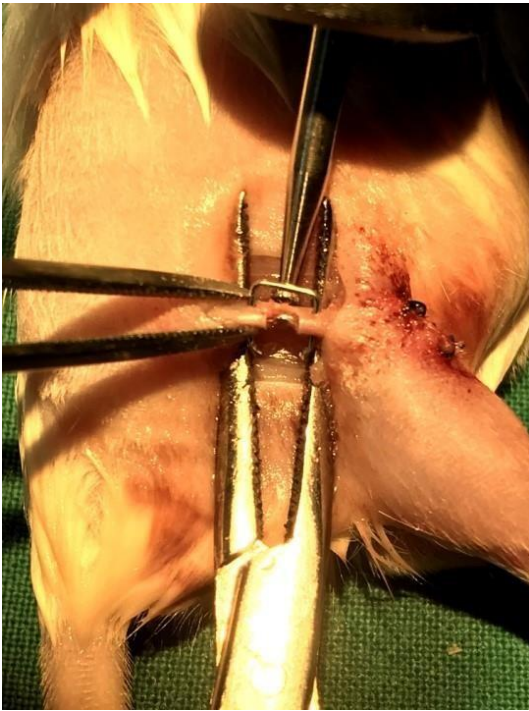


Abb. 21: Osteotomie des zirkulären Knochen-defekts mittels Fräskopf (eigene Aufnahme, 2017).

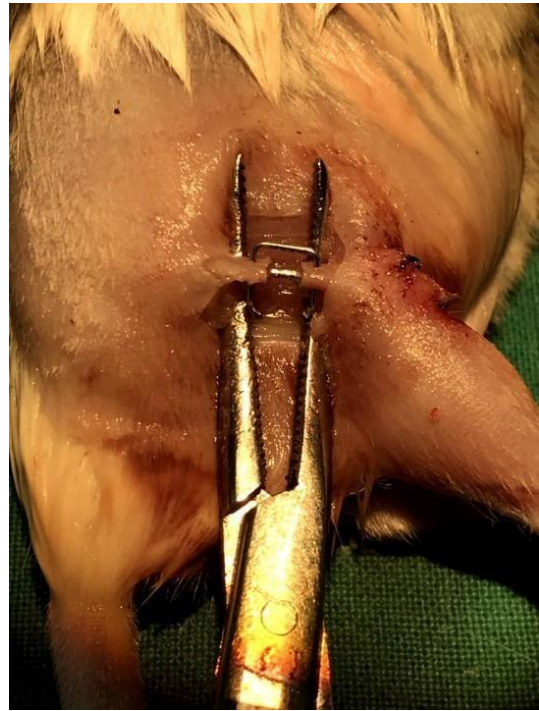


Abb. 22: Induzierter Defektspalt von 1,8 mm Länge (eigene Aufnahme, 2017).

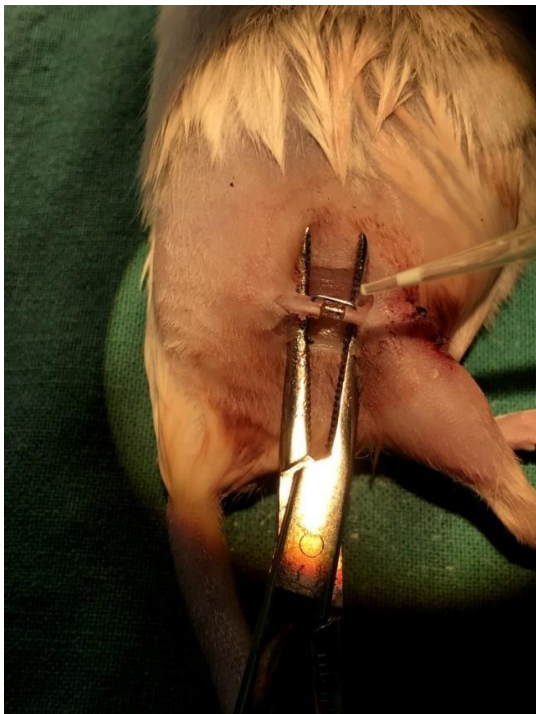


Abb. 23: Applikation VEGF-beschichteter MCM bzw. unbeschichteter MCM. Dieser Schritt entfällt in der Gruppe NONE (eigene Aufnahme, 2017).



Abb. 24: Applizierte MCM im Frakturspalt. Je nach Gruppe mit oder ohne VEGF-Beschichtung (eigene Aufnahme, 2017).



Abb. 25: Vorsichtiger Weichteilverschluss mit 5-0 Prolene® (Ethicon) (eigene Aufnahme, 2017).



Abb. 26: Hautnaht mit 5-0 Prolene® (Ethicon) (eigene Aufnahme, 2017).

3.1.6 Tötung der Tiere

Die Versuchstiere wurden 14 oder 70 Tage postoperativ durch eine intraperitoneale Injektion mit einer Überdosis des Narkosegemisches getötet.

3.1.7 Knochenentnahme

Unverzüglich nach Tötung der Tiere erfolgte die Entnahme des Knochens. Hierzu wurde das Femur freigelegt und im Hüftgelenk luxiert. Das distale Femurende wurde im Gelenkbereich osteotomiert, sodass der Pin, ohne den Kallusbereich zu beschädigen, entnommen werden konnte. Die dorsalen Enden des Clips wurden gekürzt, um den Clip durch leichten Zug nach ventral entfernen zu können.

3.2 Auswertungskriterien

3.2.1 Radiologie

3.2.1.1 Röntgen

Die Röntgenaufnahmen erfolgten im Institut der Klinisch - Experimentellen Chirurgie, Homburg (Saar). Vor Tötung der Tiere und Entnahme des Knochens wurde in Narkose ein Röntgenbild in Seitenlage mit dem Faxitron®-Röntgengerät (MX-20 Cabinet X-ray System, Faxitron X-ray Cooperation, Wheeling, USA) des rechten Femurs angefertigt. Die Belichtungszeit betrug 10 s bei einer Stromstärke von 10 A und 18 kV. Die Aufnahmen wurden mit einer installierten Kamera digitalisiert und mit einer Auflösung von 10 lp / mm bis 50 lp / mm gespeichert.

Es wurden die korrekte Implantatlage des Pin-Clip Modells im Femur, die Femurstellung sowie die knöcherne Durchbauung des Defektspalts analysiert.

3.2.1.2 Mikrocomputertomographie (μ CT)

Die mikrocomputertomographische Auswertung des Knochenpräparats erfolgte ebenfalls im Institut der Klinisch - Experimentellen Chirurgie, Homburg (Saar).

Die Femurpräparate wurden nach der Entnahme zur Aufbewahrung kryokonserviert. Für die Untersuchung mittels μ CT wurden die Proben aufgetaut und anschließend in 4 % gepuffertem Formalin für die nachfolgenden Untersuchungen fixiert.

Es wurde das μ CT Skyscan 1172 der Marke Bruker (Bruker, Billerica, USA) zur Analyse verwendet. Die Aufnahmeeinstellungen wurden gemäß vorangegangener Studien gewählt (Orth et al., 2017): Die Fokusgröße betrug 5 μ m, mit einem Kathodenstrom von 201 μ A. Die Beschleunigungsspannung betrug 50 kV. Die Knochenproben wurden jeweils senkrecht zur Röntgenstrahlachse platziert und rotierten während den Aufnahmen zwischen der statischen Röntgenquelle und dem Detektor. Nach Platzierung der Probe wurde eine Übersichtsaufnahme angefertigt, um den Defektspalt darzustellen und die korrekte Lage zu bestimmen. Die Bilder wurden mit einer Ortsauflösung von 8,9 μ m in 3D-Arrays gespeichert.

Nach Bildrekonstruktion mithilfe der NRecon-Reconstruction Software der Firma Bruker wurde die Auswertung der μ CT-Bilder anhand der Software CTAnalyzer (Bruker) erarbeitet. Beurteilt wurde für jede Probe:

- Der Anteil Knochenvolumen am Gewebevolumen (BV / TV; [%])
- Die durchschnittliche Knochenmineraldichte für mineralisierten Knochen (bone mineral density, BMD; [g / cm³])

Die zu untersuchende Region of Interest (ROI), die neuartig gebildeten Knochen umfasst, wurde durch alle Schichten exakt bestimmt und manuell konturiert, um vorbestehendes kortikales Knochengewebe sowie die verwendeten MCM-Partikel auszuschließen. Zur Unterscheidung von MCM und Weichteilgewebe wurde die ROI mit dem Schwellenwertverfahren der Software CTanalyzer (Bruker) verarbeitet.

Die verschiedenen Grauwerte wurden anhand von Grenzwerten im Histogramm definiert, sodass eine Unterscheidung zwischen mineralisiertem Knochen und nicht-knöchernen Strukturen erfolgen konnte. Die Kalibrierung erfolgte im Vorfeld anhand von Calciumhydroxylapatit (CaHA)-Phantomstäben mit bekannter BMD gemäß Herstellerangaben.

Eine BMD über 0,41 g / cm³ mit Grauwerten zwischen 68 bis 255 wurde als mineralisierter Knochen definiert. Die BMD wurde unter Verwendung der Voxel innerhalb der oben genannten Schwellenwerte berechnet. Der mittlere Grauwert der MCM betrug 37,8 (\pm 0,02) und wurde somit aus den Berechnungen ausgeschlossen.

3.2.2 Biomechanik

Die Biegesteifigkeit der osteotomierten Knochenpräparate wurde anhand einer 3-Punkt-Biegevorrichtung gemessen (Zwick / Roell, Ulm, Deutschland), welches sich im Institut der Klinisch - Experimentellen Chirurgie, Homburg (Saar) befindet. Hierfür wurde das entnommene Femur auf den beiden äußeren Auflagen, die standardisiert einen Abstand von 6 mm aufwiesen, mit der ventralen Seite nach oben positioniert, mit einem Prüfstempel mittig belastet und hieraus die Biegesteifigkeit berechnet. Die Berechnung der Biegesteifigkeit [N / mm] erfolgte bei allmählich ansteigender Biegekraft von 1 mm / min anhand des linearen Anteils des resultierenden Kraft-Weg-Diagramms (Garcia et al., 2008). Da es sich bei diesem Verfahren um einen nicht-destruktiven Ansatz handelt, war es möglich am selben Präparat die weiteren radiologischen und histomorphometrischen Untersuchungen durchzuführen. Hierdurch konnte die benötigte Anzahl an Versuchstieren reduziert werden.

3.2.3 Histomorphometrie

Die histologische Bearbeitung fand im Institut der Klinisch - Experimentellen Chirurgie der Universität des Saarlandes, Homburg (Saar) statt. Nach radiologischer und biomechanischer Untersuchung wurden die Knochenpräparate für 24 h in 4 % gepuffertem Formalin fixiert und anschließend durch 10 % Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) für 3 Wochen bei 4 °C entkalkt. Die Entwässerung erfolgte in aufsteigenden Alkoholkonzentrationen, indem jedes Präparat jeweils 1 h in 70 %, 80 %, 90 % sowie viermal 1 h in 100 % Alkohol gelagert wurde. Anschließend erfolgte eine Behandlung der Präparate dreimalig für je 1 h mit Xylol, welches die Durchgängigkeit des Gewebes für Paraffin erhöht. Im Folgenden wurden die Proben 4 × für 1 h in heißem Paraffin eingebettet.

Nach Abkühlung und Erstarren des Paraffinblocks wurden die Proben in 3 µm dünne Schnitte in sagittaler und longitudinaler Schnittführung geschnitten und nach der Safranin-O / Fast-Green-Methode gefärbt. Durch die Anlagerung des Safranin-O an die negativen Ladungen der Knorpelproteoglykane werden diese rot dargestellt. Das Fast-Green hingegen bindet an den entkalkten Knochen und färbt diesen grün. Die Kernfärbung wurde mit Eisenhämatoxylin nach Weigert für die Dauer von 1 min durchgeführt. Nach ausgiebiger Spülung der Präparate mit Aqua destillata (Aqua dest.) erfolgte die Differenzierung in einer Lösung, bestehend aus 70 % Alkohol und 1 % Chlorwasserstoff. Auf die anschließende Inkubation in Leitungswasser für 10 min folgte eine erneute Spülung mit Aqua dest. Danach wurden die Proben mit 0,02 % Fast-Green (VWR, Darmstadt, Deutschland) gefärbt, nach 4-minütiger Einwirkzeit mit 1 % Essigsäure gespült und erneut mit 0,1 % Safranin-O (VWR) für weitere 5 min gefärbt. Abschließend erfolgte nach der Entwässerung die histologische Eideckung.

Die Präparate der entnommenen Knochenproben wurden auf Kallusgröße sowie dessen Gewebezusammensetzung hin untersucht. Außerdem wurde ein Punktesystem für die Überbrückung des Defektpalts angewandt (Orth et al., 2017). Hierbei wurden jeweils 0 Punkte für eine Überbrückung aus Bindegewebe, 1 Punkt für eine Überbrückung aus Knorpelgewebe und 2 Punkte für eine knöcherne Überbrückung je Kortikalis vergeben. Insgesamt konnte somit jedes Präparat minimal 0 und maximal 4 Punkte erreichen, wobei 0 Punkte einer persistierenden Pseudarthrose und 4 Punkte einer kompletten knöchernen Überbrückung des Defektpaltes entsprachen.

Die Dokumentation und Digitalisierung der Proben erfolgte anhand eines 1,25 × Weitwinkelobjektivs mit 50 × Vergrößerung (Olympus BX60 Mikroskop, Olympus, Shin-juku, Japan; Zeiss Axio Cam und Axio Vision 3.1, Zeiss, Jena, Deutschland). Ausgewertet wurden die histologischen Bilder mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ Analysis System (National

Institutes of Health, Bethesda, USA). Bestimmt wurden gemäß den Empfehlungen von Gers-
tenfeld et al. (2005):

- Größe der Kallusfläche [mm²]
- Anteil des Knorpelgewebes an der Kallusfläche [%]
- Anteil des Bindegewebes an der Kallusfläche [%]
- Anteil des Knochengewebes an der Kallusfläche [%]

3.2.4 Immunhistochemie

Um die Proliferationsrate im Kallusgewebe 70 Tage postoperativ zu analysieren, wurde eine zusätzliche immunhistochemische Färbung des Kallusgewebes im Institut für Klinisch - Experimentelle Chirurgie, Homburg (Saar) durchgeführt. Die bereits für die histomorphometrische Untersuchung angewandten Proben konnten hierfür ebenfalls verwendet werden, sodass die Anzahl der benötigten Versuchstiere insgesamt noch weiter reduziert werden konnte. Die Schnitte wurden mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen den Proliferationsmarker Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) (Agilent Technologies, Hamburg, Deutschland) gefärbt, gefolgt von Peroxidase-markierter Ziegen-Anti-Maus-IgG-Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland). Abschließend erfolgte eine Behandlung durch ein Diamino-Benzidin-Substratsystem (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland). Die Schnitte wurden im Anschluss mit Mayers-Hämalaun-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt. Die Anzahl der PCNA-positiven (PCNA⁺) Zellen in Tieren der Gruppen MCM+VEGF, MCM und NONE wurde 70 Tage postoperativ bei einer Vergrößerung von 400 × (Olympus BX60 Mikroskop, Olympus) im zentralen Teil des Kallus unter Verwendung von Gesichtsfeldern (high power field; HPF) pro Probe gezählt (PCNA⁺-Zellen / HPF).

3.2.5 WB

Die Analyse der Proben mittels WB erlaubt eine genaue Bestimmung der exprimierten Proteine verschiedener Gewebe. Um das Kallusgewebe hinsichtlich der Proteinexpression zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit VEGF, Erythropoetin (EPO), EPO-Rezeptor (EPO-R), runt-related transcription factor-2 (RUNX-2) und PCNA 14 Tage postoperativ quantifiziert.

Unmittelbar vor Tötung der Tiere wurden der Pin sowie der Clip vorsichtig in Narkose aus dem Femur entfernt (siehe 3.1.7), das Kallusgewebe entnommen und in Lyse-Puffer mit Proteaseinhibitoren überführt. Direkt im Anschluss der Explantation wurden die Proben bei -80°C kryokonserviert, um einer Proteindenaturierung vorzubeugen.

Die Proteinextraktion erfolgte, nach Hinzufügen von 80 μl Lyse-Puffer mit Proteaseinhibitoren, Phosphataseinhibitoren (je 1:100, Sigma-Aldrich) sowie 100 mM des Serinproteaseinhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid (Roth, Karlsruhe, Deutschland) vor der Kryokonservierung, durch mechanische Zerkleinerung der Gewebe. Die Proteaseinhibitoren verhindern den enzymatischen Abbau der zu untersuchenden Proteine durch intrazelluläre Proteasen, die infolge von Degradierungsprozessen und bei der mechanischen Zerkleinerung freigesetzt werden. Die Proben wurden im Anschluss 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für weitere 30 min bei 4°C mit 13000 U / min ($16000 \times g$) zentrifugiert (Heraeus Fresco 21, Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland). Die gewonnenen Überstände wurden abpipettiert und mittels Aqua dest. auf 1:10 verdünnt, um sie für die Proteinbestimmung vorzubereiten. Die hierfür nötige Messlösung wurde noch unmittelbar vor der Bestimmung angesetzt.

Die Messlösung setzte sich wie folgt zusammen:

- 5 ml der Reagenz A: 10 g Na_2CO_3 / 500 ml 0,1 M NaOH (Roth) plus
- 100 μl der Reagenz B: 0,5 g KNa-Tartrat, 0,25 g Cu-Sulfat $\times 5 \text{H}_2\text{O}$ / 50 ml Aqua dest. (Merck)

250 μl dieser Messlösung wurden 50 μl Proteinextrakt hinzugefügt und sofort für 15 Sekunden mittels Reagenzglasschüttler (Vortex, Heidolph Reax Top, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) gemischt. Danach folgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden 25 μl Folinlösung (1:2 mit Aqua dest. verdünnt) hinzugefügt und gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption des entstandenen Farbkomplexes bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen Aqua dest. fotometrisch (GeneQuant pro, Amersham pharmacia biotech, Freiburg, Deutschland) bestimmt. Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde eine Rinderserumalbumin-Standardkurve verwendet. Es erfolgte eine Doppelbestimmung zu jedem Proteinextrakt. Die Proteinextrakte wurden auf dieselben Proteingehalte (25 μg / 15 μl) eingestellt und mit Laemmli-Puffer (Sigma-Aldrich) für insgesamt 5 min in kochendem Wasser denaturiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die WB-Analyse als eindimensionale SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter diskontinuierlichen Bedingungen nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Im Sammelgel betrug die Acrylamidkonzentration 5 %, im

Trenngel 10 % (30 % Acrylamid / Bis Solution; 29:1; BioRad, München, Deutschland) (Tab. 3).

Zusätze [ml]	Sammelgel 5 %	Trenngel 10 %
30 % Acrylamid / Bisacrylamid	0,67	3,3
Trenngelpuffer		2,5
Sammelgelpuffer	0,5	
Aqua dest.	2,7	4,0
10 % SDS	0,04	0,1
10 % APS	0,04	0,1
TEMED	0,02	0,02

Tab. 3: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele für die WB-Analyse.

Die Gele wurden in einen Gießstand für Minigele (Mini-Protean II, BioRad) gegossen. Um eine Polymerisation an der Geloberfläche durch Sauerstoff zu verhindern und eine glatte Trennung zwischen den Gelen zu garantieren, wurde nach dem Einfüllen 200 µl Isopropanol (Roth) aufgetragen. Nach einer halbstündigen Inkubation und Polymerisation der Gele wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel eingefüllt. Um nun die Geltaschen mit einem Beladungsvolumen von 15 µl zu formen, folgte unmittelbar nach der Befüllung das Einsetzen eines Teflon-Kamms (15-zählig, 4 mm × 1 cm × 0,75 mm, BioRad). Im Anschluss an eine einstündige Polymerisationszeit wurden 15 µl der Proben in die Geltaschen sowie ein Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) / Glycinpuffer (0,125 M TRIS Base; 0,96 M Glycin; 0,5 % SDS, Roth) eingefüllt und an ein Netzgerät für stabilisierten Gleichstrom (Power Pac 200, BioRad) angeschlossen. Der Gleichstrom führt zu einer Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Molekülgröße in der vertikalen Elektrophoresekammer (Mini-Protean II, BioRad). Zunächst erfolgte die Konzentrierung der Proteine innerhalb des Sammelgels bei 100 Volt (V) für insgesamt 15 min. Danach wurde die Spannung für circa 1 h auf 140 V erhöht, sodass die Passage durch das Trenngel erfolgen konnte. Die Auftrennung der Proteine war abgeschlossen, sobald die „blaue Lauffront“ der Bromphenolblau-Bande das untere Ende des Gels erreicht hatte. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele in ein Transferpufferbad (Bjerrum-Schafer-Nielsen-Puffer, 48 mM TRIS Base, 39 mM Glycin; Roth) für das Blotting äquilibriert.

Ziel des Blottings ist die Übertragung der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine synthetische Membran, sodass ein genaues Abbild des Elektrophoresemusters entsteht. Die dann auf der Membran befindlichen Proteine sind somit für den Nachweis durch spezifische Antikörper

leicht zugänglich. Zur Durchführung des sogenannten Semi-Dry-Blots im Rahmen des horizontalen Proteintransfers wurde eine Blot-Apparatur (Trans-Blot Turbo, BioRad) verwendet. Zur Vorbereitung wurde die hierfür verwendete Polyvinyliden-Difluorid (PVDF)-Membran (0,2 µm Porengröße, BioRad) für 20 s in Methanol (Roth) gebadet und anschließend mit destilliertem Wasser abgespült. Danach erfolgte eine 10-minütige Äquilibration in einer Mischung aus Methanol (Roth) und Bjerrum-Schafer-Nielsen-Puffer im Verhältnis 1:10. Für den Blotsandwich wurde die PVDF-Membran und das Gel luftblasenfrei zwischen Filterpapieren (Whatman, Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland), die in Bjerrum-Schafer-Nielsen-Puffer getränkt waren, in die Blot-Kassette eingelegt. Die Ausrichtung erfolgte hierbei so, dass der Stromfluss den Transfer der Proteine auf die Membran gewährleistet. Nach 7 min bei einer Spannung von 25 V und einer Stromstärke von 0,4 A im Trans Blot Turbo Transfer System (BioRad) wurde die Membran mit den nun beladenen Proteinen entnommen und über Nacht in TBS-T-Puffer (1,5 mM TRIS Base pH 7,5, 1 % NaCl, 0,01 % Tween 20; Roth) bei 4 °C zur weiteren Bearbeitung konserviert.

Um die Targetproteine detektieren zu können, wurde eine spezifische Antikörper-Färbung der membrantransferierten Proteine angewandt. Damit unspezifische Proteinbindestellen gesättigt werden, wurde die PVDF-Membran für 30 min mit einer Blockungsreagenz behandelt, bei der es sich um eine 5 % Lösung aus Milchpulver (Blotting Grade Blocker non-fat dry milk, BioRad) in TBS-T handelte. Alle Schritte der Antikörper-Färbung erfolgten auf einem Horizontalschüttler (Phoenix Instrument, RS-DS5, Garbsen, Deutschland). Nach Saturierung der unspezifischen Bindungsstellen erfolgten drei weitere Waschschrte mit TBS-T. Die Nachweisreaktion erfolgte im Anschluss durch die Bindung eines spezifischen, unkonjugierten Primärantikörpers am Targetprotein und einem Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper, der das Signal verstärkte. Die entsprechenden Primärantikörper wurden nach einem jeweils spezifischen Zeitschema bei Raumtemperatur (RT) inkubiert (Tab. 4).

Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung/ Inkubation
PCNA	DAKO Cytomation, Hamburg, Deutschland	1:1000 2 h RT + über Nacht 4 °C
EPO	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	1:100 2 h RT + über Nacht 4 °C
EPO-R	Santa Cruz Biotechnology	1:100 2 h RT + über Nacht 4 °C
RUNX-2	Santa Cruz Biotechnology	1:100 2 h RT + über Nacht 4 °C
VEGF	Santa Cruz Biotechnology	1:50 2 h RT + über Nacht 4 °C

Tab. 4: Primärantikörper für die WB-Analyse.

Im Anschluss erfolgten erneut drei Waschschrte mit TBS-T Puffer und die Inkubation der Sekundärantikörper (Tab. 5):

Primär-Antikörper	Sekundär-Antikörper	Bezugsquelle des Sekundär-Antikörpers	Verdünnung / Inkubation
PCNA	Ziege-anti-Maus IgG-POD	R & D Systems	1:1000 1,5 h RT
EPO	Ziege-anti-Kaninchen-IgG-POD	DAKO Cytomation	1:1500 1,5 h RT
EPO-R	Ziege-anti-Kaninchen-IgG-POD	DAKO Cytomation	1:1500 1,5 h RT
RUNX-2	Ziege-anti-Kaninchen-IgG-POD	DAKO Cytomation	1:1500 1,5 h RT
VEGF	Ziege-anti-Kaninchen-IgG-POD	DAKO Cytomation	1:1500 1,5 h RT

Tab. 5: Sekundärantikörper für die WB-Analyse.

Nach eineinhalbstündiger Inkubation wurden die Membranen bei RT für weitere fünf Male in TBS-T gewaschen und daraufhin einer Chemilumineszenzreaktion unterzogen (ECL Western Blotting Analysis System, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland).

Zur Kontrolle der Proteinbeladung und des Transfers wurde der monoklonale β -Actin-Antikörper Klon AC-15 (1:5000, Sigma-Aldrich) als Standard gesetzt. β -Actin gehört zu den hoch konservierten eukaryotischen Proteinen und eignet sich aufgrund seiner konstanten intrazellulären Verteilung im Zytoskelett als interner Standard.

Die Analyse der Signale der behandelten Membran erfolgte durch den Intas ECL Chemocam Imager (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland). Hierfür wurde die Membran in das Gerät eingelegt und durch den Chemocam Imager detektiert und visualisiert. Die Auswertung erfolgte per Pixelintensität mithilfe der Labimage 1D Gel und Blot Auswertungssoftware (Intas Science Imaging Instruments GmbH). In allen WB-Analysen wurde die ermittelte Pixelintensität auf gleiche β -Actin-Konzentrationen korrigiert.

3.3 Statistik

Die aus den Experimenten gewonnenen Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Nach Überprüfung der Normalverteilung wurden die Daten der einzelnen Versuchsgruppen mit einseitiger ANOVA bzw. einem Student-Newman-Keuls-

Test miteinander verglichen. Für Mehrfachvergleiche wurde eine Bonferroni-Abgleichung durchgeführt.

Ein ungepaarter t -Test oder Mann-Whitney Test wurde durchgeführt um zeitabhängige Unterschiede zwischen den Gruppen (Tag 14 vs. Tag 70) zu analysieren. Die statistische Analyse aller erfassten Parameter wurde mithilfe der SigmaPlot Software 11.0 von Systat Software (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) durchgeführt. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung VEGF-beschichteter MCM

Die Analyse der Oberflächenmorphologie von MCM zeigte eine plättchenartige Struktur der Mineralbeschichtung mit typischen, nanoskalierten Platten (Abb. 27 a - c). Die Bindungseffizienz von MCM für VEGF betrug $46 \pm 3 \%$ der VEGF-Konzentration in der verwendeten Inkubationslösung. Das Freisetzungsprofil wies initial eine hohe Freisetzung, gefolgt von einer verzögerten Freisetzung über den restlichen 50-tägigen Untersuchungszeitraum auf. Hierdurch wurde das physiologische Expressionsprofil von VEGF während der Knochenheilung nachgeahmt. Nach 50 Tagen wurden etwa 72 % des ursprünglich gebundenen VEGF aus den Mikropartikeln freigesetzt (Abb. 27 d).

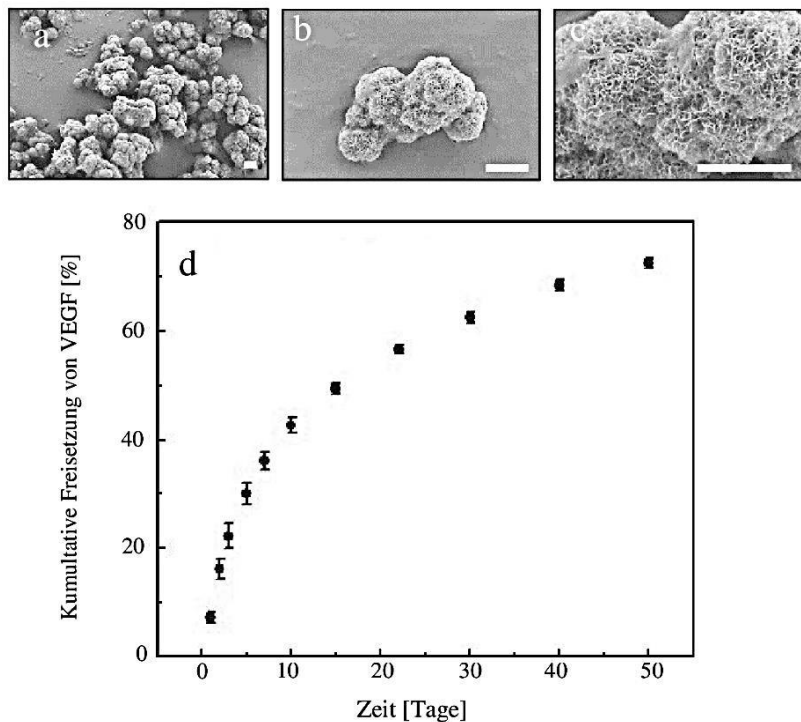


Abb. 27: Charakterisierung von VEGF-beladenen MCM. a - c: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von MCM in verschiedenen Vergrößerungen nach Beschichtung mit Gold. MCM weisen eine große Oberfläche durch eine charakteristische plättchen-artige Struktur der Mineralbeschichtung auf. Die Skala entspricht $2 \mu\text{m}$. d: Kumulative Freisetzung von VEGF von MCM über 50 Tage. Das Profil zeigt eine anfänglich gesteigerte Freisetzung innerhalb der ersten 7 Tage, gefolgt von einer kontinuierlichen, verzögerten Freisetzung über den restlichen Untersuchungszeitraum. Insgesamt wurden etwa 72 % des gebundenen VEGF über den 50-tägigen Beobachtungszeitraum abgegeben.

4.2 Postoperativer Verlauf

Die Versuchstiere wurden unmittelbar postoperativ bis zur Erlangung des völligen Bewusstseins beobachtet und auf pathologisches Verhalten hin untersucht. Im Rahmen der Stallpflege sowie des Fütterns und des Trinkwasserwechsels wurden die Mäuse täglich beobachtet.

Tiere, die einen Knochen- oder Weichteilinfekt, eine signifikante Gewichtsabnahme oder eine makroskopisch bzw. im Rahmen der Explantation aufgefallene radiologische Implantatdislokation aufwiesen, wurden aus der Studie ausgeschlossen.

Eine anfängliche Schonhaltung des operierten Beins zeigte sich innerhalb von 1 - 2 Tagen rückläufig, sodass hiernach eine Belastbarkeit ähnlich der präoperativen Belastung erkennbar war. Diese Form der Belastung ließ keine äußeren Schmerzzeichen oder Beeinträchtigung des Bewegungsablaufes erkennen und entsprach einem physiologischen Gangbild.

4.3 Makroskopischer Befund

Alle Versuchstiere wurden post mortem und vor Explantation der Femora auf eventuelle Pathologien wie z. B. Patella- und / oder Kniegelenksluxationen, Infekte, Wundheilungsstörungen oder Muskelatrophien untersucht und ggf. aus der Studie ausgeschlossen.

Alle in die Studie aufgenommenen Tiere wiesen in der makroskopischen Kontrolle eine korrekte Lage des Pins und des Clips sowie deren festen Sitz auf.

Der Defektspace wurde unmittelbar nach Entfernung des Pins und darauffolgend des Clips begutachtet und die Überbrückung makroskopisch untersucht. Nach einer Standzeit von 14 Tagen zeigten Tiere aller Gruppen noch einen sehr weichen Kallus ohne Anhalt für ossäre Überbrückung des Defektspace.

Hingegen ließ sich bei Tieren der Gruppe MCM+VEGF nach einer Standzeit von 70 Tagen eine makroskopisch stabilere Überbrückung des Defektspace im Vergleich zu Tieren der Gruppen MCM bzw. NONE beobachten.

4.4 Radiologie

4.4.1 Röntgen

Die röntgenologische Auswertung der Knochenbruchheilung erfolgte anhand einer Röntgenübersichtsaufnahme des jeweiligen osteotomierten Femurs, die sowohl unmittelbar nach durchgeführter Operation als auch 14 bzw. 70 Tage postoperativ angefertigt wurden (Abb. 26). Die Aufnahmen erlaubten eine Überprüfung der korrekten Lage des Pins und des Clips sowie die Beurteilung der knöchernen Überbrückung. Während in Femora der Gruppen NONE und MCM nach einer Standzeit von 14 bzw. 70 Tagen keine knöchernen Überbrückung des Defektspalts nachweisbar war (Abb. 28 a - d), zeigten Femora der Gruppe MCM+VEGF nach einer Standzeit von 70 Tagen eine knöchernen Überbrückung des Defektspalts mit direktem Kontakt der Fragmente zueinander (Abb. 28 e und f).

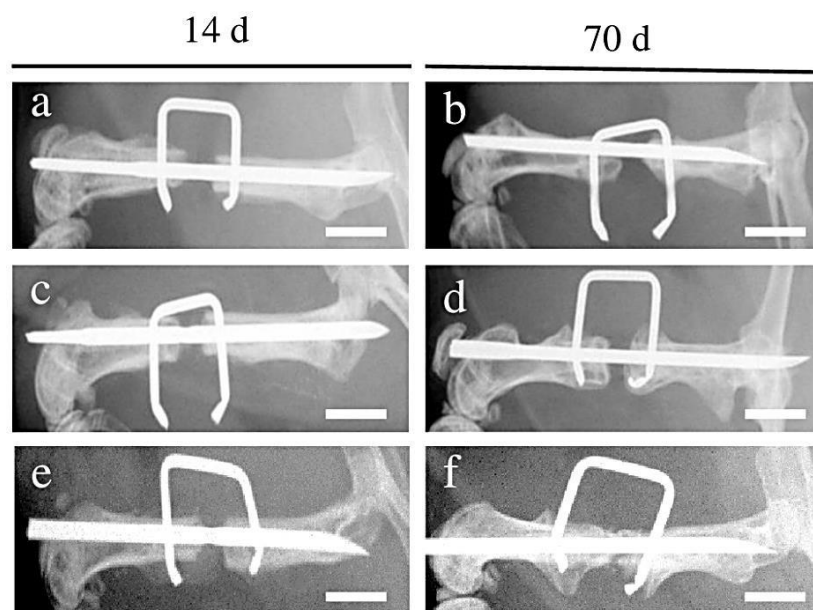


Abb. 28: Röntgenaufnahmen der osteotomierten Mäusefemora mit einem Defektspalt von 1,8 mm (a - f). Die Aufnahmen erfolgten 14 Tage (a, c, e) und 70 Tage (b, d, f) nach Stabilisierung der Fraktur mit der "Pin-Clip"-Technik. Aufnahmen der Femora der Gruppe NONE (a, b) und MCM (c, d) zeigen als Zeichen einer fortbestehenden Pseudarthrose keine knöchernen Überbrückung. Hingegen weisen die mit VEGF-beschichteten MCM behandelten Femora 70 Tage nach Operation Knochengewebe im Osteotomiespalt mit direktem Kontakt der Fragmente zueinander auf. Die Skala entspricht 2 mm.

4.4.2 μ CT

Die μ CT-Analyse ergab einen signifikant höheren Anteil Knochenvolumen am Totalvolumen des Kallusgewebes in Proben der Gruppe MCM+VEGF sowohl 14 Tage als auch 70 Tage postoperativ im Vergleich zu Proben der Gruppen MCM und NONE (Abb. 29 a - h).

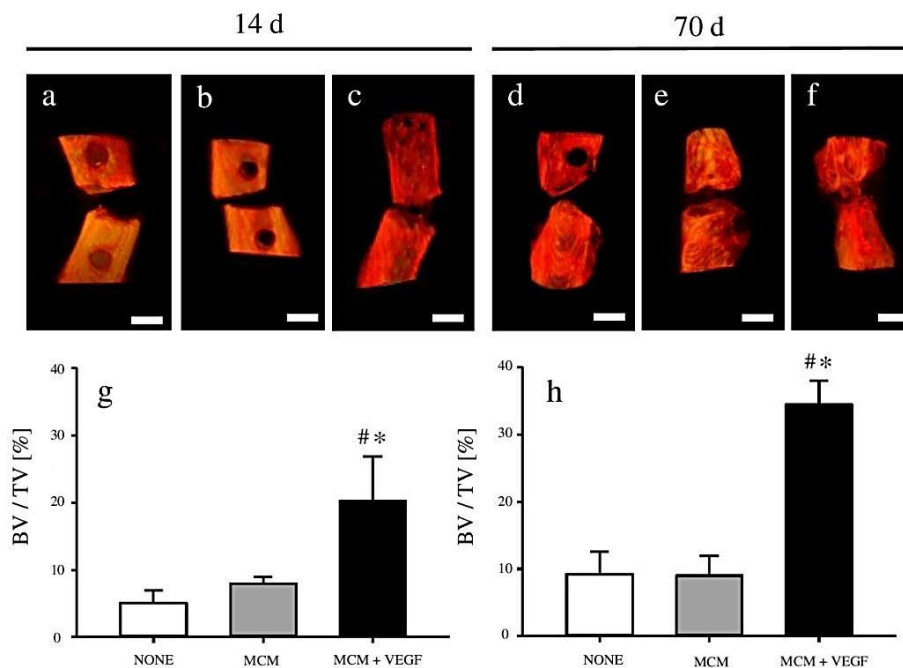


Abb. 29: μ CT-Analyse der Femora. a - f: μ CT-Bilder der Femora 14 Tage (a - c) und 70 Tage (d - f) nach Operation an Tieren der Gruppe NONE (a, d), der Gruppe MCM (b, e) und der Gruppe MCM+VEGF (c, f). 70 Tage nach Osteotomie zeigen sich in der Gruppe NONE (d) und MCM (e) abgerundete und zum Teil verschmälerte, zum Defektspace hin gerichtete Knochenfragmente, typisch für eine atrophe Pseudarthrose. Hingegen weist die Rekonstruktion des Femurs der MCM+VEGF-Gruppe (f) eine erhöhte Knochenbildung mit mineralisiertem Knochengewebe innerhalb des Osteotomiespalts auf. Die Skala entspricht 1 mm. g, h: BV / TV 14 Tage (g) und 70 Tage (h) nach Osteotomie von Tieren der Gruppe NONE (n = 8), MCM (n = 8) und MCM+VEGF (n = 8). Mittelwert \pm SEM; [#]p < 0,05 vs. Kontrolle; *p < 0,05 vs. MCM.

3D Rekonstruktionen der μ CT-Aufnahmen von Proben der Gruppe MCM+VEGF 70 Tage postoperativ zeigten eine knöcherne Überbrückung des Defektspalts (Abb. 29 f). Im Gegensatz dazu zeigten Rekonstruktionen der Knochenfragmente und des Osteotomiespalts in Tieren der Gruppen MCM und NONE keine Überbrückung zu diesem Zeitpunkt (Abb. 29 d und e). Darüber hinaus wiesen die Enden der Fragmente, die zur Osteotomie hin gerichtet waren, eine Abrundung und Verschmälерung im Sinne einer atrophischen Pseudarthrose auf (Abb. 29 d und e). Die BMD ergab in keiner Gruppe für die jeweiligen Standzeiten signifikante Unterschiede (unveröffentlichte Daten).

4.5 Biomechanik

Nach 14 und 70 tägiger Standzeit wiesen Femora der MCM+VEGF-Gruppe im Vergleich zu Femora der MCM- sowie der NONE-Gruppe zu beiden Zeitpunkten eine signifikant höhere Biegesteifigkeit auf (Abb. 30 a und b). Proben der Gruppe NONE und MCM zeigten im Sinne einer atrophen Pseudarthrose praktisch keine Biegesteifigkeit.

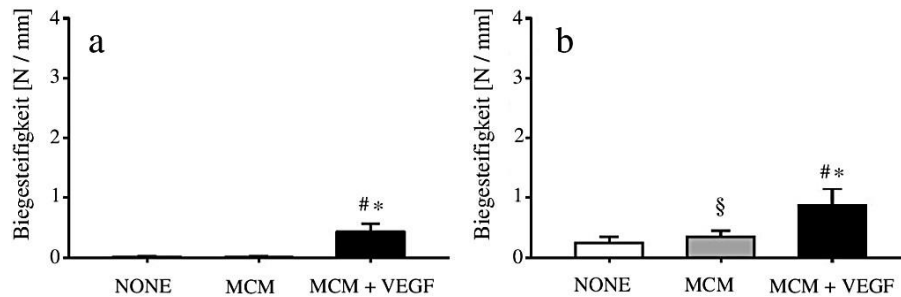


Abb. 30: Biomechanische Analyse der osteotomierten Mäusefemora. a, b: Biegesteifigkeit von Femora der Gruppe NONE ($n = 8$), MCM ($n = 8$) und MCM+VEGF ($n = 8$), 14 Tage (a) und 70 Tage (b) nach Osteotomie. Mittelwert \pm SEM; # $p < 0,05$ vs. Kontrolle; * $p < 0,05$ vs. MCM, \$ $p < 0,05$ vs. 14 Tage postoperativ innerhalb der jeweiligen Gruppe.

4.6 Histomorphometrie

Die histomorphometrische Auswertung des Kallusgewebes erfolgte anhand longitudinaler Schnittpräparate. Die histologische Analyse 14 und 70 Tage nach erfolgter Osteotomie ergab, dass die Gesamtkallusfläche der Tiere in der Gruppe MCM+VEGF signifikant größer war als in Tieren der Gruppen NONE und MCM (Abb. 31 a - f; Abb. 32 a, b).

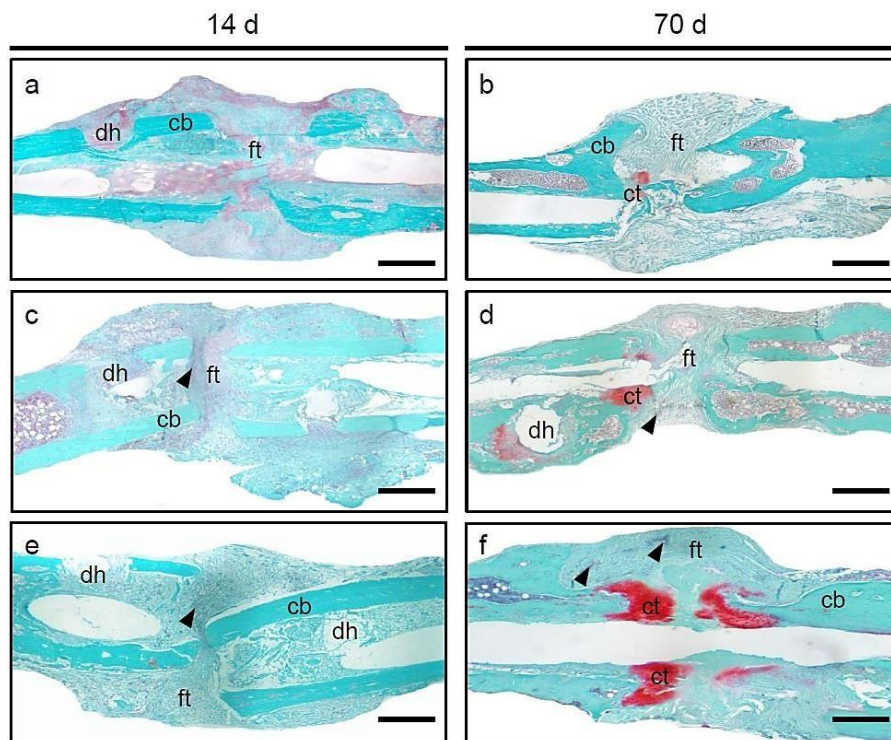


Abb. 31: Longitudinale histologische Femur-Schnittpräparate im Bereich des Defektspalts nach Saffranin-O-Färbung. a - f: Repräsentative histologische Aufnahmen 14 Tage (a, c, e) und 70 Tage (b, d, f) postoperativ von Femora der Gruppe NONE (a, b), MCM (c, d) und MCM+VEGF (e, f). Bindegewebe (ft), Knorpelgewebe (ct) und kortikaler Knochen (cb) sind markiert. Die Bohrlöcher des Clips sind mit dh gekennzeichnet. MCM in der Osteotomielücke werden durch Pfeilspitzen dargestellt. Die Skala entspricht 500 μ m.

Die Untersuchung der Kalluszusammensetzung ergab 14 Tage postoperativ einen niedrigen Knochengewebsanteil in allen drei Vergleichsgruppen. Der Kallus bestand zu diesem Zeitpunkt in allen Gruppen vorrangig aus Bindegewebe (Abb. 32 c).

Interessanterweise zeigten Femora der Gruppe MCM+VEGF über die Studiendauer von 70 Tage nach Osteotomie einen tendenziell zunehmenden, jedoch nicht signifikanten, Knochen- und Knorpelanteil am Gesamtkallusgewebe ($4,1 \pm 2,3$ % vs. $6,7 \pm 5,5$ %, $p > 0,05$), wohingegen Versuchstiere der Gruppen NONE und MCM einen abnehmenden Anteil an Knochenge-webe aufwiesen (MCM: $10,6 \pm 3,3$ % vs. $2,6 \pm 1,4$ %; NONE: $13,7 \pm 3,8$ % vs. $1,4 \pm 0,9$ %, $p < 0,05$) (Abb. 32 c und d).

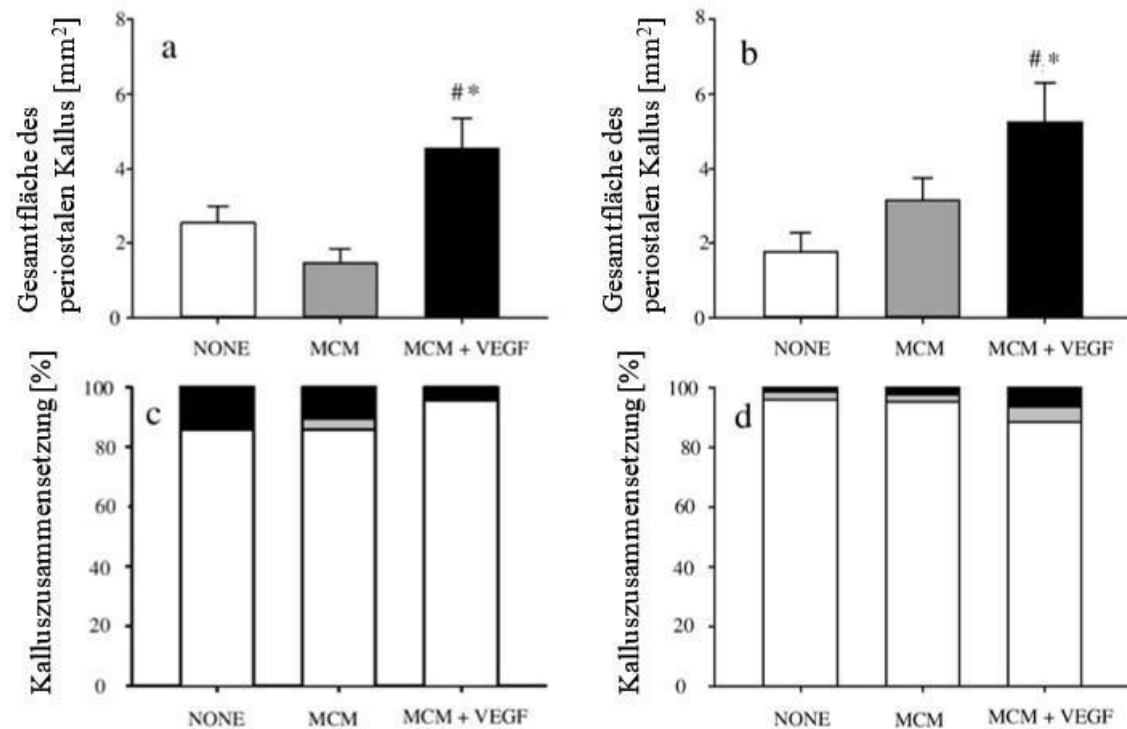


Abb. 32: Kallusfläche und -zusammensetzung. a, b: Gesamtfläche des periostalen Kallus der Gruppen NONE ($n = 8$), MCM ($n = 8$) und MCM+VEGF ($n = 8$) 14 Tage (a) und 70 Tage (b) nach Osteotomie. c, d: Kalluszusammensetzung einschließlich fibrösem Gewebe (weiß), Knorpelgewebe (grau) und Knochengewebe (schwarz) der Gruppen NONE ($n = 8$), MCM ($n = 8$) und MCM+VEGF ($n = 8$) 14 Tage (c) und 70 Tage (d) postoperativ.

Die histomorphometrische Analyse deutet zusammenfassend darauf hin, dass in Tieren der Gruppe MCM+VEGF ein enchondraler Knochenbildungsprozess stattfand. In Tieren der Gruppen NONE bzw. MCM hingegen zeigte sich das typische Bild einer atrophen Pseudarthrose.

Dementsprechend zeigte die quantitative Beurteilung der knöchernen Überbrückung des Defektpalts mittels des beschriebenen Punktesystems 70 Tage postoperativ bei Tieren der Gruppe MCM+VEGF einen höheren Wert, als in Tieren der Gruppen NONE und MCM (MCM+VEGF: $0,5 \pm 0,3$; MCM: $0,25 \pm 0,2$; NONE: $0,0 \pm 0,0$). Jedoch waren die Werte in allen Gruppen relativ niedrig und es wurden keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen ($p > 0,05$).

4.7 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung des Kallusgewebes 70 Tage postoperativ ergab eine höhere Anzahl von PCNA⁺-Zellen im zentralen Bereich des Kallusgewebes von MCM+VEGF-Tieren im Vergleich zu Tieren der Gruppen MCM und NONE (Abb. 33).

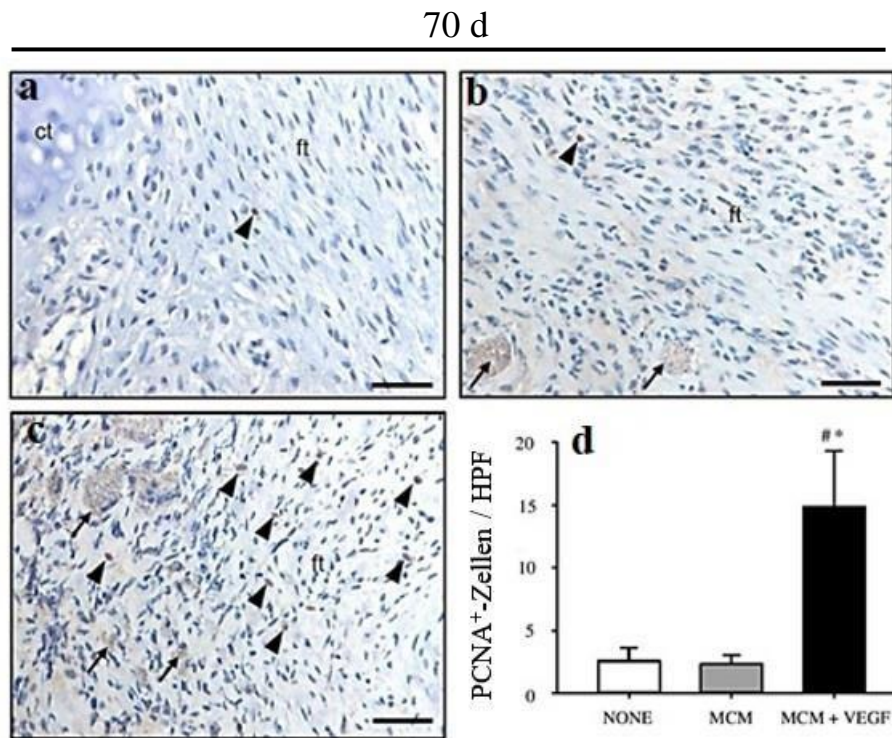


Abb. 33: Immunhistochemische Analyse des Kallusgewebes. a - c: Immunhistochemischer Nachweis von PCNA⁺-Zellen (Pfeilspitzen) im Kallusgewebe osteotomierter Femora 70 Tage postoperativ von Tieren der Gruppe NONE (a), MCM (b) und MCM+VEGF (c). In der Abbildung sind Bindegewebe (ft), Knorpelgewebe (ct) und Konglomerate von MCM (Pfeile) markiert. Die Skala entspricht 50 μ m. d: Anzahl PCNA⁺-Zellen pro HPF im Kallusgewebe der Gruppe NONE (n = 4), MCM (n = 4) und MCM+VEGF (n = 4) 70 Tage nach Osteotomie. Mittelwert \pm SEM; [#]p < 0,05 vs. Kontrolle; *p < 0,05 vs. MCM.

4.8 WB

Die WB-Analyse des Kallusgewebes ergab eine signifikant höhere Expression von VEGF im Kallusgewebe der Gruppe MCM+VEGF im Vergleich zur Gruppe NONE (Abb. 34 und 35).

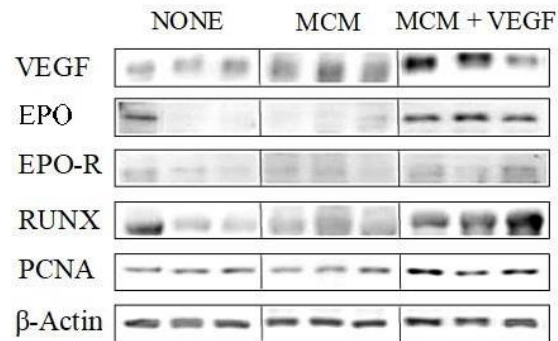


Abb. 34: WB-Analyse des Kallusgewebes. Repräsentative WBs von VEGF, EPO, EPO-R, RUNX-2, PCNA- und β-Actin-Expression innerhalb des Kallusgewebes der Gruppen NONE, MCM und MCM+VEGF 14 Tage nach erfolgter Osteotomie.

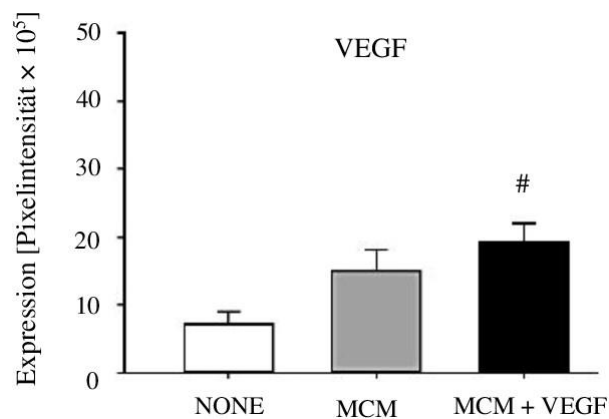


Abb. 35: Expression von VEGF innerhalb des Kallusgewebes der Kontrolle ($n = 3$), MCM ($n = 3$) und MCM+VEGF ($n = 3$) 14 Tage nach der Osteotomie. Mittelwert \pm SEM; # $p < 0,05$ vs. NONE.

Interessanterweise war die Expression von EPO im Kallus der Gruppe MCM+VEGF im Vergleich zu Kallusgewebe der Gruppen NONE und MCM um das 10 \times bzw. 6 \times signifikant erhöht (Abb. 34 und 36).

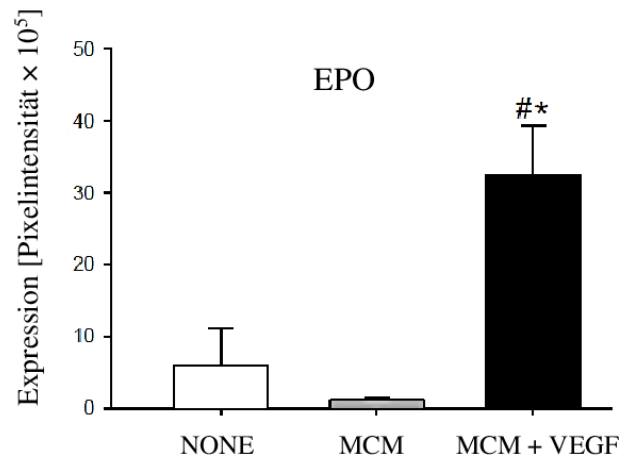


Abb. 36: Expression von EPO innerhalb des Kallusgewebes der Gruppen NONE ($n = 3$), MCM ($n = 3$) und MCM+VEGF ($n = 3$) 14 Tage nach der Osteotomie. Mittelwert \pm SEM; [#] $p < 0,05$ vs. NONE; * $p < 0,05$ vs. MCM.

Im Gegensatz hierzu war die Expression von EPO-R zu diesem Zeitpunkt im Kallusgewebe der drei Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 34 und 37).

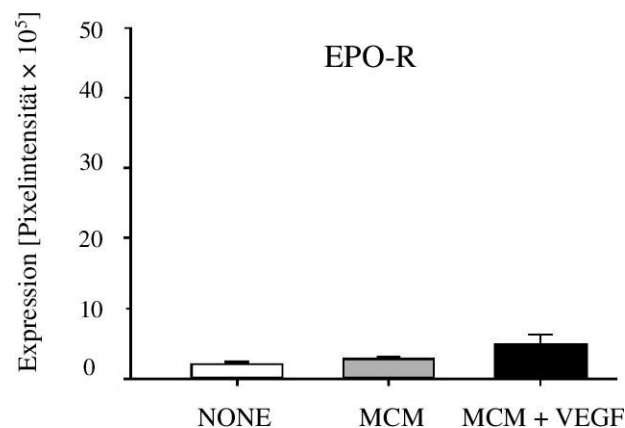


Abb. 37: Expression von EPO-R innerhalb des Kallusgewebes der Gruppen NONE ($n = 3$), MCM ($n = 3$) und MCM+VEGF ($n = 3$) 14 Tage postoperativ.

Die Expression von RUNX-2 war bei Tieren der Versuchsgruppe MCM+VEGF im Vergleich zu Tieren der Gruppe NONE und MCM signifikant erhöht (Abb. 34 und 38).

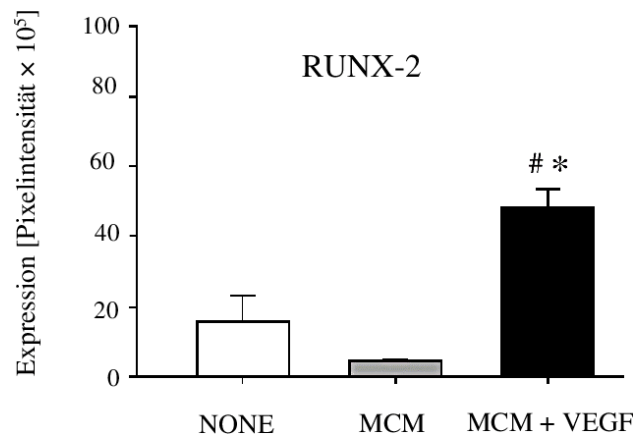


Abb. 38: Expression von RUNX-2 innerhalb des Kallusgewebes der Gruppen NONE ($n = 3$), MCM ($n = 3$) und MCM+VEGF ($n = 3$) 14 Tage nach der Osteotomie. Mittelwert \pm SEM; [#] $p < 0,05$ vs. NONE; * $p < 0,05$ vs. MCM.

Die Expression des Proliferationsmarkers PCNA war bei Tieren der Gruppe MCM+VEGF im Vergleich zu Tieren der Gruppen NONE und MCM ebenfalls signifikant erhöht (Abb. 39).

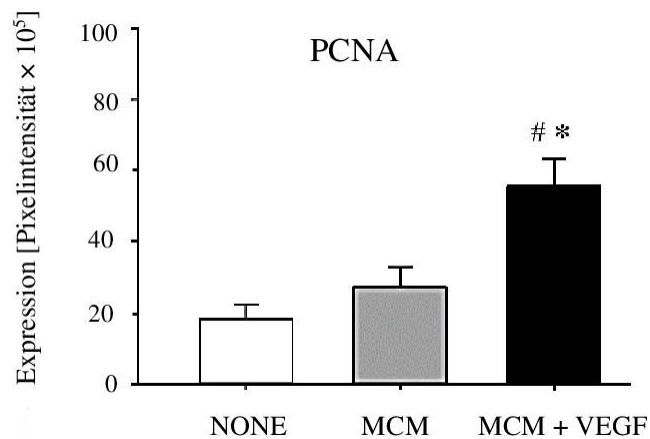


Abb. 39: Expression von PCNA innerhalb des Kallusgewebes der Gruppen NONE ($n = 3$), MCM ($n = 3$) und MCM + VEGF ($n = 3$) 14 Tage nach der Osteotomie. Mittelwert \pm SEM; [#] $p < 0,05$ vs. NONE; * $p < 0,05$ gegenüber MCM.

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

Die Knochenheilung ist ein komplexer biologischer Prozess, der eine Interaktion unterschiedlicher knochenfremder Gewebetypen wie z. B. des Periosts, des Gefäßsystems und des periostären Weichteilgewebes erfordert. Dieses Zusammenspiel wird während der unterschiedlichen Phasen der Knochenheilung durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Dieses sog. ossäre micro-environment ist aufgrund der Komplexität in vitro nur schwer reproduzierbar (Friedman et al., 1996). Zwar war es in der vorliegenden Arbeit möglich die Charakterisierung der verwendeten Mikropartikel in vitro durchzuführen, doch da bislang kein in vitro Modell die komplexen Vorgänge der Knochenheilung in vivo adäquat imitieren kann, war es für die genannte Fragestellung der vorliegenden Arbeit notwendig, die weiteren Untersuchungen am Tiermodell durchzuführen.

Bekanntlich gibt es Unterschiede hinsichtlich der biomechanischen und anatomischen Verhältnisse zwischen murinem und humanem Knochen. So besitzt die Maus beispielsweise nicht das unter 2.1.2 beschriebene Havers-System (Mills & Simpson, 2012). Stattdessen bauen sie Knochen an der Frakturstelle unter Verwendung von Resorptionshöhlräumen um, die sich in der Nähe der Frakturoberfläche bilden und durch Osteoblasten ausgefüllt werden. Obwohl dieser Prozess dem vollständigen Umbau nach Havers ähnelt, stellt dieser Unterschied in Hinblick auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Knochen einen Nachteil dar.

Andererseits bieten Nagetiere wie z. B. die Maus für Tierversuche zur Untersuchung der Knochenheilung auch Vorteile. So eignen sich Mäuse aufgrund ihrer geringen Anschaffungs- und Haltungskosten zur Durchführung von Studien mit großen Gruppengrößen. Weiterhin ist das Genom der Maus vollständig entschlüsselt, wodurch sich eine Vielzahl transgener Stämme und molekularbiologischer und -genetischer Untersuchungsmöglichkeiten ergeben, die an anderen Spezies nicht durchführbar wären (Haffner-Luntzer et al., 2016) (Nunamaker, 1998). Darüber hinaus ist die Dauer der Knochenheilung geringer als bei anderen Spezies, woraus i. d. R. kürzere Studiendauern resultieren (Bourque et al., 1992). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Studie ausgewachsene CD-1 Mäuse als Versuchstiere verwendet.

Verschiedene Knochenheilungsmodelle an der Maus sind beschrieben und verfügbar. Bei der Auswahl eines Knochenheilungsmodells muss berücksichtigt werden, dass die mechanischen Gegebenheiten für den Heilungserfolg von wesentlicher Bedeutung sind (Claes et al., 1998).

Instabile Osteosynthesemodelle bilden daher nur sehr eingeschränkt das klinische Bild wieder, sind nur wenig aussagekräftig und sollten daher nach Möglichkeit vermieden werden (Histing et al., 2011).

Das von unserer Arbeitsgruppe entwickelte und in der vorliegenden Arbeit verwendete Pin-Clip Modell stellt eine etablierte Technik dar, um biomechanische Stabilität zu gewährleisten und die interfragmentäre Bewegung im Vergleich zu einer rein intramedullären, rotationsinstabilen Fixierung signifikant zu reduzieren (Garcia et al., 2008). Darüber hinaus eignet sich dieses Modell zur Induktion sowohl einer physiologischen als auch einer gestörten Knochenheilung und wurde hierfür bereits in mehreren Studien erfolgreich angewandt (Garcia et al., 2008b) (Holstein et al., 2011) (Orth et al., 2017) (Orth et al., 2018) (Orth et al., 2018b).

Im Vergleich zu anderen Knochenheilungsmodellen an der Maus bietet das Pin-Clip Modell entscheidende Vorteile: So gewährt beispielsweise der von Bonnarens und Einhorn publizierte intramedulläre Pin keine Rotations- oder Achsenstabilität und es besteht die Gefahr der Pin-dislokation (Bonnarens & Einhorn, 1984) (Histing et al., 2011). Das von Holstein und Kollegen 2009 publizierte „MouseScrew“-Verfahren ist für die Untersuchung einer Pseudarthrose ungeeignet, da die Rotationsstabilität durch die Kompression der jeweiligen Knochenfragmente hergestellt wird (Holstein et al., 2009). Die 2010 von unserer Arbeitsgruppe publizierte „LockingMousePlate“ eignet sich vor allem für die Untersuchung der intramembranösen Knochenheilung und für die Stabilisierung größerer Segmentdefekte, stellt jedoch kein vergleichbares etabliertes Verfahren zur Untersuchung von Pseudarthrosen dar und ist i. d. R. für Knochendefekte im metaphysären statt diaphysären Bereich geeignet (Histing et al., 2010). Eine etablierte Alternative zum Pin-Clip Modell zur Untersuchung der murinen Pseudarthrose stellt der „Locking-Mouse-Nail“® dar (Garcia et al., 2009). Dieser ist hingegen vergleichsweise teuer. Darüber hinaus wurde das Pin-Clip Modell bereits bei einer Vorstudie zur Untersuchung der Wirkung beschichteter MCM auf die Knochenheilung angewandt (Orth et al., 2017), sodass die Wahl dieses Modells in der vorliegenden Studie die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erhöht.

Ein Nachteil des verwendeten Pin-Clip Modells ist der hohe Invasivitätsgrad des chirurgischen Eingriffs. Bei Anwendung rotationsstabiler Pseudarthrosemodellen ist dies jedoch aufgrund der manuellen Induktion eines standardisierten Knochendefekts im Vergleich zu geschlossenen Modellen, die eine physiologische Knochenheilung induzieren, generell erhöht. Es ist möglich, dass die im Rahmen der Operation induzierten Verletzungen des umgebenden Weichteilmantels, des Periosts oder des Knochens selbst die Knochenheilung beeinträchtigen. Darüber hinaus ist es denkbar, dass der Intramedullärraum durch das Implantat zusätzlich

geschädigt wird. Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit trotz dessen bei allen Tieren bereits 1 - 2 Tage postoperativ eine physiologische Belastung der osteotomierten Extremität und ein physiologisches Gangbild beobachtet werden. Die Versuchstiere zeigten während des Beobachtungszeitraums keinerlei Einschränkungen im Bewegungsablauf oder Hinweise auf Schmerzen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Osteosynthese stabil genug war und keine höhergradig einschränkende Weichteilverletzung induziert wurde. Unter Berücksichtigung der genannten Vor- und Nachteile entschieden wir uns daher in der vorliegenden Arbeit für das Pin-Clip Modell.

Zusammenfassend hat sich die verwendete Pin-Clip Methode nach Garcia et al. (Garcia et al., 2008) für die vorliegende Studie als geeignet erwiesen. Es ist reproduzierbar und kann auch für Folgestudien empfohlen werden. Dies sollte insbesondere vor dem Hintergrund der besseren Vergleichbarkeit angewandter Knochenersatzmaterialien erwogen werden.

Die Allgemeinanästhesie sowie die dafür verwendeten Medikamente Xylazin und Ketamin wurden von den Versuchstieren stets gut vertragen und es ergaben sich keine Hinweise auf Entzündungen oder Infektionen an der abdominellen Einstichstelle oder des Operationsgebietes selbst. Die Narkosedauer betrug durchschnittlich etwa 30 min und erwies sich für die Operationsdauer sowie die unmittelbare postoperative Röntgenkontrolle als ausreichend.

Darüber hinaus war die Tötung der Tiere durch Überdosierung des Narkosegemischs schonend und gab ausreichend Zeit für eine weitere Röntgenkontrolle und Explantation des Femurs bzw. des Kallusgewebes für die weiteren Analysen. Im Rahmen der Explantation der Knochen zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten ergab sich kein Hinweis auf Infektionen oder Pathologien im Operationsfeld.

Die Untersuchungszeitpunkte von 14 bzw. 70 Tagen postoperativ wurden unter Berücksichtigung des murinen Knochenheilungsverlaufs und einer ausführlichen Literaturrecherche gewählt (Garcia et al., 2008) (Histing et al., 2011) (Holstein et al., 2011) (Manigrasso & O'Connor, 2004) (Orth et al., 2017). Manigrasso und O'Connor (2004) publizierten die Stadien der murinen Knochenheilung. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass 10 - 14 Tage nach Fraktur das größte Kallusvolumen vorlag (Manigrasso & O'Connor, 2004). Die Untersuchung 14 Tage nach der Fraktur stellt somit die Phase der frühen Frakturheilung dar. Der Untersuchungszeitpunkt von 70 Tagen bildet hingegen die späte Phase der Knochenheilung ab und stellt zugleich die zeitliche Grenze dar, bis zu der eine murine Fraktur geheilt sein sollte. Ist zu diesem Zeitpunkt die Fraktur nicht knöchern überbrückt, so muss von einer Pseudarthrose ausgegangen werden (Garcia et al., 2008b). Zudem wurden diese beiden Untersuchungszeitpunkte bereits in früheren Studien zur Untersuchung von Pseudarthrosen verwen-

det, sodass sich durch die Auswahl des gleichen Zeitraums wiederum eine bessere Vergleichbarkeit zu Vorstudien ergibt (Garcia et al., 2008b) (Holstein et al., 2011) (Orth et al., 2017). Retrospektiv sind die beiden gewählten Untersuchungszeitpunkte geeignet gewesen, um sowohl frühe als auch späte Prozesse der Knochenheilung beurteilen zu können und können daher auch für Folgestudien empfohlen werden.

Wie unter 2.4 beschrieben ist die korrekte Wahl der Trägersubstanz zur Applikation von Wachstumsfaktoren essenziell. Eine direkte Injektion von Wirkstoffen in den Frakturspalt ohne jegliche Trägersysteme erwies sich in der Vergangenheit als wenig wirksam: In einer Vorstudie, die ebenfalls die Auswirkungen von VEGF auf atrophe Pseudarthrosen in einem murinen Frakturmodell untersuchte, wurde VEGF direkt und ohne Trägersubstanz in den Frakturspalt injiziert (Ogilvie et al., 2012). Die nur mild ausgefallene proosteogene Wirkung des auf diesem Wege applizierten VEGF könnte darauf beruhen, dass der Wachstumsfaktor nicht in dem Defektspalt und somit ohne räumliche Applikationskontrolle verblieb und daher nicht ausreichend am Zielort wirken konnte. Dies wird gestützt durch die Studie von Eckardt und Kollegen, die ebenfalls die Wirkung von VEGF auf die atrophe Pseudarthrose am Kaninchenmodell untersuchten (Eckardt et al., 2005). Hierfür wurde rekombinantes humanes VEGF auf einen Hyaluronsäureträger aufgetragen und im Defektspalt angebracht. Auf diese Weise konnte ein positiver Effekt von VEGF auf die Defektheilung nachgewiesen werden, ohne dass der Wachstumsfaktor den Defektspalt verließ (Eckardt et al., 2005).

Analysiert wurden die Femora anhand radiologischer, biomechanischer, histologischer und proteinbiochemischer Methoden. Zur Anwendung dieser Methoden war es notwendig, die Versuchstiere zu töten, da die Femora bzw. das Kallusgewebe hierzu vollständig explantiert werden mussten. Generell gibt es Analyseverfahren, die keiner Tötung der Tiere bedürfen. So sind verschiedene bildgebenden Verfahren verfügbar, welche die Knochenheilung am lebenden Versuchstier analysieren können. Auf diese Weise lassen sich beispielsweise die Morphologie des Gewebes, Regenerations- und Umbauprozesse, die Expression verschiedener Gene, die Proteindegradation, die Migration von Zellen sowie der Zelltod am lebenden Objekt mithilfe von Mikropositronen-Emissions-Tomographie und Mikromagnetresonanztomographie darstellen (Cano et al., 2008) (Fragogeorgi et al., 2019) (Lee et al., 2009) (Lu et al., 2005) (Zachos et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden neben konventionellen Röntgenaufnahmen auch eine 2D und 3D μ CT als etablierte Verfahren zur Visualisierung und Beurteilung von Knochen durchgeführt. Im Gegensatz zur μ CT lassen sich anhand eines Röntgenbildes lediglich Größe und Dichte des Kallusgewebes in Ebenen grob abschätzen. Da es sich beim konventionellen

Röntgen um eine Projektionstechnik handelt, sind die Ergebnisse der Messung von der Position des Knochens innerhalb des Scanfeldes abhängig (Augat et al., 1997) (Garcia et al., 2008b) (Holstein et al., 2007). Die μ CT hingegen bietet die Möglichkeit den Knochen 3D zu rekonstruieren und den Defektsplatt hochauflösend morphologisch und quantitativ zu beurteilen. Außerdem ist es möglich mit verschiedenen Rekonstruktion-Softwares sogar biomechanische Parameter des Knochens zu bestimmen (Cano et al., 2008). Während die Röntgenaufnahmen in der vorliegenden Arbeit primär dazu dienen, unmittelbar postoperativ sowie vor Explantation des Knochens die korrekte Lage des Implantates zu überprüfen bzw. sekundäre Dislokationen auszuschließen, konnte durch die Analyse der rekonstruierten 3D Aufnahmen der μ CTs eine exakte Analyse des neu gebildeten Knochens erfolgen. Da MCM selbst einen Grauwert unterhalb der unter 3.2.1.2 genannten Grenze für mineralisierten Knochen haben, konnten Messfehler durch die Trägersubstanz ausgeschlossen werden.

Eine biomechanische Analyse des Knochens ist essenziell für die Beurteilung der Knochenheilung und kann generell mittels verschiedener Verfahren erfolgen: So stellt die nicht-destruktive 3-Punkt-Biegung eine weit verbreitete Methode dar, um die Biegesteifigkeit des Knochens als biomechanischen Parameter zu analysieren. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgt anhand eines Kraft-Weg-Diagramms (Histing et al., 2010). Diese Methode gewährleistet, dass die Proben intakt bleiben und somit anschließend für weitere Analysen zur Verfügung stehen. Hierdurch kann die Anzahl der Versuchstiere im Vergleich zu anderen, destruirenden Verfahren deutlich reduziert werden. Der Nachteil der 3-Punkt-Biegung ist jedoch die Messung der maximalen Belastung lediglich über einem Punkt des Knochens. Im Gegensatz hierzu stellt die 4-Punkt-Biegung ein Verfahren dar, welches eine Messung über eine Strecke ermöglicht. Dies ist zwar i. d. R. biomechanisch günstiger (Burstein & Frankel, 1971), jedoch ist die Anwendung der 4-Punkt-Biegung am Mäusefemur aufgrund der Dimensionen nicht möglich. Das durchschnittliche Mäusefemur besitzt eine Länge von etwa 14,8 mm bei einem Durchmesser von durchschnittlich etwa 1,86 mm. Zur Bestimmung der Biegesteifigkeit mittels 4-Punkt-Biegung sollte jedoch die Länge mindestens das $16 \times$ des Durchmessers betragen um Messungenauigkeiten zu verhindern (Manigrasso & O'Connor, 2004). Demnach müsste das Mäusefemur also eine Länge von knapp 30 mm aufweisen.

Alternativ zur Beurteilung von mechanischen Eigenschaften des Knochens wäre die Bestimmung der Torsionssteifigkeit durch Rotationstestung möglich gewesen. Ein Vorteil dieser Methodik im Vergleich zu den Biegetestungen besteht darin, dass leichte Ungenauigkeiten der Knochengeometrie keinen wesentlichen Einfluss auf das Ergebnis haben. Die aus den Torsionstests gewonnenen Informationen wie Scherspannung, Torsionssteifigkeit und Scher-

modul würden zur Bestimmung der Struktur- und Materialeigenschaften des Kallusgewebes beitragen. Nachteil dieses Verfahrens ist jedoch die Destruktion des Knochens während der Testung und den konsekutiv erhöhten Versuchstierbedarf (Manigrasso & O'Connor, 2004). Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit auf Torsionstestungen verzichtet und die 3-Punkt-Biegung zur Analyse der biomechanischen Eigenschaften der Proben angewandt.

Den Goldstandard der Knochenheilungsanalyse stellt die histologische Untersuchung der Knochen dar (Gerstenfeld et al., 2005) (Pritchard & Ruzicka, 1950). Die Messungen der Gesamtkallusfläche sowie der prozentualen Anteile von fibrösem, knorpeligem und knöchernem Gewebe liefern Hinweise auf den Verlauf der verschiedenen Reparaturstadien des Knochendefekts. Auch die zeitliche Abfolge der unterschiedlichen Stadien der Knochenheilung kann hierdurch beurteilt werden (siehe hierzu unter 2.2.3) (Gerstenfeld et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden die Nomenklatur sowie die Parameter nach Vorgaben der American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR) gewählt (Gerstenfeld et al., 2005). Der peri-ostale Kallusbereich wurde als sämtliches Knochen-, Knorpel- und Bindegewebe zwischen den beiden Bohrlöchern des Clips außerhalb der Kortikales definiert. Vorbestehender kortikaler Knochen sowie endostale Kallusbildungen wurden ausgeschlossen. Aufgrund der uneinheitlichen 3D Architektur des Osteotomiespalts stellt es eine Herausforderung dar, die verschiedenen Gewebe einheitlich in einem longitudinale 2D Schnittpräparat zu analysieren. Durch die Untersuchung am Punkt des maximalen Femurdurchmessers konnte jedoch trotz dessen eine einheitliche, repräsentative und reproduzierbare Analyse des Defektspalts erfolgen (Garcia et al., 2008) (Holstein et al., 2007).

Die histomorphometrische Analyse ist generell sowohl am kalzifizierten als auch am nicht kalzifizierten Knochen möglich. Die Entkalkung erlaubt eine optimale Darstellung der organischen und zellulären Anteile des Knochengewebes durch Herauslösen der anorganischen Substanzen. Die Dekalzifikation erweicht den Knochen und ermöglicht hierdurch die weitere Verarbeitung mit histologischen Routinemethoden (Lang, 2006). Jedoch kann durch diesen Prozess keine Aussage über den Kalkgehalt in der Probe getroffen werden (Gerstenfeld et al., 2005). Da dies jedoch mittels mikrocomputertomographischer Analyse vor der histologischen Auswertung bereits erfolgt war, wurde die histomorphometrische Analyse am dekalzifizierten Knochen durchgeführt. Hierdurch gelang es, die organische Zusammensetzung des Gewebes im Defektspalt genauer zu beurteilen. Eine Verwendung der Proben für die weiteren immunhistochemischen Färbungen und Auswertungen war darüber hinaus weiterhin möglich, da dies sowohl am kalzifizierten als auch am nicht kalzifizierten Knochen durchführbar ist.

Um die für die Knochenheilung relevante Proteinexpression beurteilen zu können, erfolgte eine WB-Analyse. Am murinen Knochenheilungsmodell findet bereits 10 - 14 Tage nach Fraktur eine Vaskularisierung und Kalzifikation des Kallusgewebes statt (Manigrasso et al., 2004). Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit VEGF appliziert, welches hauptsächlich in der frühen Phase der Knochenheilung wirkt (siehe 2.5.3). Die übrigen untersuchten Proteine EPO, EPO-R, RUNX-2 spielen ebenfalls in der frühen Phase der Knochenheilung im Rahmen der Angiogenese, Zellproliferation und enchondralen Osteogenese (EPO und EPO-R) (Holstein et al., 2007b) sowie der Osteoblastogenese, Knorpelformation, Zellmigration und Vaskularisation (RUNX-2) (Lin & Hankenson, 2011) (Wysokinski et al., 2015) eine vorrangige Rolle. Hingegen ist PCNA ein allgemeiner Proliferationsmarker ohne zeitlichen Bezug zur Knochenheilung (Holstein et al., 2011), der immunhistochemisch bereits zum späten Untersuchungszeitpunkt analysiert wurde. Daher entschieden wir uns im Rahmen der WB-Analyse zur Untersuchung der Proteinexpression während des frühen Studienzeitpunkts von 14 Tagen postoperativ.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie zur therapeutischen Applikation von VEGF mittels MCM als Trägermolekül in atrophen Pseudarthrosen. Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen die Hypothese, dass VEGF-beschichtete MCM in der Lage sind die Knochenheilung in einem etablierten atrophen Pseudarthrosemodell in der Maus zu verbessern. Dies wurde durch einen radiologisch nachgewiesenen erhöhten Anteil von BV / TV, einer verbesserten Biegesteifigkeit des Knochens, einer histologisch gesicherten größeren Gesamtkallusfläche des periostalen Kallusgewebes sowie der erhöhten Anzahl proliferierender Zellen nachgewiesen. Dieser Effekt kann durch ein proangiogenes und proosteogenes Expressionsprofil im Kallusgewebe von Mäusen der Gruppe MCM+VEGF erklärt werden. Die Knochenheilung war in dieser Versuchsgruppe jedoch nach wie vor unvollständig, was sich durch niedrige absolute Werte der Biegesteifigkeit, einem niedrigen ossären Überbrückungsscore und dem begrenzten Anteil von Knochengewebe in der Kalluszusammensetzung zeigte.

Die Abgabe von Proteinen bzw. bioaktiven Wirkstoffen durch biokompatible Trägersysteme ist aufgrund komplexer intramolekularer Faltung und der Anfälligkeit von Proteinen für Denaturierung und Abbau eine große Herausforderung (Yu et al., 2017). Bisher wurde versucht, diese Probleme durch Umschließung der Proteine durch bioresorbierbare Polymermatrices

wie z. B. Mikrokugeln oder Nanopartikel zu lösen (Chen & Mooney, 2003) (Jeong et al., 1997) (Richardson et al., 2001). Diese Verfahren ermöglichen eine nachhaltige Freisetzung von Proteinen. Die intrinsische Instabilität von Proteinen gegenüber externen Stressfaktoren während der Synthese solcher Konstrukte und der Abgabe bleibt jedoch ein signifikantes Problem. Solche Stressoren können Exposition gegenüber hydrophober Grenzflächen, starke mechanische Reize (z. B. Rühren), verschiedene Detergenzien während der Einarbeitung, eine erhöhte Temperatur sowie Nebenprodukte des Polymerabbaus und erhöhte Feuchtigkeitsgehalte während der Abgabe sein (Giri et al., 2011) (Yu et al., 2017).

Frühere Studien konnten außerdem zeigen, dass Proteine, die in Polymerträgern eingekapselt sind, agglomerieren und ihre Funktionalität verlieren können (Zhu et al., 2000) (Fu et al., 1999). Es wurden nur wenige Strategien entwickelt, um zu transportierende Proteine während des Einbauprozesses, der Lagerung und der Freisetzung zu stabilisieren und dadurch diese Einschränkungen zu überwinden. Für MCM konnte jedoch in vorangegangenen Studien bereits gezeigt werden, dass die Proteinbindung durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der Calciumphosphat-Mineraloberfläche und den Seitenketten der Proteine sowie durch die große Oberfläche der MCM mit ihrer typischen, plattenartigen Struktur erfolgt (Yu et al., 2014). Insbesondere die dadurch vergrößerte Oberfläche des MCM ermöglicht eine effiziente Bindung. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Mineralbeschichtung der MCM Proteine unter Extrembedingungen gegen Denaturierung und Aggregation schützt und dass nanostrukturelle Merkmale von MCM eine verbesserte Proteinstabilisierung bewirken. Dieser Proteinstabilisierungseffekt wurde genutzt, um *in vitro* und *in vivo* eine langanhaltende biologische Aktivität bei verzögerter Abgabe von Wachstumsfaktoren hervorzurufen (Orth et al., 2017) (Yu et al., 2017). Aufgrund dieser Eigenschaften eignen sich MCM hervorragend als Trägersubstanz zur Abgabe von VEGF am murinen Modell mit Knochendefekten kritischer Größe.

In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Bindungseffizienz der MCM für VEGF etwa 46 % beträgt und dadurch mit der in einer früheren Studie berichteten Bindungseffizienz vergleichbar war (Yu et al., 2014). Es war darüber hinaus während des 70-tägigen Beobachtungszeitraums keine Auflösung der MCM im Osteotomiespalt zu beobachten (Orth et al., 2017). Interessanterweise zeigte das Freisetzungsprofil von VEGF-beschichteten MCM innerhalb der ersten 7 Tage eine gesteigerte Freisetzung, die dem physiologischen Anstieg von VEGF am 5. postoperativen Tag im Rahmen der Knochenheilung bei Nagetieren entspricht (Pufe et al., 2002). Darüber hinaus zeigten die WB-Analysen nach 14 Tagen eine erhöhte Expression von VEGF im Kallusgewebe von Versuchstieren, die VEGF-beschichtete

MCM erhalten hatten, im Vergleich zu Tieren, die keine MCM erhalten hatten. Dies ist ein Hinweis auf eine erfolgreiche Implantation von bioaktiven, VEGF-beschichteten MCM im knöchernen Defektspace.

Die Angiogenese ist für einen erfolgreichen Knochenheilungsprozess von entscheidender Bedeutung und tritt insbesondere in den frühen Phasen des typischerweise sehr gut koordinierten Prozesses der Knochenheilung auf. Dementsprechend ist bekannt, dass eine unzureichende Knochenvascularisierung mit einer verminderten Knochenbildung und Knochenmasse verbunden ist (Burkhardt et al., 1987). In Vorstudien konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des VEGF-Signals die Knochenregeneration erheblich stört und zu Pseudarthrosen führen kann (Gaston & Simpson, 2007) (Hausman et al., 2001) (Street et al., 2002). In der vorliegenden Studie erhöhte die Anwendung von VEGF-beschichteten MCM im Defektspace von Mäusen das Verhältnis von BV / TV, die Biegesteifigkeit sowie die periostale Gesamtkallusfläche im Vergleich zu Tieren der Gruppen NONE und MCM. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anwendung von VEGF unter Verwendung von MCM als Trägersystem die Knochenreparatur in diesem murinen atrophischen Pseudarthrosemodell verbesserte.

Interessanterweise wurde die verbesserte Knochenreparatur bereits 14 Tage postoperativ beobachtet. Dieser Zeitpunkt repräsentiert ein frühes Stadium des Knochenheilungsprozesses. Während die erste Phase dieses Prozesses durch Hämatombildung gekennzeichnet ist, ist die zweite Phase mit der Rekrutierung von Entzündungszellen, Fibroblasten und Stammzellen verbunden. Dies führt schließlich zur Bildung des weichen Kallus. In dieser Phase wird physiologisch endogenes VEGF in hohen Mengen exprimiert. Wir schließen daraus, dass die Anwendung VEGF-beschichteter MCM in der frühen Phase des Knochenheilungsprozesses bei Versuchstieren der Gruppe MCM+VEGF 14 Tage postoperativ analog wirkte und die Knochenheilung hierdurch verbesserte.

WB-Analysen zeigten, dass die lokale Applikation von VEGF mittels MCM die Expression von proangiogenem EPO 14 Tage postoperativ erhöht. Üblicherweise wird die Expression proangiogener Zytokine durch Transkriptionsfaktoren wie z. B. HIF-1 α als Reaktion auf hypoxische Zustände reguliert (siehe hierzu unter 2.5.3). Interessanterweise konnte bereits in Hirngewebe nachgewiesen werden, dass VEGF selbst während einer Normoxie als HIF-1 α -ähnliches Signal wirken und somit die Expression von EPO induzieren kann (Bellomo et al., 2006). Daher ist es möglich, dass in der vorliegenden Studie VEGF selbst als Hypoxie-ähnliches Signal während der Knochenheilung zur Induktion von EPO gedient haben könnte. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten darüber hinaus, dass die Expression des physiologischen Rezeptors von EPO (EPO-R) zwischen den Gruppen nicht unterschiedlich war.

Dies kann durch die Tatsache erklärt werden, dass EPO eine genetische und funktionelle Homologie mit VEGF teilt, was auf eine ähnliche Rolle beider Zytokine bei der Knochenreparatur hindeutet (Holstein et al., 2011). Anhand einer Studie von Hautverletzungen und Myokardinfarkten wurde gezeigt, dass EPO die Geweberegeneration über VEGF-abhängige Pfade stimulieren kann (Galeano et al., 2006) (Westenbrink et al., 2010). Dementsprechend ist es denkbar, dass die Anwendung VEGF-beschichteter MCM nicht nur die Knochenreparatur durch VEGF selbst verbessern, sondern auch die Expression von EPO induzieren und eine anschließende synergistische Stimulation der Angiogenese über VEGF-abhängige Signalwege bewirken kann.

Die biologischen Wirkungen von VEGF werden von mehreren Rezeptoren übertragen. Während VEGFR-2 eine Schlüsselrolle für die Angiogenese spielt, wird VEGFR-1 üblicherweise als „Köder-Rezeptor“ für VEGF betrachtet (Ferrara et al., 2003). Im Rahmen der Osteogenese wird VEGFR-1 jedoch auch auf Osteoblasten exprimiert, wodurch VEGF eine chemotaktische Reaktion auslösen kann (Beamer et al., 2010). Außerdem stimuliert VEGF Endothelzellen osteoanabole Faktoren abzusondern (Bouletreau et al., 2002) (Wang et al., 1997). Damit ist VEGF ein wichtiger multifunktionaler Schlüsselfaktor bei der Knochenregeneration dessen Funktion weit über seine klassische Rolle als angiogener Wachstumsfaktor hinausgeht. Daraus schließen wir, dass die Anwendung von VEGF-beschichteten MCM in der vorliegenden Studie möglicherweise nicht nur die Knochenheilung durch eine angiogene Signalübertragung, sondern auch durch eine osteoblastogene Stimulation verbesserte.

Für die Osteoblastogenese ist RUNX-2 von zentraler Bedeutung. RUNX-2 dient als wesentlicher Regulator der Knochenbildung an der Schnittstelle vieler Signalwege zur Regulation der Differenzierung von Osteoblasten (Ducy et al., 1997) (Lin & Hankenson, 2011). Interessanterweise scheint RUNX-2 auch für die VEGF-induzierte enchondrale Knochenbildung eine wichtige Rolle zu spielen. Wie von Zelzer et al. (2001) beschrieben, zeigten RUNX-2-defiziente Mäuse weder die physiologische Hochregulation von VEGF noch die Invasion von Blutgefäßen in Knorpelgewebe während der enchondralen Ossifikation. Dies deutet darauf hin, dass VEGF RUNX-2 für die Knochenregeneration benötigt (Zelzer et al., 2001). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen nun zusätzlich vermuten, dass die Anwendung von VEGF die Expression von RUNX-2 hochregulieren kann. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Liu et al. (2012), die zeigen konnten, dass VEGF die Osteoblastogenese fördert indem es die Expression und Aktivität von RUNX-2 reguliert (Liu et al., 2012). Die Daten der vorliegenden Studie legen daher nahe, dass der osteogene Effekt VEGF-beschichteter MCM über einen RUNX-2-abhängigen Signalweg reguliert wurde. Die Ergebnisse der WB-

Analyse indizieren, dass im Kallusgewebe der Gruppe MCM+VEGF ein Expressionsprofil vorlag, das typisch für eine verbesserte Vaskularisation sowie erhöhte osteogene Aktivität ist. Obwohl die Anwendung von VEGF-beschichteten MCM die Knochenheilung verbesserte und mit einem Knochenheilungsprozess über den gesamten Untersuchungszeitraum verbunden war, heilte der Osteotomiespalt von 1,8 mm nicht vollständig. Die Biegesteifigkeit bei Tieren der MCM+VEGF-Gruppe war im Vergleich zu früheren biomechanischen Analysen unter Verwendung dieses atrophen Pseudarthrosemodells gering (Orth et al., 2017). Auch der niedrige histologische Punktwert für die Knochenüberbrückung und die geringe Fraktion an Knochen- und Knorpelgewebe 70 Tage nach erfolgter Osteotomie deuten auf eine unvollständige Heilung des Defektspalts hin. Jedoch zeigten histomorphometrische Analysen über den gesamten Untersuchungszeitraum zunehmende Anteile von knöchernem und knorpeligem Gewebe im Gesamtkallus bei Tieren der Gruppe MCM+VEGF. Darüber hinaus wiesen Tiere der MCM+VEGF-Gruppe im Vergleich zu den Tieren der anderen Gruppen signifikant mehr PCNA⁺-Zellen pro HPF auf. Dies deutet darauf hin, dass die Knochenheilung in Tieren der Gruppe MCM+VEGF noch andauerte, während die Knochenheilung in Tieren der anderen Gruppen atrophe Zustände aufwies. Dementsprechend ist es möglich, dass ein längerer Beobachtungszeitraum in der vorliegenden Arbeit einen größeren Fortschritt der Knochenregeneration bei Versuchstieren der Gruppe MCM+VEGF hätte zeigen können. Atrophe Pseudarthrosen bei Mäusen sind jedoch durch unzureichende Heilung nach mindestens 70 Tagen postoperativ definiert (Garcia et al., 2008b). Daher konnte die Anwendung von VEGF-beschichteten MCM trotz Stimulierung des Knochenheilungsprozesses die Bildung einer atrophen Pseudarthrose in diesem anspruchsvollen Modell nicht verhindern.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zuvor zeigen, dass die Anwendung von BMP-2-beschichteten MCM eine knöcherne Überbrückung des Defektspalts in diesem atrophen Pseudarthrosemodell mit einer im Vergleich zum gesunden Femur der Gegenseite relativen Biegesteifigkeit von ca. 36 % 70 Tage postoperativ ermöglicht (Orth et al., 2017). Dies deutete immer noch auf eine unvollständige Knochenregeneration hin (Orth et al., 2017). Interessanterweise konnten andere Studien zeigen, dass eine Kombination von BMP-2 und VEGF synergistisch wirkt und den Knochenheilungsprozess weiter verbessern kann als die Anwendung eines der beiden Zytokine allein (Çakır-Özkan et al., 2017) (Luo et al., 2012) (Patel et al., 2008). Daher kann vermutet werden, dass die kombinierte Anwendung von BMP-2- und VEGF-beschichteten MCM in künftigen Studien zu einer vollständigen Knochenheilung führen könnte.

5.3 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend zeigt die Verwendung von MCM zur Applikation von VEGF ein großes Potenzial aufgrund der Fähigkeit, die Proteinstabilität und -funktionalität während der Anwendung in vivo aufrechtzuerhalten. In der vorliegenden Studie wurden VEGF-beschichtete MCM auf ihre therapeutische Wirksamkeit in einem murinen femoralen atrophen Pseudarthrosemodell untersucht. Interessanterweise verbesserte die Applikation VEGF-beschichteter MCM die Knochenheilung durch Stimulation der Angiogenese und Osteoblastogenese über EPO- und RUNX-2 vermittelte Signalwege. Daher sollten MCM als Träger- und Freisetzungssystem für VEGF in Kombination mit einer herkömmlichen Osteosynthesetechnik von Interesse sein und könnten für die Behandlung von Pseudarthrosen auch von klinischem Nutzen sein.

6. Literaturverzeichnis

1. Amirian J, Linh NT, Min YK, Lee BT (2015) Bone formation of a porous Gelatin-Pectin-biphasic calcium phosphate composite in presence of BMP-2 and VEGF. *International journal of biological macromolecules*. 76: 10 - 24
2. An Y, Friedman RJ, Parent T, Draughn RA (1994) Production of a standard closed fracture in the rat tibia. *Journal of orthopaedic trauma*. 8: 111 - 5
3. Ancelin M, Chollet-Martin S, Hervé MA, Legrand C, El Benna J, Perrot-Applanat M (2004) Vascular endothelial growth factor VEGF189 induces human neutrophil chemotaxis in extravascular tissue via an autocrine amplification mechanism. *Laboratory Investigation*. 84: 502 - 12
4. Auer JA, Goodship A, Arnoczky S, Pearce S, Price J, Claes L, von Rechenberg B, Hofmann-Antenbrinck M, Schneider E, Müller-Terpitz R, Thiele F, Rippe KP, Grainger DW (2007) Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. *BMC musculoskeletal disorders*. 8: 72
5. Augat P, Merk J, Genant HK, Claes L (1997) Quantitative assessment of experimental fracture repair by peripheral computed tomography. *Calcified tissue international*. 60: 194 - 9
6. Bahney CS, Zondervan RL, Allison P, Theologis A, Ashley JW, Ahn J, Miclau T, Marcucio RS, Hankenson KD (2019) Cellular biology of fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research*. 37: 35 - 50
7. Barnhart MD, Rides CF, Kennedy SC, Aiken SW, Walls CM, Horstman CL, Mason D, Chandler JC, Brouman JD, Murphy SM, Pike F, Naber SJ (2013) Fracture Repair Using a Polyaxial Locking Plate System (PAX). *Veterinary Surgery*. 42: 60 - 66
8. Beamer B, Hettrich C und Lane J (2010) Vascular endothelial growth factor: an essential component of angiogenesis and fracture healing. *HSS journal: the musculoskeletal journal of Hospital for Special Surgery*. 6: 85 - 94
9. Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, Hoth M, Kurtz A, Leipziger J, Müller F, Pedain C, Rettig J, Wagner C, Wischmeyer E, Bob A, Bob K (2009) *Duale Reihe Physiologie*. 1. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart
10. Bellomo M, Marini H, Adamo EB, Catania MA, Mannucci C, Squadrito F, Marini R, Giuffrida R, Grasso G, Buemi M, Caputi AP, Giacca M, Calapai G (2006) Vascular endothelial growth factor induces brain erythropoietin expression? *Functional neurology*. 21: 87 - 91
11. Berchtold R, Bruch HP, Keller R, Trentz O (2006) *Berchtold Chirurgie*. 5. Auflage. Elsevier. München

12. Biberthaler P, van Griensven M (2016) Knochendefekte und Pseudarthrosen. 1. Auflage. Springer. Berlin
13. Bigam-Sadegh A und Oryan A (2015) Selection of animal models for pre-clinical strategies in evaluating the fracture healing, bone graft substitutes and bone tissue regeneration and engineering. *Connect Tissue Research*. 56: 175 - 94
14. Blumenfeld I, Srouji S, Lanir Y, Laufer D, Livne E (2002) Enhancement of bone defect healing in old rats by TGF-beta and IGF-1. *Experimental gerontology*. 37: 553 - 65
15. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H (2008) Pathologie. 4. Auflage. Urban & Fischer. München
16. Bonnarens F, Einhorn TA (1984) Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *Journal of Orthopaedic Research*. 2: 97 - 101
17. Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Steinbrech DS, Mehrara BJ, Longaker MT (2002) Factors in the fracture microenvironment induce primary osteoblast angiogenic cytokine production. *Plastic and reconstructive surgery*. 110: 139 - 48
18. Bourque WT, Gross M und Hall BK (1992) A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Laboratory animal science*. 42: 369 - 74
19. Burdick JA, Mason MN, Hinman AD, Thorne K, Anseth KS (2002) Delivery of osteoinductive growth factors from degradable PEG hydrogels influences osteoblast differentiation and mineralization. *Journal of Controlled Release*. 83: 53 - 63
20. Burkhardt R, Kettner G, Böhm W, Schmidmeier M, Schlag R, Frisch B, Mallmann B, Eisenmenger W, Gilg T (1987) Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia, primary osteoporosis, and old age: a comparative histomorphometric study. *Bone*. 8: 157 - 64
21. Burstein AH, Frankel VH (1971) A standard test for laboratory animal bone. *Journal of biomechanics*. 4: 155 - 8
22. Çakır-Özkan N, Eğri S, Bekar E, Altunkaynak BZ, Kabak YB, Kivrak EG (2017) The Use of Sequential VEGF- and BMP2-Releasing Biodegradable Scaffolds in Rabbit Mandibular Defects. *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 75: 221.e1 - 221.e14
23. Cano J, Vaquero JJ, Martínez González JM, Bascones A (2008) High resolution image in bone biology II. Review of the literature. *Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal*. 13: E31 - 5

24. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 380: 435 - 9
25. Chen RR, Mooney DJ (2003) Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering. *Pharmaceutical research*. 20: 1103 - 12
26. Cheung KMC, Kaluarachi K, Andrew G, Lu W, Chan D, Cheah KS (2003) An externally fixed femoral fracture model for mice. *Journal of orthopaedic research*. 21: 685 - 90
27. Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D, Seidl W, Margevicius KJ, Augat P (1998) Effects of Mechanical Factors on the Fracture Healing Process. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 355: S132 - S147
28. Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N, Haymore BL, Leimgruber R, Feder J (1989) Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *The Journal of biological chemistry*. 264: 20017 - 24
29. Cudmore MJ, Hewett PW, Ahmad S, Wang KQ, Cai M, Al-Ani B, Fujisawa T, Ma B, Sissaoui S, Ramma W, Miller MR, Newby DE, Gu Y, Barleon B, Weich H, Ahmed A (2012) The role of heterodimerization between VEGFR-1 and VEGFR-2 in the regulation of endothelial cell homeostasis. *Nature communications*. 3: 972
30. Danckwardt-Lillieström G, Lorenzi GL, Olerud S (1970) Intramedullary nailing after reaming. An investigation on the healing process in osteotomized rabbit tibias. *Acta orthopaedica Scandinavica*. 134: 1 - 78
31. Dos Santos Neto FL, Volpon JB (1984) Experimental nonunion in dogs. *Clinical orthopaedics and related research*. 187: 260 - 71
32. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997) *Osf2 / Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 89: 747 - 54
33. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, Alitalo K (1998) Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science*. 282: 946 - 9
34. Dvorak HF, Orenstein NS, Carvalho AC, Churchill WH, Dvorak AM, Galli SJ, Feder J, Bitzer AM, Rypysc J, Giovinco P (1979) Induction of a fibrin-gel investment: an early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor-secreted products. *Journal of immunology*. 122: 166 - 74
35. Dvorak HF (2000) VPF/VEGF and the angiogenic response. *Seminars in perinatology*. 24: 75 - 8
36. Dvorak HF (2002) Vascular permeability factor / vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of clinical oncology*. 20: 4368 - 80

37. Eckardt H, Ding M, Lind M, Hansen ES, Christensen KS, Hvid I (2005) Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. *The Journal of bone and joint surgery. British volume.* 87: 1434 - 8
38. Einhorn TA (2003) Clinical applications of recombinant human BMPs: early experience and future development. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume.* 3: 82 - 8
39. Fachinformation Avastin® (2019). Roche Registration GmbH. Grenzach-Wyhlen. (September 2019). URN: <https://www.roche.de>. URL: <https://www.roche.de/dok/Avastin-reg-Infusionsloesungskonzentrat-fachinfo-0-na-attach.pdf> (Abruf: 15.01.2020)
40. Ferrara N, Henzel WJ (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications.* 161: 851 - 8
41. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine.* 9: 669 - 676
42. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML (1995) Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 376: 66 - 70
43. Fragogeorgi EA, Rouchota M, Georgiou M, Velez M, Bouziotis P, Loudos G (2019) In vivo imaging techniques for bone tissue engineering. *Journal of tissue engineering.* 10: 2041731419854586
44. Friedman RJ, An YH, Ming J, Draughn RA, Bauer TW (1996) Influence of bio-material surface texture on bone ingrowth in the rabbit femur. *Journal of orthopaedic research.* 14: 455 - 64
45. Friess W, Uludag H, Foskett S, Biron R, Sargeant C (1999) Characterization of absorbable collagen sponges as rhBMP-2 carriers. *International journal of pharmaceutics.* 187: 91 - 9
46. Fu K, Griebenow K, Hsieh L, Klibanov AM, Langer R (1999) FTIR characterization of the secondary structure of proteins encapsulated within PLGA microspheres. *Journal of controlled release.* 58: 357 - 66
47. Galeano M, Altavilla D, Bitto A, Minutoli L, Calò M, Lo Cascio P, Polito F, Giugliano G, Squadrito G, Mioni C, Giuliani D, Venuti S, Squadrito F (2006) Recombinant human erythropoietin improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. *Critical care medicine.* 34: 1139 - 46
48. 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. *Journal of Biomechanics.* 41: 1689 - 96

49. Garcia P, Holstein JH, Maier S, Schaumlöffel H, Al-Marrawi F, Hannig M, Pohlemann T, Menger MD (2008b) Development of a Reliable Non-Union Model in Mice. *Journal of Surgical Research*. 147: 84 - 91
50. Garcia P, Herwerth S, Matthys R, Holstein JH, Histing T, Menger MD, Pohlemann T (2009) The LockingMouseNail--a new implant for standardized stable osteosynthesis in mice. *The Journal of surgical research*. 169: 220 - 6
51. Gaston MS, Simpson AH (2007) Inhibition of fracture healing. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 89: 1553 - 60
52. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N (1999) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Medicine*. 5: 623 - 8
53. Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA (2005) Application of Histomorphometric Methods to the Study of Bone Repair. *Journal of Bone and Mineral Research*. 20: 1715 - 22
54. Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM (2008) Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced drug delivery reviews*. 60: 1307 - 15
55. Giri J, Li WJ, Tuan RS, Cicerone MT (2011) Stabilization of proteins by nanoencapsulation in sugar-glass for tissue engineering and drug delivery applications. *Advanced materials*. 23: 4861 - 7
56. Glass GE, Chan JK, Freidin A, Feldmann M, Horwood NJ, Nanchahal J (2011) TNF-alpha promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108: 1585 - 90
57. Haffner-Luntzer M, Kovtun A, Rapp AE, Ignatius A (2016) Mouse Models in Bone Fracture Healing Research. *Current Molecular Biology Reports*. 2: 101 - 11
58. Haffner-Luntzer M, Hankenson KD, Ignatius A, Pfeifer R, Khader BA, Hildebrand F, van Griensven M, Pape HC, Lehmicke M (2019) Review of Animal Models of Comorbidities in Fracture-Healing Research. *Journal of Orthopaedic Research*. 37: 2491 - 8
59. Hausman MR, Schaffler MB, Majeska RJ (2001) Prevention of Fracture Healing in Rats by an Inhibitor of Angiogenesis. *Bone*. 29: 560-4
60. Henne-Bruns D, Barth E (2012) *Duale Reihe Chirurgie*. 4. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart
61. Hietaniemi K, Peltonen J und Paavolainen P (1995) An experimental model for non-union in rats. *Injury*. 26: 681 - 6

62. Hiltunen A, Vuorio E und Aro HT (1993) A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *Journal of Orthopaedic Research*. 11: 305 - 12
63. 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. *Journal of Orthopaedic Research*. 27: 1152 - 6
64. Histing T, Garcia P, Matthys R, Leidinger M, Holstein JH, Kristen A, Pohlemann T, Menger MD (2010) An internal locking plate to study intramembranous bone healing in a mouse femur fracture model. *Journal of Orthopaedic Research*. 28: 397 - 402
65. Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke MW, Wehner T, Bindl R, Recknagel S, Stuermer EK, Vollmar B, Wildemann B, Lienau J, Willie B, Peters A, Ignatius A, Pohlemann T, Claes L, Menger MD (2011) Small animal bone healing models: Standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone*. 49: 591 - 99
66. Hollister SJ (2009) Scaffold Design and Manufacturing: From Concept to Clinic. *Advanced Materials*. 21: 3330 - 42
67. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T (2007) Development of a locking femur nail for mice. *Journal of Biomechanics*. 40: 215 - 9
68. 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 Sciences*. 80: 893 - 900
69. Holstein JH, Matthys R, Histing T, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Meier C, Pohlemann T, Menger MD (2009) Development of a stable closed femoral fracture model in mice. *The Journal of surgical research*. 153: 71 - 5
70. Holstein JH, Orth M, Scheuer C, Tami A, Becker SC, Garcia P, Histing T, Mörsdorf P, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2011) Erythropoietin stimulates bone formation, cell proliferation, and angiogenesis in a femoral segmental defect model in mice. *Bone*. 49: 1037 - 45
71. Hu K, Olsen BR (2016) The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone*. 91: 30 - 8
72. Hurley MM, Adams DJ, Wang L, Jiang X, Burt PM, Du E, Xiao L (2016) Accelerated fracture healing in transgenic mice overexpressing an anabolic isoform of fibroblast growth factor 2. *Journal of Cellular Biochemistry*. 117: 599 - 611
73. Ir'ianov IM, Kir'ianov NA und Popkov AV (2014) [Fracture healing under intramedullary insertion of wires with hydroxyapatite coating]. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk*. 7 - 8: 127 - 32

74. Jeong B, Bae YH, Lee DS, Kim SW (1997) Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems. *Nature*. 388: 860 - 2
75. Junqueira LCU, Carneiro J, Gratzl M, Mayerhofer A, Schilling K, Richter W, Wurzigler LJ (2005) *Junqueira Carneiro Histologie*. 6.Auflage. Springer. Berlin
76. Kaderly RE (1991) Primary bone healing. *Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)*. 6: 21 - 5
77. Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, Schemitsch EH, Giannoudis PV (2008) Fracture vascularity and bone healing: A systematic review of the role of VEGF. *Injury*. 39: 45 - 57
78. Kim KJ, Li B, Houck K, Winer J, Ferrara N (1992) The Vascular Endothelial Growth Factor Proteins: Identification of Biologically Relevant Regions by Neutralizing Monoclonal Antibodies. *Growth Factors*. 7: 53 - 64
79. King WJ, Krebsbach PH (2012) Growth factor delivery: how surface interactions modulate release in vitro and in vivo. *Advanced drug delivery reviews*. 64: 1239 - 56
80. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680 - 5
81. Lang G (2006) *Histotechnik Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 1. Auflage. Springer. Wien
82. Lee SW, Padmanabhan P, Ray P, Gambhir SS, Doyle T, Contag C, Goodman SB, Biswal S (2009) Stem cell-mediated accelerated bone healing observed with in vivo molecular and small animal imaging technologies in a model of skeletal injury. *Journal of Orthopaedic Research*. 27: 295 - 302
83. Lettin AW (1965) The effects of axial compression on the healing of experimental fractures of the rabbit tibia. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. 58: 882 - 6
84. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 246: 1306 - 9
85. Li J, Zhang YP, Kirsner RS (2003) Angiogenesis in wound repair: Angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microscopy Research and Technique*. 60: 107 - 114
86. Liebschner MAK (2004) Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials*. 25: 1697 - 714
87. Lim S, Zhang Y, Zhang D, Chen F, Hosaka K, Feng N, Seki T, Andersson P, Li J, Zang J, Sun B, Cao Y (2014) VEGFR2-mediated vascular dilation as a mechanism of VEGF-induced anemia and bone marrow cell mobilization. *Cell reports*. 9: 569 - 80

88. Lin GL, Hankenson KD (2011) Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*. 112: 3491 - 3501
89. Liu Y, Berendsen AD, Jia S, Lotinun S, Baron R, Ferrara N, Olsen BR (2012) Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. *Journal of Clinical Investigation*. 122: 3101 - 13
90. Lu C, Miclau T, Hu D, Hansen E, Tsui K, Puttlitz C, Marcucio RS (2005) Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *Journal of Orthopaedic Research*. 23: 1300 - 7
91. Luo T, Zhang W, Shi B, Cheng X, Zhang Y (2012) Enhanced bone regeneration around dental implant with bone morphogenetic protein 2 gene and vascular endothelial growth factor protein delivery. *Clinical oral implants research*. 23: 467 - 73
92. Manigrasso MB, O'Connor JP (2004) Characterization of a closed femur fracture model in mice. *Journal of orthopaedic trauma*. 18: 687 - 95
93. Mark H Bergholm J, Nilsson A, Rydevik B, Strömberg L (2003) An external fixation method and device to study fracture healing in rats. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 74: 476 - 82
94. Markel MD, Bogdanske JJ, Xiang Z, Klohnen A (1995) Atrophic nonunion can be predicted with dual energy x-ray absorptiometry in a canine osteotomy model. *Journal of Orthopaedic Research*. 13: 869 - 75
95. Marsell R, Einhorn TA (2011) The biology of fracture healing. *Injury*. 42: 551 - 5
96. Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R (2001) Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comparative medicine*. 51: 292 - 9
97. Merezhinskii MF, Cherkasova LS, Kutsenko ZM (1955) [Ascorbic acid in tissue in white mice in experimental fractures during administration of various types of food]. *Voprosy pitaniia*. 14: 26 - 30
98. Messori A (2014) Avastin-Lucentis: off-label and surroundings. *Recenti progressi in medicina*. 105: 137 - 40
99. 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 - 8
100. Mills LA, Simpson AH (2012) In vivo models of bone repair. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. 94: 865 - 74

101. Moreira IS, Fernandes PA, Ramos MJ (2007) Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Inhibition - A Critical Review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 7: 223 - 245
102. Newman E, Turner AS, Wark JD (1995) The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone*. 16: 277S - 84S
103. Nunamaker DM (1998) Experimental models of fracture repair. *Clinical orthopaedics and related research*. 355: S56 - 65
104. Ogilvie CM, Lu C, Marcucio R, Lee M, Thompson Z, Hu D, Helms JA, Mclau T (2012) Vascular endothelial growth factor improves bone repair in a murine nonunion model. *The Iowa orthopaedic journal*. 32: 90 - 4
105. Olerud S, Danckwardt-Lillieström G (1968) Fracture healing in compression osteosynthesis in the dog. *The Journal of bone and joint surgery*. 50: 844 - 51
106. Oni OO (1995) A non-union model of the rabbit tibial diaphysis. *Injury*. 26: 619-22
107. Orth M, Kruse NJ, Braun BJ, Scheuer C, Holstein JH, Khalil A, Yu X, Murphy WL, Pohlemann T, Laschke MW, Menger MD (2017) BMP-2-coated mineral coated microparticles improve bone repair in atrophic non-unions. *European Cells and Materials*. 33: 1 - 12
108. Orth M, Shadmanov T, Scheuer C, Braun BJ, Fritz T, Holstein JH, Histing T, Laschke MW, Pohlemann T, Menger MD (2018) Marble-derived microcalcite improves bone healing in mice osteotomy. *Biomedical Materials*. 14: 025001
109. Orth M, Altmeyer MAB, Scheuer C, Braun BJ, Holstein JH, Eglin D, D'Este M, Histing T, Laschke MW, Pohlemann T, Menger MD (2018b) Effects of locally applied adipose tissue-derived microvascular fragments by thermoresponsive hydrogel on bone healing. *Acta biomaterialia*. 77: 201 - 11
110. Park SH, O'Connor K, Sung R, McKellop H, Sarmiento A (1999) Comparison of healing process in open osteotomy model and closed fracture model. *Journal of orthopaedic trauma*. 13: 114 - 20
111. Park SH, Silva M, Bahk WJ, McKellop H, Lieberman JR (2002) Effect of repeated irrigation and debridement on fracture healing in an animal model. *Journal of Orthopaedic Research*. 20: 1197 - 204
112. Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong ME, Mikos AG (2008) Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone*. 43: 931 - 40
113. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG (2007) Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *European cells & materials*. 13:1 - 10

114. Petters RM, Sommer, JR (2000) Transgenic animals as models for human disease. *Transgenic research*. 9: 347 - 51
115. Porter DG (1992) Ethical scores for animal experiments. *Nature*. 356: 101 - 2
116. Preininger B, Checa S, Molnar FL, Fratzl P, Duda GN, Raum K (2011) Spatial-temporal mapping of bone structural and elastic properties in a sheep model following osteotomy. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 37: 474 - 83
117. Pritchard JJ (1946) Repair of fractures of the parietal bone in rats. *Journal of anatomy*. 80: 55 - 60
118. Pritchard JJ, Ruzicka AJ (1950) Comparison of fracture repair in the frog, lizard and rat. *Journal of anatomy*. 84: 236 - 61
119. Pufe T, Wildemann B, Petersen W, Mentlein R, Raschke M, Schmidmaier G (2002) Quantitative measurement of the splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor in the time flow of fracture healing: a study in the rat. *Cell and tissue research*. 309: 387 - 92
120. Rai B, Teoh SH, Hutmacher DW, Cao T, Ho KH (2005) Novel PCL-based honeycomb scaffolds as drug delivery systems for rhBMP-2. *Biomaterials*. 26: 3739 - 48
121. Reifenrath J, Angrisani N, Lalk M, Besdo S (2014) Replacement, refinement, and reduction: Necessity of standardization and computational models for long bone fracture repair in animals. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 102: 2884 - 900
122. Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ (2001) Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nature Biotechnology*. 19: 1029 - 34
123. Scharf HP, Rüter A, Pohlemann T, Marzi I, Kohn DGK (2011) *Orthopädie und Unfallchirurgie: Facharztwissen nach der neuen Weiterbildungsordnung*. 2. Auflage. Elsevier. München
124. Schiebler TH, Korf HW (2007) *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. 10. Auflage. Springer. Berlin
125. Seamon J, Wang X, Cui F, Keller T, Dighe AS, Balian G, Cui Q (2013) Adenoviral Delivery of the VEGF and BMP-6 Genes to Rat Mesenchymal Stem Cells Potentiates Osteogenesis. *Bone marrow research*. 2013: 737580
126. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 219: 983 - 5

127. Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, Feder J, Dvorak HF (1990) Purification and NH₂-Terminal Amino Acid Sequence of Guinea Pig Tumor-secreted Vascular Permeability Factor. *Cancer Research*. 50: 1774 - 8
128. Shalaby F, Janet R, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 376: 62 - 6
129. Shapiro F (1988) Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. 70: 1067-81
130. Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L (2016) Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 17: 611 - 25
131. Street J, Winter D, Wang JH, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP (2000) Is human fracture hematoma inherently angiogenic? *Clinical orthopaedics and related research*. 378: 224 - 37
132. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV Jr, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH (2002) Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99: 9656 - 61
133. Suárez-González D, Barnhart K, Migneco F, Flanagan C, Hollister SJ, Murphy WL (2012) Controllable mineral coatings on PCL scaffolds as carriers for growth factor release. *Biomaterials*. 33: 713 - 21
134. Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, Murtomäki A, Suchting S, Wirzenius M, Waltari M, Hellström M, Schomber T, Peltonen R, Freitas C, Duarte A, Isoniemi H, Laakkonen P, Christofori G, Ylä-Herttuala S, Shibuya M, Pytowski B, Eichmann A, Betsholtz C, Alitalo K (2008) Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature*. 454: 656 - 60
135. Tang W, Yang F, Li Y, De Crombrughe B, Jiao H, Xiao G, Zhang C (2012) Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) by osteoblast-specific transcription factor osterix (Osx) in osteoblasts. *The Journal of biological chemistry*. 287: 1671 - 8
136. Teixeira CR, Rahal SC, Volpi RS, Taga R, Cestari TM, Granjeiro JM, Vulcano LC, Correa MA (2007) Tibial segmental bone defect treated with bone plate and cage filled with either xenogeneic composite or autologous cortical bone graft. An experimental study in sheep. *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology*. 20: 269 - 76
137. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K (2000) Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Research*. 60: 203 - 12

138. Vempati P, Popel AS, Mac Gabhann F (2014) Extracellular regulation of VEGF: Isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 25: 1 - 19
139. Wang DS, Miura M, Demura H, Sato K (1997) Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells. *Endocrinology*. 138: 2953 - 62
140. Westenbrink BD, Ruifrok WP, Voors AA, Tilton RG, van Veldhuisen DJ, Schoemaker RG, van Gilst WH, de Boer RA (2010) Vascular endothelial growth factor is crucial for erythropoietin-induced improvement of cardiac function in heart failure. *Cardiovascular research*. 87: 30 - 9
141. Wildemann B, Bamdad P, Holmer Ch, Haas NP, Raschke M, Schmidmaier G (2004) Local delivery of growth factors from coated titanium plates increases osteotomy healing in rats. *Bone*. 34: 862 - 8
142. Wysokinski D, Pawlowska E und Blasiak J (2015) RUNX2: A Master Bone Growth Regulator That May Be Involved in the DNA Damage Response. *DNA and cell biology*. 34: 305 - 15
143. Yamamoto M, Tabata Y, Hong L, Miyamoto S, Hashimoto N, Ikada Y (2000) Bone regeneration by transforming growth factor beta1 released from a biodegradable hydrogel. *Journal of controlled release*. 64: 133 - 42
144. Ylä-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J (2007) Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *Journal of the American College of Cardiology*. 49: 1015 - 26
145. Yu X, Khalil A, Dang PN, Alsberg E, Murphy WL (2014) Multilayered Inorganic Microparticles for Tunable Dual Growth Factor Delivery. *Advanced functional materials*. 24: 3082 - 93
146. Yu X, Biedrzycki AH, Khalil AS, Hess D, Umhoefer JM, Markel MD, Murphy WL (2017) Nanostructured Mineral Coatings Stabilize Proteins for Therapeutic Delivery. *Advanced materials*. 29: 1701255
147. Zachos TA, Bertone AL, Wassenaar PA, Weisbrode SE (2007) Rodent Models for the Study of Articular Fracture Healing. *Journal of investigative surgery*. 20: 87 - 95
148. Zelzer E, Glotzer DJ, Hartmann C, Thomas D, Fukai N, Soker S, Olsen BR (2001) Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1 / Runx2. *Mechanisms of development*. 106: 97 - 106
149. Zhang L, Leeman E, Carnes DC, Graves DT (1991) Human osteoblasts synthesize and respond to platelet-derived growth factor. *The American journal of physiology*. 261: C348 - 54

150. Zhu G, Mallery SR, Schwendeman SP (2000) Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly (lactide- co-glycolide). *Nature Biotechnology*. 18: 52 - 57

7. Abkürzungs- / Abbildungs- / Tabellenverzeichnis

7.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
&	und
Ø	Durchmesser
<	kleiner
>	größer
±	Plusminus
®	Registered Trademark (eingetragene Handelsmarke)
°	Grad
°C	Grad Celsius
α	Alpha
β	Beta
μA	Mikroampère
μCT	Mikrocomputertomographie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
A	Ampère
Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of Variance (einfaktorielle Varianzanalyse)
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ASBMR	American Society of Bone and Mineral Research (amerikanische Gesellschaft für Knochen- und Mineralforschung)
bFGF	Basic fibroblast growth factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
BMD	Bone mineral density (Knochendichte)
BMP	Bone morphogenetic protein (knochenmorphogenetisches Protein)
BSU	Basic multicellular unit (multizelluläre Grundeinheit)

BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
BV	Bone volume (Knochenvolumen)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
Ca ²⁺ Cl	Kalziumchlorid
CaHA	Calciumhydroxylapatit
cb	cortical bone (kortikaler Knochen)
CD-1	Cluster of Differentiation 1 (internationales System zur Bezeichnung von Differenzierungsantigenen)
cm	Zentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
ct	cartilage tissue (Knorpelgewebe)
Cu	Kupfer
Cu-Sulfat	Kupfersulfat
Da	Dalton
dh	drilling holes (Bohrlöcher des Clips)
d. h.	das heißt
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ECL	Enhanced Chemiluminescence (erweiterte Chemilumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	Et alii (und andere)
EPO	Erythropoetin
EPO-R	Erythropoetin Rezeptor
FGF	Fibroblast growth factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
ft	fibrous tissue (Bindegewebe)
G	Erdbeschleunigung
G	Gauge
g	Gramm
g / cm ³	Gramm pro Kubikzentimeter
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
GH	Growth factor (Wachstumsfaktor)
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung

h	Stunde(n)
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
H ₂ O	Wasser
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
HPF	High power field; Hochauflösendes Feld
i. d. R.	in der Regel
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IgG	Immunglobulin G
Ihh	Indian hedgehog
IL-1 α	Interleukin-1 α
IL-1 β	Interleukin-1 β
inkl.	inklusive
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kV	Kilovolt
lp / mm	Linepairs per milimeter (Linienpaare pro Millimeter)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)
MCM	Mineral Coated Microparticles (Mineralien-beschichtete Mikropartikel)
M-CSF	Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mm ⁴	Einheit des Flächenträgheitsmoments
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mSBF	modified simulated body fluid (modifizierte simulierte Körperflüssigkeit)
N	Newton

n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalzlösung)
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NRP-1	Neuropilin-1
OPG	Osteoprotegerin
P1GF	Placenta Growth Factor (Plazenta Wachstumsfaktor)
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatpuffer-Kochsalzlösung)
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet derived growth factor
PI3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMOI	Polarer Torsionswiderstand
POD	Peroxidase
PTHrP	Parathormone-related peptide
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
RANK	Receptor for activation of nuclear factor kappa B
RANKL	Receptor for activation of nuclear factor kappa B Ligand
ROI	Region of interest (Bereich von Interesse)
RT	Raumtemperatur
RUNX-2	Runt-related transcription factor-2
s	Sekunde(n)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
sog.	sogenannte(n)
Tab.	Tabelle
TBS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-buffered saline (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-gepufferte Kochsalzlösung)
TBS-T	Tris-buffered saline mit Tween20
TEMED	Thermo Scientific Pierce Tetramethylethylendiamin
TGF-β	Transforming growth factor-β

TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNP-470	O-(chloroacetylcarbamoyl)fumagillol
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TV	Tissue volume (Gewebevolumen)
u. a.	unter anderem
U / min	Umdrehungen pro Minute
USA	United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)
V	Volt
v. a.	vor allem
V-Atpase	Vacuolar-type H ⁺ -ATPase (vakuoläre H ⁺ -ATPase)
VEGF	Vascular endothelial growth factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor)
VPF	Vascular permeability factor (vaskulärer Permeabilitätsfaktor)
vs.	versus
WB	Western Blot
×	Multiplikationszeichen
z. B.	zum Beispiel

7.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Morphologie von MCMs mit unterschiedlichen Carbonatkonzentrationen.
- Abb. 2 Schematische Darstellung der VEGF-Rezeptoren und Liganden.
- Abb. 3 Operationsinstrumente (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 4 Ventrale Ansicht des fixierten, rechten Beines des Versuchstiers (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 5 Eröffnung durch Hautinzision. Sicht auf das Ligamentum patellae (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 6 Luxation der Patella nach lateral nach Schnitt medial des Ligamentum patellae (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 7 Markraumeröffnung innerhalb der Fossa intercondylaris mit dem Mikrobohrer (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 8 Abmessung der Markraumlänge anhand einer Kanüle ($\varnothing = 0,45$ mm) (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 9 Einführen der abgeflachten Kanüle (Pin; $\varnothing = 0,55$ mm) (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 10 Kürzen des Pins am zuvor markierten Bereich (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 11 Sicht von ventral auf die Fossa intercondylaris mit eingebrachtem und gekürzte Pin (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 12 Reposition der Patella sowie Refixation des Kniegelenks mit 5-0 Prolene® (Ethicon) (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 13 Hautnaht mit 5-0 Prolene® (Ethicon) (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 14 Seitliche Lagerung des Versuchstiers mit Eröffnung des lateralen Zugangsweges (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 15 Stumpfe Präparation des Femurs (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 16 Fixation des Femurs mithilfe eines Klemmchens (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 17 Perforation des Femurs zur späteren Clip-Implantation (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 18 Einbringen des vorgefertigten Clips und Abmessung der Distanz zur Bohrung des zweiten Lochs (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 19 Bohrung des zweiten Loches (eigene Aufnahme, 2017).

- Abb. 20 Einbringen des Clips sowie Anbiegen der dorsalen Enden zur Stabilisierung (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 21 Osteotomie des zirkulären Knochendefektes mittels Fräskopf (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 22 Induzierter Defektspalt von 1,8 mm Länge (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 23 Applikation von VEGF-beschichteter MCM bzw. unbeschichteter MCM (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 24 Applizierte MCM im Frakturspalt (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 25 Vorsichtiger Weichteilverschluss mit 5-0 Prolene® (Ethicon) (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 26 Hautnaht mit 5-0 Prolene® (Ethicon) (eigene Aufnahme, 2017).
- Abb. 27 Charakterisierung von VEGF-beladenen MCM.
- Abb. 28 Röntgenaufnahmen der osteotomierten Mäusefemora mit einem Defektspalt von 1,8 mm (a - f).
- Abb. 29 μ CT-Analyse der Femora.
- Abb. 30 Biomechanische Analyse der osteotomierten Mäusefemora.
- Abb. 31 Longitudinale histologische Femur-Schnittpräparate im Bereich des Defektspalts nach Safranin-O-Färbung.
- Abb. 32 Kallusfläche und -zusammensetzung.
- Abb. 33 Immunhistochemische Analyse des Kallusgewebes.
- Abb. 34 WB-Analyse des Kallusgewebes.
- Abb. 35 Expression von VEGF innerhalb des Kallusgewebes der Kontrolle (n = 3), MCM (n = 3) und MCM+VEGF (n = 3) 14 Tage nach der Osteotomie.
- Abb. 36 Expression von EPO innerhalb des Kallusgewebes der Gruppen NONE (n = 3), MCM (n = 3) und MCM+VEGF (n = 3) 14 Tage nach der Osteotomie.
- Abb. 37 Expression von EPO-R innerhalb des Kallusgewebes der Gruppen NONE (n = 3), MCM (n = 3) und MCM+VEGF (n = 3) 14 Tage postoperativ.
- Abb. 38 Expression von RUNX-2 innerhalb des Kallusgewebes der Gruppen NONE (n = 3), MCM (n = 3) und MCM+VEGF (n = 3) 14 Tage nach der Osteotomie.
- Abb. 39 Expression von PCNA innerhalb des Kallusgewebes der Gruppen NONE (n = 3), MCM (n = 3) und MCM + VEGF (n = 3) 14 Tage nach der Osteotomie.

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Ionenzusammensetzung der mSBF.

Tab. 2 Versuchsprotokoll.

Tab. 3 Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele für die WB-Analyse.

Tab. 4 Primärantikörper für die WB-Analyse.

Tab. 5 Sekundärantikörper für die WB-Analyse.

8. Publikationen

Die vorliegende Arbeit wurde wie folgt publiziert:

Vortrag:

Orth M, Shenar AK, Orth P, Braun B, Holstein JH, Pohlemann T, Laschke MW, Menger MD (2018) VEGF-beschichtete Mineral Coated Microparticles verbessern die Knochenbildung in atrophem Pseudarthrosen. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, Berlin, Deutschland

Publikation:

Orth M, Shenar AK, Scheuer C, Braun BJ, Herath SC, Holstein JH, Histing T, Yu X, Murphy WL, Pohlemann T, Laschke MW, Menger MD (2019) VEGF-loaded mineral-coated microparticles improve bone repair and are associated with increased expression of epo and RUNX-2 in murine non-unions. 37: 821 - 31

9. Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Klinisch - Experimentelle Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg erstellt. Mein herzlicher Dank gilt:

Prof. Dr. med. Tim Pohlemann. Für die großzügige Unterstützung meiner wissenschaftlichen und studentischen Tätigkeiten und die Überlassung des Themas sowie die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten.

PD Dr. med. Marcel Orth. Für die intensive und freundschaftliche fachliche Beratung, sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit und seiner unschätzbaren Betreuung. Ohne seine Hilfe wäre die Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen.

Prof. Dr. med. Michael D. Menger. Für die Hilfe bei der Durchführung der Arbeit und für die großzügige Bereitstellung der Räumlichkeiten und Gerätschaften.

Dr. rer. nat. C. Scheuer, Frau J. Becker und Frau J. Parakenings. Für die tatkräftige Unterstützung und Hilfestellung in der Durchführung der, histologischen, immunhistochemischen und proteinbiochemischen Analysen.

Dr. med. vet. Monika Frings. Für die Unterstützung und Hilfestellung im Umgang mit den Tieren und ihr Einverständnis zur Durchführung des Tierversuchs.

Ferner möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen aus dem Institut für Klinisch - Experimentelle Chirurgie in Homburg für ein sehr angenehmes Arbeitsklima und die erstklassige Zusammenarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt schließlich neben vielen Freunden meinen Eltern, die meine Arbeit mit großem Engagement unterstützt haben. Der größte Dank gebührt Mihail, ohne dessen unermüdliche Unterstützung die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre.