

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

**Einfluss der Osteotomie und Fraktur auf die
Knochenheilung im Mausmodell
- Eine experimentelle Vergleichsstudie -**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2017

vorgelegt von: Andrea Stieger
geb. am: 17.04.1984 in Reschitz/Rumänien

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

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Jahr der Promotion: 2017

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung / Summary	1
1.1	Zusammenfassung	1
1.2	Summary	2
2	Einleitung	3
2.1	Knochen	3
2.1.1	Morphologie	3
2.1.2	Bestandteile des Knochengewebes	3
2.1.3	Histologie	6
2.1.4	Funktion	8
2.2	Frakturheilung	9
2.2.1	Primäre Frakturheilung	10
2.2.2	Sekundäre Frakturheilung	11
2.3	Wachstumsfaktoren	14
2.3.1	Bone morphogenetic proteins (BMP)	14
2.3.2	Receptor activator of NF- κ B Ligand und Osteoprotegerin	15
2.3.3	Cystein rich protein-61	16
2.3.4	Vascular endothelial growth factor	17
2.3.5	Kollagene	17
2.4	Tiermodelle und Osteosynthesetechniken	18
2.5	Fragestellung und Zielsetzung	22
3	Material und Methodik	23
3.1	Studiendesign	23
3.2	Tiermodell	24
3.3	Intervention	25
3.3.1	Narkose	25
3.3.2	Operation	26
3.3.3	Tötung der Tiere	30
3.3.4	Präparation des Knochens	30
3.4	Zielkriterien und Auswertung	30
3.4.1	Radiologie	30

3.4.2	Biomechanik	31
3.4.3	Histologie	33
3.4.4	Western Blot	37
3.5	Statistik	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Postoperativer Verlauf	44
4.2	Makroskopischer Befund	44
4.3	Radiologie	45
4.3.1	Computertomographie	45
4.4	Biomechanik	48
4.5	Histologie	50
4.5.1	Histomorphometrie	50
4.5.2	Immunhistochemie	59
4.6	Western Blot	61
5	Diskussion	65
5.1	Diskussion der Methoden	65
5.2	Diskussion der Ergebnisse	69
6	Literaturverzeichnis	75
7	Abbildungsverzeichnis	84
8	Tabellenverzeichnis	86
9	Publikationen und Vorträge	87
10	Danksagung	88
11	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A.	Aqua
Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
APS	Ammoniumpersulfat
ASBMR	American Society of Bone and Mineral Research
BMP	bone morphogenetic protein
BMU	basic metabolizing (multicellular) unit
BSA	bovine (Rinder) serum albumin
Ca	Calcium
ca.	circa
CD-1	Cluster of differentiation -1
Cl	Chlor
cm	Zentimeter
Col	Kollagen
CT	Computertomographie
Cyr-61	Cystein rich protein 61
DAB	Diaminobenzidin
dest.	destilliert
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
etc.	et cetera
G	Gauge
g	Gramm
ges.	gesamt
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
H	Wasserstoff
HPF	high power field
i.d.R	in der Regel
IgG	Immunglobulin Gamma
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
l	Liter
µl	Mikroliter
m	männlich
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minuten

ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm ²	Quadratmillimeter
MSC	Mesenchymale Stammzellen
M-CSF	Makrophage-colony stimulating factor (Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor)
MW	Mittelwert
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (nukleärer Faktor an Promotor leichter Kappa Ketten von B-Lymphozyten bindend)
nm	Nanometer
O	Sauerstoff
OP	Operation
OPG	Osteoprotegerin
o.g.	oben genannt
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCA	periosteal callus area
PDG	platelet derived growth factor
pH	pondus Hydrogenii
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RANK(L)	receptor activator of NF- κB (ligand)
ROI	region of interest
RT	Raumtemperatur
SDS-Page	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
SEM	standard error of the mean
sek.	Sekunden
Tab.	Tabelle
TBS-(T)	Tris gepufferte Salzlösung und Tween (Polysorbat) 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIFF	tagged Image File Format
TGF-β	transforming growth factor - beta
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha (Tumornekrosefaktor-alpha)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
VEGF	vascular endothelial growth factor
V	Volt
vs.	versus
W	Watt
z.B.	zum Beispiel

1 Zusammenfassung / Summary

1.1 Zusammenfassung

Zur Untersuchung molekularer Mechanismen der Frakturheilung existiert bereits eine Vielzahl von Osteotomie- und Frakturmodellen der Maus. Bis dato gibt es jedoch nur wenige Informationen darüber, ob sich der Heilungsprozess nach Osteotomie oder Fraktur des Knochens unterscheidet. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Unterschiede im Heilungsprozess nach Osteotomie und Fraktur am Femur der Maus zu untersuchen.

Insgesamt wurden für diese Studie 40 CD-1 Mäuse untersucht. Bei 20 Mäusen wurde eine offene Osteotomie durchgeführt. Bei weiteren 20 Mäusen wurde das Femur offen frakturiert. In beiden Gruppen erfolgte die Stabilisierung mittels intramedullärer Schraube. Die Knochenheilung wurde nach zwei und fünf Wochen postoperativ radiologisch, biomechanisch, histologisch, immunhistologisch, sowie mittels Western Blot Analyse untersucht. Nach Osteotomie der Knochen zeigte sich eine signifikant geringere Biegesteifigkeit im Vergleich zur Frakturgruppe. In den Mikro-Computertomographie-Untersuchungen (μ -CT) konnte ein geringerer Anteil von Knochengewebe im neu gebildeten Kallus nach Osteotomie nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich histologisch ein signifikant geringerer Anteil an Knochengewebe im Kallus nach Osteotomie (26% und 88% zwei Wochen bzw. fünf Wochen postoperativ) im Vergleich zur Frakturgruppe (50% und 100%). Insgesamt zeigte sich ein verzögerter Remodelingprozess nach Osteotomie der Femora. Interessanterweise unterschied sich die Expression der beiden Wachstumsfaktoren bone morphogenetic protein (BMP)-2 und (BMP)-4 in der Western Blot Analyse nicht signifikant. Es konnte jedoch eine höhere Expression von Kollagen-2, sowie der angiogenen Wachstumsfaktoren Cystein rich protein (Cyr)-61 und vascular endothelial growth factor (VEGF) in der Osteotomiegruppe nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Heilungsprozess nach Osteotomie im Vergleich zur Fraktur deutlich verzögert ist. Dies sollte bei Studien zur Untersuchung molekularer Mechanismen der Frakturheilung berücksichtigt werden.

1.2 Summary

Murine osteotomy and fracture models have become the standard to study molecular mechanisms of bone healing. Because there is little information whether the healing of osteotomies differs from that of fractures, we herein studied in mice the healing of femur osteotomies compared to femur fractures.

Twenty CD-1 mice underwent a standardized open femur osteotomy. Another 20 mice received a standardized open femur fracture. Stabilization was performed by an intramedullary screw. Bone healing was studied by micro-CT, biomechanical, histomorphometric, immunohistochemical and protein expression analyses. Osteotomies revealed a significantly lower biomechanical stiffness compared to fractures. Micro-CT showed a reduced bone/tissue volume within the callus of the osteotomies. Histomorphometric analyses demonstrated also a significantly lower amount of osseous tissue in the callus of osteotomies (26% and 88% after 2 and 5 weeks) compared to fractures (50% and 100%). This was associated with a delayed remodeling. Western blot analyses demonstrated comparable bone morphogenetic protein (BMP)-2 and (BMP)-4 expression, but higher levels of collagen-2, cystein rich protein (Cyr)-61 and vascular endothelial growth factor (VEGF) after osteotomy.

Therefore, we conclude that open femur osteotomies in mice show a markedly delayed healing when stabilized less rigidly with an intramedullary screw. This should be considered when choosing a model for studying the mechanisms of bone healing in mice.

2 Einleitung

2.1 Knochen

2.1.1 Morphologie

Knochen werden aufgrund ihrer Form unterschieden in:

- *Ossa longa* (Lange- bzw. Röhrenknochen, z.B. Oberarm- und Oberschenkelknochen)
 - *Ossa brevia* (kurze Knochen, z.B. Hand- und Fußwurzelknochen)
 - *Ossa plana* (platte Knochen, z.B. Schulterblatt und Beckenschaufel)
 - *Ossa pneumatica* (luftgefüllte Knochen, z.B. Warzenfortsatz im Schläfenbein)
 - *Ossa irregularia*, die keiner der o.g. Gruppen zuzuordnen sind
- (Aumüller G *et al.* 2006)

Die Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit wurden an langen Röhrenknochen durchgeführt. An Röhrenknochen werden unterschieden:

- die **Epiphysen** am distalen und proximalen Ende
 - zwischen den beiden Epiphysen liegt die **Diaphyse**
 - die **Metaphysen** verbinden die Diaphyse mit den jeweiligen Epiphysen
- (Aumüller G *et al.* 2006)

Bei dieser Arbeit wurde der Knochenheilungsprozess im Bereich der Diaphyse untersucht.

2.1.2 Bestandteile des Knochengewebes

Knochengewebe besteht zum einen aus spezialisierten Zellen, zum anderen aus nichtzellulären Elementen. Zu den Zellen gehören Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten und mesenchymale Vorläuferzellen. Zusammen bilden diese Zellen ein dynamisches und reaktives System zum Knochenwachstum, zur Knochenheilung und zum Umbau des Knochengewebes.

Die Knochenmatrix, als nicht zellulärer Teil des Knochengewebes, besteht aus einem organischen und einem anorganischen Anteil, wobei der organische Anteil aus Kollagen, Proteoglykanen, Glykoproteinen, Phospholipiden und Phosphoproteinen und der anorganische Anteil aus Calciumhydroxyapatit und Calciumphosphat besteht (Webb JCJ und Tricker J 2000).

Osteoblasten: Sie sind die knochenbildenden Zellen und stammen von pluripotenten, mesenchymalen Stammzellen ab. Sie synthetisieren und sezernieren die organischen Komponenten der Knochenmatrix und steuern deren Mineralisation (Abb. 1). Die von Osteoblasten produzierte Matrix wird als Osteoid bezeichnet. Die Sekretion der Matrixproteine, vorwiegend Kollagen-1, findet an der mit der Matrix in Verbindung stehenden Zelloberfläche statt. Die Mineralisation erfolgt über Matrixvesikel, welche in den Osteoblasten gebildet werden. In den Vesikeln wachsen Hydroxylapatitkristalle, welche mit der Zeit die Vesikel zum Platzen bringen. Dadurch gelangen die Kristalle in den Extrazellulärraum, wo sie sich an Kollagenfibrillen anlagern. Die hohe Konzentration alkalischer Phosphatase in den Vesikeln stellt eine große Menge anorganischen Phosphats zur Verfügung. Die meisten Osteoblasten gehen in Apoptose, einige differenzieren sich zu Osteozyten und wenige gehen in einen inaktiven Zustand als Endostzelle über.

Osteozyten: Sie gehen aus Osteoblasten hervor und befinden sich eingemauert in der mineralisierten Matrix. Über ihre langen Zellfortsätze stehen die Osteoklasten untereinander mittels Gap junctions in Verbindung. Sie reagieren auf mechanische Beanspruchung des Knochens und halten die extrazelluläre Matrix aufrecht.

Osteoklasten: Diese sehr großen, mehrkernigen Zellen gehen aus ihren Vorläufern, den Monozyten, hervor und gehören somit dem mononuklären Phagozytensystem an. Dadurch erklärt sich auch ihre Aufgabe den mineralisierten Knochen zu resorbieren. Sie enthalten viele Mitochondrien und Lysosomen, welche die Speicher für die zum Matrixabbau notwendigen Enzyme sind (Abb. 2).

Matrix: Sie besteht zu etwa 50% aus anorganischem Material, dessen größter Anteil Kalzium und Phosphat in Form von Hydroxyapatitkristallen ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) bildet. Das organische Material besteht fast vollständig aus Kollagen-1, lediglich etwa 5% machen Proteoglykane und Glykoproteine aus. In der Grundsubstanz befinden sich spezifische Glykoproteine, wie z.B. Osteocalcin, die durch Kalziumbindung an der Verkalkung der Matrix beteiligt sind. Diese spezifische Komposition beeinflusst den Knochen bezüglich Härte und Flexibilität. So verleihen die Kollagenfasern dem Knochen die Flexibilität und die Zugfähigkeit, die Mineralisierung hingegen ist für die Härte und Druckstabilität verantwortlich.

(Webb JCJ und Tricker J 2000, Junqueira L *et al.* 2004, Wennemuth G 2012).

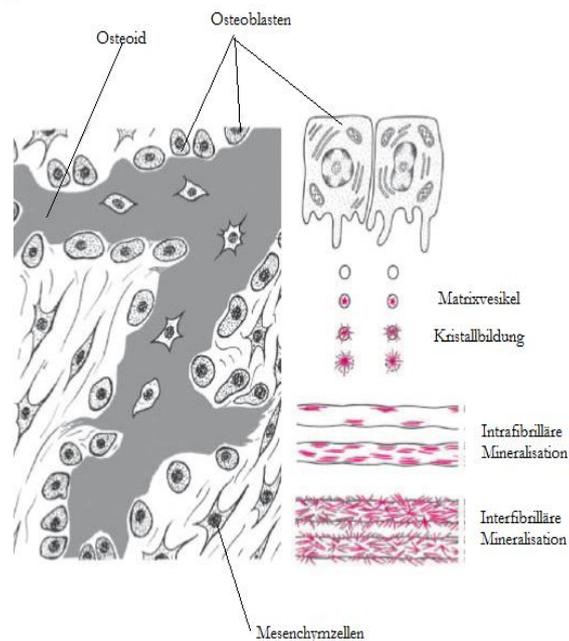


Abb. 1: Knochenbildung durch Osteoblasten
(Schiebler TH und Korf H-W 2007)

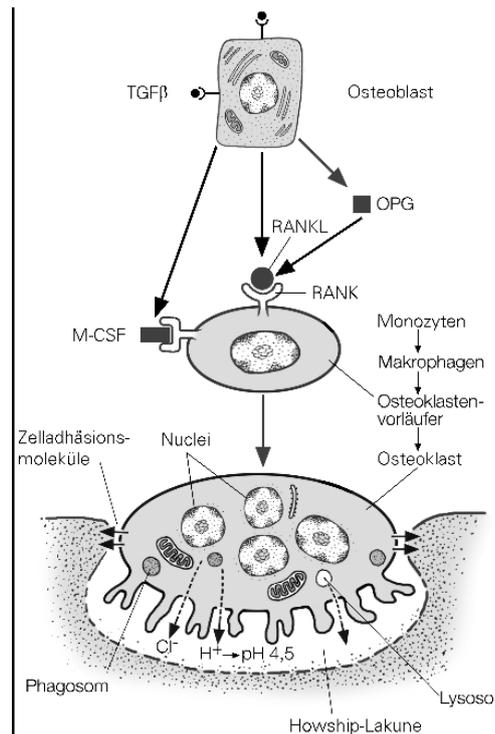


Abb. 2: Schematische Darstellung des Knochenabbaus
(Schiebler TH und Korf H-W 2007)

2.1.3 Histologie

Man unterscheidet hauptsächlich zwei Formen von Knochengewebe. **Lamellenknochen**, als der sogenannte reife Knochen, der den Großteil des Skeletts eines erwachsenen Menschen ausmacht und **Geflechtknochen**, als der unreife, der hauptsächlich als Vorstufe bei der Knochenneubildung auftritt und im Lauf der Entwicklung fast vollständig durch Lamellenknochen ersetzt wird. Geflechtknochen hat einen größeren und unregelmäßig angeordneten Zellanteil. Er ist dadurch beweglicher, jedoch auch schwächer als Lamellenknochen (Webb JCJ und Tricker J 2000).

Im Lamellenknochen kann man eine äußere Substantia compacta (Kompakta), bestehend aus kortikalem Knochen, sowie eine innere Substantia spongiosa (Spongiosa), bestehend aus trabekulärem Knochen, unterscheiden. Mikroskopisch erkennt man, dass die Lamellen (Plättchen) der Spongiosa, bestehend aus Kollagen und Matrix, sich in mehreren Schichten konzentrisch um einen zentralen Kanal, den Havers-Kanal, anordnen. Lamellen und Havers-Kanal zusammen bilden das Havers-System, welches auch als Osteon bezeichnet

wird (Abb. 3). Die die Osteone umgebende, mineralisierte Matrix enthält nur wenig Kollagen. Die meist schräg verlaufenden Volkmann-Kanäle durchdringen die Osteone und dienen der Kommunikation zwischen den Havers-Kanälen oder zwischen Havers-System und Periost (Abb. 3). Des Weiteren kann man Schalt- und Generallamellen unterscheiden. Schaltlamellen sind Ausdruck des ständigen Umbaus im Knochen. Sie sind Überreste alter Osteone und füllen den Raum zwischen den noch intakten Osteonen aus. Generallamellen hingegen gliedern sich in äußere und innere Generallamellen, die jeweils die äußere und innere Seite des kompakten Knochens bedecken (Welsch U und Deller T 2010).

Im Gegensatz zum Menschen findet man in Knochen von kleinen Nagetieren, wie zum Beispiel Mäusen, kein Havers-System. Zum Knochenumbau bilden sich an der Oberfläche der Frakturenden sogenannte Resorptionshöhlen aus, die im Laufe des Heilungsprozesses von Osteoblasten ausgefüllt werden (Nunamaker DM 1998).

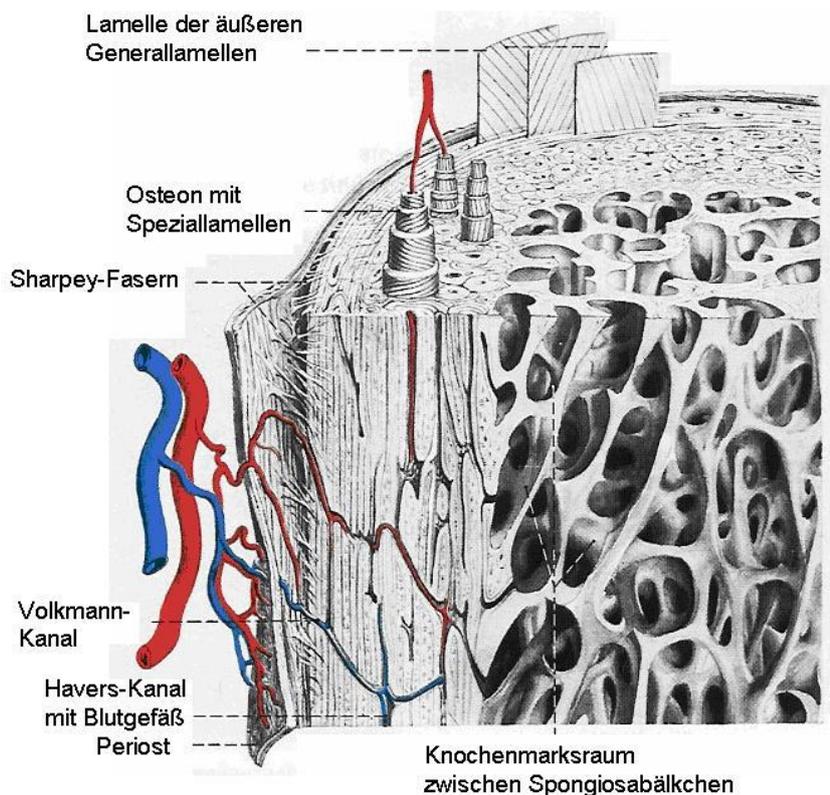


Abb. 3: Schematische Darstellung des Lamellenknochens (Junqueira et al. 2004).

Außen wird der Knochen von der Knochenhaut, dem Periost, umgeben. Das Periost ist spezialisiertes Bindegewebe, dessen Zellen osteogene Potenz haben. Die Periostzellen besitzen also die Fähigkeit sich zu Knochenzellen zu differenzieren. Innerhalb des Periosts unterscheidet man drei Schichten. Die äußerste Schicht wird von der Tunica adventitia, welche aus lockerem Bindegewebe besteht und für die Blutversorgung verantwortlich ist, gebildet. Gefolgt vom Stratum fibrosum, welches straffer ist und dessen Fasern vorwiegend längs verlaufen. Aus dieser Schicht strahlen Kollagenfasern in die Kompakta des Knochens ein. Diese sogenannten Sharpey-Fasern schaffen somit eine feste Verbindung zwischen Knochen und Periost. Die innerste Schicht bildet schließlich das Stratum osteogenicum. Hier befinden sich hauptsächlich mesenchymale Stammzellen und Knochenvorläuferzellen (Welsch U und Deller T 2010).

Das Endost kleidet alle Binnenräume des Knochens, so zum Beispiel auch die Havers-Kanäle, aus. Es besteht hauptsächlich aus ruhenden Knochenzellen, welche in zwei bis drei Schichten dem Knochengewebe direkt anliegen, und aus einer darunter liegenden Bindegewebsschicht, deren Zellen ebenfalls eine osteogene Potenz besitzen (Welsch U und Deller T 2010).

Sowohl im Periost als auch im Endost ruhen Zellen, die zu Knochenzellen differenzieren können. Daraus lässt sich schließen, dass beide eine durchaus wichtige Rolle als „Stammzelllieferanten“ im Rahmen der Frakturheilung spielen.

2.1.4 Funktion

Die Knochen bilden zusammen mit Muskeln und Gelenken den Bewegungsapparat. Das knöcherne Skelett bietet dem Weichgewebe eine optimale mechanische Struktur. Außerdem schützt es die im Thorax und Abdomen gelegenen inneren Organe und spielt eine wichtige Rolle in der Hämatopoese und im Calcium-Phosphat-Metabolismus.

Um die Funktionen aufrechtzuerhalten unterliegt das Knochengewebe einem ständigen Auf-, Ab- und Umbau, was auch als Modeling und Remodeling bezeichnet wird. Der wachsende Knochen nimmt an Größe zu, er verändert seine Form und seine innere Struktur, er kann sich somit neuen mechanischen Anforderungen optimal anpassen. Dieser Vorgang wird als Modeling bezeichnet. Im ausgewachsenen Knochen ändern sich zwar die

mechanischen Anforderungen nicht mehr so schnell, der Umbau findet aber weiterhin statt – dies ist das Remodeling (Parfitt AM 1994). Der Begriff des Remodelings findet sich schon in den 1960er Jahren (Frost HM 1966;1969). Frost war es, der als erster den Begriff der „basic metabolizing units“ prägte, welcher später in „basic multicellular units“, für gewöhnlich als BMU abgekürzt, umbenannt wurde. Darunter versteht man eine eigenständige, jedoch zeitlich begrenzte, anatomische Einheit, bestehend aus Osteoklasten und Osteoblasten. Das Remodeling führt nicht zu einer Zunahme des Knochenvolumens und des Längenwachstums, sondern findet vor allem während der Frakturheilung statt.

2.2 Frakturheilung

Die Frakturheilung ist ein komplexer Prozess, welcher sowohl Elemente aus der embryologischen und fetalen Wachstumsphase beinhaltet, als auch solche, die nur später in der adulten Phase auftreten (Ferguson C *et al.* 1999).

Knochen heilt, im Gegensatz zu anderem adulten Gewebe, nicht unter Bildung von Narbengewebe, sondern mit der Bildung von neuem Knochen. Dieser, sich neu bildende Knochen, unterliegt einem stetigen Remodeling, bis die ursprüngliche Struktur wieder hergestellt ist (McKibbin B 1978). Knochengewebe ist dazu in der Lage Vorgänge aus der embryonalen Entwicklung zu reaktivieren, um sich somit selbst zu regenerieren. Es kann damit letztendlich nicht nur seine ursprüngliche Form, sondern auch seine biomechanische Anforderungen zurück erlangen (Gerstenfeld LC *et al.* 2003). Vermutlich ist jedoch nur bei kindlichen Knochen die vollständige und genaue Wiederherstellung der anatomischen Struktur möglich (Einhorn TA 1998). Die wichtigsten Faktoren für die Regeneration des frakturierten Knochens sind mechanische Stabilität und eine ausreichende Blutversorgung (Epari DR *et al.* 2010).

Die sich dabei abspielenden biologischen Prozesse und verschiedenen Phasen der Regeneration werden allesamt von Signalmolekülen reguliert. Dazu gehören vor allem proinflammatorische Zytokine, Proteine der TGF (transforming growth factor)- β Familie und Faktoren der Angiogenese (Ai-Aql ZS *et al.* 2008).

Seit langem ist bekannt, dass die Kallusgröße von Bewegungen im Frakturspalt beeinflusst wird. Der Kallus ist also umso größer, je mehr Bewegung im Frakturspalt herrscht. Durch die Entwicklung sehr rigider Osteosyntheseverfahren, findet sich daher kaum Kallusgewebe, so dass die Fraktur über die primäre Frakturheilung heilen kann. Kleinste interfragmentäre Bewegungen führen jedoch dazu, dass es in der Mehrzahl der Fälle trotzdem zu einer sekundären Frakturheilung, mit Ausbildung von Kallusgewebe, kommt (Epari DR *et al.* 2010).

2.2.1 Primäre Frakturheilung

Bei der primären Frakturheilung kommt es zur direkten Bildung von lamellärem Knochen ohne Entstehung von Kallusgewebe. Sie stellt die Idealform der Knochenheilung dar. Die primäre Frakturheilung findet nur statt, wenn die Fragmente korrekt anatomisch reponiert, und mittels stabiler und rigider Osteosynthese versorgt werden. Bis dato gibt es keine Studie, die eine primäre Frakturheilung bei Mäusen nachweisen konnte.

Je nach Breite des Frakturspaltens unterscheidet man zwei Untergruppen. Zur so genannten **Kontakttheilung** kommt es beim Menschen bei einer Spaltbreite unter 0,1 mm. Die der Fraktur am nächsten gelegenen Osteone formen sogenannte cutting cones, welche beide Fragmente überbrücken. Die Osteoklasten resorbieren alten Knochen und formen dadurch Kanäle, in die sich Osteoblasten einlagern können, um neuen lamellären Knochen zu bilden. Die Frakturrenden können somit ineinander verzahnen. Gleichzeitig entsteht dabei auch ein neues Havers-System, welches die Blutversorgung gewährleistet (Schenk RK und Willenegger HR 1977, Perren SM 1979, Shapiro F 1988, Marsell R und Einhorn TA 2011).

Anders verläuft es bei der **Spaltheilung**. In der Literatur findet man verschiedene Angaben zur Spaltbreite. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Spaltheilung im menschlichen Knochen bei einer Spaltbreite von 0,8 mm bis 1 mm auftritt. Bei dieser Form der primären Knochenheilung wird der Frakturspalt zuerst mit Geflechtknochen aufgefüllt, welcher sich entlang der Gefäße, meist senkrecht zur Knochenachse, ausbildet. Im Rahmen des sekundären Remodelings erfolgt ein der Kontakttheilung ähnlicher Prozess mit Bildung von längs, entlang der Knochenachse, ausgerichteten Osteonen und cutting cones. Dadurch

wird der bestehende Geflechtknochen durch Lamellenknochen ersetzt (Shapiro F 1988, Kaderly RE 1991, Marsell R und Einhorn TA 2011).

2.2.2 Sekundäre Frakturheilung

Die sekundäre Frakturheilung wird auch als indirekte Frakturheilung bezeichnet und kommt häufiger als die primäre Heilung vor. Sie ist durch die Bildung von Kallusgewebe charakterisiert und ist eine Kombination aus intramembranöser und endochondraler Knochenbildung (Gerstenfeld LC *et al.* 2006). Sie erfordert keine anatomische Reposition oder rigide Stabilisierung. Demzufolge tritt sie bei konservativer Frakturbehandlung auf, z.B. im Rahmen der Gipsruhigstellung oder bei der operativen Behandlung mittels Marknagelung (Einhorn TA 1998).

Während des Heilungsprozesses unterscheidet man verschiedene eigenständige, sich überlappende, Stadien:

- Frakturphase mit Hämatombildung
- Entzündungsphase
- Angiogenese und Chondrogenese
- Chondrale und desmale Ossifikation
- Phase des Umbaus (Modeling und Remodeling)

Unmittelbar nach dem Trauma, welches die Fraktur bedingt, entsteht ein **Hämatom** im Frakturspalt und im umgebenden Weichteilgewebe. Als Antwort auf dieses Hämatom entwickelt sich eine **akute Entzündungsreaktion** (Gerstenfeld LC *et al.* 2003).

Im Hämatom findet man verschiedenste Zellen aus dem peripherem Blut und aus dem Markraum, sowie Knochenmarkszellen (Marsell R und Einhorn TA 2011). Neben Erythrozyten lagern sich vor allem Thrombozyten zur Stabilisierung des Hämatoms ein. Sie werden als Initiatoren der Entzündungskaskade beschrieben, da sie sowohl platelet derived growth factor (PDGF) als auch transforming growth factor beta (TGF- β) ausschütten (Webb JCJ und Tricker J 2000). Beide Proteine gehören zur Gruppe der

proinflammatorischen Zytokine. Weitere wichtige Zytokine, die in dieser Phase von Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten, Stammzellen und Granulozyten exprimiert und sezerniert werden und eine entscheidende Rolle spielen sind der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und die Interleukine (IL). Sie aktivieren die zur Heilung notwendigen Zellen, damit diese proliferieren und differenzieren können. Ebenso fördern sie die Bildung eines ersten knorpeligen Kallus und die Angiogenese (Gerstenfeld LC *et al.* 2001, Kon T *et al.* 2001). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Blockade von IL-6 eine signifikant verminderte Osteoklastenneubildung bzw. -aktivität in der Frühphase der Frakturheilung nach sich zieht, sowie die Qualität des gebildeten Kallusgewebes negativ beeinträchtigt (Wallace A *et al.* 2011). Die Blockade von IL-20 durch einen monoklonalen Antikörper wies eine verminderte Osteoklastendifferenzierung nach (Hsu YH *et al.* 2011) und hatte einen signifikanten positiven Einfluss auf die Differenzierung von Osteoblasten (Hsu YH *et al.* 2016). In einer weiteren Studie führte das Ausschalten des TNF- α Signalweges zu einer Verzögerung der Frakturheilung. So waren sowohl das Einwandern von Stammzellen in der frühen Phase als auch die Apoptose von Chondrozyten während der endochondralen Phase verzögert. Ebenso war die Resorption von mineralisiertem Knorpel in späteren Phasen vermindert (Gerstenfeld LC *et al.* 2003). Innerhalb der ersten 24 Stunden erreicht die akute Entzündungsreaktion ihr Maximum und flacht nach ca. 3 Tagen ab (Cho TJ *et al.* 2002).

Eine adäquate Heilung des Knochens ist nur bei ausreichender Blutversorgung möglich. Demnach unterscheidet man weiterhin die Phase der **Angiogenese**. Während dieser Phase bilden sich nicht nur Gefäße neu, es findet auch ein Um- und Abbau im Knorpelgewebe statt. Dieser Prozess wird **Chondrogenese** genannt (Marsell R und Einhorn TA 2011). Vor allem der Wachstumsfaktor TNF- α spielt hierbei eine entscheidende Rolle (Gerstenfeld LC *et al.* 2003). Für die Regeneration des Knochengewebes ist das Einwandern von mesenchymalen Stammzellen (MSC) in die Frakturumgebung und deren Differenzierung in Knochenzellen essentiell. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass bone morphogenetic proteins (BMPs), insbesondere BMP-2 und -7 für die Rekrutierung der MSC's eine entscheidende Rolle spielen (Bais MV *et al.* 2009). Mehrere Studien konnten nachweisen, dass mesenchymalen Stammzellen teilweise auch aus den Wänden der einsprossenden Gefäße freigesetzt werden. Sie werden als Perizyten bezeichnet. (Caplan AI

2008, da Silva Meirelles L *et al.* 2008). Aber auch das Knochenmark, das umgebende Weichteilgewebe, das Periost und das Endost dienen als Quelle für pluripotente Stammzellen. Das Periost kann man dabei wohl als wichtigsten Stammzelllieferanten ansehen. Es wurde gezeigt, dass signifikant weniger Kallus gebildet wurde, wenn das Periost zuvor entfernt wurde (Buckwalter JA *et al.* 2001). Aufgrund dieser Tatsache sollte bei der operativen Frakturversorgung das Periost möglichst geschont werden.

Ein weiterer Schritt während der sekundären Frakturheilung ist die Organisation des Frakturhämatoms. Dies geht mit der Bildung eines Granulationsgewebes einher, welches reich an Fibroblasten, neu gebildetem Kollagen und Kapillaren ist. In dieser Phase entsteht der sogenannte weiche Kallus, welchen man auch als Primärkallus bezeichnet. Bei Kleintiermodellen erreicht die Phase des Primärkallus ihren Höhepunkt zwischen dem 7. und 10. Tag (Einhorn TA 1998) und dauert im Schnitt insgesamt ca. 14 Tage. Ganz im Gegensatz dazu erstreckt sich dieser Zeitraum beim Menschen auf 3 bis 4 Wochen.

Gebildet wird der weiche Kallus durch **endochondrale Ossifikation**, welche sich vorwiegend an der Außenseite des dem Frakturspalt direkt benachbarten Periosts abspielt. Gleichzeitig findet eine **intramembranöse/desmiale Ossifikation** statt. Während der intramembranösen Ossifikation wird direkt Geflechtknochen gebildet. Die dafür verantwortlichen Zellen sind Knochenvorläuferzellen aus dem Stratum oteogenicum des Periosts (Webb JCJ und Tricker J 2000).

Letztendlich münden all diese Vorgänge in die aufeinander folgenden Prozesse der Knorpelmineralisation, des Knorpelabbaus und schließlich der Bildung von Lamellenknochen mit dem anschließenden Remodeling. Die Knorpelmineralisation wird hauptsächlich von den Matrixvesikeln gesteuert, welche hypertrophen Chondrozyten entstammen. In den Vesikeln befindet sich das von den Zellen gespeicherte und ausgeschüttete Calcium. Außerdem sind sie mit Enzymen ausgestattet, welche für die Proteolyse der sich in der Matrix befindlichen Proteoglykane verantwortlich sind. Diese Proteolyse wird als Voraussetzung für die Mineralisation des Kallus gesehen (Einhorn TA *et al.* 1989). Eine weitere Aufgaben der Matrixvesikel ist der Abbau von Phosphodiesterasen durch Phosphatasen, um Phosphat für die Präzipitation mit Calcium bereitzustellen (Einhorn TA *et al.* 1989).

In den mineralisierten Knorpel sprossen Gefäße ein, welche die schon erwähnten Perizyten mit sich führen. Diese Perizyten gelten als Vorläuferzellen der Osteoblasten. Entlang dieser Gefäße erfolgt **der Abbau bzw. die Resorption des mineralisierten Knorpels** durch Chondroklasten, sowie dessen Ersatz durch Geflechtknochen. Auch in dieser Phase finden sich dominierende Zytokine. Zu nennen wären Osteoprotegerin (OPG), Rezeptor Aktivator von NF- κ B Ligand (RANKL) und der Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (M-CSF). Dieser mineralisierte und vorwiegend knöcherne Kallus wird als harter Kallus bezeichnet. (Kon T *et al.* 2001). Obwohl der harte Kallus biomechanische Stabilität gewährt, ersetzt er noch lange nicht vollkommen alle biomechanischen Eigenschaften des normalen Knochens. Deshalb erfolgt in einer weiteren, resorptiven Phase, der Umbau von Geflechtknochen in Lamellenknochen mit der Ausbildung einer zentralen Markhöhle (Gerstenfeld LC *et al.* 2003). Dieser Umbau beginnt beim Menschen etwa 3 - 4 Wochen nach der Frakturierung des Knochens. Bis der Knochen jedoch wieder vollständig regeneriert ist und seine ursprüngliche Struktur wiedererlangt hat, kann es auch Monate, wenn nicht Jahre dauern.

2.3 Wachstumsfaktoren

2.3.1 Bone morphogenetic proteins

Die bone morphogenetic proteins (BMPs) gehören zur TGF- β Superfamilie. Ihre Vorhandensein wurde in den 60er Jahren entdeckt (Urist MR 1965). Die Proteine konnten jedoch erst in den 80er Jahren durch Purifikation, Sequenzierung und Klonen entschlüsselt werden (Wozney JM *et al.* 1988, Luyten FP *et al.* 1989). Bis heute sind rund 20 Mitglieder aus der BMP Familie bekannt und charakterisiert worden. Sie spielen eine bedeutsame Rolle in der Entwicklung des Skeletts von Wirbeltieren und in der Knochenbildung (Hogan BL 1996, Urist MR 1997).

Es wurde gezeigt, dass beim Menschen vor allem BMP-2, -6 und -9 eine hohe Potenz haben, insbesondere die spezifische Differenzierung der pluripotenten mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblastenvorläuferzellen einzuleiten. Die weitere Differenzierung zu

Osteoblasten und Osteozyten wird von allen BMPs gleichermaßen angeregt (Cheng H *et al.* 2003). BMP-2 spielt eine essentielle Rolle in der Ausbildung von Knochen während der Frakturheilung. Nachdem das BMP-2 Gen bei sogenannten knock-out Mäusen ausgeschaltet wurde, war die frühe sekundäre Mineralisierung der wachsenden Knochen gestört. Dies zeigte sich vor allem an dem erheblichen Mangel von Kollagen-2 in der extrazellulären Matrix. Sobald die Mäuse an Gewicht zunahmen und körperlich aktiver wurden, hatte der BMP-2 Mangel erhebliche Folgen. Es konnten multiple Spontanfrakturen der Extremitäten beobachtet werden. Zudem zeigte sich eine verzögerte Heilung bzw. die Ausbildung von Pseudarthrosen (Tsuji K *et al.* 2006). In einer ganz aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass die Beschichtung von Implantaten mit BMP-2 zu einer signifikanten Verbesserung der Frakturheilung bei Pseudarthrosen führt (Orth M *et al.* 2017).

2.3.2 Receptor activator of NF- κ B Ligand und Osteoprotegerin

Das Zusammenspiel von OPG, RANK und RANKL als Signalweg gilt als Schlüssel für die Balance zwischen der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität, also der Balance zwischen Knochenbildung und Knochenabbau.

Durch Simonet *et al.* konnte 1997 nachgewiesen werden, dass OPG als nicht membrangebundenes Mitglied der TNF-Rezeptor Familie in den Knochenmetabolismus, vor allem in den Regelkreis der Knochendichte, eingebunden ist. OPG hemmt sowohl die Bildung also auch die Ausreifung von Osteoklasten. Dies führte in Studien mit transgenen Mäusen, welche vermehrt OPG exprimierten, zu einer Zunahme der Knochendichte (Osteopetrose) und gleichzeitiger Abnahme der Osteoklastenzahl (Simonet WS *et al.* 1997, Yasuda H *et al.* 1998). Da dieses Protein den Knochen vor Abbau durch Osteoklasten schützt, gab man ihm den Namen Osteo- (=Knochen) -protegerin (=schützend). Eine verminderte Expression von OPG führt zum Verlust von Knochenmasse und zu einer verfrühten Osteoporose (Bucay N *et al.* 1998). OPG neutralisiert den OPG-Liganden (OPGL), welcher wiederum ein Aktivator von Osteoklastenvorläuferzellen und deren Entwicklung ist, und nachweislich auch einen Einfluss auf ausgewachsene Osteoklasten hat (Lacey DL *et al.* 1998, Burgess TL *et al.* 1999). OPG konnte sowohl im gesunden

Knochen als auch während des Heilungsprozesses in Rattentibiae nachgewiesen werden. Die Expression von OPG zeigte zwei Peaks auf. Den ersten innerhalb der ersten 24 Stunden und den zweiten an Tag 7 nach dem Trauma (Kon T *et al.* 2001).

Auch RANK, ein transmembranöser Rezeptor auf Osteoklasten und Osteoklastenvorläuferzellen, zählt zu der TNF-Familie (Kon T *et al.* 2001). An RANK bindet sein Ligand RANKL, wodurch eine intrazelluläre Kaskade in Gang gesetzt wird, welche die Bildung und Ausreifung von Osteoklasten fördert und gleichzeitig die Aktivität schon bestehender Osteoklasten steigert (Yasuda H *et al.* 1998, Boyle WJ *et al.* 2003). RANKL wird in nicht frakturierten Knochen kaum exprimiert. Während der Knochenheilung zeigen sich jedoch ebenfalls 2 Peaks, jeweils am 3. und 14. Tag nach dem Trauma (Kon T *et al.* 2001). Indem OPG an RANKL bindet, wird dessen Effekt inhibiert, da RANKL nicht mehr an seinen Rezeptor RANK binden kann. Lin *et al.* konnten erstmals den direkten Nachweis einer erhöhten NF- κ B Aktivität in gealterten mesenchymalen Stammzellen erbringen. Damit verbunden war auch eine signifikant höhere RANKL-Expression und verminderte OPG-Expression in gealterten MSCs im Vergleich zu jungen MSCs. Die Ergebnisse deuten auf ein Ungleichgewicht im RANKL/OPG System hin, womit sich die erhöhte Knochenresorptionsrate im höheren Alter erklären ließe (Lin TH *et al.* 2016).

2.3.3 Cystein rich protein-61

Die ersten Forschungen führten dazu, dass man cystein rich protein (Cyr-61) als ein „immediate early gene“, also ein regulatorisches Gen, entdeckte, welches die Aminosäuresequenz für ein Cystein reiches Protein verschlüsselt und innerhalb weniger Minuten nach Aktivierung durch Wachstumsfaktoren transkribiert wird (O'Brien TP *et al.* 1990).

Cyr-61 stimuliert die Chondrogenese. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Cyr-61 in engem Zusammenhang mit der embryonalen Knorpelentwicklung der Maus steht. Die Expression in den Embryonen korreliert nicht nur mit der Entwicklung knorpeliger Strukturen, sondern auch mit der Entwicklung des Kreislaufsystems. Cyr-61 begünstigt den Zusammenschluss mesenchymaler Stammzellen, beschleunigt die

Expression von Kollagen-2 und stimuliert die Bildung von knorpelspezifischer Matrix und Knorpelgewebe (O'Brien TP und Lau LF 1992, Wong M *et al.* 1997).

Zudem spielt die Expression von Cyr-61 im Rahmen der Angiogenese eine wichtige Rolle. Studien konnten zeigen, dass Cyr-61 als Signalmolekül die Neovaskularisation über Aktivierung verschiedener Rezeptoren fördert (Di Y *et al.* 2015).

2.3.4 Vascular endothelial growth factor

Die Angiogenese spielt sowohl während der embryonalen Entwicklung und während des Längenwachstums, als auch während der Frakturheilung eine entscheidende Rolle. Eine unzureichende Vaskularisation führt letztendlich zu einer inadäquaten Ossifikation und somit zu einem vermehrten Auftreten atropher Pseudarthrosen (Gerber HP und Ferrara N 2000, Carano RA und Filvaroff EH 2003).

VEGF spielt eine essentielle Rolle als potenter angiogener Wachstumsfaktor im Rahmen der Knochenheilung und ist für die adäquate Kallusbildung und Mineralisation verantwortlich. In Studien führte die Hemmung der VEGF-Aktivität zu einem Abbruch des Knochenheilungsprozesses, sowie zur Ausbildung von Pseudarthrosen (Street J *et al.* 2002).

Des Weiteren beeinflusst die Expression von VEGF auch die Osteogenese. Eine verminderte Expression von VEGF führte in verschiedenen Untersuchungen zu einer geringeren BMP-2/BMP-4 vermittelten Knochenbildung (Carano RA und Filvaroff EH 2003).

2.3.5 Kollagene

Mittlerweile sind mindestens 15 verschiedenen Kollagenarten bekannt. Anhand ihrer molekularen Struktur unterscheidet man fibrilläre und nicht-fibrilläre Kollagene. Kollagen-2 und -10 (Col-2 und Col-10), welche in der vorliegenden Studie untersucht wurden, beeinflussen die Chondrogenese während der Frakturheilung und können deshalb als „Knorpelmarker“ verwendet werden (Sandberg MM *et al.* 1993). Kollagen-2 wird während

der frühen Phase der Chondrogenese exprimiert. Kollagen-10 wird zu einem späteren Zeitpunkt während der Chondrogenese exprimiert.

2.4 Tiermodelle und Osteosynthesetechniken

In den vergangenen Jahrzehnten wurden an verschiedenen tierexperimentellen Modellen die komplexen Zusammenhänge der Frakturheilung untersucht. Zu Beginn favorisierte man vor allem **Großtiermodelle**, wie Schafe, Hunde und Schweine. Von Vorteil ist, dass die Größe und die Anatomie der Tiere sehr gut mit dem Menschen zu vergleichen sind.

Nichtsdestotrotz nutzte man auch schon in den 40er Jahren **Kleintiermodelle**. Zuerst Ratten (Pritchard JJ 1946, Urist MR und Mc LF 1950), später dann auch Mäuse (Tonna EA 1964). Im Gegensatz zu Großtiermodellen ist die Handhabung aufgrund der Größe der Tiere besonders anspruchsvoll. Besonders die Entwicklung von Osteosynthesematerial stellt eine große Herausforderung dar. Heute gewinnt die Forschung an Mausmodellen immer mehr an Bedeutung. Dies liegt vor allem an den zahlreichen transgenen Mäusen und Knockout-Stämmen, welche die Möglichkeit eröffnen molekulare Mechanismen genauestens zu erforschen. Ein weiterer Vorteil bei Kleintiermodellen sind die deutlich geringeren Kosten. Nicht nur in Bezug auf die Zucht- und Haltungskosten, sondern auch aufgrund niedrigerer Therapiekosten, z.B. für Studien mit Antikörpergabe. Histing et al. haben 2011 beispielhaft die Kosten für einen anti-VEGF monoklonalen Antikörper verglichen. Bei täglicher Gabe über einen Zeitraum von 30 Tagen beliefen sich die Kosten bei einer Gruppe von 10 Mäusen auf ca. 6000 Euro. Ginge man von einer gleich großen Gruppe Schafe aus, so käme man auf die Summe von 15 Millionen Euro (Histing T *et al.* 2011).

In Hinblick auf die Anatomie von Kleintiermodellen ist bekannt, dass diese Tiere eine primitive Knochenstruktur mit fehlendem Havers-System aufweisen. Das Remodeling im Rahmen der Knochenheilung wird hier über sogenannte Resorptionshöhlen vermittelt, welche sich frakturnah bilden und im Verlauf mit Osteoblasten aufgefüllt werden. Das Remodeling über Havers-Systeme zeigt zwar gewisse Ähnlichkeiten, es liegen jedoch noch wenige Erkenntnisse über die Relevanz dieser Unterschiede vor. Studien an Ratten und

Mäusen eignen sich somit nicht für Untersuchungen, welche die Form, Funktion und Beschaffenheit des Havers-Systems untersuchen. Das Havers-System ist phylogenetisch erst beim Kaninchen zu finden, wobei auch hier anatomische Unterschiede zum menschlichen Havers-System bestehen (Nunamaker DM 1998).

Auch Großtiermodelle finden weiterhin ihre Anwendung. So sind Studien an Schafen bei der Entwicklung und Testung neuer humaner Implantate von Vorteil. Die Forschung an Großtiermodellen, beispielsweise an Hunden, ist vor allem für die Veterinärmedizin von großer Bedeutung. Die Herausforderung bei Tieren im Allgemeinen ist, dass die postoperative Belastung nicht adäquat kontrolliert werden kann. Es sollte eine möglichst frühe Belastung mit dem vollen Körpergewicht angestrebt werden, da eine komplette Immobilisation, zum Beispiel bei Schafen, aber auch Hunden oder Katzen nur eingeschränkt realisierbar ist (Tralman G *et al.* 2012).

Da man weiß, dass die biomechanischen Bedingungen einen enormen Einfluss auf die Frakturheilung haben, sind standardisierte Bedingungen zur Untersuchung der Frakturheilung unabdingbar. Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von Stabilisierungsverfahren für Kleintiere. Zur Untersuchung der Knochenbruchheilung an langen Röhrenknochen unterscheidet man bei der Maus grundsätzlich zwischen geschlossenen und offenen Frakturmodellen (Histing T *et al.* 2011). Bei den geschlossenen Modellen wird die Fraktur mittels stumpfer Guillotine erzeugt. Bei den offenen Modellen wird über einen lateralen Zugang der Knochen freipräpariert und anschließend osteotomiert.

Der intramedulläre Pin (Abb. 4, A) wurde schon sehr früh in Studien am Rattenmodell verwendet (Bonnarens F und Einhorn TA 1984), später auch als Frakturstabilisierung im Mausmodell (Kinner B und Spector M 2002, Manigrasso MB und O'Connor JP 2004). Der Pin ist meist aus einer einfachen Spritzenkanüle gefertigt. Er kann geschlossen durch eine Inzision im Bereich der Patella über die Fossa intercondylaris des Femurs in den Markraum eingebracht werden. Im Gegensatz zu neueren geschlossenen Modellen bietet der Pin keine Rotationsstabilität. Aus diesem Grund sind standardisierte Untersuchungsbedingungen schwer realisierbar.

Holstein et al. stellten 2007 erstmalig einen Verriegelungsnagel (Abb. 4, B) für Studien am Mausfemur vor (Holstein JH *et al.* 2007). Durch die Abflachung der beiden Enden eines herkömmlichen Pins verankert sich dieser besser im Markraum und führt somit zu einer Verbesserung der Rotationsstabilität.

Offen erfolgt die Versorgung mit dem Pin-Clip (Abb. 4, C). Hierbei wird ein herkömmlicher, distal abgeflachter Pin mit einem Clip, also einer Klammer, kombiniert. Nachdem der Pin retrograd eingebracht wird, erfolgt die Osteotomie mit einer Gigli Säge. Anschließend werden die Löcher für die Klammer distal und proximal der Fraktur gebohrt. Die Klammer wird ventral im Knochen positioniert und verbessert deutlich die Rotationsstabilität (Garcia P *et al.* 2008).

Der oben beschriebene Verriegelungsnagel konnte zwar die Rotationsstabilität verbessern, eine ausreichende axiale Stabilität konnte jedoch noch nicht gewährleistet werden. Dies veranlasste die Arbeitsgruppe dazu, ein geschlossenes Frakturmodell zu entwickeln, welches beide Eigenschaften vereinbart (Holstein JH *et al.* 2009). Erreicht wurde dies durch die MouseScrew® (Abb. 4, D). Durch ein proximales Gewinde, das wie eine Zugschraube wirkt und einen distalen Konus, der sich zwischen den Femurkondylen verhakt, erhöht sich die Rotationsstabilität. Die Frakturierung erfolgt geschlossen vor Einbringen der Schraube mit einer Guillotine-ähnlichen Vorrichtung.

Die winkelstabile Platte (Abb. 4, E) wurde im AO Institut, Davos, Schweiz (Matthys R und Perren SM 2009) entwickelt. Die Auflagefläche auf das Periost wird durch eine winkelstabile Verankerung verringert. Die Platte mit vier Schraubenlöchern wird durch einen offenen lateralen Zugang eingebracht. Nach Fixierung erfolgt die Osteotomie mit der Gigli-Säge. Die Platte steht als flexibles oder rigides Modell zur Verfügung.

Ein weiteres Modell wurde 2011 von Garcia et al. entwickelt. Das Prinzip des LockingMouseNail® (Abb. 4, F) ist mit dem Verriegelungsnagel beim Menschen vergleichbar. Der Nagel wird retrograd über die interkondyläre Notch eingebracht. Über einen zusätzlichen seitlichen Zugang sowie einen Führungsarm wird das Einbringen der Verriegelungspins ermöglicht. Zwischen den Pins erfolgt die offene Osteotomie mit einer Gigli-Säge (Garcia P *et al.* 2011).

Ein Nachteil dieser offenen Verfahren ist der dadurch entstehende Weichteilschaden (Histing T *et al.* 2010).

Der Fixateur externe (MouseExFix, RISystem, Davos, Schweiz) besteht aus einem Polymer-Block und 4 Mini-Schanz-Schrauben (Abb. 4, G). Er kann als rigide Fixation (Zwingenberger S *et al.* 2013) oder als flexibles bzw. semi-rigides Modell (Röntgen V *et al.* 2010) verwendet werden. Der Vorteil des Fixateurs externe liegt darin, dass die Implantatsteifigkeit sehr gut kontrolliert werden kann und der Einfluss der Steifigkeit *in vivo*, im Rahmen biomechanischer Studien, untersucht werden kann. Des Weiteren kann der Fixateur als Pseudarthrosemodell verwendet werden. Nachteilig könnten die Größe und das Gewicht der Implantate sein, welche den normalen Bewegungsablauf der Tiere beeinträchtigen können.

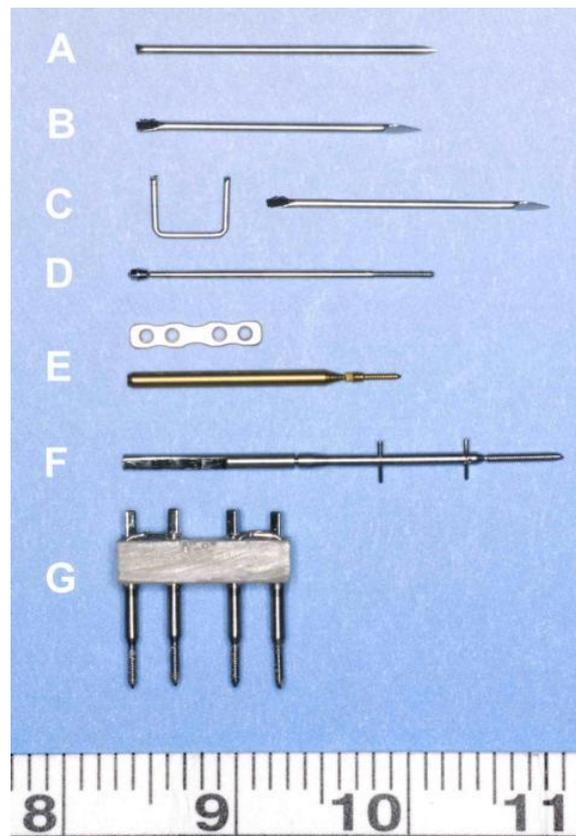


Abb. 4: Osteosynthesematerial für das Mausfemur
 intramedullärer Pin - 24 G Injektionskanüle (A), intramedullärer Verriegelungsnagel - beidseits abgeflachte 24 G Injektionskanüle (B), Pin-Clip - distal abgeflachter Pin und extramedullärer Clip (C), MouseScreen™ - intramedulläre Zugschraube mit distal konus förmigem Kopf und proximalem Gewinde (D), Platte mit Schraube (E) Verriegelungsnagel mit Verriegelungsbolzen (F), Fixateur externe - Fixationsblock und vier Mini-Schanz Schrauben (G)

2.5 Fragestellung und Zielsetzung

Aktuell existiert eine Vielzahl verschiedener Frakturmodelle der Maus. Diese Modelle unterscheiden sich jedoch wesentlich in der Art des Heilungsprozesses.

Ziel der Arbeit war es, zu untersuchen, ob sich der Heilungsprozess nach offener Osteotomie im Vergleich zur offenen Fraktur unterscheidet.

Die Nullhypothese lautet:

„Der Frakturheilungsprozess nach offener Osteotomie unterscheidet sich nicht im Vergleich zur offenen Fraktur“

3 Material und Methodik

3.1 Studiendesign

Die Versuche wurden von der entsprechenden Behörde (Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittel- und Veterinärwesen – Zentralstelle, Konrad-Zuse-Straße 11, 66115 Saarbrücken) genehmigt.

Die Durchführung der Tierversuche erfolgte am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes unter Aufsicht des Versuchsleiters und nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes.

Die Einteilung der insgesamt 40 verwendeten Versuchstiere erfolgte in jeweils 4 Gruppen (Tab. 1).

Tab. 1: *Versuchsprotokoll*

	Osteotomie		Fraktur	
	2 Wochen	5 Wochen	2 Wochen	5 Wochen
	20 Tiere		20 Tiere	
CT	n=4	n=4	n=4	n=4
Biomechanik	n=8	n=8	n=8	n=8
Histologie	n=8	n=8	n=8	n=8
Western-Blot	n=4		n=4	

Die radiologischen, biomechanischen und histologischen Untersuchungen konnten jeweils am gleichen Tier durchgeführt werden. Für die Western Blot Untersuchungen wurden weitere 4 Tiere 2 Wochen postoperativ pro Gruppe operiert.

3.2 Tiermodell

Als Versuchstiere wurden 12-14 Wochen alte, weibliche CD-1 Mäuse, mit einem Körpergewicht von 30 – 40 g verwendet (Abb. 5).



Abb. 5: CD-1 Maus

Die Tierhaltung der Mäuse erfolgte im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes unter klimatisierten Raumbedingungen (Lufttemperatur: 22-24°C, relative Luftfeuchtigkeit 60%) bei 12-stündigem Tag-Nacht-Rhythmus. Wasser sowie Standarddiätfutter in Pelletform (Altromin 1320, Altromin, Lage, Deutschland) wurden ad libidum bereitgestellt.

Zur osteosynthetischen Versorgung wurde die MouseScrew® (RISystem, Davos, Schweiz) verwendet (Abb. 6). Sie wurde 2009 in Zusammenarbeit mit dem AO Institut in Davos entwickelt (Holstein JH *et al.* 2009) und kam bereits in weiteren Arbeiten zur Anwendung (Holstein JH *et al.* 2010, Histing T *et al.* 2012, Holstein JH *et al.* 2012, Histing T *et al.* 2013, Holstein JH *et al.* 2013, Herath SC *et al.* 2015, Histing T *et al.* 2016).

Die MouseScrew® ist eine intramedulläre Zugschraube aus medizinischem Stahl (Länge 7,2 mm, Durchmesser 0,5 mm, Gewicht 0,02 g). Durch das proximale Gewinde und den distalen Konus ist eine Frakturspaltkompression möglich, welche die Rotationsstabilität erhöht.

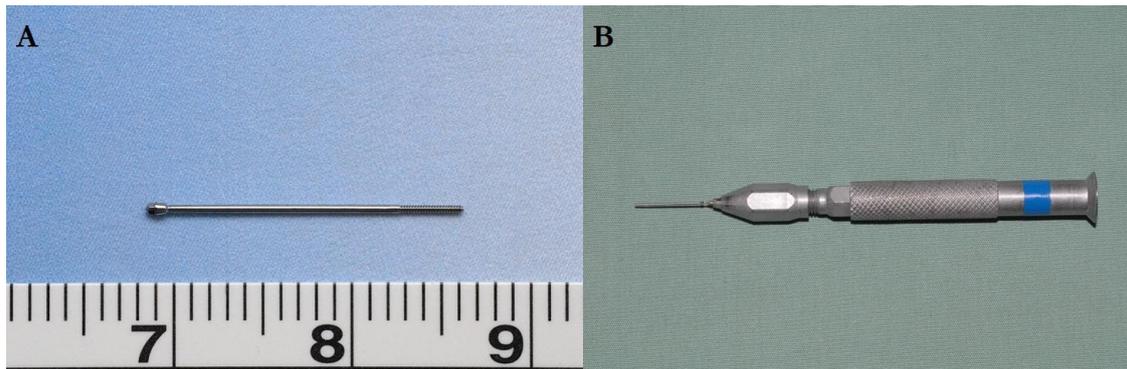


Abb. 6: MouseScrew® - Länge 17,2 mm, Durchmesser 0,5mm, Gewicht 0,02 g, Material: medizinischer Stahl (RISystem, Davos, Schweiz) **(A)**. Schraubendreher zum eindrehen der Schraube in den Knochen **(B)**.

3.3 Intervention

3.3.1 Narkose

Die Narkotisierung der Mäuse erfolgte mittels einer intraperitonealen Injektion von 15 mg/kg Körpergewicht (KG) Xylazin (Rompun® 2% - Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) und 75 mg/kg KG Ketamin (Ursostamin® 100mg 0,1% - Serumwerke Bernburg, Bernburg, Deutschland) (Abb. 7).



Abb.7: Durchführung der intraperitonealen Narkose

3.3.2 Operation

Unter Narkose wurde der rechte Oberschenkel rasiert und mit Softasept® (B Braun Melsungen AG, Deutschland) desinfiziert. Um die Augen vor Austrocknung zu schützen, wurde Dexpanthenolsalbe (Bepanthen® Augen und Nasensalbe - Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) aufgetragen. Die anschließende Operation fand unter nicht sterilen Bedingungen statt.

Vor der Operation wurde das Femur mit einem speziellen Handgriff fixiert (Abb. 8). Nach einer etwa 4 mm langen Hautinzision mit einer Skalpellklinge (Carbon Steel Skalpellklingen #15, Braun Aesculap AG & Co KG, Tuttlingen, Deutschland) medial des Kniegelenkes, wurde die Kniegelenkscapsel eröffnet und die Patella nach lateral luxiert (Abb. 9).

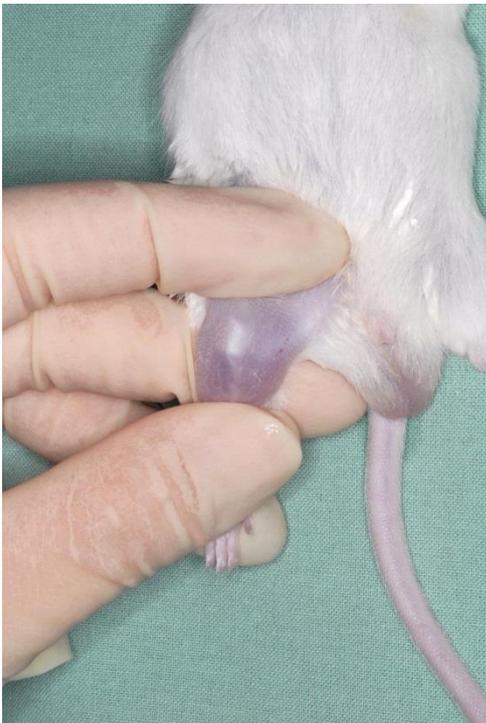


Abb. 8: Fixierung des Femurs



Abb. 9: Hautinzision mit luxierter Patella

Nach Freilegung der Femurkondylen wurde mit Hilfe einer 24 Gauge (G) Injektionsnadel (BD Microlane 3™ – 24 G 1“ - Nr.17, Ø 0,55 x 25mm – Becton Dickinson and Company, Drogheda, Irland) der Markraum aufgebohrt. Um den Markraum komplett retrograd aufzubohren, wurde eine dünnere Injektionsnadel (Sterican® Einmalkanüle für die Dentalanästhesie – 27 G x 1 ½ - Ø 0,4 x 40 mm, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verwendet. Letztendlich wurde somit auch der Trochanter major und die darüber liegende Haut durchstoßen (Abb. 10). Ein Wolfram-Führungsdraht (Ø = 0,2 mm, Goodfellow Camebridge Limited, Huntingdon, England) wurde über das Lumen der liegenden Nadel in den Markraum eingebracht (Abb. 11).



Abb. 10: Eingebachte Führungskanüle



Abb. 11: Eingebachter Wolfram-Führungsdraht

Je nach Gruppenzugehörigkeit unterschied sich das weitere Vorgehen. In der Osteotomie-Gruppe wurde das Femur über eine ca. 4 mm lange, laterale Inzision freigelegt. Mittels Gigli-Säge (Ø 0,22mm) wurde anschließend diaphysär die Osteotomie durchgeführt (Abb. 12). In der zweiten Gruppe (Fraktur-Gruppe) wurde das rechte Femur mittels Drei-Punkt-Biege-Vorrichtung frakturiert (Abb. 13 und 14) (Bonnarens F und Einhorn TA 1984). Abschließend wurde das Femur ebenfalls durch eine laterale Inzision freipräpariert.

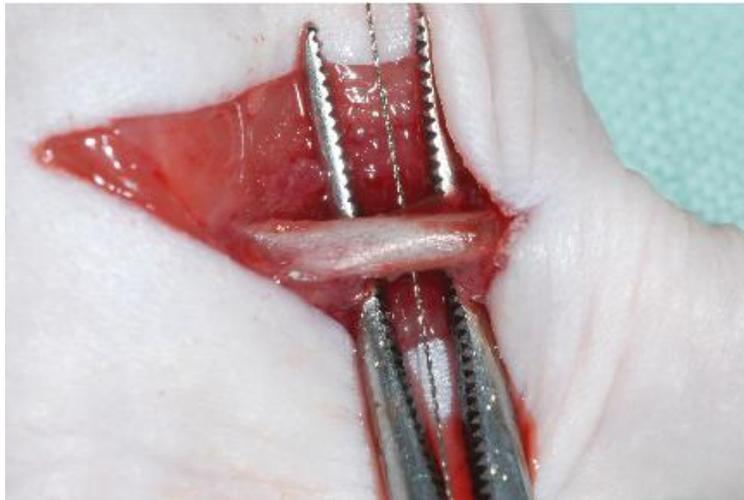


Abb. 12: Osteotomie mittels Gigli-Säge



Abb. 13: Guillotine

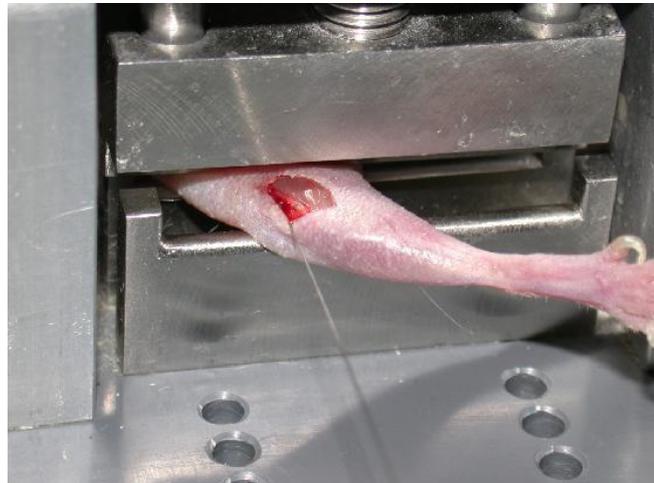


Abb. 14: Fraktur mittels Guillotine

Die Zugschraube wurde in beiden Fällen über den einliegenden Führungsdraht vorgeschoben und mit einem definierten Drehmoment eingedreht (Abb. 15). Abschließend erfolgte die Patellareposition. Der Verschluss der Kniegelenkscapsel (Abb. 16) und der Haut wurde mit 5-0 Prolene® (Ethicon Inc., Somerville, USA) durchgeführt. Abschließend wurde die Implantatlage und die Fraktur bzw. Osteotomie radiologisch kontrolliert (Abb. 17).



Abb. 15: Eindrehen der Schraube über den Führungsdraht



Abb. 16: Refixation der Patella



Abb. 17: Radiologische Kontrolle unmittelbar postoperativ

3.3.3 Tötung der Tiere

Nach 2 bzw. 5 Wochen postoperativ erfolgte die Tötung der Mäuse mit einer Überdosis Phenobarbital.

3.3.4 Präparation des Knochens

Direkt nach der Tötung wurden beide Oberschenkelknochen explantiert. Dies erfolgte durch eine Exartikulation, sowohl im Hüft- als auch im Kniegelenk. Die umgebenden Weichteile wurden vorsichtig mithilfe einer Skalpellklinge und einer feinen Schere reseziert. Nach erfolgtem Ausbau wurde das Implantat mit einem dafür entwickelten Ausdrehinstrument entfernt. Während der gesamten Prozedur wurde darauf geachtet, dass die Femora mit isotoner Kochsalzlösung befeuchtet wurden.

3.4 Zielkriterien und Auswertung

3.4.1 Radiologie

3.4.1.1 Konservatives Röntgen

Unmittelbar postoperativ und nach Präparation der ausgebauten Femora wurde eine Röntgenaufnahme im anterior-posterioren Strahlengang angefertigt (Abb. 15), Belichtungszeit 10 ms, Stromstärke 10 Ampere, Spannung 26 kV (Faxitron® MX-20 Cabinet X-ray System, Seriennummer: 2321 AO988, Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, USA). Eine weitere Auswertung der Röntgenbilder erfolgte in dieser Studie nicht.

3.4.1.2 Computertomographie

Nach 2 und 5 Wochen postoperativ wurden die Knochen mittels hoch auflösendem Mikro-CT der Firma BrukerMicroCT (ehemals Skyscan, Kontich, Belgien) untersucht. Hierzu wurden die Femora in Eppendorf-Gefäße (2 ml) mit 70%igem Ethanol gelegt, welche für die Untersuchung selbst senkrecht zur Achse des Röntgenstrahls positioniert

wurden. Der Kallus wurde mit bei einer Auflösung von 4 μm gescannt, während die Röntgenröhre mit einem Kathodenstrom von 200 μA und einer Beschleunigungsspannung von 50 keV arbeitete. Die Integrationszeit wurde auf 500 ms festgelegt, die Kameraauflösung betrug 1336 x 2000 Pixel.

Die so erhaltenen Rohdaten wurden mit Hilfe der firmeneigenen Rekonstruktionssoftware (NRecon, BrukerMicroCT, Kontich Belgien), zu einem multiplanaren Datensatz rekonstruiert. Als Volume of Interest wurde das Gesamtkallusvolumen definiert. Die Analyse des Kallusgewebes erfolgte mit einer Analysesoftware (CTAn, BrukerMicroCT, Kontich Belgien) am dreidimensionalen Datensatz.

Folgende Zielparameter wurden zur Analyse des Kallusgewebes festgelegt:

- Gesamtkallusvolumen (Tissue volume = TV) in mm^3
- Knochengewebe (Bone volume = BV) in mm^3
- Verhältnis des Knochengewebes zum Gesamtkallusvolumen (BV/TV) in %

3.4.2 Biomechanik

Für die biomechanische Testung wurden die Knochen ebenfalls kontinuierlich mit isotoner Kochsalzlösung befeuchtet.

Biomechanisch wurden die Knochen mittels Drei-Punkt-Biege-Testung (Mini-Zwick Z 2,5 – Zwick GmbH, Ulm, Deutschland) untersucht (Abb. 18). Die Testung erfolgte zerstörungsfrei. Die Steifigkeit wurde jeweils in Absolutwerten [N/mm] und Relativwerten [%] zum jeweiligen gesunden Knochen angegeben. Die Testung erfolgte standardisiert, so dass die Femora jeweils mit der Ventralseite nach oben in die Vorrichtung gelegt wurden. Der Abstand beider Auflagestempel betrug 6 mm. Die Geschwindigkeit der Messung betrug 1 mm/min. Zur Bestimmung der Biegesteifigkeit wurde die Steigung im linearen Anteil des Kraft-Wege-Diagramms (Abb. 19) herangezogen.

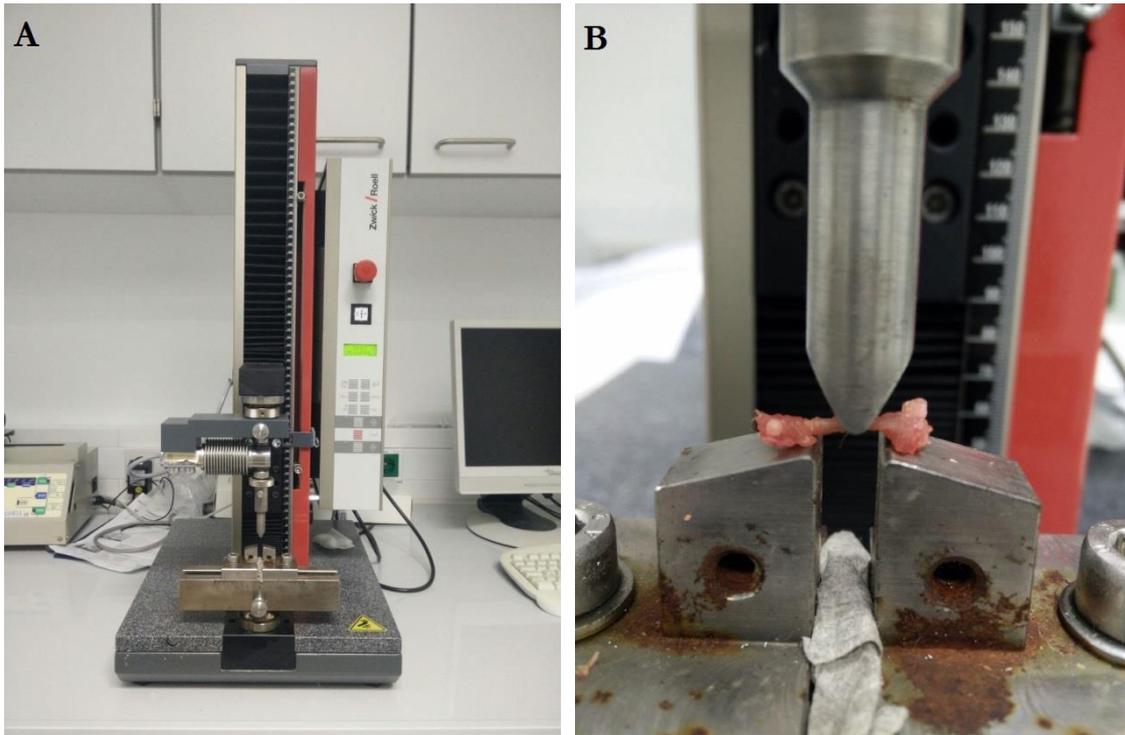


Abb. 18: 3-Punkt-Biegevorrichtung zur biomechanischen Testung. Übersichtsaufnahme der Vorrichtung (A), Detailaufnahme mit Testknochen (B).

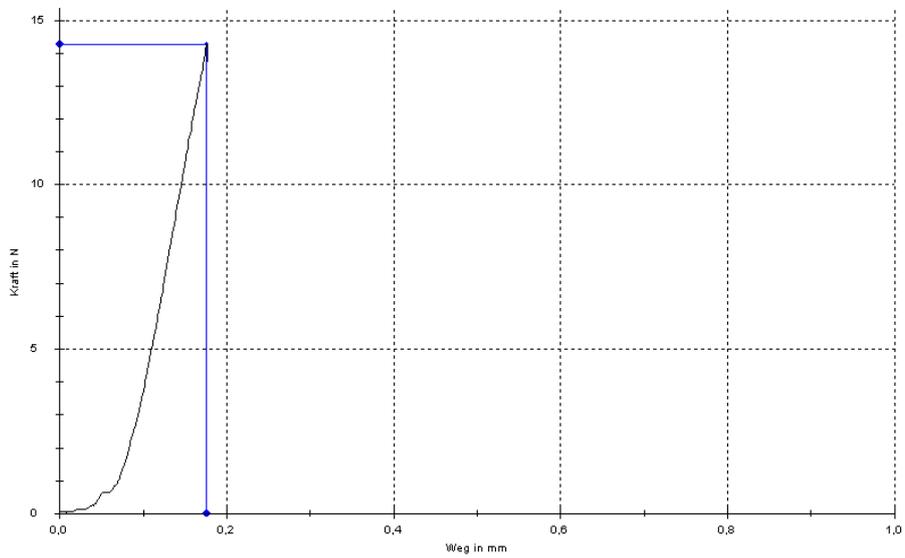


Abb. 19: Kraft-Wege-Diagramm zur Bestimmung der Biegesteifigkeit

3.4.3 Histologie

3.4.3.1 Histomorphometrie

Im Anschluss an die biomechanische Testung erfolgte die histologische Aufarbeitung des frakturierten Femurs. Die nachfolgend beschriebene Methode ist am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikum des Saarlandes/Homburg bereits etabliert.

In den ersten 24 Stunden wurden die Knochen in Zink-Lösung (ICH Zink Fixative – BD Bioscience Farmigen, San Diego, CA, USA) fixiert und anschließend für drei Wochen in 13% EDTA Lösung bei 4°C zu entkalkt. Die entkalkten Knochen wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils eine Stunde mit 70%, 80% und 90%, sowie viermal eine Stunde mit 100% Alkohol entwässert. Um das Gewebe paraffingängig zu machen erfolgte dreimal, für jeweils eine Stunde, die Behandlung mit Xylol. Abschließend wurden die Knochen über den Zeitraum von einer Stunde in heißes Paraffin eingebettet. Aus den entstandenen Präparaten konnten nun im Bereich des maximalen Kallusdurchmessers 5 µm dicke Schnitte in longitudinaler Richtung angefertigt werden. Anschließend wurden die Schnitte mit der Masson-Goldner-Methode gefärbt.

Tab. 2: Zelluläres und extrazelluläres Färbeverhalten der Masson-Goldner-Färbung

Gewebe	Farbe
Zytoplasma	hellrot bis orange
Erythrozyten	rot
Muskel	blässrot
Mineralisierter Knochen	grün (leuchtend)
Verkalkte Knorpelmatrix	hellgrün

Dazu wurden die Schnittpräparate zunächst 1 bis 2 Minuten in Weigerts Eisenhämatoxylin gelegt und dann 10 bis 15 Minuten mit fließendem Wasser gespült. Anschließend erfolgte die Färbung mit Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin für 5 bis 7 Minuten (Masson-Goldner I), sowie das Abspülen mit 1% Essigsäure. Masson-Goldner II beinhaltet das Differenzieren in Molybdätosphorsäure-Orange oder Wolframatophosphorsäure-Orange für etwa 3 Minuten bis zur völligen Entfärbung des Bindegewebes, sowie das erneute Abspülen mit 1% Essigsäure. Mit Lichtgrün (bzw. Anilinblau) wurde das Präparat für 5 min gegengefärbt (Masson-Goldner III). Abschließend wurde es 5 Minuten mit 1% Essigsäure ausgewaschen, rasch in Isopropanol entwässert, kurz in Xylol geschwenkt und in Einschlussharz eingebettet.

Zur Auswertung der Schnittpräparate mussten diese zunächst digitalisiert werden. Dies erfolgte am Mikroskop (Olympus BX60 Microscope - Olympus, Tokio, Japan) mit einem 1,25x Weitwinkelobjektiv und einer an das Mikroskop angeschlossenen Kamera inklusive Digitalisierungsprogramm (Zeiss Axio Cam and Axio Vision 3.1 - Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Die so gewonnenen digitalen Bilder der Präparate wurden mit dem Bildauswertungsprogramm ImageJ® (ImageJ Analysis System, NIH, Bethesda, MD, USA) analysiert.

Folgende Parameter wurden bei der mikroskopischen Auswertung des histologischen Schnittpräparates ausgewertet:

- Femurdurchmesser in Höhe des Frakturspaltes (BDm) [mm]
- Periostale Kallusfläche (CAr) [mm²]
- Knöcherner Anteil innerhalb des Kallus (TOTAr) [mm²]
- Knorpeliger Anteil innerhalb des Kallus (CgAr) [mm²]
- Bindegewebiger Anteil innerhalb des Kallus (FTAr) [mm²]

Als Zielwerte wurden, nach einer von Gerstenfeld (Gerstenfeld LC *et al.* 2005) publizierten Nomenklatur, gemäß der Empfehlungen der American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR) (Parfitt AM *et al.* 1987), folgende Parameter bestimmt:

- Kallusfläche gesamt / Femurdurchmesser
Callus Area / Bone Diameter (CAr/BDm [mm])
- Knöcherne Kallusfläche / Kallusfläche gesamt
Total Osseous Tissue Area / Callus Area (TOTAr/CAr [%])
- Knorpelige Kallusfläche / Kallusfläche gesamt
Cartilage Area / Callus Area (CgAr/CAr [%])
- Bindegewebige Kallusfläche / Kallusfläche gesamt
Fibrous Tissue Area / Callus Area (FTAr/CAr [%])

3.4.3.2 Immunhistochemie

Die Gefäßbildung innerhalb des Kallusgewebes wurde mithilfe immunhistologischer Methoden untersucht. Als Marker für Endothelzellen diente CD31.

Die zur Histomorphometrie hergestellten Präparate wurden zunächst deparaffiniert, indem sie 3 x 3 Minuten mit Xylol behandelt und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe, von 100% bis 70%, für jeweils 2 bis 3 Minuten rehydriert wurden. Nach Spülung in destilliertem Wasser wurde die endogene Peroxidase durch 10-minütiges Einlegen der Präparate in 3% H₂O₂ geblockt. Als Blockierungsreagenz diente eine Mischung aus 1 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und 30 µl Normalserum. Es wurden 75 µl dieser Mischung auf das Präparat pipettiert. Anschließend wurde dieses für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

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

Nach Applikation des Primärantikörpers (polyklonaler Ratten Antikörper, 1:30, Dianova GmbH, Hamburg, Germany) wurden die Präparate über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Schnitte 3 Minuten mit PBS gespült. Nach Ausguss des Puffers erfolgte die erneute, nun 5-minütige Spülung mit PBS.

Im nächsten Schritt wurde der Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus-IgG, 1:50; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) aufgetragen und 30 Minuten in feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte eine erneute mehrmalige Spülung mit PBS wie nach Auftragen des Primärantikörpers.

Diaminobenzidin (DAB) diente als Chromogen. Zur Herstellung wurde destilliertes Wasser mit je einer Tablette DAB und H₂O₂ vermischt. 100 µl des so hergestellten Reagenz wurden appliziert. Es folgte die 3-minütige Inkubation der Präparate in feuchter Kammer bei Raumtemperatur sowie die Spülung in destilliertem Wasser für 5 Minuten.

Die histologischen Schnitte wurden mit der Hämalunmethode nach Mayer gegengefärbt. Hierzu erfolgte die Spülung in destilliertem Wasser sowie die 8-minütige Wässerung unter fließendem Leitungswasser. Nach erneuter Spülung mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe, beginnend mit 70% Ethanol und endend bei 100% Ethanol, für jeweils 3 Minuten entwässert. Abschließend wurden die Schnitte erneut 3x3 Minuten mit Xylol behandelt und schließlich eingedeckt.

Im Rahmen der Auswertung wurden die histologischen Schnitte auf das Vorliegen positiv gefärbter Zellen untersucht. Die sagittal angeschnittene Kallusfläche wurde anhand der Femurachse und der Frakturlinie in Quadranten aufgeteilt. In jedem Quadranten wurden die CD-31 positiven Gefäße in einem „high power field“ (HPF) bei 20facher Vergrößerung ausgezählt. Das HPF wurde jeweils am Übergang von Blasenknorpel zu ossifiziertem Kallusgewebe positioniert. Die Daten repräsentieren die Anzahl CD-31 positiver Zellen pro HPF.

3.4.4 Western Blot

Das Western-Blot-Verfahren dient der quantitativen Bestimmung von Proteinen. Nach der Auftrennung der Proteine durch eine Gelelektrophorese werden die Proteine über ein senkrecht zum ersten Gel gerichteten elektrisches Feld auf eine proteinbindende Membran transferiert. Es entsteht sozusagen ein Abklatsch (Blot) auf geeignete Folien bzw. Membranen. An derartige Blots können anschließend spezifische Antikörper gebunden werden, über welche dann das von diesem Antikörper erkannte Protein identifiziert wird (Löffler G *et al.* 2007). Die im Gel verbleibenden Proteinbanden können nach erfolgtem Membrantransfer durch eine Anfärbung mit Coomassie Brillantblau und die transferierten Banden auf der Membran durch eine reversible Anfärbung mit Ponceau S visuell dargestellt werden. Zur Überprüfung der Blotbedingungen wird als internen Standard ein ubiquitär konstitutiv exprimiertes Protein (i. d. R. α -Tubulin oder β -Actin) mitgeführt, welches in allen zu vergleichenden Ansätzen die gleiche Expressionsstärke aufweisen muss.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Proteine, welche eine wichtige Rolle während der Frakturheilung spielen, analysiert (Tab. 3). Dazu gehörten bone morphogenetic protein 2 und 4 (BMP-2 und BMP-4), Kollagen 1 und Kollagen 10 (Col-1 und Col-10), cystein-rich protein 61 (Cyr-61), receptor activator of NF- κ B Ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG) und vascular endothelial growth factor (VEGF).

Tab. 3: Übersicht über die im Western Blot analysierten Proteine und deren Funktion

Protein	Funktion
BMP-2 und -4	Knochenmarker
Kollagen-2 und -10	Knorpelmarker
Cyr-61	Angiogenese-/Knochen- und Knorpelmarker
RANKL	Osteoklastenstimulator
OPG	Osteoklasteninhibitor
VEGF	Angio- und osteogener Wachstumsfaktor

Zur Durchführung der Western Blot-Analyse wurde bei den dafür vorgesehenen Tieren nach 14 Tagen nur der frakturierte bzw. osteotomierte Knochen explantiert. Nach Entfernen des Weichteilmantels wurde der aus knöchernem, knorpeligem und bindegewebigem Gewebe bestehende Kallus reseziert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -80°C bis zur Analyse kryokonserviert. Die kryokonservierten Proben wurden zunächst mit je $150\ \mu\text{l}$ vorgekühltem Lyse-Puffer, einem Proteaseinhibitor-Cocktail (1:75; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und $100\ \text{mM}$ Phenylmethylsulfonylfluorid (1:500; PMSF) homogenisiert. Danach wurden die Proben für 30 Minuten auf Eis inkubiert und für weitere 30 Minuten mit $13000\ \text{U}/\text{min}$ ($16000 \times g$) bei 4°C zentrifugiert (Biofuge Fresco, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland). Abschließend wurden die Überstände abpipettiert und Aliquots der gewonnenen Proteinextrakte bei -20°C kryokonserviert.

Die aus der Proteinextraktion gewonnenen Proben wurden mit 1:10 Aqua destillata (A. dest.) verdünnt. Unmittelbar vor der Proteinbestimmung wurde folgende Messlösung angesetzt:

- $5\ \text{ml}$ Reagenz A: $10\ \text{g Na}_2\text{CO}_3/500\ \text{ml}$ $0,1\ \text{M NaOH}$
(Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- $100\ \mu\text{l}$ Reagenz B: $0,1\ \text{g KNa-Tartrat}$, $0,25\ \text{g Cu-Sulfat} \times 5\ \text{H}_2\text{O}/50\ \text{ml}$ A. dest.
(Merck, Darmstadt, Deutschland)

Zu $250\ \mu\text{l}$ dieser Lösung wurden je $50\ \mu\text{l}$ der verdünnten Extrakte zugesetzt und sofort 10 Sekunden gemischt (Vortex Mixer, Heidolph™ Reax Top, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland). Im Anschluss wurden die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit $25\ \mu\text{l}$ verdünnter (1:2 mit A. dest.) Folinlösung gemischt (Vortex).

Nach einer erneuten Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption des entstandenen Farbkomplexes bei einer Wellenlänge von $595\ \text{nm}$ gegen A. dest. photometrisch gemessen (GeneQuant pro, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). Die Proteinkonzentration wurde mithilfe einer BSA-Standardkurve ermittelt. Es wurde für jedes Proteinextrakt eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Extrakte

wurden auf gleiche Proteingehalte (13,5 µg/15 µl) eingestellt und mit Laemmli-Puffer 2x (Sigma-Aldrich) für 5 min im kochenden Wasserbad denaturiert.

Die Western-Blot-Analysen wurden als eindimensionale SDS-PAGE unter diskontinuierlichen Bedingungen nach Laemmli (Laemmli UK *et al.* 1970) mit einer Acrylamidkonzentration von 5% im Sammelgel und 10% im Trenngel durchgeführt (30 % Acrylamid / Bis Solution; 29:1; Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) (Tab. 4).

Tab. 4: Zusammensetzung der für die Western-Blot-Analysen verwendeten Sammel- und Trenngele

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

Die Gele wurden in einer vertikalen Flachapparatur mit Gießstand für Minigele entsprechend der Anleitung des Herstellers gegossen (Bio-Rad). Nach Einfüllen der Trenngellösung wurden vorsichtig ca. 200 µl Isopropanol (Carl Roth) überschichtet, um eine Hemmung der Polymerisation an der Geloberfläche durch Luftsauerstoff zu verhindern und die Ausbildung einer glatten Trennfläche zwischen Trenn- und Sammelgel zu gewährleisten. Nach einer einstündigen Polymerisationszeit wurde nach Entfernung des Alkohols das Sammelgel in die Apparatur gegossen. Unmittelbar im Anschluss wurden die entsprechenden Geltaschen, welche ein maximales Beladungsvolumen von 15 µl zulassen, mit einem Teflonkamm (15 Zähne; 4mm x 1cm x 0,75mm; Bio-Rad) gesetzt.

Nach einer Stunde Polymerisierung wurden 15 µl der Proben in die Geltaschen aufgetragen. Im weiteren Verlauf wurden die Proteine in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Bio-Rad) entsprechend ihrer Molekülgröße in einem TRIS / Glycinpuffer (0,125M TRIS Base, 0,96M Glycin, 0,5% SDS; Carl Roth) getrennt.

Um die erforderliche Niederspannung zu gewährleisten, wurde ein spezielles Netzgerät für stabilisierten Gleichstrom (Bio-Rad) verwendet. Hierbei wurde eine anfängliche Spannung von 100 V angelegt, um die Proteine im Sammelgel zu konzentrieren. Diese wurde nach 15 Minuten zur Passage des Trenngels für etwa 1 Stunde auf 140 V erhöht. Nachdem die „blaue Lauffront“ der Bromphenolblau-Bande des Laemmli Puffers das untere Gel Ende erreicht hatte, wurde die Auftrennung der Proteine beendet. Im Anschluss wurden die Gele aus der Kammer genommen und in einem Transferpufferbad (12 mM TRIS Base, 96 mM Glycin; Carl Roth) für das weitere Membranblotting äquilibriert.

Zur Durchführung des sogenannten Tankblottings im Rahmen des horizontalen Proteintransfers wurde eine Mini-Trans-Blotkammer (Bio-Rad) verwendet. Um Oberflächenladungen auszugleichen, wurde die PVDF-Membran mit 0,2 µm Porengröße (Bio-Rad) für 20 Sekunden in Methanol (Carl Roth) gebadet und sofort mit destilliertem Wasser abgespült. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Äquilibrierung in Transferpuffer. Für den Blotsandwich wurden die äquilibrierte PVDF-Membran und das Gel luftblasenfrei zwischen zwei Transferpuffer-getränkten Schwämmen mit entsprechendem Filterpapier (Whatman, Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland) in die Blotkassette eingelegt. Die verschlossene Sandwichkassette wurde so in der Blotkammer ausgerichtet, so dass der Stromfluss einen Proteintransfer vom Gel zur Membran gewährleistete. Zur Beibehaltung einer gleichmäßig niedrigen Temperatur wurden ein Eis-Spacer und ein Magnetrührer verwendet. Nach Auffüllung der Blotkammer mit Transferpuffer wurde für 2 Stunden ein zweiter Gleichstrom (Anfangsstromstärke 800 mA/2 Gele) bei konstanter Spannung (50V) angelegt. Die proteinbeladene Membran wurde über Nacht in TBS-T-Puffer (1,5 mM TRIS Base pH 7,5, 1% NaCl, 0,01% Tween 20; Carl-Roth) in destilliertem Wasser bei 4 °C zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

Die Detektion der Targetproteine erfolgte über eine spezifische Antikörperfärbung der membrantransferierten Proteine. Alle Handhabungen zur Antikörperfärbung der Membranen wurden auf einem Horizontalschüttler durchgeführt. Die über Nacht in TBS-T aufbewahrten Membranen wurden vor der Saturierung noch dreimal mit TBS-T gewaschen. Die Membran wurde in 5% Lösung aus Milchpulver (Blotting Grade Blocker non-fat dry milk; Bio-Rad) und TBS-T für 30 Minuten inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach drei weiteren Waschschrritten mit TBS-T wurden die entsprechenden Primärantikörper nach einem jeweils unterschiedlichen Zeitschema bei Raumtemperatur inkubiert (Tab. 5).

Tab. 5: Primärantikörper für die Western-Blot-Analysen

Antikörper	Verdünnung/Inkubation	Bezugsquelle
BMP-2	1:100 4h Raumtemperatur (RT) + über Nacht 4°C	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
BMP-4	1:100 4h RT + über Nacht 4°C	Santa Cruz
Col-2	1:100 4h RT + über Nacht 4°C	Bioss, Woburn, MA, USA
Col-10	1:300 4h RT + über Nacht 4°C	Bioss
Cyr-61	1:100 4h RT + über Nacht 4°C	Santa Cruz Biotechnology
RANKL	1:300 4h RT	Abcam, Cambridge, UK
OPG	1:300 4h RT + über Nacht 4°C	Bioss
VEGF	1:100 4h RT + über Nacht 4°C	Santa Cruz Biotechnology
α -Tubulin	1:500 2h RT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit den korrespondierenden Sekundärantikörpern (Tab. 6):

Tab. 6: Sekundärantikörper für die Western-Blot-Analysen

Primär AK	Sekundär AK	Verdünnung/ Inkubation	Bezugsquelle
BMP-2	Donkey-anti-rabbit Immunglobulin (IgG)-POD	1:5000 1,5h RT	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
BMP-4	Donkey-anti-rabbit IgG-POD	1:5000 1,5h RT	GE Healthcare
Col-2	Donkey-anti-rabbit IgG-POD	1:5000 1,5h RT	GE Healthcare
Col-10	Rabbit-anti-goat IgG- POD	1:1000 1,5h RT	Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland
Cyr-61	Rabbit-anti-goat IgG- POD	1:1000 1,5h RT	Dako Cytomation
RANKL	Donkey-anti-rabbit IgG-POD	1:5000 1,5h RT	GE Healthcare
OPG	Donkey-anti-rabbit IgG-POD	1:5000 1,5h RT	GE Healthcare
VEGF	Donkey-anti-rabbit IgG-POD	1:5000 1,5h RT	GE Healthcare
α -Tubulin	Sheep-anti-mouse IgG-POD	1:5000 1,5h RT	GE Healthcare

Die Membranen wurden nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur fünfmal in TBS-T gewaschen und anschließend einer Chemilumineszenzreaktion unterzogen (ECL Western Blotting Analysis System; GE Healthcare, Freiburg, Deutschland).

Die entsprechenden Signale der behandelten Membranen wurden auf Röntgenfilmen (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) detektiert und visualisiert. Als interner Standard wurde zur Kontrolle der Proteinbeladung und des Proteintransfers der monoklonale α -Tubulin-Antikörper (Sigma-Aldrich) verwendet. Als eines der höchst-konservierten eukaryotischen Proteine mit konstanter intrazellulärer Verteilung im Zytoskelett eignet sich α -Tubulin als Proteinkonzentrationsstandard. Die Röntgenfilme wurden mit einem Gel-Dokumentationssystem (Gel Doc; Bio-Rad) und einem entsprechenden Quantifizierungsprogramm (Quantity One-Gel Doc; Bio-Rad) ausgewertet. Die quantitative Analyse der Proteinmuster erfolgte durch densitometrische Bestimmung der Lichtabsorption, indem die optische Dichte der Banden über die Fläche ihrer Ausdehnung analysiert wurde. Die ermittelten Daten wurden abschließend über den internen α -Tubulin-Standard korrigiert.

3.5 Statistik

Die statistischen Daten im Text werden als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Nach Überprüfung der Normalverteilung erfolgte eine einseitige Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Student's t-Test. Zur Erstellung der Statistik wurde das Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) verwendet. Es wurde ein p-Wert von $<0,05$ festgelegt, um signifikante Unterschiede festzulegen.

4 Ergebnisse

4.1 Postoperativer Verlauf

Nach dem operativen Eingriff wurden die Tiere in der Aufwachphase unter der Wärmelampe beobachtet. Des Weiteren erfolgte die tägliche Beobachtung über die gesamte Dauer der Standzeit, insbesondere in Hinblick auf pathologische Verhaltens- oder Bewegungsmuster. Über einen Zeitraum von zwei Tagen wurde den Tieren als Schmerzmittel Tramadol (Tramal® 2,5 mg/100 ml, Grünethal GmbH, Aachen, Deutschland) über das Trinkwasser verabreicht.

Als Ausschlusskriterien wurden Infektionen und eine deutliche Gewichtsabnahme festgelegt. Unmittelbar postoperativ konnte eine verminderte Aktivität durch eine Schonhaltung der operierten Extremität festgestellt werden. Innerhalb des zweiten postoperativen Tages zeigten jedoch alle Tiere einen physiologischen Bewegungsablauf.

4.2 Makroskopischer Befund

Die Versuchstiere wurden post mortem im Rahmen der Explantation der Femora auf das Vorliegen eventueller pathologischer Veränderungen hin untersucht. Insbesondere wurde dabei auf Infektionen im Bereich der Gelenke und der Beinmuskulatur geachtet. Bei keinem der Tiere fanden sich Hinweise auf eine Lockerung des Implantates, eine Patellaluxation oder Weichteil- bzw. Knocheninfektion.

Nach der Explantation, sowie der Resektion des Weichteilmantels und Entfernung der Implantate, konnte die Überbauung des Fraktur- bzw. Osteotomiespaltes makroskopisch beurteilt werden. Die Kallusgröße konnte zu diesem Zeitpunkt keine wesentlichen Rückschlüsse auf die Gruppenzugehörigkeit geben. Nach fünfwöchiger Heilung war der Frakturspalt knöchern überbaut, während in der Osteotomiegruppe eine deutliche Kallusformation nachweisbar war.

4.3 Radiologie

4.3.1 Computertomographie

In den computertomographischen Analysen wurden das Gesamtkallusvolumen [mm^3], sowie der absolute [mm^3] und prozentuale [%] Anteil an Knochengewebe ausgewertet.

Zwei Wochen postoperativ war das Kallusvolumen (Tissue Volume = TV) in beiden Gruppen vergleichbar (Tab. 7, Abb. 20 A). Fünf Wochen postoperativ war das Kallusvolumen in der Osteotomiegruppe deutlich größer. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Tab. 7, Abb. 20 B).

Der absolute Anteil an Knochengewebe (Bone Volume = BV) unterschied sich sowohl nach zwei als auch nach fünf Wochen postoperativ nicht signifikant (Tab. 7, Abb. 20 C und D).

Im Gegensatz dazu war der relative Anteil an Knochengewebe (BV/TV) in der Osteotomiegruppe im Vergleich zur Frakturgruppe signifikant niedriger (Tab. 7, Abb. 20 E und F).

Tab. 7: Auswertung Computertomographie, Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Fraktur. Angegeben sind das Kallusvolumen (TV), der absolute Anteil an Knochengewebe (BV) und der relative Anteil an Knochengewebe (BV/TV) 2 und 5 Wochen postoperativ in der Fraktur- und Osteotomiegruppe.

	Fraktur		Osteotomie	
	2 Wochen	5 Wochen	2 Wochen	5 Wochen
TV [mm^3]	44,2 \pm 7,6	19,6 \pm 2,1	58,5 \pm 3,3	43,5 \pm 10,7
BV [mm^3]	13,6 \pm 1,3	10,4 \pm 1,2	12,8 \pm 0,6	15,4 \pm 3,4
BV/TV [%]	32,2 \pm 3,2	52,9 \pm 2,7	21,9 \pm 0,4*	36,9 \pm 4,1*

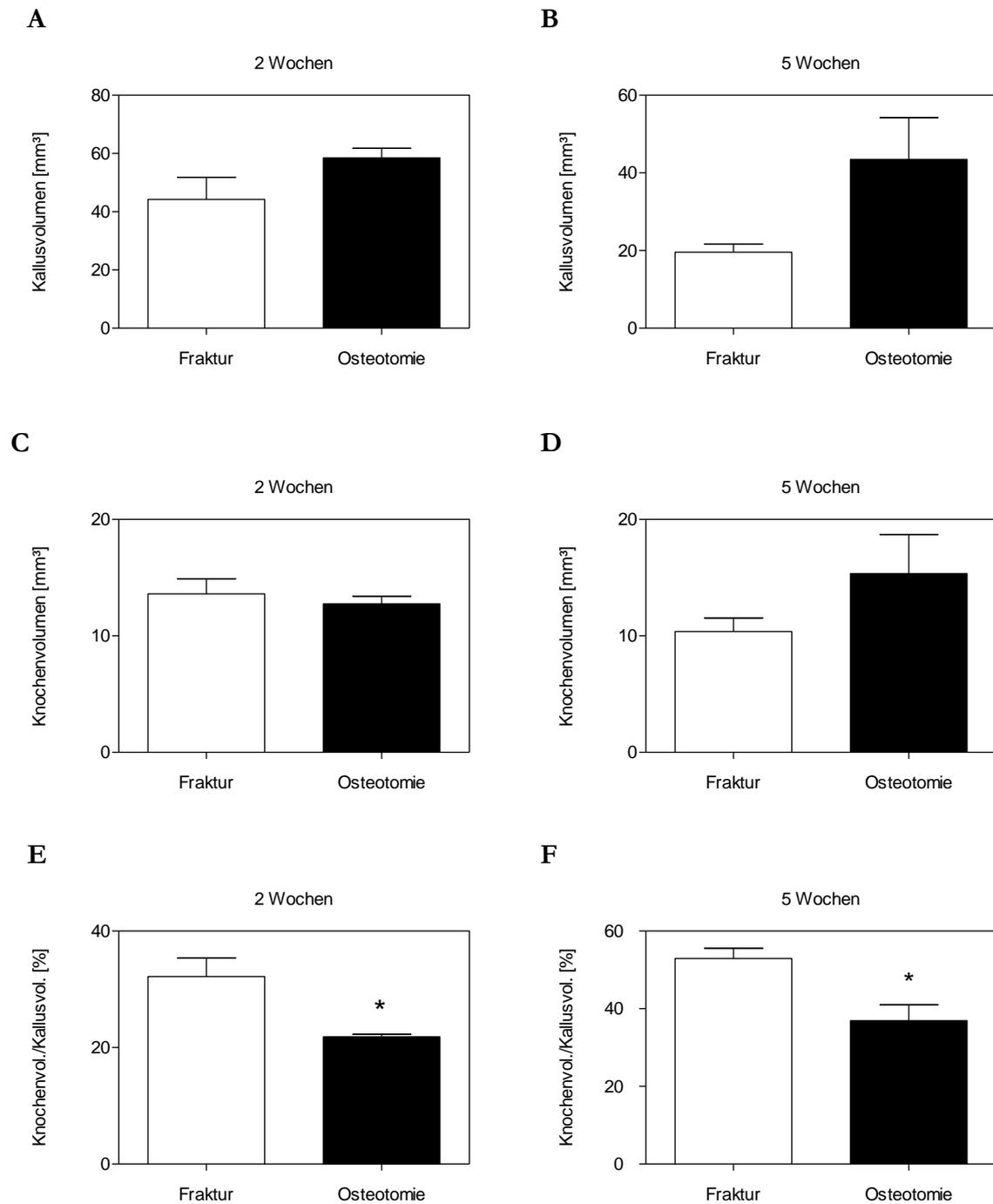


Abb. 20: Kallusvolumen zwei Wochen postoperativ (**A**). Kallusvolumen fünf Wochen postoperativ (**B**). Absoluter Anteil an Knochengewebe zwei Wochen postoperativ (**C**). Absoluter Anteil an Knochengewebe fünf Wochen postoperativ (**D**). Relativer Knochenanteil am Kallusvolumen zwei Wochen postoperativ (**E**). Relativer Knochenanteil am Kallusvolumen fünf Wochen postoperativ (**F**). Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Fraktur.

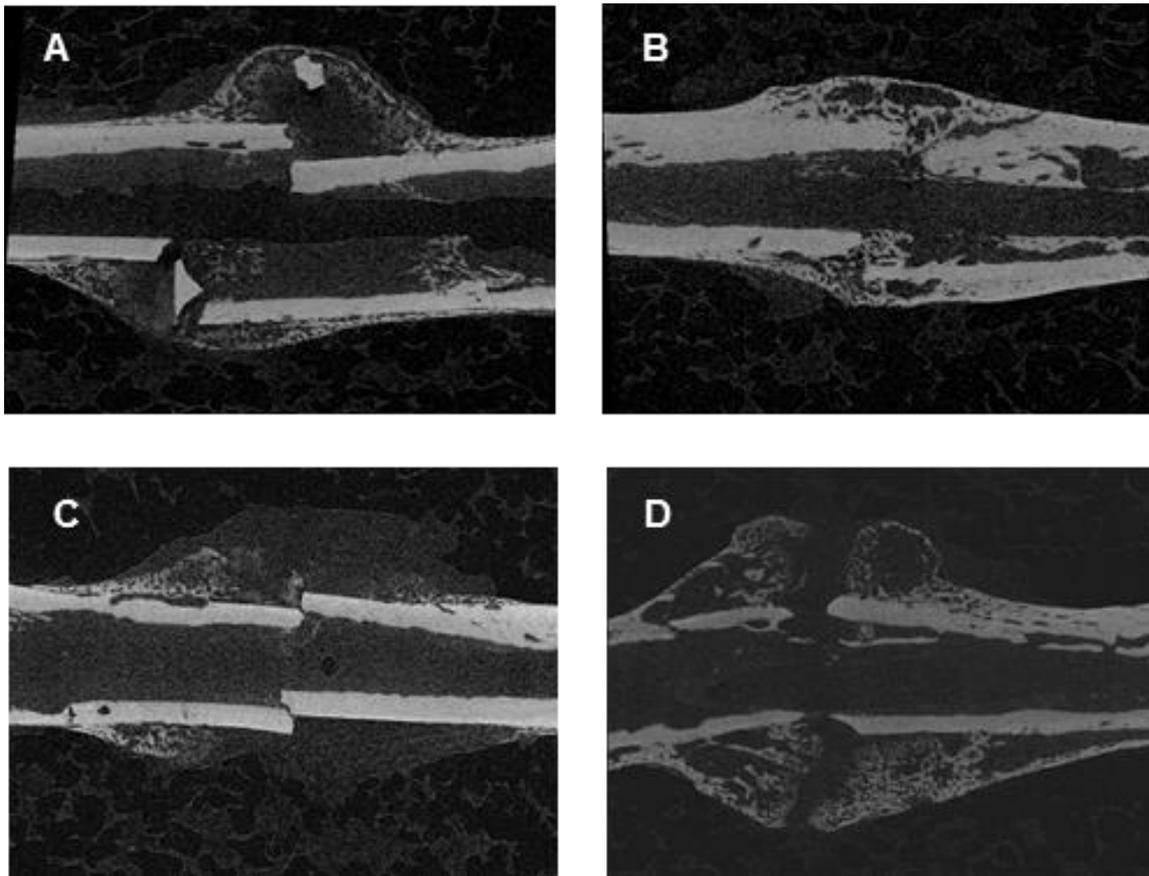


Abb. 21: Mikro-CT Schnittbilder zwei Wochen postoperativ nach Fraktur (A) und Osteotomie (C), sowie fünf Wochen postoperativ nach Fraktur (B) und Osteotomie (D).

4.4 Biomechanik

Die biomechanischen Untersuchungen erfolgten mittels 3-Punkt-Biege-Testung. Die Testung erfolgte sowohl an den frakturierten bzw. osteotomierten Femora, als auch an den nicht frakturierten kontralateralen Femora.

Die biomechanischen Auswertungen zwei Wochen postoperativ zeigten eine signifikant niedrigere absolute Biegesteifigkeit [N/mm] nach offener Osteotomie im Vergleich zu der offenen Fraktur (Tab. 8, Abb. 22 A). In der Gruppe, in der die Femora frakturiert wurden, konnten deutlich höhere Biegesteifigkeiten von minimal (min.) 0,47 N/mm bis maximal (max.) 18,90 N/mm bestimmt werden. In der Osteotomiegruppe wurden Werte von min. 0,09 N/mm bis max. 1,33 N/mm ermittelt. Beim Vergleich der relativen Biegesteifigkeit in Relation zum kontralateralen gesunden Knochen zeigte sich zwei Wochen postoperativ ebenfalls ein signifikanter Unterschied (Tab. 8, Abb. 22 C).

Auch fünf Wochen postoperativ war die Biegesteifigkeit nach Osteotomie signifikant geringer im Vergleich zur Frakturgruppe. (Tab. 8, Abb. 22 B und D).

Tab. 8: Auswertung Biomechanik, Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Fraktur. Angegeben sind die absolute Biegesteifigkeit (N/mm) und relative Biegesteifigkeit 2 und 5 Wochen postoperativ in der Fraktur- und Osteotomiegruppe.

	Fraktur		Osteotomie	
	2 Wochen	5 Wochen	2 Wochen	5 Wochen
Biegesteifigkeit [N/mm] absolut	7,6 \pm 2,5	77,3 \pm 15,7	0,7 \pm 0,2*	21,1 \pm 3,9*
Biegesteifigkeit [%] relativ	6,0 \pm 1,9	55,8 \pm 13,1	0,6 \pm 0,1*	13,2 \pm 2,0*

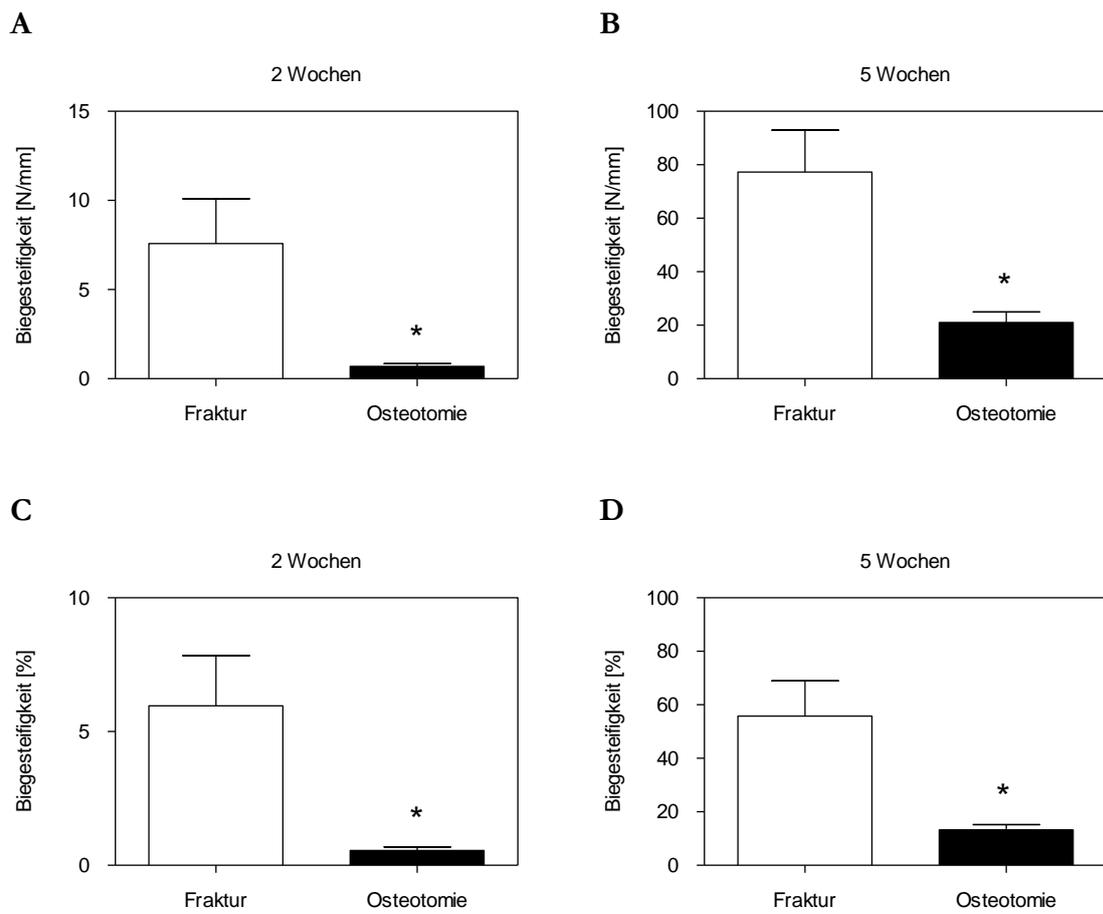


Abb. 22: Absolute Biegesteifigkeit zwei Wochen postoperativ (**A**). Absolute Biegesteifigkeit fünf Wochen postoperativ (**B**). Relative Biegesteifigkeit zwei Wochen postoperativ (**C**). Relative Biegesteifigkeit fünf Wochen postoperativ (**D**). Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Fraktur.

4.5 Histologie

4.5.1 Histomorphometrie

Die histologischen Analysen des Kallusgewebes wurden an sagittalen, longitudinalen Schnittpräparaten im Bereich des maximalen Kallusdurchmessers durchgeführt.

Beide Gruppen zeigten eine vergleichbare periostale Gesamtkallusfläche (CAr [mm²]) zwei Wochen postoperativ (Tab. 9, Abb. 23 A). In der Osteotomiegruppe wurden Werte von min. 7,70 mm² bis max. 12,43 mm² gemessen. In der Frakturgruppe reichte die periostale Kallusfläche von min. 4,64 mm² bis max. 11,86 mm². Um die individuellen Unterschiede der einzelnen Versuchstiere zu berücksichtigen, wurde der Kallusdurchmesser in Relation zum Femurdurchmesser (CAr/BDm [mm]) ermittelt. Hierbei zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied (Tab. 9, Abb. 23 C).

Im Gegensatz dazu war die periostale Gesamtkallusfläche fünf Wochen postoperativ nach Osteotomie signifikant größer als in der Frakturgruppe (Tab. 9, Abb. 23 B). In der Osteotomiegruppe fanden sich Werte von min. 5,08 mm² bis max. 12,36 mm², wohingegen die Kallusflächen in der Frakturgruppe von min. 3,47 mm² bis mx. 9,99 mm² reichten. Die Gesamtkallusfläche in Bezug zum Femurdurchmesser war nach Osteotomie fünf Wochen postoperativ ebenfalls signifikant größer (Tab. 9, Abb. 23 D).

Tab. 9: Auswertung Gesamtkallus, Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Fraktur. Angegeben sind die periostale Gesamtkallusfläche (CAr), sowie der Kallusdurchmesser im Vergleich zum Femurdurchmesser (CAr/BDm) 2 und 5 Wochen postoperativ in der Fraktur- und Osteotomiegruppe.

	Fraktur		Osteotomie	
	2 Wochen	5 Wochen	2 Wochen	5 Wochen
CAr [mm ²]	9,3 \pm 0,9	5,8 \pm 0,9	9,5 \pm 0,7	9,0 \pm 1,0*
CAr/BDm [mm]	5,9 \pm 0,6	3,9 \pm 0,6	6,2 \pm 0,7	6,0 \pm 0,8*

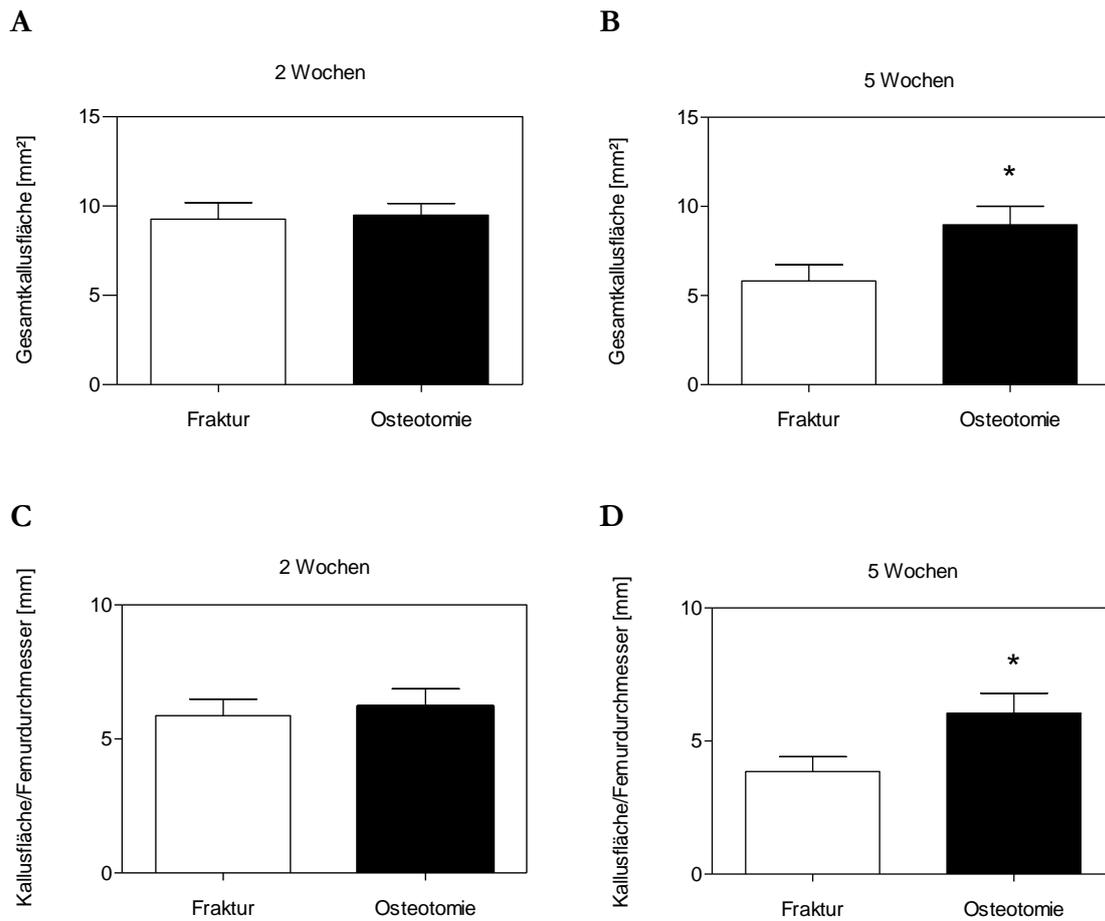


Abb. 23: Periostale Kallusfläche (CAr) zwei Wochen postoperativ (**A**). Periostale Kallusfläche (CAr) fünf Wochen postoperativ (**B**). Periostale Kallusfläche/Femurdurchmesser (CAr/BDM) zwei Wochen postoperativ (**C**). Periostale Kallusfläche/Femurdurchmesser (CAr/BDM) fünf Wochen postoperativ (**D**). Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Fraktur.

Bei der Analyse der Gewebszusammensetzung des periostalen Kallus zwei und fünf Wochen postoperativ unterschieden sich die Gruppen deutlich.

Zwei Wochen postoperativ war der absolute Anteil des Knochengewebes (TOTAr [mm²]) in der Osteotomiegruppe signifikant niedriger als in der Frakturgruppe (Tab. 10, Abb. 24 A). Der relative Anteil an Knochengewebe zum Gesamtkallus (TOTAr/CAr [%]) war ebenfalls nach Osteotomie signifikant geringer. Der Anteil lag in der Osteotomiegruppe im Mittel bei 25,34%. In der Frakturgruppe wurde fast 50% Knochengewebe im Kallus nachgewiesen (Tab. 10, Abb. 24 C).

Fünf Wochen postoperativ unterschied sich der absolute Anteil an Knochengewebe nicht signifikant. Der prozentuale Anteil war fünf Wochen postoperativ in der Frakturgruppe mit nahezu 100% signifikant höher im Vergleich zur Osteotomiegruppe mit 87% (Tab. 10, Abb. 24 B und D).

Tab. 10: Auswertung Knochengewebe im Gesamtkallus, Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Fraktur. Angegeben sind der absolute Anteil an Knochengewebe (TOTAr), sowie der relative Anteil an Knochengewebe im Gesamtkallus (TOTAr/CAr) 2 und 5 Wochen postoperativ in der Fraktur- und Osteotomiegruppe.

	Fraktur		Osteotomie	
	2 Wochen	5 Wochen	2 Wochen	5 Wochen
TOTAr [mm ²]	4,6 \pm 0,7	5,8 \pm 0,9	2,5 \pm 0,5*	7,8 \pm 0,9
TOTAr/CAr [%]	49,9 \pm 6,0	99,6 \pm 0,4	25,3 \pm 4,1*	87,5 \pm 3,1*

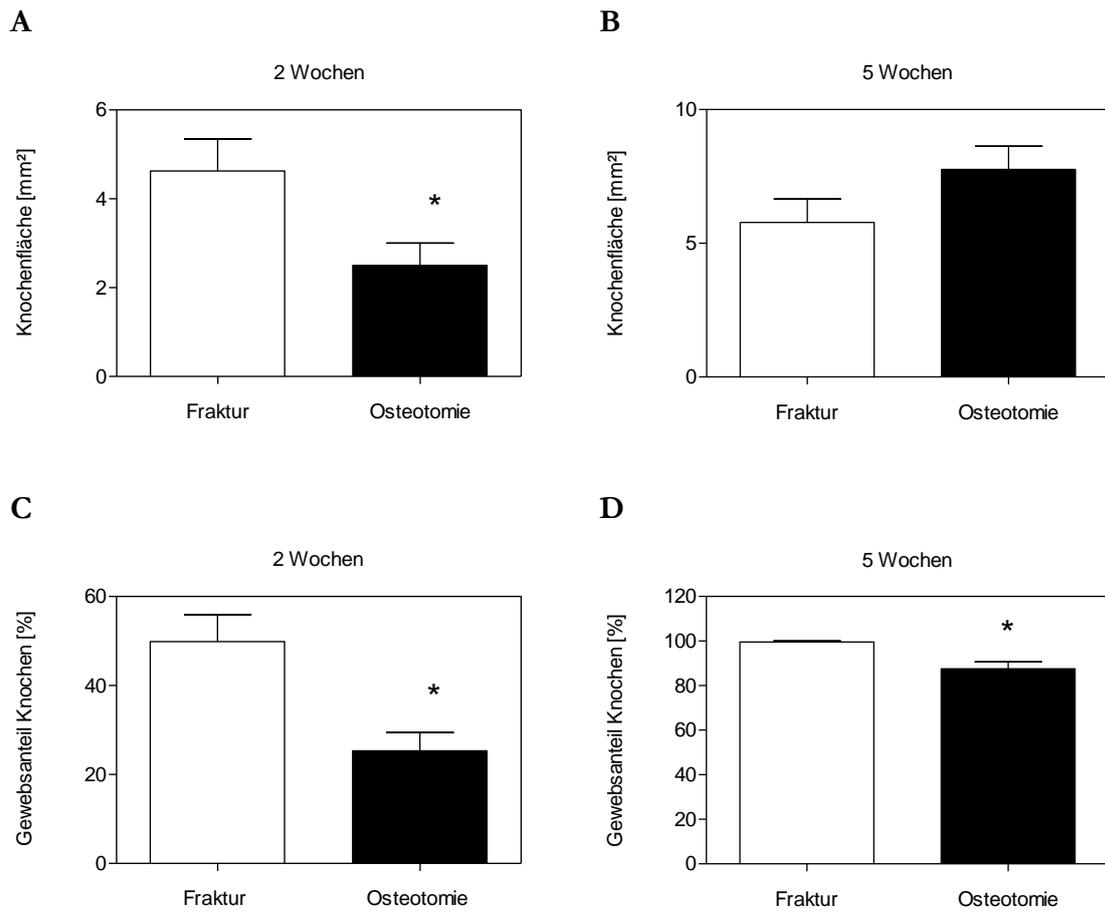


Abb. 24: Absoluter Knochenanteil (TOTAr) zwei Wochen postoperativ (A). Absoluter Knochenanteil fünf Wochen postoperativ (B). Prozentualer Anteil des Knochengewebes am Gesamtkallus (TOTAr/CAr) zwei Wochen postoperativ (C). Prozentualer Anteil des Knochengewebes am Gesamtkallus fünf Wochen postoperativ (D). Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Fraktur.

Der absolute Anteil an Knorpelgewebe (CgAr [mm²]) war sowohl zwei als auch fünf Wochen postoperativ in der Osteotomiegruppe signifikant höher (Tab. 11, Abb. 25 A und B). Fünf Wochen postoperativ war in der Frakturgruppe im Gegensatz zur Osteotomiegruppe kaum noch Knorpelgewebe nachweisbar (Tab. 11, Abb. 25 B). Der prozentuale Anteil an Knorpelgewebe (CgAr [%]) war ebenfalls sowohl zwei als auch fünf Wochen postoperativ in der Osteotomiegruppe signifikant höher (Tab. 11, Abb. 25 C und D).

Tab. 11: Auswertung Knorpelgewebe im Gesamtkallus, Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Fraktur. Angegeben sind der absolute Anteil an Knorpelgewebe (CgAr), sowie der relative Anteil an Knorpelgewebe im Gesamtkallus (CgAr/CAr) 2 und 5 Wochen postoperativ in der Fraktur- und Osteotomiegruppe.

	Fraktur		Osteotomie	
	2 Wochen	5 Wochen	2 Wochen	5 Wochen
CgAr [mm ²]	2,2 \pm 0,5	0,0 \pm 0,0	3,7 \pm 0,4*	0,5 \pm 0,2*
CgAr/CAr [%]	23,9 \pm 4,3	0,0 \pm 0,0	39,7 \pm 5,7*	4,9 \pm 1,6*

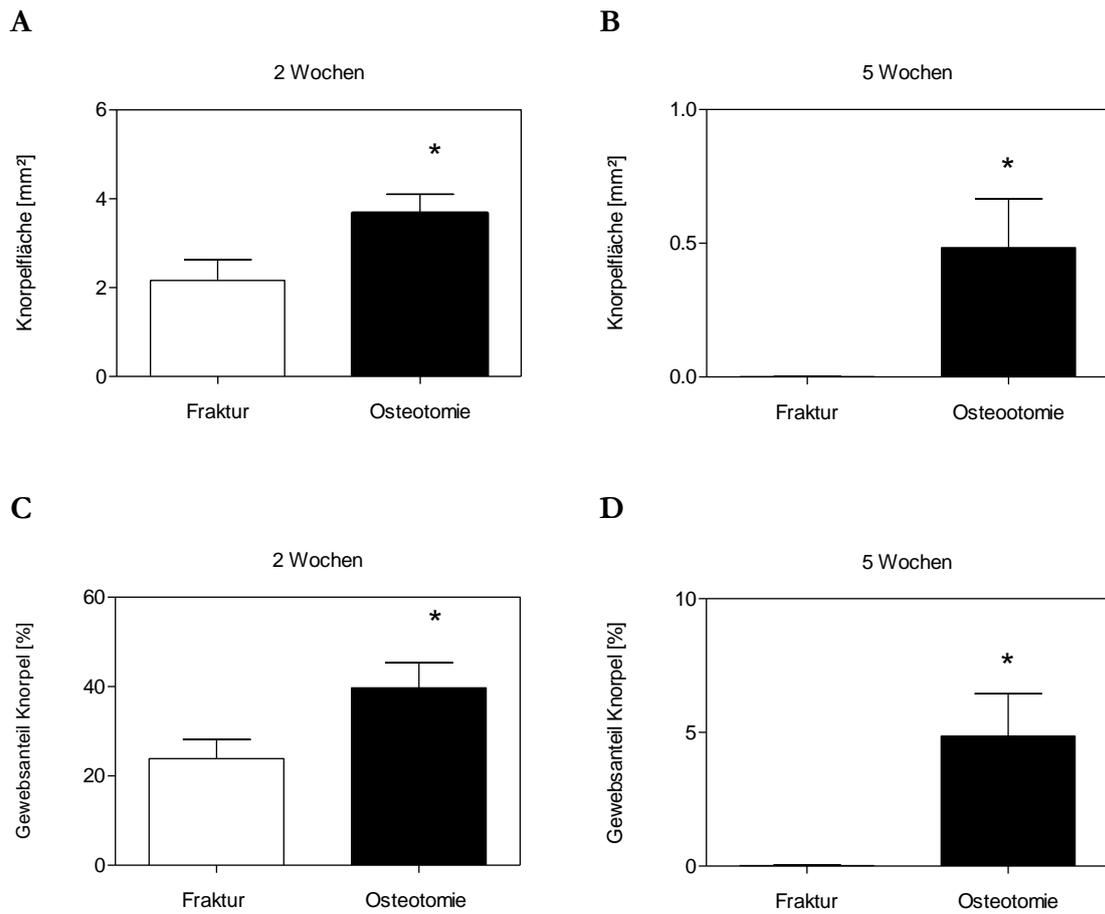


Abb. 25: Absoluter Knorpelanteil (C_0Ar) zwei Wochen postoperativ (**A**). Absoluter Knorpelanteil fünf Wochen postoperativ (**B**). Prozentualer Anteil des Knorpelgewebes am Gesamtkallus (C_0Ar/C_{Ar}) zwei Wochen postoperativ (**C**). Prozentualer Anteil des Knorpelgewebes am Gesamtkallus fünf Wochen postoperativ (**D**) Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Fraktur.

Sowohl der absolute Anteil an Bindegewebe (FTAr [mm²]) als auch der prozentuale Bindegewebsanteil (FTAr/CAr [%]) waren in der Osteotomiegruppe zwei Wochen postoperativ signifikant höher als in der Frakturgruppe (Tab. 12, Abb. 26 A und C). Fünf Wochen postoperativ konnte in beiden Gruppen nur noch wenig Bindegewebe nachgewiesen werden. Dennoch war der Anteil des Bindegewebes nach Osteotomie im Vergleich mit der Frakturgruppe signifikant höher (Tab. 12, Abb. 26 B und D).

Tab. 12: Auswertung Bindegewebe im Gesamtkallus, Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Fraktur. Angegeben sind der absolute Anteil an Bindegewebe (FTAr), sowie der relative Anteil an Bindegewebe im Gesamtkallus (FTAr/CAr) 2 und 5 Wochen postoperativ in der Fraktur- und Osteotomiegruppe.

	Fraktur		Osteotomie	
	2 Wochen	5 Wochen	2 Wochen	5 Wochen
FTAr [mm ²]	2,2 \pm 0,5	0,0 \pm 0,0	0,6 \pm 0,1*	0,7 \pm 0,4
FTAr/CAr [%]	6,7 \pm 1,1	0,4 \pm 0,4	21,7 \pm 4,2*	7,8 \pm 3,8

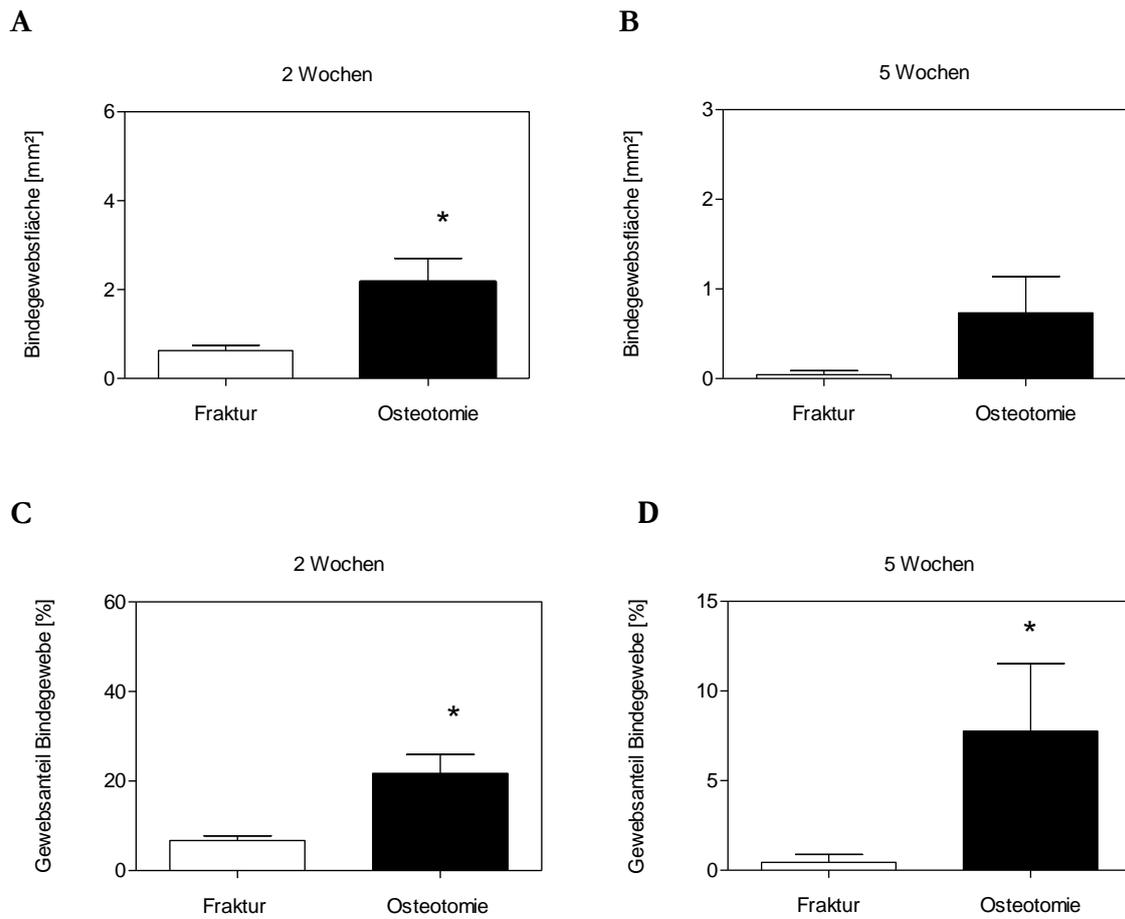


Abb. 26: Absoluter Bindegewebsanteil (FTAr) zwei Wochen postoperativ (**A**). Absoluter Bindegewebsanteil fünf Wochen postoperativ (**B**). Prozentualer Anteil des Bindegewebes am Gesamtkallus (FTAr/CAr) zwei Wochen postoperativ (**C**). Prozentualer Anteil des Bindegewebes am Gesamtkallus fünf Wochen postoperativ (**D**). Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Fraktur.

Insgesamt sprechen die histologischen Ergebnisse für einen verzögerten Remodelingprozess nach Osteotomie.

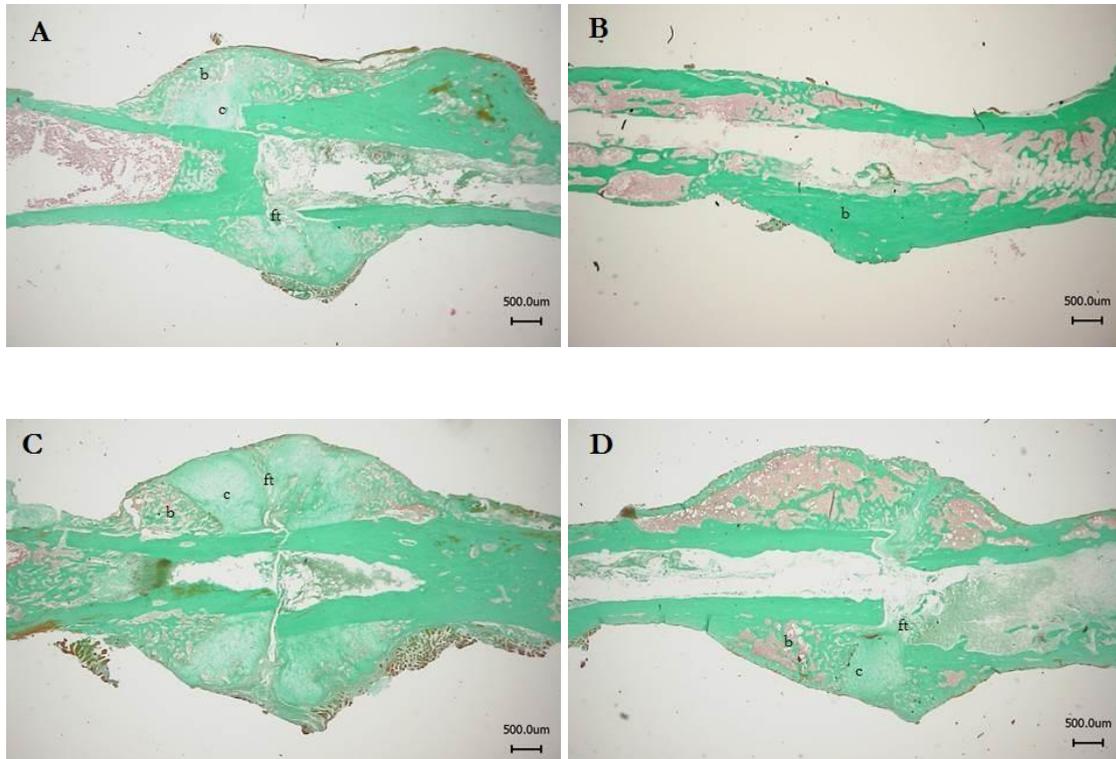


Abb. 27: Histologische Schnittpräparate mit Darstellung der verschiedenen Gewebearten: Knochen (b), Knorpel (c) und Bindegewebe (ft). Zwei Wochen postoperativ nach Fraktur (A) und nach Osteotomie (C) und fünf Wochen postoperativ nach Fraktur (B) und Osteotomie (D).

4.5.2 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Analyse zwei Wochen postoperativ zeigte eine signifikant niedrigere Anzahl CD31-positiver Blutgefäße im Kallus osteotomierter Knochen im Vergleich zu den frakturierten Knochen (Tab 13, Abb. 28).

Tab. 13: Immunhistochemische Auswertung CD31-positiver Blutgefäße. Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Fraktur.

	Fraktur	Osteotomie
	2 Wochen	2 Wochen
CD31-positiv Gefäße/HPF	20,6 \pm 1,3	13,3 \pm 0,7*

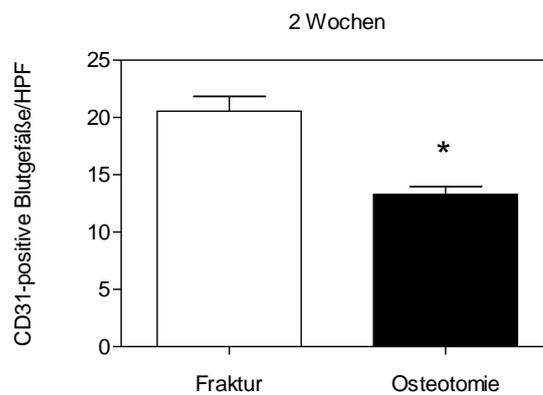


Abb. 28: Quantitative Auswertung CD31-positiver Blutgefäße pro High Power Field (HPF). Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Fraktur.

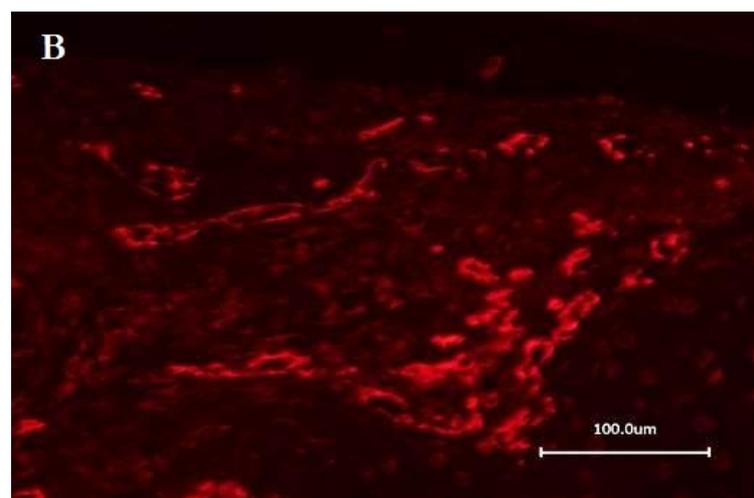
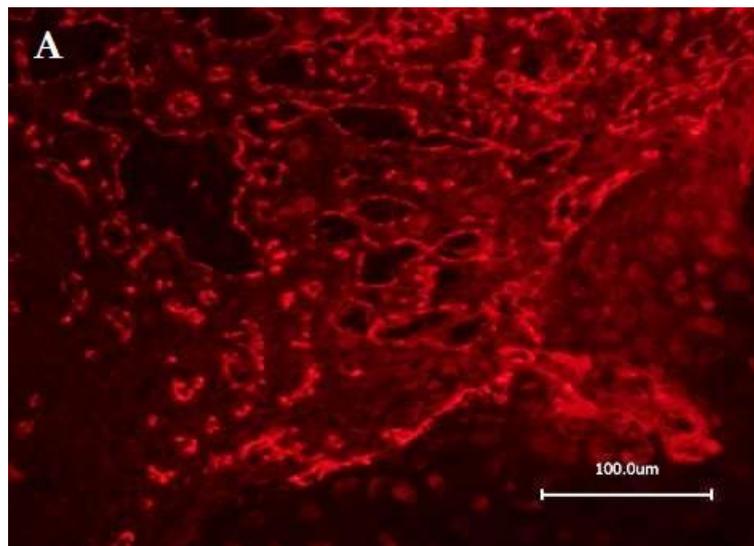


Abb. 29: Fluoreszenzmikroskopie CD31-positiver Zellen, nach Fraktur (A) und nach Osteotomie (B).

4.6 Western Blot

Im Rahmen der Western Blot Analysen wurde die Expression verschiedener Wachstumsfaktoren zwei Wochen postoperativ analysiert. Zur Beurteilung der Angiogenese wurde die Expression von VEGF und Cyr-61 analysiert. Zur Beurteilung der Chondrogenese wurden die Expression von Col-2 und Col-10 untersucht. Als Knochenformationsmarker wurden BMP-2 und BMP-4 bestimmt. Das Remodeling wurde über die Expression von RANKL und OPG beurteilt.

Die Western Blot Analyse ergab zwei Wochen postoperativ eine signifikant höhere Expression von Cyr-61 und VEGF in der Osteotomiegruppe im Vergleich zur Frakturgruppe (Tab. 14, Abb. 30 A und B).

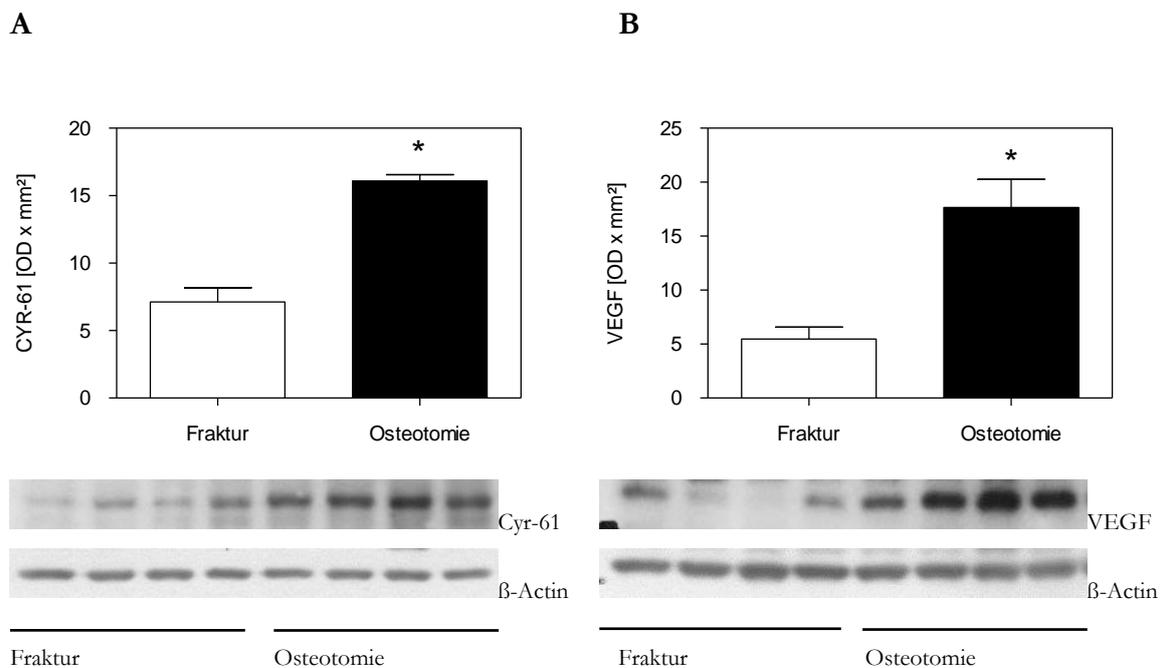


Abb. 30: Expression der angiogenen Wachstumsfaktoren Cyr-61 (**A**) und VEGF (**B**). Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Fraktur.

Die Expression von Col-2 war in der Osteotomiegruppe signifikant höher. Im Gegensatz dazu unterschied sich die Expression von Col-10 zwischen beiden Gruppen nicht (Tab. 14, Abb. 31 A und B).

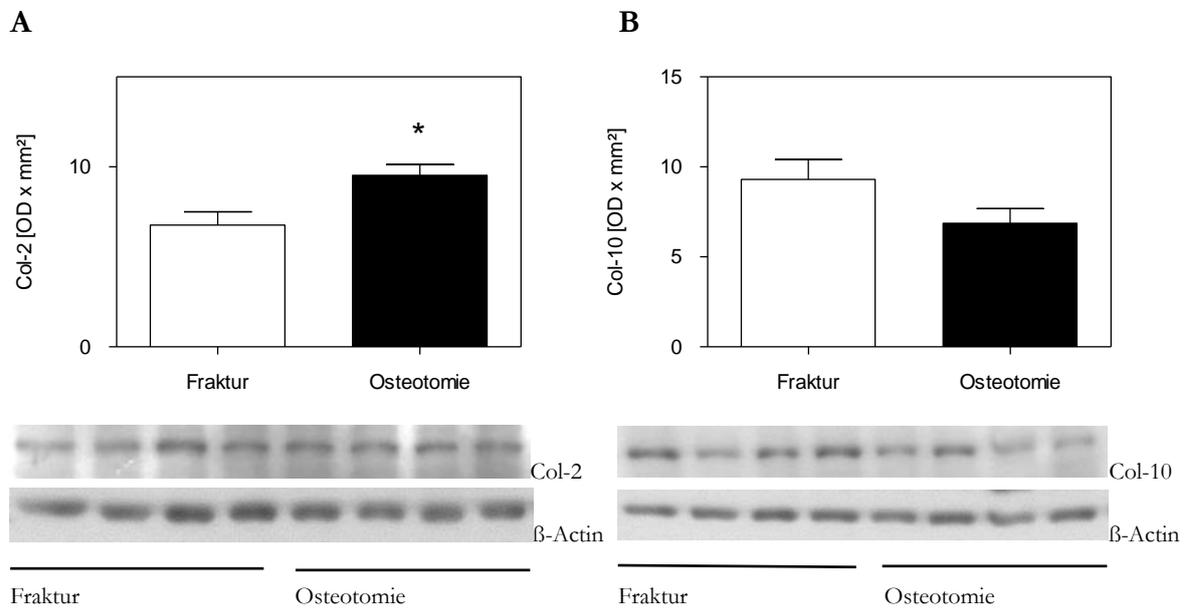


Abb. 31: Expression der kollagenen Wachstumsfaktoren Col-2 (**A**) und Col-10 (**B**). Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Fraktur.

Die Expression der osteogenen Marker BMP-2 und BMP-4 (Tab. 14, Abb. 32 A und B), sowie OPG und RANKL (Tab. 14, Abb. 33 A und B), unterschied sich in beiden Gruppen nicht signifikant.

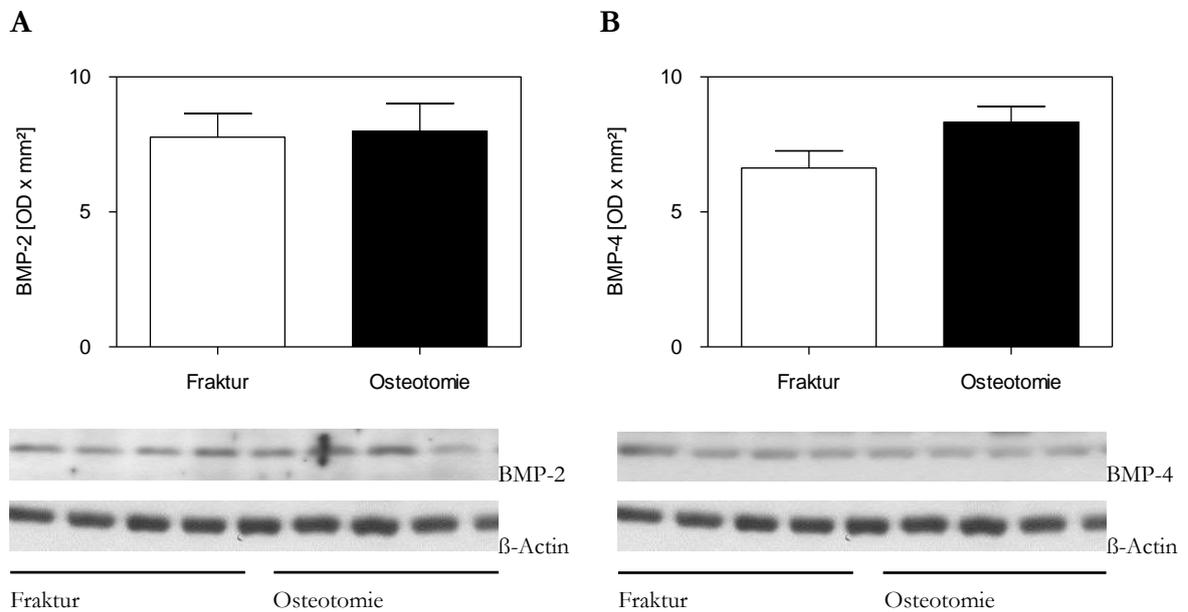


Abb. 32: Expression des osteogenen Wachstumsfaktoren BMP-2 (A) und BMP-4 (B). Mittelwerte ± SEM, * $p < 0,05$ vs. Fraktur.

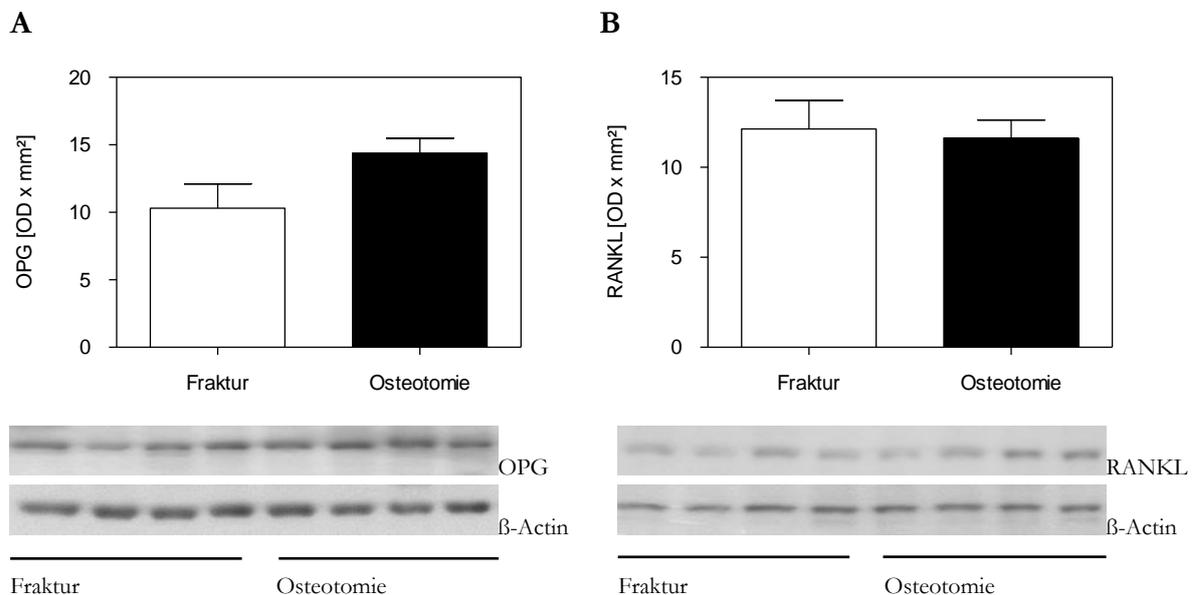


Abb. 33: Western Blot Analyse der Expression der osteogenen Marker OPG (A) und RANKL (B). Mittelwerte ± SEM, * $p < 0,05$ vs. Fraktur.

Tab.14: Auswertung Western Blot, Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Fraktur

Lichtabsorbtion [OD \times mm ²]	Fraktur	Osteotomie
	2 Wochen	2 Wochen
CYR 61	7,1\pm1,1	16,1\pm0,5*
VEGF	5,5\pm1,1	17,7\pm2,7*
Col-2	6,8\pm0,7	9,5\pm0,6*
Col-10	9,3 \pm 1,1	6,9 \pm 0,8
BMP-2	7,8 \pm 0,9	8,0 \pm 1,0
BMP-4	6,6 \pm 0,6	8,3 \pm 0,6
OPG	10,3 \pm 1,8	14,4 \pm 1,1
RANKL	12,1 \pm 1,6	11,6 \pm 1,0

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

Mausmodelle haben sich mittlerweile zur Untersuchung der Knochenbruchheilung etabliert. Kleintiermodelle sind vor allem im Vergleich zu Großtiermodellen in der Anschaffung, Züchtung und Haltung wesentlich kostengünstiger (Histing T *et al.* 2011). Der entscheidende Vorteil ist jedoch die Verfügbarkeit von transgenen Stämmen, Antikörpern und verschiedenen Knock-out Mäusen zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der Frakturheilung.

Aufgrund der Tatsache, dass Mäuseknochen kein Havers-System besitzen, können die Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragen werden. Es finden sich jedoch durchaus Parallelen zwischen der Ausbildung von Resorptionshöhlen im Mausmodell und dem beim Menschen stattfindenden Remodelingprozess (Nunamaker DM 1998).

Das Femur, als langer Röhrenknochen, eignet sich durch seine homogene Form besonders gut für biomechanische Untersuchungen. Es existieren auch Frakturheilungsstudien an der Rippe und der Tibia. Frakturmodelle an Rippen sind anatomisch gesehen jedoch ungeeignet für biomechanische Testmethoden, so dass dieses Modell in Studien bisher fast ausschließlich zur Erforschung der Genexpression während der Knochenheilung Anwendung fand (Nakase T *et al.* 1994, Asami K *et al.* 2000, Reumann MK *et al.* 2010). Das Tibiafrakturmodell wird vor allem in der Ratte häufig verwendet. Ein Nachteil der Tibia liegt in der anatomischen Form. Die Tibia hat einen dreieckigen und unregelmäßigen Querschnitt, der sich nach distal verjüngt, sowie eine gebogene Achse. Dies macht vor allem die standardisierte biomechanische Testungen anspruchsvoller (Cheung KM *et al.* 2003). Des Weiteren kann bei der Frakturierung der Tibia die Fibula zusätzlich frakturieren. Im Verlauf kann es dadurch zu einer kombinierten Kallusbildung zwischen Tibia und Fibula kommen, was wiederum die Untersuchungen beeinflussen würde. Auch der dünne Weichteilmantel der Tibia wird als Nachteil gesehen, vor allem in Bezug auf die daraus

resultierende, erhöhte Infektionsgefahr nach Frakturierung. Im Gegensatz dazu zeigt das Mausfemur eine gute Weichteildeckung.

Zur Untersuchung der Knochenheilung wurde in dieser Studie eine intramedulläre Schraube (MouseScrew®, RISystem, Davos, Schweiz) verwendet. Diese Stabilisierungstechnik erlaubt eine standardisierte Untersuchung der Knochenheilung. Die Frakturheilung nach Stabilisierung erfolgt über die sekundäre Frakturheilung mit einer deutlichen Ausbildung von Kallusgewebe. Das Kallusgewebe kann dann für weitere histologische und proteinbiochemische Untersuchungen verwendet werden. Die MouseScrew® wurde bisher erfolgreich in mehreren Studien verwendet (Holstein JH *et al.* 2009), (Claes L *et al.* 2009, Histing T *et al.* 2012, Holstein JH *et al.* 2012, Holstein JH *et al.* 2013, Herath SC *et al.* 2015, Histing T *et al.* 2016).

Verschiedene Studien haben den Einfluss des Weichteilschadens auf die Frakturheilung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein ausgedehnter Weichteilschaden die Knochenheilung negativ beeinflusst (Utvag SE *et al.* 2003, Claes L *et al.* 2006). In einer aktuellen Studie von Hurtgen *et al.* wurde am Rattenmodell eine offene Tibiafraktur mit Traumatisierung des Musculus tibialis anterior, im Sinne eines ausgedehnten Muskelschadens, durchgeführt. Die Studie konnte eine überschießende und verlängerte inflammatorische Reaktion nach großem Muskelverlust, sowie eine verzögerte Frakturheilung nachweisen (Hurtgen BJ *et al.* 2016). Die geschlossene Frakturierung stellt eine nicht invasive Methode dar. Dennoch wird durch die Frakturierung mittels Guillotine ein Weichteiltrauma durch Quetschung der Oberschenkelmuskulatur verursacht. Bei der Osteotomie hingegen wird der Weichteilschaden durch den offenen Zugang und die Separierung der Muskulatur verursacht. Um beide Methoden bestmöglich vergleichen zu können, wurde bei der Frakturgruppe das Femur ebenfalls über einen lateralen Zugang frei präpariert.

Für die biomechanische Testung des Mausfemurs stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Zu nennen wären die von uns angewandte Drei-Punkt-Biegung, die Vier-Punkt-Biegung und die Rotationstestung.

Bei der Vier-Punkt-Biegung wird die maximale Kraft auf eine größere Fläche verteilt. Dies setzt eine entsprechende Mindestgröße des Knochens voraus, was bei Mäusen nicht zuverlässig möglich ist (Turner CH und Burr DB 1993). Die Länge des diaphysären Knochenanteils sollte mindestens das 16-fache des Durchmessers betragen (Turner CH und Burr DB 1993, Manigrasso MB und O'Connor JP 2004). Bei einem durchschnittlichen Durchmesser von nur 2 mm müsste das Mausfemur 32 mm lang sein. Dies macht die Durchführung einer 4-Punkt-Biegung bei der Maus praktisch nicht realisierbar.

Die Drei-Punkt-Biegung hat den Nachteil, dass die Kraft nur auf einen sehr begrenzten Abschnitt des Knochens wirkt. Am meisten wird hierbei der Kallus beansprucht, der von diesen Kräften deformiert wird (Turner CH und Burr DB 1993, Manigrasso MB und O'Connor JP 2004). Dieses Vorgehen wird regelmäßig und erfolgreich von verschiedenen Arbeitsgruppen, einschließlich unserer, angewendet (Histing T *et al.* 2011, Histing T *et al.* 2012, Histing T *et al.* 2012).

Der Vorteil einer Rotationstestung liegt darin, dass auch bei unregelmäßiger Knochengometrie eine höhere Messgenauigkeit erreicht werden kann. Die Rotationstestung kann jedoch nicht zerstörungsfrei durchgeführt werden. Dies hätte zur Folge, dass die benötigte Tieranzahl verdoppelt werden müsste.

Nach Ausbau der Knochen wurden diese bei -20° eingefroren. Sedlin und Hirsch (1966) sowie Ashman (1982) konnten zeigen, dass das Einfrieren von Knochen keine wesentlichen Auswirkungen auf deren biomechanische Eigenschaften hat. So gilt die Aufbewahrung bei -20° als beste Methode (Turner CH und Burr DB 1993).

Als histologische Standardfärbungen für Knochen werden die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung), die Azan-Färbung, die van Giesson-Färbung und die Trichromfärbungen nach Masson und Goldner angewandt (Welsch U und Deller T 2010). Die Trichromfärbung nach Masson-Goldner gilt heute als Standardfärbung für die Knochenmorphometrie. Um die histomorphometrischen Analysen möglichst standardisiert durchzuführen wandten wir für unsere Untersuchungen die Messparameter und die Nomenklatur der American Society for Bone Mineral Research (ASBMR) an (Parfitt AM *et al.* 1987).

Sowohl kalzifizierte als auch dekalzifizierte Knochen können histologisch aufgearbeitet werden (Gerstenfeld LC *et al.* 2005). In der vorliegenden Studie wurden dekalzifizierte Präparate verwendet, da diese als geeigneter für immunhistochemische Analysen gelten. Ein Nachteil der Verwendung dekalzifizierter Knochen ist dabei natürlich die fehlende Aussagekraft über den Kalksalzgehalt des untersuchten Knochens.

Der Einfluss nichtsteroidaler Antirheumatika (NSAR) auf die Knochenheilung wird kontrovers diskutiert. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass NSAR oder Inhibitoren der spezifischen Cyclooxygenase-2 (COX-2 Hemmer) keinen Einfluss auf die Frakturheilung und Biegesteifigkeit haben (Mullis BH *et al.* 2006, Utvag SE *et al.* 2010). Die meisten Studien konnten jedoch einen negativen Einfluss nicht steroidaler Antirheumatika auf die Frakturheilung nachweisen. Es zeigte sich eine deutliche Verzögerung der Knochenheilung in Rattenfemora nach Behandlung mit Celecoxib (Li KH *et al.* 2013). Nach Behandlung mit Diclofenac wurde eine geringere Biegesteifigkeit und eine geringere Knochendichte nachgewiesen (Beck A *et al.* 2003). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch nach Fraktur der Tibia und Behandlung mit Parecoxib im Rattenmodell (Dimmen S *et al.* 2009).

Der Einfluss von Opioiden auf die Frakturheilung in Kleintiermodellen ist bis dato nur wenig untersucht. Beck *et al.* konnten in ihrer Studie keinen negativen Einfluss von Tramadol auf die Frakturheilung feststellen (Beck A *et al.* 2003). Chrastil *et al.* untersuchten den Einfluss einer postoperativen Schmerzbehandlung mit Morphin am Rattenmodell. Die Ergebnisse zeigten eine radiologisch und histologisch signifikant schlechtere Kallusqualität, sowie eine niedrigere Biegesteifigkeit der Knochen nach Behandlung mit Morphin (Chrastil J *et al.* 2013).

In der vorliegenden Studie wurde der partielle μ -Rezeptor Agonist Tramadol als postoperatives Schmerzmittel verwendet, da bisher keine Studien zeigen konnten, dass Tramadol die Frakturheilung negativ beeinflusst.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Frakturheilung nach offener Osteotomie im Vergleich zur offenen Fraktur signifikant beeinträchtigt ist.

In der histomorphometrischen Analyse ergaben sich deutliche Unterschiede in der Gewebeverteilung im Kallus. Zwei Wochen postoperativ zeigte sich nach Osteotomie ein signifikant geringerer Knochenanteil im Vergleich zur Frakturgruppe. Im Gegensatz dazu war der Anteil an Knorpel- und Bindegewebe in der Osteotomiegruppe signifikant erhöht. Auch fünf Wochen postoperativ konnte noch deutlich mehr Knorpel- und Bindegewebe in der Osteotomiegruppe nachgewiesen werden, was für einen verzögerten Remodelingprozess spricht. Die μ CT-Analyse konnte ebenfalls einen signifikant geringeren Anteil Knochengewebe im Kallus osteotomierter Knochen nachweisen. In der biomechanischen Testung war die Biegesteifigkeit nach Osteotomie sowohl nach zwei als auch nach fünf Wochen signifikant niedriger.

Frühere Studien haben bereits die Frakturheilung nach Osteotomie und Fraktur verglichen (Park SH *et al.* 1999, Kratzel C *et al.* 2008). Die genannten Studien haben jedoch eine offene Osteotomie mit einer geschlossenen Fraktur verglichen, so dass allein das chirurgische Trauma, bedingt durch den offenen Zugang, für die verzögerte Heilung verantwortlich sein könnte.

Park et al. untersuchten den Heilungsprozess nach Osteotomie und Fraktur an Kaninchentibiae nach rigider Stabilisierung mittels Fixateur externe. In der Osteotomiegruppe zeigten sich zwei Wochen postoperativ eine verminderte Rotationssteifigkeit und eine geringere Mineralisation des Kallus. Die Autoren postulierten, dass die verzögerte Heilung zum einen durch die Zerstörung des Periosts während des Sägevorgangs und zum anderen durch das Auswaschen des Frakturhämatoms verursacht worden war.

Schon lange wird dem Frakturhämatom eine besondere Bedeutung beigemessen. Das Hämatom, welches sich an der Frakturstelle bildet, wurde als „Brücke über den Frakturspalt“ (Brighton CT 1984) und als „Rahmengerüst für die Kallusformation“ (Crues

RL und Dumont J 1975) bezeichnet. Es konnte schließlich gezeigt werden, dass das Frakturhämatom selbst eine osteogene Potenz besitzt. So konnte in einer experimentellen Studie an Ratten gezeigt werden, dass die intramuskuläre Transplantation des Frakturhämatoms nach vier Tagen eine enchondrale Ossifikation aufweist (Mizuno K *et al.* 1990). Eine weitere Studie konnte nachweisen, dass durch das Entfernen des Frakturhämatoms am vierten postoperativen Tag die Frakturheilung beeinträchtigt war. Die Knochen zeigten eine geringere Steifigkeit in den biomechanischen Testungen im Vergleich zur Kontrolle. Das Entfernen des Frakturhämatoms 30 Minuten postoperativ hatte jedoch keinen wesentlichen Einfluss auf die Heilung (Grundnes O und Reikeras O 1993).

Auch dem Periost wird eine bedeutende Rolle während der Frakturheilung zugesprochen, da es als Quelle für pluripotente mesenchymale Stammzellen angesehen wird (Murao H *et al.* 2013). Kokubu *et al.* haben gezeigt, dass das Entfernen des Periosts, durch zirkuläre Kauterisation auf einer Strecke von 2 mm, zu einer atrophischen Pseudarthrose führt (Kokubu T *et al.* 2003). In weiteren Studie wurde nachgewiesen, dass das Entfernen des Periostes die Chondrogenese während der Frakturheilung beeinträchtigt (Ozaki A *et al.* 2000).

In der hier vorliegenden Studie wurde in beiden Gruppen das Frakturhämatom ausgespült, weshalb die schlechtere Heilung nach Osteotomie nicht auf das Ausspülen des Frakturhämatoms zurückgeführt werden kann. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass durch das Sägen mit der Gigli-Säge das Periost durch die Hitzeentwicklung, trotz ständiger Spülung mit Kochsalzlösung, geschädigt wurde. Somit könnte die Schädigung des Periosts eine wesentliche Ursache für die verzögerte Heilung in unserer Studie sein. Interessanterweise war in der Studie von Park *et al.* die Frakturheilung nur in der frühen Phase beeinträchtigt. In der späten Phase, vier Wochen postoperativ, waren die Knochen sowohl nach Fraktur als auch nach Osteotomie geheilt. In der hier vorliegenden Studie zeigte sich auch nach fünf Wochen keine adäquate Heilung in der Osteotomiegruppe.

In der Studie von Kratzel *et al.* wurde ebenfalls der Heilungsprozess nach Osteotomie und Fraktur verglichen. Die Untersuchungen wurden an Rattentibiae durchgeführt. Zur Stabilisierung der Knochen wurde eine simple, intramedulläre Pin-Stabilisierung, die fast gar keine Rotationsstabilität gewährleistet, verwendet. Vergleichbar zu unseren Ergebnissen

zeigten die Knochen der Osteotomiegruppe eine geringere Rotationssteifigkeit, sowie eine verzögerte knöcherne Durchbauung. Zudem waren im Kallusgewebe der Osteotomiegruppe deutlich mehr Entzündungszellen nachweisbar. Die Autoren vermuten deshalb, dass die verzögerte Heilung nach Osteotomie durch eine verstärkte Entzündungsphase zu erklären ist.

Es ist hinreichend bekannt, dass ein offener chirurgischer Eingriff einen nicht unerheblichen Weichteilschaden und eine Entzündungsreaktion hervorruft (Menger MD und Vollmar B 2004). Interessant war, dass in der Frakturgruppe fünf Wochen postoperativ lediglich eine im Vergleich zum kontralateralen Femur 50%ige Biegesteifigkeit nachweisbar war. In vergleichbaren Studien unserer Arbeitsgruppe (Garcia P *et al.* 2011, Histing T *et al.* 2012) zeigten die Knochen nach geschlossener Frakturierung fünf Wochen postoperativ eine nahezu 100 prozentige Biegesteifigkeit im Vergleich zum gesunden kontralateralen Knochen. Somit kann postuliert werden, dass der offene Zugang einen deutlichen Einfluss auf die Frakturheilung hat. In der hier vorliegenden Arbeit wurde in beiden Gruppen der gleiche Weichteilschaden induziert. Die verzögerte Heilung in der Osteotomiegruppe ist deshalb nicht allein auf das Operationstrauma durch den offenen Zugang zurückzuführen.

Der Heilungsprozess wird des Weiteren signifikant durch die Stabilität des Implantates beeinflusst. Bei rigider und stabiler Fixierung der Knochen erfolgte die Heilung fast ausschließlich über eine intramembranöse Ossifikation. Bei semirigider Fixierung der Knochen erfolgt die Heilung über eine enchondrale Ossifikation (Histing T *et al.* 2009, Histing T *et al.* 2016).

Gröngröft *et al.* konnten zeigen, dass die Osteotomie, die mit semirigiden Platten stabilisiert wurde, langsamer heilte als diejenige mit sehr rigider Stabilisierung (Gröngröft I *et al.* 2009). Vergleichbare Ergebnisse konnte auch Röntgen *et al.* nachweisen. In dieser Studie wurde die Osteotomie mit zwei externen Fixateuren unterschiedlicher Steifigkeit stabilisiert. Die Knochen mit der weniger stabilen Versorgung heilten deutlich langsamer und zeigten eine geringere Biegesteifigkeit (Röntgen V *et al.* 2010).

In der Studie von Park et al. wurde ein rigider Fixateur externe verwendet und es konnte gezeigt werden, dass die Knochen sowohl in der Osteotomiegruppe als auch in der Frakturgruppe vier Wochen postoperativ geheilt waren. Im Gegensatz dazu wurde in der Studie von Kratzel et al. eine rotationsinstabile Pin-Stabilisierung verwendet. In dieser Studie zeigte sich auch nach zwölf Wochen postoperativ keine adäquate Heilung.

Es ist davon auszugehen, dass die Stabilität der verschiedenen Osteosynthesetechniken eine entscheidende Rolle während der Heilung spielt. In der hier vorliegenden Studie wurde eine intramedulläre Schraube verwendet, welche im Gegensatz zur Pin-Stabilisierung sowohl eine höhere axiale Stabilität als auch eine bessere Rotationsstabilität gewährleistet. Trotzdem erreicht die Schraube lediglich 20% der Stabilität eines externen Fixateurs (Histing T *et al.* 2009). Dies könnte die deutlich verzögerte Heilung der Osteotomiegruppe in der vorliegenden Studie erklären. Fünf Wochen postoperativ zeigte sich in der Osteotomiegruppe eine Biegesteifigkeit welche lediglich 10% des kontralateralen Femurs aufwies. Des Weiteren kann vermutet werden, dass die Schraubenosteosynthese in der Osteotomiegruppe eine geringere Rotationssteifigkeit aufweist als in der Frakturgruppe. Am ehesten ist dies auf die glatte Oberfläche der Knochen im Bereich der Osteotomie zurückzuführen. Im Gegensatz dazu können sich die Fragmente nach Frakturierung durch die ungleichmäßige Oberfläche der Fraktur besser verzahnen. Die geringere Stabilität der Schraubenosteosynthese in der Osteotomiegruppe zeigte sich letztendlich auch in dem höheren Anteil an Knorpelgewebe und größerem Kallus im Vergleich zur Frakturgruppe.

Diese Beobachtungen bestätigen sich in den Western Blot Analysen. In der Osteotomiegruppe wurde eine signifikant höhere Expression von Col-2, einem Knorpelmarker der frühen Heilungsphase und eine geringere Expression von Col-10, einem Knorpelmarker, der erst später im Rahmen der Mineralisation von Knorpelzellen exprimiert wird, nachgewiesen. Im Gegensatz dazu unterschied sich die Expression von BMP-2 und BMP-4 in beiden Gruppen nicht signifikant. Auch konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der RANKL/OPG Expression nachgewiesen werden.

Die Expression der angiogenen Marker CYR-61 und VEGF war in der Osteotomiegruppe signifikant erhöht. CYR-61 spielt eine essentielle Rolle für die Funktion von Osteoblasten, da CYR-61 die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Osteoblasten, die Proliferation und Ausreifung osteoblastischer Vorläuferzellen und deren Migration beeinflusst (Lienau J *et al.* 2006). Des Weiteren wird CYR-61 während der embryonalen Knorpelentwicklung exprimiert (Wong M *et al.* 1997). Es wurde konstatiert, dass die Expression von CYR-61 ihren Höhepunkt während der chondrogenen Phase der Kallusformation hat und somit eine entscheidende Rolle in der endochondralen Ossifikation spielt (Hadjjargyrou M *et al.* 2000). In einer weiteren Studie wurde vermutet, dass die BMP-2 abhängige Differenzierung der Osteoblasten von CYR-61 gesteuert wird, da die Hochregulierung von BMP-2-RNA in engem Zusammenhang mit einer hohen CYR-61 Expression steht (Su JL *et al.* 2010). In der hier vorliegenden Studie zeigte sich jedoch keine Korrelation zwischen hoher CYR-61 und BMP-2 Expression.

Auch VEGF, als Marker der Angiogenese, spielt eine wichtige Rolle bei der endochondralen Ossifikation. VEGF vermittelt nicht nur die Vaskularisierung des Knochens, sondern ermöglicht auch die Differenzierung hypertropher Chondrozyten, Osteoblasten, Endothelzellen und Osteoklasten. Die VEGF-vermittelte Kapillareinsprossung ist für den Umbau im Knorpelgewebe verantwortlich. Demnach ist VEGF ein wesentlichen Koordinator des Zusammenspiels von Chondrozyten, Chondroklasten, Zellen der Angiogenese und der Knochenneubildung (Gerber HP *et al.* 1999, Maes C *et al.* 2002).

Sowohl VEGF als auch CYR61 spielen somit eine bedeutende Rolle während der Knochenheilung. Zudem reguliert VEGF die CYR61-Expression (Athanasopoulos AN *et al.* 2007). Es kann vermutet werden, dass in der vorliegenden Studie durch die Verletzung des Periosts, die arterielle Blutversorgung beeinträchtigt wurde. Im Allgemeinen führt eine verminderte Blutversorgung zu einer Hypoxie, welche für die Hochregulation der VEGF und CYR 61 Expression verantwortlich ist (Radke S *et al.* 2006). In vorhergehenden Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die VEGF- und BMP-4-Expression einen synergistischen Effekt auf die Frakturheilung haben. Die Studie von Peng *et al.* konnte nachweisen, dass ein Verhältnis von VEGF zu BMP-4 mit 1:5 einen positiven Effekt auf

die Frakturheilung hat. Ist das Verhältnis jedoch umgekehrt (5:1), so zeigte sich sogar ein negativer Effekt mit resultierender verzögerter Heilung (Peng H *et al.* 2002). Die in der vorliegenden Studie massiv erhöhte VEGF Expression im Vergleich zu der BMP-4 Expression in der Osteotomiegruppe könnten demnach für die verzögerte Frakturheilung nach Osteotomie verantwortlich sein.

Schlussfolgerungen

Mit der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die offene Osteotomie im Vergleich zur offenen Fraktur zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Frakturheilung führt.

Der verzögerte Remodelingprozess ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass nach Osteotomie im Vergleich zur Fraktur eine geringere Rotationsstabilität vorliegt. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass die Beschädigung des Periosts während der Osteotomie des Knochens ebenfalls die Knochenheilung negativ beeinflusst.

In Folge dessen sollten für Studien zur Untersuchung der Frakturheilung im Osteotomiemodell nur sehr rigide, rotationsstabile Implantate verwendet werden.

6 Literaturverzeichnis

1. **Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA** (2008). *Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis.* J Dent Res **87**: 107-118.
2. **Asami K, Nakanishi T, Asahara H, Inoue H, Takigawa M** (2000). *Expression of neurotrophins and their receptors (TRK) during fracture healing.* Bone **26**: 625-633.
3. **Athanasopoulos AN, Schneider D, Keiper T, Alt V, Pendurthi UR, Liegibel UM, Sommer U, Nawroth PP, Kasperk C, Chavakis T** (2007). *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced up-regulation of CCN1 in osteoblasts mediates proangiogenic activities in endothelial cells and promotes fracture healing.* J Biol Chem **282**: 26746-26753.
4. **Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wolff W, Wurzinger LJ, Zilch HG** (2006). *Anatomie, Duale Reihe.* 1. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart.
5. **Bais MV, Wigner N, Young M, Toholka R, Graves DT, Morgan EF, Gerstenfeld LC, Einhorn TA** (2009). *BMP2 is essential for post natal osteogenesis but not for recruitment of osteogenic stem cells.* Bone **45**: 254-266.
6. **Beck A, Krischak G, Sorg T, Augat P, Farker K, Merkel U, Kinzl L, Claes L** (2003). *Influence of diclofenac (group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs) on fracture healing.* Arch Orthop Trauma Surg **123**: 327-332.
7. **Bonnarens F, Einhorn TA** (1984). *Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone.* J Orthop Res **2**: 97-101.
8. **Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL** (2003). *Osteoclast differentiation and activation.* Nature **423**: 337-342.
9. **Brighton CT** (1984). *The biology of fracture repair.* Instr Course Lect **33**: 60-82.
10. **Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS** (1998). *osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification.* Genes Dev **12**: 1260-1268.
11. **Buckwalter JA, Einhorn TA, Marsh LJ** (2001). *Rockwood and Green's fractures in adults.* 5th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
12. **Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, Kelley M, Hsu H, Boyle WJ, Dunstan CR, Hu S, Lacey DL** (1999). *The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts.* J Cell Biol **145**: 527-538.
13. **Caplan AI** (2008). *All MSCs are pericytes?* Cell Stem Cell **3**: 229-230.
14. **Carano RA, Filvaroff EH** (2003). *Angiogenesis and bone repair.* Drug Discov Today **8**: 980-989.

15. **Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC** (2003). *Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs)*. J Bone Joint Surg Am **85-A**: 1544-1552.
16. **Cheung KM, Kaluarachi K, Andrew G, Lu W, Chan D, Cheah KS** (2003). *An externally fixed femoral fracture model for mice*. J Orthop Res **21**: 685-690.
17. **Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA** (2002). *Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing*. J Bone Miner Res **17**: 513-520.
18. **Chrastil J, Sampson C, Jones KB, Higgins TF** (2013). *Postoperative opioid administration inhibits bone healing in an animal model*. Clin Orthop Relat Res **471**: 4076-4081.
19. **Claes L, Maurer-Klein N, Henke T, Gerngross H, Melnyk M, Augat P** (2006). *Moderate soft tissue trauma delays new bone formation only in the early phase of fracture healing*. J Orthop Res **24**: 1178-1185.
20. **Claes L, Schmalenbach J, Herrmann M, Olku I, Garcia P, Histing T, Obeid R, Schorr H, Herrmann W, Pohlemann T, Menger MD, Holstein JH** (2009). *Hyperhomocysteinemia is associated with impaired fracture healing in mice*. Calcif Tissue Int **85**: 17-21.
21. **Cruess RL, Dumont J** (1975). *Fracture healing*. Can J Surg **18**: 403-413.
22. **Da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB** (2008). *In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells*. Stem Cells **26**: 2287-2299.
23. **Di Y, Zhang Y, Yang H, Wang A, Chen X** (2015). *The mechanism of CCN1-enhanced retinal neovascularization in oxygen-induced retinopathy through PI3K/Akt-VEGF signaling pathway*. Drug Des Devel Ther **9**: 2463-2473.
24. **Dimmen S, Nordsletten L, Madsen JE** (2009). *Parecoxib and indomethacin delay early fracture healing: a study in rats*. Clin Orthop Relat Res **467**: 1992-1999.
25. **Einhorn TA** (1998). *The cell and molecular biology of fracture healing*. Clin Orthop Relat Res: S7-21.
26. **Einhorn TA, Hirschman A, Kaplan C, Nashed R, Devlin VJ, Warman J** (1989). *Neutral protein-degrading enzymes in experimental fracture callus: a preliminary report*. J Orthop Res **7**: 792-805.
27. **Epari DR, Duda GN, Thompson MS** (2010). *Mechanobiology of bone healing and regeneration: in vivo models*. Proc Inst Mech Eng H **224**: 1543-1553.
28. **Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA** (1999). *Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation?* Mech Dev **87**: 57-66.
29. **Frost HM** (1966). *Bone dynamics in metabolic bone disease*. J Bone Joint Surg Am **48**: 1192-1203.
30. **Frost HM** (1969). *Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling*. Calcif Tissue Res **3**: 211-237.

31. **Garcia P, Herwerth S, Matthys R, Holstein JH, Histing T, Menger MD, Pohlemann T** (2011). *The LockingMouseNail--a new implant for standardized stable osteosynthesis in mice.* J Surg Res **169**: 220-226.
32. **Garcia P, Holstein JH, Histing T, Burkhardt M, Culemann U, Pizanis A, Wirbel RJ, Pohlemann T, Menger MD** (2008). *A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: impact of stability on fracture healing.* J Biomech **41**: 1689-1696.
33. **Gerber HP, Ferrara N** (2000). *Angiogenesis and bone growth.* Trends Cardiovasc Med **10**: 223-228.
34. **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.* Nat Med **5**: 623-628.
35. **Gerstenfeld LC, Alkhiary YM, Krall EA, Nicholls FH, Stapleton SN, Fitch JL, Bauer M, Kayal R, Graves DT, Jepsen KJ, Einhorn TA** (2006). *Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis.* J Histochem Cytochem **54**: 1215-1228.
36. **Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Cruceta J, Graves BD, Einhorn TA** (2001). *Impaired intramembranous bone formation during bone repair in the absence of tumor necrosis factor-alpha signaling.* Cells Tissues Organs **169**: 285-294.
37. **Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Tsay A, Fitch J, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA** (2003). *Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption.* J Bone Miner Res **18**: 1584-1592.
38. **Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA** (2003). *Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation.* J Cell Biochem **88**: 873-884.
39. **Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA** (2005). *Application of histomorphometric methods to the study of bone repair.* J Bone Miner Res **20**: 1715-1722.
40. **Gröngröft I, Heil P, Matthys R, Lezuo P, Tami A, Perren S, Montavon P, Ito K** (2009). *Fixation compliance in a mouse osteotomy model induces two different processes of bone healing but does not lead to delayed union.* J Biomech **42**: 2089-2096.
41. **Grundnes O, Reikeras O** (1993). *The importance of the hematoma for fracture healing in rats.* Acta Orthop Scand **64**: 340-342.
42. **Hadjiargyrou M, Ahrens W, Rubin CT** (2000). *Temporal expression of the chondrogenic and angiogenic growth factor CYR61 during fracture repair.* J Bone Miner Res **15**: 1014-1023.
43. **Herath SC, Lion T, Klein M, Stenger D, Scheuer C, Holstein JH, Morsdorf P, Rollmann MF, Pohlemann T, Menger MD, Histing T** (2015). *Stimulation of angiogenesis by cilostazol accelerates fracture healing in mice.* J Orthop Res **33**: 1880-1887.
44. **Histing T, Andonyan A, Klein M, Scheuer C, Stenger D, Holstein JH, Veith NT, Pohlemann T, Menger MD** (2016). *Obesity does not affect the healing of femur fractures in mice.* Injury **47**: 1435-1444.

45. **Histing T, Anton C, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger MD** (2012). *Melatonin impairs fracture healing by suppressing RANKL-mediated bone remodeling.* J Surg Res **173**: 83-90.
46. **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**: 591-599.
47. **Histing T, Garcia P, Matthys R, Leidinger M, Holstein JH, Kristen A, Pohlemann T, Menger MD** (2010). *An internal locking plate to study intramembranous bone healing in a mouse femur fracture model.* J Orthop Res **28**: 397-402.
48. **Histing T, Heerschop K, Klein M, Scheuer C, Stenger D, Holstein JH, Pohlemann T, Menger MD** (2016). *Characterization of the healing process in non-stabilized and stabilized femur fractures in mice.* Arch Orthop Trauma Surg **136**: 203-211.
49. **Histing T, Holstein JH, Garcia P, Matthys R, Kristen A, Claes L, Menger MD, Pohlemann T** (2009). *Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture.* J Orthop Res **27**: 1152-1156.
50. **Histing T, Kuntz S, Stenger D, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Pohlemann T, Menger MD** (2013). *Delayed fracture healing in aged senescence-accelerated P6 mice.* J Invest Surg **26**: 30-35.
51. **Histing T, Marciniak K, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger MD** (2011). *Sildenafil accelerates fracture healing in mice.* J Orthop Res **29**: 867-873.
52. **Histing T, Stenger D, Scheuer C, Metzger W, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Pohlemann T, Menger MD** (2012). *Pantoprazole, a Proton Pump Inhibitor, Delays Fracture Healing in Mice.* Calcif Tissue Int **90**: 507-514.
53. **Hogan BL** (1996). *Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development.* Genes Dev **10**: 1580-1594.
54. **Holstein JH, Becker SC, Fiedler M, Scheuer C, Garcia P, Histing T, Klein M, Menger MD, Pohlemann T** (2012). *Increased exercise after stable closed fracture fixation does not affect fracture healing in mice.* J Biomech **45**: 1299-1304.
55. **Holstein JH, Herrmann M, Schmalenbach J, Obeid R, Olku I, Klein M, Garcia P, Histing T, Pohlemann T, Menger MD, Herrmann W, Claes L** (2010). *Deficiencies of folate and vitamin B12 do not affect fracture healing in mice.* Bone **47**: 151-155.
56. **Holstein JH, Karabin-Kehl B, Scheuer C, Garcia P, Histing T, Meier C, Benninger E, Menger MD, Pohlemann T** (2013). *Endostatin inhibits Callus remodeling during fracture healing in mice.* J Orthop Res **31**: 1579-1584.
57. **Holstein JH, Matthys R, Histing T, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Meier C, Pohlemann T, Menger MD** (2009). *Development of a stable closed femoral fracture model in mice.* J Surg Res **153**: 71-75.

58. **Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T** (2007). *Development of a locking femur nail for mice.* J Biomech **40**: 215-219.
59. **Hsu YH, Chen WY, Chan CH, Wu CH, Sun ZJ, Chang MS** (2011). *Anti-IL-20 monoclonal antibody inhibits the differentiation of osteoclasts and protects against osteoporotic bone loss.* J Exp Med **208**: 1849-1861.
60. **Hsu YH, Chiu YS, Chen WY, Huang KY, Jou IM, Wu PT, Wu CH, Chang MS** (2016). *Anti-IL-20 monoclonal antibody promotes bone fracture healing through regulating IL-20-mediated osteoblastogenesis.* Sci Rep **6**: 24339.
61. **Hurtgen BJ, Ward CL, Garg K, Pollot BE, Goldman SM, Mckinley TO, Wenke JC, Corona BT** (2016). *Severe muscle trauma triggers heightened and prolonged local musculoskeletal inflammation and impairs adjacent tibia fracture healing.* J Musculoskeletal Neuronal Interact **16**: 122-134.
62. **Junqueira L, Carneiro J, Gratzel M** (2004). *Histologie: Neue Approbationsordnung.* Springer Medizin Verlag. Heidelberg.
63. **Kaderly RE** (1991). *Primary bone healing.* Semin Vet Med Surg (Small Anim) **6**: 21-25.
64. **Kinner B, Spector M** (2002). *Expression of smooth muscle actin in osteoblasts in human bone.* J Orthop Res **20**: 622-632.
65. **Kokubu T, Hak DJ, Hazelwood SJ, Reddi AH** (2003). *Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur.* J Orthop Res **21**: 503-510.
66. **Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA** (2001). *Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing.* J Bone Miner Res **16**: 1004-1014.
67. **Kratzel C, Bergmann C, Duda G, Greiner S, Schmidmaier G, Wildemann B** (2008). *Characterization of a rat osteotomy model with impaired healing.* BMC Musculoskeletal Disord **9**: 135.
68. **Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ** (1998). *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation.* Cell **93**: 165-176.
69. **Laemmli UK, Molbert E, Showe M, Kellenberger E** (1970). *Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4.* J Mol Biol **49**: 99-113.
70. **Li KH, Cheng L, Zhu Y, Deng GB, Long HT** (2013). *Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor (celecoxib) on fracture healing in rats.* Indian J Orthop **47**: 395-401.

71. **Lienau J, Schell H, Epari DR, Schutze N, Jakob F, Duda GN, Bail HJ** (2006). *CYR61 (CCN1) protein expression during fracture healing in an ovine tibial model and its relation to the mechanical fixation stability.* J Orthop Res **24**: 254-262.
72. **Lin TH, Gibon E, Loi F, Pajarinen J, Cordova LA, Nabeshima A, Lu L, Yao Z, Goodman SB** (2016). *Decreased osteogenesis in mesenchymal stem cells derived from the aged mouse is associated with enhanced NF-kappaB activity.* J Orthop Res.
73. **Löffler G, Petrides P, Heinrich P** (2007). *Biochemie und Pathobiochemie.* Springer Medizin Verlag. Heidelberg.
74. **Luyten FP, Cunningham NS, Ma S, Muthukumaran N, Hammonds RG, Nevins WB, Woods WI, Reddi AH** (1989). *Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation.* J Biol Chem **264**: 13377-13380.
75. **Maes C, Carmeliet P, Moermans K, Stockmans I, Smets N, Collen D, Bouillon R, Carmeliet G** (2002). *Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188.* Mech Dev **111**: 61-73.
76. **Manigrasso MB, O'connor JP** (2004). *Characterization of a closed femur fracture model in mice.* J Orthop Trauma **18**: 687-695.
77. **Marsell R, Einhorn TA** (2011). *The biology of fracture healing.* Injury **42**: 551-555.
78. **Matthys R, Perren SM** (2009). *Internal fixator for use in the mouse.* Injury **40 Suppl 4**: S103-109.
79. **Mckibbin B** (1978). *The biology of fracture healing in long bones.* J Bone Joint Surg Br **60-B**: 150-162.
80. **Menger MD, Vollmar B** (2004). *Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression?* Langenbecks Arch Surg **389**: 475-484.
81. **Mizuno K, Mineo K, Tachibana T, Sumi M, Matsubara T, Hirohata K** (1990). *The osteogenetic potential of fracture haematoma. Subperiosteal and intramuscular transplantation of the haematoma.* J Bone Joint Surg Br **72**: 822-829.
82. **Mullis BH, Copland ST, Weinhold PS, Miclau T, Lester GE, Bos GD** (2006). *Effect of COX-2 inhibitors and non-steroidal anti-inflammatory drugs on a mouse fracture model.* Injury **37**: 827-837.
83. **Murao H, Yamamoto K, Matsuda S, Akiyama H** (2013). *Periosteal cells are a major source of soft callus in bone fracture.* J Bone Miner Metab **31**: 390-398.
84. **Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y, Oikawa S, Ono K, Takaoka K** (1994). *Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing.* J Bone Miner Res **9**: 651-659.
85. **Nunamaker DM** (1998). *Experimental models of fracture repair.* Clin Orthop Relat Res: S56-65.

86. **O'brien TP, Lau LF** (1992). *Expression of the growth factor-inducible immediate early gene *cyr61* correlates with chondrogenesis during mouse embryonic development.* Cell Growth Differ **3**: 645-654.
87. **O'brien TP, Yang GP, Sanders L, Lau LF** (1990). *Expression of *cyr61*, a growth factor-inducible immediate-early gene.* Mol Cell Biol **10**: 3569-3577.
88. **Orth M, Kruse NJ, Braun BJ, Scheuer C, Holstein JH, Khalil A, Yu X, Murphy WL, Pohlemann T, Laschke MW, Menger MD** (2017). *BMP-2-coated mineral coated microparticles improve bone repair in atrophic non-unions.* Eur Cell Mater **33**: 1-12.
89. **Ozaki A, Tsunoda M, Kinoshita S, Saura R** (2000). *Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process.* J Orthop Sci **5**: 64-70.
90. **Parfitt AM** (1994). *Osteonal and Hemi-Osteonal Remodeling - the Spatial and Temporal Framework for Signal Traffic in Adult Human Bone.* Journal of Cellular Biochemistry **55**: 273-286.
91. **Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR** (1987). *Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee.* J Bone Miner Res **2**: 595-610.
92. **Park SH, O'connor K, Sung R, Mckellop H, Sarmiento A** (1999). *Comparison of healing process in open osteotomy model and closed fracture model.* J Orthop Trauma **13**: 114-120.
93. **Peng H, Wright V, Usas A, Gearhart B, Shen HC, Cummins J, Huard J** (2002). *Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4.* J Clin Invest **110**: 751-759.
94. **Perren SM** (1979). *Physical and biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation.* Clin Orthop Relat Res: 175-196.
95. **Pritchard JJ** (1946). *Repair of fractures of the parietal bone in rats.* J Anat **80**: 55-60 52.
96. **Radke S, Battmann A, Jatzke S, Eulert J, Jakob F, Schutze N** (2006). *Expression of the angiogenic proteins CYR61, CTGF, and VEGF in osteonecrosis of the femoral head.* J Orthop Res **24**: 945-952.
97. **Reumann MK, Nair T, Strachna O, Boskey AL, Mayer-Kuckuk P** (2010). *Production of VEGF receptor 1 and 2 mRNA and protein during endochondral bone repair is differential and healing phase specific.* J Appl Physiol **109**: 1930-1938.
98. **Röntgen V, Blakytyn R, Matthys R, Landauer M, Wehner T, Gockelmann M, Jermendy P, Amling M, Schinke T, Claes L, Ignatius A** (2010). *Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator.* J Orthop Res **28**: 1456-1462.
99. **Sandberg MM, Aro HT, Vuorio EI** (1993). *Gene expression during bone repair.* Clin Orthop Relat Res: 292-312.

100. **Schenk RK, Willenegger HR** (1977). [*Histology of primary bone healing: modifications and limits of recovery of gaps in relation to extent of the defect (author's transl)*]. Unfallheilkunde **80**: 155-160.
101. **Schiebler TH, Korf H-W** (2007). *Anatomie*. Steinkopff Verlag. Heidelberg.
102. **Shapiro F** (1988). *Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process*. J Bone Joint Surg Am **70**: 1067-1081.
103. **Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, Derosé M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ** (1997). *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*. Cell **89**: 309-319.
104. **Street J, Bao M, Deguzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, Van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH** (2002). *Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover*. Proc Natl Acad Sci U S A **99**: 9656-9661.
105. **Su JL, Chiou J, Tang CH, Zhao M, Tsai CH, Chen PS, Chang YW, Chien MH, Peng CY, Hsiao M, Kuo ML, Yen ML** (2010). *CYR61 regulates BMP-2-dependent osteoblast differentiation through the $\alpha v \beta 3$ integrin/integrin-linked kinase/ERK pathway*. J Biol Chem **285**: 31325-31336.
106. **Tonna EA** (1964). *Fracture Callus Formation in Young and Old Mice Observed with Polarized Light Microscopy*. Anat Rec **150**: 349-361.
107. **Tralman G, Andrianov V, Arend A, Mannik P, Kibur RT, Noupuu K, Uksov D, Aunapuu M** (2012). *A Novel Combined Method of Osteosynthesis in Treatment of Tibial Fractures: A Comparative Study on Sheep with Application of Rod-Through-Plate Fixator and Bone Plating*. Anat Histol Embryol.
108. **Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, Einhorn T, Tabin CJ, Rosen V** (2006). *BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing*. Nat Genet **38**: 1424-1429.
109. **Turner CH, Burr DB** (1993). *Basic Biomechanical Measurements of Bone - a Tutorial*. Bone **14**: 595-608.
110. **Urist MR** (1965). *Bone: formation by autoinduction*. Science **150**: 893-899.
111. **Urist MR** (1997). *Bone morphogenetic protein: the molecularization of skeletal system development*. J Bone Miner Res **12**: 343-346.
112. **Urist MR, Mc LF** (1950). *Bone repairs in rats with multiple fractures*. Am J Surg **80**: 685-695; passim.
113. **Utvag SE, Fuskevåg OM, Shegarfi H, Reikeras O** (2010). *Short-term treatment with COX-2 inhibitors does not impair fracture healing*. J Invest Surg **23**: 257-261.
114. **Utvag SE, Grundnes O, Rindal DB, Reikeras O** (2003). *Influence of extensive muscle injury on fracture healing in rat tibia*. J Orthop Trauma **17**: 430-435.

115. **Wallace A, Cooney TE, Englund R, Lubahn JD** (2011). *Effects of interleukin-6 ablation on fracture healing in mice.* J Orthop Res **29**: 1437-1442.
116. **Webb JCJ, Tricker J** (2000). *A review of fracture healing.* current orthopaedics **14**: 457-463.
117. **Welsch U, Deller T** (2010). *Lehrbuch Histologie.* 3. Auflage. Urban&Fischer Verlag/Elsevier GmbH. München.
118. **Wennemuth G** (2012). *Taschenatlas Histologie.* 1. Auflage. Urban&Fischer Verlag/Elsevier GmbH. München.
119. **Wong M, Kireeva ML, Kolesnikova TV, Lau LF** (1997). *Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate-early gene, regulates chondrogenesis in mouse limb bud mesenchymal cells.* Dev Biol **192**: 492-508.
120. **Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA** (1988). *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities.* Science **242**: 1528-1534.
121. **Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K** (1998). *Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro.* Endocrinology **139**: 1329-1337.
122. **Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T** (1998). *Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL.* Proc Natl Acad Sci U S A **95**: 3597-3602.
123. **Zwingenberger S, Niederlohmann E, Vater C, Rammelt S, Matthys R, Bernhardt R, Valladares RD, Goodman SB, Stiehler M** (2013). *Establishment of a femoral critical-size bone defect model in immunodeficient mice.* J Surg Res **181**: e7-e14.

7 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Knochenbildung durch Osteoblasten
- Abb. 2: Schematische Darstellung des Knochenabbaus
- Abb. 3: Schematische Darstellung des Lamellenknochens
- Abb. 4: Osteosynthesematerial für das Mausfemur
- Abb. 5: CD-1 Maus
- Abb. 6: MouseScrew und Eindrehwerkzeug
- Abb. 7: Durchführung der intraperitonealen Narkose
- Abb. 8: Fixierung des Femurs während der OP
- Abb. 9: Hautinzision mit luxierter Patella
- Abb. 10: Eingebrachte Führungskanüle
- Abb. 11: Eingebrachter Wolfram-Führungsdraht
- Abb. 12: Osteotomie mit Gigli-Säge
- Abb. 13: Guillotine Vorrichtung zur Frakturierung
- Abb. 14: Fraktur mittels Guillotine
- Abb. 15: Eindrehen der Schraube über den Führungsdraht
- Abb. 16: Refixation der Patella
- Abb. 17: Radiologische Kontrollen
- Abb. 18: 3-Punkt-Biegevorrichtung
- Abb. 19: Kraft-Wege-Diagramm
- Abb. 20: graphische Darstellung der CT-Ergebnisse
- Abb. 21: Mikro-CT Schnittbilder
- Abb. 22: graph. Darstellung der Biomechanik Ergebnisse
- Abb. 23: graph. Darstellung der Gesamtkallusfläche
- Abb. 24: graph. Darstellung der Verteilung des Knochengewebes im Kallus
- Abb. 25: graph. Darstellung der Verteilung des Knorpelgewebes im Kallus
- Abb. 26: graph. Darstellung der Verteilung des Bindegewebes im Kallus
- Abb. 27: Histologische Schnittpräparate
- Abb. 28: graphische Darstellung der immunhistologischen Ergebnisse
- Abb. 29: Immunhistochemische Anfärbung CD-31 positiver Zellen
- Abb. 30: graphische Darstellung der Expression von Cyr-61 und VEGF

Abb. 31: graph. Darstellung der Expression von Col-2 und Col-10

Abb. 32: graph. Darstellung der Expression von BMP-2 und BMP-4

Abb. 33: graph. Darstellung der Expression von OPG und RANKL

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Versuchsprotokoll

Tab. 2: Zelluläres und extrazelluläres Färbeverhalten
der Masson-Goldner-Färbung

Tab. 3: Übersicht über die im Western Blot analysierten Proteine
und deren Funktionen

Tab. 4: Zusammensetzung der für die in den Western-Blot-Analysen
verwendeten Sammel- und Trenngele

Tab. 5: Primärantikörper für die Western-Blot-Analysen

Tab. 6: Sekundärantikörper für die Western-Blot-Analysen

Tab. 7: Auswertung CT

Tab. 8: Auswertung Biomechanik

Tab. 9: Auswertung Gesamtkallus

Tab. 10: Auswertung Knochenanteil im Gesamtkallus

Tab. 11: Auswertung Knorpelanteil im Gesamtkallus

Tab. 12: Auswertung Bindegewebsanteil im Gesamtkallus

Tab. 13: Auswertung Immunhistologie

Tab. 14: Auswertung Western Blot

9 Publikationen und Vorträge

Publikationen

1. Klein M, **Stieger A**, Stenger D, Scheuer C, Holstein JH, Pohlemann T, Menger MD, Histing T (2015). *Comparison of Healing Process in Open Osteotomy Model and Open Fracture Model: Delayed Healing of Osteotomies After Intramedullary Screw Fixation*. J Orthop Res, 33:971-8.
2. Histing T, Klein M, **Stieger A**, Stenger D, Matthys R, Holstein JH, Pohlemann T, Menger MD (2012). *A New model to analyze metaphyseal bone healing in mice*. J Surg Res, 178: 715-21.

Vorträge

1. Histing T, Klein M, **Stieger A**, Stenger D, Matthys R, Holstein JH, Pohlemann T, Menger MD: „Ein neues Frakturmodell zur Analyse der metaphysären Frakturheilung.“ Vortrag im Rahmen der AO Drei-Länder-Tagung (Deutschland, Österreich, Schweiz), Wien, 3.-5. Mai 2012

10 Danksagung

Meiner Doktormutter und Betreuerin, **PD Dr. med. Tina Histing**, danke ich für die Überlassung des Themas meiner Dissertationsschrift. Besonders bedanken möchte ich mich für ihr Engagement und ihre Freundschaft auch über die Arbeit hinaus. Sie stand mir stets in allen Belangen mit Rat und Tat zu Seite.

Prof. Dr. med. Tim Pohlemann danke für die einmalige Gelegenheit eines Aufenthalts in Brisbane/Australien, im Rahmen der Studie „A new model to analyze metaphyseal fracture healing in mice“. Auch die Teilnahme an den Meetings in Davos und Hornbach waren eine große Bereicherung.

Prof. Dr. med. Michael D. Menger gilt mein Dank für die großzügige Bereitstellung der Räumlichkeiten und Gerätschaften des Instituts für klinisch-experimentelle Chirurgie, sowie für seine persönliche Unterstützung während der Durchführung der Arbeit und während des Schreibprozesses.

Dr. rer. nat. Claudia Scheuer und **Janine Becker** danke ich für Unterstützung bei der Durchführung der proteinbiochemischen und histologischen Analysen.

Ich danke **Dr. med. vet. Monika Frings** für das Einverständnis zur Durchführung des Tierversuchs sowie für ihre fachlichen Ratschläge.

Herrn **Dr. med. Moritz Klein** und Herrn **Dr. med. David Stenger** danke ich für ihre fachliche Unterstützung und Ratschläge.

Danke an alle Mitarbeiter der Tierversuchspflege des Instituts für Experimentelle Chirurgie. Mein Dank gilt auch allen Doktoranden, Ärzten und wissenschaftlichen Mitarbeitern, die ich während der Zeit im Institut kennenlernen durfte.

Zum Schluss möchte ich besonders **meinen Eltern und Großeltern** danken, für ihre Liebe und die unendliche Geduld.

Danke auch an **Meike und Gerhart**.

Zu guter Letzt noch an **Felix und Antonia**: Danke, dass es euch gibt und ihr meine kleine Familie seid.