

Aus dem Bereich

Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Medizinischen Fakultät

Der Universität des Saarlandes, Homburg (Saar)

Direktor: Prof. Dr. Tim Pohlemann

Effekte lokal applizierter mikrovaskulärer Fragmente mittels thermoreponsivem Hydrogel auf die Frakturheilung

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

2019

Vorgelegt von: Maximilian Alexander Berthold Altmeyer

Geb. am: 16.11.1993 in Saarbrücken

Dekan: _____

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

Jahr der Promotion: _____

Für meine Familie,

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung / Abstract	1
1.1. Zusammenfassung	1
1.2. Abstract.....	1
2. Einleitung.....	3
2.1. Knochen.....	3
2.1.1. Histologie	3
2.1.2. Physiologie	7
2.2. Arten der Frakturheilung	8
2.2.1. Primäre Frakturheilung	8
2.2.2. Sekundäre Frakturheilung	9
2.2.3. Einflussfaktoren auf die Frakturheilung.....	11
2.3. Frakturmodelle.....	14
2.3.1. Maus	14
2.3.2. Ratte	17
2.3.3. Kaninchen.....	17
2.3.4. Katze.....	18
2.3.5. Hund	18
2.3.6. Schaf.....	18
2.3.7. Ziege.....	19
2.3.8. Pferd	19
2.3.9. Primat	19
2.4. Mikrovaskuläre Fragmente (MVF)	20
2.5. Thermoresponsives Hydrogel (TRH)	20
2.5.1. Historie und Anwendungsgebiete	20
2.5.2. Struktur und Biosynthese	22
2.5.3. Andere thermoresponsive Polymere	24

2.6.	Zielsetzung.....	24
2.7.	Fragestellung	24
3.	Material und Methoden	26
3.1.	Intervention.....	26
3.1.1.	Versuchsprotokoll	26
3.1.2.	Versuchstiere	27
3.1.3.	Isolation von MVF	27
3.1.4.	Präparation von TRH	28
3.1.5.	Kultivierung von MVF.....	29
3.1.6.	Morphologie und Viabilität kultivierter MVF	29
3.1.7.	Tiermodell und Applikation von TRH und MVF	30
3.1.8.	Tötung der Versuchstiere	36
3.1.9.	Präparation des Knochens	36
3.2.	Zielkriterien und Auswertung.....	37
3.2.1.	Morphologie und Viabilität von MVF	37
3.2.2.	Radiologie	37
3.2.3.	Biomechanik.....	39
3.2.4.	Histologie und Histomorphometrie.....	39
3.2.5.	Western Blot.....	41
3.3.	Statistik	46
4.	Ergebnisse	47
4.1.	Morphologie und Viabilität kultivierter MVF.....	47
4.2.	Postoperativer Verlauf.....	49
4.3.	Makroskopischer Befund.....	49
4.4.	Radiologie.....	50
4.4.1.	Röntgen	50
4.4.2.	Mikrocomputertomographie.....	51
4.5.	Biomechanik.....	52

4.6.	Histologie und Histomorphometrie	53
4.7.	Western Blot	59
5.	Diskussion	62
5.1.	Diskussion der Methoden	62
5.2.	Diskussion der Ergebnisse	68
5.3.	Schlussfolgerungen	72
6.	Literaturverzeichnis	73
7.	Abkürzungs- / Abbildungs- / Tabellenverzeichnis	89
7.1.	Abkürzungsverzeichnis	89
7.2.	Abbildungsverzeichnis	93
7.3.	Tabellenverzeichnis	95
8.	Publikationen	96
9.	Danksagungen	97

1. Zusammenfassung / Abstract

1.1. Zusammenfassung

Eine defizitäre Vaskularisation ist ein vorrangiger Grund für eine verzögerte Frakturheilung bzw. die Entwicklung von Pseudarthrosen. Um dieses Problem zu lösen, können mikrovaskuläre Gefäßfragmente (MVF) aus Fettgewebe als Vaskularisationseinheiten dienen. Jedoch benötigt es zur präzisen Applikation von MVF in einen Knochendefekt eine geeignete Trägersubstanz. In dieser Studie wurde untersucht, ob dies durch ein thermoresponsives Hydrogel (TRH) erreicht werden kann. MVF wurden aus CD-1 Mäusen isoliert und in TRH inkorporiert, während nicht inkorporierte MVF als Kontrolle dienten. Die Viabilität von MVF wurde immunhistochemisch über einen Zeitraum von bis zu 7 Tagen untersucht. Zusätzlich wurde in Femora von CD-1 Mäusen eine Osteotomie induziert. Der Osteotomiespalt wurde mit MVF-beladenem TRH (TRH+MVF), unbeladenem TRH (TRH) oder ohne Material (Kontrolle) aufgefüllt. Die Knochenheilung wurde 14 und 35 Tage postoperativ untersucht. In TRH eingebettete MVF zeigten weniger apoptotische Zellen und eine stabile Gefäßmorphologie im Vergleich zu Kontrollen. Im Tiermodell zeigte die Mikrocomputertomographie weniger Knochenvolumen in TRH+MVF Femora. Die Histomorphometrie ergab weniger Knochen- und mehr Bindegewebe 35 Tage postoperativ in TRH+MVF Femora verglichen mit Kontrollen. Dementsprechend war der ossäre Überbrückungsscore und die Biegesteifigkeit in Femora der Gruppe TRH+MVF reduziert. Die Histologie und der Western Blot zeigten eine verbesserte Vaskularisierung und erhöhte CD31 Expression, wohingegen die Expression von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) in TRH+MVF Femora reduziert war. Zudem zeigte der Kallus von TRH+MVF Femora eine höhere Expression von Rezeptor-aktiviertem NF- κ B Liganden (RANKL) und eine größere Anzahl an Osteoklasten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass TRH eine geeignete Trägersubstanz für MVF darstellt. Die Applikation von TRH+MVF verbessert die Vaskularisation in Knochendefekten. Jedoch stört dies die Knochenheilung, am ehesten durch eine geringere VEGF Expression in der frühen Phase der Knochenheilung.

1.2. Abstract

Insufficient vascularization is a major cause for the development of non-unions. To overcome this problem, adipose tissue-derived microvascular fragments (MVF) may serve as

vascularization units. However, their application into bone defects needs a carrier system. Herein, we analyzed whether this is achieved by a thermoresponsive hydrogel (TRH). MVF were isolated from CD-1 mice and cultivated after incorporation into TRH, while non-incorporated MVF served as controls. Viability of MVF was assessed immunohistochemically over a 7-day period. Moreover, osteotomies were induced in femurs of CD-1 mice. The osteotomy gaps were filled with MVF-loaded TRH (TRH+MVF), unloaded TRH (TRH) or no material (control). Bone healing was evaluated 14 and 35 days postoperatively. MVF incorporated into TRH exhibited less apoptotic cells and showed a stable vessel morphology compared to controls. In the animal model, micro-computed tomography revealed a reduced bone volume in TRH+MVF femurs. Histomorphometry showed less bone and more fibrous tissue after 35 days in TRH+MVF femurs compared to controls. Accordingly, TRH+MVF femurs exhibited a lower osseous bridging score and a reduced bending stiffness. Histology and Western blot analysis revealed an increased vascularization and CD31 expression, whereas vascular endothelial growth factor (VEGF) expression was reduced in TRH+MVF femurs. Furthermore, the callus of TRH+MVF femurs showed increased receptor activator of NF- κ B ligand expression and higher numbers of osteoclasts. These findings indicate that TRH is an appropriate carrier system for MVF. Application of TRH+MVF increases the vascularization of bone defects. However, this impairs bone healing, most likely due to lower VEGF expression during the early course of bone healing.

2. Einleitung

2.1. Knochen

Knochen können nach verschiedenen Kriterien klassifiziert werden. Anhand der äußeren Form lassen sich vier morphologische Gruppen zusammenfassen (Aumüller et al., 2007) (Schiebler & Korf, 2007):

- Lange Knochen (Ossa longa) Auch Röhrenknochen genannt. Hierzu gehören z. B. Femur, Tibia und Humerus.
- Kurze Knochen (Ossa brevia) Wichtige Vertreter sind unter anderem die Hand- und Fußwurzelknochen.
- Platte Knochen (Ossa plana) Beispiele hierfür sind diverse Schädelknochen, z. B. die Ossa parietalia, das Os ilium und die Scapula.
- Irreguläre Knochen (Ossa irregularia) Hierzu zählen vor allem die Wirbel oder Schädelbasisknochen, wie z. B. das Os sphenoidale.

In der vorliegenden Arbeit wurden Femora (Röhrenknochen) verwendet.

Röhrenknochen lassen sich neben anderen, speziellen Strukturen in 3 Bereiche unterteilen (Aumüller et al., 2007) (Schiebler & Korf 2007):

- Epiphyse Die mit hyalinem Knorpel überzogenen Epiphysen bilden die distalen und proximalen Enden der Röhrenknochen und können dort mit anderen Knochen artikulieren.
- Diaphyse Die Diaphyse bildet den länglichen Schaft des Röhrenknochens.
- Metaphyse Die Metaphyse liegt zwischen Epiphyse und Diaphyse. Sie enthält im Wachstumsalter die Epiphysenfuge und ist als solche für das Längenwachstum des Röhrenknochens verantwortlich.

In der vorliegenden Arbeit diente die Diaphyse des Femurs als Lokalisation für die Osteotomie.

2.1.1. Histologie

Histologisch lässt sich der Knochen in folgende Bestandteile unterteilen:

Die äußere Substantia compacta, auch Corticalis genannt, besteht beim Menschen hauptsächlich aus Osteonen und dem Havers-System. Hierunter versteht man eine ca. 250 µm x 1 - 5 cm große, funktionelle Einheit aus 3 - 5 µm dicken Knochenlamellen (Havers-Lamellen

bzw. Speziallamellen), die konzentrisch um einen zentralen Kanal (Havers-Kanal) herum angeordnet sind. Die an das Periost angrenzenden äußeren Lamellen werden als äußere Generallamellen und die an die Spongiosa angrenzenden inneren Lamellen als innere Generallamellen bezeichnet. Die mit Endost ausgekleideten Havers-Kanäle, beinhalten neben vegetativen Nerven auch Blutgefäße (Zentralarterie bzw. Havers-Arterie), die über seitliche Verzweigungen (sogenannte Volkmann-Kanäle) miteinander kommunizieren (Lüllmann-Rauch et al., 2006) (Junqueira et al., 2004).

Die aus mineralisierten Kollagenfibrillen bestehenden Knochenlamellen weisen eine von Lamelle zu Lamelle wechselnde Verlaufsrichtung auf. Dieses Muster ist Ausdruck des Knochens zur Anpassung an Zug- und Druckbelastung (Bucher & Wartenberg, 1997).

Zwischen den Lamellen sind die Zellkörper der Osteozyten in den linsenförmigen Lacunae ossae (Knochenhöhlen) eingemauert. Von diesen Lakunen ziehen die Canaliculi ossei, in denen sich die Ausläufer der Osteozyten befinden, in verschiedene Richtungen radikulär aus. Diese Zellausläufer treten in den Kanälchen mit interstitieller Flüssigkeit per Diffusion in Kontakt, sodass sich ein komplexes Versorgungssystem der Knochenzellen bildet. Die Osteozyten stehen über sogenannte Gap Junctions mit ihren Nachbarzellen in Kontakt und ermöglichen so einen Informationsaustausch untereinander. Die Grenze zwischen den einzelnen Osteonen kann häufig durch eine kräftig anfärbare Linie (Zementlinie) erkannt werden. Der Hohlraum zwischen den einzelnen Nachbarosteonen wird durch Schaltlamellen gefüllt. Diese Schaltlamellen sind Rudimente von älteren, teilweise abgebauten Havers-Systemen und zeigen somit den ständigen Umbau von Knochen (Lüllmann-Rauch et al., 2006) (Junqueira et al., 2004).

An den äußersten Bereichen der Substantia compacta, angrenzend an das Periost bzw. den Markraum, sind die Lamellen nicht in Osteonen organisiert. Hier umfassen die Lamellen kontinuierlich die ganze Zirkumferenz des Knochens und bilden die o.g. äußere bzw. innere Generallamelle (Lüllmann-Rauch et al., 2006) (Junqueira et al., 2004).

Die Compacta wird mit Ausnahme der knorpeligen Gelenkflächen von Periost überzogen. Periostales Gewebe wird funktionell in 2 Schichten eingeteilt:

Das Stratum osteogenicum liegt direkt dem Knochen auf und wird auch Kambiumschicht genannt. Diese Kambiumschicht besteht aus den gleichen Zellen wie das Endost und enthält darüber hinaus noch kleine Gefäße, welche die Ernährung des Knochens von außen ermöglichen. Weiterhin enthält das Stratum osteogenicum auch sensible Nervenfasern, welche

die typische Schmerzempfindung hervorrufen. Aufgrund der guten Vaskularisation und der zellulären Ausstattung ist die Kambiumschicht wichtiger Ort für die Neubildung von Knochensubstanz. Sie ist unter anderem für die Osteoblastendifferenzierung zuständig und ist vor allem im Wachstumsalter stark ausgeprägt. Zudem findet hier das Dickenwachstum des Knochens statt. Das Ende des Knochenwachstums geht auch mit der Abnahme der Osteoblastendifferenzierung einher. Bei Bedarf kann diese jedoch wieder gesteigert werden und wird dann - z. B. im Falle einer Fraktur - als periostale Frakturheilung bezeichnet. (Schiebler & Schmidt, 2003) (Lüllmann-Rauch et al., 2006).

Das Stratum fibrosum liegt dem Stratum osteogenicum außen auf. Diese äußere Schicht des Periosts ist mit der Kambiumschicht über kollagene Faserbündel, den sogenannten Sharpey-Fasern, verbunden. Diese Kollagenfaserbündel sind vor allem in Ansatzbereichen der Sehnen stärker ausgeprägt und reduzieren bzw. verteilen dort die auf den Knochen einwirkende Zugkraft der jeweiligen Muskeln, indem sie die Kräfte gleichermaßen auf das gesamte Periost des Knochens verteilen. (Schiebler & Schmidt, 2003).

Das innere Knochengewebe, die sogenannte Substantia spongiosa (Spongiosa), wird von der Substantia compacta umschlossen und stellt im Gegensatz zur festen Corticalis ein komplexes, eher schwammartiges Gebilde dar, welches aus Knochenbälkchen besteht und deren Zwischenräume von Knochenmark ausgefüllt werden. Die Extrazellulärmatrix (EZM) der Spongiosa ist, genauso wie die der Compacta, ebenfalls in Lamellen organisiert. Allerdings sind die Spongiosa-Lamellen parallel angeordnet. Die Bälkchen sind frei von Gefäßen und die in den Lamellen eingemauerten Osteozyten werden per Diffusion vom Knochenmark ernährt (Lüllmann-Rauch et al., 2006) (Junqueira et al., 2004).

Das zwischen den Trabekeln der Spongiosa lokalisierte Knochenmark kann grob in rotes und gelbes Mark unterteilt werden. Während der Embryonalzeit wird primär das sogenannte rote, blutbildende, Knochenmark angelegt. Hier findet bereits ab dem 5. - 6. Fetalmonat die Blutbildung (Hämatopoiese) statt. Obwohl die Hämatopoiese zunächst im Knochenmark aller Knochen gleichermaßen abläuft, wandelt sich das rote Knochenmark der langen Röhrenknochen nach den ersten 12 Lebensmonaten in gelbes, fettreiches, Mark um. Mit zunehmendem Alter beschränkt sich die Blutbildung auf die kurzen und platten Knochen. Bei erhöhtem Bedarf an hämatopoietisch aktivem Gewebe wie z. B. im Rahmen einer chronischen Hypoxie, ist diese Entwicklung jedoch reversibel (Boecker et al., 2004).

Das Grundgerüst des Knochenmarks besteht histologisch aus retikulärem Bindegewebe. Das Stroma enthält Retikulumzellen, Fettzellen sowie Osteoblasten und schafft ein ideales Milieu

indem die Gerüstzellen durch diverse Zytokine die Hämatopoiese beeinflussen (Boecker et al., 2004).

Die Spongiosa-Trabekel werden in ihrem Verlauf komplett von Endost überzogen, welches sich bis in die bereits beschriebenen Havers-Kanäle fortsetzt. Das Endost besteht aus einer dünnen Schicht nicht-mineralisierter Kollagenfibrillen und einer durchgängigen Zelllage (sogenannte *Lining Cells*). Diese Zelllage besteht vorrangig aus mesenchymalen Vorläuferzellen (Stammzellen, Osteoprogenitorzellen), Osteoblasten und Osteoklasten. Bei Bedarf, wie z. B. bei einer Fraktur, können diese Zellen mit diversen Umbauprozessen beginnen und sich an der Frakturheilung beteiligen (Lüllmann-Rauch et al., 2006). Diese Vorläuferzellen findet man nicht nur auf endostaler Seite, sondern auch an den äußeren Knochenoberflächen und in den Havers-Kanälen. Sie werden durch hormonelle Steuerung angeregt und in Osteoblasten umgewandelt (Lüllmann-Rauch et al., 2006). Osteoblasten sind dazu in der Lage unter hormoneller Regulierung Knochengrundsubstanz (sogenanntes Osteoid) zu synthetisieren. Mittels alkalischer Phosphatase aus Osteoblasten wird dieses Osteoid im Verlauf mineralisiert. Je nach Lokalisation im Knochen dauert dieser Prozess der Mineralisation unterschiedlich lang. In der Spongiosa ist die Mineralisation nach ca. 25 Tagen abgeschlossen, wohingegen die Compacta erst nach etwa 35 Tagen mineralisiert ist (Junqueira et al., 2004). Hiernach werden Osteoblasten entweder in die EZM eingemauert und verwandeln sich zu Osteozyten, gehen in einen inaktiven Zustand über, oder werden apoptotisch abgebaut (Lüllmann-Rauch et al., 2006).

Neben Osteoblasten finden sich im Knochen auch Osteoklasten. Diese polynukleären Riesenzellen werden je nach Gewebe auch Chondro- bzw. Odontoklasten genannt. Anders als die übrigen Zellen des Knochens werden Osteoklasten aus hämatopoietischen Vorläuferzellen gebildet. Im Gegensatz zu Osteoblasten sind Osteoklasten für den Abbau des Osteoids verantwortlich. Sie finden sich in Vertiefungen der Knochenoberflächen, den sogenannten Howship Lakunen, oder auch an Stellen in der Corticalis, an denen später ein Gefäßkanal für ein neues Osteon entstehen soll. Der Knochen unterliegt somit einem ständigen Auf- und Abbau, was ihn zu einem dynamischen und anpassungsfähigen Gewebe macht (Lüllmann-Rauch et al., 2006) (Junqueira et al., 2004).

Neben den unterschiedlichen Zellen des Knochens spielt auch dessen Grundsubstanz eine bedeutende Rolle. Die EZM des Knochens besteht zu ungefähr 65 % aus anorganischen Substanzen (Calciumphosphaten und Calciumcarbonaten) und zu ca. 35 % aus organischen Anteilen. Etwa 90 % der organischen Anteile werden durch Kollagene ausgemacht. Die

restlichen 10 % werden durch nicht-kollagene Proteine und Lipide gebildet (Junqueira et al., 2004).

Abhängig von der räumlichen Organisation der EZM lässt sich das Knochengewebe in 2 Arten unterscheiden:

Im sogenannten Geflechtknochen oder auch Faserknochen liegen die Kollagenfasern gebündelt vor und sind kreuz und quer miteinander verflochten. Bei jeder Knochenneubildung entsteht zuerst Geflechtknochen. Diese Art von Knochengewebe bildet sich entlang der Gefäße und weist eine sehr große Zelldichte auf. Analog zu den Kollagenfasern ist hier die Anordnung der Osteozyten ebenfalls sehr diffus (Lüllmann-Rauch et al., 2006) (Junqueira et al., 2004).

Im weiteren Verlauf der Frakturheilung wird Geflechtknochen zu dem oben beschriebenen organisierteren Lamellenknochen umgebaut. Hier liegen die Kollagenfaserbündel regelmäßig und geordnet im jeweiligen Havers-System vor und die Anzahl an Zellen ist vergleichsweise niedrig. Diese Art von Knochen beinhaltet einen höheren Anteil an anorganischen Bestandteilen (Lüllmann-Rauch et al., 2006) (Junqueira et al., 2004).

2.1.2. Physiologie

Die vorrangige Funktion des Knochens ist eine Stütz- und Strukturfunktion für den Körper. Darüber hinaus ist Knochen auch integraler Baustein unseres Bewegungsapparates und hat eine Mobilitätsfunktion. Zudem ist Knochen auch für die Calciumhomöostase des Körpers verantwortlich. Mit Blick auf die Wirbelsäule und den Thorax übernimmt Knochen außerdem eine Schutzfunktion lebensnotwendiger Organe (Aumüller et al., 2007) (Schiebler & Korf, 2007).

Um diesen Aufgaben gerecht zu werden muss Knochen anpassungsfähig und „dynamisch“ sein. Hierzu sind ständige Formations- bzw. Resorptionsvorgänge notwendig (Frost, 1987). Diese Vorgänge sind durch folgende Abläufe gekennzeichnet:

- Wachstum
- Modeling
- Remodeling

Das Längenwachstum erfolgt vorrangig im Bereich der Epiphysenfuge. Hingegen erfolgt das Dickenwachstum vor allem durch das Stratum osteogenicum des Periosts (Lüllmann-Rauch et al., 2006) (Junqueira et al., 2004).

Modeling bezeichnet die Fähigkeit des Knochens, auf diverse mechanische Erfordernisse mit gezielten Formveränderungen zu reagieren. Auch diese Fähigkeit ist in der Wachstumsphase stärker ausgeprägt als im höheren Lebensalter (Fleisch, 1997).

Als Remodeling werden lebenslang ablaufende, dynamische und belastungsunabhängige Umbauprozesse im Knochen bezeichnet. Diese Vorgänge führen jedoch zu keiner Zunahme des Knochenvolumens, sondern Ziel dieses Vorgangs ist vor allem die Reparatur von Mikrofrakturen. In diesem Zusammenhang ist auch der Begriff Coupling von Bedeutung. Coupling bezeichnet das Gleichgewicht zwischen Knochenresorption und neuem Knochenanbau. Das morphologische Korrelat hierzu wird durch die *bone remodeling unit* (BRU) beschrieben (Fleisch, 1997).

2.2. Arten der Frakturheilung

2.2.1. Primäre Frakturheilung

Die primäre oder auch direkte Frakturheilung bezeichnet eine Knochenheilung ohne äußere Kallusmanschette. Voraussetzung für diese Form der Heilung ist, dass der Knochen makroskopisch ohne erkennbaren Zwischenraum zusammengefügt wird und über eine ausreichend gute Vaskularisation und mechanische Stabilität der Fraktur verfügt. Daher ist für diese Art der Frakturheilung eine Stabilisierung mittels Osteosynthese nach vorheriger anatomischer Reposition der Fraktur unabdingbar (Rueter et al., 2003) (Berchtold et al., 2008).

Abhängig von der absoluten Weite des Frakturspalts wird bei der primären Frakturheilung zwischen einer Kontakt- und einer Spaltheilung unterschieden.

Ist der Frakturspalt kleiner als 0,2 mm kommt es zur Kontaktheilung. Bei dieser geringen Distanz verzahnen sich die Frakturfragmente. Durch die osteoklastische Aktivität werden Resorptionskanäle in den jeweils gegenüberliegenden Corticalices geschaffen. Nachfolgende Osteoblasten füllen diese Kanäle sukzessive auf und bilden Lamellenknochen aus. Dadurch kommt es zu einem longitudinalen Einwachsen der Osteone und einer direkten Vereinigung der Knochenfragmente (Rueter et al., 2003) (Berchtold et al., 2008).

Beträgt die Frakturweite mehr als 0,2 mm findet eine Spaltheilung statt. Hierbei werden die mikroskopischen Spalten mit Geflechtknochen aufgefüllt. Dieser Vorgang dauert beim Menschen ca. 3 - 4 Wochen. Im Anschluss wird im Rahmen des funktionellen Remodelings der

neu gebildete Geflechtknochen zu Lamellenknochen umgebaut, wobei die Lamellen parallel zur Schaftachse ausgerichtet sind (Rueter et al., 2003) (Berchtold et al., 2008).

Bis dato ist unklar, ob es an der Maus unter o.g. Voraussetzungen zu einer primären Frakturheilung kommen kann. Bisher angewandte Modelle zeigten eine sekundäre Frakturheilung (Garcia et al., 2008) (Garcia et al., 2008b) (Garcia et al., 2009) (Hiltunen et al., 1993) (Histing et al., 2009b) (Holstein et al., 2007b) (Holstein et al., 2009b) (Manigrasso & O'Connor, 2004).

2.2.2. Sekundäre Frakturheilung

Die sekundäre Frakturheilung oder auch indirekte Frakturheilung stellt die häufigere Art der Frakturheilung dar. Im Gegensatz zur primären Frakturheilung kommt es zur Ausbildung eines Zwischengewebes, dem sogenannten Kallus. Aufgabe des Kallusgewebes ist es, den Knochen vorerst zu fixieren, um ihn in einem zweiten Schritt sukzessive mechanisch zu stabilisieren (Scharf et al., 2009).

Sekundäre Frakturheilung erfolgt immer dann, wenn die anatomische Reposition der Knochenfragmente nicht möglich ist. Beim Menschen wird diese Art der Frakturheilung vor allem bei konservativ behandelten Frakturen beobachtet, aber auch bei Osteosynthesen die nicht auf die anatomische Reposition ausgerichtet sind wie z. B. der intramedullären Marknagelung (Rueter et al., 2003) (Berchtold et al., 2008) (Scharf et al., 2009).

Bei der sekundären Frakturheilung kann man 5 verschiedene, sich teilweise überlappende Phasen unterscheiden:

In der Frakturphase kommt es durch Gewalteinwirkung auf den Knochen zu einer strukturellen Unterbrechung der Corticalis, der Spongiosa, des Knochenmarks und des Periosts. Abhängig vom Unfallmechanismus wirkt eine Kraft solange auf den Knochen bis dieser bricht und sich die einwirkende Kraft auf das umliegende Gewebe verteilt. Bei der gleichzeitigen Durchtrennung von periostalen bzw. medullären Blutgefäßen kommt es zur Bildung eines Frakturhämatoms im Frakturspalt und dem unmittelbar umliegenden Weichteilgewebe. Schon in den folgenden Minuten bis Stunden nach der Fraktur finden sich im Bruchspalt Zytokine und diverse Wachstumsfaktoren (Scharf et al., 2009).

Mit der Entstehung des Frakturhämatoms beginnt die Entzündungsphase. Sie reicht bis zur Ausbildung des bindegewebigen Kallus beim Menschen und dauert ca. 48 bis 72 Stunden. Begünstigt durch das Frakturhämatom kommt es zu einer überschießenden

Kapillaraussprossung, woraufhin sich eine Kaskade der Proliferation, Migration und Differenzierung von pluripotenten Stammzellen, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen anschließt. Neben den genannten Zellen sind in der Entzündungsphase auch die Spindelzellen für die sekundäre Frakturheilung von Bedeutung. Diese Zellart befindet sich in der inneren Periostschicht und lässt sich morphologisch nicht von Fibroblasten unterscheiden. Spindelzellen können im weiteren Verlauf der Frakturheilung zu Osteoblasten ausdifferenzieren, weshalb sie auch als Osteoprogenitorzellen angesehen werden können (Rueter et al., 2003).

Im Rahmen der Entzündungsphase spielt die Angiogenese eine entscheidende Rolle bezüglich Zellmigration und Zellnutrition. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, dass mesenchymale Vorläuferzellen direkt dem einsprießenden Gefäßendothel entstammen (Tremain et al., 2001). Durch die gesteigerte Gewebsperfusion in der Entzündungsphase wird eine „Flussumkehr“ ermöglicht. Statt der physiologischen Perfusion der inneren $\frac{2}{3}$ der Corticalis durch medulläre Gefäße, wird die Corticalis in der Entzündungsphase hauptsächlich durch periostale Gefäße ernährt. Vor allem in der zweiten Woche nach Frakturierung des Knochens kann sich die Durchblutung bis auf das 6-fache der Norm steigern. Trotz dieser intensiven angiogenen Aktivität im Bereich der Fraktur bleibt jedoch die Sauerstoffspannung niedrig und der pH-Wert im sauren Bereich, da selbst die vermehrte Sauerstoffzufuhr dem Zellreichtum und dem damit verbundenen Bedarf kaum gerecht werden kann (Rueter et al., 2003) (Boyle et al., 2003) (Teitelbaum & Ross, 2003) (Thomann et al., 2009) (Scharf et al., 2009).

Der Entzündungsphase folgt die Granulationsphase. In dieser Phase entsteht ein Konstrukt, in welchem sich Kollagenfibrillen und Fibrin in einem lichten Netz aus Lymphozyten, Fibroblasten, neu gebildetem Kollagen und Kapillaren befinden. Zwischen den Kollagenfibrillen lassen sich bereits jetzt Mineraldepots nachweisen. Parallel beginnt in dieser Phase der Abbau der abgestorbenen Fragmente durch Osteoklasten. Mesenchymale Vorläuferzellen entwickeln sich zu Chondroblasten, während subperiostal die direkte Knochenneubildung aus Osteoblasten einsetzt (desmale Ossifikation oder auch primäre Kallusreaktion). Am Ende dieser Phase sind die Knochenfragmente durch Bindegewebe und Knorpel locker miteinander verbunden. Der sogenannte weiche Kallus ist entstanden. Während die Granulationsphase des Menschen ungefähr 3 - 4 Wochen andauert, lässt sie sich bei der Maus bereits nach knapp 2 Wochen beobachten (Rueter et al., 2003) (Scharf et al., 2009) (Manigrasso & O'Connor, 2004).

Nachfolgend schließt sich die Phase der Kallushärtung an, die durch eine kräftige Mineralisation des Kallusgewebes gekennzeichnet ist. Das für die Mineralisation benötigte Calcium entstammt aus den Mitochondrien hypertrophierter Chondrozyten. Darüber hinaus kommt es zu einer frakturspaltfernen Proliferation der Osteoblasten und somit zu einer Ablagerung von Geflechtknochen zwischen Diaphysenoberfläche und Periost. Der im Rahmen der enchondralen Ossifikation entstehende Geflechtknochen bildet sich entlang der neuen Kapillarsprossen aus, anstatt den lamellären Belastungslinien zu folgen. In dieser Phase wird weicher Kallus in harten Kallus umgebaut. Sobald die Knochenfragmente fest miteinander verbunden sind, ist diese Phase abgeschlossen (Scharf et al., 2009) (Rueter et al., 2003).

Die letzte Phase des Modelings und Remodelings beginnt beim Menschen in der Regel 6 Wochen nach dem Trauma, dauert mehrere Wochen bis Monate an und umfasst allgemein den Knochenumbau. Sowohl für den Abbau des nekrotischen Knochens, als auch für den Umbau von mineralisiertem Knorpel in Knochen ist die bereits oben beschriebene BRU verantwortlich. Diese multizelluläre Grundeinheit besteht aus Zellen, Interzellulärschubstanz und Kapillaren und hat zeitabhängig verschiedene Aktivitäten und Fähigkeiten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Osteoklasten den kalzifizierten Knorpel resorbieren und Osteoblasten diesen Defekt mit Geflechtknochen ersetzen. Je nach mechanischer Belastung wandelt die BRU den Geflechtknochen abschließend in Lamellenknochen um. Als Remodeling bezeichnet man in diesem Zusammenhang die Wiederherstellung der ursprünglichen Knochenkontur und des ursprünglichen Markraums. Die sekundäre Frakturheilung ist nach dem Remodeling abgeschlossen (Scharf et al., 2009) (Rueter et al., 2003).

2.2.3. Einflussfaktoren auf die Frakturheilung

Die Knochenheilung wird durch mehrere Faktoren beeinflusst. Neben der Signaltransduktion spezieller Proteine sind noch diverse andere Faktoren wie z. B. die Nutrition oder biologische und physikalische Einflüsse relevant. Die Aufnahme und der Metabolismus von Vitaminen beeinflusst als nutritive Komponente die Frakturheilung. Es konnte gezeigt werden, dass ein verringerter Vitamin B₁₂-Spiegel mit einer reduzierten Knochendichte einhergeht (Tucker et al., 2005). Darüber hinaus gibt es physikalische Einflussfaktoren wie z. B. die mechanische Belastung, der Einfluss von Ultraschall oder elektromagnetischer Strahlung (Augat et al., 2005).

Das biochemische Milieu wird durch komplexe Interaktionen von Wachstumsfaktoren und Zytokinen beeinflusst. So haben vor allem angiogene Wachstumsfaktoren einen erheblichen

Einfluss auf die Knochenheilung. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Unterdrückung dieser angiogenen Substanzen die Frakturheilung erheblich beeinträchtigen, wohingegen deren Substitution die Bildung von neuem Knochengewebe begünstigt (Augat et al., 2005) (Geiger et al., 2005) (Hausman et al., 2001) (Holstein et al., 2008).

Insbesondere folgende angiogene Wachstumsfaktoren haben im Rahmen der Frakturheilung eine vorrangige Bedeutung (Carano & Filvaroff., 2003) (Geiger et al., 2005):

- *Vascular endothelial growth factor* (VEGF)
- *Fibroblast growth factor* (FGF)
- *Transforming growth factors* (TGF)- α und - β

VEGF konnte im Rahmen der sekundären Frakturheilung als ein Schlüsselmolekül der Angiogenese identifiziert werden (Brighton & Hunt, 1997) (Ferguson et al., 1999). Zudem wirkt es fördernd auf die Formierung und Mineralisation des neuen Knochens (Geiger et al., 2005). VEGF stellt somit ein elementares Bindeglied zwischen Angiogenese und Osteogenese im Rahmen der Knochenheilung dar (Carano & Filvaroff, 2003), (Street et al., 2002), (Peng et al., 2002).

VEGF wurde erstmals 1983 von Senger et al. unter dem Namen *vascular permeability factor* publiziert (Senger et al., 1983). Später wurde VEGF durch mehrere Arbeitsgruppen als einer der wichtigsten Wachstums- und Überlebensfaktoren des Gefäßendothels identifiziert (Ferrara & Henzel, 1989) (Gospodarowicz et al., 1989) (Tischer et al., 1989).

VEGF wird vor allem in der Entzündungsphase der sekundären Frakturheilung von Thrombozyten innerhalb des Frakturhämatoms sezerniert und fördert dadurch die Neovaskularisation des Frakturareals. Diese Neovaskularisation ist für die enchondrale Ossifikation einerseits von nutritiver Bedeutung, andererseits kommt es dadurch auch zur Einlagerung, Proliferation und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Fibroblasten, Chondroblasten und Osteoblasten. In dieser Phase produzieren auch die Entzündungszellen sowohl FGF (Baird et al., 1985), *platelet derived growth factor* (PDGF) (Shimokado et al., 1985), TGF- β (Saadeh et al., 1999) als auch Interleukin-1 und -6 (Einhorn et al., 1995). Hierdurch wird die Produktion von VEGF wiederum stimuliert, sodass es zu einer Verstärkung der Wirkung von VEGF kommt (Bolander, 1992) (Einhorn et al., 1995).

Chondroblasten und Osteoblasten sezernieren im reifen Zustand VEGF und stimulieren dadurch ihrerseits die umliegenden Zellen (Carlevaro et al., 2000). Obwohl in ruhenden und unreifen Knorpelzellen kaum VEGF produziert wird (Harper & Klagsbrun, 1999), nimmt die

VEGF-Produktion mit dem Grad der Chondrozytenhypertrophie zu. Parallel sprießen vom Knochen aus Blutgefäße in den Knorpel ein. Ferner wird durch Chondroklasten die Knorpelmatrix abgebaut, wodurch die Bildung von neuem Geflechtknochen begünstigt wird (Carlevaro et al., 2000) (Gerber et al., 1999) (Harper & Klagsbrun, 1999).

Abgesehen von o.g. Wachstumsfaktoren spielen auch andere osteogene Wachstumsfaktoren, eine entscheidende Rolle in der Frakturheilung:

Rodan und Martin stellten 1981 die Hypothese auf, dass die Osteoklastogenese einem bisher unbekanntem hormonellen Einfluss von Faktoren aus Osteoblasten bzw. mesenchymalen Stammzellen unterliegt (Rodan & Martin, 1981). 1997 beschrieben Simonet et al. ein Protein aus der Familie der Tumornekrosefaktoren, welches im Falle einer Überexpression in transgenen Mäusen zu einer Osteopetrose führte und als Osteoprotegerin (OPG) bezeichnet wird. Der Schweregrad der Osteopetrose korrelierte hierbei mit der Expression dieses Proteins und dessen RNA. Es konnte gezeigt werden, dass OPG *in vitro* die Differenzierung der Osteoklasten herunterreguliert und somit die Osteoklastogenese stört, weshalb OPG auch als *osteoclastogenesis inhibitory factor* (OCIF) bekannt ist. Darüber hinaus zeigten die Autoren, dass die systemische Applikation von rekombinanten OPG *in vivo*, zu einer Zunahme des Trabekelwerks führt und somit die Knochendichte erhöht (Simonet et al., 1997).

Durch Expressionsklonierung konnten sowohl Lacey et al., als auch Yasuda et al. den bis dato nicht bekannten Rezeptor für OPG nachweisen. OPG bindet den Rezeptor-aktivierten NF- κ B Liganden (RANKL). RANKL kann sowohl membranständig als auch gelöst vorliegen und wird von Osteoblasten bzw. mesenchymalen Stammzellen gebildet. RANKL findet sich vor allem im Knochenmark, in Lymphknoten, Thymusgewebe oder Zellen der Synovia und bindet an membranständigem Rezeptor-aktivierten NF- κ B (RANK) auf Osteoklastenvorläuferzellen, reifen Osteoklasten und dendritischen Zellen (Lacey et al., 1998) (Yasuda et al., 1998).

Im Rahmen der Osteoklastogenese dient die RANKL-/RANK-Achse als wichtige Signalkaskade um die Differenzierung der Osteoklastenvorläuferzelle zum Osteoklasten zu induzieren und somit den Knochenabbau einzuleiten. Die Bindung von RANKL durch OPG, als physiologischer Antagonist von RANK, inhibiert dementsprechend die Osteoklastogenese. (Boyce & Xing, 2007).

2.3. Frakturmodelle

In der Vergangenheit konnten zahlreiche Erkenntnisse über die Physiologie der Knochenheilung mit Hilfe klinischer Studien am Menschen sowie diversen *in vitro* Studien gewonnen werden. Trotzdem sind für die Untersuchung der Frakturheilung weiterhin tierexperimentelle Studien erforderlich. Sie bieten den Vorteil, das knöcherne *micro environnement* aufrecht zu erhalten und sind somit von essenzieller Bedeutung für die Forschung zur Knochenheilung.

In diesem Zusammenhang sind je nach Fragestellung der Studie, Frakturmodelle an Spezies unterschiedlicher Größe und Anatomie entwickelt worden. Hierbei muss jedoch die teilweise sehr unterschiedliche Biologie der Knochenheilung sowie die Anatomie der jeweiligen Spezies bei der Interpretation der Ergebnisse und der Translation beachtet werden (Rhineland, 1974) (Nunamaker, 1998).

Zwar bestehen zum Teil große Ähnlichkeiten im Genom der diversen in Tierversuchen verwendeten Spezies, jedoch werden deren Gene speziesabhängig unterschiedlich exprimiert. Vor allem für die Expression von Zytokinen sind solche Unterschiede von Bedeutung und sollten stets Beachtung finden (Nunamaker, 1998).

Abgesehen von anatomischen Verhältnissen, gilt es auch die unterschiedliche Verträglichkeit bzw. Response verschiedener Spezies auf die zu untersuchende Substanz zu beachten. Verschiedene Tierarten weisen zum Teil ein völlig unterschiedliches Verhalten in Hinblick auf das Metabolisierungspotenzial bestimmter Wirkstoffe auf. Es kommt zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Wirkung, was eine Anpassung der Dosis erfordert. Hier sei beispielsweise die toxische Wirkung von nichtsteroidalen Antiphlogistika auf Katzen und Hunde erwähnt (Herrgesell, 1967) (Jones et al., 1992) (Nunamaker, 1998).

Ein weiterer Faktor der die Knochenheilung beeinflusst, ist das Alter des Versuchstiers. Ein jüngerer und noch nicht ausgewachsener Knochen zeigt einen schnelleren Heilungsablauf als ein älterer, bereits ausgewachsener Knochen (Lu et al., 2005) (Rossant & Nagy 1995). Ein abgeschlossenes Wachstum kann durch den Verschluss der Epiphysenfuge im Röntgenbild festgestellt werden (Nunamaker et al., 1998).

2.3.1. Maus

Zur Untersuchung von physiologischen und pathologischen Prozessen während der Frakturheilung wurden diverse Tiermodelle an der Maus entwickelt. Während initial vorrangig

Großtiermodelle zur Untersuchung der Frakturheilung eingesetzt wurden, wurden in den letzten Jahren zunehmend mehr Kleintiermodelle entwickelt. Gründe hierfür sind unter anderem die geringen Anschaffungs-, Zucht-, und Haltungskosten. Hierdurch sind Studien mit großen Versuchsgruppen an der Spezies Maus sehr gut realisierbar. Des Weiteren ist das Genom der Maus vollständig entschlüsselt und keine andere Spezies weist ein derart großes Spektrum an unterschiedlichen transgenen Stämmen auf. Dies bietet insbesondere bei Studien mit molekularbiologischen und proteinbiochemischen Untersuchungen einen Vorteil gegenüber anderen Tierarten (Rossant & Nage, 1995).

Andererseits stellen die anatomischen Größenverhältnisse der Maus, für die praktische Durchführung, eine große Herausforderung dar. Mit einer Länge von etwa 15 mm und einem Durchmesser von knapp 2 mm erfordern sowohl die Frakturierung, als auch die osteosynthetische Versorgung ein hohes Maß an manuellen Fähigkeiten und operativem Geschick (Holstein et al., 2009).

Zudem zeigen kleine Nagetiere wie z. B. die Maus im Vergleich zum Menschen eine recht primitive Knochenstruktur. Da Mäusen das Havers-System fehlt, wird hier das Modeling und Remodeling im Rahmen der Knochenheilung über Resorptionshöhlen vermittelt, welche sich unmittelbar in der Nähe der Fraktur bilden und sukzessiv mit Osteoblasten ausgefüllt werden. Über die Relevanz dieser anatomischen Unterschiede im Hinblick auf die Frakturheilung liegen nur wenige Erkenntnisse vor (Nunamaker, 1998). Initial entwickelte Frakturmodelle an der Maus konzentrierten sich auf die Frakturheilung der Rippe, der Tibia sowie des Femurs (Hiltunen et al., 1993) (Bourque et al., 1992) (Nakase et al., 1994) (Manigrasso & O'Connor, 2004) (Holstein et al., 2007b) (Garcia et al., 2008).

Aufgrund der ungünstigen Anatomie sind Frakturmodelle an Rippen für biomechanische Testmethoden wenig geeignet und werden daher fast ausschließlich im Rahmen von Genexpressionsanalysen angewandt (Nakase et al., 1994) (Ito et al., 1999) (Yamagiwa et al., 1999). Im Gegensatz dazu werden für biomechanische Testungen vor allem die Tibia und das Femur benutzt. Für Studien an der Tibia ist einschränkend festzuhalten, dass diese im Vergleich zum Femur eine geringere Weichteildeckung und einen ungleichmäßigen Querschnitt hat (Cheung et al., 2003).

Bei Tibia- und Femurfrakturmodellen wird grundsätzlich zwischen einer offenen und einer geschlossenen Methode der Frakturierung unterschieden. Bei der geschlossenen Form wird durch eine stumpfe Guillotine ein standardisierter transverser Frakturverlauf unter minimalem Weichteilschaden induziert. Das ursprünglich von Bonnarens und Einhorn beschriebene

Modell wurde erstmals an der Ratte angewandt und erst 1993 von Hiltunen und Kollegen an der Tibia der Maus beschrieben (Bonnarens & Einhorn, 1984) (Hiltunen et al., 1993). Im Verlauf wurde das Modell von Manigrasso und O'Connor auf das Femur der Maus übertragen (Manigrasso & O'Connor, 2004). Im Gegensatz zur geschlossenen Frakturierung wird bei der offenen Methode die Frakturierung meist über einen longitudinalen, lateralen Zugang zum Knochen vorgenommen (Cheung et al., 2003) (Garcia et al., 2008).

Nach Induktion der Fraktur wird das Femur bzw. die Tibia nach einer definierten Standzeit explantiert, um die Knochenheilung mit Hilfe verschiedener analytischen Methoden untersuchen zu können. Hierzu werden unter anderem biomechanische, radiologische, histologische und proteinbiochemische Verfahren eingesetzt (Holstein et al., 2009).

Häufig wird die intramedulläre Pin-Stabilisierung zur osteosynthetischen Versorgung an der Maus eingesetzt. Bei diesem Modell ist jedoch die unzureichende Rotationsstabilität im Frakturbereich einschränkend zu berücksichtigen. Darüber hinaus ist aufgrund der schwierigen Reposition, die Frakturierung in der Regel erst nach vorheriger Implantateinbringung möglich (Holstein et al., 2009) (Manigrasso & O'Connor, 2004).

Cheung und Kollegen beschrieben erstmals 2003 eine Frakturversorgung an der Maus mittels Fixateur externe. Dieser ermöglicht eine suffiziente rotatorische Stabilität im Frakturspalt. Jedoch stellen das hohe Gewicht des externen Fixateurs, die damit verbundenen Veränderungen im physiologischen Bewegungsablauf sowie die aufwendige und schwierige Operationstechnik Nachteile dieser Methode dar. Des Weiteren müssen die Pins durch einen offenen Zugang eingebracht werden, was im Vergleich zur intramedullären Pin-Stabilisierung eine höhere Invasivität darstellt (Cheung et al., 2003).

Unsere Arbeitsgruppe entwickelte nachfolgend ein Modell mit Verriegelungsmarknagel, bei dem durch die Verwendung einer proximal und distal abgeflachten Spritzkanüle erstmals eine geschlossene, rotationsstabile Osteosynthese ermöglicht wurde und das *mechanical environment* innerhalb des Frakturspalts standardisiert wurde. Eine geschlossene Frakturierung ohne einliegendes Implantat im Mausmodell ist also möglich (Holstein et al., 2007b).

Zusätzlich wurde von unserer Arbeitsgruppe ein Osteosynthesemodell an der Maus entwickelt, das eine Axial- und Rotationsstabilität durch interfragmentäre Kompression ermöglicht. Dies wird durch das Einbringen einer sogenannten MouseScrew® ermöglicht. Hier erfolgt die Frakturierung ebenfalls ohne liegendes Implantat (Holstein et al., 2009b).

Histing und Kollegen führten 2009 ein weiteres Modell zur Knochenheilung an der Maus ein. Um eine intramembranöse Frakturheilung zu ermöglichen, wird dem Knochen von außen eine Platte angelegt und an beiden Fragmenten mittels Schrauben befestigt (LockingMousePlate®). Der Knochen kann dann im stabilisierten Bereich frakturiert werden. Bei dieser Methode wird die Implantation eines intramedullären Fremdkörpers vermieden.

2008 wurde von Garcia und Kollegen ein weiteres Modell entwickelt. Ähnlich dem Verriegelungsmarknagel-Modell wird zuerst eine Spritzkanüle von distal nach proximal in das Femur eingeführt. Danach wird in einem zweiten Schritt der Operation, das Femur von lateral freigelegt und ein Clip ventrodorsal im Femur verankert. Zwischen den Schenkeln des Clips kann dann ein unterschiedlich großer Spalt mit unterschiedlichen Heilungsverläufen induziert werden (Garcia et al., 2008) (Garcia et al., 2008b). Dieses Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit eingesetzt und wird genauer unter 3.1.7. erläutert.

2.3.2. Ratte

Im Gegensatz zur Maus sind Modelle an Ratten schon seit längerer Zeit als Tiermodelle für die Erforschung der Knochenheilung etabliert. Diverse Studien haben bisher Schädel, Femur, Tibia, Metatarsalia, Radius und Ulna als Frakturlokalisation benutzt. (Hietaniemi et al., 1995) (Utvag et al., 1994).

Im Vergleich zur Maus bietet die Ratte ein größeres Körpermaß, was sowohl das operative Handling als auch biomechanische Testungen vereinfacht.

Frakturmodelle an Rattenfemora und -tibiae sind durchaus mit denen der Maus vergleichbar, weshalb sich auch in der Vergangenheit bei Ratten stabile Fixationstechniken wie der Verriegelungsmarknagel oder der Fixateur externe gegenüber der instabilen Pin-Osteosynthesen etabliert haben (Willie et al., 2011) (Wingerter et al., 2007) (Bonnarens & Einhorn, 1984). Basierend auf den Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe mit Frakturmodellen an der Maus sowie aus ökonomischen Gründen, wählten wir für die vorliegende Arbeit jedoch ein Modell an der Maus.

2.3.3. Kaninchen

Modelle am Kaninchen werden ebenfalls für Studien zur Frakturheilung eingesetzt (Ashhurst et al., 1982) (Strong et al., 1992) (Stafford et al., 1994). Im Gegensatz zur Maus, die sich vor allem für molekularbiologische Untersuchungen eignet, dient das Kaninchen aufgrund seiner Größe vorrangig zur Untersuchung biophysikalischer Parameter. Die genannten

Osteosynthesetechniken (Fixateur externe, Platte und Verriegelungsmarknagel) kommen auch beim Kaninchen zum Einsatz (Danckwardt-Lilieström et al., 1970) (Brighton et al., 1985) (Kaplan et al., 1985) (Terjesen & Johnson, 1986) (Deibert et al., 1994).

Im Vergleich zu größeren Säugetieren wie z. B. Hund, Schaf, Ziege oder Pferd erlaubt das Kaninchen als Versuchstier die Anwendung höherer Dosen kostenintensiverer Substanzen. Des Weiteren halten sich auch die Kosten für Anschaffung, Zucht und Haltung im Gegensatz zu Großsäugern in einem überschaubaren Rahmen, sind jedoch im Vergleich zu Kleintieren wie der Maus noch deutlich höher (Critchlow et al., 1995).

2.3.4. Katze

Die langen Röhrenknochen der Katze, insbesondere das Femur, haben die Eigenschaft lang und gerade konfiguriert zu sein. Diese Konfiguration begünstigt das Einbringen von diversen Implantaten und hat dazu geführt, dass unterschiedliche Methoden der Frakturversorgung sowohl operativ als auch konservativ beschrieben wurden (Toombs et al., 1985).

Die Knochenbruchheilung der Katze wurde bisher in Forschungsarbeiten zur Frakturversorgung und im Rahmen größerer veterinärmedizinischer Studien untersucht (Henry et al., 1985) (Toombs et al., 1985) (Puech et al., 1990).

2.3.5. Hund

Aufgrund des großen veterinärmedizinischen Interesses wurde die Frakturheilung und deren biologische Abläufe am Hund im Detail untersucht (Johnson & Stein, 1988). Im Rahmen tierexperimenteller Studien sind bisher diverse Frakturmodelle mit unterschiedlichen Versorgungstechniken entwickelt worden. Man unterscheidet zwischen Modellen ohne Stabilisierung, sowie Modellen mit internen bzw. externen Stabilisierungen (Davy & Connolly, 1982) (Daum et al., 1983) (Lewallen et al., 1984) (Lenehan et al., 1985) (Black et al., 1985) (Chao et al., 1989) (Georgiadis et al., 1990) (Roush & Wilson, 1990) (Egger et al., 1993) (Peter et al., 1996).

2.3.6. Schaf

Das Schaf ist ein beliebtes Versuchstier und Modelle am Schaf werden vor allem für die Testung und Entwicklung neuer Human-Implantate eingesetzt. (Cheal et al., 1991) (Kirker Head et al., 1995) (Richardson & Nunamaker, 1991) (Steen et al., 1988) (Steen & Field, 1989). Die *Association for the Study of Internal Fixation* (ASIF) nutzte das Schaf für die Untersuchung

der Knochenbruchheilung unter Verwendung von Platten- bzw. Schraubenosteosynthesen. Dementsprechend ist die primäre Frakturheilung beim Schaf, deren Remodeling über das Havers-System abläuft, gut beschrieben (Perren et al., 1969) (Schenk & Willenegger, 1977) (Nunamaker & Perren, 1979) (Nunamaker, 1998).

Darüber hinaus stellt das Schaf ein geeignetes Versuchstier zur Untersuchung der sekundären Knochenheilung nach intramedullärer Stabilisierung dar. Aufgrund der frühen Belastung der behandelten Extremität wird ein erwünschter Kompressionseffekt auf die Fraktur erzeugt (Schemitsch et al., 1994) (Schemitsch et al., 1995) (Steen & Fjeld, 1989).

Aus ökonomischer Sicht sind die Kosten für Zucht und Haltung von Schafen als relativ hoch einzustufen. Daher sind Studien mit großen Gruppengrößen an dieser Spezies nur schwer durchführbar (Nunamaker, 1998).

2.3.7. Ziege

Die Ziege hat sich als Versuchstier zur Untersuchung der Knochenheilung bis dato nicht durchgesetzt (Curtis et al., 1995). Aufgrund des häufigen Auftretens von Pathologien des muskuloskeletalen Systems ist die Aussagekraft konventioneller Frakturheilungsstudien limitiert. Als Beispiel wird hierzu die infektiöse Ziegenarthritis erwähnt (Adams et al., 1983).

2.3.8. Pferd

Bedingt durch das hohe Körpergewicht und den damit verbundenen hohen Haltungs- und Zuchtkosten ist das Pferd als Versuchstier für Frakturheilungsstudien nicht geeignet. Aufgrund einer mangelnden Compliance ist es trotz hohem veterinärmedizinischem Aufwand oft nicht möglich, eine ausreichende Frakturheilung zu erzielen. Der Versuch einer osteosynthetischen Frakturversorgung am Pferd stellt technisch und veterinärmedizinisch eine enorme Herausforderung dar, sodass der Einsatz dieser Spezies als Versuchstier für tierexperimentelle Studien nicht gerechtfertigt ist (Nunamaker et al., 1991).

2.3.9. Primat

Phylogenetisch haben Primaten eine mit dem Menschen größtenteils vergleichbare Knochenstruktur. Hohe Kosten für Zucht und Haltung dieser Spezies, die Verfügbarkeit anderer Versuchstierarten und auch ethische Gründe sprechen jedoch gegen Studien an Primaten (Nunamaker, 1998).

2.4. Mikrovaskuläre Gefäßfragmente

Um die Knochenheilung zu verbessern und die Pseudarthrosenrate zu senken, wurden verschiedene Verfahren entwickelt. Der Goldstandard zur Behandlung von Pseudarthrosen ist nach wie vor die autologe Transplantation von Knochengewebe in den Pseudarthrosenspalt (Tang et al., 2012). Aufgrund möglicher Komplikationen dieses Verfahrens wie z. B. Schmerzen an der Entnahmestelle, Verletzungen umliegender Strukturen, Hämatombildung und die Gefahr eine Frakturbildung am Ort der Knochenentnahme, sind Alternativen notwendig (Myeroff & Archdeacon, 2011).

Da die Zellteilung und die Regeneration des Gewebes sehr von dessen Durchblutung abhängt, wurden mikrovaskuläre Gefäßfragmente (MVF) entwickelt, um die Vaskularisation an der Empfängerstelle zu verbessern (Laschke et al., 2015). MVF können beispielsweise aus Fettgewebe entnommen werden, sind reich an mesenchymalen Stammzellen und setzen pro-angiogene Wachstumsfaktoren frei (Laschke et al., 2012) (Laschke et al., 2015). Darüber hinaus besitzen sie die Eigenschaft sich schnell untereinander, aber auch mit den umliegenden Gefäßen zu verbinden um ein gut perfundiertes, mikrovaskuläres Netzwerk auszubilden (Laschke et al. 2015) (Shepherd et al., 2004).

Um MVF an der Empfängerstelle zu applizieren, im Falle der vorliegenden Arbeit in den Osteotomiespalt, bedarf es einer biokompatiblen Trägersubstanz. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir hierzu unten genanntes Hydrogel.

2.5. Thermoresponsives Hydrogel

2.5.1. Historie und Anwendungsgebiete

Der Entwicklung des thermoresponsiven Hyaluronsäure-poly(*N*-Isopropylacrylamid) Hydrogels (TRH) geht die Entdeckung des Acrylamids bzw. dessen Polymers, das Polyacrylamid, voraus. 1959 wurde von Raymond & Weintraub ein Gel auf Polyacrylamid-Basis entwickelt (Raymond & Weintraub, 1959) und später zur Elektrophorese eingesetzt (Davis et al., 1964) (Ornstein et al., 1964).

Aus Acrylamid wurde im Verlauf die Substanz Isopropylacrylamid entwickelt und als Polymer poly(*N*-Isopropylacrylamid) (PNIPAM) 1986 von Pelton und Chibante hergestellt (Pelton & Chibante, 1986). Seither ist PNIPAM eines der am häufigsten verwendeten thermosensiblen

Polymere auf Wasserbasis und ist im Verlauf durch chemische Modifizierungen weiterentwickelt worden (Pelton et al., 1986) (Takata et al., 2002).

Bisher wurde PNIPAM im Rahmen von Studien in verschiedenen Bereichen eingesetzt:

Zou et al. untersuchten 2011 die Effektivität von PNIPAM zur intravitrealen Medikamentenapplikation am Auge. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei den mit PNIPAM behandelten Ratten eine Senkung des Augeninnendruckes ohne histologische Veränderung an Cornea, Iris oder Retina möglich war (Zou et al., 2011).

Darüber hinaus wurden diverse Studien zu PNIPAM als Trägersubstanz für Medikamente durchgeführt. Das von Serres et al. und Ramkisson-Ganorkar et al. hergestellte Konjugat aus PNIPAM, Butylmethacrylat (BMA) und Acrylsäure (AAc) (PNIPAM-co-BMA-co-AAC) wurde als Trägermedium für Calcitonin verwendet und deren Verhalten bzw. Abgabefähigkeit im Gastrointestinaltrakt untersucht (Serres et al., 1996) (Ramkisson-Ganorkar et al., 1999). Kim et al. untersuchte darüber hinaus die Wirkung von PNIPAM als Trägermedium für Insulin (Kim et al., 1994).

2001 wurde erstmals Hyaluronsäure (HA) an PNIPAM gekoppelt. 2005 wurde das HA-konjugierte PNIPAM von der Arbeitsgruppe Ohya an Ratten im Rahmen einer chirurgischen Adhäsionsprophylaxe untersucht. Es zeigte sich, dass nach Appendektomie Verwachsungen durch die Behandlung mit HA-Hydrogel signifikant reduziert werden konnten (Ohya et al., 2001) (Ohya et al., 2005). Hierbei kam es jedoch wiederholt zu einer zu hohen Polydispersität bei der Herstellung des Hydrogels.

Das Herstellungsverfahren für TRH konnte 2010 durch Mortisen et al. am AO Research Institute in Davos optimiert werden, sodass die physikochemischen Eigenschaften des Konjugats wie z.B. die Thermosensibilität das Hydrogel für weitere *tissue engineering* Studien verfügbar machten (Mortisen et al., 2010).

Im Rahmen des *tissue engineering* wurde TRH mehrfach angewandt. 2012 konnten Peroglio et al. in vitro die Eignung des Hydrogels als injizierbares Trägermedium für Nucleus pulposus Zellen bestätigen und zeigten, dass hierdurch die Bildung von EZM unterstützt wird (Peroglio et al., 2012). Darüber hinaus konnten Peroglio et al. die Überlegenheit von TRH im Vergleich zu dem konventionellen Trägermaterial Alginat für humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) zeigen. Es konnte gezeigt werden, dass TRH ohne Einsatz von anderen Wachstumsfaktoren die Differenzierung der hMSC fördert (Peroglio et al., 2013). TRH wurde auch bereits in vivo eingesetzt. Peattie et al. konnten nachweisen, dass die TRH-vermittelte

Applikation von VEGF eine höhere Gefäßdicke erzeugt als die Applikation von VEGF allein (Peattie et al., 2004).

2.5.2. Struktur und Biosynthese

TRH besteht aus unterschiedlichen Grundsubstanzen. Es handelt sich um ein Polymer aus an 38×10^3 g/mol N-Isopropylacrylamid gekoppelten HA-Bausteinen. Für die thermoresponsiven Eigenschaften des Moleküls ist vor allem die in Abbildung (Abb.) 1 dargestellte PNIPAM Einheit verantwortlich (Pelton et al., 1986) (Ohya et al., 2001) (Mortisen et al., 2010).

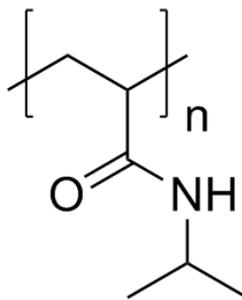


Abb.1: Strukturformel von PNIPAM (Ohya et al., 2001)

Die Biosynthese des TRH beruht auf dem etablierten Verfahren der *Reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization* (RAFT) und der *Copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*.

Hierbei wird zunächst aus Natrium-HA das wasserlösliche HA-Propargylamin mittels *Streptococcus equi* hergestellt. Parallel wird ein aminoterminales poly(*N*₃-isopropylacrylamid) (*N*₃-PNIPAM) hergestellt. Aus beiden Edukten HA-Propargylamin und *N*₃-PNIPAM entsteht in einer Kupfersulfat-katalysierten Reaktion das Endprodukt thermoresponsives HA-Hydrogel (Abb. 2). Die Polymerlösung wird im Anschluss sterilisiert und lyophilisiert.

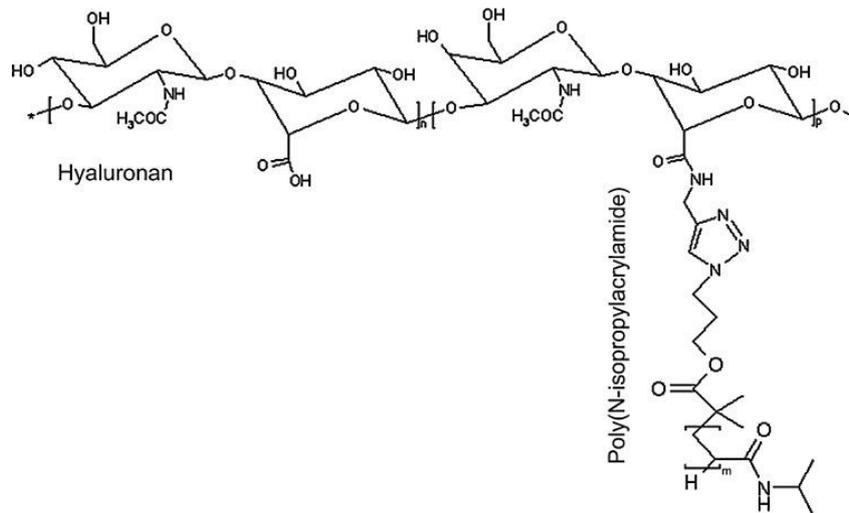


Abb.2: Strukturformel von HA-PNIPAM (Peroglio et al., 2012)

Das HA-Hydrogel weist besondere physikalische und chemische Eigenschaften auf:

Die Haupteigenschaft des TRH ist die Fähigkeit temperaturabhängig den Aggregatzustand zu ändern. Bei Raumtemperatur (RT) ist das Hydrogel flüssig und lässt sich homogen mit den entsprechenden Wirkstoffen wie z.B. Zellen oder Wachstumsfaktoren beladen. Die Temperatur, bei der sich der Zustand des Gels verändert, wird auch als kritische Lösungstemperatur (LCST). Die LCST ist vor allem von der Polymerlänge bzw. deren molekularer Konfiguration abhängig. Je nach Kettenlänge, Konfiguration und dementsprechend auch je nach Molekulargewicht wird das TRH in 3 Untergruppen (A, B, C) aufgeteilt. Die LCST liegt bei den meisten eingesetzten Hydrogelen bei ungefähr 32 °C. Setzt man nun das flüssige TRH einer Wärmeexposition oberhalb der LCST aus, so wechselt es unmittelbar in einen festen Aggregatzustand. Das PNIPAM beginnt bei höheren Temperaturen das Wasser auszustoßen, zieht sich zusammen und bildet dadurch hydrophobe Bereiche aus. Aus chemischer Sicht finden sich hierbei Ähnlichkeiten mit der Bildung einer Mizelle. Die initial hydrophile Substanz wandelt sich also zu einer nach außen hin hydrophoben Substanz um. Der innere Kern bleibt hierbei jedoch hydrophil und enthält dann die entsprechenden Wirkstoffe (Ohya et al., 2001) (Mortisen et al., 2010) (Peroglio et al., 2012).

Darüber hinaus ist der Wechsel des Aggregatzustands reversibel. Dies ist insbesondere für die Applikation der Wirkstoffe am Zielort notwendig und macht das TRH zu einer geeigneten Trägersubstanz für Versuche im Bereich der regenerativen Medizin.

Des Weiteren finden spezielle TRHs wie z. B. TRH B25 und TRH B30 Verwendung, die im Gegensatz zu anderen Hydrogelen, beim Wechsel des Aggregatzustands, ihr Volumen praktisch nicht verändern. Dies kann in Abhängigkeit vom Wirkort und dessen anatomischen Beschaffenheiten von Bedeutung sein. Eine Schwellung bzw. eine Schrumpfung könnte wichtige anatomische Strukturen verlagern oder gar die Wirkung bzw. die Heilung an der Stelle des Geschehens beeinträchtigen (Ohya et al., 2001) (Mortisen et al., 2010) (Peroglio et al., 2012). Für die vorliegende Studie wurde ein thermoresponsives HA-Hydrogel ohne Veränderung des Volumens verwendet, um dem definierten Frakturspalt und dessen Gegebenheiten gerecht zu werden.

2.5.3. Andere thermoresponsive Polymere

Neben der Klasse der poly(*N*-Alkylamide), zu der auch das hier verwendete TRH gehört, gibt es noch weitere Klassen von thermosensitiven Polymeren (Schmaljohann et al., 2006) wie z. B. poly(Methylvinylether), poly(*N*-Vinylcaprolactam) und poly(*N*-Ethyloxazoline), welche jedoch aufgrund physikalischer und chemischer Eigenschaften (strukturelle Instabilität, Temperatursensitivität) nicht für unsere Studie geeignet sind (Sugihara et al., 2012) (Mikheeva et al., 1998) (Rueda et al., 2005).

2.6. Zielsetzung

Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, zu untersuchen ob das TRH als Trägersubstanz für MVF geeignet ist und ob MVF die Vaskularisation und Frakturheilung verbessert.

Die entsprechenden Informationen sollten durch Versuche *in vitro* und *in vivo* an der Maus nach einem bewährten Tiermodell gewonnen werden.

2.7. Fragestellung

Trotz des rasch fortschreitenden Wissens in der Anwendung moderner *tissue engineering*-Verfahren war bisher nicht bekannt, ob TRH für die genannten Gefäßfragmente geeignet ist und inwieweit die Frakturheilung hierbei beeinflusst werden kann.

Die durchgeführten tierexperimentellen Studien sollten die Frage beantworten, ob das TRH als Trägermedium für MVF geeignet ist. Anschließend sollte die Frage geklärt werden, inwieweit

ein Unterschied zwischen der Frakturheilung unter lokaler Behandlung mit MVF-beladenem TRH gegenüber der Frakturheilung unter Behandlung mit unbeladenem TRH bzw. ohne entsprechende Behandlung besteht.

Die Nullhypothese lautet:

„(I) Das TRH ist keine geeignete Trägersubstanz für MVF und (II) MVF (Verum) verändert nicht die Vaskularisation und Frakturheilung im Vergleich zu unbehandelten Frakturen (Kontrollen).“

Die Knochenbruchheilung wurde nach 14 und 35 Tagen mit radiologischen, histologischen und proteinbiochemischen Methoden am postmortalen Knochen-Explantat untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Intervention

3.1.1. Versuchsprotokoll

Die Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde (Dezernat 5, Saarpfalz-Kreis, 66424 Homburg (Saar)) unter dem Versuchsvorhaben VV 40/2013 genehmigt und am Institut für Klinische & Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg (Saar) nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

In einem ersten Teil der Arbeit sollte die Wirkung von TRH auf MVF analysiert werden. Mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen wurde die Morphologie und Viabilität der Gefäßfragmente nach Einbettung in TRH im Vergleich zu nicht eingebetteten, freien Gefäßfragmenten zu unterschiedlichen Zeitpunkten verglichen. Hierzu wurden insgesamt 12 männliche CD-1 Mäuse verwendet.

	Kontrolle	TRH+MVF
Tag 0	n = 4	n = 4
Tag 3	n = 4	n = 4
Tag 7	n = 4	n = 4

Tab.1: Versuchsprotokoll in vitro Studie

In einem zweiten Teil der Arbeit wurde standardisiert eine Frakturheilung in einem Mausmodell induziert (Garcia et al., 2008). Der Gruppe TRH+MVF wurde MVF-beladenes TRH in den Osteotomiespalt appliziert, der Gruppe TRH wurde unbeladenes TRH in den Osteotomiespalt appliziert und die Kontrolle erhielt keine Applikation (Tabelle 2). Hierzu wurden insgesamt 114 CD-1 Mäuse verwendet.

	14 Tage			35 Tage		
	Kontrolle	TRH	TRH + MVF	Kontrolle	TRH	TRH + MVF
Radiologie	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8
Histologie und Histomorphometrie	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8
Biomechanik	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8
Western Blot	n = 3	n = 3	n = 3			

Tab.2: Versuchsprotokoll in vivo Studie. Die Auswertung erfolgte mittels Mikrocomputertomographie (s.u.), Histomorphometrie, Biomechanik, Western Blot und Immunhistochemie. Proben konnten für Analysen zu Microcomputertomographie, Histomorphometrie, Immunhistochemie und Biomechanik wiederverwendet werden.

3.1.2. Versuchstiere

Sowohl für die Isolation der MVF als auch das Frakturmodell wurden ausgewachsene CD-1 Mäuse mit einem Körpergewicht von 30 - 40 g verwendet. Die Haltung der Mäuse erfolgte im Institut für Klinische & Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg (Saar) unter klimatisierten Raumbedingungen (Lufttemperatur: 22 - 24 °C, relative Luftfeuchtigkeit 60 %) bei 12-stündigem Tag- / Nachtrhythmus. Wasser sowie Standarddiätfutter in Pelletform (Altromin 1320, Altromin, Lage, Deutschland) wurden ad libitum bereitgestellt.

3.1.3. Isolation von MVF

MVF wurden aus epididymalem Fettgewebe männlicher CD-1 Mäuse isoliert (Laschke et al., 2012). Hierzu erfolgte die intraperitoneale Injektion einer Narkotisierung aus Ketamin (75 mg/kg Körpergewicht; Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) und Xylazin (25 mg/kg Körpergewicht; Rompun; Bayer, Leverkusen, Deutschland) Phenobarbital. Nach Rasur der Bauch- und Leistenregion, sowie Überprüfung der korrekten Narkosetiefe, wurde die Maus in Rückenlage auf einem Korkuntergrund gelagert. Nach Desinfektion des OP-Gebietes wurde unter sterilen Kautelen eine mediane Laparotomie mit anschließender Y-förmiger Inguinotomie durchgeführt. Die beiden Bauchwandlappen wurden jeweils mittels einer Spritzkanüle ($\varnothing = 0,55$ mm) auf den Korkuntergrund fixiert und somit das Abdomen offen gehalten. Mit einer anatomischen Pinzette wurde das Nebenhodenfettgewebe gefasst und mit einer gebogenen Schere streng am Samenstrang abgetrennt. Das explantierte Fettgewebe wurde zunächst in

Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gespült und unmittelbar anschließend in eine Petrischale mit 10 % Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; 10 % fetales Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin; PAA, Cölbe, Deutschland) überführt.

Die weitere Gefäßisolation erfolgte unter einer Sterilbank (ScanLaf, Lyngø, Dänemark). In einem ersten Schritt wurde das entnommene Fettgewebe mit Hilfe einer chirurgischen Pinzette in 3 Spülgängen mit PBS von Blut und Lymphflüssigkeit befreit. Hiernach wurden die Gewebestücke gewogen und anschließend mittels spitzer, steriler Mikroschere in einem Rundbodenröhrchen homogenisiert.

Das homogenisierte Fettgewebe wurde daraufhin in einen 50 ml Erlenmeyerkolben umgefüllt und mit der im Verhältnis zum Fettgewebe doppelten Menge an 10 % NB4G Kollagenase (0,5 U/ml; Serva, Heidelberg, Deutschland) versetzt. Das Gemisch wurde daraufhin unter konstantem Rühren im Brutschrank (Binder, Tuttlingen, Deutschland) bei 37 °C in einer feuchten Umgebung mit 5 % CO₂ für 5 - 7 Minuten behandelt. Nach Neutralisation der Kollagenase mittels PBS inkl. 20 % FKS wurde das Gemisch gleichmäßig auf mehrere Rundbodenröhrchen aufgeteilt und unter kontrollierten Bedingungen im Brutschrank (Binder) bei 37 °C und 5 % CO₂ für 5 Minuten sedimentiert. Nachfolgend konnte das freie Fettgewebe als Überstand abpipettiert werden. Diese Sedimentation wurde 3 - 5 mal wiederholt, bis das Fett makroskopisch vollständig entfernt war.

Im Anschluss wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 500 U/min zentrifugiert. Abschließend konnte der Überstand vorsichtig abpipettiert werden, sodass das Pellet mit Gefäßfragmente isoliert war und zur weiteren Kultivierung verarbeitet werden konnte.

3.1.4. Präparation von TRH

Die Synthese des TRH erfolgte gemäß den unter 2.5.2 gemachten Angaben durch die Kollegen im AO Research Institute in Davos, Schweiz.

Zur weiteren Verwendung wurde das sterile, vliesartige Hydrogelpolymer als 10 %ige Lösung mit PBS angesetzt und zunächst bei 4 °C aufbewahrt. In einer Pilotstudie der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine 10 %ige Lösung den besten Kompromiss zwischen einer ausreichenden Gelstabilität und Viskosität einerseits und dem intraoperativen Handling andererseits bietet. Schwächere Konzentrationen waren weniger viskos und zeigten nach Erwärmung und Änderung in einen festen Aggregatzustand, ein instabileres Konstrukt, am ehesten aufgrund einer ungenügenden Verbindung der HA-Ketten (die Viskosität des PNIPAMs ist proportional zu dessen Kettenlänge). Höhere Konzentrationen des Gels waren

aufgrund der Viskosität der Lösung nicht gut über eine Pipette applikabel und somit nicht für die vorliegende Studie geeignet.

3.1.5. Kultivierung von MVF

Zur weiteren Analyse hinsichtlich Morphologie und Viabilität der Gefäßfragmente wurden Proben generiert, die MVF einer halben Spendermaus beinhalteten (n = 24). Gemäß den Angaben in Tabelle 1 wurde in der Gruppe TRH+MVF (n = 12) MVF mit 10 µl flüssigem Hydrogel bei RT gemischt. Das beladene Hydrogel wurde dann in eine vorgewärmte Well-Platte mit Endothelzell-Wachstumsmedium (ECWM) MV (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) gegeben. Hierbei entstanden solide, kugelförmige Proben aus MVF-beladenem TRH. Die Proben wurden dann in einer feuchten Umgebung mit 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert. In der Kontrollgruppe (n = 12) wurden die Gefäßfragmente direkt nach Isolation in vorgewärmtes ECWM ohne Einbettung in TRH überführt. Das Endothelzellmedium wurde während des Kultivierungszeitraums alle 48 Stunden ausgetauscht.

3.1.6. Morphologie und Viabilität kultivierter MVF

Nach Ablauf des oben genannten jeweiligen Kultivierungszeitraums, wurden die Proben bei 37 °C von dem Nährmedium in ein 2 %iges Agarosegel mit einem Schmelzpunkt von unter 37 °C (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) gegeben. Nach Aushärten bei RT wurden die Proben zur weiteren Analyse in ein 2 %iges Agarosegel mit hohem Schmelzpunkt (Sigma-Aldrich) transferiert und dann mit 4 %igem gepuffertem Formalin fixiert.

Durch den Einsatz der Agarosegele mit unterschiedlichen Schmelzpunkten konnte einerseits einem Methoden-bedingten Hitzeschaden vorgebeugt werden. Andererseits erlaubte die spätere Einbettung in Agarosegel mit hohem Schmelzpunkt, die weitere immunhistochemische Färbung ohne Verlust von Probenmaterial.

Im Anschluss wurden alle Proben in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Hierzu wurden die Proben in einem ersten Schritt mit Bisbenzimid (Hoechst 33342; 1:500; Sigma-Aldrich) gefärbt. Bei dieser Substanz handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, welcher bevorzugt zur Anfärbung des nukleären Chromatins dient. Es wurden somit alle Zellkerne innerhalb der Probe angefärbt.

In einem zweiten Schritt erfolgte in allen Proben die Markierung von Endothelzellen. Mit einem monoklonalen Ratte-anti-Maus Primärantikörper gegen das Endothelzell-Oberflächenprotein CD31 (1:30; Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) wurden die Gefäßzellen markiert.

Hierdurch konnte bei der Auswertung zwischen Endothelzellen und perivaskulären Zellen unterschieden werden.

Anschließend wurden die gefärbten Proben jeweils mit spezifischen Antikörpern für das Apoptoseverhalten und für den Reifezustand der Endothelien untersucht.

Mittels Färbung gegen gespaltene Caspase-3 (Casp-3) konnte das Apoptose-Verhalten von Endothelzellen und perivaskulären Zellen analysiert werden. Hierzu wurden die Proben mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-Maus Antikörper gegen gespaltene Casp-3 (1:50; Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) markiert.

Mittels α -smooth muscle actin (α -SMA) Färbung wurden die gefärbten Gefäßfragmente mit einem Kaninchen-anti-Maus Primärantikörper gegen α -SMA markiert (1:100; Abcam, Cambridge, Großbritannien), um die Ausbildung einer Gefäß-stabilisierenden perivaskulären Schicht zu detektieren.

Als Sekundärantikörper für die immunhistochemischen Färbungen diente ein Ziege-anti-Ratte Cy3 Antikörper (1:50; Dianova GmbH) sowie ein Ziege-anti-Kaninchen Alexa 488 Antikörper (1:100; Invitrogen, Darmstadt, Deutschland).

3.1.7. Tiermodell und Applikation von TRH und MVF

Alle Operationen an Versuchstieren für den tierexperimentellen Teil der Arbeit wurden in standardisierter Weise im Operationssaal des Instituts für Klinische & Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg (Saar) durchgeführt.

In der aktuellen Studie kam ein standardisiertes Frakturmodell an der Maus zum Einsatz (Garcia et al., 2008). Hierzu wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin (75 mg/kg Körpergewicht, Pharmacia GmbH) und Xylazin (2 mg/kg Körpergewicht; Rompun, Bayer) narkotisiert. Darüber hinaus erhielten alle Tiere am Operationstag und am ersten postoperativen Tag zur Analgesie 0,05 ml Carprofen® subcutan.

Nach Überprüfung der Narkosetiefe wurde das rechte Bein sowie der rechte Hüftbereich enthaart und die Haut mit Softasept® desinfiziert.

Mit Hilfe des Operationsmikroskops (6-fache Vergrößerung) wurde eine ca. 4 mm lange Hautinzision medial der Patella durchgeführt. Nach dem Hautschnitt wurde die Kniegelenkscapsel eröffnet und die Patella nach lateral luxiert. Mit einer Kanüle ($\varnothing = 0,45$ mm) wurde über der Fossa intercondylaris die Eröffnungsstelle des Markraums markiert. Im

Anschluss wurde der Markraum über der Markierung mit einem Mikrobohrer ($\varnothing = 0,5$ mm; 8000 U/min) eröffnet. Mit o.g. Kanüle wurde der Markraum ausgemessen und die Länge auf eine weitere Kanüle ($\varnothing = 0,55$ mm) übertragen. Letztere wurde dann über eine Strecke von ca. 8 mm proximal und distal abgeflacht. Die abgeflachte Kanüle wurde anschließend über den Bohrkanal in den eröffneten Markraum bis in das proximale Ende des Femurs eingebracht und nach radiologischer Kontrolle (Faxitron® MX-20 Cabinet X-ray System, Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, USA) der Implantatlage, am Eingang des Bohrkansls gekürzt, sodass der Pin vollständig im Knochen versenkt wurde.

Nachfolgend wurde die Maus auf die linke Seite gelagert und der rechte Oberschenkel durch eine ca. 5 mm lange Hautinzision lateral eröffnet. Die lateralen Muskelanteile wurden vorsichtig nach ventral und dorsal verlagert.

Das Femur wurde nun distal, etwa am Übergang zwischen mittlerem zu distalem Drittel des Schafts mit einem Mikrobohrer ($\varnothing = 0,5$ mm; 8000 U/min) lateral des Pins und medial der lateralen Corticalis an 2 Stellen durchbohrt. Eine U-förmige Kanüle ($\varnothing = 0,45$ mm) wurde nach vorherigem Ausmessen über die Bohrlöcher eingebracht. Nachfolgend wurden die beiden Schenkel des Clips dorsal nach innen umgebogen, um eine sekundäre Dislokation des Clips zu vermeiden. Mittels einer Gigli-Säge ($\varnothing = 0,25$ mm) wurde ein 0,25 mm großer Osteotomiespalt zirkulär um den Pin herum induziert. Nach erneuter radiologischer Kontrolle wurde das Operationsfeld mit einer 0,9 %igen Natriumchlorid-Lösung ausgespült und abgetupft. Das weitere Vorgehen war abhängig von dem in Tabelle 2 gezeigten Protokoll.

Die TRH+MVF Gruppe (n = 19) erhielt 10 μ l des mit MVF beladenen TRH durch eine direkte Injektion des Gemischs in den Osteotomiespalt. Das TRH enthielt hierbei MVF einer Spendermaus. Um den Wechsel des Aggregatzustands des TRH zu ermöglichen, wurde der Operationssitus wenige Minuten vor Applikation des Hydrogels mit einer Wärmelampe vorgewärmt. Die Temperatur im Situs wurde mittels Thermometer kontrolliert. Sobald die Temperatur über 33 °C betrug, erfolgte die Applikation der in TRH eingebetteten MVF (n = 19). Die Applikation des unbeladenen Hydrogels in der Gruppe TRH (n = 19) erfolgte unter analogen Bedingungen. Die Tiere der Kontrollgruppe (n = 19) erhielten weder TRH noch MVF.

Abschließend erfolgte bei allen Tieren eine adaptierende Muskel- und Hautnaht mit 5-0 Prolene®, sowie ein Röntgenbild zur Lagekontrolle der Implantate (Faxitron® MX-20 Cabinet X-ray System).



Abb.3: Fixierung des Beines während der Operation



Abb.4: Sicht auf das Ligamentum patellae nach medio-patellarem Zugang



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



Abb.6: Markraumeröffnung im Bereich der Fossa intercondylaris



Abb.7: Sondierung des Markraumes und Vermessung der Markraumlänge mit einer Kanüle ($\varnothing = 0,45 \text{ mm}$)



Abb.8: Einbringung und anschließende Kürzung an der zuvor angebrachten Längenmarkierung einer proximal und distal abgeflachten Kanüle ($\varnothing = 0,55 \text{ mm}$)



Abb.9: Reposition der Patella mit Naht der Patellarsehne sowie anschließender Hautnaht mit 5-0 Prolene®



Abb.10: Eröffnung des lateralen Zugangswegs sowie anschließende stumpfe Freilegung des Femurs

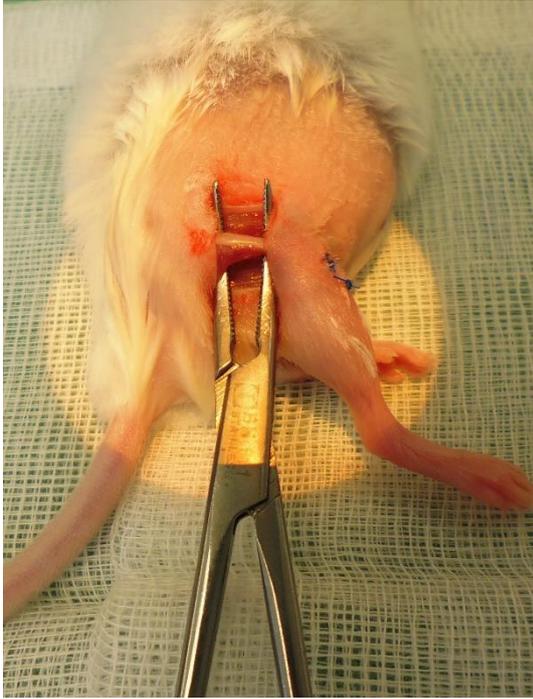


Abb.11: Eröffnen des Situs zur Implantation des Clips über lateralen Zugang



Abb.12: Bohrung der Bohrlöcher zur Implantation des Clips



Abb.13: Einbringung des zuvor auf die Distanz der Bohrlöcher angepassten Clips



Abb.14: Vollständige Clip-Implantation und anschließend Biegung der dorsalen Enden nach innen zur Sicherung der Implantatlage



Abb.15: Osteotomie mittels Gigli-Säge (Drahtstärke 0,25 mm)

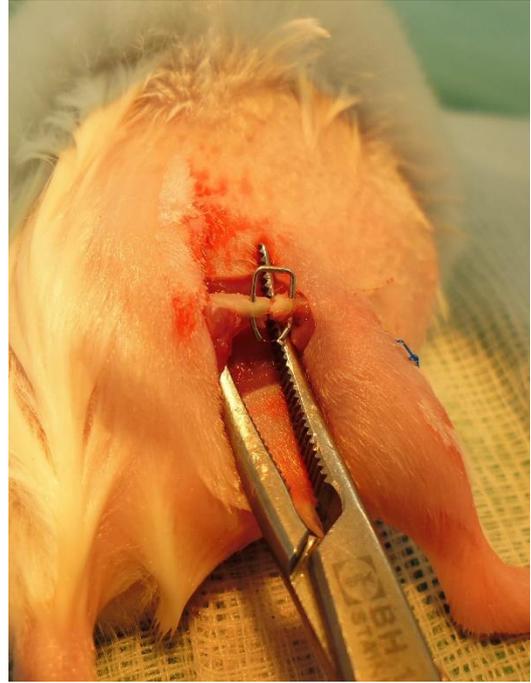


Abb.16: Spülung und Trocknung des Osteotomiespalts



Abb.17: Applikation von 10 μ l Verum (TRH bzw. TRH+MVF)

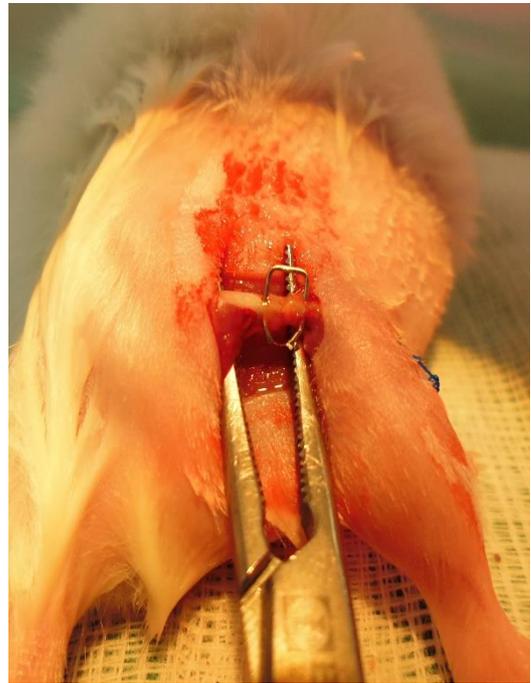


Abb.18: Aushärtung des Hydrogels unter einer Wärmelampe bei einer Temperatur im Situs von > 33 °C



Abb.19: Adaptierende Muskelnäht mit 5-0 Prolene® unter der Wärmelampe



Abb.20: Abschließende Hautnäht mit 5-0 Prolene® und OP Ende

3.1.8. Tötung der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden 14 bzw. 35 Tage postoperativ mittels einer Überdosis Phenobarbital getötet.

3.1.9. Präparation des Knochens

Unmittelbar im Anschluss an die Tötung erfolgte die Explantation und Präparation des operierten Femurs. Hierzu wurde nach Hautschnitt an der Oberschenkelinnenseite das Femur sowohl im Hüft- als auch im Kniegelenk exartikuliert und der umliegende Weichteilmantel reseziert. Nach Explantation des Femurs erfolgte die Metallentfernung. Zuerst wurde die distale Epiphyse des Femurs vorsichtig reseziert, um unter Schonung des Knochendefektareals den Pin vorsichtig zu entfernen. Anschließend wurde der Clip nach Kürzen der Schenkel vorsichtig entfernt. Die Femora für die biomechanische, histologische und radiologische Auswertung wurden anschließend in 4 %igem gepuffertem Formalin für die weiteren Untersuchungen kryokonserviert. Bei Femora für die Western Blot Analyse wurde das Kallusgewebe nach kallus Schonender Implantatentfernung und vor Tötung der Tiere entnommen. Die Kallusproben bestanden dementsprechend aus Knochen-, Knorpel- und Bindegewebe. Die Proben wurden

nach Explantation bei - 80 °C in einem Lyse-Puffer mit Proteaseinhibitoren konserviert, um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern.

3.2. Zielkriterien und Auswertung

3.2.1. Morphologie und Viabilität von MVF

Proben mit TRH-inkorporierten MVF sowie Kontrollen wurden unmittelbar nach Isolation, sowie 3 bzw. 7 Tage nach Kultivierung gemäß Tabelle 1 hinsichtlich Morphologie und Viabilität untersucht. Die immunhistochemischen Schnitte wurden mit Hilfe des BX 60 Mikroskops (Olympus, Tokio, Japan) unter Fluoreszenzfiltern untersucht und digitalisiert. Es wurden alle Casp-3-positiven (Casp-3+) Zellen gezählt. Im Anschluss wurde der relative Anteil positiver Zellen unter Berücksichtigung der Unterscheidung von Endothelzellen und perivaskulären Zellen bestimmt. Bei der α -SMA-Färbung wurden alle positiven Gefäßfragmente gezählt und das relative Verhältnis an α -SMA-positiven (α -SMA+) Fragmenten bestimmt.

3.2.2. Radiologie

3.2.2.1. Röntgen

Unmittelbar vor Tötung der Versuchstiere erfolgte in den Räumlichkeiten des Instituts für Klinische & Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg (Saar) eine röntgenologische Untersuchung. Hierzu wurden seitliche Röntgenaufnahmen der operierten Femora angefertigt (Faxitron® MX-20 Cabinet X-ray System).

Es wurde eine Belichtungszeit von 0,01 s bei einer Stromstärke von 10 A und einer Spannung von 35 kV gewählt. Die Aufnahmen wurden mit der eingebauten Kamera und einer Auflösung zwischen 10 lp/mm bis 50 lp/mm aufgenommen und digitalisiert.

Die Auswertung der Röntgenbilder erfolgte anhand folgender Kriterien:

- Implantatlage
- Knochenstellung
- Knöcherne Durchbauung

3.2.2.2. Mikrocomputertomographie

Die mikrocomputertomographischen Untersuchungen fanden in den Räumlichkeiten des Instituts für Klinische & Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg (Saar) statt.

Die nach der konventionellen Röntgenuntersuchung in einer 4 % gepufferten Formalinlösung kryokonservierten Femora wurden vor der Mikrocomputertomographie (μ CT)-Untersuchung aufgetaut.

Die μ CT-Untersuchungen wurden mit dem Gerät SkyScan 1172 (Bruker, Billerica, USA) durchgeführt. Dabei wurde ein Kathodenstrom von 200 μ A, eine Beschleunigungsspannung von 50 kV und ein 0,5 mm dicker Aluminiumfilter als Eigenschaften für die Untersuchung festgelegt. Zur Untersuchung stand die Längsachse des Femurs senkrecht zur Achse des Röntgenstrahls.

In einem weiteren Schritt wurden die zweidimensionalen (2D) Bilder mit einer Rekonstruktions-Software (SkyScan, NRecon package) zu den jeweiligen Transversalschnitten der Femora rekonstruiert um die Analyse des Kallusgewebes und dessen Volumen zu ermöglichen. Dieser Vorgang wurde mit Hilfe einer digitalen Bildverstärkung und unter Verwendung einer automatisierten Ringartefakt-Reduktion optimiert. Nach der Rekonstruktion wurde die zu untersuchende Region, also der neu gebildete Kallus, markiert und als sogenannte *region of interest* (ROI) definiert. Sie wurde mittels des Analyse-Programms CT-Analyzer (Bruker) manuell auf den jeweiligen Schnitten markiert und qualitativ mit histologischen Schnitten und anderen Vorarbeiten verglichen (Orth et al., 2017) (Bosemark et al., 2013).

Mit Hilfe der o.g. Analysetechnik wurden folgende Zielparameter zur Beurteilung des Knochendefekts berechnet:

- Knochenvolumen von mineralisiertem Knochengewebe im Osteotomiespalt
- Knochendichte von mineralisiertem Knochengewebe im Osteotomiespalt

Um zwischen Knochengewebe und anderen Gewebearten bzw. MCM innerhalb der ROI zu unterscheiden, wurde die ROI basierend auf dem Histogramm aller Grauwerte unterteilt. Gemäß Herstellerangaben wurde unter Verwendung eines Calcium-Hydroxyapatit Phantoms mit bekannter Dichte, die gemessenen Grauwerte kalibriert (Orth et al., 2017). Die Unterscheidung zwischen Knochen und anderem Gewebe wurde anhand der gemessenen Grauwerte festgelegt. Als Knochengewebe wurde jenes mit einer Knochendichte (BMD) über

0,410 g/cm³ (Grauwert ab 68) festgelegt (Morgan et al., 2009) (Isaksson et al., 2009). MCM hatten einen mittleren Grauwert von $37,8 \pm 0,02$, sodass 99,96 % der MCM bei der Berechnung ausgeschlossen werden konnten (Orth et al., 2017).

3.2.3. Biomechanik

Nach Tötung der Versuchstiere, Explantation der Implantate und radiologischer Analyse wurden die Femora einer biomechanischen 3-Punkt-Biegetestung unterzogen. Die Messung (Mini-Zwick Z 2.5-Zwick GmbH, Ulm, Deutschland) wurde zerstörungsfrei durchgeführt, sodass die Proben für weitere Analysen verwendet werden konnten und somit die Anzahl benötigter Versuchstiere reduziert werden konnte. Hierzu wurden die Femora jeweils mit der ventralen Seite nach unten auf die Prüfvorrichtung gelegt. Der Abstand der beiden Stempel betrug standardisiert 6 mm. Die anschließende Messung erfolgte mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1 mm/min. Im linearen Anteil des Kraft-Weg-Diagramms wurde die Biegesteifigkeit des Kallus bestimmt (Garcia et al., 2008) (Orth et al., 2017). Um individuelle Unterschiede zu berücksichtigen, wurde die Messung an gesunden Femora als interne Kontrolle durchgeführt. Bei allen Femora konnte somit die relative Biegesteifigkeit der osteotomierten Femora im Vergleich zur gesunden Gegenseite bestimmt werden.

3.2.4. Histologie und Histomorphometrie

Die histomorphometrische Auswertung der Femora erfolgte in den Räumlichkeiten des Instituts für Klinische & Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg (Saar).

Nach der μ CT Untersuchung wurden die Knochen für 24 Stunden in einer 4 % gepufferten Formalinlösung fixiert und für 3 Wochen in 10 % EDTA bei 4 °C entkalkt. Anschließend wurden die entkalkten Präparate in einer aufsteigenden Reihe an Alkohollösungen entwässert (jeweils eine Stunde mit 70 %, 80 %, 90 % sowie viermal eine Stunde mit 100 % Alkohol). Nach der Entwässerung wurden die Proben dreimal jeweils eine Stunde mit Xylol behandelt, um das Gewebe paraffingängig zu machen. Hiernach wurden die Knochen für eine weitere Stunde in heißem Paraffin eingebettet. Abschließend wurden 5 μ m dicke Schnittpräparate in sagittaler Schnitfführung für die Färbungen angefertigt.

Die Schnitte wurden zunächst mit Eisenhämatoxylin (HE) nach Weigert gefärbt. In 3 μ m dicken Schnitten wurde in 4 zentralen Bereichen des Kallusgewebes die absolute Anzahl an angeschnittenen Gefäßen unter 400-facher Vergrößerung (Olympus BX60 Mikroskop) bestimmt und als Gefäße pro *High Power Field* (HPF) angegeben. Die Anwesenheit eines

Lumens mit einer typischen Gefäßwandmorphologie war nötig um die Struktur als Gefäß zu identifizieren.

Zudem wurde nach HE-Färbung die kombinierte Safranin-O- / Fast-Green-Färbung verwendet um eine Differenzierung zwischen den Gewebetypen des Kallus zu ermöglichen. Safranin-O lagert sich an die negativen Ladungen der Proteoglykane des Knorpels an und stellt diesen rot dar, während sich Fast-Green an den entkalkten Knochen lagert und diesen grün färbt. Nach Spülung mit Aqua destillata (Aqua dest.) erfolgte eine Differenzierung in einem HCl-Alkohol-Gemisch aus 70 % Alkohol und 1 % HCl. Daraufhin wurden die Schnitte für 10 Minuten in Leitungswasser bläuen gelassen und erneut mit Aqua dest. gespült. Im Anschluss wurden die Schnitte mittels 0,02 % Fast-Green (VWR, Darmstadt, Germany) für 4 Minuten gefärbt, mit 1 % Essigsäure gespült und anschließend mit 0,1 % Safranin-O (VWR) für weitere 5 Minuten gefärbt. Nach dem Entwässern konnten die Schnitte eingedeckt werden.

Unter 50-facher Vergrößerung wurden die histologischen Schnitte analysiert, aufgenommen und digitalisiert (BX 60 Mikroskop, Olympus; Zeiss Axio Cam and Axio Vision 3.1, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Im weiteren Verlauf wurden die Bilder mit Hilfe der Software ImageJ Analysis System (NIH, Bethesda, USA) ausgewertet. Es wurden in den Safranin-O / Fast-Green Schnitten folgende Parameter bestimmt:

- Gesamtkallusfläche [mm²]
- Fläche des bindegewebigen Anteils innerhalb des Kallus [mm²]
- Fläche des knorpeligen Anteils innerhalb des Kallus [mm²]
- Fläche des knöchernen Anteils innerhalb des Kallus [mm²]

Gemäß den Empfehlungen von Gerstenfeld et al. wurde für die Kalluszusammensetzung folgende Zielwerte bestimmt (Gerstenfeld et al., 2005):

- $\left(\frac{\text{knöcherne Kallusfläche [mm}^2\text{]}}{\text{Gesamtkallusfläche [mm}^2\text{]}} \right)$
- $\left(\frac{\text{knorpelige Kallusfläche [mm}^2\text{]}}{\text{Gesamtkallusfläche [mm}^2\text{]}} \right)$
- $\left(\frac{\text{bindegewebige Kallusfläche [mm}^2\text{]}}{\text{Gesamtkallusfläche [mm}^2\text{]}} \right)$

Des Weiteren wurde die Überbrückung des Osteotomiespalts in Abhängigkeit des überbrückenden Gewebes nach einem Punktesystem bewertet (Orth et al., 2017). Beide Corticalices wurden unabhängig voneinander jeweils auf eine knöcherne Überbrückung [2 Punkte], eine knorpelige Überbrückung [1 Punkt] oder eine bindegewebige Überbrückung [0

Punkte] hin untersucht. Es konnten somit maximal 4 Punkte pro Knochen als Zeichen einer kompletten knöchernen Ausheilung, und minimal null Punkte als Zeichen einer ausbleibenden Knochenheilung erreicht werden.

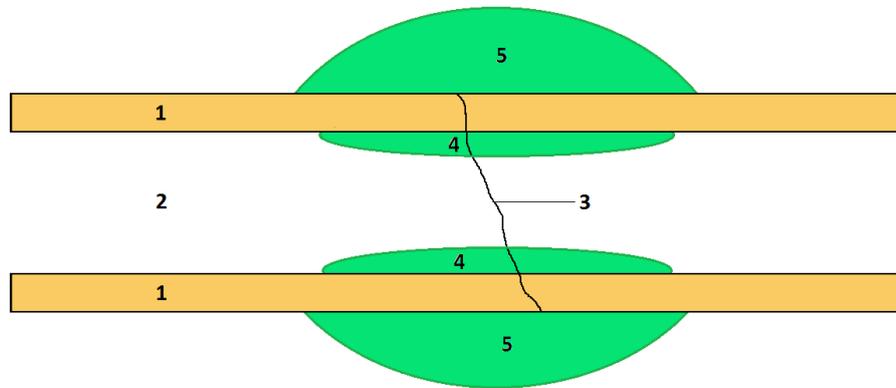


Abb.21: Schematische Darstellung der histologischen Auswertungsparameter. 1 Corticalis, 2 Markraum, 3 Frakturlinie, 4 endostaler Callus, 5 periostaler Callus

Zur Quantifizierung der Osteoklastenaktivität in den vorliegenden Proben wurden 3 µm Schnitte von Femora 14 Tage postoperativ mittels *Tartrate-Resistant Acid Phosphatase* (TRAP) gefärbt. Hierbei handelt es sich um ein glykosyliertes monomerisches Enzym, welches hauptsächlich auf der Zellmembran von Osteoklasten und aktivierten Makrophagen zu finden ist, und dient somit als Marker für die Osteoklastenaktivität (Baumbach et al., 1991) (Minkin, 1982). Zur Färbung wurden die Schnitte entparaffiniert und mit 20 mg Naphtol AS-MX Phosphat (Sigma Aldrich) und 120 mg Fast Red Violet LB salt (Sigma Aldrich) in einem Natriumacetat Puffer (pH 5,0; Sigma Aldrich) bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit A. dest. gespült, mit Hämalaun nach Meyer gegengefärbt und mit Glyceringelatine eingedeckt.

In Schnitten der TRAP Färbung wurde in 4 zentralen Bereichen des Kallusgewebes die absolute Anzahl TRAP-positiver (TRAP+) Zellen unter 400facher Vergrößerung (Olympus BX60 Mikroskop) bestimmt und als TRAP+ Zellen / HPF angegeben.

3.2.5. Western Blot

Das Western- bzw. Immunoblotting ist eine Methode zur quantitativen Ermittlung der Proteinexpression in Gewebeproben. Hierfür werden die zu analysierenden Proteine zuerst in einer vertikalen Gelmatrix elektrophoretisch aufgetrennt und dann in einer zweiten horizontalen Elektrophorese auf eine proteinbindende Membran transferiert bzw. „geblottet“. Grundprinzip

der elektrophoretischen Trennung von Proteinen ist deren Wanderung in einem angelegten elektrischen Feld. Dies ist unter anderem abhängig von Ladung, Form und molekularer Größe des Moleküls. Anschließend werden mit Hilfe von Enzym-konjugierten Antikörpern spezifische Targetproteine markiert. Das Maß der Proteinexpression wird über eine lichtemittierende Enzym-Substrat-Reaktion detektiert. Um die Proteinexpression der verschiedenen Proben bei gleichmäßigem Gel-Membran-Transfer quantitativ vergleichen zu können, werden die Beladungen der gewonnenen Proteinextrakte auf eine identische Proteinkonzentration eingestellt und gegen ein ubiquitär exprimiertes Protein korrigiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von OPG, RANKL, CD31 und VEGF nach 14 tägiger Knochenheilung quantifiziert.

Die kryokonservierten Proben wurden zunächst mit 150 µl vorgekühltem Lyse-Puffer, mit einem Proteaseinhibitor-Cocktail (1:75; Sigma-Aldrich), einem Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (1:100; Sigma-Aldrich) und 100 mM Phneylmethylsulfonylfluorid (1:500; Roth, Karlsruhe, Deutschland) homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten auf Eis inkubiert und für weitere 30 Minuten mit 16000 x G bei 4 °C zentrifugiert (Biofuge fresco, Kendro, Hanau, Deutschland). Die Überstände wurden abpipetiert und die Aliquots der gewonnenen Proteinextrakte bei -20 °C kryokonserviert.

Die nach der Proteinextraktion gewonnenen Proben wurden mit Aqua dest. 1:10 verdünnt. Unmittelbar vor der Proteinbestimmung wurde folgende Messlösung angesetzt:

- 5 ml Reagenz A: 10 g Na₂CO₃ / 500 ml 0,1 M NaOH (Roth)
- 100 µl Reagenz B: 0,5 g KNa-Tartrat, 0,25 g Cu-Sulfat x 5 H₂O / 50 ml Aqua dest. (Merck, Darmstadt, Deutschland).

Zu 250 µl dieser Messlösung wurden je 50 µl der verdünnten Extrakte zugesetzt und für 10 s gemischt (Vortex, Heidolph Reax Top, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland). Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei RT inkubiert und mit 25 µl Aqua dest. verdünnter Folinlösung (1:2; Sigma-Aldrich) gemischt.

Im Anschluss an eine weitere 30-minütige Inkubation bei RT wurde die Absorption des entstandenen Farbkomplexes bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen Aqua dest. photometrisch gemessen (GeneQuant pro, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). Mit Hilfe einer bovinen Serumalbumin Standardkurve wurde die Proteinkonzentration ermittelt. Für jedes Proteinextrakt wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Extrakte wurden auf gleiche Proteinkonzentrationen eingestellt (40 µg / 15 µl) und mit einem „Sample Buffer“ (2 x Laemmli-Puffer, 4 % Natriumdodecylsulfat (SDS), 20 % Glycerin, 10 % β-Mercaptoethanol, 0,004 % Bromphenolblau, 0,125 M TRIS-HCl pH 6,8; Sigma-Aldrich) für 2 x 5 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert.

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

Tab.3: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele für den Western Blot

Die Analysen wurden als eindimensionale Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter diskontinuierlichen Bedingungen nach Laemmli (Laemmli, 1970) mit einer Acrylamidkonzentration von 5 % im Sammelgel und einer Acrylamidkonzentration von 10 % im Trenngel durchgeführt (30 % Acrylamid/Bis Solution, 29:1; BioRad, München Deutschland).

Gemäß Herstellerangaben wurden die Gele in eine vertikale Flachapparatur mit Gießstand für Minigele (Mini-Protean II, BioRad) gegossen. Im Anschluss an das Einfüllen der Trenngellösung wurden ca. 200 µl Isopropanol (Roth) überschichtet, um somit eine glatte Trennfläche zwischen Trenn- und Sammelgelen zu gewährleisten. Nach einer 30-minütigen Polymerisationszeit wurde nach Entfernen des Alkohols das Sammelgel in die Vorrichtung gegossen und unmittelbar anschließend ein Teflonkamm eingesetzt (15 Zähne; 4 mm x 0,75 mm; BioRad). Die dadurch entstehenden Geltaschen erlauben ein maximales Füllvolumen von 15 µl. Nach einer weiteren 1-stündigen Polymerisationszeit konnten schließlich 7,5 µl der

Proben in die Geltaschen eingefüllt werden. Anschließend wurden die Proteine in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Mini-Protean II, BioRad) in einem TRIS / Glycinpuffer (0,125 M TRIS Base, 0,96 M Glycin, 0,5 % SDS; Roth) elektrophoretisch getrennt. Die erforderliche Niederspannung wurde durch ein spezielles Netzgerät für stabilisierten Gleichstrom (Power Pac, BioRad) gewährleistet. Anfangs wurde für 15 Minuten eine Spannung von 100 V angelegt, um die Proteine im Sammelgel zu konzentrieren. Später wurde die angelegte Spannung für etwa eine Stunde auf 140 V erhöht. Sobald die „blaue Lauffront“ der Bromphenolblau-Bande des Laemmli Puffers das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Auftrennung beendet, die Gele aus der Kammer genommen und für das weitere Membranblotting in einem Transferpufferbad (Bjerrum-Schäfer-Nilson: 48 mM TRIS Base, 39 mM Glycin, 10 % Methanol, pH 9,2; Roth) äquilibriert.

Das sogenannte *Semidryblotting*, also der horizontale Proteintransfer, erfolgte in einer Trans-Blot Turbo Apparatur (BioRad). Um Oberflächenladungen auszugleichen, wurde die hydrophobe Polyvinyliden-Difluorid-Membran, welche eine hohe Proteinbindekapazität aufweist, für 20 s in Methanol gebadet und sofort mit Aqua dest. gespült. Anschließend erfolgte eine Äquilibrierung für 10 Minuten im Transferpuffer. Die äquilibrierte PVDF-Membran wurde zusammen mit dem Gel luftblasenfrei zwischen Transferpuffer getränkten Filterpapieren (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) in die Blotkassette eingelegt. Die Kassette wurde so in der Blotkammer ausgerichtet, dass durch den Stromfluss ein Proteintransfer vom Gel zur Membran möglich ist. Im weiteren Verlauf wurde ein stabilisierter Gleichstrom (Anfangsstromstärke 1,3 A/Gel) bei einer konstanten Spannung von 25 V für 7 Minuten angelegt. Die nun proteinbeladene Membran wurde über Nacht in *TRIS-buffered saline with Tween20* (TBS-T)-Puffer (1,5 mM TRIS Base pH 7,5, 1 % NaCl, 0,01 % Tween 20; Roth) bei 4 °C bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

Um die Targetproteine zu detektieren, erfolgte eine spezifische Antikörperfärbung der auf die Membran transferierten Proteine. Die Antikörperfärbung der Membran wurde auf einem Horizontalschüttler (Heidolph Polymax 1040, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) durchgeführt. Die in TBS-T über Nacht zwischengelagerten Membranen wurden nun dreimal mit TBS-T gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit einer 5 %igen Milchpulverlösung (Blotting Grade Blocker non-fat dry milk, BioRad) zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen inkubiert. Nach 3 Waschgängen mit TBS-T wurden nun die entsprechenden Primäntikörper nach einem spezifisch vorgegebenen Zeitschema inkubiert.

Antikörper	Klon/Spezies	Bezugsquelle	Verdünnung/Inkubation
CD31	Monoklonal Maus	D11, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	1:10 über Nacht bei 4 °C + 1:50 für 3,5 Stunden bei RT
VEGF	Polyklonal Kaninchen	A20, Santa Cruz Biotechnology	1:10 über Nacht bei 4 °C + 1:50 für 3,5 Stunden bei RT
OPG	Polyklonal Kaninchen	Bioss, Biozol Diagnostica, Eching, Deutschland	1:100 über Nacht bei 4 °C + 1:300 für 3,5 Stunden bei RT
RANKL	Polyklonal Kaninchen	Abcam	1:50 über Nacht bei 4 °C + 1:300 für 3,5 Stunden bei RT
β-Actin	Monoklonal Maus	Sigma	1:5000 für 3,5 Stunden bei RT

Tab.4: Primärantikörper für den Western Blot

Primärantikörper	Sekundärantikörper	Bezugsquelle	Verdünnung Inkubation
CD31	Ziege-anti-Maus IgG-POD	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark	1:1500 für 1,5 h
VEGF	Ziege-anti-Kaninchen IgG-POD	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland	1:1000 für 1,5 h
OPG	Ziege-anti-Kaninchen IgG-POD	R&D Systems	1:1000 für 1,5 h
RANKL	Ziege-anti-Kaninchen IgG-POD	R&D Systems	1:1000 für 1,5 h
β-Actin	Ziege-anti-Maus IgG-POD	Dako	1:1500 für 1,5 h

Tab.5: Sekundärantikörper für den Western Blot

Nach weiteren 3 Waschgängen mit TBS-T erfolgte die 2-stündige Inkubation mit unterschiedlich stark verdünnten Sekundärantikörpern.

Im weiteren Verlauf wurden die Membranen 5 mal in TBS-T gewaschen und anschließend der o.g. Chemilumineszenzreaktion unterzogen (ECL Western Blotting Analysis System, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland).

Die emittierten Signale der Membranen wurden mittels Enhanced Chemiluminescence Imager (ECL) (ChemoCam Imager 3.2, Intas, Göttingen, Deutschland) detektiert. Als interner Standard zur Überprüfung der Proteinbeladung wurde der monoklonale Antikörper gegen ubiquitäres β -Actin (Sigma-Aldrich) eingesetzt.

Die quantitative Analyse der Proteinmuster erfolgte durch die densitometrische Bestimmung der Lichtabsorption, wobei die optische Dichte der Banden über deren Ausdehnungsfläche analysiert und digitalisiert wurden. Die ermittelte optische Dichte wurde auf gleiche β -Actin-Konzentrationen korrigiert.

3.3. Statistik

Alle statistischen Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Nach der Überprüfung der Normalverteilung wurden im Falle parametrischer Daten bei 2 Untersuchungsgruppen ein ungepaarter *t*-Test und bei mehreren Untersuchungsgruppen ein einseitiger ANOVA, jeweils gefolgt von einem *Student-Newman-Keuls* Test zum paarweisen Vergleich, durchgeführt. Für Mehrfachvergleiche wurde eine Bonferroni-Abgleichung durchgeführt. Bei nicht-parametrischer Datenlage erfolgte der Vergleich zweier Gruppen mittels Mann-Whitney Rangsummentest, wohingegen Vergleiche mehrere Untersuchungsgruppen mittels einseitiger ANOVA, gefolgt von einem Dunn's Test, durchgeführt wurden. Auch hier erfolgte eine Bonferroni Abgleichung. Die Statistik wurde mit Hilfe der Software SigmaPlot 11.0 (Systat Software, San Jose, USA) durchgeführt. Um eine statistische Signifikanz anzuzeigen wurde ein *p*-Wert von $< 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1. Morphologie und Viabilität kultivierter MVF

In TRH eingebettete MVF zeigten über den Beobachtungszeitraum von 7 Tagen eine stabile Gefäß-morphologie bei entsprechend hohem Anteil α -SMA+ Gefäße. Im Gegensatz hierzu zeigten Kontrollen einen zunehmenden Verlust α -SMA+ Gefäße (Abb. 22 und 23). Die Anzahl an α -SMA+ MVF war in Proben der Gruppe TRH+MVF nach 7 Tagen signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Abb. 23).

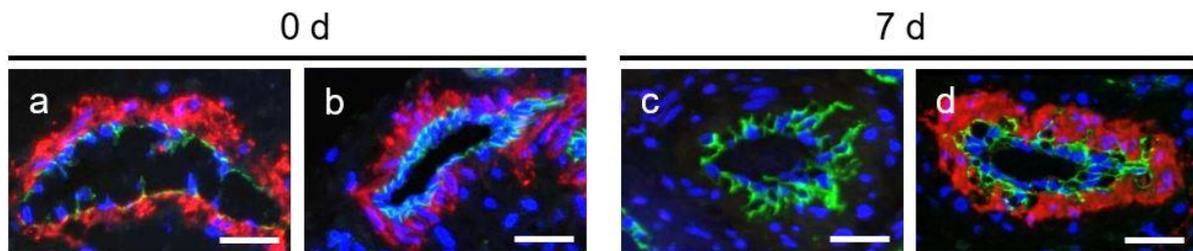


Abb.22: Immunhistochemische Charakterisierung der MVF in freier Zellkultur (a, c) und eingebettet in TRH (b, d) zum Zeitpunkt Tag 0 (a, b) und Tag 7 (c, d). Zellkerne (blau), CD31+ Endothelzellen (grün) und eine stabilisierende α -SMA+ Schicht (rot) sind erkennbar. Der Maßstabballen zeigt eine Distanz von 10 μ m.

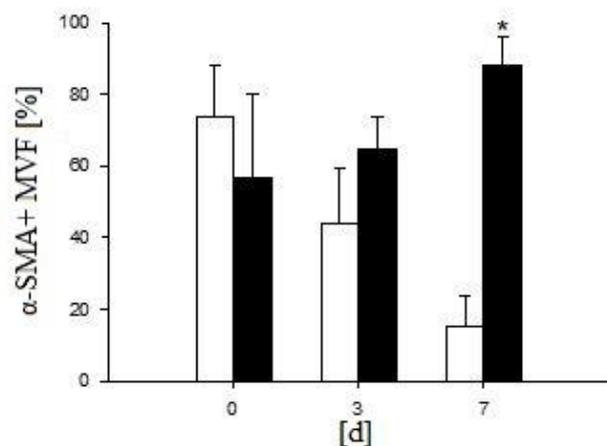


Abb.23: Prozentualer Anteil an α -SMA+ MVF im zeitlichen Verlauf. Freie MVF (Kontrolle) im Nährmedium (weißer Balken) und in TRH eingebettete MVF (TRH+MVF; schwarzer Balken) sind dargestellt. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar (* $p < 0,05$).

Die immunhistochemische Markierung von Casp-3 zeigte, dass die Einbettung von MVF in TRH zu einer geringeren Expression von Casp-3+ Zellen im Vergleich zu Kontrollen führt. Dies galt sowohl für Endothelzellen (Abb. 24 und 25), als auch für perivaskuläre Zellen (Abb. 26 und 27).

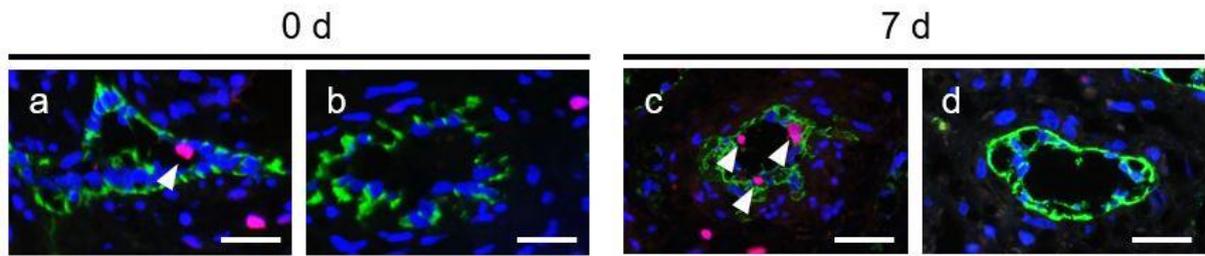


Abb.24: Immunhistochemische Charakterisierung der MVF von Kontrollen (a, c) und eingebettet in TRH (b, d) zum Zeitpunkt Tag 0 (a, b) und Tag 7 (c, d). Zellkerne (blau), CD31+ Endothelzellen (grün) und Casp-3+ Zellen (rot) sind erkennbar. Die Pfeile zeigen Casp-3 positive Endothelzellen. Der Maßstabballen zeigt eine Distanz von 10 μ m.

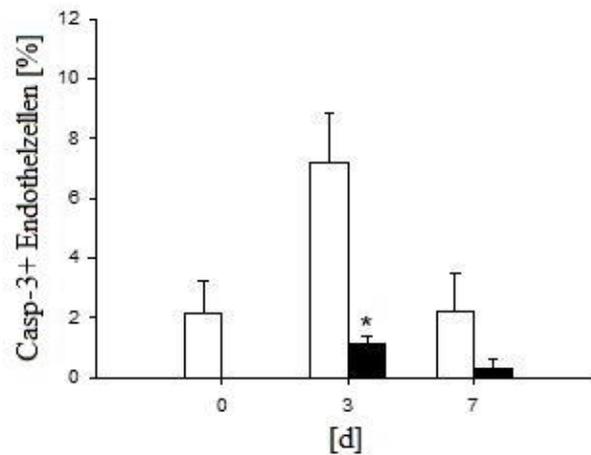


Abb.25: Prozentualer Anteil an Casp-3+ Endothelzellen im zeitlichen Verlauf jeweils zu Tag 0, 3 und 7. Freie MVF (Kontrolle) im Nährmedium (weißer Balken) und in TRH eingebettete MVF (TRH+MVF; schwarzer Balken) sind dargestellt. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar (* $p < 0,05$).

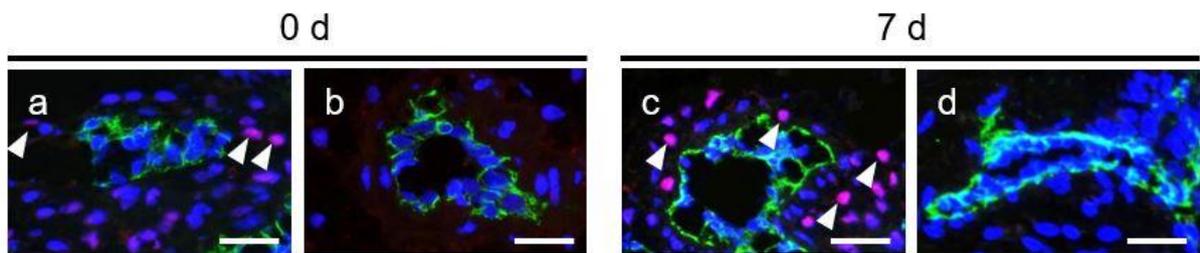


Abb.26: Immunhistochemische Charakterisierung der MVF in freier Zellkultur (a, c) und eingebettet in TRH (b, d) zum Zeitpunkt Tag 0 (a, b) und Tag 7 (c, d). Zellkerne (blau), CD31+ Endothelzellen (grün) und Casp-3+ Zellen (rot) sind erkennbar. Die Pfeile zeigen Casp-3+ perivaskuläre Zellen. Der Maßstabballen zeigt eine Distanz von 10 μ m.

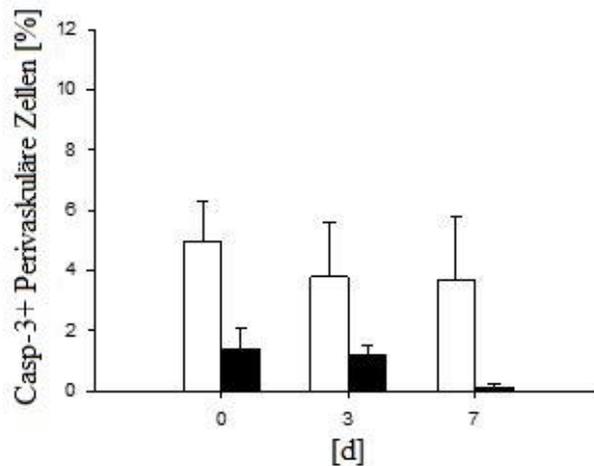


Abb.27: Prozentualer Anteil an Casp-3+ perivaskuläre Zellen im zeitlichen Verlauf jeweils zu Tag 0, 3 und 7. Freie MVF (Kontrolle) im Nährmedium (weißer Balken) und in TRH eingebettete MVF (TRH+MVF; schwarzer Balken) sind dargestellt. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar.

4.2. Postoperativer Verlauf

Unmittelbar postoperativ wurden die Versuchstiere bis zum Erlangen des völligen Bewusstseins beobachtet. Während der weiteren Standzeit von 14 bzw. 35 Tagen wurden die Tiere täglich überwacht. Gelegentlich war am ersten postoperativen Tag eine leicht verminderte Aktivität sowie eine Schonhaltung des operierten Beins zu erkennen, welche sich jedoch spätestens am zweiten postoperativen Tag bis zur schmerzadaptierten Vollbelastung besserte. Das Verhalten der Tiere konnte anschließend dem präoperativen physiologischen Verhalten ohne Beeinträchtigungen des Bewegungsablaufes oder anderen Schmerzzeichen gleichgesetzt werden.

Als postoperative Ausschlusskriterien galten eine nachgewiesene Knochen- bzw. Weichteilinfektion, eine signifikante Gewichtsabnahme, eine radiologisch nachgewiesene Implantatdislokation sowie sonstige pathologische Veränderungen der operierten Extremität.

Futter sowie Trinkwasser wurden postoperativ von allen Tieren in angemessener Menge aufgenommen.

4.3. Makroskopischer Befund

Nach Ablauf der jeweiligen Standzeit wurden die explantierten Femora auf eventuelle Pathologien hin untersucht. Besondere Achtung galt bei der makroskopischen Untersuchung den femoro-patellaren und femoro-tibialen Gelenkverhältnissen, der Beinmuskulatur sowie der

Lokalisation der Osteotomie. Bei keinem der Tiere fanden sich Hinweise auf Infekte, Wundheilungsstörungen, Muskelatrophien, Kniegelenksluxationen oder andere postoperative Ausschlusskriterien. Alle in die Studie aufgenommenen Tiere wiesen in der makroskopischen Begutachtung sowie in den Röntgenaufnahmen eine korrekte Lage und einen festen Sitz des Osteosynthesematerials auf.

Nach Resektion des Weichteilmantels und vorsichtiger Entfernung zunächst des Pins und nachfolgend des Clips wurde die Überbrückung des Osteotomiespaltes untersucht. Bei den Tieren mit einer Standzeit von 14 Tagen zeigte sich in der Kontrollgruppe sowie der Gruppe TRH eine leichte, schlaffe Überbrückung, jedoch ohne deutliche Kallusformation. Im Vergleich hierzu fand sich bei der Gruppe TRH+MVF eine dem intraoperativen Befund kaum abweichende Situation.

Nach einer 35 tägigen Standzeit wiesen die Knochen der Gruppen TRH und Kontrolle einen vergleichbaren Zustand mit makroskopischen Zeichen einer knöchernen Überbrückung der Osteotomie auf. Der Knochen war nach Implantatentfernung deutlich stabiler als in der Gruppe TRH+MVF. Femora dieser Gruppe zeigten keine bzw. kaum Zeichen der knöchernen Knochenheilung, sondern wiesen eine sehr instabile und bindegewebige Durchbauung der Osteotomie auf.

4.4. Radiologie

4.4.1. Röntgen

Sowohl direkt postoperativ, als auch nach der jeweiligen Standzeit wurden die Femora röntgenologisch untersucht. Dadurch konnten die korrekte Implantatlage sowie weitere Ausschlusskriterien zu Beginn und am Ende des Beobachtungszeitraums überprüft werden.

Erwartungsgemäß konnte in keiner der Gruppen nach 14 Tagen eine knöcherne Überbrückung des Osteotomiespats beobachtet werden (Abb. 28).

Interessanterweise zeigten Femora der Gruppe TRH+MVF im Gegensatz zu Knochen der Gruppe TRH und Kontrollen auch nach 35 Tagen eine fehlende knöcherne Durchbauung des Osteotomiespalts (Abb. 29).

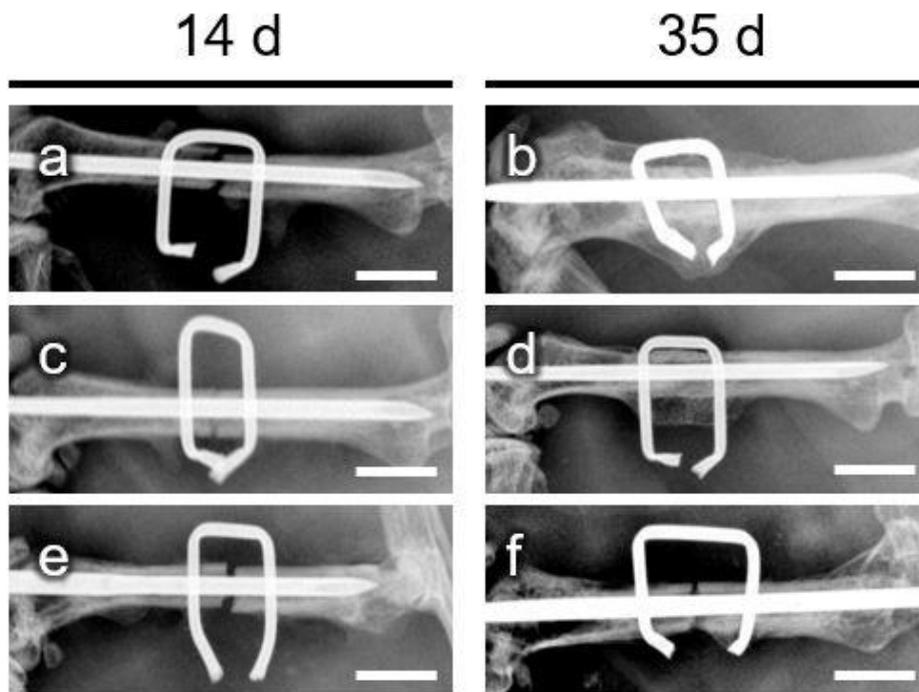


Abb.28: Postoperative Röntgenaufnahmen der osteotomierten Femora mit einem Defekt von 0,25mm 14 Tage (a,c,e) und 35 Tage(b,d,f) nach Stabilisierung mittels Pin-Clip-Technik. Dargestellt sind Femora der Kontrollgruppe (a,b), unbeladenes TRH (c,d) und TRH+MVF Gruppe (e,f). Der Maßstab Balken zeigt eine Distanz von 2 mm.

4.4.2. Mikrocomputertomographie

Tiere mit einer Standzeit von 14 Tagen zeigten keine signifikanten Unterschiede der Knochenvolumina innerhalb der einzelnen Gruppen (Abb. 30).

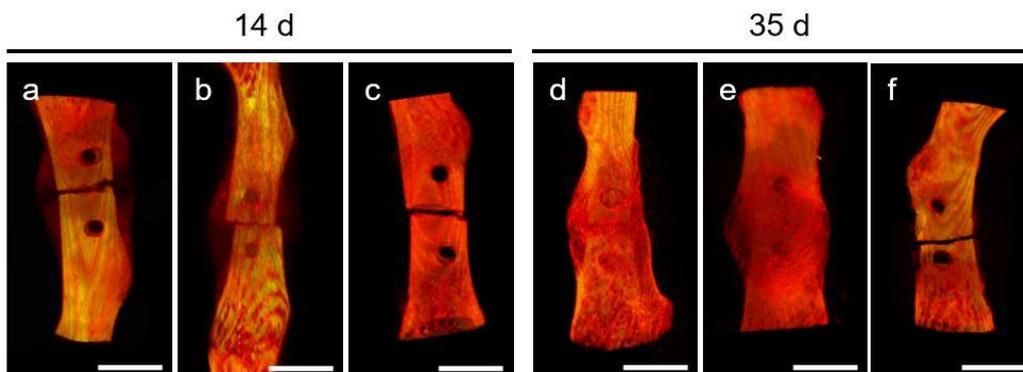


Abb.29: Repräsentative dreidimensionale μ CT-Rekonstruktionen der Femora der Kontrollgruppe (a, d), der Gruppe TRH (b, e) und der Gruppe TRH+MVF (c, f) 14 Tage (a, b, c) und 35 Tage (d, e, f) postoperativ. Der Maßstab Balken zeigt eine Distanz von 2 mm.

Nach einer Standzeit von 35 Tagen zeigten Tiere der Gruppe TRH+MVF signifikant weniger Knochenvolumen im Vergleich zu TRH und Kontrollen (Abb. 31).

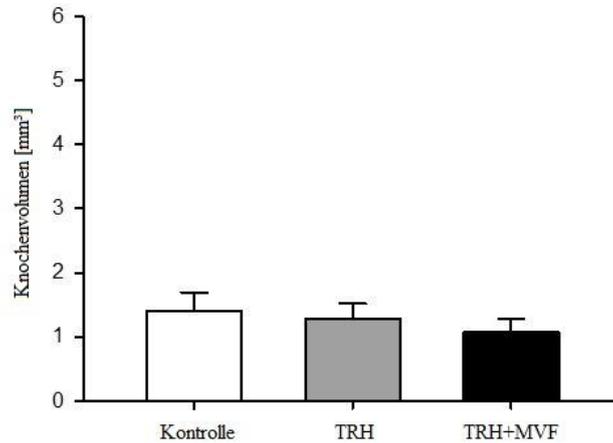


Abb.30: Knochenvolumen innerhalb der ROI von Femora der Kontrollgruppe, der Gruppe TRH und der Gruppe TRH+MVF 14 Tage postoperativ. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar.

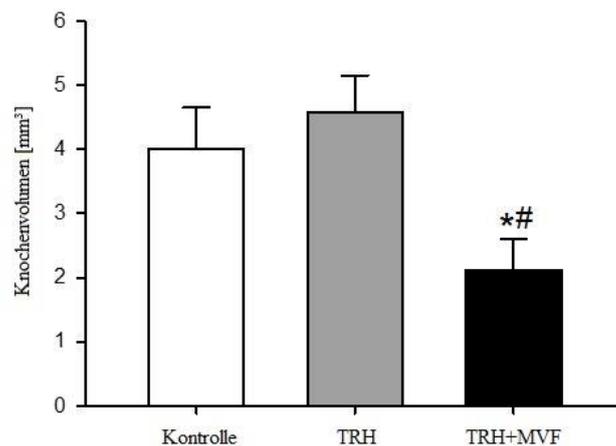


Abb.31: Knochenvolumen im innerhalb der ROI von Femora der Kontrollgruppe, der Gruppe TRH und der Gruppe TRH+MVF 35 Tage postoperativ. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar. (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle) (# $p < 0,05$ vs. TRH).

Die BMD ergab in keiner Gruppe für die jeweiligen Standzeiten signifikante Unterschiede (unveröffentlichte Daten).

4.5. Biomechanik

Die Biegesteifigkeit der Femora zeigte nach einer Standzeit von 14 Tagen in allen Gruppen Werte von $< 12\%$ im Verhältnis zur gesunden Gegenseite (Abb. 32). Doch selbst zu diesem

frühen Zeitpunkt zeigten Femora der Gruppe TRH+MVF signifikant verminderte Werte im Vergleich zur TRH Gruppe.

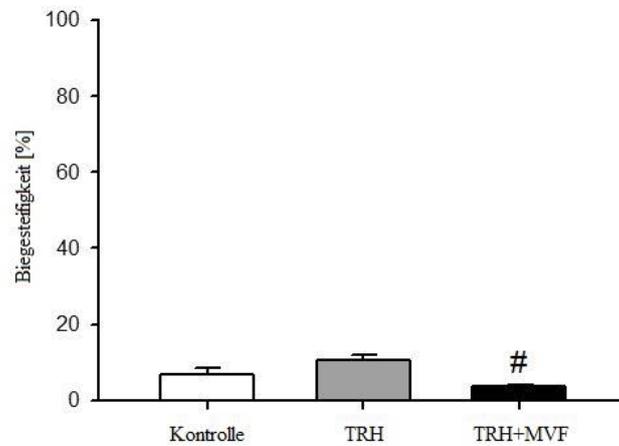


Abb.32: Relative Biegesteifigkeit von Femora der Kontrollgruppe, der Gruppe TRH und der Gruppe TRH+MVF 14 Tage postoperativ. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar (# $p < 0,05$ vs. TRH).

Nach einer Standzeit von 35 Tagen war die relative Biegesteifigkeit in der Kontrollgruppe und der TRH Gruppe auf etwa 50 % zur Gegenseite angestiegen. Im Gegensatz dazu zeigten Tiere der Gruppe TRH+MVF eine signifikant verminderte Biegesteifigkeit von etwa 13 % (Abb. 33).

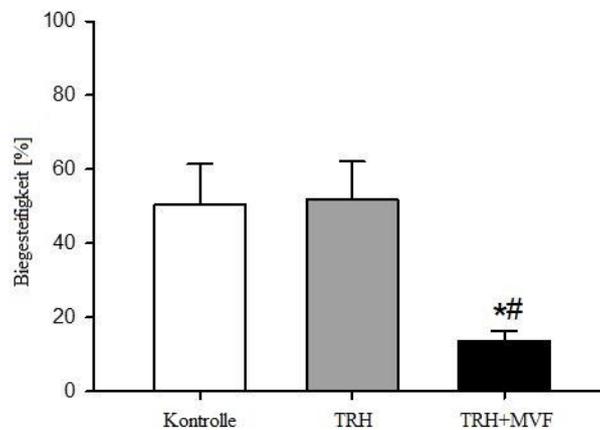


Abb.33: Relative Biegesteifigkeit von Femora der Kontrollgruppe, der Gruppe TRH und der Gruppe TRH+MVF 35 Tage postoperativ. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle) (# $p < 0,05$ vs. TRH).

4.6. Histologie und Histomorphometrie

In der HE Färbung zeigte sich im Kallus der TRH+MVF Gruppe im Vergleich zu Kallusgewebe der Gruppe TRH und zur Kontrolle sowohl nach 14, als auch nach 35 Tagen, eine signifikant höhere Anzahl an Gefäßen (Abb. 34 - 36).

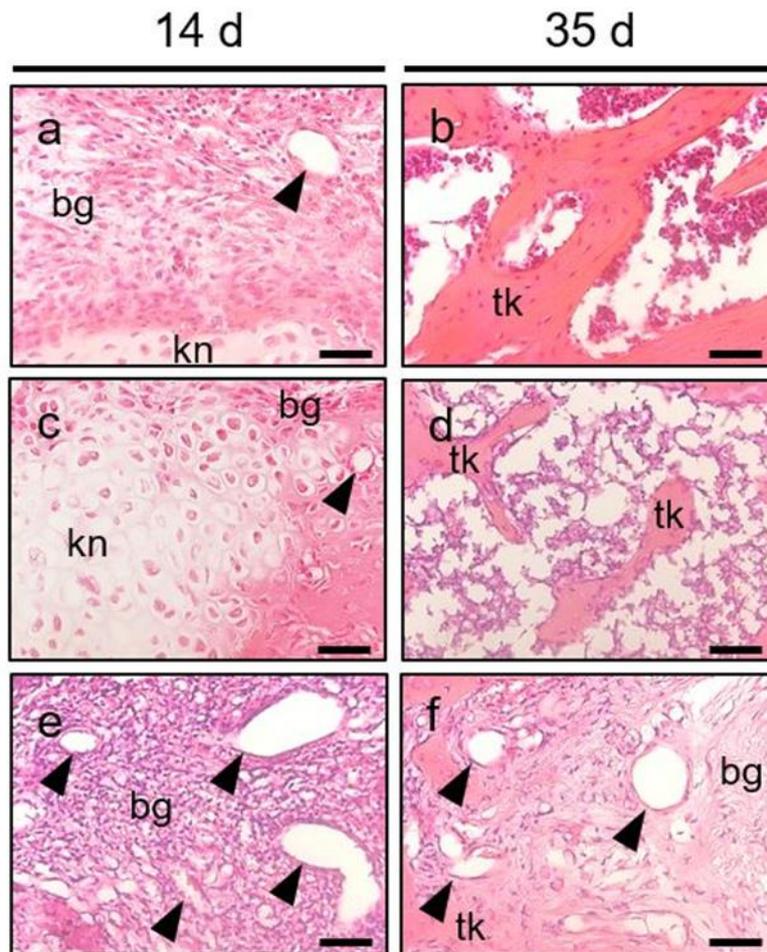


Abb.34: HE Färbung von Kallusgewebe der Kontrollgruppe (a,b), der Gruppe TRH (c,d) und der Gruppe TRH+MVF (e,f) 14 Tage (a,c,e) und 35 Tage (b,d,f) postoperativ. Bindegewebe (bg), Knorpelgewebe (kn) und trabekuläres Knochengewebe (tk) sind gekennzeichnet. Die Pfeile zeigen angeschnittene Gefäße. Der Maßstabbalken zeigt eine Distanz von 50µm.

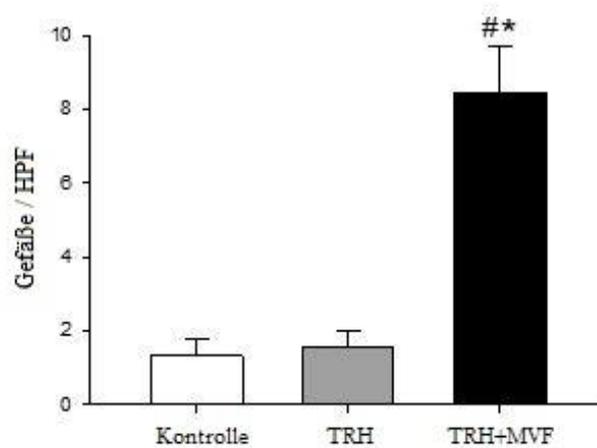


Abb.35: Anzahl Gefäße / HPF in Femora der Kontrollgruppe, der Gruppe TRH, und der Gruppe TRH+MVF 14 Tage postoperativ. Die Daten stellen Mittelwerte ± SEM dar (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle) (# $p < 0,05$ vs. TRH)

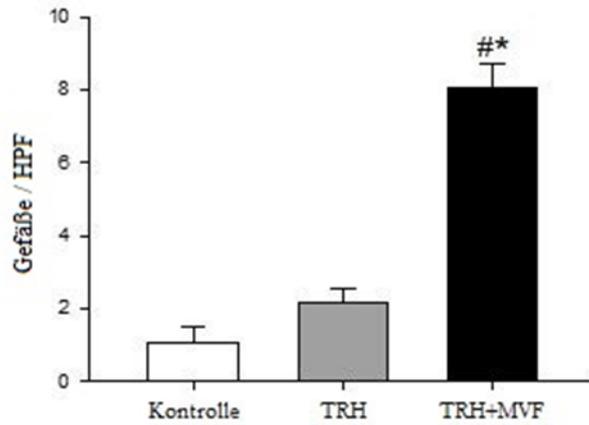


Abb. 36: Anzahl Gefäße / HPF in Femora der Kontrollgruppe, der Gruppe TRH und der Gruppe TRH+MVF 35 Tage postoperativ. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle) (# $p < 0,05$ vs. TRH)

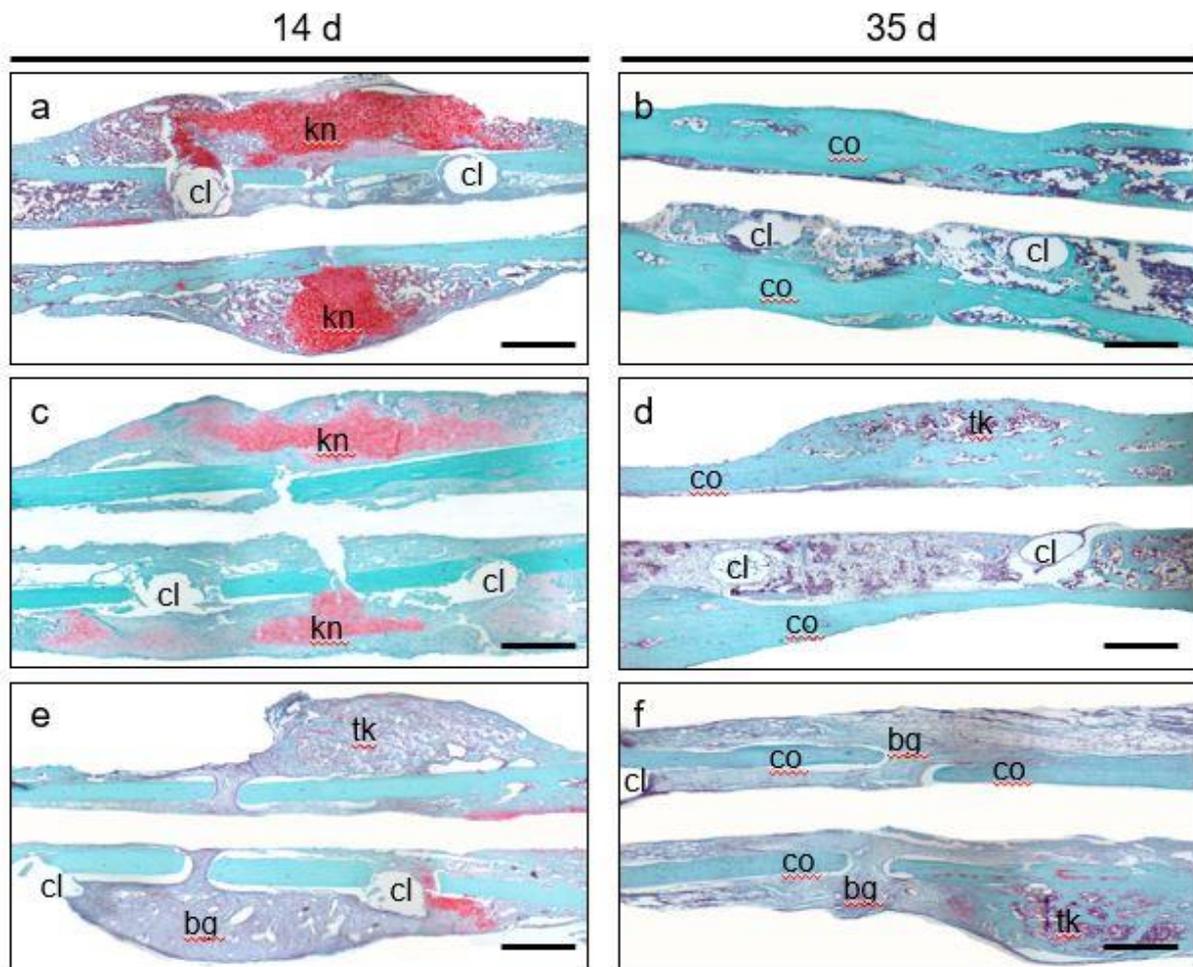


Abb.37: Repräsentative histologische Bilder nach Safranin-O / Fast-Green Färbung von Femora der Kontrollgruppe (a, b), der Gruppe TRH (c, d) und der Gruppe TRH+MVF (e, f) 14 Tage (a, c, e) und 35 Tage (b, d, f) postoperativ. Bindegewebe (bg), Knorpelgewebe (kn) und trabekulärer Knochen (tk), corticaler Knochen (co) sowie die Bohrlöcher des Clips (cl) sind gekennzeichnet. Der Maßstabballen zeigt eine Distanz von 500 μ m.

Die histomorphometrische Auswertung des Kallusgewebes zeigte hinsichtlich der Gesamtkallusfläche keinen signifikanten Unterschied zwischen den 3 Gruppen, 14 Tage (TRH+MVF: $4,5 \pm 0,5$; TRH: $3,6 \pm 0,4$; Kontrolle: $3,5 \pm 0,4$; $p > 0,05$) und 35 Tage (TRH+MVF: $3,2 \pm 0,4$; TRH: $3,0 \pm 0,6$; Kontrolle: $2,9 \pm 0,3$; $p > 0,05$) postoperativ.

Die Kalluszusammensetzung zeigte nach einer 14 tägigen Standzeit zwar im Kallusgewebe von Tieren der Gruppe TRH+MVF im Vergleich zur Gruppe TRH und Kontrolle eine reduzierte Knochen- und Knorpelfraktion, jedoch blieben die Unterschiede ohne Signifikanz (Abb. 37 und 38).

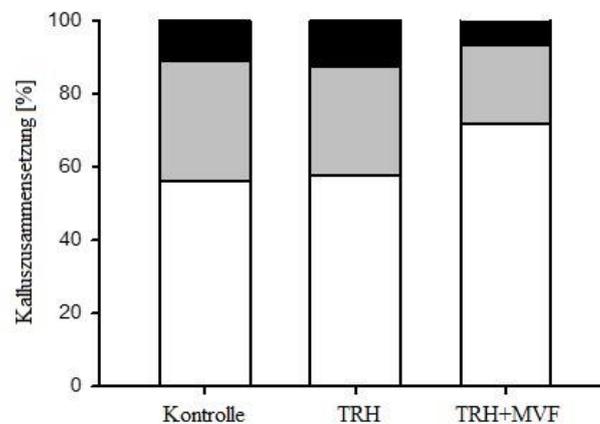


Abb.38: Kalluszusammensetzung 14 Tage postoperativ in der Kontrollgruppe, der Gruppe TRH und der Gruppe TRH+MVF. Weißer Balkenanteil = Bindegewebe, grauer Balkenanteil = Knorpelgewebe, schwarzer Balkenanteil = Knochengewebe. . Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar.

Nach einer 35 tägigen Standzeit zeigte die Kalluszusammensetzung in der Gruppe TRH+MVF $21,7 \pm 2,9$ % Knochengewebe im periostalen Kallusgewebe, wohingegen die Kalluszusammensetzung in der Gruppe TRH und in der Kontrolle eine signifikant größere Fraktion Knochengewebe im Kallus zeigte. Der Anteil an Bindegewebe war in der Gruppe TRH+MVF konsekutiv erhöht, bei nicht signifikant verändertem Anteil von Knorpelgewebe (Abb. 37 und 39).

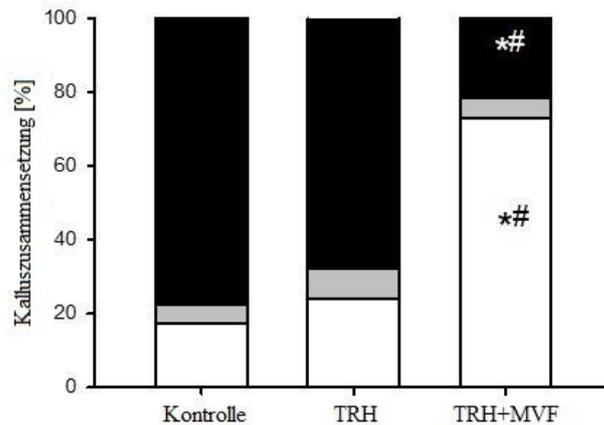


Abb.39 Kalluszusammensetzung 35 Tage postoperativ in der Kontrollgruppe, der Gruppe TRH und der Gruppe TRH+MVF. Weißer Balkenanteil = Bindegewebe, grauer Balkenanteil = Knorpelgewebe, schwarzer Balkenanteil = Knochengewebe. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle) (# $p < 0,05$ vs. TRH).

Dementsprechend war der Überbrückungsscore nach einer Standzeit von 14 Tagen in Femora der Gruppe TRH+MVF vermindert, wenngleich nicht signifikant verändert (Abb. 40).

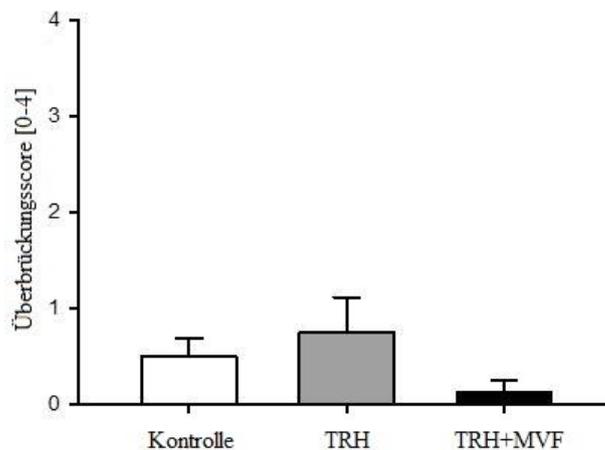


Abb.40: Überbrückungsscore des Osteotomiespalts der Kontrollgruppe, der Gruppe TRH und der Gruppe TRH+MVF 14 Tage postoperativ. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar.

Der Überbrückungsscore in Femora der Gruppe TRH+MVF war nach einer Standzeit von 35 Tagen im Vergleich zu Femora der anderen Gruppen signifikant vermindert. Während Femora in dieser Gruppe lediglich Werte von $0,6 \pm 0,3$ aufwiesen, zeigten Femora der Gruppen TRH und Kontrollen Werte > 3 zeigten (Abb. 41).

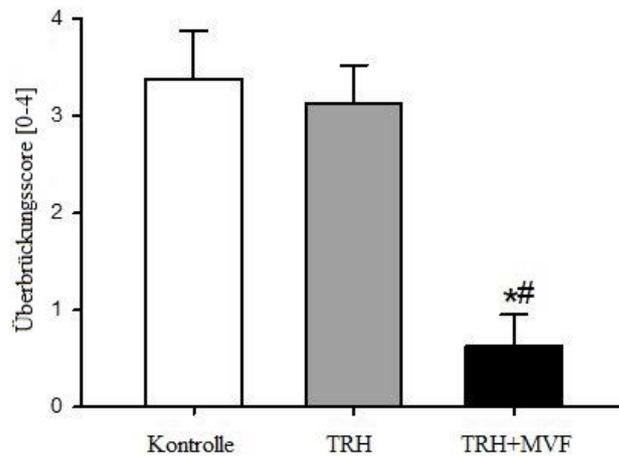


Abb.41: Überbrückungsscore des Osteotomiespalts der Kontrollgruppe, der Gruppe TRH und der Gruppe TRH+MVF 35 Tage postoperativ. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle) (# $p < 0,05$ vs. TRH).

Die TRAP-Färbung zur Beurteilung der Osteoklastenaktivität zeigte 14 Tage postoperativ eine signifikant höhere Anzahl TRAP+ Zellen im Kallus der Gruppe TRH+MVF im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen (Abb. 42 und 43).

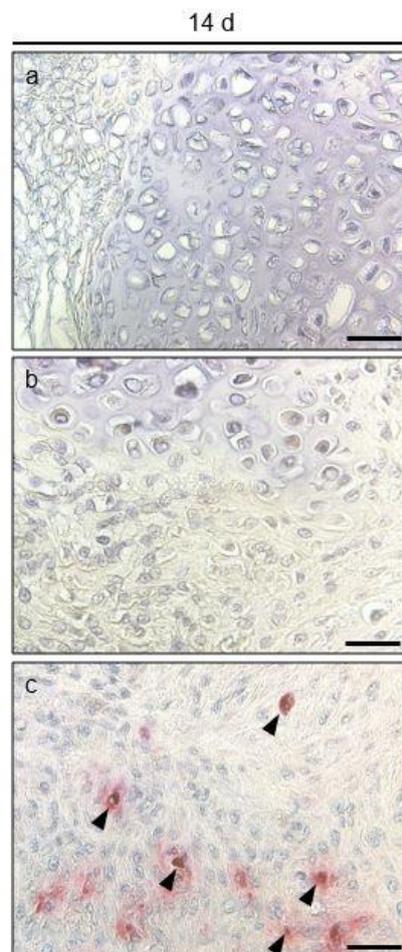


Abb.42: Repräsentative histologische Bilder von TRAP-gefärbtem Kallusgewebe der Kontrollgruppe (a), der Gruppe TRH (b) und der Gruppe TRH+MVF (c) 14 Tage postoperativ. TRAP+ Zellen (Pfeile) sind markiert. Der Maßstab zeigt eine Distanz von 50 μ m.

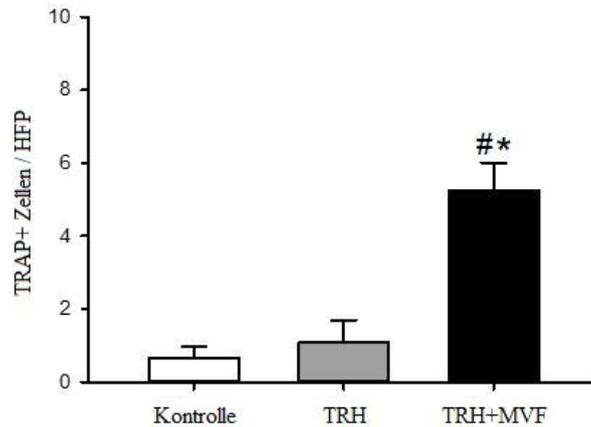


Abb.43: Anzahl an TRAP+ Zellen im Kallusgewebe von Femora der Kontrollgruppe, der Gruppe TRH und der Gruppe TRH+MVF 14 Tage postoperativ. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle) (# $p < 0,05$ vs. TRH).

4.7. Western Blot

Die Western Blot Analyse 14 Tage postoperativ ergab eine signifikant höhere Expression des Endothelzellmarkers CD31 in der Gruppe TRH+MVF im Vergleich zu den anderen Gruppen (Abb. 44) und ergab somit Anhalt für eine verbesserte Vaskularisation im Osteotomiespalt der Gruppe TRH+MVF zu diesem frühen Zeitpunkt.

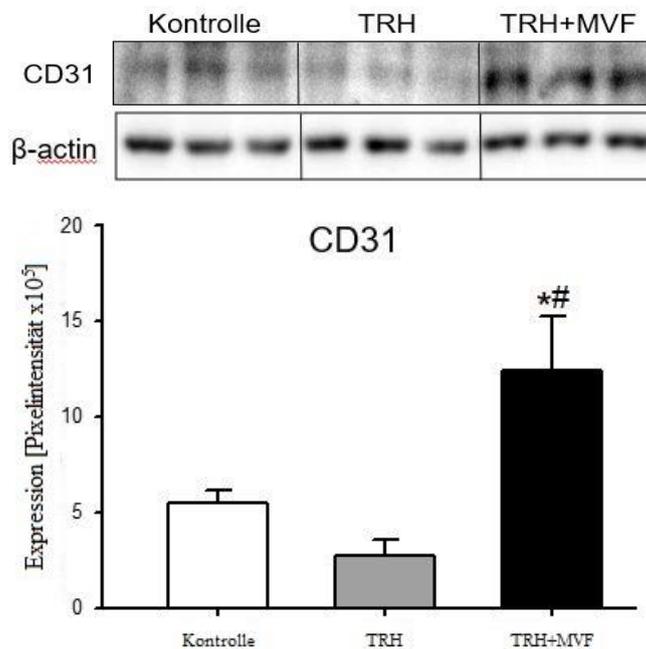


Abb.44: Western Blot Analyse der CD31 Expression im Kallus von Femora der Kontrollgruppe, der Gruppe TRH und der Gruppe TRH+MVF 14 Tage postoperativ.

Hingegen war der angiogene Wachstumsfaktor VEGF im Kallusgewebe von Proben der Gruppe TRH+MVF signifikant vermindert exprimiert (Abb. 45).

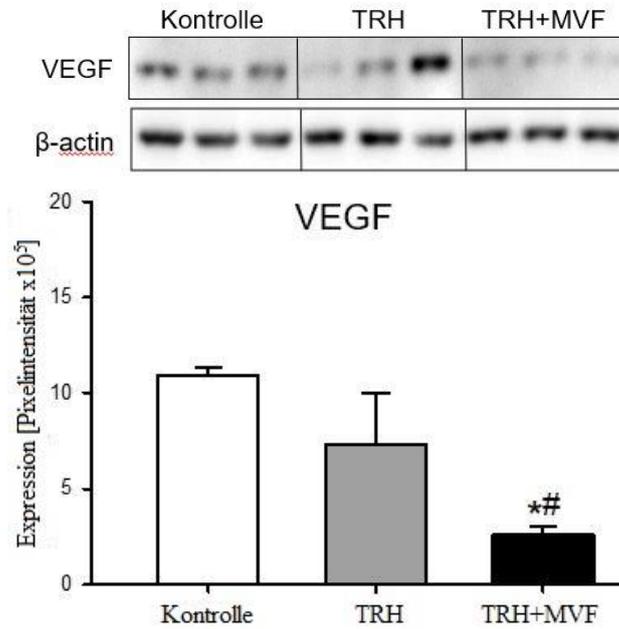


Abb.45: Western Blot Analyse der VEGF Expression im Kallus von Femora der Kontrollgruppe, der Gruppe TRH und der Gruppe TRH+MVF 14 Tage postoperativ.

Die Expression von OPG zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den 3 Gruppen (Abb. 46).

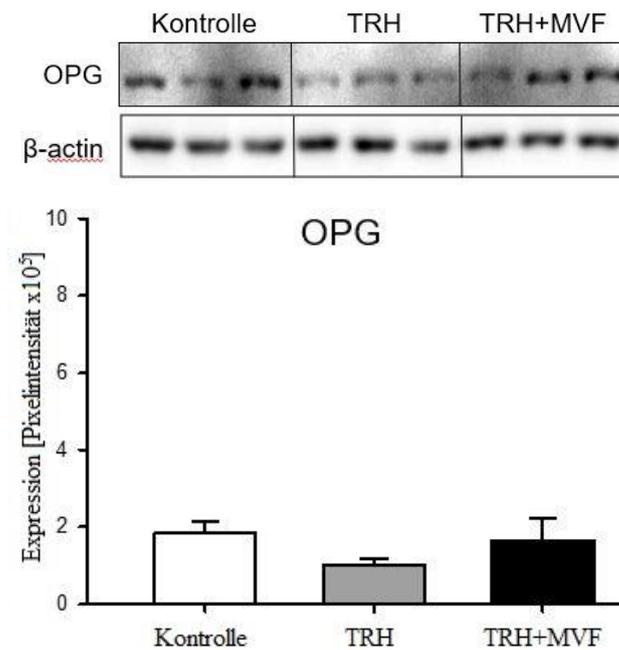


Abb.46: Western Blot Analyse der OPG Expression im Kallus von Femora der Kontrollgruppe, der Gruppe TRH und der Gruppe TRH+MVF 14 Tage postoperativ.

Die Expression von RANKL war in der Gruppe TRH+MVF deutlich erhöht im Vergleich zu den Gruppen TRH und Kontrolle (Abb. 47).

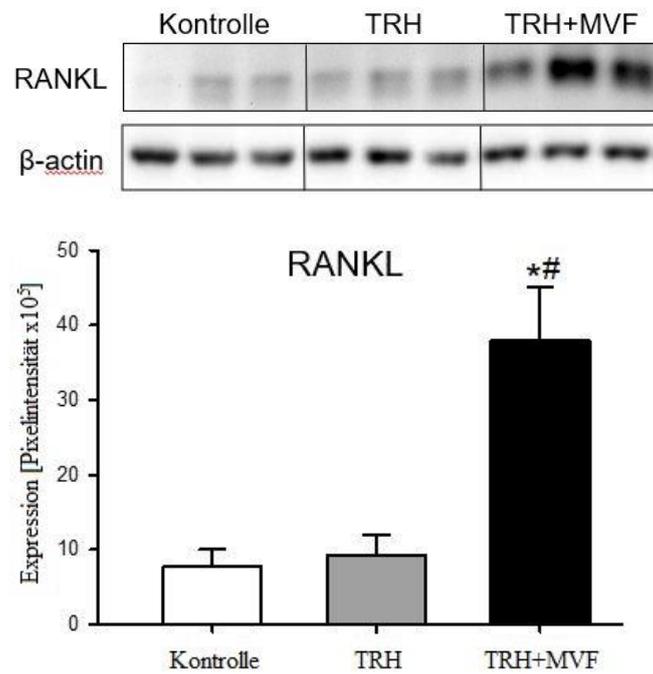


Abb.47: Western Blot Analyse der RANKL Expression im Kallus von Femora der Kontrollgruppe, der Gruppe TRH und der Gruppe TRH+MVF 14 Tage postoperativ.

5. Diskussion

5.1. Diskussion der Methoden

Die Knochenheilung ist ein komplexer biologischer Prozess, der eine Interaktion unterschiedlicher knochenfremder Gewebetypen wie z. B. des Periosts, des Gefäßsystems und des periostären Weichteilgewebes erfordert. Dieses Zusammenspiel wird während der unterschiedlichen Phasen der Frakturheilung durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Das ossäre *micro-environment* ist aufgrund der Komplexität *in vitro* nur schwer reproduzierbar (Friedman et al., 1996). Während die Viabilität von MVF in TRH in einem ersten Schritt *in vitro* untersucht werden konnte, war für die weitere Studie die Untersuchung am Tiermodell notwendig.

Anatomisch besitzt die Maus im Gegensatz zum Menschen kein Havers-System. Hinsichtlich der Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Studien an der Maus auf den Menschen ist dies als Nachteil zu werten. Jedoch finden sich Parallelen der beiden Spezies im Remodelingprozess wie z. B. bei der Ausbildung sogenannter Resorptionshöhlen im Rahmen der murinen Frakturheilung (Nunamaker, 1998). Darüber hinaus bieten Studien an der Maus aufgrund der relativ günstigen Zucht- und Haltungskosten und der hiermit verbundenen Durchführbarkeit von Studien mit großer Gruppenstärke einen Vorteil. Zusätzlich ist das Genom der Maus bereits vollständig entschlüsselt und daher eine große Anzahl transgener Stämme sowie spezifischer Antikörper für die Maus verfügbar (Rossant & Nagy, 1995). Vor diesem Hintergrund entschieden wir uns in der vorliegenden Arbeit zur Verwendung von ausgewachsenen CD-1 Mäusen als Versuchstiere.

Das mittels Längslaparotomie standardisiert gewonnene epididymale Fettgewebe der Maus ist ein etabliertes Verfahren zur Isolation von MVF (Laschke et al., 2012). MVF können angesichts des ubiquitären Vorkommens von Gefäßen aus vielen Gewebearten isoliert werden (Laschke et al., 2015). Fettgewebe bietet jedoch aufgrund dessen Entbehrlichkeit und des einfachen Zugangsweges einen Vorteil gegenüber anderer Gewebearten. Darüber hinaus würde Fettgewebe auch im Rahmen einer potenziellen klinischen Anwendung als geeignete Quelle von Gefäßfragmenten in Frage kommen (Laschke et al., 2015) (Nunes et al., 2010). Wir entschieden uns daher für epididymales Fettgewebe als Quelle von Gefäßfragmenten.

Ähnlich den in dieser Studie verwendeten MVF sind stromale vaskuläre Fraktionen (SVF). SVF ermöglichen ebenso die Ausbildung eines mikrovaskulären Netzwerks und können aus

Nebenhodenfettgewebe (NHF) isoliert werden. Jedoch werden für die enzymatische Digestion im Rahmen des Isolationsprozesses von SVF aus NHF ca. 45 - 60 Minuten beansprucht, wohingegen die Isolation der MVF lediglich 8 bis 10 Minuten benötigt (Weisberg et al., 2003). Dies führt dazu, dass MVF aus einer Mischung unterschiedlicher Gefäßanteile bestehen, die unmittelbar an das bestehende Gefäßnetzwerk Anschluss finden können (Laschke & Menger 2015), wohingegen bei SVF einzelne Zellen isoliert werden, die zunächst Gefäßfragmente bilden müssen, um sich mit dem autochthonen Gefäßnetzwerk verbinden zu können (Koh et al., 2011). Folglich ist anzunehmen, dass diese Anbindung bei SVF länger als bei MVF dauert. Für eine adäquate Knochenheilung ist die Ausbildung eines mikrovaskulären Netzwerks im Kallusgewebe essenziell um den initial bindegewebigen und knorpeligen Kallus zu Geflechtknochen ausreifen zu lassen. Hierfür ist eine gute Versorgung des Kallus mit Sauerstoff und Nährstoffen von Nöten, welche durch eine gute Vaskularisierung erreicht werden kann (Shapiro, 2008). Da durch MVF eine schnellere Perfusion des Kallusgewebes angenommen werden kann als für SVF, haben wir uns in dieser Studie für MVF entschieden.

Aus Fettgewebe isolierte MVF stellen ein Gemisch verschiedener Gefäßsubtypen dar und bestehen aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen mit all deren speziellen Eigenschaften (Hoying et al., 1996) (Laschke & Menger, 2015). Die durchschnittliche Länge der Fragmente beträgt ca. 21 - 50 μm und es bestehen keine signifikanten Unterschiede in deren Eigenschaften bei Mäusen mit einem Alter bis zu 12 Monaten (Später et al., 2017). MVF beinhalten mesenchymale Stammzellen und setzen unter kontrollierten Bedingungen einer Zellkultur mehrere pro-angiogene Wachstumsfaktoren frei. MVF sind also nicht nur inaktive Gefäßbestandteile, sondern verfügen auch über ein großes regeneratives Potenzial (Laschke et al., 2012) (Laschke & Menger, 2015).

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnten wir nachweisen, dass MVF nach Kultivierung in TRH eine verringerte Apoptoserate gegenüber MVF ohne TRH aufwiesen, sodass wir TRH als geeignete Trägersubstanz für MVF einstufen. Obwohl hiermit keine Aussage zu einer möglichen Proliferationsrate von Zellen in TRH getroffen werden kann, erscheint uns die Kultivierung in vitro inkl. immunhistochemischer Casp-3-Färbung zur Analyse der Viabilität von MVF in TRH geeignet.

Neben der Analyse des Apoptoseverhaltens sollte die Stabilität und Integrität der MVF im TRH untersucht werden. Die Reifung kleiner Gefäße sowie die Ausbildung von Perizyten und glatter Muskulatur kann durch Nachweis des SMA-Proteins erfolgen (Nehls & Drenckhahn, 1991)

(Hellström et al., 2001). Wir entschieden uns daher in der vorliegenden Studie für eine α -SMA / CD31 Doppelimmunfluoreszenz-Färbung. In vitro wurden die Proben unmittelbar nach Einbettung (Tag 0), sowie nach Inkubation von 3 bzw. 7 Tagen analysiert. Der Zeitpunkt Tag 0 diente hierbei als interne Kontrolle des Isolations- und Einbettungsprotokolls sowie als Ausgangswert für die Folgezeitpunkte. Die beiden Folgezeitpunkte repräsentieren Zeitpunkte zur Beurteilung der Gefäßintegrität und des Apoptoseverhaltens im zeitlichen Verlauf. Nach entsprechendem Nachweis in vitro, dass das hier verwendete Hydrogel als Trägersubstanz für MVF geeignet ist, wurde die Wirkung von TRH und MVF auf die Knochenheilung in vivo untersucht.

Die mechanischen Gegebenheiten sind bekanntlich von großer Bedeutung für die Knochenheilung (Claes et al., 1998). Studien mit instabiler Osteosynthese bilden daher nur sehr eingeschränkt das klinische Bild einer Osteosynthese wider und sind daher nur sehr eingeschränkt aussagekräftig und übertragbar. Das von unserer Arbeitsgruppe entwickelte Pin-Clip-Modell stellt im Vergleich zur instabilen Pin-Osteosynthese eine Methode dar, welche die biomechanische Stabilität im Vergleich zu rein intramedullären Fixierungen signifikant verbessert (Garcia et al., 2008b).

Im vorliegenden Pin-Clip Modell konnte durch Implantation des zuerst eingebrachten intramedullären Pins die axiale Stabilität gesichert werden. Im Anschluss wurde zur Rotationsstabilisierung der Clip über einen lateralen Zugang eingebracht. Die nachfolgend induzierte Osteotomie erfolgte ebenfalls standardisiert.

Der Nachteil des Pin-Clip-Modells besteht, wie bei allen offenen Modellen, im höheren Grad der Invasivität im Vergleich zu den geschlossenen Frakturmodellen, die zum Teil nur über einen kleinen parapetallaren Schnitt operiert werden können. Trotz der invasiveren Operationsmethode konnten wir bereits nach dem ersten bzw. zweiten postoperativen Tag einen physiologischen Bewegungsablauf der Tiere beobachten, sodass von einer adäquaten Belastung der operierten Extremität bei korrekter Implantatlage ausgegangen werden kann.

Retrospektiv kann das gewählte Tiermodell ohne wesentliche Einschränkungen als reproduzierbar und für die Fragestellung geeignet beurteilt werden. Auch für Folgeversuche würden wir das Pin-Clip-Modell nutzen.

Die für den Eingriff nötige Allgemeinnarkose wurde wie vorab erwähnt mit Xylazin und Ketamin durchgeführt. Es handelte sich um eine einfach durchzuführende intraperitoneale

Injektion. Die Dauer der Narkose belief sich in etwa auf 30 Minuten und erwies sich für den durchgeführten Eingriff und die intra- bzw. postoperativen Röntgenkontrollen als suffizient.

Im Rahmen der Femur-Explantation konnten die Proben auf Anzeichen von Infekten oder anderen unerwarteten Pathologien hin untersucht werden.

Auf Grundlage vorangegangener Studien (Bourque et al., 1992) (Hiltunen et al., 1993b) wurden die Standzeiten auf 14 bzw. 35 Tage festgelegt. Die Knochenheilung der Maus verläuft nachweislich schneller als die des Menschen (Bourque et al., 1992). 2004 konnte von Manigrasso und O'Connor in einem Modell der ungestörten Frakturheilung gezeigt werden, dass es bei der Maus bereits nach 14 Tagen zur maximalen Kallusbildung kommt. Nach 35 Tagen ist die physiologische Knochenheilung bereits im fortgeschrittenen Stadium des Remodelings (Bourque et al., 1992) (Hiltunen et al., 1993) (Manigrasso & O'Connor, 2004). Hierdurch ist es in der vorliegenden Studie möglich, die Knochenheilung in den unterschiedlichen Gruppen sowohl zu einem frühen als auch zu einem späten Zeitpunkt zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Knochenheilung nach den oben erwähnten Zeitabschnitten mittels radiologischer, biomechanischer, histologischer und proteinbiochemischer Methoden untersucht. Generell ist es möglich die Knochenheilung am lebenden Tier zu analysieren. Hierfür stehen moderne Methoden wie z. B. die μ -Positronenemissionstomographie und μ -Magnetresonanztomographie und neue Techniken der molekularen Biolumineszenz- oder Nukleartomographie zur Verfügung. Hiermit können Aussagen zu Gewebemorphologie, Genexpression, Proteindegradation, Zellmigration und Zelltod in vivo getroffen werden (Lee et al., 2009) (Lu et al., 2005) (Zachos et al., 2007).

Radiologisch etablierte Verfahren sind neben der konventionellen Röntgenaufnahme vor allem die 2D und 3D μ CT. Der Nachteil des konventionellen Röntgenbilds ist, dass es sich um eine 2D Übersichtsaufnahme des Knochens handelt und somit lediglich eine Aussage zu Größe und Dichte des Kallus zulässt (Augat et al., 2005) (Garcia et al., 2008) (Holstein et al., 2007). Die μ CT bietet darüber hinaus die Möglichkeit der 3D Rekonstruktion sowie der genauen Dichtermittlung des Kallus und ermöglicht somit die bessere Zuordnung des Gewebetyps und dessen Quantifizierung (Holstein et al., 2007) (Cano et al., 2008).

In unserer Arbeit haben wir sowohl die konventionelle Röntgendiagnostik als auch die μ CT eingesetzt. Die Röntgenaufnahme diente unmittelbar postoperativ und auch zum Zeitpunkt der Tötung der Überprüfung der korrekten Implantatlage und zum Ausschluss von

Exklusionskriterien. Die μ CT diene vor allem der Erfassung des Knochenvolumens und der genaueren Spezifizierung des Kallus. Mittels 3D Rekonstruktion konnte der Defektspalt multiplanar untersucht und die Durchbauung der Osteotomie besser visualisiert und quantifiziert werden.

Zur Untersuchung der Biomechanik des Femurs gibt es mehrere Möglichkeiten. In der vorgelegten Studie wurde die Biegesteifigkeit des Knochens mittels nicht destruktiver 3-Punkt-Biegung bestimmt. Diese biomechanische Testung ist ein etabliertes Verfahren, welches die Berechnung der Biegesteifigkeit anhand eines Kraft-Weg-Diagramms ermöglicht (Histing et al., 2009). Es handelt sich hierbei um eine zerstörungsfreie Methode, sodass die Knochen anschließend für weitere Analysen wie z. B. die histologische Aufarbeitung zu Verfügung stehen. Die für die Studie benötigte Anzahl an Versuchstieren kann hierdurch im Vergleich zu einer destruktiven Methode reduziert werden. Ein Nachteil der 3-Punkt-Biegung ist, dass die maximale Belastung lediglich über einem isolierten Punkt des Knochens gemessen wird. Im Gegensatz dazu ermöglicht eine 4-Punkt-Biegung, die Messung über eine größere Fläche durchzuführen, was im Vergleich zur 3-Punkt-Biegung biomechanisch günstiger ist (Burstein et al., 1971). Jedoch sollte die Länge des Knochens hierfür mindestens das 16-fache des Durchmessers betragen um Messungenauigkeiten vorzubeugen (Manigrasso & O'Connor, 2004). Das durchschnittliche Femur einer Maus misst ca. 2 mm, die Länge des Knochens müsste also ungefähr 32 mm betragen um solche Messfehler zu verhindern. Aufgrund einer durchschnittlich deutlich kleineren Femurlänge von etwa 16 mm haben wir diese Methode nicht verwendet. Darüber hinaus wäre die Bestimmung einer Torsionssteifigkeit durch Rotationstestung denkbar gewesen. Diese Methode hat gegenüber einer 3-Punkt-Biegung den Vorteil, dass ein typischer Frakturmechanismus mit Rotationskomponente imitiert werden kann. Jedoch handelt es sich bei dieser Methode um ein destruktives Verfahren, sodass sich die Anzahl der benötigten Versuchstiere nahezu verdoppelt hätte. Daher haben wir uns in der vorliegenden Studie auf die 3-Punkt-Biegung als biomechanische Analyse konzentriert.

Der Goldstandard in der Analyse der Frakturheilung stellt die quantitative histologische Analyse dar (Gerstenfeld et al., 2005). Zur standardisierten Analyse wurde das heterogene 3D Konstrukt aus Femur, Fraktur und Kallusgewebe am maximalen Femurdurchmesser mittels sagittaler, longitudinaler Schnittführung bearbeitet und das Gewebe an dieser Stelle analysiert. Hierdurch konnten wir reproduzierbare und repräsentative Untersuchungen zu Kallusgröße und -zusammensetzung durchführen (Garcia et al., 2008b) (Holstein et al., 2007).

Eine histologische Auswertung der Frakturheilung kann sowohl am kalzifizierten als auch am dekalzifizierten Knochen stattfinden. Der Nachteil einer Analyse am dekalzifizierten Knochen ist, dass man nur schwer Aussagen über den Kalkgehalt im Gewebe treffen kann (Gerstenfeld et al., 2005). Trotzdem entschieden wir uns für die Untersuchung am dekalzifizierten Knochen, um diese Proben auch für die histochemische Färbung zur Osteoklastenaktivität verwenden zu können. Zudem war es mit Hilfe dieser Proben auch möglich, die Gefäßdichte zu bestimmen.

Da sowohl die Vaskularisierung als auch die Kalzifizierung des Kallus bereits nach einer etwa zweiwöchigen Frakturheilung zu beobachten sind, fanden alle Western Blot Untersuchungen nach einer 14 tägigen Studiendauer gemäß vorangegangener Studien statt (Bourque et al., 1992) (Hiltunen et al., 1993b).

Um einerseits die korrekte Durchführung der Transplantation von MVF zu verifizieren und die Anwesenheit der Endothelzellen in der Gruppe TRH+MVF zu bestätigen, haben wir einen quantitativen Nachweis des für Endothelzellen spezifischen CD31 Proteins mittels Western Blot durchgeführt.

Von großer Bedeutung für die Knochenheilung ist das Einsprießen von neuen Blutgefäßen. Hierdurch wird eine Weiterdifferenzierung mesenchymaler Zellen zu Chondrozyten während der sekundären Frakturheilung ermöglicht (Caplan, 1990). Eines der Schlüsselmoleküle für die Angiogenese im Rahmen der sekundären Frakturheilung ist der oben beschriebene Wachstumsfaktor VEGF (Brighton & Hunt, 1997) (Ferguson et al., 1999). Des Weiteren beeinflusst VEGF die Mineralisierung, die Kalzifizierung und die Formierung des neuen Knochengewebes direkt (Geiger et al., 2005) (Street et al., 2002). Um überprüfen zu können, in welchem Ausmaß VEGF im Kallusgewebe exprimiert wird und um somit Rückschlüsse auf Angiogenese und Knochenheilung in der frühen Heilungsphase treffen zu können, entschlossen wir uns, in der vorliegenden Arbeit die Expression von VEGF mittels Western Blot zu quantifizieren.

Darüber hinaus wurde auch die Expression der zur Familie der Tumornekrose-Faktoren gehörenden Proteine RANKL und OPG mittels Western Blot bestimmt. RANKL-defiziente Mäuse leiden an einer schweren Osteopetrose. Bei ihnen kann die Aktivierung, die Differenzierung und das Überleben der Osteoklasten nicht gewährleistet werden (Kong et al., 1999). Durch die Bindung von OPG an RANKL wird der aktivierende Effekt von RANKL auf die Osteoklastogenese gehemmt. OPG besitzt also einen Osteoid-stabilisierenden Einfluss (Hofbauer et al., 2000) (Takahashi et al., 1999). Um den Einfluss dieses Wechselspiels der

beiden Proteine RANKL und OPG auf die Knochenheilung untersuchen zu können, wurde zusätzlich die Expression dieser Proteine mittels Western Blot analysiert.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnten wir nachweisen, dass TRH die Viabilität der Gefäßfragmente *in vitro* erhält und als Trägermedium für MVF geeignet ist. Zudem konnten wir *in vivo* anhand des bewährten Pin-Clip Modells, mit MVF beladenes TRH präzise in den Osteotomiespalt applizieren. Hierdurch konnte die Vaskularisierung des Osteotomiespalts in der frühen Phase der Knochenheilung verbessert werden. Entgegen unserer Hypothese führte dies zu einer verzögerten Knochenheilung. Die alleinige Applikation von TRH im Vergleich zur Kontrollgruppe beeinflusste die Knochenheilung nicht.

Gemäß vorangegangener Studien konnten wir zeigen, dass ein Teil der MVF unmittelbar nach Isolation α -SMA⁺ waren (Laschke et al., 2012) (Shepherd et al., 2004) (Hoying et al., 1996). *In vitro* konnten in TRH eingebettete MVF über 7 Tage lang diese perivaskuläre, stabilisierende Zellmorphologie beibehalten. Im Gegensatz zeigte die Kontrollgruppe einen zunehmenden Verlust von α -SMA über den Studienzeitraum. In Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien scheint das Vorhandensein einer stabilisierenden 3D Matrix von essenzieller Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Zellintegrität und Viabilität von Gefäßen zu sein (Laschke et al., 2016) (Ott et al., 2008) (Song et al., 2011). Interessanterweise ist darüber hinaus auch die Zusammensetzung einer solchen Matrix relevant. Shepherd et al. konnten zeigen, dass die Beladung von Kollagen-Gelen mit MVF ebenfalls zu einem Verlust der stabilisierenden α -SMA-Umhüllung führt (Shepherd et al., 2004). Um als Trägersubstanz erfolgreiche Anwendung zu finden, sollte eine Matrix also optimalerweise die Viabilität des inkorporierten biologischen Materials gewährleisten. In der vorliegenden Studie konnten wir in Proben der Gruppe TRH+MVF weniger apoptotische Endothelzellen bzw. perivaskuläre Zellen *in vitro* nachweisen. Folglich ermöglicht TRH eine gute Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff aus der jeweiligen Umgebung. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit Mortisen et al., die eine hohe Viabilität für in TRH eingebettete hTERT-BJ1 Fibroblasten nachweisen konnten (Mortisen et al., 2010).

Ein weiterer Vorteil von TRH ist, dass es sich flexibel an die ortsspezifischen Gegebenheiten anpassen und dort gemäß seiner thermoresponsiven Eigenschaft gelartig aushärten kann.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass TRH zügig *in vivo* abgebaut wird. Histologische Analysen an osteotomierten Kaninchen-Humeri, deren Defekt mit TRH aufgefüllt wurde, zeigten ein schaumiges und bläulich verfärbtes Zytoplasma der Makrophagen im Kallus auf. Dies deutet auf den Abbau einer Fremdschubstanz hin. Bei dieser Substanz könnte es sich um den nicht löslichen poly(N-Isopropylacrylamid)-Anteil des TRH handeln (Ter Boo et al., 2018). Nach vier Wochen konnten in diesem Modell keine substantiellen Überreste des TRH mehr beobachtet werden (Ter Boo et al., 2018). Der Abbau des eingesetzten TRH erfolgt hierbei vor allem durch enzymatischen und oxidativen Abbau der HA (Mortisen et al., 2004).

Durch unsere vielversprechenden *in vitro* Ergebnisse wurde der Effekt von MVF-beladenem TRH auf die Knochenbruchheilung *in vivo* analysiert. Es ist hinlänglich bekannt, dass eine gestörte Durchblutung zu einem drastischen Anstieg der Rate an Pseudarthrosen führt (Bahney et al., 2015). Die Applikation von MVF als natürliche Vaskularisierungseinheiten interagieren schnell untereinander, integrieren sich zügig in die autochthonen mikrovaskulären Strukturen und bilden damit ein gut durchblutetes mikrovaskuläres Netzwerk (Laschke & Menger, 2015) (Shepherd et al., 2004) (Nakano et al., 1997). Analog hierzu konnten wir in unserer Arbeit im Vergleich zu Kontrollfemora eine verbesserte Vaskularisierung im Kallus der TRH+MVF nachweisen. Dies wurde mittels einer signifikant gesteigerten CD31 Expression im Kallus der Femora 14 Tage postoperativ, sowie mittels der signifikant erhöhten Anzahl an Gefäßen im Kallus dieser Femora in der Histologie gezeigt. Entgegen unserer Erwartungen, wurde hierdurch jedoch die Knochenheilung nicht gefördert, sondern die knöchernen Ausheilung wurde sogar gestört. Dies wurde durch ein reduziertes Knochenvolumen, eine herabgesetzte biomechanische Stabilität und einen histologisch geringeren Überbrückungs-Score nachgewiesen.

Es ist möglich, dass die Ursache der gestörten Knochenheilung die signifikant reduzierte VEGF Expression im Kallus der TRH+MVF Femora 14 Tage postoperativ war. VEGF ist ein starker Stimulus für die Angiogenese und das enchondrale Knochenwachstum (Carano et al., 2003). Während sich in der ersten Phase der Frakturheilung das Frakturhämatom ausbildet, kommt es in der zweiten Phase zur Rekrutierung von Entzündungszellen, Fibroblasten und Stammzellen. Dies führt zur Ausbildung eines weichen Kallus. In dieser Phase wird physiologischerweise VEGF stark exprimiert, welches nicht nur für die Angiogenese in dieser Phase, sondern auch für die ausreichende Kallusbildung und Mineralisierung zu einem späteren Zeitpunkt von Bedeutung ist (Carano et al., 2003). Da VEGF darüber hinaus die Differenzierung von

Osteoblasten begünstigt, stellt VEGF einen essenziellen Bestandteil und ein wichtiges Bindeglied zwischen Angio- und Osteogenese in der frühen Knochenheilung dar (Carano et al., 2003) (Street et al., 2002) (Peng et al., 2002). Es darf daher spekuliert werden, dass die gestörte Knochenheilung in Tieren der TRH+MVF Gruppe, durch die herabgesetzte VEGF Expression während der frühen Phase der Frakturheilung zu erklären ist.

Die reduzierte VEGF Expression im Kallus der TRH+MVF Femora war überraschend, da MVF in der Lage sind pro-angiogene Wachstumsfaktoren, inklusive VEGF, zu sezernieren (Laschke et al., 2012). Die niedrigere VEGF-Expression ist möglicherweise durch eine schnellere Normoxie im Kallusgewebe zu erklären. Hypoxie ist bekanntlich der stärkste Stimulus für die Produktion von VEGF. Durch die Applikation von MVF in unserer Arbeit kam es zu einer beschleunigten Vaskularisierung des Osteotomiespalts und damit zu einer früheren Normoxie im Kallusgewebe. Die optimierte Perfusion kann zu einem reduzierten Stimulus für die Produktion von VEGF geführt haben. Darüber hinaus könnte ein verbesserter Anschluss des Kallusgewebes an das systemische Gefäßnetzwerk in der Gruppe TRH+MVF zu einem beschleunigten Abtransport von VEGF im Kallusgewebe in den Systemkreislauf geführt haben, was im Übrigen einen der wichtigsten Regulationsmechanismus der lokalen VEGF Wirkung darstellt (Vempati et al., 2014).

Eine weitere Hypothese wäre, dass das TRH selbst einen Einfluss auf die endogene VEGF Expression hat. Studien konnten zeigen, dass hochmolekulare HA mit einem Molekulargewicht von mehr als 0,5 MDa antiphlogistische und antiangiogene Eigenschaften hat. Niedermolekulare HA weist tendenziell eher gegenteilige Effekte auf (Stern et al., 2006). Da das Gewicht der in dieser Studie angewendeten HA 0,28 MDa betrug und Tiere der Gruppe TRH keinerlei Störung der Knochenheilung zeigte, erscheint es unwahrscheinlich, dass das TRH für die reduzierte VEGF Expression verantwortlich ist.

Eine weitere Erklärung für die gestörte Knochenheilung könnte sein, dass die TRH Matrix die vom Gewebe sezernierten Wachstumsfaktoren in ihrer Wirkung beeinträchtigt hat. Dies stünde allerdings im Widerspruch mit vorangegangenen Studien, in der TRH eingesetzt wurde, um die Freisetzung von Bone Morphogenetic Protein (BMP)-2 zu untersuchen. BMP-2 zeigte in vitro eine normale Aktivität nach Einbettung in TRH (Seelbach et al., 2015) (Petta et al., 2016). Darüber hinaus konnten Peattie et al. zeigen, dass TRH und VEGF sogar einen starken synergistischen Effekt haben. Nach Applikation von VEGF-beladenem TRH in Ohrmuscheln

von Mäusen zeigte sich im Vergleich zur Applikation von VEGF allein eine erhöhte Dichte an Mikrogefäßen (Peattie et al., 2004). Daher erscheint eine beeinträchtigende Wirkung der Wachstumsfaktoren durch das TRH als unwahrscheinliche Ursache für die gestörte Knochenheilung.

Die späte Phase der Knochenheilung ist durch die Aushärtung und Mineralisierung des Kallus zu festem Geflechtknochen gekennzeichnet und schließt mit dem Remodeling ab. Western Blot Analysen konnten eine starke Expression von RANKL in Femora der Gruppe TRH+MVF nachweisen. Im Gegensatz dazu unterschied sich die Expression des physiologischen Antagonisten OPG in keiner der 3 Gruppen. Der Einfluss der RANKL Expression auf die Knochenheilung wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einerseits führt eine herabgesetzte RANKL Expression bei Mäusen unter Pantoprazol- oder Melatonintherapie zu einer verzögerten Frakturheilung durch Störung des Remodelings (Histing et al., 2012) (Histing et al., 2012b). Andererseits führt eine anti-RANKL Therapie mit OPG zu einer stärkeren Verknöcherung und Stabilität von Osteosynthesematerial in situ (Bernhardsson et al., 2015). Darüber hinaus führte bei Mäusen mit größeren Knochendefekten eine duale Therapie mit OPG und BMP-2 im Vergleich zu einer Monotherapie mit BMP-2 zu einer gesteigerten Frakturheilung (Bougioukli et al., 2016).

In der vorliegenden Arbeit war das Verhältnis von RANKL / OPG bei Tieren der Gruppe TRH+MVF deutlich zu Gunsten von RANKL verschoben. Ähnliche RANKL / OPG Verhältnisse konnten bei Patienten mit schwerer Osteolyse nachgewiesen werden (Grimaud et al., 2003). Darüber hinaus führt eine RANKL Überexpression zu Osteoporose und einem gesteigerten Knochenabbau in Folge vermehrter Osteoklastenaktivierung (Pérez-Sayáns et al., 2010). Im Einklang mit diesen Ergebnissen fanden wir in unserer Arbeit eine pathologisch gesteigerte Osteoklastenaktivität in Kallusgewebe der TRH+MVF Femora in der frühen Phase der Knochenheilung. Die gestörte Knochenheilung bei diesen Tieren könnte also auch eine Folge dieses Ungleichgewichts zwischen RANKL und OPG sein.

Zusammenfassend konnten wir in dieser Studie zeigen, dass TRH eine geeignete Trägersubstanz für MVF ist, und es deren Viabilität und Integrität bewahrt. Des Weiteren konnten wir nachweisen, dass die Applikation von TRH und MVF die Vaskularisierung im Frakturspalt signifikant verbessert. Entgegen unserer Erwartungen führte dies jedoch zu einer gestörten Knochenheilung. Dies lässt sich am ehesten durch eine reduzierte VEGF Expression

und eine Verschiebung des RANKL / OPG Verhältnisses in der frühen Phase der Knochenheilung erklären.

5.3. Schlussfolgerungen

- Die Viabilitätsanalyse in vitro war standardisiert und reproduzierbar. Sie ergab einen stabilisierenden Einfluss von TRH auf MVF. TRH war folglich als Trägersubstanz für MVF geeignet.
- Das für unsere Studie verwendete Tiermodell erwies sich als geeignet, um die Wirkung von TRH bzw. TRH+MVF auf die Frakturheilung zu untersuchen. Die entsprechenden mikrocomputertomographischen, biomechanischen, histologischen und proteinbiochemischen Untersuchungen lieferten zuverlässige Daten.
- Weder nach 14, noch nach 35 Tagen fanden sich signifikante Unterschiede zwischen Tieren der Gruppe TRH und Kontrollen. TRH scheint die Frakturheilung nicht zu beeinflussen.
- Die Applikation von MVF-beladenem TRH fördert zwar die Vaskularisierung des Osteotomiespalts, stört jedoch die Knochenheilung. Dies ist am ehesten durch eine verminderte Expression von VEGF und ein verändertes Gleichgewicht angiogener und osteogener Wachstumsfaktoren und verstärkter Osteoklastenaktivität zu erklären.

6. Literaturverzeichnis

1. Adams DS, Klevjer-Anderson P, Carlson JL, McGuire TC, Gorham JR (1983) Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am J Vet Res.* 44: 1670-5
2. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature.* 390: 175-9
3. Ashhurst DE, Hogg J, Perren SM (1982) A method for making reproducible experimental fractures of the rabbit tibia. *Injury.* 14: 236-42
4. Augat P, Simon U, Claes L (2005) Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. *Osteoporos Int.* 16: 36-43
5. 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, Wurzingler LJ, Zilch HG (2007) *Duale Reihe Anatomie.* 1. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart
6. Bahney CS, Hu DP, Miclau T 3rd, Marcucio RS (2015) The multifaceted role of the vasculature in endochondral fracture repair. *Front Endocrinol.* 6: 4
7. Baird A, Mormede P, Bohlen P (1985) Immunoreactive fibroblast growth factor in cells of peritoneal exudate suggests its identity with macrophage-derived growth factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 126: 358-64
8. Baumbach GA, Saunders PT, Ketcham CM, Bazer FW, Roberts RM (1991) Uteroferrin contains complex and high mannose-type oligosaccharides when synthesized in vitro. *Mol Cell Biochem.* 105: 107-17
9. Beamer B, Hettrich C, Lange J (2010) Vascular Endothelial Growth Factor: An Essential Component of Angiogenesis and Fracture Healing. *HSS J.* 6: 85-94
10. Berchtold R, Bruch HP, Trentz O (2008) *Berchtold Chirurgie.* 6. Auflage. Elsevier. München
11. Bernhardsson M, Sandberg O, Aspenberg P (2015) Anti-RANKL treatment improves screw fixation in cancellous bone in rats. *Injury.* 46: 990-5
12. Black J, Balligand MH, Nunamaker DM, Brighton CT (1985) Electrical Stimulation of fresh fractures: Faradic stimulation of tibial osteotomies in the dog. *Trans Orthop Res Soc.* 10: 29
13. Boecker W, Denk H, Heits PU (2004) *Pathologie.* 3. Auflage. Elsevier. München

14. Bolander ME (1992) Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med.* 200: 165-70
15. Bonnarens F, Einhorn TA (1984) Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res.* 2: 97-101
16. Bosemark P, Isaksson H, McDonald MM, Little DG, Tägil M (2013) Augmentation of autologous bone graft by a combination of bone morphogenic protein and bisphosphonate increased both callus volume and strength. *Acta Orthop.* 84: 106-11
17. Bougioukli S, Jain A, Sugiyama O, Tinsley BA, Tang AH, Tan MH, Adams DJ, Kostenuik PJ, Lieberman JR (2016) Combination therapy with BMP-2 and a systemic RANKL inhibitor enhances bone healing in a mouse critical-sized femoral defect. *Bone.* 84: 93-103
18. Bourque WT, Gross M, Hall BK (1992) A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Lab Anim Sci.* 42: 369-74
19. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 423: 337-42
20. Brighton CT, Hunt RM (1997) Early histologic and ultrastructural changes in microvessels of periosteal callus. *J Orthop Trauma.* 11: 244-53
21. Brighton CT, Hozack WJ, Brager MD, Windsor RE, Pollack SR, Vreslovic EJ, Kotwick JE (1985) Fracture Healing in the rabbit fibula when subjected to various capacitively coupled electrical fields. *J Orthop Res.* 3: 331-40
22. Bucher O, Wartenberg H (1997) *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen.* 12. Auflage. Huber. Bern
23. Burstein AH, Frankel VH (1971) A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech.* 4: 155-8
24. Cano J, Campo J, Vaquero JJ, Martínez González JM, Basones A (2008) High resolution image in bone biology II. Review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 13: E31-5
25. Caplan AI (1990) Cartilage begets bone versus endochondral myelopoiesis. *Clin Orthop Relat Res.* 257: 267
26. Carano RA, Filvaroff EH (2003) Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today.* 8: 980-9
27. Carlevaro MF, Cermelli S, Cancedda R, Descalzi Cancedda F (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci.* 113: 59-69

28. Chao EY, Aro HAT, Lewallen DG, Kelly PJ (1989) The effect of rigidity on fracture healing in external fixation. *Clin Orthop Relat Res.* 241: 24-35
29. Cheal EJ, Mansmann KA, DiGioia AM 3rd, Hayes WC, Perren SM (1991) Role of interfragmentary strain in fracture healing: ovine model of a healing osteotomy. *J Orthop Res.* 9: 131-42
30. 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: 685-90
31. Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D, Seidl W, Margevicius KJ, Augat P (1998) Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clin Orthop Relat Res.* 355: S132-47
32. Coetzee M, Kruger MC (2004) Osteoprotegerin-receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand ratio: a new approach to osteoporosis treatment?. *South Med J.* 97: 506-11
33. Critchlow MA, Bland YS, Ashhurst DE (1995) The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit. *Bone.* 16: 521-7
34. Curtis MJ, Brown PR, Dick JD, Jinnah RH (1995) Contaminated fractures of the tibia: a comparison of treatment modalities in an animal model. *J Orthop Res.* 13: 286-95
35. Danckwardt-Lilieström G, Lorenzi GL, Olerud S (1970) Intramedullary nailing after reaming. An investigation on the healing process in osteotomized rabbit tibias. *Acta Orthop Scand Supp.* 134: 1-78
36. Darnell MC, Sun JY, Mehta M, Johnson C, Arany PR, Suo Z, Mooney DJ (2013) Performance and biocompatibility of extremely tough alginate/polyacrylamide hydrogels. *Biomaterials.* 34:8042-8
37. Daum WJ, Chang SL, Simmons DJ, Webster D, Shoenecker PL (1983) Healing of canine femoral osteotomies. Effects of compression plates versus Eggers' plates. *Clin Orthop Relat Res.* 180: 291-300
38. Davis JM, Arakawa T, Strickland TW, Yphantis DA (1987) Characterization of recombinant erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry.* 26: 2633-8
39. Davy DT, Connolly JF (1982) The biomechanical behavior of healing canine radii and ribs. *J Biomech.* 15: 235-47
40. Deibert MC, McLeod BR, Smith SD, Liboff AR (1994) Ion resonance electromagnetic field stimulation of fracture healing in rabbits with a fibular osteotomy. *J Orthop Res.* 12: 878-85

41. D'Este M, Alini M, Eglin D (2012) Single step synthesis and characterization of thermoresponsive hyaluronan-hydrogels. *Carbohydr Polym.* 90: 1378-85
42. Egger EL, Gottsauner-Wolf F, Palmer J, Aro HAT, Chao EY (1993) Effects of axial dynamization on bone healing. *J Trauma.* 34: 185-92
43. Einhorn TA (1995) Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am.* 77: 940-56
44. Einhorn TA (1998) The cell and molecular biology of fracture-healing. *Clin Orthop Relat Res.* 355: S7-21
45. Ferguson C, Alpern E, Micalau T, Helms JA (1999) Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation?. *Mech Dev.* 57: 57-66
46. Ferrara N, Henzel WJ (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 161: 851-8
47. Fleisch H (1997) Bisphosphonates: mechanisms of action and clinical use in osteoporosis-an update. *Horm Metab Res.* 29: 145-50
48. Friedman RJ, An YH, Ming J, Draughn RA, Bauer TW (1996) Influence of biomaterial surface texture on bone ingrowth in the rabbit femur. *J Orthop Res.* 14: 455-64
49. Frost HM (1987) Bone „mass“ and „mechanostat“: a proposal. *Anat Rec.* 219: 1-9
50. 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: 1689-96
51. Garcia P, Holstein JH, Maier S, Schaumloffel H, Al-Marrawi F, Hannig M, Pohlemann T, Menger MD (2008b) Development of a reliable non-union model in mice. *J Surg Res.* 147: 84-91
52. Garcia P, Herwerth S, Matthys R, Holstein JH, Histing T, Menger MD, Pohlemann T (2009) The LockingMouseNail-A New Implant for Standardized Stable Osteosynthesis in Mice. *J Surg Res.* 169: 220-6
53. Garcia P, Speidel V, Scheuer C, Laschke MW, Holstein JH, Histing T, Pohlemann T, Menger MD (2011) Low dose erythropoietin stimulates bone healing in mice. *J Orthop Res.* 29: 165-72
54. Geiger F, Bertram H, Berger I, Lorenz H, Wall O, Eckhardt C, Simank HG, Richter W (2005) Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J Bone Miner Res.* 20: 2028-35

55. Georgiadis GM, Minster GJ, Moed BR (1990) Effects of dynamization after interlocking tibial nailing: an experimental study in dogs. *J Orthop Trauma.* 4: 323-30
56. 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: 623-8
57. Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA (2005) Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. *J Bone Miner Res.* 20: 1715-22
58. Glowacki J (1998) Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* 355: S82-9
59. Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J (1989) Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86: 7311-5
60. Gown AM, Willingham MC (2002) Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *J Histochem Cytochem.* 50: 449-54
61. Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, Coipeau P, Moreau A, Passuti N, Gouin F, Redini F, Heymann D (2003) Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (Rankl)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am J Pathol.* 163: 2021-31
62. Harper J, Klagsbrun M (1999) Cartilage to bone-angiogenesis leads the way. *Nat Med.* 5: 617-8
63. Hausman MR, Schaffler MB, Majeska RJ (2001) Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone.* 29: 560-4
64. Hellström M, Gerhardt H, Kalén M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C (2001) Lack of Pericytes Leads to Endothelial Hyperplasia and Abnormal Vascular Morphogenesis. *J Cell Biol.* 153: 543-54
65. Henry WB Jr, Schachar NS, Wadsworth PL, Castronovo FP Jr, Mankin HJ (1985) Feline model for the study of frozen osteoarticular hemijoint transplantation: qualitative and quantitative assessment of bone healing. *Am J Vet Res.* 46: 1714-20
66. Herrgesell JD (1967) Aspirin poisoning in the cat. *J Am Vet Med Assoc.* 151: 452-5
67. Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P (1995) An experimental model for non-union in rats. *Injury.* 26: 681-6
68. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT (1993) A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res.* 11: 305-12

69. Hiltunen A, Aro HAT, Vuorio E (1993b) Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice. *Clin Orthop Res.* 23-7
70. Histing T, Holstein JH, Garcia P, Matthys R, Kristen A, Claes L, Menger MD, Pohlemann T (2009a) Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture. *J Orthop Res.* 27: 1152-6
71. Histing T, Garcia P, Matthys R, Leidinger M, Holstein JH, Kristen A, Pohlemann T, Menger MD (2009b) An internal locking plate to study intramembranous bone healing in a mouse femur fracture model. *J Orthop Res.* 28: 397-402
72. 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
73. 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: 507-14
74. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL (2000) The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 15: 2-12
75. Holstein JH, Menger MD, Scheuer C, Meier C, Culemann U, Wirbel RJ, Garcia P, Pohlemann T (2007) Erythropoietin (EPO): Epo-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing. *Life Sci.* 80: 893-900
76. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T (2007b) Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech.* 40: 215-9
77. Holstein JH, Klein M, Garcia P, Histing T, Culemann U, Pizanis A, Laschke MW, Scheuer C, Meier C, Schorr H, Pohlemann T, Menger MD (2008) Rapamycin affects early fracture healing in mice. *Br J Pharmacol.* 154: 1055-62
78. Holstein JH, Garcia P, Histing T, Kristen A, Scheuer C, Menger MD, Pohlemann T (2009) Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration. *J Orthop Trauma.* 23: S31-8
79. Holstein JH, Matthys R, Histing T, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Meier C, Pohlemann T, Menger MD (2009b) Development of a stable closed femoral fracture model in mice. *J Surg Res.* 153: 71-5

80. Hoying JB, Boswell CA, Williams SK (1996) Angiogenic potential of microvessel fragments established in three-dimensional collagen gels. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 32: 409-19
81. Isaksson H, Gröngröft I, Wilson W, van Donkelaar CC, van Rietbergen B, Tami A, Huiskes R, Ito K (2009) Remodeling of fracture callus in mice is consistent with mechanical loading and bone remodeling theory. *J Orthop Res.* 27: 664-72
82. Ito H, Akiyama H, Shigeno C, Iyama K, Matsuoka H, Nakamura T (1999) Hedgehog signaling molecules in bone marrow cells at the initial stage of fracture repair. *Biochem Biophys Res Commun.* 262: 443-51
83. Iwaki A, Jingushi S, Oda Y, Izumi T, Shida HI, Tsuneyoshi M, Sugioka Y (1997) Localization and quantification of proliferating cells during rat fracture repair: detection of proliferating cell nuclear antigen by immunohistochemistry. *J Bone Miner Res.* 12: 96-102
84. Jones RD, Baynes RE, Nimitz CT (1992) Nonsteroidal anti-inflammatory drug toxicosis in dogs and cats: 240 cases (1989-1990). *J Am Vet Med Assoc.* 201: 475-7
85. Johnson A, Stein LE (1988) Morphologic comparison of healing patterns in ethylene oxide-sterilized cortical allografts and untreated cortical autografts in the dog. *Am J Vet Res.* 49: 101-5
86. Junqueira LC, Carneiro J, Gratzl M (2004) *Histologie. Neue Approbationsordnung.* 6. Auflage. Springer. Berlin
87. Kaplan SJ, Hayes WC, Mudan P, Lelli JL, White AA (1985) Monitoring the healing of a tibial osteotomy in the rabbit treated with external fixation. *J Orthop Res.* 3: 325-30
88. Kim YH, Bae YH, Kim SW (1994) pH/temperature-sensitive polymers for macromolecular drug loading and release. *J Control Release.* 28: 143-52
89. Kirker-Head CA, Gerhart TN, Schelling SH, Hennig GE, Wang E, Holtrop ME (1995) Long-term healing of bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2. *Clin Orthop Relat Res.* 318: 222-30
90. Koh YJ, Koh BI, Kim H, Joo HJ, Jin HK, Jeon J, Choi C, Lee DH, Chung JH, Cho CH, Park WS, Ryu JK, Suh JK, Koh GY (2011) Stromal vascular fraction from adipose tissue forms profound vascular network through the dynamic reassembly of blood endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vas.* 31: 1141-50
91. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos A, Van G, Itie A (1999) OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature.* 397: 315-23

92. Köttstorfer J, Thomas A, Gregori M, Kecht M, Kaiser G, Eipeldauer S, Sarahrudi K (2014) Are OPG and RANKL involved in human fracture healing?. *J Orthop Res.* 32: 1557-61
93. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 93: 165-76
94. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-5
95. Laschke MW, Kleer S, Scheuer C, Schuler S, Garcia P, Eglin D, Alini M, Menger MD (2012) Vascularisation of porous scaffolds is improved by incorporation of adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater.* 24: 266-77
96. Laschke MW, Menger MD (2015) Adipose tissue-derived microvascular fragments: natural vascularisation units for regenerative medicine. *Trends Biotechnol.* 33: 442-8
97. Laschke MW, Kleer S, Scheuer C, Eglin D, Alini M, Menger MD (2015) Pre-cultivation of adipose tissue-derived microvascular fragments in porous scaffolds does not improve their in vivo vascularisation potential. *Eur Cell Mater.* 29: 190-200
98. Laschke MW, Menger MD (2016) Prevascularization in tissue engineering: current concepts and future directions. *Biotechnol Adv.* 34: 112-21
99. Lee DY, Cho TJ, Kim JA, Lee HR, Yoo WJ, Chung CY, Choi IH (2008) Mobilization of endothelial progenitor cells in fracture healing and distraction osteogenesis. *Bone.* 42: 932-41
100. Lee SW, Padmanabhan P, Ray P, Gambhir SS, Doyle T, Contag C, Goodman SB, Biswal S (2009) Stem cell-mediated accelerated bone healing observed with in vivo molecular and small animal imaging technologies in a model of skeletal injury. *J Orthop Res.* 27: 295-302
101. Lenehan TM, Balligand M, Nunamaker DM, Wood FEJ (1985) Effect of EHDP on fracture healing in dogs. *J Orthop Res.* 3: 499-507
102. Lewallen DG, Chao EY, Kasman RA, Kelly PJ (1984) Comparison of the effects of compression plates and external fixators on early bone-healing. *J Bone Joint Surg Am.* 66: 1084-91
103. Lu C, Micalau T, Hu D, Hansen E, Tsui K, Puttlitz C, Marcucio RS (2005) Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *J Orthop Res.* 23: 1300-7
104. Lüllmann-Rauch (2006) Taschenlehrbuch Histologie. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart

105. Mikheeva LM, Grinberg NV, Mashkevich AY, Grinberg VY, Thanh LTM, Makhaeva EE, Khokhlov AR (1997) Microcalorimetric Study of Thermal Cooperative Transitions in Poly(N-vinylcaprolactam) Hydrogels. *Macromolecules*. 30: 2693
106. Manigrasso MP, O'Connor JP (2004) Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma*. 18: 687-95
107. Minkin C (1992) Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int*. 34: 285-90
108. Morgan EF, Mason ZD, Chien KB, Pfeiffer AJ, Barnes GL, Einhorn TA, Gerstenfeld LC (2009) Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone*. 44: 335-44
109. Mortisen D, Peroglio M, Alini M, Eglin D (2010) Tailoring thermoreversible hyaluronan hydrogels by „click“ chemistry and RAFT polymerization for cell and drug therapy. *Biomacromolecules*. 11: 1261-72
110. Myeroff C, Archdeacon M (2011) Autogenous bone graft: donor sites and techniques. *J Bone Joint Surg Am*. 93: 2227-36
111. Nakano M, Nakajima Y, Tsuchida Y, Kudo S, Nakamura H, Fukuda O (1997) Direct evidence of a connection between autotransplanted microvessel fragments and the host microvascular system. *Int J Microcirc Clin Exp*. 17: 159-63
112. 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: 651-9
113. Nehls V, Drenckhahn D (1991) Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type alpha-actin. *J Cell Biol*. 113: 147-54
114. Nguyen TB, Lee BT (2014) A combination of biphasic calcium phosphate scaffold with hyaluronic acid-gelatin hydrogel as a new tool for bone regeneration. *Tissue Eng Part A*. 20: 1993-2004
115. Nunamaker DM, Perren SM (1979) A radiological and histological analysis of fracture healing using prebending of compression plates. *Clin Orthop Relat Res*. 138: 167-74
116. Nunamaker DM, Richardson DW, Butterveck DM (1991) Mechanical and biological effects of plate luting. *J Orthop Trauma*. 5: 138-45
117. Nunamaker DM (1998) Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*. 355: 56-65
118. Nunes SS, Krishnan L, Gerard CS, Dale JR, Maddie MA, Benton RL, Hoying JB (2010) Angiogenic potential of microvessel fragments is independent of the tissue of origin

- and can be influenced by the cellular composition of the implants. *Microcirculation*. 17: 557-67
119. Ohya S, Nakayama Y, Matsuda T (2001) Thermoresponsive artificial extracellular matrix for tissue engineering: hyaluronic acid bioconjugated with poly(N-isopropylacrylamide) grafts. *Biomaterials*. 2: 856-63
 120. Ohya S, Sonoda H, Nakayama Y, Matsuda T (2005) The potential of poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted hyaluronan and PNIPAM-grafted gelatin in the control of post-surgical tissue adhesions. *Biomaterials*. 26: 655-9
 121. Ornstein L (1964) Disc Electrophoresis. I. Background and theory. *Ann N Y Acad Sci*. 28: 321-49
 122. 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
 123. Orth M, Altmeyer MAB, Scheuer C, Braun BJ, Holstein JH, Eglin D, D'Este M, Histing T, Laschke MW, Pohlemann T, Menger MD (2018) Effects of locally applied adipose tissue-derived microvascular fragments by thermoresponsive hydrogel on bone healing. *Acta Biomater*. 77: 201-11
 124. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, Taylor DA (2008) Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*. 14: 213-21
 125. Patterson J, Siew R, Herring SW, Lin AS, Guldberg R, Stayton PS (2010) Hyaluronic acid hydrogels with controlled degradation properties for oriented bone regeneration. *Biomaterials*. 31: 6772-81
 126. Peattie RA, Nayate AP, Firpo MA, Shelby J, Fisher RJ, Prestwich GD (2004) Stimulation of in vivo angiogenesis by cytokine-loaded hyaluronic acid hydrogel implants. *Biomaterials*. 25: 2789-98
 127. Pelton RH, Chibante P (1986) Preparation of aqueous latices with N-isopropylacrylamide. *Colloids and Surfaces*. 20: 247-56
 128. Peng H, Wright V, Usas A, Hearhart 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: 751-9
 129. Pérez-Sayáns M, Somoza-Marín JM, Barros-Angueira F, Rey JM, García-García A (2010) *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 109: 679-96

130. Peroglio M, Grad S, Mortisen D, Sprecher CM, Illien-Jünger S, Alini M, Eglin D (2012) Injectable thermoreversible hyaluronan-based hydrogels for nucleus pulposus cell encapsulation. *Eur Spine J.* 6: S839-49
131. Peroglio M, Eglin D, Benneker LM, Alini M, Grad S (2013) Thermoreversible hyaluronan-based hydrogel supports in vitro and ex vivo dis-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Spine J.* 13: 1627-39
132. Perren SM, Huggler A, Russenberger M, Allgower M, Mathys R, Schenk R, Willenegger H, Muller ME (1969) The reaction of cortical bone to compression. *Acta Orthop Scand Suppl.* 125: 19-29
133. Peter CP, Cook WO, Nunamaker DM, Provost MT, Seefor JG, Rodan GA (1996) Effect of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs. *J Orthop Res.* 14: 74-9
134. Petta D, Fussell G, Hughes L, Buechter DD, Sprecher CM, Alini M, Eglin D, D'Este M (2016) Calcium phosphate/thermoresponsive hyaluronan hydrogel composite delivering hydrophilic and hydrophobic drugs. *J Orthop Transl.* 5: 57-68
135. Pilia M, McDaniel JS, Guda T, Chen XK, Rhoads RP, Allen RE, Corona BT, Rathbone CR (2014) Transplantation and perfusion of microvascular fragments in a rodent model of volumetric muscle loss injury. *Eur Cell Mater.* 28: 11-23
136. Puech B, Cameli M, Chancrin JL, Pierre C, Dufour M, Elizagaray A (1990) Biointegration of massive bone allografts: imaging and histological studies in cat. *Biomaterials.* 11: 75-8
137. Qi B, Yu J, Zhao Y, Zhu D, Yu T (2016) Mouse fracture models: a primer. *Int J Clin Exp Med.* 9: 12418-29
138. Ramkisson-Ganorkar C, Liu F, Baudys M, Kim SW (1999) Effect of molecular weight and polydispersity on kinetics of dissolution and release from pH/temperature-sensitive polymers. *J Biomater Sci Polym Ed.* 10: 1149-61
139. Raymond S, Weintraub L (1959) Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science.* 130: 711
140. Rhineland FW (1974) Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 105: 34-81
141. Richardson DW, Nunamaker DM (1991) Evaluation of plate luting, using an in vivo ovine osteotomy model. *Am J Vet Res.* 52: 1468-73
142. Rodan GA, Martin TJ (1981) Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption: a hypothesis. *Calcif Tissue Int.* 33: 349-51

143. Rossant J, Nagy A (1995) Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat Med.* 1: 592-4
144. Roush JK, Wilson JW (1990) Effects of plate luting on cortical vascularity and development of cortical porosity in canine femurs. *Vet Surg.* 19: 208-14
145. Rueda J, Zschoche S, Komber H, Schmaljohann D, Voit B (2005) Synthesis and characterization of thermoresponsive graft co-polymers of NIPAAm and 2-alkyl-2-oxazolines by the „grafting from“ method. *Macromolecules.* 38: 7330-6
146. Rueter A, Trentz O, Wagner M (2003) *Unfallchirurgie.* 2. Auflage. Elsevier. München
147. Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Budziak ME, Greenwald LA, Luchs JS, Spector JA, Ueno H, Gittes GK, Longaker MT (1999) Transforming growth factor-beta1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts. *Am J Physiol.* 277: C628-37
148. Scharf HP, Rüter A, Pohlemann T, Marzi I, Kohn D, Günther KP (2009) *Orthopädie und Unfallchirurgie: Facharztwissen nach der neuen Weiterbildungsordnung.* 1. Auflage. Elsevier. München
149. Schemitsch EH, Kowalski MJ, Swiontkowski MF, Senft D (1994) Cortical bone blood flow in reamed and unreamed locked intramedullary nailing: a fractured tibia model in sheep. *J Orthop Trauma.* 8: 373-82
150. Schemitsch EH, Kowalski MJ, Swiontkowski MF, Harrington RM (1995) Comparison of the effect of reamed and unreamed locked intramedullary nailing on blood flow in the callus and strength of union following fracture of the sheep tibia. *J Orthop Res.* 13: 382-9
151. 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
152. Schiebler TH, Korf HW (2007) *Anatomie.* 10. Auflage. Springer. Berlin
153. Schiebler TH, Schmidt W (2003) *Anatomie.* 8. Auflage. Springer. Berlin
154. Schmaljohann D (2006) Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 58: 1655-70
155. Seelbach RJ, Fransen P, Pulida D, D'Este M, Duttonhoefer F, Sauerbier S, Freiman TM, Niemeyer P, Albericio F, Alini M, Royo M, Mata A, Eglin D (2015) Injectable hyaluronan hydrogels with peptide-binding dendrimers modulate the controlled release of BMP-2 and TGF- β 1. *Macromol Biosci.* 15: 1035-44

156. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 219: 983-5
157. Serres A, Baudys M, Kim SW (1996) Temperature and pH-sensitive polymers for human calcitonin delivery. *Pharm Res*. 13: 196-201
158. Shapiro F (2008) Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater*. 15: 53-76
159. Shepherd BR, Chen HY, Smith CM, Gruionu G, Williams SK, Hoying JB (2004) Rapid perfusion and network remodeling in a microvascular construct after implantation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24: 898-904
160. Shimokado K, Raines EW, Madtes DK, Barrett TB, Benditt EP, Ross R (1985) A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell*. 43: 277-86
161. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 89: 309-19
162. Song JJ, Ott HC (2011) Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends Mol Med*. 17: 424-32
163. Später T, Körbel C, Frueh FS, Nickels RM, Menger MD, Laschke MW (2017) Seeding density is a crucial determinant for the in vivo vascularisation capacity of adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater*. 34: 55-69
164. Stafford HJ, Roberts MT, Oni OO, Hay J, Gregg P (1994) Localisation of bone-forming cells during fracture healing by osteocalcin immunocytochemistry: an experimental study of the rabbit tibia. *J Orthop Res*. 12: 29-39
165. Steen H, Fjeld TO, Bjerkreim I, Tevik A, Aldegheri R, Trivella G (1988) Limb lengthening by diaphyseal corticotomy, callus distraction, and dynamic axial fixation. An experimental study in the ovine femur. *J Orthop Res*. 6: 730-5
166. Steen H, Fjeld TO (1989) Lengthening osteotomy in the metaphysis and diaphysis. An experimental study in the ovine tibia. *Clin Orthop Relat Res*. 247: 297-305
167. Stern R, Asari AA, Sugahara KN (2006) Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol*. 85: 699-715

168. 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 USA*. 99: 9656-61
169. Strong ML, Wong-Chun J, Babikian G, Brody A (1992) Rotational remodeling of malrotated femoral fractures: a model in the rabbit. *J Pediatr Orthop*. 12: 173-6
170. Sugihara S, Yamashita K, Matsuzuka K, Ikeda F, Maeda Y (2012) Transformation of Living Cationic Polymerization of Vinyl Ethers to RAFT Polymerization Mediated by a Carboxylic RAFT Agent. *Macromolecules*. 45: 794-804
171. Takahashi N, Udagawa N, Suda T (1999) A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun*. 256: 449-55
172. Takata S, Suzuki K, Norisuye T, Shibayama M (2002) Dependence of shrinking kinetics of poly(N-isopropylacrylamide) gels on preparation temperature. *Polymer*. 43: 3101-7
173. Tan H, Ramirez CM, Milijkovic N, Li H, Rubin JP, Marra KG (2009) Thermosensitive injectable hyaluronic acid hydrogel for adipose tissue engineering. *Biomaterials*. 30: 6844-53
174. Tang S, Zhao J, Xu S, Li J, Teng Y, Quan D, Guo X (2012) Bone induction through controlled release of novel BMP-2-related peptide from PTMC₁₁-F127-PTMC₁₁ hydrogels. *Biomed Mater*. 7: 015008
175. Teitelbaum SL, Ross FP (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet*. 4: 638-49
176. Ter Boo GJ, Schmid T, Zderic I, Nehrass D, Camenisch K, Richards RG, Grijpma DW, Moriarty TF, Eglin D (2018) Local application of a gentamicin-loaded thermo-responsive hydrogel allows for fracture healing upon clearance of a high *Staphylococcus aureus* load in a rabbit model. *Eur Cell Mater*. 35: 151-64
177. Terjesen T, Johnson E (1986) Effects of fixation stiffness on fracture healing. External fixation of tibial osteotomy in the rabbit. *Acta Orthop Scand*. 57: 146-8
178. Thomann KD, Schröter F, Grosser V (2009) Orthopädisch-unfallchirurgische Begutachtung: Praxis der klinischen Begutachtung. 1. Auflage. Elsevier. München.
179. Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, Crisp T, Fiddes JC, Abraham JA (1989) Vascular endothelial growth factor: a new member of the

- platelet-derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun.* 165: 1198-206
180. Toombs JP, Wallace LJ, Bjorling DE, Rowland GN (1985) Evaluation of Key's hypothesis in the feline tibia: an experimental model for augmented bone healing studies. *Am J Vet Res.* 46: 513-8
181. Tremain N, Korkko J, Ibberson D, Kopen GC, DiGirolamo C, Phinney DG (2001) MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages. *Stem Cells.* 19: 408-18
182. Tsangari H, Findlay DM, Kuliwaba JS, Atkins GJ, Fazzalari NL (2004) Increased expression of IL-6 and RANK mRNA in human trabecular bone from fragility fracture of the femoral neck. *Bone.* 35: 334-42
183. Tucker KL, Hannan MT, Qiao N, Jacques PF, Selhub J, Cupples LA, Kiel DP (2005) Low plasma vitamin B12 is associated with lower BMD: the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res.* 20: 152-8
184. Utvag SE, Grundnes O, Reikeras O (1994) Healing of segmental and simple fractures in rats. *Acta Orthop Scand.* 65: 559-63
185. Vempati P, Popel AS, Mac Gabhann F (2014) Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25: 1-19
186. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante Jr AW (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 112: 1796-808
187. Willie BM, Blakytyn R, Glöckelmann M, Ignatius A, Claes L (2011) Temporal variation in fixation stiffness affects healing by differential cartilage formation in a rat osteotomy model. *Clin Orthop Relat Res.* 469: 3094-101
188. Wingerter S, Calvert G, Tucci M, Tsao A, Russell G, Benhguzzi H (2007) Comparison of two different fixation techniques for a segmental defect in a rat femur model. *J Invest Surg.* 20: 149-55
189. Yamagiwa H, Tokunaga K, Hayami T, Hatano H, Uchida M, Endo N, Takahashi HE (1999) Expression of metalloproteinase-13 (Collagenase-3) is induced during fracture healing in mice. *Bone.* 25: 197-203
190. 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 USA*. 95: 3597-602

191. Zachos TA, Bertone AL, Wassenaar PA, Weisbrode SE (2007) Rodent models for the study of articular fracture healing. *J Invest Surg*. 20: 87-94
192. Zhao L, Weir MD, Xu HH (2010) An injectable calcium phosphate-alginate hydrogel-umbilical cord mesenchymal stem cell paste for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 31: 6502-10
193. Zou L, Nair A, Wenig H, Tsai YT, Hu Z, Tang L (2011) Intraocular pressure changes: an important determinant of the biocompatibility of intravitreal implants. *PLoS One*. 6: e28720

7. Abkürzungs- / Abbildungs- / Tabellenverzeichnis

7.1. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
&	und
<	Kleiner
>	Größer
±	Plusminus
®	Registered Trademark
°	Grad
°C	Grad Celsius
α	Alpha
β	Beta
μA	Mikroampère
μCT	Mikrocomputertomographie
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
A	Ampère
AAc	Acrylic acid (Acrylsäure)
Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of Variance
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
APS	Ammoniumpersulfat

Aqua dest.	Aqua destillata (Destilliertes Wasser)
ASIF	Association for the study of internal fixation
BMA	Buthylmethacrylat
BMD	Bone mineral density (Knochendichte)
BRU	Bone remodeling Unit (Knochenremodelingeinheit)
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cu	Kupfer
CuAAC	Copper (I) catalyzed azide-alkyne cycloaddition (Kupfer (I) katalysierte Azid-Alkyl Cycloaddition)
d	day(s) (Tag(e))
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ECWM	Endothelzell-Wachstumsmedium
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
et al.	et alii (und andere)
EZM	Extrazellulärmatrix
FGF	Fibroblast growth factor
FKS	Fötales Kälberserum
G	Erdbeschleunigung

g	Gramm
g/cm ³	Gramm pro Kubikzentimeter
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde(n)
HA	Hyaluronic acid (Hyaluronsäure)
HA-PNIPAM	Hyaluronic acid poly(N-isopropylacrylamide) (Hyaluronsäure poly(<i>N</i> -Isopropylacrylamid)
HCl	Salzsäure
HE	Eisenhämatoxylin
hMSC	Human mesenchymal stem cells (humane mesenchymale Stammzellen)
HU	Hounsefield unit
IgG	Immunglobulin G
KNa	Kaliumnatrium
kV	Kilovolt
LCST	Lower critical solution temperature (untere kritische Lösungstemperatur)
Lig.	Ligamentum
lp/mm	Linepairs per milimeter (Linienpaare pro Millimeter)
M	Molar
mA	Milliampère
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
mm ³	Kubikmillimeter

ms	Millisekunden
MVF	Mikrovaskuläre Fragmente
N	Stickstoff
N/mm	Newton pro Millimeter
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
Ø	Durchmesser
OP	Operation
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet derived growth factor
PEtOx	Poly(N-Ethyloxazoline)
pH	Potentia Hydrogenii
PNIPAM	Poly(N-isopropylacrylamide) (poly(N-Isopropylacrylamid))
POD	Peroxidase
RAFT	Reversible addition-fragmentation chain transfer
RANKL	Receptor activator of NF-κB Ligand (Rezeptor-aktivierter NF-κB Ligand)
ROI	Region of interest
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwerts)
SMA	Smooth muscle actin

Tab.	Tabelle
TBS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-buffered saline (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-gepufferte Kochsalzlösung)
TBS-T	TRIS-buffered saline with Tween20
TGF	Transforming growth factor
TRAP	Tartrate Resistant Acid Phosphatase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vs	versus
W	Watt
WB	Western Blot
x	Multiplikationszeichen
zB.	zum Beispiel

7.2. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Strukturformel von PNIPAM
- Abb. 2: Strukturformel von HA-PNIPAM
- Abb. 3: Fixierung des Beins während der Operation
- Abb. 4: Sicht auf das Ligamentum patellae nach medio-patellarem Zugang
- Abb. 5: Luxation der Patella nach lateral und Sicht auf die Fossa intercondylaris
- Abb. 6: Markraumeröffnung im Bereich der Fossa intercondylaris
- Abb. 7: Sondierung des Markraumes und Vermessung der Markraumlänge

- Abb. 8: Einbringung und anschließende Kürzung des Pins
- Abb. 9: Reposition der Patella mit Naht der Patellarsehne sowie anschließender Hautnaht
- Abb. 10: Eröffnung des lateralen Zugangswegs und stumpfe Freilegung des Femurs.
- Abb. 11: Eröffnen des Situs zur Implantation des Clips über lateralen Zugang
- Abb. 12: Bohrung der Bohrlöcher zur Implantation des Clips
- Abb. 13: Einbringung des zuvor auf die Distanz der Bohrlöcher angepassten Clips
- Abb. 14: Vollständige Clip-Implantation und anschließend Biegung der dorsalen Enden
- Abb. 15: Osteotomie mittels Gigli-Säge (Drahtstärke 0,25 mm)
- Abb. 16: Spülung und Trocknung des Osteotomiespalts
- Abb. 17: Applikation von 10 µl Verum (TRH bzw. TRH+MVF)
- Abb. 18: Aushärtung des Hydrogels unter einer Wärmelampe bei einer Temperatur im Situs von > 33 °C
- Abb. 19: Adaptierende Muskelnaht mit 5-0 Prolene® unter der Wärmelampe
- Abb. 20: Abschließende Hautnaht mit 5-0 Prolene® und OP Ende
- Abb. 21: Schematische Darstellung der histologischen Auswertungsparameter.
- Abb. 22: Immunhistochemische Doppelfluoreszenzfärbung von α -SMA und CD31
- Abb. 23: Prozentualer Anteil an α -SMA+ MVF
- Abb. 24: Immunhistochemische Doppelfluoreszenzfärbung von Casp-3 und CD31
- Abb. 25: Analyse Casp-3+ Endothelzellen
- Abb. 26: Immunhistochemische Doppelfluoreszenzfärbung von Casp-3 und CD31
- Abb. 27: Analyse Casp-3+ perivaskuläre Zellen
- Abb. 28: Röntgenaufnahmen osteotomierter Femora 14 und 35 Tage postoperativ
- Abb. 29: Knochenvolumen im Kallus 14 Tage postoperativ
- Abb. 30: Knochenvolumen im Kallus 35 Tage postoperativ
- Abb. 31: μ CT 3D Rekonstruktionen der Femora 14 und 35 Tage postoperativ

- Abb. 32: Relative Biegesteifigkeit von osteotomierten Femora 14 Tage postoperativ
- Abb. 33: Relative Biegesteifigkeit von osteotomierten Femora 35 Tage postoperativ
- Abb. 34: Repräsentative histologische Bilder zur Auswertung von Blutgefäßen im Kallusgewebe nach HE Färbung
- Abb. 35: Anzahl Gefäße / HPF 14 Tage postoperativ
- Abb. 36: Anzahl Gefäße / HPF 35 Tage postoperativ
- Abb. 37: Histologische Aufarbeitung mittels Safranin-O / Fast-Green-Färbung
- Abb. 38: Histologische Analyse der Kalluszusammensetzung 14 Tage postoperativ
- Abb. 39: Histologische Analyse der Kalluszusammensetzung 35 Tage postoperativ
- Abb. 40: Überbrückungsscore des Osteotomiespalts 14 Tage postoperativ
- Abb. 41: Überbrückungsscore des Osteotomiespalts 35 Tage postoperativ
- Abb. 42: Repräsentative histologische Bilder zur Auswertung der Osteoklastenaktivität im Kallusgewebe nach TRAP Färbung
- Abb. 43: Anzahl TRAP+ Zellen 14 Tage postoperativ
- Abb. 44: Western Blot Analyse der CD31 Expression 14 Tage postoperativ
- Abb. 45: Western Blot Analyse der VEGF Expression 14 Tage postoperativ
- Abb. 46: Western Blot Analyse der OPG Expression 14 Tage postoperativ
- Abb. 47: Western Blot Analyse der RANKL Expression 14 Tage postoperativ

7.3. Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Versuchsprotokoll in vitro Studie
- Tab. 2: Versuchsprotokoll in vivo Studie.
- Tab. 3: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele für den Western Blot
- Tab. 4: Primärantikörper für den Western Blot
- Tab. 5: Sekundärantikörper für den Western Blot

8. Publikationen

Diese Arbeit wurde auf verschiedenen nationalen und internationalen Kongressen vorgestellt und wie folgt publiziert:

Vorträge:

Orth M, Altmeyer M, Stenger D, Braun B, Holstein JH, Pohlemann T, Laschke MW, Menger MD (2016) Die Applikation von mikrovaskulären Fragmenten mittels thermoresponsivem Hydrogel stört die Frakturheilung. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, Berlin, Deutschland

Orth M, Altmeyer M, Stenger D, Braun B, Holstein JH, Pohlemann T, Laschke MW, Menger MD (2017) The application of microvascular fragments loaded thermoresponsive hydrogel impairs the bone healing in mice. Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Diego, USA

Publikation:

Orth M, Altmeyer MAB, Scheuer C, Braun BJ, Holstein JH, Eglin D, D'Este M, Histing T, Laschke MW, Pohlemann T, Menger MD (2018) Effects of locally applied adipose tissue-derived microvascular fragments by thermoresponsive hydrogel on bone healing. *Acta Biomater.* 77: 201-11

9. Danksagungen

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

Meinem Doktorvater Herrn *Prof. Dr. med. Tim Pohlemann* danke ich für die hervorragenden Möglichkeiten und die Überlassung des Themas.

Meinem Betreuer Herrn *Dr. med. Marcel Orth* danke ich ganz besonders für die freundschaftliche, unermüdliche und ausgezeichnete Betreuung. Ohne seine Beratung und Unterstützung während der gesamten Zeit wäre die Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn *Prof. Dr. med. Michael D. Menger* danke ich für seine Hilfe bei der Durchführung der Arbeit, für das Bereitstellen der Räumlichkeiten und Gerätschaften sowie für seine konstruktiven Ratschläge.

Frau *Dr. rer. med. Claudia Scheuer*, Frau *Julia Parakenings* und Frau *Janine Becker* möchte ich ganz besonders für die großartige und tatkräftige Unterstützung in der Durchführung der histologischen und proteinbiochemischen Arbeiten sowie für das Einarbeiten im Labor danken.

Frau *Dr. med. vet. Monika Frings* danke ich für die Unterstützung und ihr Einverständnis zur Durchführung der Tierversuche.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Kollegen des Instituts für Klinische & Experimentelle Chirurgie für die stets kollegiale und freundliche Atmosphäre sowie die ausgezeichnete Zusammenarbeit bedanken.

Meinen Eltern, meiner Familie, meiner Freundin und meinen Freunden danke ich für die Liebe und Unterstützung während meiner gesamten Laufbahn.