

Aus dem Bereich

Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Emmanouil Liodakis, MBA, FEBOT

Einfluss von Clopidogrel auf die Frakturheilung im murinen Ischämiemodell

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2025

vorgelegt von: Lukas Keller

geboren am: 07.05.1998

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	2
2	Abkürzungsverzeichnis	5
3	Zusammenfassung/Abstract	7
4	Einleitung.....	10
4.1	Knochen	10
4.1.1	Funktion.....	10
4.1.2	Histologie.....	10
4.2	Wachstumsfaktoren	12
4.2.1	RANKL/RANK/OPG-Trias.....	12
4.2.2	Runt-related transcription factor 2 (RUNX2).....	13
4.2.3	Bone morphogenetic protein (BMP)	13
4.2.4	Cysteine-rich angiogenic inducer 61 (Cyr61)	13
4.2.5	Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)	14
4.2.6	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (CD31)	14
4.2.7	Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3Ks)	15
4.2.8	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	15
4.3	Frakturen	16
4.3.1	Frakturmechanismen	16
4.3.2	Frakturformen	16
4.3.3	Frakturheilung.....	17
4.3.4	Frakturmodelle.....	19
4.4	Clopidogrel	23
4.4.1	Struktur.....	24
4.4.2	Wirkmechanismus	24
4.4.3	Pharmakokinetik	25
4.4.4	Anwendung und Indikation.....	27

4.4.5	Nebenwirkungen.....	28
4.5	Zielsetzung	29
4.6	Fragestellung.....	30
5	Material und Methoden	31
5.1	Methoden	31
5.1.1	Studiendesign.....	31
5.1.2	Tiermodell.....	32
5.1.3	Operationsverfahren.....	32
5.1.4	Medikamentenapplikation	37
5.1.5	Tötung der Tiere	38
5.1.6	Knochenpräparation	38
5.2	Zielkriterien und Auswertung	39
5.2.1	Biomechanik.....	39
5.2.2	Radiologie	39
5.2.3	Computertomographie.....	40
5.2.4	Histomorphometrie	41
5.2.5	Biochemie / Western Blot.....	43
5.3	Statistik.....	45
6	Ergebnisse.....	46
6.1	Biomechanik	46
6.2	Radiologie	47
6.3	Computertomographie	48
6.4	Histomorphometrie	50
6.5	Biochemie / Western Blot.....	53
7	Diskussion	59
7.1	Diskussion der Methoden	59
7.2	Diskussion der Ergebnisse	64
8	Literaturverzeichnis.....	68
9	Abbildungsverzeichnis	79

10	Tabellenverzeichnis.....	81
11	Danksagung.....	82
12	Publikationen.....	84
12.1	Vorträge.....	84
12.2	Publikation.....	84
13	Lebenslauf	85

2 Abkürzungsverzeichnis

°	Grad
°C	Grad Celsius
µA	Mikroampere
µl	Mikroliter
A.	Arteria
ACOS-Register	deutsches Register für das akute Koronarsyndrom
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Aktiengesellschaft
AHA	American Heart Association
AO	Arbeitsgruppe Osteosynthese
ASS	Acetylsalicylsäure
AUC	Area under the curve
BDm	Femurdurchmesser
BMP	Bone morphogenetic protein
BV	Bone Volume
C	Kohlenstoff
CA	California
CD31	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül
CDm	Kallusdurchmesser
Cl	Chlor
cm	Zentimeter
C _{max}	maximale Konzentration
Co KG	Compagnie Kommanditgesellschaft
CYP	Cytochrom P
Cyr61	Cysteine-rich angiogenic inducer 61
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Luminol-enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESC	Europäische Gesellschaft für Kardiologie
et al.	et alii
etc.	et cetera
g	Gramm
G	Gauge
GI	gastrointestinal
GmbH	Gemeinschaft mit beschränkter Haftung
GP	Glykoprotein
H	Wasserstoff
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IL	Illinois
Inc.	Incorporated
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kV	Kilovolt
M	Molar
MA	Massachusetts

min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar, Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
mm ³	Kubikmillimeter
MW	Mittelwert
N	Stickstoff, Newton
N.	Nervus
Na	Natrium
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
N-STEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarktes
O	Sauerstoff
Ø	Durchmesser
OP	Operation
OPG	Osteoprotegerin
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PI3Ks	Phosphoinositid-3-Kinasen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTCA	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
RANK	Receptor Activator of NF-κB
RANKL	Rezeptor-Aktivator von NF-κB-Ligand
ROI	Region of interest
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
s	Sekunde
S	Schwefel
SEM	Standardfehler
STEMI	ST-Hebungsinfarkt
TbN	Trabekelanzahl
TbSp	Trabekelabstand
TbTh	Trabekeldicke
TGF-β	Transforming growth factor β
TIP	Target-Intensitätspixel
TTP	Thrombotisch-Thrombozytopenische Purpura
TV	Kallusvolumen
U/min	Umdrehungen pro Minute
USA	United States of America
V.	Vena
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VOI	Volume of interest
vs.	versus
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer

3 Zusammenfassung/Abstract

Einfluss von Clopidogrel auf die Frakturheilung im murinen Ischämiemodell

Clopidogrel wird als Thrombozytenaggregationshemmer zur Sekundärprophylaxe von Myokard- und Hirninfarkten sowie bei der Therapie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) eingesetzt [110]. Die Perfusion beziehungsweise ausreichende Vaskularisierung und Angiogenese sind zugleich auch entscheidende Faktoren für eine erfolgreiche Frakturheilung. Der Einfluss von Clopidogrel auf die Frakturheilung unter physiologischen Bedingungen wird derzeit kontrovers diskutiert. Ob Clopidogrel die Frakturheilung unter ischämischen Bedingungen beeinflusst, wurde bisher nicht untersucht. Ziel dieser Studie war es, erstmals den Einfluss von Clopidogrel auf die Frakturheilung in einem Ischämiemodell in vivo zu analysieren.

In 46 CD-1 Mäusen wurde mittels Ligatur der Arteria profunda femoris eine milde Ischämie im Bereich der rechten unteren Extremität induziert [110]. Anschließend wurde das Femur geschlossen frakturiert und eine osteosynthetische Versorgung mittels intramedullärer Kompressionsschraube durchgeführt. Den Tieren wurde täglich 3 mg/kg Körpergewicht Clopidogrel per os appliziert (n=25, Clopidogrel-Gruppe). Die Kontrollgruppe erhielt täglich die äquivalente Menge Natriumchlorid per os (n=21, Kontrollgruppe). Zwei und fünf Wochen postoperativ wurden biomechanische (Biegesteifigkeit [N/mm]), radiologische (Röntgen (Goldberg-Score) und micro-computertomographische (Trabekeleigenschaften, Kallusvolumen [mm³], Knochenvolumen [mm³]), histomorphometrische (Kallusfläche [mm²], Kalluszusammensetzung) sowie proteinbiochemische Untersuchungen durchgeführt.

Biomechanisch zeigte sich nach Gabe von Clopidogrel fünf Wochen postoperativ keine signifikante Änderung der Biegesteifigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe [110]. Röntgenologische und computertomographische Parameter wiesen keine signifikanten Unterschiede in der Clopidogrel-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Histomorphometrisch zeigte der Histoscore signifikant verminderte Werte in Tieren der Clopidogrel-Gruppe. Zudem fand sich histologisch fünf Wochen postoperativ ein signifikant verringerter Knochenanteil und korrespondierend hierzu ein erhöhter Anteil an Bindegewebe nach Clopidogrel-Applikation. In der proteinbiochemischen Analyse konnte eine signifikant verminderte Expression von BMP-4 als osteogener Marker bei vermehrter Expression von angiogenem CD31 nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass Clopidogrel die Frakturheilung unter ischämischen Bedingungen am Mausmodell beeinträchtigt und den Remodeling-Prozess verzögert, ohne jedoch die Knochenheilung insgesamt zu verhindern [110]. Dieser Effekt ist am ehesten auf ein zu Gunsten der Angiogenese verschobenes Verhältnis angiogener und osteogener Expressionsmarker im Kallusgewebe zurückzuführen.

Effect of clopidogrel on fracture healing under ischemic conditions

Clopidogrel is used as an antiplatelet agent for the secondary prevention of myocardial and cerebral infarctions and in the treatment of peripheral arterial occlusive disease (PAD) [110]. Perfusion or sufficient vascularization and angiogenesis are also decisive factors for successful fracture healing. The influence of clopidogrel on fracture healing under physiological conditions is currently the subject of controversial debate. Whether clopidogrel influences fracture healing under ischemic conditions has not yet been investigated. The aim of this study was to analyze for the first time the influence of clopidogrel on fracture healing in an ischemia model *in vivo*.

In 46 CD-1 mice, mild ischemia was induced in the right lower limb by ligation of the profunda femoris artery [110]. The femur was then fractured closed and osteosynthetic treatment was performed using an intramedullary compression screw. The animals were given 3 mg/kg body weight of clopidogrel *per os* daily (n=25, clopidogrel group). The control group received the equivalent amount of sodium chloride *per os* daily (n=21, control group). Two and five weeks postoperatively, biomechanical (bending stiffness [N/mm]), radiological (X-ray (Goldberg score) and micro-computed tomography (trabecular properties, callus volume [mm³], bone volume [mm³]), histomorphometric (callus area [mm²], callus composition) and protein biochemical examinations were performed.

Biomechanically, there was no significant change in bending stiffness five weeks postoperatively after administration of clopidogrel compared to the control group [110]. Radiographic and computed tomographic parameters showed no significant differences in the clopidogrel group compared to the control group. Histomorphometrically, the histoscore showed significantly reduced values in animals in the clopidogrel group. In addition, histologically five weeks postoperatively, there was a significantly reduced proportion of bone and correspondingly an increased proportion of connective tissue after clopidogrel application. Protein biochemical analysis revealed a significantly reduced expression of BMP-4 as an osteogenic marker with increased expression of angiogenic CD31.

In summary, the data of the present study show that clopidogrel impairs fracture healing under ischemic conditions in the mouse model and delays the remodeling process without, however, preventing bone healing altogether [110]. This effect is most likely due to a shift in the ratio of angiogenic and osteogenic expression markers in the callus tissue in favor of angiogenesis.

4 Einleitung

4.1 Knochen

4.1.1 Funktion

Das aus circa 200 Knochen bestehende ossäre System des Menschen erfüllt gleichzeitig mehrere Funktionen [7,140]. Dazu zählen neben der Stützfunktion auch die Aufgabe, empfindliche Weichorgane wie zum Beispiel das in der Schädelkalotte befindliche Gehirn zu schützen. Weitere Organe, beispielsweise das Herz und die Lunge, werden durch den knöchernen Thorax vor äußeren Einflüssen abgeschirmt. Des Weiteren besitzt der Körper die Fähigkeit, die hohe Kalziumkonzentration der Knochen als puffernden Speicher für die Homöostase des Mineralstoffwechsels zu nutzen. Zusätzlich findet im Knochenmark ein Großteil der postnatalen Hämatopoese statt.

4.1.2 Histologie

Die Grundbausteine des Knochengewebes lassen sich in zwei Klassen einteilen - die organischen beziehungsweise zellulären und die anorganischen beziehungsweise mineralischen Bestandteile [125]. Osteozyten, Osteoklasten, Osteoblasten sowie die Grundsubstanz, welche aus Glykoproteinen (Osteonektin, Osteopontin), Proteoglykanen und Kollagen-Typ I-Fasern besteht, werden zur Gruppe der organischen Bestandteile zugeordnet. Kalzium und Mineralstoffe hingegen zählen zu den anorganischen Elementen. Im Knochen wird durch Osteoblasten das organische Gerüst namens Osteoid gebildet, welches aus intrazellulären Substanzen wie Fasern und Grundsubstanz besteht und durch Einlagerung von Kalksalzen (kristallines Hydroxylapatit) die für Knochen typische Härte gewährleistet. Nach Ausreifung der Osteoblasten werden diese zu Osteozyten, welche in Lakunen der Knochenmatrix eingeschlossen sind. Als Gegenspieler des ossären Anabolismus bezeichnet man die Osteoklasten. Diese sind mehrkernige Riesenzellen mit der Fähigkeit, Knochensubstanz abzubauen, um so beispielsweise bei Bedarf den Kalziumgehalt im Blut anzuheben.

Im menschlichen Körper werden zwei Knochenarten differenziert [125]. Zu Beginn der Knochenbildung entsteht der Geflechtknochen mit einem hohen Anteil ungerichteter Kollagenfibrillen, welcher im Verlauf aufgrund von Umbauprozessen in Lamellenknochen überführt wird. Dieser Lamellenknochen lässt sich in zwei

Erscheinungsformen unterteilen. Er kann sowohl als feine Knochenbälkchen (Substantia spongiosa) als auch in kompakter Form (Substantia compacta) auftreten. Die Substantia spongiosa stellt das hohlraumfüllende Innenleben des Knochens dar, welches von der Substantia compacta als feste äußere Umwandlung eingehüllt wird. Beide Typen des Lamellenknochens werden zusätzlich von einer Gewebsschicht umgeben, die außen um den Knochen herum Periost und im Inneren Endost genannt wird [140]. Das Endost legt sich hülsenförmig von innen an den Knochen an, wohingegen das Periost den Knochen von außen umschließt und mithilfe von Kollagenfaserbündeln (Sharpey-Fasern) fixiert wird, welche senkrecht zur Knochenoberfläche verlaufen [133]. Das Periost separiert sich wiederum in zwei Schichten. Die äußere, relativ dünne und überwiegend fibröse Faserschicht (Stratum fibrosum) ist gekennzeichnet durch kollagene Faserbündel sowie eine reduzierte fibroblastäre Zellpopulation. Konträr dazu wird die innere Periostschicht (Stratum osteogenicum) von zahlreichen mesenchymalen Zellen und Gefäßen durchzogen [108,133].

Der Geflechtknochen tritt hauptsächlich in der Phase der Knochenbildung auf und wird zusätzlich im Verlauf der Frakturheilung gebildet [108]. Er zeichnet sich durch ein ungeordnetes Geflecht aus Kollagenfasern aus, welche teils in groben, teils in feinen Bündeln zufällig verteilt vorliegen. Im Vergleich zum Lamellenknochen besitzt der Geflechtknochen mehr Osteozyten und weniger mineralische Bestandteile, wodurch er insgesamt weniger mechanisch belastbar ist. Aus diesem Grund erfolgt in der Regel eine Umwandlung in Lamellenknochen.

Namensgebend für den Lamellenknochen sind die in ihm verlaufenden Lamellensysteme, welche durch eine geschichtete Anordnung von Kollagenfibrillen entstehen und ihm so eine regelmäßige Struktur verleihen [125]. Den zentralen und größten Bestandteil des Lamellenknochens bilden die zylindrischen Osteone (Havers-Systeme) mit einer Länge von 1 bis 2,5 cm und einem Durchmesser von 50 µm. Diese verlaufen regelhaft in Längsrichtung des Knochens und parallel zu dessen Außenhülle [108,125]. Sie sind jedoch keine abgeschlossenen Einheiten, sondern können untereinander spitzwinklige Verzweigungen ausbilden. Im Zentrum jedes Osteons liegt ein Havers-Kanal, der sich dadurch kennzeichnet, dass er von Blutgefäßen durchzogen und schraubenförmig von Kollagenfasern lamellenartig umhüllt wird. Bestimmend ist dabei der Steigungswinkel der Windungen, welcher die mechanischen Eigenschaften der Knochen beeinflusst – steilere Windungen sind zugfester, wohingegen ein flacherer Winkel der Fasern die Druckfestigkeit erhöht [125]. Die Lakunen, welche die Zellkörper der Osteozyten beherbergen, befinden sich zwischen den Knochenlamellen. Die Zellfortsätze der Osteozyten ziehen durch dünne Canaliculi in die Lamellen hinein. Entstehen durch solche Canaliculi Zellkontakte zwischen Osteozyten, so nennt man

diese Verbindung einen Nexus, über welchen Diffusionsprozesse stattfinden können. Aufgrund ständig anhaltender Umbauprozesse werden alte Osteone abgebaut und von neuen verdrängt. Die bruchstückhaften Reste alter Osteone, welche die Räume zwischen den neu gebildeten Osteonen füllen, bezeichnet man als Schaltlamellen oder interstitielle Lamellen. Zusätzlich zu den längs verlaufenden Osteonen gibt es rechtwinklig verlaufende Volkmann-Kanäle (Canales perforantes), welche eine Kollateralbildung zwischen den Havers-Kanälen und Verbindungen zu Periostgefäßen bewirken.

4.2 Wachstumsfaktoren

Am Knochenmetabolismus sind verschiedene Wachstumsfaktoren als Regulatoren beteiligt. Eine Auswahl derer wurde zur Analyse des Heilungsverhaltens herangezogen und wird im Folgenden kurz vorgestellt.

4.2.1 RANKL/RANK/OPG-Trias

In den späten 1990er Jahren wurde eine Trias aus Ligand, Modulator und Rezeptor entdeckt, welche einen entscheidenden Einfluss auf den Stoffwechsel der Knochen hat [85].

Bei dem Rezeptor-Aktivator von NF- κ B (RANK)-Ligand handelt es sich um einen Tumornekrosefaktor, welcher hauptsächlich auf den Membranen von Osteoblasten und aktivierten T-Zellen gebunden ist und beispielsweise von aktivierten T-Zellen sezerniert wird [14,85]. Durch Aktivierung des Transmembranrezeptors RANK auf Zellen der Monozyten-/Makrophagen-Linie aktiviert RANKL deren Differenzierung zu Osteoklasten und verlängert das Überleben der knochenabbauenden Zellen. Die Übereinstimmung der RANKL-Aminosäuresequenz zwischen Mensch und Maus beträgt dabei 85 % [14,85].

Osteoprotegerin (OPG) ist ein Decoy-Rezeptor für RANKL, welcher eine Bindung an RANK verhindert [14,85]. Somit wirkt OPG als schützender Regulator auf die Ab- und Umbauprozesse in der Knochensubstanz ein. Hauptproduzent von OPG sind Osteoblasten, die über die Sezernierung von OPG ihre anabole Wirkung auf den Knochenstoffwechsel verstärken. Auch die strukturelle Übereinstimmung von menschlichem und murinem OPG ist mit 85 % sehr hoch. Aus diesen genannten Gründen ist die relative Konzentration von RANKL und OPG eine bedeutende Determinante sowohl für die Knochenfestigkeit als auch für die Knochenmasse [14,85].

4.2.2 Runx-related transcription factor 2 (RUNX2)

RUNX2 gilt als Haupttranskriptionsfaktor der enchondralen Ossifikation und ist somit auch bei der Frakturheilung von großer Bedeutung [14,134]. Der Einfluss auf den Knochenstoffwechsel entsteht durch die Steuerung der Expression von Genen, welche entscheidend sind für die Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten. Zusätzlich fördert RUNX2 die Einwanderung von Gefäßen im Verknöcherungsprozess und vermittelt den positiven Effekt von BMP-2 auf die Osteoblastendifferenzierung [14,134].

4.2.3 Bone morphogenetic protein (BMP)

Marshall Urist beschrieb 1965 die Induktion neuen Knochens durch demineralisierte Knochenmatrix und führte dies auf darin enthaltene Proteine zurück, die er als „bone morphogenic proteins“ bezeichnete [34]. Die BMPs zählen zu den multifunktionalen Wachstumsfaktoren aus der Superfamilie Transforming growth factor β (TGF- β) [17]. In tierexperimentellen Studien konnte den verschiedenen Proteinen ein stimulierender Effekt auf die Knochenentwicklung und die Frakturheilung zugeschrieben werden.

Als Mitglied der Familie morphogenetischer Knochenproteine gehört BMP-2 zu den klassischen Morphogenen und kann auf mesenchymale Zellen konzentrationsabhängig Einfluss nehmen [102]. Durch die Beteiligung an verschiedenen Signalwegen induziert BMP-2 die Knorpel- und Knochenbildung [71]. Entscheidend dabei ist der nachweisliche Effekt auf die Osteoblastendifferenzierung [54]. Zusätzlich konnte in Studien nachgewiesen werden, dass BMP-2 bereits 24 Stunden nach Entstehung der Fraktur sein Expressionsmaximum erreicht, weshalb davon ausgegangen wird, dass dieses Protein ein entscheidender Faktor für den Beginn der Frakturheilung und deren weiteren Verlauf darstellt [20].

Entsprechend BMP-2, nimmt BMP-4 unterstützend an der Regulation der Zellproliferation und Chondrogenese teil [109]. Dabei scheint das Protein bei gesteigerter Ausschüttung mit der Ausbildung des Kallus vergesellschaftet zu sein [35].

4.2.4 Cysteine-rich angiogenic inducer 61 (Cyr61)

Cyr 61 gehört zu den Wachstumsfaktoren, die mit der extrazellulären Matrix assoziiert sind und erfüllt verschiedenste Funktionen [58,65]. So wirkt Cyr61 über die Bindung an Integrin sowie durch die Regulation der Expression und Aktivität von VEGF-A und VEGF-C stark angiogen [58]. Darüber hinaus wird die Differenzierung von Knorpelzellen und

Osteoblasten gefördert, wohingegen gleichzeitig Osteoklasten in ihrer Aktivität gehemmt werden.

4.2.5 Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)

Als wichtiger Bestandteil der DNA-Replikation und -Reparatur umschließt PCNA die DNA während ihres Replikationsprozesses wie eine gleitende Klammer, die als Anheftpunkt für verschiedene Proteine dient, um diesen eine Interaktion mit der DNA zu ermöglichen [127]. Zu diesen PCNA-interagierenden Proteinen gehören Polymerasen, Ligasen und Topoisomerasen, wodurch PCNA eine unmittelbare Rolle bei der DNA-Synthese zukommt. Auf Grund seiner Einflüsse auf DNA-Replikation, -Reparatur, Prophylaxe von Genschäden, Zellzykluskontrolle, Zellüberleben etc. wurde PCNA lange als reines Kernprotein eingestuft. Dieser Status änderte sich durch die Ergebnisse neuerer Studien, welche nahelegen, dass das Antigen auch an zytoplasmatischen und extrazellulären Prozessen involviert ist [104,130]. PCNA scheint an der Regulation der Apoptose und Glykolyse sowie als Ligand auf der äußeren Zellmembran an der Aktivierung der natürlichen Killerzellen mitzuwirken [79,104,130]. Nicht nur die Möglichkeit aus der Expression von PCNA allgemeine Informationen zur Zellaktivität abzuleiten macht das Protein für diese Studie interessant, sondern auch sein regulatorischer Einfluss auf die induzierte Differenzierung von Osteoklasten durch RANKL und die Funktionalität deren Aktinsaumes [119].

4.2.6 Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (CD31)

Das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül wird meist als Cluster of Differentiation 31 bezeichnet und ist ein integrales Membranglykoprotein aus der Immunglobulin-Superfamilie, welches hauptsächlich auf Blutplättchen und Endothelzellen zu finden ist [3]. Seine primäre Funktion liegt als Adhäsionsmolekül in der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten, wie beispielsweise bei Endothelzellen von Gefäßen, wodurch ihre Dichtigkeit und Stabilität gewährleistet wird [91]. Ergänzend dazu kann CD31 Anstoß zur Gefäßneubildung geben, in dem es angioproliferative Stimuli wie Hypoxie, Zytokine, Wundheilung und Scherstress vermittelt. Kim et al. (2010) konnten nachweisen, dass Mäuse, deren Gliedmaße mit CD31-positiven Zellen behandelt wurden, nach einer künstlich induzierten Ischämie eine bessere Durchblutung aufwiesen und damit einhergehend deutlich bessere Heilungserfolge als die Kontrollgruppe aufwiesen [60]. Ebenso wurde dieser positive Einfluss auf die Frakturheilung durch Yang et al. (2020) beschrieben [135].

4.2.7 Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3Ks)

Unter dem Begriff PI3-Kinasen wird eine Familie aus Lipidkinasen zusammengefasst, die vielfältig an der Zellfunktion beteiligt ist [33]. Unter anderem beeinflusst sie das Überleben von Zellen, deren Stoffwechsel und Wachstum, indem die PI3Ks auf Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder biophysikalische Signale reagieren und Lipid-Sekundärbotenstoffe produzieren, welche dann an den Signalwegen wichtiger Stoffwechselwege teilnehmen. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Studie ist der Einfluss der PI3Ks auf die Neubildung und korrekte Funktionsfähigkeit des Endothels besonders interessant, welche jeweils im Rahmen der Frakturheilung essenziell ist. Dies gelingt, indem VEGF PI3Ks stimuliert und diese das proangiogene Signal weiterleiten [33,97]. Auch Angiopoetin, welches entscheidend an der Reifung und Morphogenese von Gefäßen beteiligt ist sowie VE-Cadherin, ein gefäßbildung- und barrierefunktionförderndes Transmembran-Adhäsivprotein, nutzen PI3Ks, um ihre Wirkung zu entfalten [6,33,64,117].

4.2.8 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Der Begriff „Vascular Endothelial Growth Factor“ bezeichnet eine Familie von Wachstumsfaktoren, welche angiogen wirken und Einfluss auf die Gefäßpermeabilität haben [136]. VEGF-A ist deren wichtigster Vertreter, da es sich um den entscheidenden Wachstumsfaktor für die Angiogenese sowie die Regulation der Gefäßpermeabilität handelt. Darüber hinaus können im Menschen noch VEGF-B/-C/-D und der Plazenta-Wachstumsfaktor nachgewiesen werden. VEGF werden von Zellen ausgeschüttet, die unter oxidativen Stress geraten [112]. Dieses VEGF kann im Anschluss an den VEGF-Rezeptor binden, welcher auf hämatopoetischen Stammzellen, Monozyten, Makrophagen und vaskulären Endothelzellen exprimiert wird und so seine angiogene Wirkung entfaltet [50]. Wird der Rezeptor auf vaskulären Endothelzellen aktiviert, fördert dies deren Proliferation, Überleben, Durchlässigkeit und Migration. Da die Angiogenese, welche vor allem zu Beginn der Knochenheilung stattfindet, entscheidend für eine optimale Perfusion der Frakturzone ist, stellt VEGF einen essentiellen Baustein in der Angiogenese-Osteogenese-Achse dar [15,88]. So führt die Beeinträchtigung der VEGF-Signalübertragung zu erheblichen Störungen der Knochenregeneration und begünstigt die Entstehung von Pseudarthrosen [27,40,88].

4.3 Frakturen

4.3.1 Frakturmechanismen

Man unterscheidet verschiedene Formen der Entstehung von Knochenfrakturen.

Führt eine Kraft unmittelbar an ihrem Einwirkungspunkt zu einem Bruch des Knochens, so spricht man von einer direkten Fraktur [80].

Bei indirekten Frakturen wird die schädliche Wirkung einer Kraft über eine Hebelwirkung, Drehung, Biegung, Kompression oder Zug vom ursprünglichen Einwirkungsort weitergeleitet, sodass der Effekt an einer anderen Stelle des Knochen auftritt [80].

Ist ein Knochen in seiner Struktur bereits vor einer Gewalteinwirkung krankhaft geschwächt, so reicht bereits eine geringere Kraft, um eine Fraktur zu erzeugen [80]. Als Auslöser kommen sowohl generalisierte knöchernen Pathologien wie Osteoporose oder Osteogenesis imperfecta in Frage als auch der schädliche Einfluss von lokal auftretenden Tumoren oder Metastasen, die einen Knochen infiltrieren können. Zu den am häufigsten ossär metastasierenden Tumorerkrankungen zählen Schilddrüsen-, Mamma-, Prostata-, Bronchial- und Nierenzellkarzinome [80].

4.3.2 Frakturformen

Neben dem auslösenden Mechanismus erfolgt die Klassifizierung von Frakturen auch anhand verschiedener Kriterien, die deren Form betreffen [80]. Zum einen unterscheidet man dislozierte von nicht dislozierten Brüchen, wobei es nur in seltenen Fällen zu keiner Verschiebung der knöchernen Bruchstücke kommt. Zum anderen kann man die Anzahl der durch die Fraktur entstehenden Fragmente nutzen, um einen Bruch einzuordnen. Bricht ein Knochen ohne Absprengung eines weiteren Fragmentes, so wird dies als Zweifragmentfraktur bezeichnet, andernfalls spricht man von einer Mehrfragmentfraktur. Auch der Entstehungsmechanismus kann zur Einordnung einer Fraktur herangezogen werden. Wird ein Knochen über seine Belastungsgrenze hinaus verbogen, so entsteht unter Absprengung eines Keilfragments auf der Seite der Krafteinwirkung eine Biegungsfraktur. Durch eine übermäßige Torsion bildet sich eine spiralförmige Drehbeziehungsweise Torsionsfraktur, wobei die Fraktur umso kürzer wird, je größer das einwirkende Drehmoment ist. Kommt zusätzlich noch eine stauchende oder biegende Kraft hinzu, so bildet sich ein Drehkeil aus. Zieht eine Sehne zu stark an ihrem knöchernen Ansatz, sodass dieser ausreißt, so entsteht eine Abriss- oder Avulsionsfraktur, welche orthogonal zur Zugkraft verläuft. Abscherfrakturen bilden sich

durch eine Kombination von Zug-, Scher- und Schubkräften. Deren Frakturlinie läuft parallel zu der einwirkenden Scherkraft. Auch eine zu starke Stauchung kann einen Knochen in Form einer Kompressions- beziehungsweise Stauchungsfraktur brechen lassen, wobei dieser dabei meist irreversibel an Substanz verliert. Wird ein Knochen einer massiven Gewalteinwirkung ausgesetzt, wie sie bei Hochrasanztraumen vorkommt, so zerbricht dieser meist in viele Fragmente, ab sechs Fragmenten spricht man von einer Trümmerfraktur. Bei unvollständigen Frakturen dagegen ist die Kraft nur so groß, dass zwar Ein-/Ausrisse oder Infraktionen entstehen, aber ohne dass dabei der Periostschlauch vollumfänglich reißt. Zudem gibt es noch die Luxationsfraktur, bei welcher, parallel zur Fraktur, das knorpelbedeckte und an einem Gelenk beteiligte Ende eines Knochens aus diesem herausluxiert [80].

4.3.3 Frakturheilung

Für die Heilung einer Fraktur sind das Endost sowie das Periost und die Havers-Kanäle die entscheidenden Elemente [80]. Im Falle eines Bruchs werden die Umbauprozesse, die auch im gesunden Knochen als ständiges Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten ablaufen, intensiviert. Die Reparatur der Kortikalis gelingt über den Havers-Knochenumbau, bei dem sich Osteone senkrecht zum Bruchspalt ausdehnen und so diesen verschließen. Im Knocheninneren heilt die Spongiosa indem neugebildete Trabekel den Frakturbereich überbrücken. Auslöser für die gesteigerten Umbauprozesse ist die interfragmentäre Dehnung des Gewebes, wobei für eine optimale Heilung weder zu wenig Bewegung im Bereich des Bruchs vorhanden sein darf, damit die Stimulation erhalten bleibt, noch zu viel, da es sonst zu einer Pseudarthrose (nicht knöchern heilende Knochenfraktur) kommen kann [73].

Grundlegend wird der Heilungsprozess frakturierter Knochen in zwei Klassen eingeteilt. Bei der primären Frakturheilung, die auch als direkte Frakturheilung bezeichnet wird, ist der Knochen auf einen direkten Kontakt zwischen den Fragmenten angewiesen [80]. Da es ohne eine aufwendige Fixierung des geschädigten Knochens nicht möglich ist, dauerhaft einen anatomisch repositionierten, dehnungsfreien interfragmentären Kontakt mit einem Abstand unter 1 mm herzustellen, kommt die primäre Frakturheilung in der Natur kaum vor [72]. Bei der direkten Frakturheilung werden zwei Formen unterschieden. Beträgt der Frakturspalt unter 0,01 mm und ist dieser einer Dehnung unter 2 % ausgesetzt, kommt es zu der sogenannten Kontaktheilung, bei welcher die Osteone, die nahe der Fraktur liegen, mit Hilfe von Osteoklasten Schneidkegel ausbilden [72,111,124]. Diese erzeugen hohle Kanäle zwischen den beiden Fragmenten, welche im Anschluss durch Osteoblasten im hinteren Bereich des Schneidkegels mit

Knochensubstanz gefüllt werden [59,72]. Dadurch entstehen parallel sowohl eine neue knöcherne Verbindung, als auch die für die Versorgung des Knochens wichtigen Havers-Kanäle. Im nächsten Schritt folgt, ohne den Umweg über die Ausbildung von Kallusgewebe, der Umbau der Osteonen zu Lamellenknochen [72]. Ist der Frakturspalt größer als 0,01 mm, aber kleiner als 1 mm, so kommt es zur Spalthheilung, bei der im Gegensatz zur Kontaktheilung die knöcherne Vereinigung vom Umbau der Havers-Kanäle zeitlich getrennt ist. Zu Beginn wird der Spalt mit lamellarem Knochen verfüllt, welcher jedoch orthogonal zur Längsachse verläuft und somit mechanisch instabil ist. Dieser Prozess dauert beim Menschen 3-8 Wochen. Im Anschluss erfolgt zum Erreichen der ursprünglichen biomechanischen Stabilität eine sekundäre Rekonstruktion, welche stark dem Umbau durch die Schneidkegel bei der Kontaktheilung ähnelt [72].

Die sekundäre oder indirekte Frakturheilung setzt ein, sobald die beiden Fraktarenden mehr als 1 mm voneinander entfernt sind oder sich nicht mehr in ihrer anatomisch korrekten Lage befinden und gilt als physiologischer Regelfall der Frakturheilung [80]. Dieser Heilungsprozess lässt sich in mehrere Phasen einteilen, die ineinander übergehen und je nach Autor leicht voneinander abweichen. Die folgende Aufzählung gliedert den Ablauf der Frakturheilung in vier Schritte [80,109]:

1. Initiale Verletzungsphase: Durch Gewalteinwirkung entsteht eine Fraktur inklusive Schädigung des umliegenden Weichteilgewebes, wodurch sich ein Hämatom bildet.
2. Entzündungsphase (3-14 Tage): In das Hämatom wandern Thrombozyten, Makrophagen und andere Immunzellen ein und sorgen für eine Ausschüttung von Zytokinen, Wachstums- und Gerinnungsfaktoren. Zusätzlich erfolgt eine erste Stabilisierung der Fraktur durch einen bindegewebigen Kallus, gebildet von Fibroblasten und Chondrozyten, die ebenfalls in das Hämatom einwandern und dieses umbauen.
3. Phase der Kallushärtung (Wochen bis Monate): Der bindegewebige Kallus wird durch eine hohe Osteoblastenaktivität und die Einlagerungen von Mineralstoffen von außen nach innen zum knöchernen Kallus umgewandelt, welcher aus Geflechtknochen besteht.
4. Remodeling-Phase (1-2 Jahre): In der letzten Phase erfolgt eine Anpassung des Knochens um seine ursprüngliche Belastbarkeit und Form zu erreichen. Dazu sprossen medulläre Gefäße ein und der Kallus wird zu Lamellenknochen mit einer Kortikalis und Trabekeln umgebaut.

4.3.4 Frakturmodelle

Als hilfreiches Instrument zur Erforschung der Frakturheilung, insbesondere im Bereich der Grundlagenforschung, haben sich verschiedene tierexperimentelle Frakturmodelle bewährt. Obwohl die Wissenschaft bestrebt ist, Versuche an lebenden Tieren zu vermeiden, wird nach wie vor mit diesen die beste Näherung an das Heilungsverhalten des menschlichen Knochens erreicht, weshalb in-vivo-Versuche in puncto Übertragbarkeit auf den Menschen überlegen sind [11,23]. Verschiedene Tierarten haben jeweils entscheidende Vor- und Nachteile, die vor Beginn einer Studie gegeneinander abgewogen werden müssen, um eine optimale Balance zwischen medizinischen, ethischen, zeitlichen und finanziellen Aspekten sowie dem wissenschaftlichen Nutzen zu erreichen.

Um eine optimale Übertragbarkeit der Forschungsergebnisse vom Experiment auf den Menschen zu gewährleisten, liegt bei der Untersuchung der Frakturheilung die Auswahl von Primaten als Versuchstiere aufgrund ihrer extrem engen genetischen Verwandtschaft (98,5 % Übereinstimmung zwischen Mensch und Schimpanse) mit dem Menschen nahe [122]. Dieser Vorteil birgt jedoch zugleich den größten Nachteil dieses Tiermodells, da für Menschenaffen sehr strenge Vorschriften hinsichtlich Haltung, Zucht und erlaubten Anzahl an Versuchstieren vorherrschen [83]. Da die Nachteile bei dieser Tierart gegenüber den Vorteilen deutlich überwiegen, ist der Primat für die Untersuchung des Heilungsverhaltens von Knochen ungeeignet.

Die Tibia des Schafs ähnelt in ihren anatomischen Proportionen, dem Knochenaufbau und der Frakturheilung der des Menschen, wodurch sie in der Erforschung der Frakturversorgung vor allem Anwendung in der Entwicklung von Osteosyntheseverfahren findet [129]. Durch diese Ähnlichkeit können für die Frakturversorgung größtenteils handelsübliche humane Implantate und das dazugehörige Instrumentarium genutzt werden. Die Beliebtheit von Schafen als Versuchstiere geht unter anderem auch auf die Association for the Study of Internal Fixation zurück, die an ihnen ein Vielzahl von Studien zu Schrauben- und Plattenfixationen durchgeführt hat [81–83,95,107]. Da Schafe naturbedingt stets versuchen werden, die operierte Gliedmaße zu belasten und zudem sehr schreckhaft sind, muss eine vermehrte Belastung der betreffenden Extremität berücksichtigt werden [83]. Einer der entscheidendsten limitierenden Faktoren ist die aufwändige Haltung. Schafe benötigen entsprechend große Stallungen und Futtermengen, was einen hohen Kostenaufwand mit sich bringt.

Analog zu Schafen, ist die Anatomie der Tibia von Ziegen mit der des Menschen vergleichbar, wodurch ebenfalls handelsübliche Implantate sowie deren Instrumentarium

eingesetzt werden können oder nur leichte Anpassungen notwendig sind [22]. Bei Ziegen treten jedoch recht häufig orthopädisch relevante Erkrankungen, wie beispielsweise Ziegenarthritis auf [83]. Diese kann die Auswertung der Lahmheit im Verlauf des Beobachtungszeitraums beeinträchtigen, weshalb Ziegen als Spezies für Frakturmodelle nur selten Verwendung finden.

Hunde sind primär aus zwei Gründen besonders interessant für die Erforschung von Frakturen. Zum einen gibt es eine erhebliche Menge an Literatur aus der Veterinärmedizin über die Versorgung von Knochenbrüchen sowie das Verhalten von Hunden, da diese mit Abstand das älteste und gleichzeitig eines der wichtigsten und häufigsten Haustiere des Menschen sind [83]. Zum anderen besitzen Hundeknochen eine dem Menschen gleichartige Knochenfeinstruktur mit einem vergleichbaren Regenerationsverhalten [4,129]. Jedoch benötigt man auch selbst bei relativ großen Rassen, wie zum Beispiel dem Schäferhund, spezielles OP-Instrumentarium und angepasste Implantate. Ein von Wissing et al. (1990) besonders hervorgehobener Nachteil bei Hunden als Versuchstiere ist die Inkonsistenz der Ergebnisse trotz gleichbleibender Versuchsbedingungen [129]. Um solche Schwankungen entgegenzuwirken wäre eine erheblich höhere Zahl an Versuchstieren nötig. Zudem werden Hunde im Vergleich zu anderen Versuchsspezies als infektanfällig beschrieben.

Als größter Vertreter der experimentell genutzten Kleintiere verbinden Kaninchen die Vorteile einer anspruchslosen und platzsparenden Haltung mit dem Vorhandensein eines verhältnismäßig großen Skelettes, welches einerseits spezielle Implantate und Instrumente voraussetzt, aber andererseits komplexere Osteosynthesen und den systemischen Einsatz teurer Wirkstoffe erlaubt [83,129]. Zudem ist die Frakturheilung von Kaninchen aufgrund der Ausbildung von Havers-Systemen weniger primitiv als bei anderen Kleintieren [83]. Von Nachteil ist jedoch die recht geringe Vergleichbarkeit mit der menschlichen Frakturheilung, da diese beim Menschen bedeutend langsamer abläuft [129]. Zudem weicht die Mikrostruktur stark von der des Menschen ab [75].

Ein besonders häufig genutztes Tier für die Erforschung der Frakturheilung ist die Ratte [83]. Die Haltung und Züchtung gestaltet sich sehr einfach und kostengünstig, weshalb vielfältige Frakturmodelle an ihnen entwickelt wurden. Die dafür verwendeten Knochen reichen von Mittelfußknochen, Tibia und Fibula über das Femur bis zu Radius, Ulna und dem Schädel, wobei die Frakturen meist per Osteotomie induziert und durch intramedulläre Stabilisierung fixiert wurden [8,12,41,83,121,126,138]. Die Knochen eignen sich sowohl für histologische als auch mechanische Testungen [83]. Nachteilig ist der primitive Ablauf der Frakturheilung, welcher ohne Havers-Systeme auskommt

sowie die Unterschiede hinsichtlich der generellen Zusammensetzung, Dichte und Qualität des Knochen im Vergleich zu dem des Menschen [75,83].

Angesichts der sehr geringen Kosten für Zucht, Unterbringung und Versorgung ist es nicht verwunderlich, dass Mäuse als Versuchstiere für Frakturmodelle immer beliebter werden und große Populationen für Studienzwecke ermöglichen [83]. Zudem ist das Genom der Maus entschlüsselt, was molekularbiologische Untersuchungen stark vereinfacht. Durch die Verfügbarkeit verschiedenster Knockout-Mäuse und monoklonaler Antikörper ist es bei dieser Spezies möglich, die Einflüsse einzelner Teilelemente des Stoffwechsels auf die Frakturheilung zu untersuchen [75,98]. Für solche Studien haben sich Rippenfrakturen als Standard durchgesetzt, da hier der Bewegungsapparat der Maus und somit ihre Mobilität und Lebensqualität möglichst wenig beeinträchtigt wird [56,77,78,98,100]. Da sich Rippenfrakturen jedoch auf Grund mangelnder Reproduzierbarkeit der mechanischen Eigenschaften nicht für eine biomechanische Untersuchung eignen, wurde erstmalig von Hiltunen et al. (1993) ein standardisiertes Frakturmodell an der Tibia der Maus entwickelt, bei dem der Knochen geschlossen frakturiert und unter Verwendung eines intramedullär eingeführten Drahtes aus rostfreiem Stahl fixiert wurde [42]. Diese Methode ist kostengünstig, mit einer geringen chirurgischen Invasivität verbunden und durch die Unversehrtheit der Fibula teils selbststabilisierend, jedoch fehlt durch die verwendeten Stahlstifte eine axiale und rotatorische Stabilisierung [98]. Zudem kommt es bei diesem Frakturmodell häufig zu Knieluxationen und Schädigungen des Markraumes. Auch die Durchführung biomechanischer Messungen ist durch die gekrümmte Form der Tibia erschwert, weshalb das Femur durch seine gerade Bauform entscheidende Vorteile bietet. Seine gleichmäßige und größere Form begünstigt die Anwendung größerer und vielseitiger Implantate wie Zugschrauben, Platten oder interne und externe Fixateure. Zur Erzeugung der Fraktur wird zwischen einer offenen und einer geschlossenen Methode unterschieden, wobei beide Vor- und Nachteile aufweisen. Für eine offene Frakturierung wird über einen größeren Zugang eine gezielte Osteotomie durchgeführt, welche in Form und Ausdehnung individuell je nach Studienziel angepasst werden kann [75]. Dabei entsteht ein klar definierter, jedoch beträchtlicher Weichteilschaden, der mit jeder OP reproduzierbar ist. Dieser Weichteilschaden sowie das chirurgische Risiko können durch Verwendung einer erstmals von Bonnarens et al. (1984) eingeführten gravitationsgetriebenen, stumpfen Guillotine reduziert werden [12,75]. Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, dass zwar der umliegende Weichteilmantel gequetscht wird, jedoch insgesamt intakt bleibt. Das durch die Fraktur entstehende Hämatom wird dadurch eingedämmt und die heilungsfördernde Wirkung des Blutes im Bruchspalt bleibt erhalten.

Für die Versorgung erzeugter Frakturen stehen folgende Osteosynthese-Implantate zur Verfügung:

- Intramedullärer Pin: Stifte aus 0,2 mm starkem rostfreiem Stahl sind die älteste Form der Stabilisierung muriner Femurfrakturen und aus der Arbeit von Bonnarens et al. an der Ratte abgeleitet [12,45,98]. Diese Methode ist sehr günstig und chirurgisch einfach umzusetzen, jedoch bietet sie keine Stabilität in der Längsachse sowie der Rotation [12,45,98].
- Verriegelungsnagel: Der Verriegelungsnagel besteht aus einer modifizierten 24 Gauge-Kanüle, deren Spitze pfeilspitzenförmig abgeflacht wurde, sodass diese sich nach Einbringen in den frakturierten Knochen durch eine Bohrung zwischen den Femurkondylen im proximalen Teil des Knochen verankern kann [51,98]. Das distale Ende der Kanüle wird nach dorsal in den Interkondylärspace um 90° abgewinkelt. Insgesamt bietet diese Technik im Vergleich zum intramedullären Stift trotz fehlender Starrheit mehr Stabilität bei ebenfalls sehr geringen Kosten, niedrigem Implantatgewicht und chirurgischer Invasivität. Die bedeutendste Komplikation die auftreten kann, ist eine Schädigung des Knochenmarks [51,98].
- Nagel mit Pinverriegelung: Bei dieser Methode handelt es sich um ein offenes Frakturmodell, deren Knochendefekt durch eine Osteotomie entsteht und somit präzise induziert werden kann [26,98]. Die steife Fixierung des Knochens entsteht dadurch, dass zuerst ein intramedullärer Nagel in das Femur eingebracht und anschließend mit zwei orthogonalen Pins auf jeder Seite des im Anschluss erzeugten Bruchspalts verriegelt wird. Dabei werden deutliche Nachteile in Kauf genommen, zu denen der hohe Implantatpreis, die anspruchsvolle OP und die hochgradige Schädigung des umliegenden Gewebes zählen [26,98].
- Pin-Clip-Osteotomie: Diese Osteotomieform nutzt das minimale Gewicht und die geringen Implantatkosten des intramedullären Pins. Kombiniert wird diese mit einem circa 4 mm langen Clip aus einer 27 Gauge-Kanüle, der in Richtung der Längsachse des Knochens den Frakturspace überbrückt und an beiden Enden in einem Bohrloch verankert wird [25,98]. Dieser Clip nimmt Torsions- und Zugkräfte auf, welche bei der alleinigen Nutzung eines Stiftes zur Instabilität der Fraktur führen. Zudem lässt sich mit dieser Technik die Weite des Bruchspaltes exakt einstellen. Der größte Nachteil dieses Verfahrens ist der Umstand, dass eine offene Operation (OP) mit allen entsprechenden Komplikationen von Nöten ist. Zudem kommt es zu einer Schädigung des intramedullären Raums [25,98].
- Verriegelungsplatten: Neben den intramedullär stabilisierenden Implantaten gibt es auch Osteosyntheseplatten, welche durch einen offenen Zugang im Bereich

der Fraktur positioniert und anschließend mit mehreren Mikroschrauben fixiert werden [44,98]. Diese Vorgehensweise ermöglicht eine anatomisch korrekte und steife, verschiebungsfreie Reposition der Fraktur, welche die Versorgung am Menschen sehr gut nachahmt. Die Rotationssteifigkeit ist dabei viermal höher als bei Verwendung einer Schraube [43]. Von Nachteil ist jedoch die hohe Invasivität und Schädigung der umliegenden Weichteile durch den offenen Zugang [44].

- Fixateur externe: Dieses Verfahren orientiert sich analog zur Plattenosteosynthese nach Osteotomie sehr genau an der am Menschen angewandten Technik, wobei zunächst jeweils zwei Schanzschrauben senkrecht in beide zu stabilisierenden Teile des Knochens eingebracht und anschließend über eine Klemmbacke miteinander verbunden werden, um so die Fraktur zu versteifen [19,98]. Man kann mithilfe des externen Fixateurs individuell den Bruchspalt einstellen und so bei einer optimalen Stabilität verschiedene Frakturmodelle umsetzen. Jedoch birgt die Technik einige bedeutende Nachteile, wie das hohe Gewicht des Implantats und seine externe Lage, wodurch die Maus in ihrem Gangbild und ihrer gesamten Lebensqualität eingeschränkt wird. Das kann zu selbstverletzendem Verhalten des Tieres und gepaart mit den nach außen, die Muskel durchbohrenden Schrauben, zu einem erhöhten Infektionsrisiko für die Maus führen. Auch der Preis der Implantate ist deutlich höher als bei anderen Osteosynthesemethoden [98,103].
- Intramedulläre Zugschraube: Dem Namen entsprechend, ermöglicht diese Schraube, durch ihr im proximalen Viertel gelegenes Gewinde und dem am distalen Ende befindlichen Konus, eine Kompression des Frakturspaltes, indem beide Knochenstücke aneinander herangezogen werden [53,142]. Damit wird eine Stabilität in allen Achsen, der Länge und der Rotation bei minimaler Invasivität gewährleistet [98]. Nachteilig anzumerken ist der hohe Preis des Implantats und die mögliche Schädigung des Knochenmarks [98].

4.4 Clopidogrel

Der Wirkstoff Clopidogrel ist ein Thienopyridin-Derivat der zweiten Generation und gehört der Gruppe der Thrombozytenaggregationshemmer an [92]. Erstmals wurde Clopidogrel 1998 in den Vereinigten Staaten auf den Markt gebracht [141]. Noch im gleichen Jahr erfolgte die Zulassung in Europa durch die Europäische Arzneimittelkommission. Verabreicht wird Clopidogrel als Prodrug, welches im Gastrointestinaltrakt über den P-Glykoproteintransporter in das Blut aufgenommen und in der Leber durch Cytochrom P450-Enzyme, primär 2C19, in seinen aktiven Metaboliten

umgewandelt wird [123]. Indiziert ist Clopidogrel zur Prävention atherothrombotischer Ereignisse [73,106,139]. Als Monotherapie wird es zur Prophylaxe eines Apoplexrezidivs beziehungsweise nach einem kürzlich aufgetretenen Herzinfarkt oder bei einer bestehenden pAVK angewendet. Neben einer Thrombolyse wird Clopidogrel kombiniert mit Acetylsalicylsäure als Begleittherapie bei ST-Hebungsinfarkten angewendet [39,128]. Diese Kombination wird als duale Plättchenhemmung bezeichnet.

4.4.1 Struktur

In seiner Reinform ist Clopidogrel ein farbloses Öl mit einem Schmelzpunkt von 183 °C und der Summenformel $C_{16}H_{16}ClNO_2S$ sowie dem IUPAC-Namen (S)-Methyl-(2-chlorphenyl)-2-(6,7-dihydro-4H-thieno[3,2-c]pyridin-5-yl)acetat [84]. Das schwer wasserlösliche Molekül besitzt eine molare Masse von 321,83 g/mol.

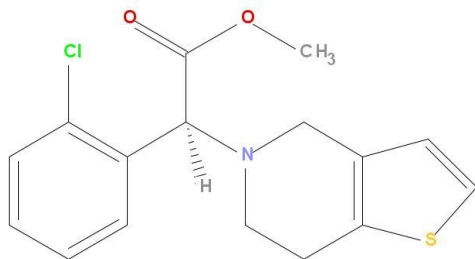


Abbildung 1: Strukturformel Clopidogrel

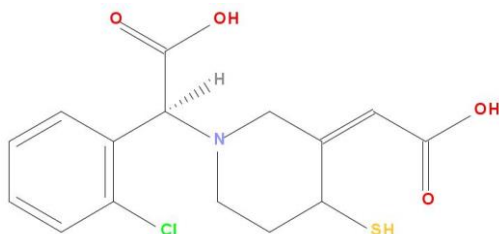


Abbildung 2: Strukturformel aktiver Metabolit Clopidogrel

4.4.2 Wirkmechanismus

Als Derivat von Thienopyrimidin ist Clopidogrel die Prodrug eines irreversiblen Inhibitors am $P2Y_{12}$ -Rezeptor, welcher eine zentrale Rolle im hämostatischen System spielt [123]. Der erstmalige Nachweis des $P2Y_{12}$ -Rezeptors gelang Hollopeter et al. im Jahr 2001 [49]. Seine Wirkung entfaltet der Rezeptor sobald Adenosindiphosphat (ADP) an diesen bindet und über eine G_i -Protein-gekoppelte Kaskade die thrombozytäre Adenylatzyklase hemmt [123]. Aus der Hemmung resultiert ein Abfall der zyklischen Adenosinmonophosphat-Konzentration innerhalb des Thrombozyten, in Folge dessen der Glykoprotein (GP)-IIb/IIIa-Komplexe aktiviert wird. Dieser GP-IIb/IIIa-Komplex kann

das im Blutplasma befindliche Fibrinogen an sich binden, was zu einer Aggregation von Thrombozyten führt. Da Clopidogrel nach seiner enterohepatischen Aktivierung die hemmende Wirkung des P2Y₁₂-Rezeptors dauerhaft blockiert, wird die Kaskade zur Fibrinogenbindung für die restliche Lebenszeit des Blutplättchens (circa 7-10 Tage) unterbrochen, welche ein essenzieller Bestandteil der Thrombozytenaggregation darstellt [123,143].

4.4.3 Pharmakokinetik

Die Absorption von Clopidogrel im Magen-Darmtrakt verläuft unabhängig von einer einmaligen oder täglichen Einnahme so schnell, dass der Peakplasmaspiegel (unverändertes Clopidogrel) nach circa 45 Minuten (min) erreicht wird [144]. Misst man die Menge der über den Harntrakt ausgeschiedenen Clopidogrelmetaboliten, so ergibt sich eine Resorptionsrate von über 50 %.

Die im Blut enthaltenen Plasmaproteine binden das absorbierte Clopidogrel und dessen inaktiven Metaboliten zu 98 % beziehungsweise 94 % an sich [144]. Jedoch kommt es über einen sehr breiten Konzentrationsbereich nicht zu einer Sättigung der Bindungskapazität der Plasmaproteine.

Clopidogrel kann sowohl mit als auch ohne Lebensmittel eingenommen werden, da eine Studie nachweisen konnte, dass aus einer Einnahme von 75 mg des Wirkstoffs zusammen mit einer standardisierten Mahlzeit nur eine um weniger als 9 % reduzierte mittlere Hemmung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation resultiert [143].

Die Umwandlung der Prodrug Clopidogrel in ihren aktiven Metaboliten geschieht enterohepatisch über mehrere Stufen, an denen verschiedene Cytochrom-P450-Enzyme beteiligt sind, wobei CYP2C19 eine Hauptrolle einnimmt [123]. Dieser Aktivierungsprozess findet lediglich bei einem Bruchteil des Medikaments statt, denn in Abhängigkeit von der Recherchequelle werden zwischen 85 % und über 90 % des Clopidogrels nach der Resorption aus dem Gastrointestinal-System von dem Enzym Carboxyesterase-1 zu einem Carbonsäurederivat (SR26334) umgesetzt, das keinen Einfluss auf die Hämostase besitzt [123,143]. Damit der aktive Wirkstoff entsteht, wird Clopidogrel zunächst von den Cytochromen zu einem 2-Oxo-Clopidogrel-Intermediärmetaboliten oxidiert und anschließend durch weitere Schritte, mithilfe von CYP2C19, CYP3A, CYP2B6 und CYP1A2 zu dem wirksamen Thiol-Derivat verstoffwechselt. Es folgt die schnelle und irreversible Bindung an den P2Y₁₂-Rezeptor, womit dessen Aggregationsfähigkeit dauerhaft gestört ist [143].

Nach einer oralen Applikation von Clopidogrel wird die maximale Konzentration (C_{\max}) des Thiol-Metaboliten in einem Zeitraum zwischen 30 und 60 min erreicht [143]. Nimmt ein Patient vier Tage in Folge 75 mg des Medikaments ein, so ist der Maximalwert nur etwa halb so hoch, wie nach einer einmaligen Dosis von 300 mg. Die Pharmakokinetik von Clopidogrel verhält sich im Bereich zwischen 75 und 300 mg zusätzlich nicht dosisproportional, denn eine Vervielfachung der Dosis lässt die C_{\max} um den Faktor 2 steigen und die Area under the curve (AUC) um den Faktor 2,7.

Die Ausscheidung im Laufe von 120 Stunden verteilt sich auf circa 50 % Elimination über den Urin und circa 46 % über den Fäzes [143,144]. Die Halbwertszeit von Clopidogrel als Prodrug beträgt nach einer Einzeldosis von 75 mg etwa 6 Stunden und die seines aktiven Derivats ungefähr 30 min. Der inaktive Carbonsäuremetabolit ist sowohl bei Verabreichung einer Einzeldosis als auch nach der wiederholten Einnahme nach 8 Stunden zur Hälfte ausgeschieden [144].

Clopidogrel lässt sich insgesamt von seiner Wirkstärke als moderat einstufen, allerdings zeigen sich starke interindividuelle Schwankungen hinsichtlich seiner Plättchenhemmung [123]. Dabei spielen nicht nur Arzneimittelinteraktionen oder demographische und klinische Faktoren, wie beispielsweise Vorerkrankungen, Alter und der Body-Mass-Index eine Rolle, sondern insbesondere auch eine genetische Varianz des CYP2C19-Systems, welches wie zuvor beschrieben, maßgeblich an der Aktivierung von Clopidogrel beteiligt ist. Zusätzlich können Polymorphismen anderer CYP450-Enzyme den Metabolismus des Thiol-Derivats beeinflussen [123,144]. Die Allelform mit der vollen Funktionsfähigkeit nennt sich CYP2C19*1, die Allele CYP2C19*2, *3,..., *8 zeichnen sich durch einen verminderten Metabolismus aus [94,144]. Betrachtet man die Gruppen der Patienten mit einer geringeren Bioverfügbarkeit, so weisen Hellhäutige einen Anteil von 85 % und Asiaten einen 99 %-igen Anteil der Allele CYP2C19*2 und *3 auf. Ist ein Mensch im Besitz zweier Loss-of-Function-Allele, so spricht man von einem schwachen Metabolisierer [143]. In der hellhäutigen Bevölkerung trifft dies auf circa 2 % zu, bei Dunkelhäutigen auf 4 % und auf 14 % der Asiaten. Liegt im Genom eines Menschen nur ein Loss-of-Function-Allel vor, wird dieser als mittelstarker Metabolisierer bezeichnet [144]. Die Einbußen bei C_{\max} und AUC von Clopidogrel bei intermediären und schwachen Metabolisierern liegt zwischen 30 % und 50 %, jedoch wurde noch kein auf klinischen Studien basierendes Schema entwickelt, welches solche interindividuellen Unterschiede kompensiert. Dass eine auf Loss-of-Function-Allel beruhende schlechtere Metabolisierung von Clopidogrel auch einen realen Einfluss auf das kardiovaskuläre Risiko von Patienten hat, konnte unter anderem in der TRITON-TIMI 38- und der CHARISMA-Studie nachgewiesen werden [9,131].

4.4.4 Anwendung und Indikation

Zugelassen wurde Clopidogrel 1998, basierend auf den Erkenntnissen der randomisierten und verblindeten internationalen CAPRIE-Studie von 1996 mit 19.185 Teilnehmern, um bei Patienten mit bereits klinisch manifestierter Atherosklerose (ischämischer Schlaganfall, Herzinfarkt, pAVK), die Folgeereignisse der Erkrankung, wie Herzinfarkt und Schlaganfall, zu vermindern [141]. In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass bei der oben beschriebenen Risikogruppe durch eine Langzeitbehandlung mit Clopidogrel von 75 mg/Tag das relative Risiko um 9,4 % im Vergleich zu einer Acetylsalicylsäure (ASS)-Therapie sinkt [29]. Ergänzend zeigen Post-hoc-Analysen der CHARISMA-Studie, welche an 15.603 zufällig ausgewählten Patienten mit klinisch bestätigten kardiovaskulären Erkrankungen oder multiplen kardialen Risikofaktoren durchgeführt wurde, dass eine duale Plättchenhemmung mit Clopidogrel und ASS bei einer CARPIE-like-Kohorte hinsichtlich der Prognose einer alleinigen ASS-Therapie überlegen ist, ohne dabei das Risiko schwerer Blutungen zu erhöhen [10,28]. Ein weiterer Anwendungsfall für Clopidogrel ist vor einer Stentimplantation gegeben, um intra- und postoperative Komplikationen zu reduzieren. Dazu wird beispielsweise durch eine einmalige Gabe von 600 mg des Medikaments mindestens zwei Stunden vor dem Eingriff das Blut aufgesättigt [28]. Auch im Anschluss an eine koronare Intervention bei einer stabilen koronaren Erkrankung folgt neben einer dauerhaften Therapie mit ASS eine zusätzliche Erhaltungstherapie mit Clopidogrel. Die Dauer ist dabei von der Art des Eingriffs abhängig. Wurde eine alleinige Perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA) durchgeführt, so reichen 2-4 Wochen duale Plättchenhemmung. Wird bei einem solchen Eingriff ein unbehandelter Stent eingesetzt, werden vier Wochen Medikamentengabe empfohlen und bei medikamentenbeschichteten Stents 12 Monate, sofern kein erhöhtes Risiko für eine Blutung besteht. Sowohl nach einem akuten Koronarsyndrom ohne ST-Hebung als auch nach einem ST-Hebungsinfarkt (STEMI) empfehlen die Europäische Gesellschaft für Kardiologie (ESC) und die American Heart Association (AHA) bei geringem Blutungsrisiko eine mindestens 12-monatige duale Plättchenhemmung. Diese Empfehlung wird von der CHARISMA-Studie gestützt, welche ein verbessertes Outcome bei langfristiger Therapie mit Clopidogrel und ASS im Vergleich zu einer ASS-Monotherapie nach der Akutphase eines Herzinfarktes nachweisen konnte [9,28]. Auch die randomisierten Studien COMMIT/CCS 2 und CLARITY-TIMI 28 untermauern beide die Bedeutung von Clopidogrel zur Therapie des STEMI [18,28,106]. Nicht nur klinische Studien können die positiven Effekte von Clopidogrel zur Therapie des STEMI belegen, sondern auch das deutsche Register für das akute Koronarsyndrom (ACOS-Register), das mit 5.886 registrierten Patienten eine deutliche Risikoreduktion unter einer

langfristigen dualen Plättchenhemmung verzeichnet [28]. Im Falle eines Nicht-ST-Hebungsinfarktes (N-STEMI) oder einer instabilen Angina pectoris werden mindestens 12 Monate duale Plättchenhemmung empfohlen [28]. Grundlage dafür ist die 12.562 Patienten starke CURE-Studie, bei der eine zusätzliche Gabe von Clopidogrel zu ASS bei Patienten mit instabiler Angina pectoris und N-STEMI, zu einem signifikant niedrigeren Risiko für Reinfarkte führte. Tendenziell bestand auch für diese Patienten ein geringeres Risiko an den Folgen der Grunderkrankung zu sterben oder anschließend einen Schlaganfall zu erleiden [28,30].

4.4.5 Nebenwirkungen

Für die Zulassung von Clopidogrel wurden in der CARPIE-Studie neben der Wirkung auch die Nebenwirkungen dokumentiert, die nach bis zu einem Jahr und länger auftreten können [29,144]. Diese Daten über unerwünschte Wirkungen von Clopidogrel wurden im Laufe der Zeit durch weitere Studien und spontane Beobachtungen während des klinischen Gebrauchs ergänzt [144]. Entsprechend seines Einflusses auf das hämostatische System sind Blutungen die am häufigsten auftretenden Komplikationen und entstehen meist bereits im ersten Monat der Behandlung. In der CARPIE-Studie traten bei 1,4 % der Probanden schwerwiegende Blutungen auf [29,144]. Die nachfolgende Tabelle enthält die mit Clopidogrel in Zusammenhang gebrachten Nebenwirkungen, sortiert nach Häufigkeitsgruppen. Dabei steht „häufig“ für ein Wahrscheinlichkeit von $>1/100$ bis $<1/10$, „gelegentlich“ für $>1/1.000$ bis $<1/100$, „selten“ für $>1/10.000$ bis $<1/1.000$ und „sehr selten“ für $<1/10.000$. Die schwerwiegendste Nebenwirkung wird in der jeweiligen Spalte zuerst genannt.

Häufig	Gelegentlich	Selten	Sehr selten
Hämatome	Thrombozytopenie	(Schwere) Neutropenie	TTP
Epistaxis	Leukopenie	Vertigo	Aplastische Anämie
GI-Blutungen	Eosinophilie	Retroperiton. Blutungen	Panzytopenie
Bluterguss	Intrakranielle Blutungen		Agranulozytose
Blutung an der Punktionsstelle	Kopfschmerzen Parästhesien Schwindel Augenblutungen Ulcus ventriculi Ulcus Duodeni Gastritis Erbrechen Übelkeit Verstopfung Flatulenz Ausschlag Juckreiz Blutungen der Haut Hämaturie Verlängerte Blutungszeit Neutrophile ↓ Thrombozyten ↓		Schwere Thrombozytopenie Anaphylaxie Halluzinationen Verwirrtheit Schwere Blutungen Vaskulitis Hypotonie Bronchospasmen Interstitielle Pneumonie Pankeatitis Kolitis Stomatitis Akutes Leberversagen Hepatitis Bullöse Dermatitis Angioödem Ekzem Lichen planus Arthritis, Arthralgie Myalgie Glomerulonephritis Serumkreatinin ↑ Fieber

Tabelle 1: Nebenwirkungen Clopidogrel

4.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob die Applikation von Clopidogrel die Frakturheilung im murinen Ischämiemodell beeinflusst.

4.6 Fragestellung

Die durchgeführten tierexperimentellen Studien sollten die Frage beantworten, inwieweit die Applikation von Clopidogrel die Frakturheilung gegenüber der Applikation eines Vehikels in einem etablierten Ischämiemodell an der Maus beeinflusst.

Trotz des breiten Einsatzes von Clopidogrel im klinischen Alltag, liegen bislang keine Informationen bezüglich der Wirkung von Clopidogrel auf die Frakturheilung unter ischämischen Bedingungen vor.

Die Nullhypothese lautet:

„Die Frakturheilung wird durch Applikation von Clopidogrel unter Ischämiebedingungen im Mausmodell im Vergleich zu Tieren ohne Applikation von Clopidogrel (Kontrollen) nicht beeinflusst.“

5 Material und Methoden

5.1 Methoden

5.1.1 Studiendesign

Nach Genehmigung des Tierversuchsvorhabens (Nummer 35/2020) durch das Landesamt für Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittel- und Veterinärwesen (Zentralstelle, Konrad-Zuse-Straße 11, 66115 Saarbrücken), wurden die Versuche in den Räumlichkeiten des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes streng nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes mit insgesamt 46 Mäusen durchgeführt. Die Anzahl der Tiere teilte sich auf in 24 Mäuse, denen täglich über den gesamten Beobachtungszeitraum oral 3 mg/kg Körpergewicht (KG) Clopidogrel (Clopidogrel AL 75 mg, ALIUD PHARMA GmbH, Laichingen, Deutschland) verabreicht wurde und 22 Mäuse, die äquivalente Volumina an 0,9 %-iger Kochsalzlösung erhielten. Diese beiden Versuchstiergruppen wurden wiederum in zwei und fünf Wochen postoperative Beobachtungszeit unterteilt (Tabelle 2).

	Clopidogrel		Control	
	2 Wochen	5 Wochen	2 Wochen	5 Wochen
Biomechanik	7	9	8	8
Radiologie / Computertomographie	9	9	8	8
Histologie	8	9	8	8
Biochemie / Western Blot	6	-	6	-

Tabelle 2: Versuchsprotokoll

5.1.2 Tiermodell

Als Versuchstiere für diese Studie dienten ausgewachsene CD-1® Mäuse (Elternstamm: CD-1® IGS Mouse, Nomenklatur: Crl:CD1(ICR); Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) mit einem durchschnittlichen Gewicht von 39 g (Clopidogrel: $40,8 \pm 2,6$ g; Kontrollgruppe: $37,5 \pm 3,0$ g). Gehalten wurden die Tiere unter konstanten Bedingungen (Raumtemperatur: 22-24 °C, relative Luftfeuchtigkeit: 60 %, 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus) in den Räumlichkeiten des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar. Als Nahrung wurde den Mäusen ausreichend pelletförmiges Standardfutter (Altromin 1320, Altromin, Lage, Deutschland) sowie Leitungswasser in Fütterungsflaschen zur freien Verfügung gestellt.

Die MouseScrew™ (RISystem AG, Davos, Schweiz), eine intramedulläre Zugschraube aus Implantatstahl mit den Maßen 17,2 × 0,5 mm diente der Osteosynthese des intraoperativ erzeugten Bruchspalts. Dabei übt der Konus am Schraubenkopf (0,8 mm Ø) distal der Fraktur durch Sitz in der Fossa intercondylaris Druck im Zusammenspiel mit dem proximal im Trochanter major sitzenden Gewinde (4 mm Länge, 0,5 mm Ø) auf den Frakturspalt aus und komprimiert diesen.

5.1.3 Operationsverfahren

Die Versuche wurden in einer standardisierten Technik am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Am Tag der Operation wurde den Mäusen ihre Tagesdosis an Clopidogrel beziehungsweise Vehikel mindestens eine Stunde vor Narkoseeinleitung oral appliziert, um genügend Zeit für die Magenpassage der Flüssigkeit zu gewährleisten und so das Risiko einer Aspiration zu minimieren.

Als Narkosemittel diente die intraperitoneale Gabe von 100 mg/kg KG Ketamin (Ursostamin® 100 mg - Serumwerke Bernburg, Bernburg, Deutschland) und 15 mg/kg KG Xylazin (Rompun® 2 % - Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland). Zum Schutz der Hornhaut vor Austrocknung wurde diese nach Eintritt der Narkosewirkung mit Dexpanthenol-Salbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe – Bayer Vital GmbH) bedeckt. Anschließend folgte die Enthaarung des zu operierenden rechten Beines per Trockenrasierer und Enthaarungscreme (elca-med® - ASID BONZ GmbH, Herrenberg, Deutschland), welche nach entsprechender Einwirkzeit feucht abgerieben wurde, um einer Reizung der Operationswunde vorzubeugen.

Vor OP-Beginn wurde die Maus mit Klebeband (Durapore™ Kunstseidenpflaster - 3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland) in Rückenlage und in gespreizter Beinhaltung

auf der OP-Unterlage fixiert und mit Softasept® N (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) im rasierten Bereich ausreichend desinfiziert (Abbildung 3).



Abbildung 3: Fixierung nach der Enthaarung

Der Hautschnitt erfolgte mit einer Skalpellklinge (Carbon Steel Skalpellklingen #15 – Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) medial der Patella sowie lateral der A. femoralis mit einer Länge von 6 mm parallel zum Gefäßverlauf (Abbildung 4).

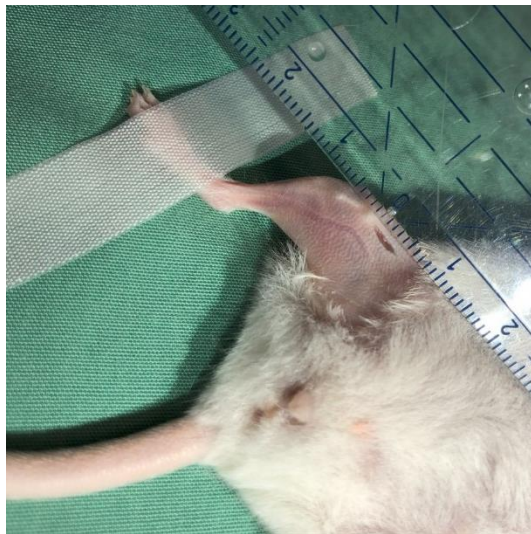


Abbildung 4: 6 mm Hautschnitt

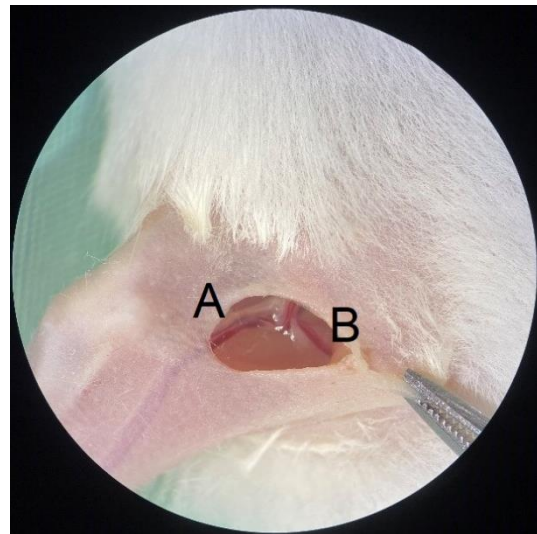


Abbildung 5: Darstellung der A. femoralis (A) und A. profunda femoris (B)

Um im nächsten Schritt ischämische Bedingungen für die Frakturheilung herzustellen, wurde in dem für diese Studie genutzten experimentellen Modell die A. profunda femoris direkt nach ihrem Abgang aus der A. femoralis verschlossen. Dafür wurde das Bündel aus A.-, V.- und N. femoralis aufgesucht und nach proximal in Richtung Leistenband verfolgt. Auf Höhe des Abgangs der A. epigastrica wurde die nach medial abgehende A. profunda femoris stumpf mit einer Sonde freipräpariert und mit einem Seidenfaden der Stärke 6-0 (Seide schwarz 6/0 USP, Seidenfaser nicht resorbierbar, geflochten,

Resorba®, Nürnberg, Deutschland) doppelt ligiert (Abbildung 5). Da die A. profunda femoris hauptsächlich nur den Femurschaft und die mediale Oberschenkelmuskulatur versorgt, kann eine milde Ischämie erzeugt werden, die relativ lokal im Bereich des Femur wirkt, ohne die Versorgung der restlichen Extremität zu beeinträchtigen [5,62,120,137]. Als Grundlage für diese Form der Ischämieinduktion diente die Studie von Menger et al., in der die Auswirkungen einer Resektion der A. femoralis distal des Leistenbandes mit einer Ligatur der A. profunda femoris verglichen wurden [74].

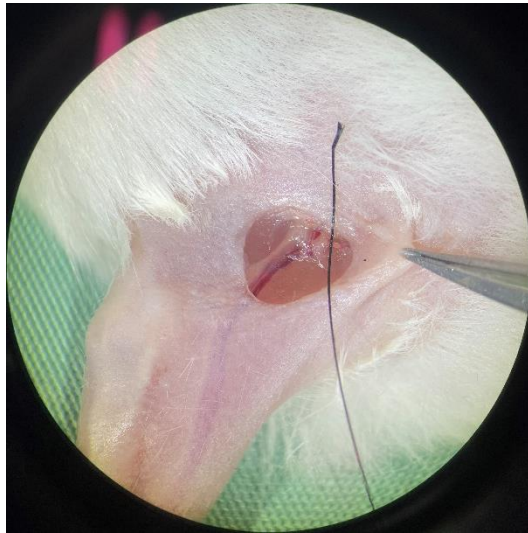


Abbildung 6: Anschlingen der A. profunda femoris

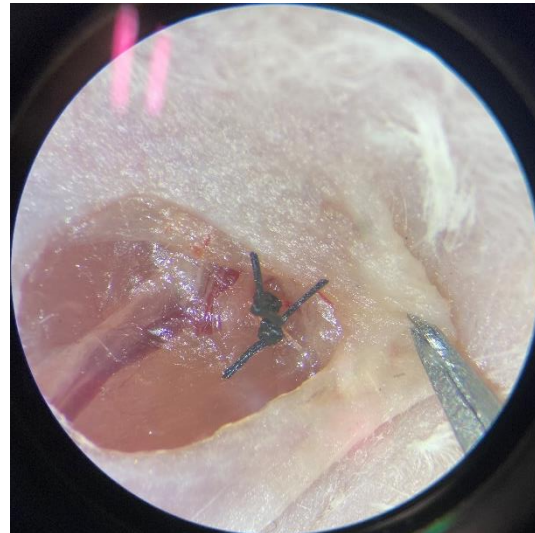


Abbildung 7: Anschlingen und doppelte Ligatur der A. profunda femoris

Anschließend wurde mittels eines weiteren Schnitts die Gelenkkapsel des Knies medial der Patella in Längsrichtung eröffnet und die Patella mit einem Wattetupfer nach lateral luxiert. Durch Lösen der Fixierung und Anwinkeln des Beines um 90°, ließen sich die Femurkondylen darstellen (Abbildung 6).



Abbildung 8: Darstellung der Gelenkkapsel

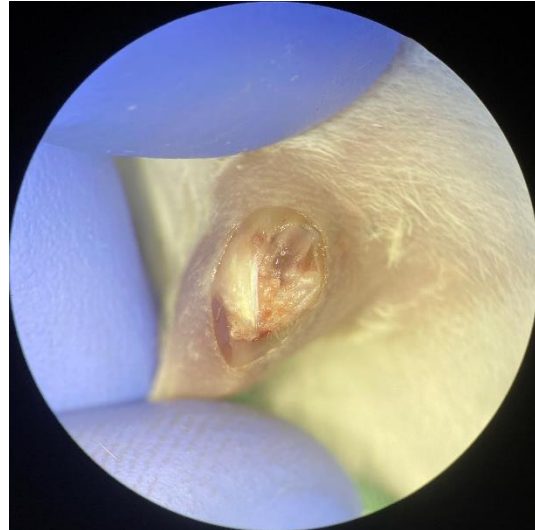


Abbildung 9: Luxation der Patella nach lateral

Mit Hilfe einer 24 G Spritzkanüle (BD Microlance 3™ – 24 G 1“ – Nr. 17, Ø 0,55 x 25 mm – BD Drogheda, Irland) ließ sich der Markraum des Femurs durch die Fossa intercondylaris eröffnen (Abbildung 7).



Abbildung 10: Darstellung der Fossa intercondylaris



Abbildung 11: Eröffnung des Markraums mittels 27 G Kanüle

In diesen Kanal wurde eine 27 G Dental-Anästhesiekanüle (Sterican® Einmalkanüle für die Dental-Anästhesie – Ober-/Unterkiefer, Leitungsanästhesie – Größe 30/42- G 27 x 1½“ / Ø 0,40 x 40 mm, B. Braun Melsungen AG) eingeführt und auf der Gegenseite der Trochanter major sowie die Haut des Tieres durchbohrt. Anschließend wurde die Dental-Anästhesiekanüle durch einen kanülierten Wolframdraht (GuideTube 0.3/0.2 mm – RISystem AG, Davos, Schweiz) ersetzt, der zu beiden Seiten circa 5 cm aus dem Knochen und den Weichteilen herausragte (Abbildung 8).



Abbildung 12: Einlage des kanülierten Wolframdrahtes

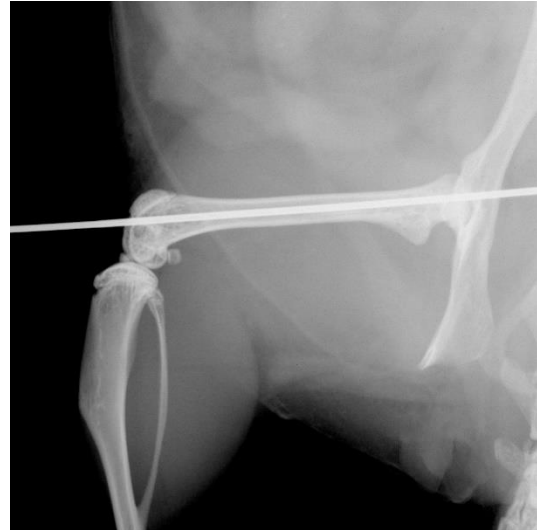


Abbildung 13: Röntgenlagekontrolle des Drahtes

Nun wurde das Femur unter Zuhilfenahme einer stumpfen Guillotine geschlossen frakturiert (Frakturtyp A2 oder A3 nach AO) zugefügt werden, wobei sowohl das Gewicht als auch die Fallhöhe der Guillotine definiert waren [76] (Abbildung 9).

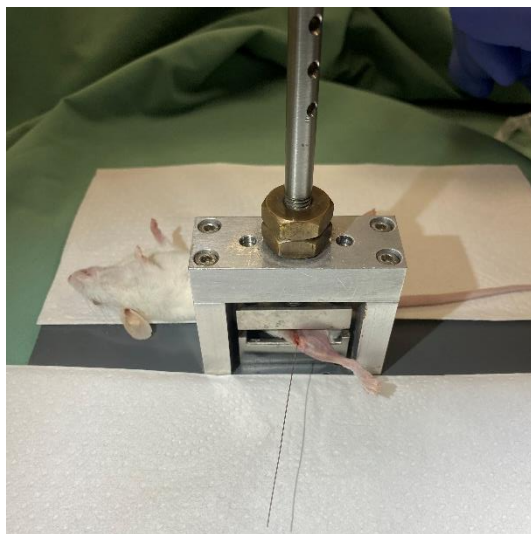


Abbildung 14: Frakturierung mittels stumpfer Guillotine

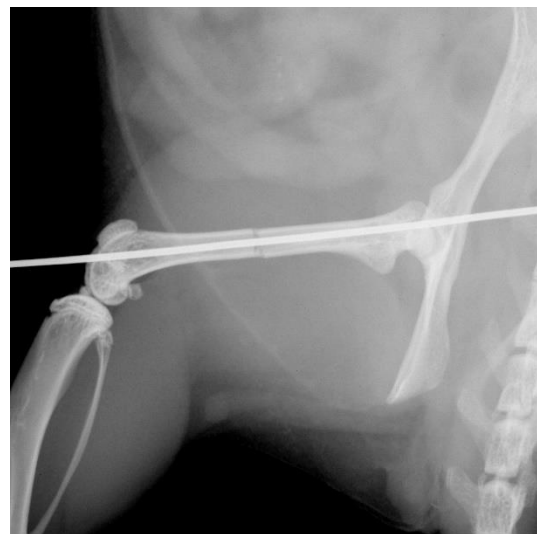


Abbildung 15: Röntgenkontrolle der Fraktur

Bei der darauffolgenden Refixation der Fraktur per MouseScrew™ fungierte der kanülierte Draht als Führung, wobei die Spitze der Schraube in das distale Ende des Drahtes adaptiert wurde [52]. Der Draht leitete die Schraube beim Hineindreihen mit einem Handbohrfutter über den Frakturspalt hinweg in das proximale Femur. Die Schraube saß richtig, sobald sich der Schraubenkonus im Sulcus intercondylaris verhakte, dieser bündig mit der Corticalis abschloss und die Sollbruchstelle abriss (Abbildung 10).



Abbildung 16: Röntgenkontrolle der MouseScrew™



Abbildung 17: Herstellerbilder der MouseScrew™ (Genehmigung durch den Urheber liegt vor)

Die weiteren Schritte dienten der Wiederherstellung der anatomischen Verhältnisse sowie dem Wundverschluss. Zuerst wurde die Patella reponiert und durch die Naht der Gelenkkapsel mittels 5-0 Prolene®-Faden (Ethicon Inc., Somerville, USA) fixiert. Anschließend folgte der Hautverschluss ebenfalls per Einzelknopfnah mit 5-0 Prolene®-Faden (Ethicon Inc.). Die Kontrolle der Einzelschritte erfolgte per intraoperativer Röntgenaufnahmen.

5.1.4 Medikamentenapplikation

Die Medikation beinhaltete zwei Komponenten. Zum einen wurde jedem Tier, entsprechend der Einteilung im Versuchsprotokoll, das zu untersuchende Medikament Clopidogrel (CLOPIDOGREL AL 75 mg Filmtablette, ALIUD PHARMA GmbH, Laichingen, Deutschland), welches in isotoner Kochsalzlösung (Isotone Kochsalzlösung 0,9 %, B. Braun Melsungen AG) aufgelöst wurde beziehungsweise volumetrisch äquivalente Mengen an selbiger isotoner Kochsalzlösung eine Stunde präoperativ und anschließend über den gesamten Beobachtungszeitraum einmal täglich per gebogener Schlundsonde verabreicht. Zum anderen erhielt jede Maus als Schmerzmedikation intraoperativ 5 mg/kg KG subcutan in die Nackenfalte appliziertes Carprofen (Rimadyl™ 50 mg/ml Carprofen, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) und für die ersten drei Tage postoperativ zusätzlich mit 1 mg/ml Tramal (Tramal 100 mg/ml Tropfen Lösung zum Einnehmen, Grünenthal GmbH, Stolberg, Deutschland) versetztes Trinkwasser.



Abbildung 18: Orale Applikation von Clopidogrel oder Vehikel per Schlundsonde

5.1.5 Tötung der Tiere

Am Ende des Beobachtungszeitraums von zwei beziehungsweise fünf Wochen erfolgte eine Narkotisierung der Mäuse nach bekanntem Schema und eine Röntgenaufnahme des operierten rechten Femurs. Unmittelbar danach folgte die Tötung mittels cervicaler Dislokation in Narkose und die Explantation beider Femora.

5.1.6 Knochenpräparation

Um die Frakturheilung auswerten zu können, wurde sowohl das operierte, als auch das unversehrte Femur zur Referenz explantiert.

Der erste Schritt umfasste die Hautinzision vom Becken bis zur proximalen Tibia. Anschließend wurde die Oberschenkelmuskulatur entfernt, indem das Ligamentum patellae per Skalpellschnitt inzidiert und die Muskulatur scharf abpräpariert wurde. Die Präparation wurde so lange fortgesetzt, bis die Gelenkkapsel des Hüftgelenks frei lag, welche wiederum eröffnet wurde, um den Femurkopf luxieren zu können. Abschließend wurden durch Abzupfen mittels Splitterpinzette letzte Muskelreste beseitigt und die MouseScrew™ vollständig entfernt. Um einer Veränderung der Knocheneigenschaften durch Austrocknung vorzubeugen, wurde der Knochen mit isotoner Kochsalzlösung regelmäßig benetzt und nach abgeschlossener Explantation in 4 %-iger Formalinlösung fixiert.

5.2 Zielkriterien und Auswertung

5.2.1 Biomechanik

Unmittelbar nach der Knochenpräparation wurde die Biegesteifigkeit [N/mm] des Kallus und des gesunden Femurs per 3-Punkt-Biegetestung zerstörungsfrei (Mini-Zwick Z 2.5 – Zwick GmbH, Ulm, Deutschland) bestimmt. Damit konnte neben der absoluten auch die relative Biegesteifigkeit prozentual zum unversehrten Knochen ausgewertet werden. Standardmäßig wurden die Femora mit ihrer ventralen Seite so auf dem Bock des Materialprüfgerätes positioniert, dass der bewegliche Messstempel seinen Druck zentral auf den Frakturspalt beziehungsweise im mittleren Drittel des Femurs aufbringen konnte. Der Abstand der beiden Auflagekanten des Bocks betrug 6 mm und die Geschwindigkeit des Messstempels 1 mm/min [52]. Die Messung wurde in einem Kraft-Weg-Diagramm aufgezeichnet und der zu bestimmende Maximalwert der Steigung, welche der Biegesteifigkeit entspricht, konnte im linearen Bereich des Grafen abgelesen werden. Die Ergebnisse der verletzten Seite wurden wiederum mit der Biegesteifigkeit der gesunden Gegenseite ins Verhältnis gesetzt, sodass zusätzlich die relative Biegesteifigkeit [%] ermittelt wurde, wodurch der Einfluss interindividueller Unterschiede der einzelnen Tiere ausgeschlossen werden konnte [52].

5.2.2 Radiologie

Zur Bewertung der knöchernen Überbauung des Bruchspaltes wurde zwei beziehungsweise fünf Wochen postoperativ der Goldberg-Score, unter Anwendung des Punktesystems nach Goldberg et al. (1985) auf die Röntgenaufnahmen beider Femora im anterior-posterior Strahlengang (Spannung 26 kV, Belichtungszeit 10 s) (MX-20 - Faxitron X-ray Corporation Wheeling, USA; Faxitron Sr 1.4.1 - Faxitron X-ray Corporation) angewendet [32] (Tabelle 3).

Score	Bedeutung
0	Ausbleibende knöcherner Überbauung
1	Partielle knöcherner Überbauung
2	Vollständige knöcherner Überbauung

Tabelle 3: Schlüssel Goldberg-Score



Abbildung 19: Röntgenbild für Goldberg-Score, links: frakturierter Knochen, rechts: gesunder Knochen

5.2.3 Computertomographie

Mittels Computertomographie (Skyscan High-resolution in-vivo x-ray microtomograph, Bruker CT SkyScan Serie 1176, RJL Micro&Analytic GmbH, Karlsdorf-Neuthard, Deutschland) wurden die rechten Femora in 9 μm messenden Schichten gescannt (Röhrenspannung: 50 kV; Stromstärke: 200 μA ; Intervalle: 0,4°; Expositionszeit: 2.400 ms; Filter: 0,5 mm Aluminium) und als Bilder in dreidimensionalen Arrays rekonstruiert und abgespeichert [55,90]. Anschließend wurde in den betreffenden axialen Schnitten manuell der Kallus als „Region of interest“ (ROI) markiert, woraus das verwendete Programm (CTAnalyser, Bruker, Billerica, MA, USA) ein Volumen („Volume of interest“ – VOI) berechnete. Anhand vordefinierter Schwellenwerte konnte der CTAnalyser (Bruker, Billerica, MA, USA) eine Separierung von Weichgewebe und Knochen durchführen und folgende Kallusparameter analysieren:

- Knöchernes Gesamtvolumen [mm^3] (Bone Volume, BV)
- Gesamtkallusvolumen [mm^3] (Tissue Volume, TV)
- Anteil des Knochenvolumens am Gesamtkallusvolumen [%] (BV/TV)
- Trabekeldicke [mm] (Trabecular thickness, TbTh)
- Trabekelabstand [mm] (Trabecular separation, TbSp)
- Trabekelanzahl [1/mm] (Trabecular number, TbN)

5.2.4 Histomorphometrie

Nach Abschluss der biomechanischen und radiologischen Analyse der Knochen, wurden diese für die histomorphometrische Untersuchung vorbereitet. Dazu wurden die Knochen im ersten Schritt für 24 Stunden in einer 4%igen Formalinlösung (Carl Roth, Karlsruhe) fixiert und im Anschluss mit Hilfe einer 10 %-igen Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Lösung entkalkt. Dieser Prozess dauerte 14 Tage und fand bei einer konstanten Temperatur von 4 °C statt. Nach Entkalkung konnte dem Knochen durch jeweils einstündige Bäder in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je eine Stunde in 70 %, 80 %, 90 % + vier Stunden in 100 % Alkohol) das Wasser entzogen werden. Damit sich im Anschluss die nun wasserfreien Areale mit Paraffin füllen konnten, mussten die Präparate drei Stunden in Xylol eingelegt und so paraffingängig gemacht werden. Im letzten vorbereitenden Schritt wurden die Knochen für eine Stunde in heißes Paraffin gebettet. Dem entstandenen Paraffinblock wurde im Bereich des größten Kallusdurchmessers in longitudinaler, sagittaler Richtung 2 μm dicke Schnitte entnommen, welche einer Safranin O-Färbung zugeführt wurden. Diese Färbung verläuft nach folgenden Schritten und in der genannten Reihenfolge:

- Eisenhämatoxylin nach Weigert: 1 Minute
- Spülung mit destilliertem Wasser
- Differenzieren in Salzsäure-Alkohol
- Bläuen in Leitungswasser: 5 Minuten
- Spülung mit destilliertem Wasser
- Benetzen mit 0,02 % Fast Green: 4 Minuten
- Spülung mit 1 % Essigsäure
- Benetzen mit 0,1 % Safranin O: 5 Minuten
- Entwässerung mit 90 % Alkohol
- Spülung mit Xylol
- Eindecken mit Deckgläschen

Diese Färbung dient der Analyse des Frakturareals auf seine Gewebezusammensetzung sowie der Vermessung des Kallus auf seine Fläche und seinen Durchmesser. Dabei lassen sich die Gewebetypen anhand ihrer Farbe wie folgt differenzieren:

- Knochen → türkis
- Bindegewebe → farblos bis blass rosa
- Knorpel → rot
- Zellkerne → schwarz

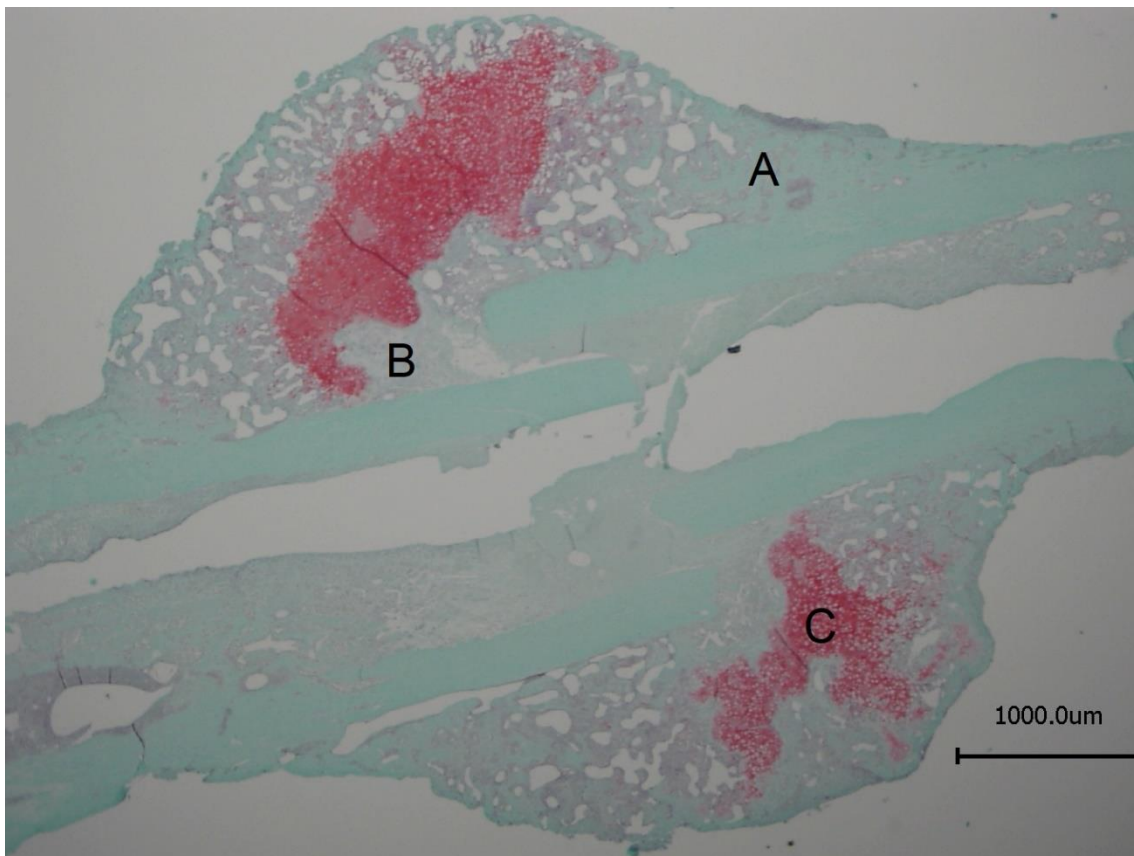


Abbildung 20: Safranin-O-Färbung in longitudinaler, sagittaler Schnittführung; A: Knochen, B: Bindegewebe, C: Knorpel

Um eine quantitative Messung durchführen zu können, wurden die histologischen Präparate mithilfe des Keyence BioZero BZ8100 Fluoreszenz-Mikroskops (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) bei 1,25-facher Vergrößerung digitalisiert (Zeiss Axio Vision 3.1 und Zeiss Axio Cam – Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und in das Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (ImageJ Analysis System, U.S. National Institute of Health, Bethesda, USA) eingespeist. Mit Hilfe dessen konnten folgende Werte erhoben werden:

- Durchmesser des Femurs auf Höhe des Frakturspaltes (BDm) [mm]
- Durchmesser des Kallus auf Höhe des Frakturspaltes (CDm) [mm]

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

Diese Werte wurden analog dem von Gerstenfeld et al. (2005) beschriebenen Prinzip in folgenden Rechnungen eingefügt und zu den statistisch ausgewerteten Zielwerten verarbeitet [31]:

- $X = \frac{\text{Kallusdurchmesser (CDm)}}{\text{Femurdurchmesser (BDm)}}$
- $X = \frac{\text{Knochenfläche innerhalb der Kallusregion (TOTAr)}}{\text{Gesamtkallusfläche (CAr)}} [\%]$
- $X = \frac{\text{Knorpelfläche innerhalb der Kallusregion (CgAr)}}{\text{Gesamtkallusfläche (CAr)}} [\%]$
- $X = \frac{\text{Bindegewebsfläche innerhalb der Kallusregion (FTAr)}}{\text{Gesamtkallusfläche (CAr)}} [\%]$

Um den histologischen Fortschritt der Frakturheilung quantifizieren zu können, wurde der Histoscore angewandt [25]. Bei diesem wird für die obere und die untere Kallushälfte jeweils anhand der Flächenverteilung die anteilmäßig dominanteste Gewebeart bestimmt, entsprechend mit Punkten bewertet und die Summe beider Zahlen gebildet. Macht Knochengewebe den größten Prozentsatz des Kallus aus, so wird dieser mit zwei Punkten bewertet, für Knorpel gibt es einen Punkt und liegt primär nur Bindegewebe vor, so gibt es null Punkte. Somit liegt die Mindestpunktzahl des Histoscores für einen Knochen bei null Punkten und die maximale Punktzahl bei vier Punkten.

5.2.5 Biochemie / Western Blot

Da der knorpelige Kallus sich bereits in der dritten Woche der Frakturheilung durch Umbauprozesse stark zurückbildet und somit dessen Menge abnimmt, wurden die Proben für die Western Blot-Analysen bereits zwei Wochen nach der Operation entnommen [37]. Nach fünf Wochen war die Frakturheilung so weit fortgeschritten, dass der Kallus bereits mineralisiert und verknöchert war. Da der Fokus der vorliegenden Arbeit auf dem Prozess der Frakturheilung und insbesondere auf den frühen Phasen beruhte, wurde auf eine Untersuchung der exprimierten Proteine an der Frakturstelle nach fünf Wochen verzichtet. In dieser Studie wurde die Expressionsmenge folgender Proteine analysiert: BMP-2, BMP-4, VEGF, CD31, PCNA, Cyr61, OPG, RANKL, RUNX2 und PI3Ks. Zur Gewinnung der Untersuchungsproben wurden die Versuchstiere in Narkose getötet und ausschließlich das operierte Femur explantiert. Anschließend wurden Weichteilgewebsreste vom Präparat entfernt und der Kallus säuberlich an der

Frakturstelle abgetragen. Das gewonnene Material musste danach unmittelbar mit Hilfe von Flüssigstickstoff tiefgefroren und bis zur Untersuchung bei -80 °C gelagert werden. Um das Kallusgewebe für den Western Blot aufzubereiten, war zuerst eine Homogenisierung mithilfe eines Lysepuffers (Mengenangaben für 10 ml: 100 µl Tromethamin 1 M, pH 7,5; 20 µl NaCl 5 M; 4 µl EDTA 250 mM; 500 µl Triton-X-100 10 %; 50 µl NaN₃ mit Aqua destillata auf 10 ml aufgefüllt (circa 500 µl pro 100 mg Probengewebe) mit PMSF 100 mM im Verhältnis 1:500 zum Endvolumen sowie Protease-Phosphatase-Inhibitor-Cocktail Cell-Signaling 5.872 im Verhältnis 1:100 zum Endvolumen) für 20 Sekunden auf Eis homogenisiert (Micra Mini Batch Homogenisator, Micra GmbH, Heitersheim, Deutschland) nötig. Im Anschluss folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Danach wurde die Probe bei 4 °C mit 16.000 Umdrehungen/min für 30 Minuten zentrifugiert. Abschließend erfolgte eine Überführung der Lysatprobe in ein neues Reagenzgefäß, welches dann bei -20 °C auf Eis gelagert werden konnte.

Zur Durchführung des Western Blots wurde ein Teil dieses Proteinlysats unter Zuhilfenahme des Probenpuffers nach Laemmli denaturiert und anschließend zur diskontinuierlichen Auftrennung auf einem Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel aufgebracht (pro Bahn 5 µg Protein). Die entstandenen Banden wurden danach mithilfe einer angelegten Spannung auf Polyvinylendifluorid-Membranen geblottet und die nichtspezifische Bindungsseite der Membran mit Milchpulver blockiert. Es folgte eine Inkubation mit den im Anschluss aufgelisteten Antikörpern:

- BMP-2 und BMP-4: Ziegen-IgG Antikörper (Human BMP-2/BMP-4 Antibody R&D AF355, 0,1 µg/ml, R&D Systems, Minneapolis, USA)
- CD31: Hasen-IgG Antikörper (Cell signaling 77699, 1:1.000, Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt am Main, Deutschland)
- Cyr61: Schaf-IgG Antikörper (R&D AF4055, 1 µg/ml, R&D Systems)
- OPG: Ratten-IgG Antikörper (OPG MAB4591 Monoclonal Antibody, 1 µg/µl, R&D Systems)
- PCNA: HRP Mäuse-IgG Antikörper (HRP-conjugated PCNA Monoclonal antibody Proteintech HRP-60097, 1.000 µg/ml, Proteintech Germany GmbH, Planegg-Martinsried, Deutschland)
- PI3K: Ziegen-IgG Antikörper (R&D AF2998, 1 µg/ml, R&D Systems)
- RANKL: Hasen-IgG Antikörper (Anti-sRANKL antibody ab62516, 0,25-0,5 µg/ml, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich)
- Runx2: Hasen-IgG Antikörper (Anti-RUNX2 antibody [EPR22858-106] - ChIP Grade, 1/1.000, Abcam, United Kingdom)
- VEGF: Hasen-IgG Antikörper (Anti-VEGFA antibody ab46154, 1 µg/ml, Abcam, United Kingdom)

Auf die Inkubation mit den Primärantikörpern folgte die Aufbringung der entsprechenden Sekundärantikörper:

- goat- α -rabbit IgG HRP (HAF008, 1:500, R&D Systems, USA)
- goat- α -mouse IgG HRP (P0447, 1:1.500, Dako Agilent Technologies, USA)
- rabbit- α -goat IgG HRP (P0449, 1:1.000, Dako Agilent Technologies, USA)
- rabbit- α -sheep IgG HRP (P0163, 1:1.000, Dako Agilent Technologies, USA)
- goat- α -rat IgG HRP (HAF005, 1:500, R&D Systems, USA)

β -Actin (Sc-47778 β -Aktin HRP, 1:1.000, 1,5 Stunden Raumtemperatur, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) diente als Kontrolle für die korrekte Beladung der Western Blots. Um die Proteinmengen optisch auswerten zu können, wurde Chemilumineszenz (Luminol-enhanced Chemiluminescence (ECL), GE Healthcare Amersham, Freiburg, Deutschland) zur Detektion genutzt. Um diese auszuwerten, wurden pro Membran je 250 μ l ECL-Detection-Reagenz 1 und 2 (Clarity Luminol Substrate, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) miteinander vermischt und aufpipettiert. Es folgte eine Inkubationszeit von einer Minute und die anschließende Darstellung der Lichtemission im ChemoCam Imager (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland), wobei die Target-Intensitätspixel (TIP) als Schlüsselmaß für die Proteinquantifizierung dienten. Diese Einheit kombiniert die Intensität und Position der nachgewiesenen Proteine auf dem Blot in Pixeln. Mithilfe der oben genannten Bildanalyse-Software wurde die Gesamtintensität des Zielproteins bestimmt und mit einem Korrekturfaktor multipliziert, um Unterschiede in der Beladung der Taschen zu kompensieren. Diese Korrektur ist bei der Nennung der TIP in den Ergebnissen automatisch mit enthalten und wird daher nicht gesondert ausgezeichnet.

5.3 Statistik

Für die Berechnung aller statistischen Werte kam das Programm SigmaPlot 13.0 (Systat Software, Inc., San José, USA) zur Anwendung. Um die statistischen Daten anzugeben, wird in dieser Arbeit stets der Mittelwert (MW) \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Für den Vergleich von Gruppen kam die Testung auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) sowie die Untersuchung der Varianzgleichheit (F-Test) mit anschließendem Student's t-Test zum Einsatz. Lag keine Normalverteilung vor, so wurde statt des Student's t-Tests der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Als signifikant gilt in dieser Arbeit ein Unterschied ab einem p-Wert von kleiner 0,05.

6 Ergebnisse

6.1 Biomechanik

Die absolute Biegesteifigkeit in der Clopidogrel-Gruppe war in Bezug auf den absoluten Mittelwert zwei Wochen postoperativ etwas niedriger als in der Kontrollgruppe, jedoch nicht signifikant ($3,5 \pm 0,9$ N/mm vs. $4,7 \pm 1,6$ N/mm) (Abbildung 21). Diese nicht signifikante Tendenz findet sich auch bei der relativen Biegesteifigkeit wieder ($3,0 \pm 0,8$ % vs. $5,2 \pm 2,2$ %) (Abbildung 22).

Fünf Wochen postoperativ zeigte sich weiterhin zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied, wenngleich auch hier die Femora der mit Clopidogrel therapierten Mäuse sowohl absolut ($24,7 \pm 12,85$ N/mm vs. $43,0 \pm 9,0$ N/mm) als auch relativ ($20,6 \pm 11,2$ % vs. $38,7 \pm 8,5$ %) tendenziell eine geringere Biegesteifigkeit aufwiesen (Abbildung 21, Abbildung 22).

Die gesunden Femora der Gegenseite wiesen zwischen der Clopidogrel- und der Kontrollgruppe weder nach zwei ($121,4 \pm 9,6$ N/mm vs. $117,1 \pm 13,2$ N/mm), noch nach fünf Wochen ($130 \pm 13,7$ N/mm vs. $117,0 \pm 9,4$ N/mm) einen Unterschied auf, sodass sich kein Anhalt auf systemische Wirkungen durch Clopidogrel auf das murine Skelett ergab (Abbildung 23).

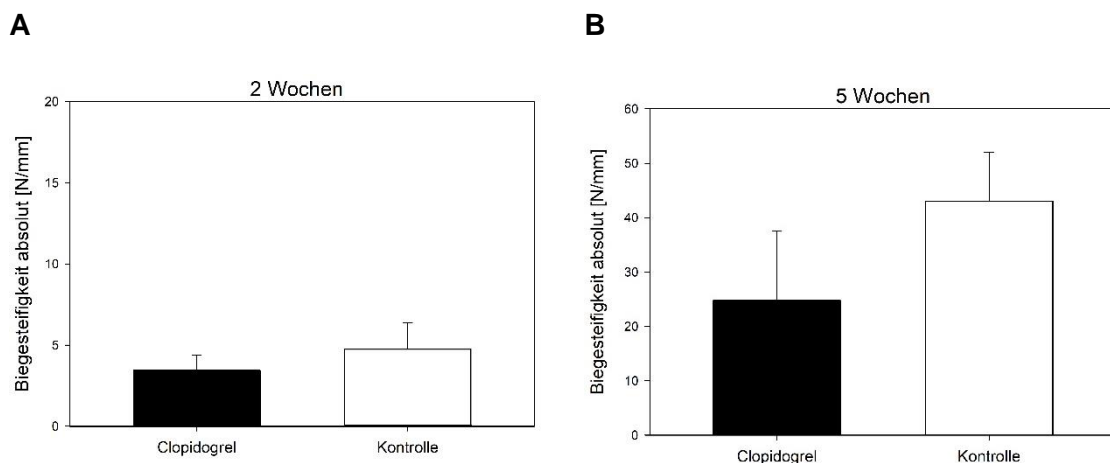


Abbildung 21: Absolute Biegesteifigkeit zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW \pm SEM.

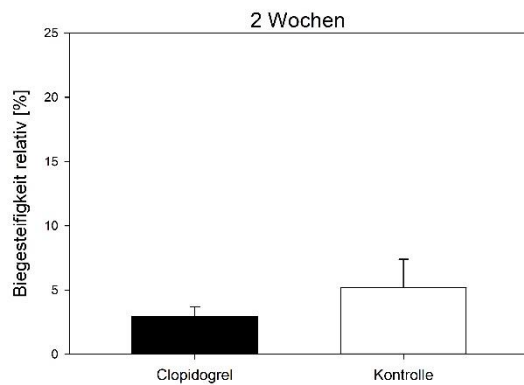
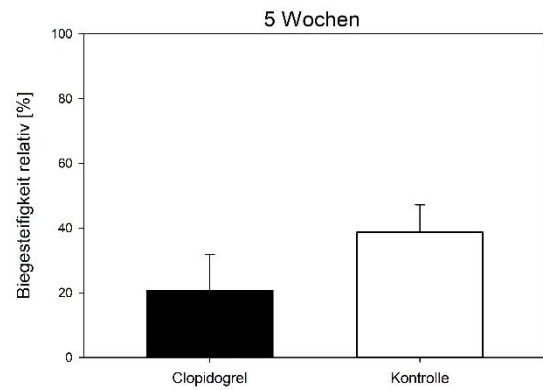
A**B**

Abbildung 22: Relative Biegesteifigkeit zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW \pm SEM.

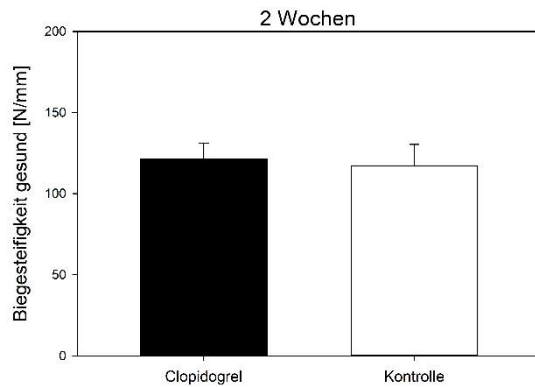
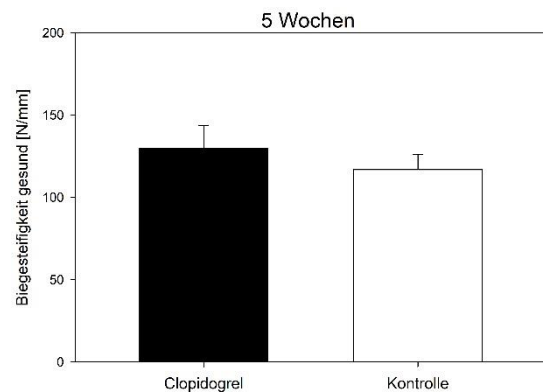
A**B**

Abbildung 23: Absolute Biegesteifigkeit gesunde Femora zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW \pm SEM.

6.2 Radiologie

Der Goldberg-Score zwei Wochen postoperativ ergab in beiden Gruppen geringe Werte als Zeichen der partiellen knöchernen Durchbauung ohne signifikanten Unterschied zwischen der Clopidogrel- und der Kontrollgruppe ($0,6 \pm 0,2$ versus $0,8 \pm 0,2$) (Abbildung 24).

Fünf Wochen postoperativ zeigten sich die Frakturspalten beider Gruppen radiologisch nahezu verheilt, wobei auch hier kein signifikanter Unterschied nachweisbar war ($1,4 \pm 0,5$ vs. $1,8 \pm 0,5$) (Abbildung 24).

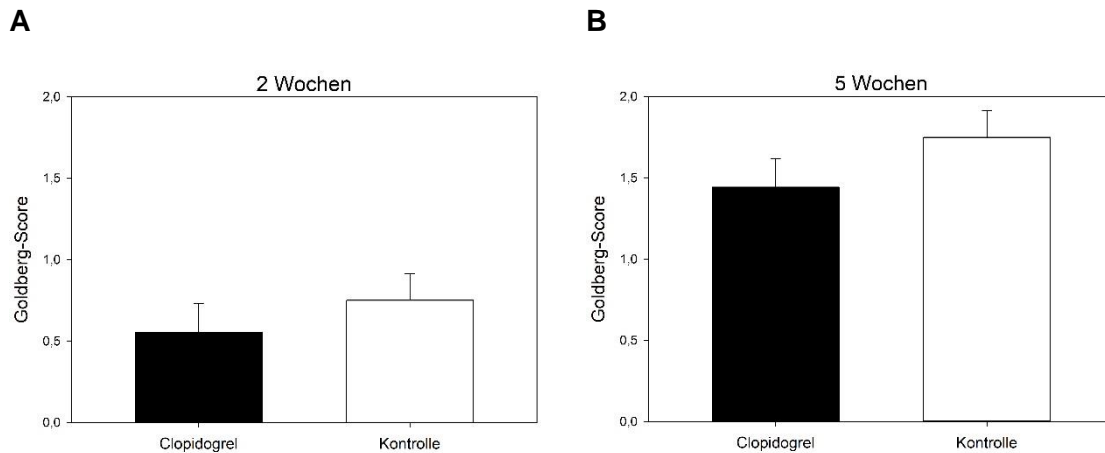


Abbildung 24: Radiologische Auswertung des Goldberg-Scores zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW ± SEM. * p < 0,05 vs. Kontrolle.

6.3 Computertomographie

Zwei Wochen postoperativ betrug das Knochenvolumen der Clopidogrel-Gruppe $7,5 \pm 0,8 \text{ mm}^3$ und in der Kontrollgruppe ($6,1 \pm 1,5 \text{ mm}^3$, $p > 0,05$) (Abbildung 25). Der relative Knochenanteil am Kallusvolumen ergab keinen signifikanten Unterschied (BV/TV $50,4 \pm 7,2 \%$ vs. $45,7 \pm 4,2 \%$, $p > 0,05$) (Abbildung 26). Auch die Trabekelzahl ($2,0 \pm 0,1 \text{ 1/mm}$ vs. $2,3 \pm 0,4 \text{ 1/mm}$, $p > 0,05$) (Abbildung 27), der Trabekelabstand ($0,5 \pm 0,02 \text{ mm}$ vs. $0,48 \pm 0,07 \text{ mm}$, $p > 0,05$) (Abbildung 28) und die Dicke der Trabekel ($0,092 \pm 0,008 \text{ mm}$ vs. $0,093 \pm 0,007$, $p > 0,05$) (Abbildung 29) waren nach zwei Wochen bei beiden Gruppen ähnlich.

Fünf Wochen postoperativ ergab die Analyse der CT-Werte ebenfalls keinen Unterschied zwischen der Medikamenten- und der Kontrollgruppe. Weder das absolute Volumen noch der relative Anteil des Knochens weicht unter Clopidogrel-Behandlung von der der Kontrollgruppe ab (BV $7,2 \pm 1,4 \text{ mm}^3$ vs. $7,1 \pm 1,1 \text{ mm}^3$, $p > 0,05$; BV/TV $50,4 \pm 7,2 \%$ vs. $45,7 \pm 4,2 \%$, $p > 0,05$) (Abbildung 25, Abbildung 26). Ein analoges Bild zeichnen die Trabekelparameter, welche in beiden Versuchsgruppen vergleichbare Werte aufwiesen (TbN $3,0 \pm 0,3 \text{ 1/mm}$ vs. $2,6 \pm 0,3 \text{ 1/mm}$, $p > 0,05$; TbSp $0,23 \pm 0,04 \text{ mm}$ vs. $0,3 \pm 0,04 \text{ mm}$, $p > 0,05$; TbTh $0,17 \pm 0,02 \text{ mm}$ vs. $0,18 \pm 0,01 \text{ mm}$, $p > 0,05$) (Abbildung 27 - 22).

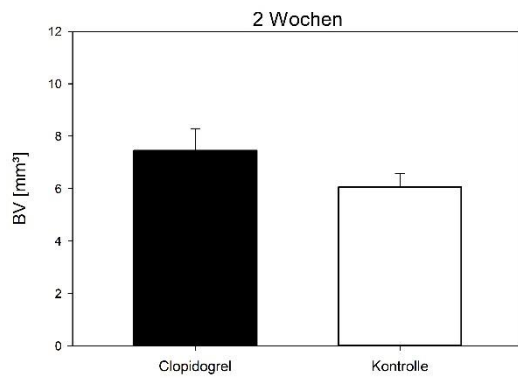
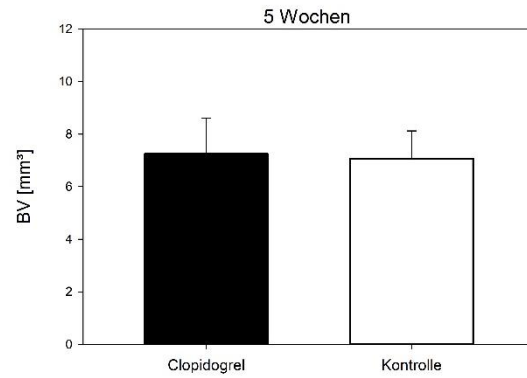
A**B**

Abbildung 25: Absolutes Knochenvolumen im Kallus zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW \pm SEM. * p < 0,05 vs. Kontrolle.

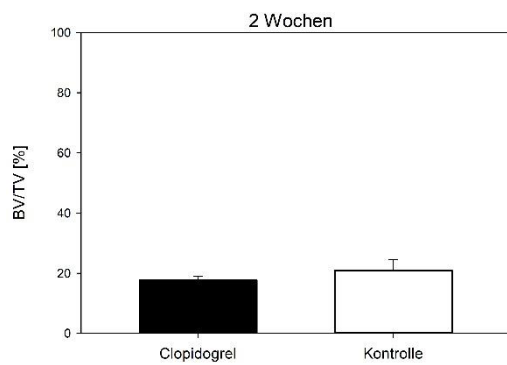
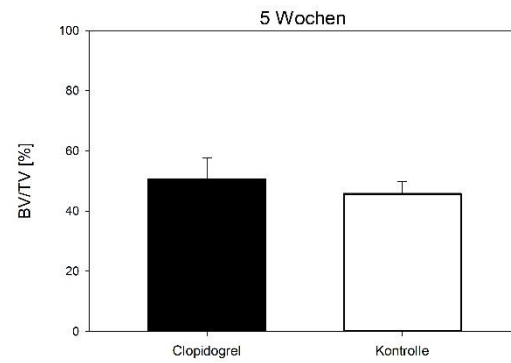
A**B**

Abbildung 26: Relativer Knochenanteil am Kallusvolumen zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW \pm SEM.

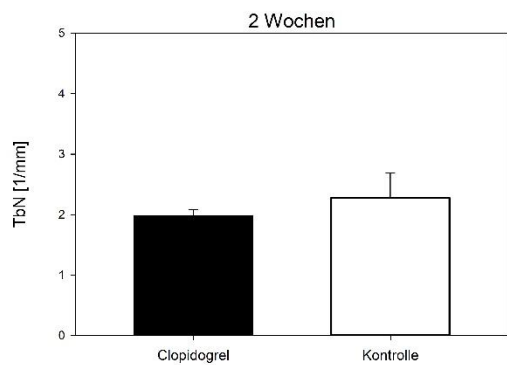
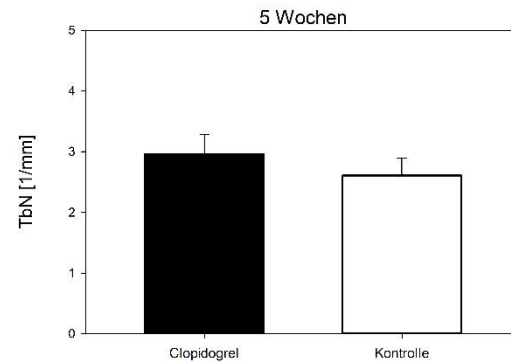
A**B**

Abbildung 27: Trabekelanzahl zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW \pm SEM.

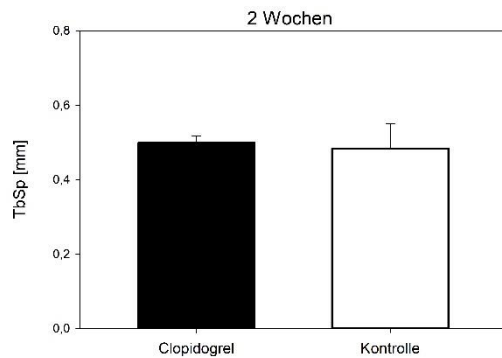
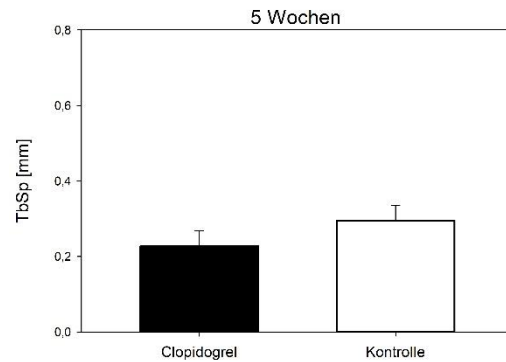
A**B**

Abbildung 28: Trabekelabstand zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW \pm SEM.

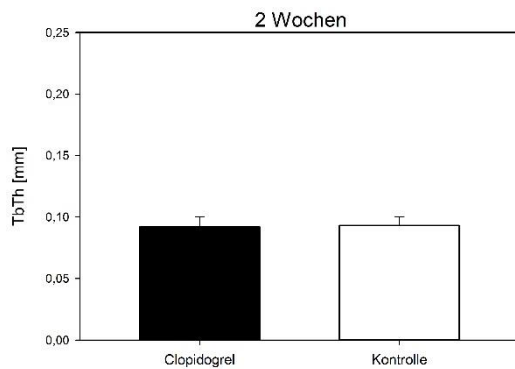
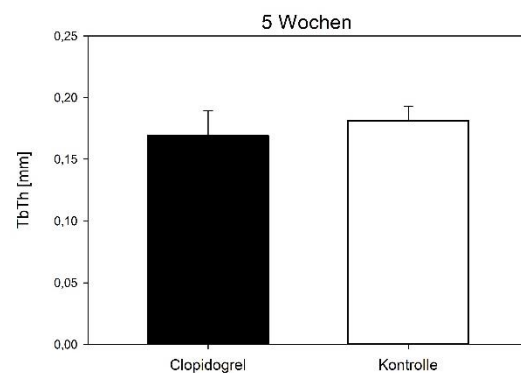
A**B**

Abbildung 29: Trabekeldicke zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW \pm SEM.

6.4 Histomorphometrie

Die Gesamtkallusfläche der Proben beider Gruppen ergaben zwei Wochen postoperativ keinen signifikanten Unterschied ($11,9 \pm 1,0 \text{ mm}^2$ vs. $10,3 \pm 1,1 \text{ mm}^2$, $p > 0,05$). Fünf Wochen postoperativ waren die Proben der Clopidogrel- und der Kontrollgruppe ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich bei typischen Anzeichen eines Remodeling-Prozesses ($5,5 \pm 0,8 \text{ mm}^2$ vs. $5,0 \pm 0,7 \text{ mm}^2$, $p > 0,05$) (Abbildung 30).

Die Analyse der prozentualen Verteilung der Gewebearten am Kallus ist nach einem Beobachtungszeitraum von zwei Wochen weder für Knochen ($21,5 \pm 3,4 \%$ vs. $29,6 \pm 4,7 \%$ $p > 0,05$) (Abbildung 31, A), Knorpel ($17,9 \pm 5,3 \%$ vs. $19,8 \pm 6,7 \%$, $p > 0,05$) (Abbildung 32, A) oder Bindegewebe ($60,6 \pm 7,1 \%$ vs. $50,6 \pm 6,5 \%$, $p > 0,05$) (Abbildung 33, A) signifikant verschieden zwischen einer Behandlung mit Clopidogrel oder einem

Vehikel. Jedoch findet sich bei der Analyse des relativen Knochenanteils eine Tendenz dahingehend, dass in der Clopidogrel-Gruppe Kallus mit weniger Knochen zu Gunsten eines höheren Bindegewebeanteils als bei der Kontrollgruppe vorliegt (Abbildung 31, A; Abbildung 33, A). Fünf Wochen postoperativ bestätigen sich die Tendenzen der 2-Wochen-Tiere. Nach dieser Zeit ist der prozentuale Knochenanteil am Kallus der Clopidogrel-behandelten Mäuse signifikant geringer als der Anteil bei den entsprechenden Kontrolltieren ($37,7 \pm 4,5 \%$ vs. $56,8 \pm 4,9 \%$, $p < 0,05$) (Abbildung 31, B). Der Bindegewebsanteil bei der Medikamentengruppe ist im Vergleich zur Kontrollgruppe vice versa signifikant erhöht ($55,4 \pm 4,1 \%$ vs. $42,5 \pm 5,0 \%$, $p < 0,05$) (Abbildung 33, B). Bei Betrachtung des Knorpelanteils findet man bei den mit Clopidogrel behandelten Tieren leicht höhere Werte als bei den Mäusen, die ein Vehikel erhielten, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant ($6,9 \pm 2,9 \%$ vs. $0,7 \pm 0,4 \%$, $p > 0,05$) (Abbildung 32, B).

Die Werte des Histoscores der Clopidogrel-Gruppe sind zwei Wochen postoperativ mit $0,2 \pm 0,1$ signifikant niedriger als die ihrer Vergleichsgruppe ($1,4 \pm 0,5$) (Abbildung 34, A). Nach fünf Wochen ist der Unterschied im Histoscore nicht mehr signifikant, behält seine Tendenz jedoch bei ($1,6 \pm 0,4$ vs. $3,0 \pm 0,5$) (Abbildung 34, B).

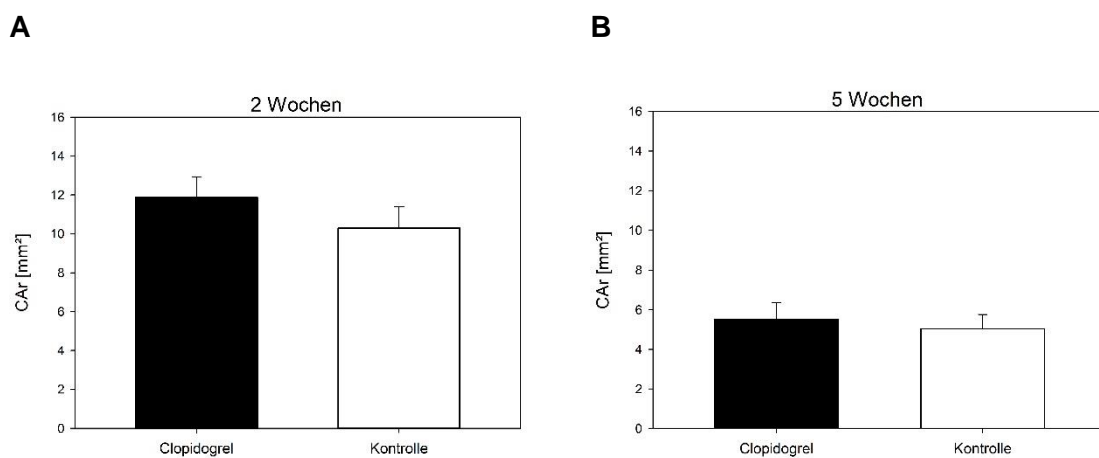


Abbildung 30: Gesamtcallusfläche zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW ± SEM.

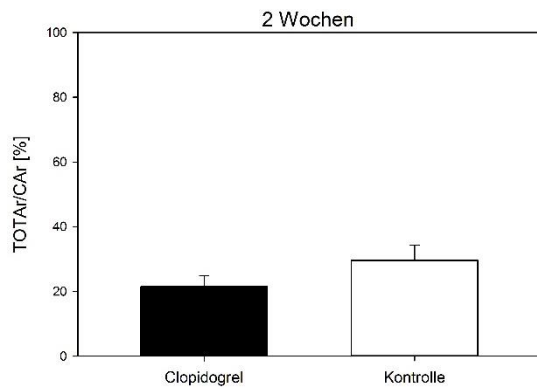
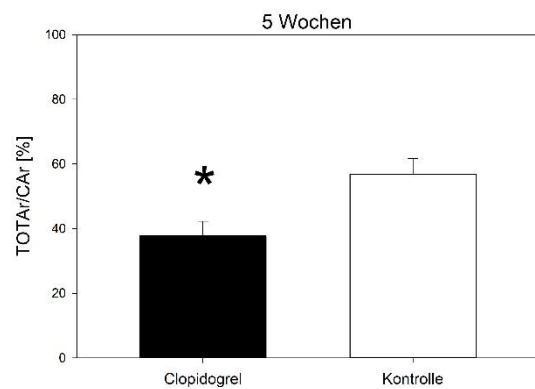
A**B**

Abbildung 31: Knochenanteil am Gesamtkallus zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW \pm SEM. * p < 0,05 vs. Kontrolle.

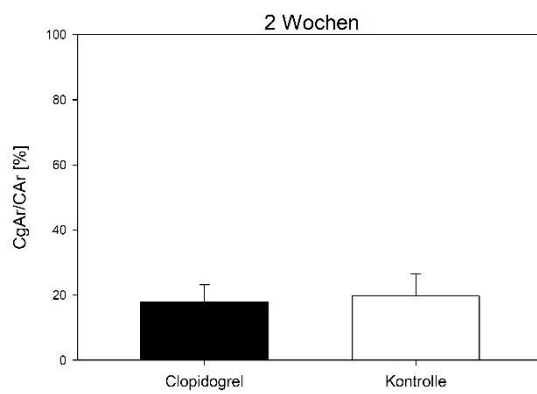
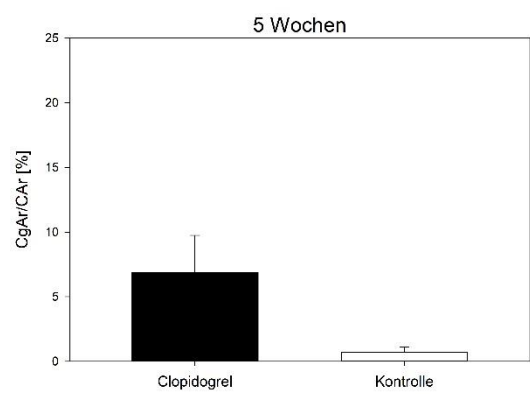
A**B**

Abbildung 32: Knorpelanteil am Gesamtkallus zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW \pm SEM.

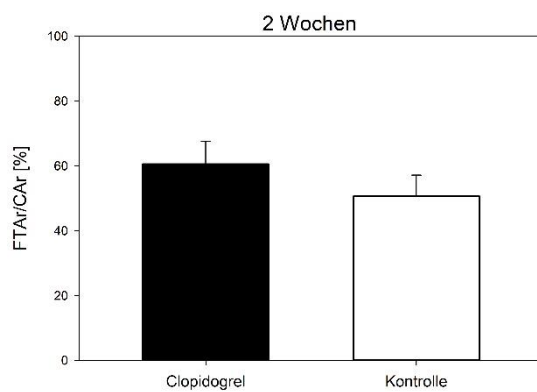
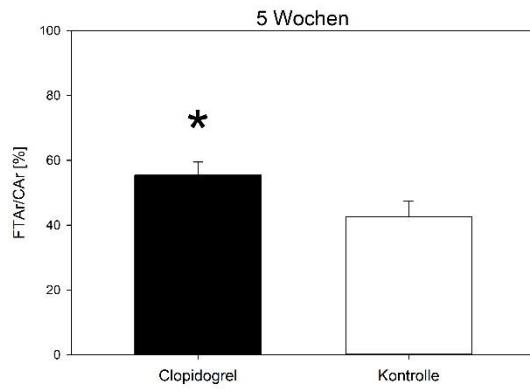
A**B**

Abbildung 33: Bindegewebsanteil am Gesamtkallus zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW \pm SEM. * p < 0,05 vs. Kontrolle.

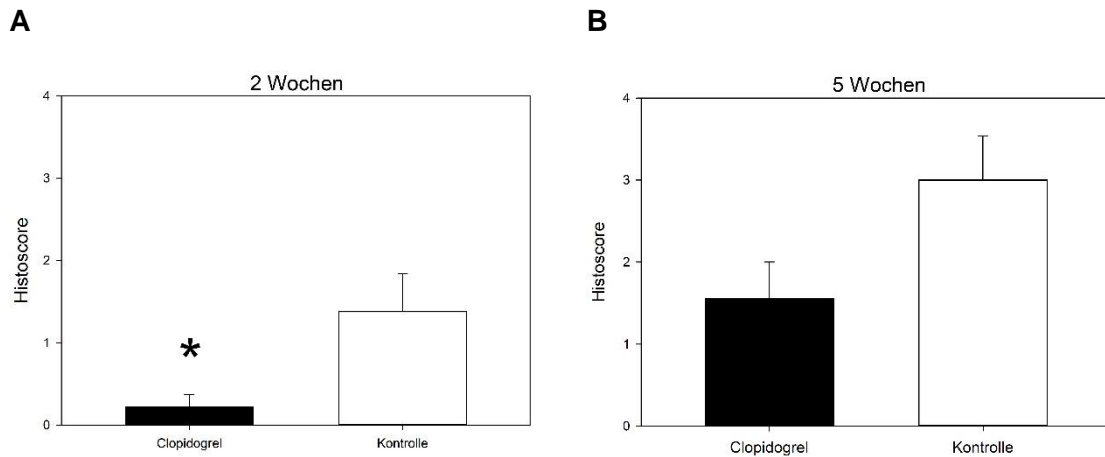


Abbildung 34: Histoscore zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW ± SEM. * p < 0,05 vs. Kontrolle.

6.5 Biochemie / Western Blot

Der Wachstumsfaktor RANKL wurde in den Frakturen der Clopidogrel-Gruppe geringfügig, jedoch nicht signifikant weniger exprimiert als in der Kontrollgruppe ($21,4 \times 10^3 \pm 2,3 \times 10^3$ TIP vs. $26,7 \times 10^3 \pm 5,8 \times 10^3$ TIP) (Abbildung 35).

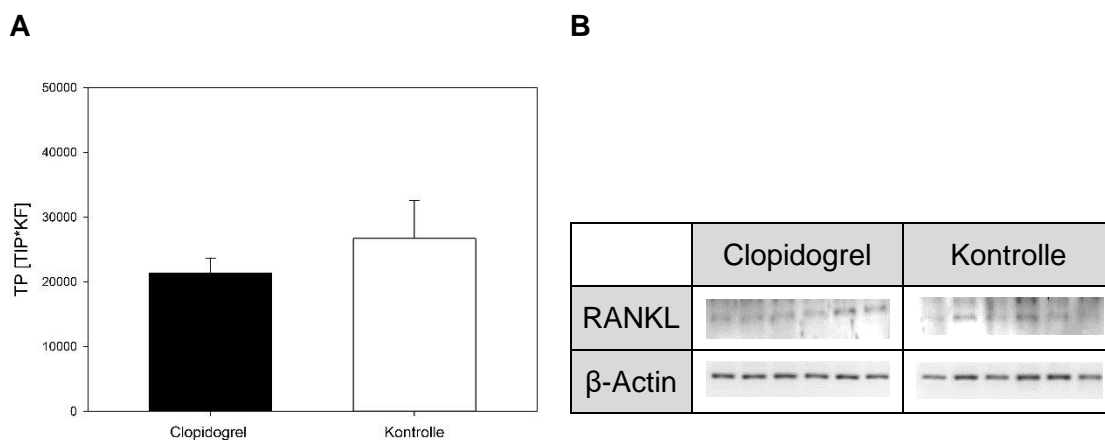


Abbildung 35: Expression von RANKL zwei Wochen postoperativ (A) mit Blots der jeweiligen Gruppen (B). MW ± SEM.

OPG war tendenziell in Proben der Kontrollgruppe mehr exprimiert, zeigt jedoch im Vergleich der beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied ($82,5 \times 10^3 \pm 17,7 \times 10^3$ TIP vs. $95,4 \times 10^3 \pm 84,4 \times 10^3$ TIP) (Abbildung 36).

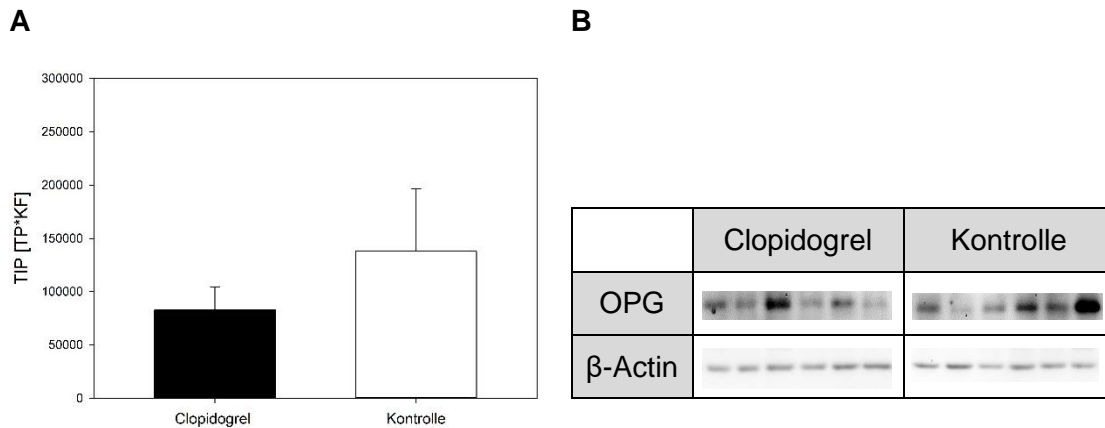


Abbildung 36: Expression von OPG zwei Wochen postoperativ (A) mit Blots der jeweiligen Gruppen (B). MW \pm SEM.

Die Ausschüttung des Zellproliferation-steuernden Proteins RUNX2 wurde durch die Gabe von Clopidogrel im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht verändert ($20,2 \times 10^3 \pm 2,6 \times 10^3$ TIP vs. $22 \times 10^3 \pm 4,9 \times 10^3$ TIP) (Abbildung 37).

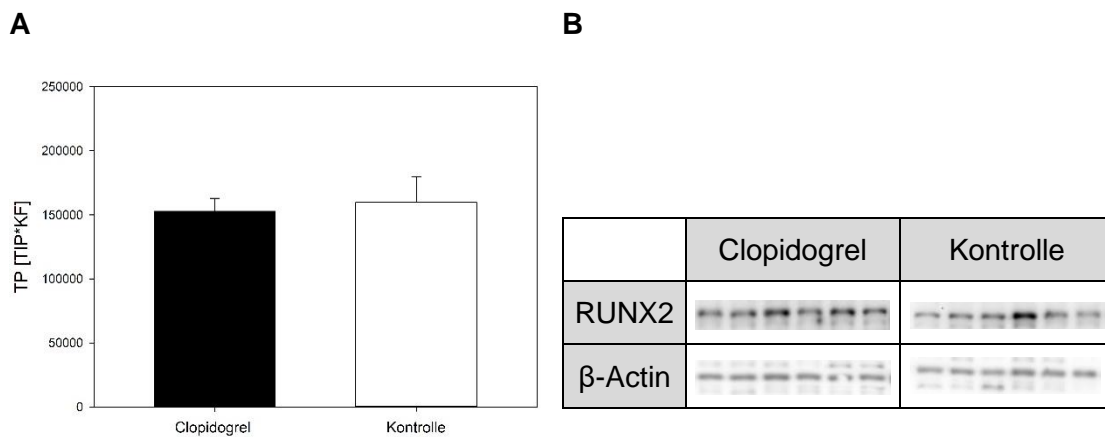


Abbildung 37: Expression von RUNX2 zwei Wochen postoperativ (A) mit Blots der jeweiligen Gruppen (B). MW \pm SEM.

Im Kallus der Mäuse, die Clopidogrel verabreicht bekamen, fand sich eine höhere Menge des Osteogenesefaktors BMP-2 als bei den Kontrolltieren, jedoch in einem nicht signifikanten Maß ($140,7 \pm 22,0$ TIP vs. $90,5 \pm 14,8$ TIP) (Abbildung 38).

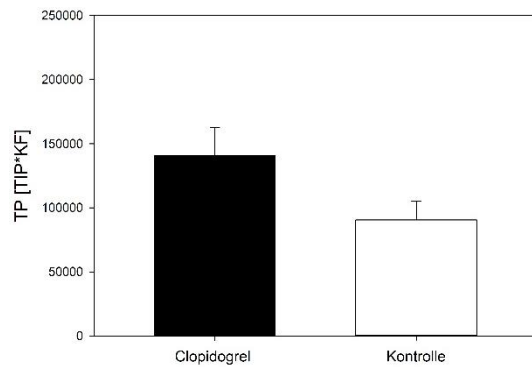
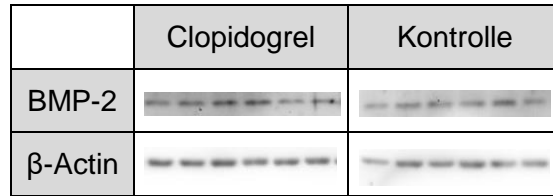
A**B**

Abbildung 38: Expression von BMP-2 zwei Wochen postoperativ (A) mit Blots der jeweiligen Gruppen (B). MW ± SEM.

Die Expression von BMP-4 ist bei der Medikamentengruppe verglichen zur Kontrollgruppe signifikant vermindert ($6,7 \times 10^3 \pm 1,9 \times 10^3$ TIP vs. $16,0 \pm 1,7 \times 10^3$ TIP) (Abbildung 39).

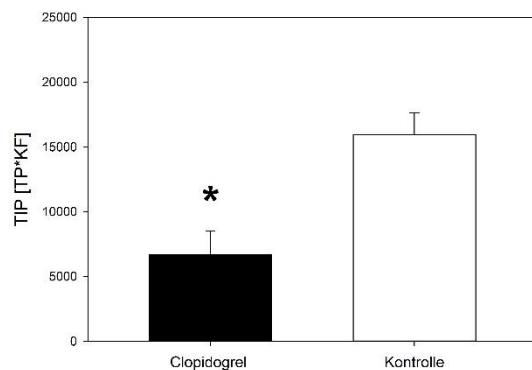
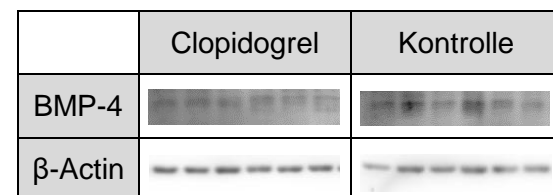
A**B**

Abbildung 39: Expression von BMP-4 zwei Wochen postoperativ (A) mit Blots der jeweiligen Gruppen (B). MW ± SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Eine nahezu identische Ausschüttung im Kallusgewebe beider Gruppen findet sich bei dem angiogenen Wachstumsfaktor Cyr61 ($89,7 \times 10^3 \pm 8,9 \times 10^3$ TIP vs. $88,1 \times 10^3 \pm 13,1 \times 10^3$ TIP) (Abbildung 40).

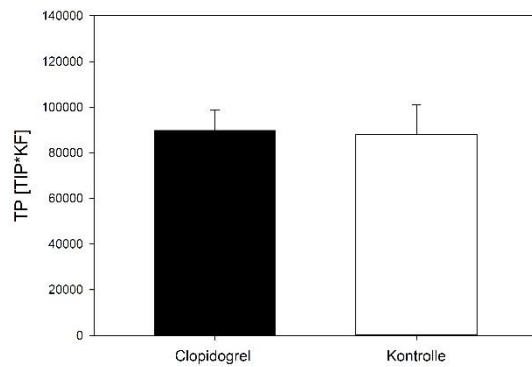
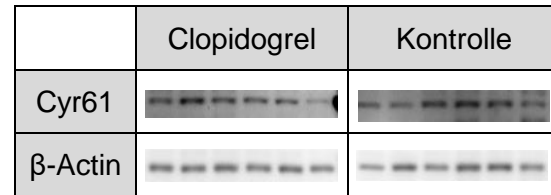
A**B**

Abbildung 40: Expression von Cyr61 zwei Wochen postoperativ (A) mit Blots der jeweiligen Gruppen (B). MW \pm SEM.

Im Kallus der Clopidogrel-Gruppe ist die Menge des gemessenen PCNAs im Vergleich zu der Menge in der Kontrollgruppe geringfügig vermindert, jedoch nicht signifikant ($93,7 \times 10^3 \pm 12,7 \times 10^3$ TIP vs. $113,2 \times 10^3 \pm 24,2 \times 10^3$ TIP) (Abbildung 41).

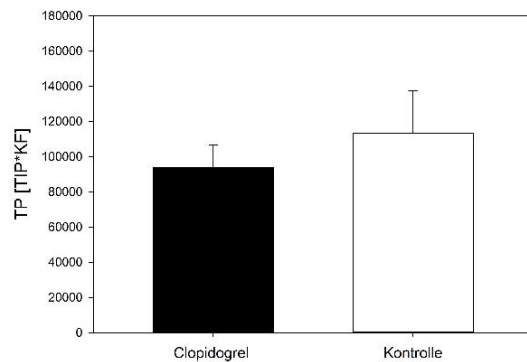
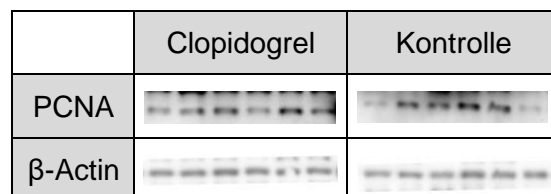
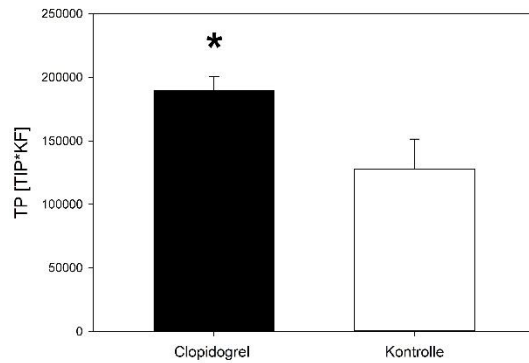
A**B**

Abbildung 41: Expression von PCNA zwei Wochen postoperativ (A) mit Blots der jeweiligen Gruppen (B). MW \pm SEM.

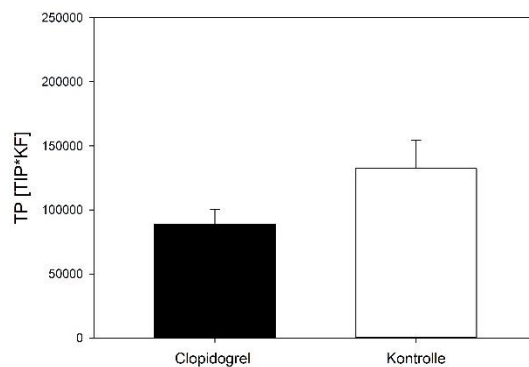
Das Adhäsionsmolekül CD31 ist in seiner Expression in der Gruppe, welche mit Clopidogrel therapiert wurde, signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe ($189,6 \times 10^3 \pm 11,1 \times 10^3$ TIP vs. $127,9 \times 10^3 \pm 23,6 \times 10^3$ TIP) (Abbildung 42).

A**B**

	Clopidogrel	Kontrolle
CD31		
β-Actin		

Abbildung 42: Expression von CD31 zwei Wochen postoperativ (A) mit Blots der jeweiligen Gruppen (B). MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

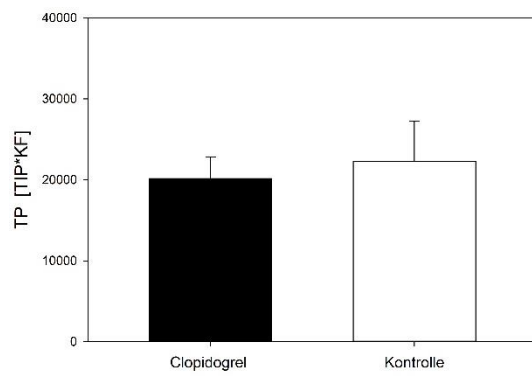
Die Menge des Wachstumsfaktors PI3K ist zwar geringer als bei den Kontrolltieren, zeigt statistisch jedoch keine Signifikanz ($88,7 \times 10^3 \pm 11,6 \times 10^3$ TIP vs. $132,3 \times 10^3 \pm 22,1 \times 10^3$ TIP) (Abbildung 43).

A**B**

	Clopidogrel	Kontrolle
PI3K		
β-Actin		

Abbildung 43: Expression von PI3K zwei Wochen postoperativ (A) mit Blots der jeweiligen Gruppen (B). MW \pm SEM.

Der angiogene Marker VEGF wurde in den Kallusgeweben von Tieren beider Vergleichsgruppen in nicht signifikant unterscheidbarem Ausmaß exprimiert ($20,2 \times 10^3 \pm 2,6 \times 10^3$ TIP vs. $22,3 \times 10^3 \pm 4,9 \times 10^3$ TIP) (Abbildung 44).

A**B**

	Clopidogrel	Kontrolle
VEGF		
β -Actin		

Abbildung 44: Expression von VEGF zwei Wochen postoperativ (A) mit Blots der jeweiligen Gruppen (B). MW \pm SEM.

7 Diskussion

7.1 Diskussion der Methoden

Um die Prinzipien der Frakturheilung zu untersuchen, gibt es verschiedene grundlegende Ansätze, welche wiederum auf unterschiedliche Weisen umgesetzt werden können. Neben dem in dieser Studie gewählten in vivo-Tierversuch können auch in vitro-Versuche an Zellkulturen durchgeführt oder klinische Fälle analysiert werden [2,101]. Jede dieser Methoden hat Vor- und Nachteile. So können in vitro-Versuche auf menschliche Zellen zurückgreifen und damit speziesbezogene Unterschiede vermeiden [99]. Jedoch sind hier die benötigten Zellen für entsprechende Zellkulturen teils schwer zu isolieren und die Untersuchungsmöglichkeiten auf Histologie und Biochemie limitiert. Funktionelle und systemische Analysen zu den Auswirkungen eines Medikaments auf einen Organismus sind hierbei nicht möglich [23].

Werden Untersuchungen an Menschen durchgeführt, ist in der Regel eine Beschränkung auf retrospektive klinische Daten gegeben, wobei bei Versuchen am Menschen auch stets ethische Belange zu beachten sind – insbesondere wenn prospektive Ansätze verfolgt werden [70]. Der Beobachtungszeitraum erstreckt sich oft über Jahre, was den Aufwand für klinische Studien erheblich erhöht. Allerdings wird dieser Nachteil aufgrund der speziesinternen direkten Übertragbarkeit auf den klinischen Behandlungsalltag relativiert. [69].

Tierexperimentelle Studien an Mäusen erlauben eine verhältnismäßig hohe Anzahl an Versuchstieren, jedoch ist diese im Vergleich zu klinischen Kohorten-Studien, welche viele Tausend Patienten einschließen können, gering. Trotzdem stellt das angewandte Tiermodell gerade in der Grundlagenforschung einen Kompromiss zwischen Zellversuchen in vitro und klinischer Anwendung am Menschen dar, da es sowohl Beobachtungen am lebenden Objekt als auch auf Zellebene erlaubt. Somit lässt sich der gesamte Heilungsprozess abbilden, statt der alleinigen Beurteilung entkoppelter zellulärer Einzelsysteme bei in vitro-Experimenten. Zusätzlich sind histomorphometrische und biochemische Untersuchungen post mortem möglich, welche bei klinischen Versuchen nicht zu realisieren sind. Zudem ist das Spektrum an Analysemöglichkeiten breiter als bei Studien am Menschen. So können die Knochen der Versuchstiere zum Beispiel biomechanischen Testungen unterzogen werden. Unterschiede hinsichtlich der Frakturheilung oder dem anatomischen Aufbau zwischen den verschiedenen Spezies und dem Menschen limitieren die klinische Übertragbarkeit

der erzielten Studienergebnisse [129]. Es ist möglich, dass eine größere Anzahl an Versuchstieren in der vorliegenden Studie statistische Auswirkungen gehabt hätte. Die Anzahl an Versuchstieren orientierte sich jedoch an vorangegangenen Studien und wäre in größerer Zahl ethisch kaum vertretbar gewesen [46,114].

Das Spektrum tierexperimenteller in vivo-Studien ist breit gefächert, weshalb die Wahl des optimalen Versuchsaufbaus das Einbeziehen multipler Variablen in den Entscheidungsprozess erfordert.

Als Versuchstier wurde bei dieser Studie die Maus gewählt, da sie leicht verfügbar, kostengünstig und platzsparend in der Haltung ist, was eine größere Studienpopulation erlaubt als bei Großtieren wie beispielsweise den Schafen. Auch die vollständige Entschlüsselung des murinen Genoms und die Verfügbarkeit verschiedenster transgener Stämme sowie spezifische molekulargenetische Antikörper sind von großem Vorteil [105]. Allerdings limitiert die Anatomie der Maus die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen, denn anstelle des im humanen Knochen vorkommenden und für die Regeneration von Frakturen bedeutsamen Havers-Systems bilden Mäuseknochen sogenannte Resorptionshöhlen, welche von Osteoblasten im Heilungsverlauf besiedelt und so verschlossen werden [83]. Dennoch überwiegen aus Sicht der Studienverantwortlichen die genannten Vorteile gegenüber den Nachteilen bei Verwendung der Maus als Versuchstierart.

Nach der Entscheidung für die Versuchstierart Maus ist die Wahl des genauen Frakturmodells von entscheidender Bedeutung. Ein Frakturmodell schlüsselt sich auf in die Technik der Frakturherzeugung, die Lokalisation der Fraktur und die Methode der anschließenden Stabilisation [45]. Für Ersteres stehen primär zwei Möglichkeiten zur Wahl; zum einen die in dieser Studie angewandte und von Bonnarens et al. (1984) entwickelte geschlossene Frakturierung per stumpfer Guillotine und zum anderen eine offene Durchtrennung des Knochens mit Hilfe eines Sägedrahtes oder Fräse [36]. Die geschlossene Technik überzeugt durch eine geringere Invasivität und eine schnellere Frakturheilung, ist jedoch nicht so präzise wie eine offene Osteotomie beziehungsweise Frakturierung [36,61]. Als Lokalisation für eine Fraktur wird in den meisten Modellen, in Anlehnung an die Technik von Hiltunen et al., die Tibia ausgewählt, da diese verhältnismäßig groß ist und durch die Verbindung mit der Fibula bereits ohne eine operative Schienung relativ stabil gehalten werden kann [42,68]. Ihr dreieckiger Querschnitt ist jedoch weniger gut für mechanische Analysen, wie zum Beispiel Biegetests geeignet, da diese lediglich bei zylindrischen Knochen, wie beispielsweise dem Femur, standardisierbare Werte erzeugen [68]. Das gleiche Problem hinsichtlich der Verwendung für biomechanische Prüfungen trifft auch auf Rippenknochen zu, die

vorwiegend für die Untersuchung genetischer Expressionen während des Verlaufs der Frakturheilung verwendet werden. Infolgedessen erweist sich das Femur als optimal geeignet für das Frakturmodell dieser Studie. Zur Frakturstabilisierung orientiert sich diese Studie an dem Frakturmodell von Holstein et al. aus dem Jahr 2009, welches eine intramedulläre Zugschraube (MouseScrew™) zur rotationsfreien und achsstabilen Bruchversorgung nutzt [52]. Die MouseScrew™ stellt einen effektiven Kompromiss dar zwischen einer hohen Stabilität der Fraktur und einer minimalen Invasivität. Die einzige Möglichkeit, umliegendes Gewebe noch weniger zu schädigen, wäre, ganz auf eine operative Frakturversorgung zu verzichten, wodurch jedoch keinerlei standardisierte Ergebnisse aufgrund unkontrollierter Bewegungen im Frakturspalt erzielbar wären [21]. Eine Stabilität, die über die der MouseScrew™ hinaus geht, kann nur durch ein höheres Maß an Weichteilschädigung verbunden mit einem größeren Infektionsrisiko erzielt werden. Exemplarisch dafür ist der Fixateur externe, welcher durch einen offenen Zugang zum Knochen über einen großen lateralen Schnitt durch das gesamte Weichgewebe des Oberschenkels angebracht wird [98].

Um den Medikamenteneinfluss möglichst differenziert abbilden zu können, wurden zwei unterschiedliche Beobachtungszeiträume für die Studie gewählt. Bei Mäusen wird aufgrund der im Vergleich zum Menschen beschleunigten Frakturheilung das Maximum an Kallusgewebe bereits am 14. postoperativen Tag erreicht, anstatt nach mehreren Wochen bis Monaten [42,68,80]. Somit ist ein Zeitpunkt von zwei Wochen zur Beurteilung der Frühphase der Frakturheilung sowie für die Entnahme von Proben zur biochemischen Analyse von Wachstumsfaktoren gut geeignet. Nach vier Wochen ist die ursprüngliche Steifigkeit zu etwa 75 % wiederhergestellt und das Kallusgewebe fast vollständig zurückgebildet, womit die Frakturheilung in ihre Spätphase übergeht. Der zweite Auswertungszeitpunkt wurde entsprechend dem Muster zahlreicher vorangegangener Studien auf das Ende der fünften postoperativen Woche festgelegt, um die Fraktur in ihrer Spätphase zu untersuchen, da die Heilungsphase durch die induzierte Ischämie potenziell verlängert sein könnte [13,46–48,89,114].

Eine Ischämie des rechten Hinterlaufes der Mäuse soll die Frakturheilung erschweren, ohne dabei die Vitalität der gesamten Extremität zu gefährden. Aus diesem Grund wurde sich gegen die etablierte Technik nach Tang et al. entschieden, bei welcher es durch die Resektion der proximalen A. femoralis zwischen Leistenband und poplitealer Bifurkation zu einer verzögerten Frakturheilung kommt [67,120]. Zusätzlich traten im Verlauf der Versuchsreihe von Tang et al. gehäuft postoperative Wundheilungsstörungen und Nekrosen im gesamten Beinbereich auf [67]. In der vorliegenden Studie wurde daher statt einer schweren Ischämie die Methode nach Menger et al. verwendet [74]. Diese Methode erzeugt eine milde Ischämie durch die doppelte Ligatur der A. profunda femoris,

die hauptsächlich den Femurschaft und die mediale Oberschenkelmuskulatur betrifft, ohne eine Unterversorgung der gesamten Extremität zu provozieren, wodurch deutlich weniger Komplikationen, wie Gangbildveränderungen, Wundheilungsstörungen und Nekrosen entstehen, als in Folge einer schweren Ischämie nach Resektion der Femoralarterie [74]. Im Hinblick auf die Vergleichbarkeit des angewandten Ischämie-modells mit der menschlichen pAVK, welche mit Hilfe dieses Eingriffes nachgeahmt werden soll, besteht die Limitation, dass diese Operation eine akute Ischämie erzeugt, welche die langfristigen Auswirkungen einer chronischen Minderperfusion nicht vollständig abbilden kann. Dennoch ist der lokale ischämische Effekt bei der gewählten Ligatur groß genug, um eine krankhafte, pAVK-ähnliche Durchblutungssituation zu konstruieren, da die A. profunda femoris nach diesem Eingriff nur in sehr geringem Maß Kollateralen ausbildet. Damit eignet sich diese Methode im Vergleich zu dem Modell von Tang et al. insgesamt deutlich besser, um die gewünschte Klinik zu repräsentieren und wurde daher für die vorliegende Studie bevorzugt.

Da die A. profunda femoris hauptsächlich nur den Femurschaft und die mediale Oberschenkelmuskulatur versorgt, kann eine milde Ischämie erzeugt werden, die relativ lokal wirkt, ohne die Versorgung der restlichen Extremität zu beeinträchtigen [5,62,120]. Als Grundlage für diese Form der Ischämieinduktion diente die Studie von Menger et al., in der die Auswirkungen einer Resektion der A. femoralis distal des Leistenbandes mit einer Ligatur der A. profunda femoris verglichen wurden [74]. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine mildere Ischämie deutlich weniger Komplikationen, wie Gangbildveränderungen, Wundheilungsstörungen und Nekrosen verursacht, als die schwere Ischämie nach Resektion der Femoralarterie. Der lokale ischämische Effekt ist bei einer Ligatur dennoch groß genug, da die A. profunda femoris nach diesem Eingriff nur in sehr geringem Maß Kollateralen ausbildet [5].

Die standardmäßige Clopidogrel-Dosis pro Tag bei Erwachsenen beträgt 75 mg, was bei einem Durchschnittsgewicht der deutschen Bevölkerung über 18 Jahren von 77 kg, etwa 1 mg/kg KG entspricht [28,145]. Der zu untersuchende Wirkstoff Clopidogrel wurde den Mäusen der Medikamentenpopulation in der Dosierung 3 mg/kg KG verabreicht. Dabei wurde sich an anderen Kleintierstudien orientiert, die die Wirkung von Clopidogrel auf die Frakturheilung untersuchten [115]. Die Studie von Wong et al. zeigt auf, dass eine Dosis von 3 mg/kg KG bei Kaninchen eine vergleichbare Plättchenhemmung erzeugt wie 75 mg/Tag beim Menschen [132]. Daher wurde sich in der vorliegenden Studie für diese Dosierung entschieden.

Die 20- bis 30-minütige Operation der rechten hinteren Extremität wurde von den Mäusen gut toleriert, ohne dass es im postoperativen Verlauf zu Infektionen,

Wundheilungsstörungen, Nekrosen oder Verhaltensauffälligkeiten kam. So kehrten die Nager bereits ab dem 2.-3. Tag wieder zu ihrem physiologischen Verhaltens- und Bewegungsmuster zurück, wodurch es zu einer vollständigen Belastung des operierten Femurs kam. Am Ende des Beobachtungszeitraumes von zwei beziehungsweise fünf Wochen wurden die Mäuse narkotisiert und die explantierten Femora radiologisch, biomechanisch und histologisch analysiert. Einen Sonderfall stellten die Tiere für die Western Blot-Analysen dar, da von deren operierten Femora nur der Kallus zur biochemischen Untersuchung zwei Wochen postoperativ entnommen wurde. Nach fünf Wochen Frakturheilung ist der Remodeling-Prozess weit fortgeschritten und nur wenig Kallus vorhanden, weshalb zu diesem Zeitpunkt eine Western Blot-Analyse nicht standardisiert möglich wäre und deshalb auf eine Untersuchung fünf Wochen postoperativ verzichtet wurde [81].

Da die biomechanische Testung unmittelbar nach der Explantation des Knochens erfolgte und sowohl für die radiologischen als auch histologischen Untersuchungsverfahren ein unversehrter Knochen notwendig war, musste ein zerstörungsfreies Verfahren Anwendung finden. Auf Grund dessen greift diese Studie auf die bewährte Technik des 3-Punkt-Biegeverfahrens zurück. Dieses Verfahren erlaubte es, ein Kraft-Weg-Diagramm des Knochens aufzuzeichnen, aus welchem die Biegesteifigkeit abgeleitet werden kann, ohne das Präparat zu schädigen [43]. Eine Anwendung des 4-Punkt-Biegeverfahrens, das aufgrund der gleichmäßigeren Kraftverteilung tendenziell zuverlässigere Messwerte liefert, ist bei der geringen Femurlänge der Maus von circa 17 mm nicht möglich [113]. Zusätzliche Informationen über die Belastbarkeit der heilenden Fraktur hätte eine Rotationstestung liefern können, jedoch geht diese mit der Zerstörung des Knochens einher, sodass ein deutlich höhere Anzahl an Versuchstieren nötig gewesen wäre [16].

Zur radiologischen Beurteilung der Frakturen kamen sowohl zwei- als auch dreidimensionale Techniken der Knochendarstellung zur Anwendung. Um den Fortschritt der Frakturheilung standardisiert quantifizieren zu können und vergleichbar zu machen, kam bei den anterior-posterior-Röntgenaufnahmen der Goldberg-Score zur Anwendung, welcher bereits in zahlreichen vorangegangenen Studien zur Frakturheilung genutzt wurde [32,96,38,46]. Als zusätzliche radiologische Technik zur Analyse des knöchernen Heilungsfortschritts ermöglicht die Computertomographie eine vollständige und objektive Auswertung des Frakturbereichs in 9 µm feinen Schichten. Dabei können strukturelle Parameter wie das Kallusvolumen und dessen prozentuale Aufteilung in Knochen und sonstigem Weichgewebe sowie verschiedene Trabekel-Eigenschaften untersucht werden [24]. Dafür kommt das Schwellenwertverfahren zum Einsatz, das eine Differenzierung der verschiedenen Gewebe ermöglicht.

Um die histomorphometrische Auswertung zu standardisieren wurden alle Schnitte nach der Methode von Gerstenfeld et al. in longitudinaler, sagittaler Richtung durch die Stelle des größten Kallusdurchmessers angefertigt und mittels Safranin-O-Färbung eingefärbt [31]. Auf diese Weise können Parameter wie Kallusdurchmesser und –fläche sowie die verhältnismäßigen Knochen-, Knorpel- und Bindegewebsanteile der Femora miteinander verglichen werden. Dies gelang in allen vorliegenden Proben problemlos und sicherte somit die histologische Auswertbarkeit der Proben als allgemein anerkannter Goldstandard [31].

7.2 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals nachgewiesen, dass die Applikation von Clopidogrel die Frakturheilung unter Ischämiebedingungen in einem Mausmodell beeinflusst. Dieser Effekt zeigte sich in Tieren der Clopidogrel-Gruppe im Vergleich zu Kontrolltieren histomorphometrisch durch einen verminderten Histoscore in der Frühphase der Frakturheilung, sowie einen verminderten Anteil an Knochengewebe bei konsekutiv erhöhtem Anteil an Bindegewebe fünf Wochen postoperativ. Die biomechanischen und radiologischen Ergebnisse wiesen hingegen keine signifikanten Unterschiede auf. Dieser negative Effekt durch Clopidogrel auf die Frakturheilung geht gemäß Western Blot Ergebnisse mit einer verminderten Expression von BMP-4 und vermehrten Expression von CD31 einher. Die Nullhypothese der vorliegenden Arbeit ist daher zu verwerfen.

Die Wirkung von Clopidogrel beruht auf der Bindung an den P2Y₁₂-Rezeptor, welcher nicht nur auf Thrombozyten zu finden ist, sondern auch auf Osteoblasten und Osteoklasten exprimiert wird [86]. Vor diesem Hintergrund ist eine Beeinflussung der Kallusbildung und dessen Remodeling durch Clopidogrel denkbar. Interessanterweise konnte der Einfluss von Clopidogrel auf den genau orchestrierten Ablauf der Frakturheilung unter ischämischen Bedingungen in der vorliegenden Arbeit im Sinne eines negativen Effektes bestätigt werden. Dies zeigt sich anhand der signifikant schlechteren Werte im Histoscore zwei Wochen postoperativ. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Erkenntnissen von Syberg et al., welche erstmalig von der Hemmung der Osteoblasten- und Osteoklastenfunktion durch Clopidogrel in einem in-vitro-Experiment berichteten [115]. Syberg et al. konnten zudem zeigen, dass Clopidogrel in den angelegten Zellkulturen eine vermehrte Differenzierung der mesenchymalen Vorläuferzellen von Osteoblasten zu Adipozyten bewirkt. Ähnlich zeigte sich in der

vorliegenden Arbeit nach fünf Wochen histomorphometrisch ein signifikant geringerer Anteil an Knochengewebe und ein erhöhter Anteil an Bindegewebe an der Gesamtkallusfläche im Sinne eines verzögerten Remodeling-Prozesses unter Clopidogrel-Einfluss. Dieser negative Einfluss von Clopidogrel auf die Frakturheilung unter ischämischen Bedingungen zeigt sich tendenziell auch in den biomechanischen und radiologischen Analysen, weist jedoch hierbei keine signifikanten Unterschiede auf. Daher führt Clopidogrel am ehesten zu einer Verzögerung der Frakturheilung im vorliegenden Modell aufgrund einer gestörten Differenzierung von Osteoblasten, verhindert die knöcherne Konsolidierung jedoch nicht vollständig.

Eine verminderte Anzahl oder gestörte Differenzierung von Osteoblasten könnte auch die signifikant geringere Expression von BMP-4 im Kallus der Clopidogrel-Gruppe erklären, da diese Zellen neben Chondrozyten maßgeblich für die Expression dieses Wachstumsfaktors im Knochen sind [1]. Die BMP-4-Signalübertragung hat einen wesentlichen Einfluss auf die Regulation osteoblastärer Funktionen. Zum einen spielt BMP-4 eine Rolle bei der Differenzierung und Mineralisierung sowie der Produktion von extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen und Osteocalcin und kann so das Überleben von Osteoblasten unter bestimmten Bedingungen verbessern [1,63,118]. Zum anderen stimuliert es die Freisetzung von OPG [116]. Clopidogrel könnte daher in der vorliegenden Arbeit den BMP-4-Signalweg durch eine Unterbrechung der osteoblastären positiven Rückkopplung sowie die konzentrationsbedingt verminderte Stimulation der OPG-Synthese negativ beeinflusst haben. Eine genauere Analyse der Wirkung von Clopidogrel auf den Signalweg von BMP-4 sollte in Folgestudien untersucht werden.

Neben der Wirkung von Clopidogrel auf die Expression von BMP-4 zeigte sich auch die Expression von CD31 verändert. Die Expression von CD31 war in der vorliegenden Studie im Kallusgewebe von Tieren mit Clopidogrel-Behandlung signifikant erhöht. CD31 wirkt bekanntlich sowohl stabilisierend auf bestehende Gefäße durch Vermittlung von endovaskulären Zell-Zell-Kontakten als auch angiogen, vor allem in ischämischem Gewebe [60,91]. Unter physiologischen Perfusionsbedingungen besitzt CD31 das Potenzial, über die vermehrte Bildung von Gefäßen in der Zone der Knochenregeneration, eine Beschleunigung der Knochenbildung zu erwirken [135]. Jedoch spiegelt sich die signifikante erhöhte Ausschüttung dieses angioproliferativen Triggers nicht wie bei Yang et al. (2020) in einer Verbesserung der Frakturheilung wider. Die erhöhte Expression des angiogenen CD31 und gleichzeitig verminderte Expression von osteogenem BMP-4 führt im Kallusgewebe von Tieren der Clopidogrel-Gruppe zu einem veränderten Verhältnis von Angiogenese zu Osteogenese zu Gunsten der

Angiogenese. Interessanterweise steht dies im Einklang mit Studien, die den Einfluss des Verhältnisses von Angiogenese zu Osteogenese auf die Frakturheilung analysiert haben [87,90,93]. Orth et al. konnten zeigen, dass ein starker angiogener Reiz durch lokale Applikation mikrovaskulärer Fragmente die physiologische Frakturheilung sogar verhindern kann und in Umkehr die Applikation von Mikropartikeln mit definiertem Verhältnis angiogener zu osteogener Wachstumsfaktoren zu Gunsten der Osteogenese nicht heilende Frakturen (Pseudarthrosen) zur knöchernen Ausheilung bringen kann [87,90]. Auf Basis eines veränderten Angiogenese / Osteogenese-Verhältnisses zu Gunsten der Angiogenese könnte Clopidogrel in der vorliegenden Studie daher die histomorphometrisch nachgewiesene Störung der Frakturheilung verursacht haben. Die unterschiedlichen Wirkungen von Clopidogrel auf die für eine Frakturheilung essenziellen Prozesse, Angiogenese und Osteogenese, spiegeln sich auch in der kontroversen Diskussion aktueller Literatur wider. So wiesen Lillis et al. bei ihrem in vivo-Versuch an Kaninchenschädeln positive Einflüsse von Clopidogrel auf die Überbauung und Regeneration der erzeugten knöchernen Defekte nach [66]. Im Gegensatz dazu steht die Studie von Syberg et al., die neben den oben genannten in vitro Ergebnissen auch in vivo an weiblichen ovariektomierten Mäusen negative Auswirkungen von Clopidogrel auf Knochendichte und Trabekeleigenschaften nachwies [115]. Wenngleich eine einheitliche Tendenz zu reduzierter Knochendichte und Trabekeleigenschaften in der vorliegenden Arbeit erkennbar war, konnte eine Verschlechterung der radiologischen Parameter in dieser Studie nicht bestätigt werden. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass im Vergleich zu Syberg et al. eine andere Dosierung der applizierten Medikamentenmenge gewählt wurde (1 mg/kg KG bei Syberg et al. vs. 3 mg/kg KG). Zudem könnten die unterschiedlichen Ergebnisse in der aktuellen Literatur durch den Zeitpunkt der Applikation von Clopidogrel, den Zeitpunkt der Ischämieinduktion oder den Zeitpunkt der Frakturierung des Knochens bedingt sein. Während das Modell von Lillis et al. eine normale Perfusion des Knochens sowie die Medikamentenverabreichung bereits ab einer Woche präoperativ vorsah, wurde bei dem gewählten Modell in der vorliegenden Studie die Ischämie sowie die Fraktur praktisch gleichzeitig induziert und die Gabe von Clopidogrel am Tag der Operation begonnen [66]. Hierdurch war die vorherige Ausbildung von Kollateralkreisläufen, die den Frakturbereich besser versorgen, nicht möglich und ein regelmäßiger pharmakologischer Wirkpegel von Clopidogrel setzte zu einem späteren Zeitpunkt im Prozess der Frakturheilung ein. Diese Faktoren könnten den Effekt von Clopidogrel auf die Frakturheilung unter den genannten Bedingungen entscheidend beeinflusst haben. Folgestudien mit unterschiedlichen Applikationszeitpunkten und dosisabhängigen

Untersuchungen von Clopidogrel auf die Frakturheilung sollten daher diese Ansätze genauer untersuchen.

Die Wirkung von Clopidogrel auf die Knochenstabilität beim Menschen wurde auch von einer dänischen Kohortenstudie an über 300.000 Schlaganfallpatienten klinisch untersucht [57]. Bei teilnehmenden Personen, die Clopidogrel in geringer Dosis einnahmen (zwischen 79 % und unter 10 % der nach WHO definierten Tagesdosis von 75 mg), wie sie bei unregelmäßiger Einnahme vorkommt, konnte das Frakturrisiko zwischen 10 % und 46 % unter das Niveau der Schlaganfallpatienten ohne Clopidogrel-Medikation gesenkt werden [57]. Bei regelmäßiger Einnahme des Medikamentes war das Frakturrisiko nur geringfügig niedriger, als das der Kontrollgruppe. Dieser offenbar dosisabhängige Effekt von Clopidogrel auf das Frakturrisiko bei Schlaganfallpatienten konnte seitens der Autoren nur deskriptiv ohne weitere Kausalitätserklärung beschrieben werden [57]. Obwohl diese Analyse an einem speziellen Patientenkollektiv durchgeführt wurde, um das Risiko einer Fraktur zu bewerten, ist sie nicht auf das vorliegende Tiermodell mit Extremitätenischämie in der aktuellen Studie übertragbar. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass in der vorliegenden Studie die gesunden Femora der Clopidogrel-Gruppe und der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied aufwiesen, was somit kein erhöhtes Frakturrisiko durch Clopidogrel vermuten lässt. In Zusammenschau präklinischer und klinischer Daten zur Wirkung von Clopidogrel auf das Frakturrisiko beziehungsweise die Knochenheilung mit teils kontroversen Ergebnissen in der aktuellen Literatur und unter Berücksichtigung der vorliegenden Arbeit wird die Notwendigkeit unterstrichen, die systemische oder lokale Beeinflussbarkeit von Angiogenese und Osteogenese durch Clopidogrel mit der damit verbundenen Prognose auf Knochenheilung beziehungsweise Frakturprävention in Folgestudien genauer zu untersuchen.

Zusammenfassend zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass Clopidogrel die Frakturheilung unter ischämischen Bedingungen am Mausmodell beeinträchtigt und den Remodeling-Prozess verzögert, ohne jedoch die Knochenheilung insgesamt zu verhindern. Dieser Effekt ist am ehesten auf ein zu Gunsten der Angiogenese verschobenes Verhältnis angiogener und osteogener Expressionsmarker im Kallusgewebe zurückzuführen.

8 Literaturverzeichnis

1. Abe E, Yamamoto M, Taguchi Y, Lecka-Czernik B, O'Brien CA, Economides AN, Stahl N, Jilka RL, Manolagas SC (2010) Essential Requirement of BMPs-2/4 for Both Osteoblast and Osteoclast Formation in Murine Bone Marrow Cultures from Adult Mice: Antagonism by Noggin. *J Bone Miner Res* 15:663–673
2. Aghaloo TL, Amantea CM, Cowan CM, Richardson JA, Wu BM, Parhami F, Tetradis S (2007) Oxysterols enhance osteoblast differentiation in vitro and bone healing in vivo. *J Orthop Res* 25:1488–1497
3. Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ (1991) Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 114:1059–1068
4. AO Research Institute, AO Foundation, Clavadelerstrasse 8, Davos, Switzerland, Pearce A, Richards R, Milz S, Schneider E, Pearce S (2007) Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *Eur Cell Mater* 13:1–10
5. Aref Z, de Vries MR, Quax PHA (2019) Variations in Surgical Procedures for Inducing Hind Limb Ischemia in Mice and the Impact of These Variations on Neovascularization Assessment. *Int J Mol Sci* 20:3704
6. Augustin HG, Young Koh G, Thurston G, Alitalo K (2009) Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin–Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:165–177
7. Aumüller G, Herausgeber (2014) *Anatomie. 3., aktualisierte Aufl edition*. Thieme, Stuttgart:75–81
8. Bak B, Jensen KS (1992) Standardization of tibial fractures in the rat. *Bone* 13:289–295
9. Bhatt DL, Fox KAA, Hacke W, Berger PB, Black HR, Boden WE, Cacoub P, Cohen EA, Creager MA, Easton JD, Flather MD, Haffner SM, Hamm CW, Hankey GJ, Johnston SC, Mak K-H, Mas J-L, Montalescot G, Pearson TA, Steg PG, Steinhubl SR, Weber MA, Brennan DM, Fabry-Ribaudo L, Booth J, Topol EJ (2006) Clopidogrel and Aspirin versus Aspirin Alone for the Prevention of Atherothrombotic Events. *N Engl J Med* 354:1706–1717
10. Bhatt DL, Flather MD, Hacke W, Berger PB, Black HR, Boden WE, Cacoub P, Cohen EA, Creager MA, Easton JD, Hamm CW, Hankey GJ, Johnston SC, Mak K-H, Mas J-L, Montalescot G, Pearson TA, Steg PG, Steinhubl SR, Weber MA, Fabry-Ribaudo L, Hu T, Topol EJ, Fox KAA (2007) Patients With Prior Myocardial Infarction, Stroke, or Symptomatic Peripheral Arterial Disease in the CHARISMA Trial. *J Am Coll Cardiol* 49:1982–1988
11. Bone and Joint Research Group, Centre for Human Development, Stem Cells and Regeneration, Human Development and Health, Institute of Developmental Sciences, University of Southampton, Southampton, SO16 6YD, UK, Hulsart-Billström G, Dawson J, Hofmann S, Müller R, Stoddart M, Alini M, Redl R, El Haj A, Brown R, Salih V, Hilborn J, Larsson S, Oreffo R (2016) A surprisingly poor

- correlation between in vitro and in vivo testing of biomaterials for bone regeneration: results of a multicentre analysis. *Eur Cell Mater* 31:312–322
12. Bonnarens F, Einhorn TA (1984) Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 2:97–101
 13. Bourque WT, Gross M, Hall BK (1992) A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Lab Anim Sci* 42:369–374
 14. Boyce BF, Xing L (2008) Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 473:139–146
 15. Burkhardt R, Kettner G, Böhm W, Schmidmeier M, Schlag R, Frisch B, Mallmann B, Eisenmenger W, Gilg Th (1987) Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia, primary osteoporosis, and old age: A comparative histomorphometric study. *Bone* 8:157–164
 16. Burstein AH, Frankel VH (1971) A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech* 4:155–158
 17. Chen D, Zhao M, Mundy GR (2004) Bone Morphogenetic Proteins. *Growth Factors* 22:233–241
 18. Chen ZM, Jiang LX, Chen YP, Pan HC (2005) Addition of clopidogrel to aspirin in 45 852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* 366:1607–1621
 19. Cheung KMC, Kaluarachi K, Andrew G, Lu W, Chan D, Cheah KSE (2003) An externally fixed femoral fracture model for mice. *J Orthop Res* 21:685–690
 20. Cho T-J, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (2002) Differential Temporal Expression of Members of the Transforming Growth Factor β Superfamily During Murine Fracture Healing. *J Bone Miner Res* 17:513–520
 21. 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
 22. 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* 13:286–295
 23. Ehnert S, Rinderknecht H, Aspera-Werz RH, Häussling V, Nussler AK (2020) Use of in vitro bone models to screen for altered bone metabolism, osteopathies, and fracture healing: challenges of complex models. *Arch Toxicol* 94:3937–3958
 24. Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W (1999) Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure. *Radiol* 39:203–212
 25. Garcia P, Holstein JH, Histing T, Burkhardt M, Culemann U, Pizanis A, Wirbel RJ, Pohlemann T, Menger MD (2008) A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: Impact of stability on fracture healing. *J Biomech* 41:1689–1696

26. Garcia P, Herwerth S, Matthys R, Holstein JH, Histing T, Menger MD, Pohlemann T (2011) The LockingMouseNail—A New Implant for Standardized Stable Osteosynthesis in Mice. *J Surg Res* 169:220–226
27. Gaston MS, Simpson AHRW (2007) Inhibition of fracture healing. *J Bone Joint Surg Br* 89-B:1553–1560
28. Gawaz M, Geisler T (2012) Update orale Plättchenhemmer: Positionspapier der deutschen Gesellschaft für Kardiologie. *Kardiologie* 6:195–209
29. Gent M, Beaumont D, Blanchard J, Bousser M-G (1996) A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *The Lancet* 348:1329–1339
30. Gerschutz GP, Bhatt DL (2002) The CURE trial: using clopidogrel in acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *Cleve Clin J Med* 69:377–378
31. Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA (2005) Application of Histomorphometric Methods to the Study of Bone Repair. *J Bone Miner Res* 20:1715–1722
32. Goldberg VM, Powell A, Shaffer JW, Zika J, Bos GD, Heiple KG (1985) Bone grafting: Role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res* 3:389–404
33. Graupera M, Potente M (2013) Regulation of angiogenesis by PI3K signaling networks. *Exp Cell Res* 319:1348–1355
34. Grgurevic L, Pecina M, Vukicevic S (2017) Marshall R. Urist and the discovery of bone morphogenetic proteins. *Int Orthop* 41:1065–1069
35. Hadjidakis DJ, Androulakis II (2006) Bone Remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 1092:385–396
36. Haffner-Luntzer M, Kovtun A, Rapp AE, Ignatius A (2016) Mouse Models in Bone Fracture Healing Research. *Curr Mol Biol Rep* 2:101–111
37. Haffner-Luntzer M, Müller-Graf F, Matthys R, Abaei A, Jonas R, Gebhard F, Rasche V, Ignatius A (2017) In Vivo Evaluation of Fracture Callus Development During Bone Healing in Mice Using an MRI-compatible Osteosynthesis Device for the Mouse Femur. *J Vis Exp* 56679
38. Haleem AA, Rouse MS, Lewallen DG, Hanssen AD, Steckelberg JM, Patel R (2004) Gentamicin and Vancomycin Do Not Impair Experimental Fracture Healing. *Clin Orthop Relat Res* 427:22–24
39. Hamm CW (2009) Kommentar zu den Leitlinien der European Society of Cardiology (ESC) zur Diagnose und Therapie des akuten Koronarsyndroms ohne ST-Strecken-Hebung (NSTEMI-ACS). *Kardiologie* 3:81–100
40. Hausman MR, Schaffler MB, Majeska RJ (2001) Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone* 29:560–564
41. Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P (1995) An experimental model for non-union in rats. *Injury* 26:681–686

42. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT (1993) A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res* 11:305–312
43. Histing T, Holstein JH, Garcia P, Matthys R, Kristen A, Claes L, Menger MD, Pohlemann T (2009) Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture. *J Orthop Res* 27:1152–1156
44. Histing T, Garcia P, Matthys R, Leidinger M, Holstein JH, Kristen A, Pohlemann T, Menger MD (2010) An internal locking plate to study intramembranous bone healing in a mouse femur fracture model. *J Orthop Res* 28:397–402
45. Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke MW, Wehner T, Bindl R, Recknagel S, Stuermer EK, Vollmar B, Wildemann B, Lienau J, Willie B, Peters A, Ignatius A, Pohlemann T, Claes L, Menger MD (2011) Small animal bone healing models: Standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 49:591–599
46. Histing T, Marciniak K, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger MD (2011) Sildenafil accelerates fracture healing in mice. *J Orthop Res* 29:867–873
47. Histing T, Stenger D, Scheuer C, Metzger W, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2012) Pantoprazole, a Proton Pump Inhibitor, Delays Fracture Healing in Mice. *Calcif Tissue Int* 90:507–514
48. 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
49. Hollopeter G, Jantzen H-M, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang R-B, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB (2001) Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409:202–207
50. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ (2007) Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal* 19:2003–2012
51. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T (2007) Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech* 40:215–219
52. Holstein JH, Matthys R, Histing T, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Meier C, Pohlemann T, Menger MD (2009) Development of a Stable Closed Femoral Fracture Model in Mice. *J Surg Res* 153:71–75
53. Holstein JH, Becker SC, Fiedler M, Scheuer C, Garcia P, Histing T, Klein M, Menger MD, Pohlemann T (2012) Increased exercise after stable closed fracture fixation does not affect fracture healing in mice. *J Biomech* 45:1299–1304
54. Ingwersen L-C, Frank M, Naujokat H, Loger K, Bader R, Jonitz-Heincke A (2022) BMP-2 Long-Term Stimulation of Human Pre-Osteoblasts Induces Osteogenic Differentiation and Promotes Transdifferentiation and Bone Remodeling Processes. *Int J Mol Sci* 23:3077
55. 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* 27:664–672

56. Ito T, Tokunaga K, Maruyama H, Kawashima H, Kitahara H, Horikoshi T, Ogose A, Hotta Y, Kuwano R, Katagiri H, Endo N (2003) Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR)-positive immature osteoblasts as targets of adenovirus-mediated gene transfer for fracture healing. *Gene Ther* 10:1623–1628
57. Jørgensen NR, Schwarz P, Iversen HK, Vestergaard P (2017) P2Y12 Receptor Antagonist, Clopidogrel, Does Not Contribute to Risk of Osteoporotic Fractures in Stroke Patients. *Front Pharmacol* 8
58. Jun J-I, Lau LF (2011) Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 10:945–963
59. Kaderly RE (1991) Primary bone healing. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 6:21–25
60. Kim S-W, Kim H, Cho H-J, Lee J-U, Levit R, Yoon Y (2010) Human Peripheral Blood-Derived CD31+Cells Have Robust Angiogenic and Vasculogenic Properties and Are Effective for Treating Ischemic Vascular Disease. *J Am Coll Cardiol* 56:593–607
61. Klein M, Stieger A, Stenger D, Scheuer C, Holstein JH, Pohlemann T, Menger MD, Histing T (2015) Comparison of healing process in open osteotomy model and open fracture model: Delayed healing of osteotomies after intramedullary screw fixation: MURINE OSTEOTOMY AND FRACTURE HEALING. *J Orthop Res* 33:971–978
62. Kochi T, Imai Y, Takeda A, Watanabe Y, Mori S, Tachi M, Kodama T (2013) Characterization of the Arterial Anatomy of the Murine Hindlimb: Functional Role in the Design and Understanding of Ischemia Models. *PLoS ONE* 8:e84047
63. Kozawa O, Hatakeyama D, Tokuda H, Oiso Y, Matsuno H, Uematsu T (2002) Sphingomyelinase amplifies BMP-4-induced osteocalcin synthesis in osteoblasts: role of ceramide. *Cell Signal* 14:999–1004
64. Lampugnani MG (2012) Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Adhesion and Signaling in Physiology and Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006528–a006528
65. Lau LF (2011) CCN1/CYR61: the very model of a modern matricellular protein. *Cell Mol Life Sci* 68:3149–3163
66. Lillis T, Veis A, Sakellaris N, Tsirlis A, Dailiana Z (2019) Effect of clopidogrel in bone healing-experimental study in rabbits. *World J Orthop* 10:434–445
67. Lu C, Miclau T, Hu D, Marcucio RS (2007) Ischemia leads to delayed union during fracture healing: A mouse model. *J Orthop Res* 25:51–61
68. Manigrasso MB, O'Connor JP (2004) Characterization of a Closed Femur Fracture Model in Mice. *J Orthop Trauma* 18:687–695
69. Mao Q, Wang W, Xu T, Zhang S, Xiao L, Chen D, Jin H, Tong P (2015) Combination Treatment of Biomechanical Support and Targeted Intra-arterial Infusion of Peripheral Blood Stem Cells Mobilized by Granulocyte-Colony Stimulating Factor for the Osteonecrosis of the Femoral Head: A Randomized Controlled Clinical Trial: INFUSION OF PBSC MOBILIZED BY G-CSF FOR FEMORAL HEAD OSTEONECROSIS. *J Bone Miner Res* 30:647–656

70. Marckmann G, Agrawal M, Herausgeber (2007) Ethische Aspekte der onkologischen Forschung: mit ... und der Dokumentation der 23. Jahresversammlung des Arbeitskreises Medizinischer Ethik-Kommissionen in der Bundesrepublik Deutschland am 11. und 12. November 2005 im Haus der Bundesärztekammer in Berlin. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln:91–109
71. Marie PJ, Debais F, Hay E (2002) Regulation of human cranial osteoblast phenotype by FGF-2, FGFR-2 and BMP-2 signaling. *Histol Histopathol*:877–885
72. Marsell R, Einhorn TA (2011) The biology of fracture healing. *Injury* 42:551–555
73. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, Malmberg K, Rupprecht H-J, Zhao F, Chrolavicius S, Copland I, Fox KA (2001) Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *The Lancet* 358:527–533
74. MENGER MM, STUTZ J, EHNERT S, NUSSLER AK, ROLLMANN MF, HERATH SC, BRAUN BJ, POHLEMANN T, MENGER MD, HISTING T (2022) Development of an ischemic fracture healing model in mice. *Acta Orthop* 93:466–471
75. Mills LA, Simpson AHRW (2012) *In vivo* models of bone repair. *J Bone Joint Surg Br* 94-B:865–874
76. Müller-Mai C, Herausgeber (2015) Frakturen auf einen Blick: Klassifikation und Behandlungsoptionen; mit Farbleitsystem. Springer, Berlin Heidelberg:18–21
77. Murata K, Kitaori T, Oishi S, Watanabe N, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Kasahara T, Shibuya H, Fujii N, Nagasawa T, Nakamura T, Ito H (2012) Stromal Cell-Derived Factor 1 Regulates the Actin Organization of Chondrocytes and Chondrocyte Hypertrophy. *PLoS ONE* 7:e37163
78. Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y, Oikawa S, Ono K, Takaoka K (2009) Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* 9:651–659
79. Naryzhny SN, Lee H (2010) Proliferating cell nuclear antigen in the cytoplasm interacts with components of glycolysis and cancer. *FEBS Lett* 584:4292–4298
80. Niethard FU, Pfeil J, Biberthaler P, Hoffmann M, Gusta M, Gusta P, Solodkoff C von, Solodkoff M von (2017) Orthopädie und Unfallchirurgie: 1135 Abbildungen. 8., unveränderte Auflage edition. Thieme, Stuttgart:302–326
81. Nunamaker D, Perren S (1979) A radiological and histological analysis of fracture healing using prebending of compression plates. *Clin Orthop Relat Res*:167–174
82. Nunamaker DM, Perren SM (1977) Cortical bone healing: Effects of implant size and mechanical application on bone healing with full weight bearing. *Trans Orthop Res Soc* 2:252
83. Nunamaker DM (1998) Experimental Models of Fracture Repair: *Clin Orthop* 355S:56–65

84. O'Neil MJ, Herausgeber (2006) *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. 14th ed edition. Merck, Whitehouse Station, N.J.:403
85. Ono T, Hayashi M, Sasaki F, Nakashima T (2020) RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond. *Inflamm Regen* 40:2
86. Orriss IR, Burnstock G, Arnett TR (2010) Purinergic signalling and bone remodelling☆. *Curr Opin Pharmacol* 10:322–330
87. 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* 77:201–211
88. Orth M, Shenar AK, Scheuer C, Braun BJ, Herath SC, Holstein JH, Histing T, Yu X, Murphy WL, Pohlemann T, Laschke MW, Menger MD (2019) VEGF-loaded mineral-coated microparticles improve bone repair and are associated with increased expression of epo and RUNX-2 in murine non-unions. *J Orthop Res* 37:821–831
89. Orth M, Baudach J, Scheuer C, Osche D, Veith NT, Braun BJ, Rollmann MF, Herath SC, Pohlemann T, Menger MD, Histing T (2019) Erythropoietin does not improve fracture healing in aged mice. *Exp Gerontol* 122:1–9
90. Orth M, Fritz T, Stutz J, Scheuer C, Ganse B, Bullinger Y, Lee JS, Murphy WL, Laschke MW, Menger MD, Pohlemann T (2022) Local Application of Mineral-Coated Microparticles Loaded With VEGF and BMP-2 Induces the Healing of Murine Atrophic Non-Unions. *Front Bioeng Biotechnol* 9:809397
91. Park S, Sorenson CM, Sheibani N (2015) PECAM-1 isoforms, eNOS and endoglin axis in regulation of angiogenesis. *Clin Sci* 129:217–234
92. Patti G, Micieli G, Cimminiello C, Bolognese L (2020) The Role of Clopidogrel in 2020: A Reappraisal. *Cardiovasc Ther* 2020:1–12
93. Peng H, Usas A, Olshanski A, Ho AM, Gearhart B, Cooper GM, Huard J (2005) VEGF Improves, Whereas sFlt1 Inhibits, BMP2-Induced Bone Formation and Bone Healing Through Modulation of Angiogenesis. *J Bone Miner Res* 20:2017–2027
94. Pereira NL, Rihal CS, So DYF, Rosenberg Y, Lennon RJ, Mathew V, Goodman SG, Weinshilboum RM, Wang L, Baudhuin LM, Lerman A, Hasan A, Iturriaga E, Fu Y-P, Geller N, Bailey K, Farkouh ME (2019) Clopidogrel Pharmacogenetics: State-of-the-Art Review and the TAILOR-PCI Study. *Circ Cardiovasc Interv* 12:e007811
95. Perren SM, Huggler A, Russenberger M, Allgöwer M, Mathys R, Schenk R, Willenegger H, Müller ME (1969) The reaction of cortical bone to compression. *Acta Orthop Scand Suppl* 125:19–29
96. Perry AC, Prpa B, Rouse MS, Piper KE, Hanssen AD, Steckelberg JM, Patel R (2003) Levofloxacin and Trovafloxacin Inhibition of Experimental Fracture-Healing. *Clin Orthop Relat Res* 1976-2007 414:95–100
97. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P (2011) Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell* 146:873–887

98. Qi B, Yu J, Zhao Y, Zhu D, Yu T (2016) Mouse fracture models: a primer. *Int J Clin Exp Med* 9:12418–12429
99. Regenerative Medicine Institute, National Centre for Biomedical Engineering Science, National University of Ireland, Galway, Czekanska E, Stoddart M, Richards R, Hayes J (2012) In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *Eur Cell Mater* 24:1–17
100. Reumann MK, Nair T, Strachna O, Boskey AL, Mayer-Kuckuk P (2010) Production of VEGF receptor 1 and 2 mRNA and protein during endochondral bone repair is differential and healing phase specific. *J Appl Physiol* 109:1930–1938
101. Ritto FG, Pimentel T, Canellas JVS, Junger B, Cruz M, Medeiros PJ (2019) Randomized double-blind clinical trial evaluation of bone healing after third molar surgery with the use of leukocyte- and platelet-rich fibrin. *Int J Oral Maxillofac Surg* 48:1088–1093
102. Rogers MB, Shah TA, Shaikh NN (2015) Turning Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) on and off in Mesenchymal Cells. *J Cell Biochem* 116:2127–2138
103. Röntgen V, Blakytyn R, Matthys R, Landauer M, Wehner T, Göckelmann M, Jermendy P, Amling M, Schinke T, Claes L, Ignatius A (2010) Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator. *J Orthop Res* 28:1456–1462
104. Rosental B, Brusilovsky M, Hadad U, Oz D, Appel MY, Afergan F, Yossef R, Rosenberg LA, Aharoni A, Cerwenka A, Campbell KS, Braiman A, Porgador A (2011) Proliferating Cell Nuclear Antigen Is a Novel Inhibitory Ligand for the Natural Cytotoxicity Receptor NKp44. *J Immunol* 187:5693–5702
105. Rossant J, Nagy A (1995) Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat Med* 1:592–594
106. Sabatine MS, Cannon CP, Gibson CM, López-Sendón JL, Montalescot G, Theroux P, Claeys MJ, Cools F, Hill KA, Skene AM, McCabe CH, Braunwald E (2005) Addition of Clopidogrel to Aspirin and Fibrinolytic Therapy for Myocardial Infarction with ST-Segment Elevation. *N Engl J Med* 352:1179–1189
107. Schenk R, Willenegger H (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
108. Schiebler TH, Korf H-W (2007) *Anatomie*. Steinkopff, Heidelberg:167–374
109. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG (2008) Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol* 19:459–466
110. Schreiber S, Stutz J, Keller L, Metzger W, Fritz T, Schönbeck C, Osche D, Örgel M, Menger MD, Pohlemann T, Liodakis E, Laschke MW, Orth M (2025) Clopidogrel Influences Fracture Healing Under Ischemic Conditions.
111. Shapiro F (1988) Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. *J Bone Joint Surg Am* 70:1067–1081

112. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359:843–845
113. Steiner M, Volkheimer D, Meyers N, Wehner T, Wilke H-J, Claes L, Ignatius A (2015) Comparison between Different Methods for Biomechanical Assessment of Ex Vivo Fracture Callus Stiffness in Small Animal Bone Healing Studies. *PLOS ONE* 10:e0119603
114. Stutz J (2020) Einfluss von Cilostazol auf die Frakturheilung im murinen Ischämiemodell.
115. Syberg S, Brandao-Burch A, Patel JJ, Hajjawi M, Arnett TR, Schwarz P, Jorgensen NR, Orriss IR (2012) Clopidogrel (Plavix), a P2Y₁₂ receptor antagonist, inhibits bone cell function in vitro and decreases trabecular bone in vivo. *J Bone Miner Res* 27:2373–2386
116. Tachi J, Onuma T, Yamaguchi S, Kim W, Hioki T, Matsushima-Nishiwaki R, Tanabe K, Tokuda H, Kozawa O, Iida H (2021) Duloxetine suppresses BMP-4-induced release of osteoprotegerin via inhibition of the SMAD signaling pathway in osteoblasts. *Biochem Cell Biol* 99:578–586
117. Taddei A, Giampietro C, Conti A, Orsenigo F, Breviario F, Pirazzoli V, Potente M, Daly C, Dimmeler S, Dejana E (2008) Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat Cell Biol* 10:923–934
118. Tang C-H, Yang R-S, Liou H-C, Fu W-M (2003) Enhancement of fibronectin synthesis and fibrillogenesis by BMP-4 in cultured rat osteoblast. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 18:502–511
119. Tang D, Liu X, Chen K, Li Z, Dai Y, Xu J, Zhang H-T, Gao X, Liu L (2020) Cytoplasmic PCNA is located in the actin belt and involved in osteoclast differentiation. *Aging* 12:13297–13317
120. Tang G, Charo DN, Wang R, Charo IF, Messina L (2004) CCR2^{-/-} knockout mice revascularize normally in response to severe hindlimb ischemia. *J Vasc Surg* 40:786–795
121. Thaller S, Hoyt J, Tesluk H, Stevenson T (1993) Midfacial fracture repair in the adult rat. *Ann Plast Surg* 31:66–71
122. The Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium (2005) Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature* 437:69–87
123. Trenk D, Nührenberg T, Stratz C, Valina CM, Hochholzer W (2014) Klinische Pharmakologie der aktuellen antithrombozytären Substanzen. *Herz* 39:790–797
124. Trostle SS, Market MD (1996) Fracture Biology, Biomechanics, and Internal Fixation. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12:19–46
125. Ulfing † N (2019) Kurzlehrbuch Histologie. 5. edition. Georg Thieme Verlag, Stuttgart:56–60

126. Utvåg SE, Grundnes O, Reikerås O (1994) Healing of segmental and simple fractures in rats. *Acta Orthop Scand* 65:559–563
127. Wang S-C (2014) PCNA: a silent housekeeper or a potential therapeutic target? *Trends Pharmacol Sci* 35:178–186
128. Wille H, Burmester G, Gerhardus A Kombination von Acetylsalicylsäure (ASS) und Clopidogrel senkt Herzinfarkt-Risiko bei akutem Koronarsyndrom. URL: https://www.iqwig.de/presse/pressemitteilungen/pressemitteilungen-detailseite_10975.html
129. Wissing H, Stürmer KM, Breidenstein G (1990) Die Wertigkeit verschiedener versuchstierspecies für experimentelle untersuchungen am knochen. *Hefte Unfallheilkd* 212:479–488
130. Witko-Sarsat V, Mocek J, Bouayad D, Tamassia N, Ribeil J-A, Candalh C, Davezac N, Reuter N, Mouthon L, Hermine O, Pederzoli-Ribeil M, Cassatella MA (2010) Proliferating cell nuclear antigen acts as a cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival. *J Exp Med* 207:2631–2645
131. Wiviott SD, Antman EM, Gibson CM, Montalescot G, Riesmeyer J, Weerakkody G, Winters KJ, Warmke JW, McCabe CH, Braunwald E (2006) Evaluation of prasugrel compared with clopidogrel in patients with acute coronary syndromes: design and rationale for the TRial to assess Improvement in Therapeutic Outcomes by optimizing platelet InhibitioN with prasugrel Thrombolysis In Myocardial Infarction 38 (TRITON-TIMI 38). *Am Heart J* 152:627–635
132. Wong PC, Crain EJ, Watson CA, Jiang X, Hua J, Bostwick JS, Ogletree ML, Schumacher WA, Rehfuss R (2007) Platelet Aggregometry and Receptor Binding to Predict the Magnitude of Antithrombotic and Bleeding Time Effects of Clopidogrel in Rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 49:316–324
133. Wörtler K (2007) Periostreaktionen: Ätiologie, radiologische Klassifikation und Differenzialdiagnose. *Radiol Up2date* 7:303–318
134. Wysokinski D, Pawlowska E, Blasiak J (2015) RUNX2: A Master Bone Growth Regulator That May Be Involved in the DNA Damage Response. *DNA Cell Biol* 34:305–315
135. Yang M, Li C, Xiao Y, Guo Q, Huang Y, Su T, Luo X, Jiang T (2020) Ophiopogonin D promotes bone regeneration by stimulating CD31^{hi} EMCN^{hi} vessel formation. *Cell Prolif* 53:e12784
136. Ylä-HS, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J (2007) Vascular Endothelial Growth Factors. *J Am Coll Cardiol* 49:1015–1026
137. Yu J, Dardik A (2018) A Murine Model of Hind Limb Ischemia to Study Angiogenesis and Arteriogenesis. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1717:135–143
138. Yuehwei A n, Friedman RJ, Parent T, Draughn RA (1994) Production of a Standard Closed Fracture in the Rat Tibia: *J Orthop Trauma* 8:111–115
139. Yusuf S, Fox KAA, Tognoni G, Mehta SR (2001) Effects of Clopidogrel in Addition to Aspirin in Patients with Acute Coronary Syndromes without ST-Segment Elevation. *N Engl J Med* 345:494–502

140. Zilles K, Tillmann BN (2010) Anatomie. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg:33–156
141. (1998) Clopidogrel erhält Zulassung für Europa. URL: <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/daz-az/1998/daz-30-1998/uid-3762>
142. MouseScrew. URL: <https://risystem.com/platefixation/mousescrew>
143. Plavix (Clopidogrel) - Description and Clinical Pharmacology. URL: http://www.druglib.com/druginfo/plavix/description_pharmacology/
144. Clopidogrel Heumann 75 Mg Filmtabletten - Fachinformation. URL: <https://imedikament.de/clopidogrel-heumann-75-mg-filmtabletten/fachinformation>
145. Körpermaße der Bevölkerung. URL: https://www.gbe-bund.de/gbe/pkg_olap_tables.prc_set_hierlevel?p_uid=gast&p_aid=57592373&p_sprache=D&p_help=2&p_indnr=223&p_ansnr=12800727&p_version=2&p_dim=D.002&p_dw=3246&p_direction=rollup

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel Clopidogrel.....	24
Abbildung 2: Strukturformel aktiver Metabolit Clopidogrel.....	24
Abbildung 3: Fixierung nach der Enthaarung.....	33
Abbildung 4: 6 mm Hautschnitt.....	33
Abbildung 5: Darstellung der A. femoralis (A) und A. profunda femoris (B).....	33
Abbildung 6: Anschlingen der A. profunda femoris.....	34
Abbildung 7: Anschlingen und doppelte Ligatur der A. profunda femoris.....	34
Abbildung 8: Darstellung der Gelenkkapsel.....	35
Abbildung 9: Luxation der Patella nach lateral.....	35
Abbildung 10: Darstellung der Fossa intercondylaris.....	35
Abbildung 11: Eröffnung des Markraums mittels 27 G Kanüle.....	35
Abbildung 12: Einlage des kanülierten Wolframdrahtes.....	36
Abbildung 13: Röntgenlagekontrolle des Drahtes.....	36
Abbildung 14: Frakturierung mittels stumpfer Guillotine.....	36
Abbildung 15: Röntgenkontrolle der Fraktur.....	36
Abbildung 16: Röntgenkontrolle der MouseScrew™.....	37
Abbildung 17: Herstellerbilder der MouseScrew™ (Genehmigung durch den Urheber liegt vor).....	37
Abbildung 18: Orale Applikation von Clopidogrel oder Vehikel per Schlundsonde.....	38
Abbildung 19: Röntgenbild für Goldberg-Score, links: frakturierter Knochen, rechts: gesunder Knochen.....	40
Abbildung 20: Safranin-O-Färbung in longitudinaler, sagittaler Schnittführung; A: Knochen, B: Bindegewebe, C: Knorpel.....	42
Abbildung 21: Absolute Biegesteifigkeit zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW ± SEM.....	46
Abbildung 22: Relative Biegesteifigkeit zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW ± SEM.....	47
Abbildung 23: Absolute Biegesteifigkeit gesunde Femora zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW ± SEM.....	47
Abbildung 24: Radiologische Auswertung des Goldberg-Scores zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW ± SEM. * p < 0,05 vs. Kontrolle.....	48
Abbildung 25: Absolutes Knochenvolumen im Kallus zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW ± SEM. * p < 0,05 vs. Kontrolle.....	49
Abbildung 26: Relativer Knochenanteil am Kallusvolumen zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW ± SEM.....	49
Abbildung 27: Trabekelanzahl zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW ± SEM.....	49
Abbildung 28: Trabekelabstand zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW ± SEM.....	50

Abbildung 29: Trabekeldicke zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW ± SEM.	50
Abbildung 30: Gesamtkallusfläche zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW ± SEM.	51
Abbildung 31: Knochenanteil am Gesamtkallus zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW ± SEM. * p < 0,05 vs. Kontrolle.	52
Abbildung 32: Knorpelanteil am Gesamtkallus zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW ± SEM.	52
Abbildung 33: Bindegewebsanteil am Gesamtkallus zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW ± SEM. * p < 0,05 vs. Kontrolle.	52
Abbildung 34: Histoscore zwei (A) und fünf (B) Wochen postoperativ. MW ± SEM. * p < 0,05 vs. Kontrolle.	53
Abbildung 35: Expression von RANKL zwei Wochen postoperativ (A) mit Blots der jeweiligen Gruppen (B). MW ± SEM.	53
Abbildung 36: Expression von OPG zwei Wochen postoperativ (A) mit Blots der jeweiligen Gruppen (B). MW ± SEM.	54
Abbildung 37: Expression von RUNX2 zwei Wochen postoperativ (A) mit Blots der jeweiligen Gruppen (B). MW ± SEM.	54
Abbildung 38: Expression von BMP-2 zwei Wochen postoperativ (A) mit Blots der jeweiligen Gruppen (B). MW ± SEM.	55
Abbildung 39: Expression von BMP-4 zwei Wochen postoperativ (A) mit Blots der jeweiligen Gruppen (B). MW ± SEM. * p < 0,05 vs. Kontrolle.	55
Abbildung 40: Expression von Cyr61 zwei Wochen postoperativ (A) mit Blots der jeweiligen Gruppen (B). MW ± SEM.	56
Abbildung 41: Expression von PCNA zwei Wochen postoperativ (A) mit Blots der jeweiligen Gruppen (B). MW ± SEM.	56
Abbildung 42: Expression von CD31 zwei Wochen postoperativ (A) mit Blots der jeweiligen Gruppen (B). MW ± SEM. * p < 0,05 vs. Kontrolle.	57
Abbildung 43: Expression von PI3K zwei Wochen postoperativ (A) mit Blots der jeweiligen Gruppen (B). MW ± SEM.	57
Abbildung 44: Expression von VEGF zwei Wochen postoperativ (A) mit Blots der jeweiligen Gruppen (B). MW ± SEM.	58

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nebenwirkungen Clopidogrel.....	29
Tabelle 2: Versuchsprotokoll.....	31
Tabelle 3: Schlüssel Goldberg-Score.....	40

11 Danksagung

In diesem Abschnitt möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei meiner Dissertation unterstützt und zu ihrem Gelingen beigetragen haben:

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Marcel Orth, dafür, dass er mir dieses Thema überlassen hat und durch vielseitige Unterstützung zum Gelingen der Studie sowie der Dissertation beigetragen hat.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Betreuerin, Frau Dr. med. Janine Stutz bedanken, welche mich durch die komplette Zeit der Promotion begleitet hat, mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und so maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Tim Pohlemann sowie seinem Nachfolger Herrn Prof. Dr. med. Emmanouil Liodakis für ihre großzügige finanzielle Unterstützung der Studie und das Ermöglichen der Teilnahme am Deutschen Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU) 2022 als auch an dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie (DCK) 2023.

Außerdem ein herzliches Dankeschön an meinen Wegbegleiter und „Doktorbruder“ Christian Schönbeck, für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit sowie die partnerschaftliche Unterstützung, die besonders die experimentelle Phase der Promotion wie im Flug hat vergehen lassen.

Prof. Dr. Michael Menger hat durch die Zurverfügungstellung aller technischen und räumlichen Ressourcen des Institutes der experimentellen Chirurgie eine entscheidende Grundlage für diese Dissertation gelegt, wofür ich ihm meinen Dank aussprechen möchte.

Vielen Dank an das gesamte Team der Tierpflege und an alle involvierten Mitarbeiter/-innen des Institutes, insbesondere an Frau Janine Becker, für die gute und reibungslose Zusammenarbeit.

Bei Frau Dr. med. vet. Monika Frings und Frau Dr. med. vet. Christina Körbel möchte ich mich für ihren Beitrag zum Tierschutzantrag und die Hilfe bei der Optimierung des Handlings der Mäuse bedanken.

Ein großes Dankeschön an dieser Stelle an Frau Dr. rer. nat. Claudia Scheuer für ihre hervorragende Unterstützung bei der Erstellung der histologischen und biochemischen Untersuchungen.

Liebe Eltern, ich danke euch von ganzem Herzen für Eure unermüdliche Unterstützung; Ihr wart immer für mich da, habt mich ermutigt, mich bestärkt und mir den Traum vom Studium der Humanmedizin inklusive dieser Promotionsarbeit ermöglicht.

Ebenso danke ich meiner Frau Chiara Keller, dass sie mich auf diesem Weg beständig begleitet, motiviert und inspiert hat. Sie stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Mein letzter Dank gilt den Versuchsmäusen, welche mit ihrem Leben mir meine Promotion ermöglicht und einen Beitrag zur medizinischen Forschung geleistet haben.

12 Publikationen

12.1 Vorträge

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, 25. bis 28. Oktober 2022, Berlin, Deutschland:

Keller L, Stutz J, Fritz T, Bullinger Y, Pohlemann T, Laschke MW, Menger M, Orth M:
Einfluss von Clopidogrel auf die Frakturheilung im murinen Ischämiemodell

Deutscher Chirurgie Kongress 26. bis 28. April 2023, München, Deutschland:

Keller L, Stutz J, Fritz T, Bullinger Y, Pohlemann T, Laschke MW, Menger M, Orth M:
Einfluss von Clopidogrel auf die Frakturheilung im murinen Ischämiemodell

12.2 Publikation

Biomedicines 2025, 13(9), 2286 (doi:10.22028/D291-46351): Clopidogrel Influences Fracture Healing Under Ischemic Conditions

von Sebastian Schreiber 1, Janine Stutz 1, Lukas Keller 1, Wolfgang Metzger 1, Tobias Fritz 1, Christian Schönbeck 1, David Osche 1, Marcus Örgel 1, Michael D. Menger 2, Tim Pohlemann 1, Emmanouil Liodakis 1, Matthias W. Laschke 2 and Marcel Orth 1

1 Department of Trauma, Hand and Reconstructive Surgery, Saarland University, D-66421 Homburg, Germany

2 Institute for Clinical and Experimental Surgery, Saarland University, PharmaScienceHub (PSH), D-66421 Homburg, Germany

13 Lebenslauf

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

Tag der Promotion: 27.03.2026
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig
Berichterstatter: Prof. Dr. med Marcel Orth
Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Kolja Freier