

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

Erythropoietin verbessert die Knochenheilung in atropen Pseudarthrosen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2011

vorgelegt von: Marcel Orth
geb. am: 17.06.1986 in Athen / Griechenland

Für meine Eltern.

Dekan: _____

1.Gutachter: _____

2.Gutachter: _____

Jahr der Promotion: _____

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung / Abstract	1
2.	Einleitung	4
2.1	Biologische Grundlagen des Knochens	4
2.1.1	Morphologie	4
2.1.2	Histologie	5
2.1.3	Physiologie	8
2.2	Arten der Frakturheilung	9
2.2.1	Primäre Frakturheilung	9
2.2.2	Sekundäre Frakturheilung	9
2.2.3	Verzögerte und defekte Frakturheilung (Pseudarthrosen)	12
2.3	Frakturmodelle	15
2.3.1	Maus	16
2.3.2	Ratte	18
2.3.3	Kaninchen	18
2.3.4	Katze	19
2.3.5	Hund	19
2.3.6	Schaf	19
2.3.7	Ziege	20
2.3.8	Pferd	20
2.3.9	Primat	21
2.4	Erythropoietin	21
2.4.1	Historie	22
2.4.2	Biosynthese und Struktur	23
2.4.3	Funktion und Wirkmechanismus	24
2.5	Zielsetzung	26
2.6	Fragestellung	26
3.	Material und Methoden	28
3.1	Intervention	28
3.1.1	Versuchsprotokoll	28
3.1.2	Tiermodell	28
3.1.3	Operation	29
3.1.4	Medikamentenapplikation	36
3.1.5	Tötung der Tiere	36
3.1.6	Blutentnahme	36
3.1.7	Präparation des Knochens	36

3.2	Zielkriterien und Auswertung	36
3.2.1	Blutwerte	36
3.2.2	Radiologie	37
3.2.2.1	Röntgen	37
3.2.2.2	Mikrocomputertomographie	37
3.2.3	Histomorphometrie	39
3.2.4	Immunhistologie	41
3.2.5	Western Blot	42
3.3	Statistik	47
4.	Ergebnisse	48
4.1	Postoperativer Verlauf	48
4.2	Makroskopischer Befund	48
4.3	Blutwerte	49
4.4	Radiologie	50
4.3.1	Röntgen	50
4.3.2	Mikrocomputertomographie	50
4.5	Histomorphometrie	56
4.6	Immunhistologie	61
4.7	Western Blot	64
5.	Diskussion	67
5.1	Diskussion der Methoden	67
5.2	Diskussion der Ergebnisse	73
5.3	Schlussfolgerungen	77
6.	Literaturverzeichnis	79
7.	Abkürzungs- / Abbildungs- / Tabellenverzeichnis	90
7.1	Abkürzungsverzeichnis	90
7.2	Abbildungsverzeichnis	93
7.3	Tabellenverzeichnis	95
8.	Publikation	96
9.	Danksagungen	97

1. Zusammenfassung / Abstract

Fragestellung. Pseudarthrosen sind gekennzeichnet durch eine insuffiziente Knochenheilung. Während die Ursache hypertropher Pseudarthrosen in einer zu geringen Stabilität der Fraktur liegt, sind für die atrophe Pseudarthrose vor allem biologische Faktoren (eingeschränkte Vaskularisation, verminderte Zellproliferation, veränderte Expression von Wachstumsfaktoren, periostärer Weichteilschaden, etc.) verantwortlich. Hieraus ergibt sich, dass hypertrophe Pseudarthrosen suffizient durch eine Erhöhung der Frakturstabilität behandelt werden können, während Therapieansätze zur Behandlung atropher Pseudarthrosen auf eine Verbesserung biologischer Aspekte der Knochenheilung abzielen. Erythropoietin (EPO) konnten in der Vergangenheit eine Vielzahl non-hämatopoietischer Funktionen zugesprochen werden. So wurde u.a. ein positiver Effekt von EPO auf die Frakturheilung nachgewiesen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob EPO die gestörte Frakturheilung (atrophe Pseudarthrose) stimuliert. Somit sollte die Frage beantwortet werden inwieweit ein Unterschied zwischen einer Pseudarthrose, die durch EPO behandelt wurde, gegenüber einer Pseudarthrose ohne entsprechende Behandlung besteht. Wir erhofften uns, das Potenzial von EPO in der Behandlung von Pseudarthrosen durch diese Studie abschätzen zu können.

Methoden. Zur Untersuchung der atrophen Pseudarthrose erzeugten wir in standardisierter Weise einen segmentalen Knochendefekt von 1,8 mm Länge an Femora von CD-1-Mäusen nach dem sog. Pin-Clip-Modell. Den Tieren wurde daraufhin über einen Zeitraum von zwei bzw. zehn Wochen täglich EPO (500 IE/kg Körpergewicht; n = 40) bzw. die gleiche Menge Trägersubstanz (Kontrollen; n = 38) intraperitoneal appliziert. In einer Sub-Gruppe mit zehnwöchiger Behandlung wurde zudem das Periost reseziert, um dessen Einfluss auf die Heilungskapazität von Pseudarthrosen unter EPO-Behandlung einzuschätzen. Nach Sektion der Knochen analysierten wir den Defektspace mit röntgenologischen, mikrocomputertomographischen sowie histomorphometrischen Methoden, um eine potentielle Überbrückung des Defektspace und dessen Gewebezusammensetzung zu beurteilen. Zudem kamen proteinbiochemische Methoden zur Anwendung, um die Wirkweise von EPO auf zellulärer Ebene zu analysieren.

Ergebnisse. Mikrocomputertomographische und histologische Analysen zeigten eine knöcherne Überbrückung des Defektspace in 2 von 22 Tieren, die zehn Wochen EPO erhalten hatten, während kein Kontrolltier eine Heilungstendenz aufwies. Dies war mit einem signifikant höheren Knochenvolumen in EPO-behandelten Tieren assoziiert, unabhängig von der Resektion des Periosts. Zudem fand sich in der EPO-Gruppe mit einer Behandlungsdauer von zwei Wochen im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant erhöhte Gefäßdichte. Die Ergebnisse der Western Blot-Untersuchung zeigten zwei Wochen postoperativ in EPO-behandelten Tieren eine signifikant gesteigerte Expression des Wachstumsfaktors vascular endothelial growth factor (VEGF) innerhalb des Knochendefektes im Vergleich zu Kontrollen, wohingegen nach zehn Wochen der Proliferationsmarker proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in EPO-behandelten Tieren gegenüber Kontrollen signifikant erhöht war. Die Ergebnisse der Western Blot-Analysen konnten mit immunhistologischen Färbungen bestätigt werden.

Schlussfolgerungen. Die Ergebnisse der hier vorgestellten Studie zeigten insbesondere nach zehn Wochen eine deutlich verbesserte Knochenheilung in atrophischen Pseudarthrosen durch die tägliche Behandlung mit EPO. Dies ist am ehesten auf eine Stimulation der VEGF-vermittelten Angiogenese und Zellproliferation zurückzuführen.

Erythropoietin improves bone repair in atrophic non-unions

Background and Purpose. Non-unions are characterized by an insufficient healing capacity of fractured bones. In contrast to hypertrophic non-unions, which are commonly caused by excessive interfragmentary motion, the reason for atrophic non-unions is supposed to be a disturbed biological healing capacity. Thus, hypertrophic non-unions can be treated successfully by ensuring sufficient fracture stabilization, while treatment of atrophic non-unions must stimulate biological processes of bone repair. Beyond its classical role in erythropoiesis, the glycoprotein erythropoietin (EPO) has been demonstrated to exert cell protective and regenerative actions in a variety of non-hematopoietic tissues. In bone, it has been recently shown that EPO is capable of stimulating fracture repair. The aim of the present study was to investigate, whether EPO treatment may also improve bone repair in atrophic non-unions.

Methods. Femoral atrophic non-unions were achieved in CD-1 mice by creating a 1.8 mm segmental bone defect that was stabilized by the so called pin-clip technique. Mice were treated by a daily intraperitoneal injection of EPO (500 U/kg body weight; n=38) or the vehicle only (controls; n=40) during the whole observation period. In one subgroup of mice the periosteum was stripped to investigate its influence on the healing capacity of non-unions under EPO-treatment. At 2 and 10 weeks after surgery, the animals were sacrificed and bone repair was studied by x-ray, μ CT, and histomorphometry. In addition, we used immunohistochemical and Western blot analyses to evaluate potential mechanisms by which EPO might affect bone repair in atrophic non-unions.

Results. Computerized tomographic and histomorphometric analyses showed osseous bridging of the bone defect in 2 out of 22 animals receiving EPO treatment for ten weeks, while no bridging of the segmental bone defects was observed in controls. This was associated by a significantly higher bone volume within the segmental defects of EPO-treated animals when compared to the segmental defects of controls. Besides, at two weeks, the number of blood vessels was increased in the group receiving EPO. Results of the Western Blot analyses revealed a significantly increased expression of the growth factor VEGF after two weeks in comparison to control animals, whereas after ten weeks the proliferation marker PCNA showed a significantly higher expression compared to controls. The results of the Western Blot analysis could be confirmed by immunohistochemical staining, showing a significantly higher number of VEGF- and PCNA-positive cells in EPO-treated animals than in controls at 2 and 10 weeks, respectively.

Conclusions: In conclusion, the results of the present study demonstrate that EPO treatment improves bone repair in atrophic non-unions particularly at 10 weeks. This is most probably caused by a stimulation of cell proliferation, angiogenesis, and the expression of the osteogenic and angiogenic growth factor VEGF through EPO treatment.

2. Einleitung

2.1 Biologische Grundlagen des Knochens

2.1.1 Morphologie

Knochen können anhand verschiedener Kriterien unterteilt werden. Ein morphologisch sinnvolles Kriterium ist die Einteilung nach ihrer Form. Hierbei unterscheidet man drei Gruppen von Knochen:

Die erste Gruppe sind lange Knochen (*Ossa longa*), die auch Röhrenknochen genannt werden. Beispiele für diese Gruppe sind Humerus, Femur und Tibia (Aumüller et al., 2007) (Schiebler & Korf, 2007).

Die zweite Gruppe sind kurze Knochen (*Ossa brevia*). Hierzu zählen u.a. die Hand- und Fußwurzelwurzelknochen (Aumüller et al., 2007) (Schiebler & Korf, 2007).

Die dritte Gruppe sind platte Knochen (*Ossa plana*). Hauptvertreter sind Scapula, Beckenknochen wie z.B. die *Ossa ilia* und Schädelknochen wie z.B. die *Ossa parietales* (Aumüller et al., 2007) (Schiebler & Korf, 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden Femora, d.h. Röhrenknochen, untersucht.

Röhrenknochen werden - abgesehen von speziellen anatomischen Strukturen - in drei Bereiche unterteilt (Aumüller et al., 2007):

An den proximalen und distalen Enden der Röhrenknochen befinden sich die Epiphysen, die jeweils als Teil eines Gelenks mit benachbarten Knochen artikulieren (Aumüller et al., 2007) (Schiebler & Korf, 2007).

In der Mitte eines Röhrenknochens befindet sich die längliche, schaffförmige Diaphyse, die i.d.R. mit Knochenmark bzw. gelbem Fettmark gefüllt ist (Aumüller et al., 2007) (Schiebler & Korf, 2007).

Zwischen Diaphyse und Epiphyse liegt die Metaphyse, die im Wachstumsalter die Epiphysenfuge beinhaltet. Dieser Abschnitt ist für das Längenwachstum des Röhrenknochens verantwortlich und verknöchert nach Abschluss des Wachstums. Die Epiphysenfuge bleibt oft als Epiphysenlinie (*Linia epiphysialis*) röntgenologisch sichtbar (Aumüller et al., 2007) (Schiebler & Korf, 2007).

In der vorliegenden Dissertation diente die Diaphyse als Osteotomielokalisation.

2.1.2 Histologie

Knochengewebe besteht aus verschiedenen Zelltypen und mineralisierter Extrazellulärmatrix (EZM), dessen besondere Eigenschaften und Zusammensetzung Knochen zu einem sehr biege-, druck- und zugfesten Gewebe machen (Lüllmann-Rauch et al., 2006).

Histologisch gliedert sich Knochen in folgende Abschnitte:

Die äußere Substantia compacta (Kompakta) besteht aus kortikalem Gewebe und wird daher auch Kortikalis genannt. Sie wird beim Menschen aus Osteonen bzw. dem Havers-System gebildet. Hierunter versteht man eine etwa 250 µm x 1-5 cm große funktionelle Einheit, die aus etwa 5-20 jeweils 3-5 µm dicken Knochenlamellen (Havers-Lamellen bzw. Speziallamellen) besteht, die konzentrisch um einen zentralen Kanal (Havers-Kanal) herum geschichtet sind. Im Havers-Kanal, der mit Endost ausgekleidet ist, verlaufen neben vegetativen Nerven auch Blutgefäße (Havers-Gefäße), die über seitliche Verzweigungen (sog. Volkmann-Kanäle) miteinander in Verbindung stehen (Lüllmann-Rauch et al., 2006) (Junqueira et al., 2004)

Die Knochenlamellen bestehen aus mineralisierten Kollagenfibrillen, deren Verlaufsrichtung von einer Lamelle zur nächsten wechselt. Dieses Bauprinzip dient der Modellierung von Zug- und Druckbelastungen auf den Knochen (Bucher & Wartenberg, 1997).

Zwischen den Lamellen sind die Zelleiber der Osteozyten in den linsenförmigen Knochenhöhlen (Lacunae osseae) angeordnet. Von den Lakunen ziehen Kanälchen (Canaliculi ossei) in verschiedene Richtungen, in denen die Ausläufer der Osteozyten und interstitielle Flüssigkeit per Diffusion in Verbindung treten, sodass sich ein Labyrinth von Versorgungswegen bildet, das die Zellen ernährt. Die Osteozyten stehen mit ihren Nachbarzellen und Zellen des Endosts über Gap Junctions in Verbindung und tauschen Informationen aus, die für die Vitalität des Knochens essenziell sind. Die Grenze zu Nachbarosteonen kann histologisch häufig durch eine stärker anfärbbare Linie (Zementlinie) dargestellt werden. Die Zwickel zwischen den Osteonen werden durch Schaltlamellen gefüllt. Diese stellen Reststücke von alten, teilweise abgebauten Havers-Systemen dar und sind Ausdruck des stetigen Knochenumbaus. Dadurch ergibt sich eine Matrix, die eine feste Masse darstellt (Lüllmann-Rauch et al., 2006) (Junqueira et al., 2004).

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

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

Das Stratum osteogenicum liegt dem Knochen direkt auf und wird auch als Kambiumschicht bezeichnet. Es enthält die gleichen Zellen wie das Endost sowie kleine Gefäße und Kapillaren und ermöglicht somit die Ernährung der Knochensubstanz von außen. Außerdem enthält die Kambiumschicht sensible Nervenfasern, die typische Schmerzempfindungen hervorrufen können. Durch die Vaskularisierung und die zelluläre Ausstattung des Stratum osteogenicum trägt diese Schicht des Periosts zur Neubildung von Knochensubstanz bei. Sie ist Ort der Osteoblastendifferenzierung, die im Wachstumsalter besonders ausgeprägt und verantwortlich für das Dickenwachstum des Knochens ist. Nach Abschluss des physiologischen Knochenwachstums nimmt die Differenzierung der Osteoblasten ab; sie kann jedoch im Falle einer Fraktur lokal wieder gesteigert werden (periostale Frakturheilung) (Lüllmann-Rauch et al., 2006) (Schiebler & Schmidt, 2003).

Das Stratum fibrosum liegt dem Stratum osteogenicum außen auf und ist mit Knochen durch Kollagenfaserbündel - sog. Sharpey-Fasern - unterschiedlich stark verbunden. Besonders im Bereich von Sehnen- und Bandansätzen, die in das Stratum fibrosum einstrahlen, sind Sharpey-Fasern von großer Bedeutung, da sie die auf den Knochen einwirkende Zugbelastung relativ verringern, indem sie die Zugkräfte auf eine größere Ansatzfläche verteilen (Schiebler & Schmidt, 2003).

Das innere Knochengewebe, das von der Substantia compacta umschlossen wird, nennt sich Substantia spongiosa (Spongiosa). Spongiosa besteht aus trabekulärem Knochen. Hierbei handelt es sich um ein komplexes, schwammartiges System aus Knochenbälkchen (Trabekel), das in seinen Zwischenräumen Knochenmark enthält. Die EZM der Spongiosa ist ebenfalls in Lamellen organisiert, jedoch sind die Lamellen parallel, d.h. flächig, angeordnet. Die Bälkchen sind gefäßlos und die zwischen den Lamellen gelegenen Osteozyten werden per Diffusion vom Knochenmark ernährt (Lüllmann-Rauch et al., 2006) (Junqueira et al., 2004).

Knochenmark wird farblich in rotes und gelbes Mark unterteilt. Es füllt alle inneren Hohlräume des Knochens aus. Embryogenetisch wird zunächst nur rotes Knochenmark angelegt. Es ist etwa ab dem 5.-6. Fetalmonat hämatopoietisch aktiv und daher wichtiger Ort der Blutbildung. Entsprechend wird die Farbe durch die hohe Anzahl von Erythrozyten und deren Vorstufen bestimmt. Mit zunehmendem Alter wird das rote Knochenmark in den langen Knochen durch gelbes Fettmark ersetzt, sodass sich die Hämatopoiese auf die kurzen und platten Knochen beschränkt. Gelbes Knochenmark hat die Funktion eines Platzhalters, d.h. im Falle einer kompensatorischen Erythropoiese (z.B. im Rahmen einer Anämie oder chronischen Hypoxie) kann eine Umkehr der Entwicklung stattfinden und dieser Bereich hämatopoietisch genutzt werden (Boecker et al., 2004).

Das histologische Grundgerüst des Knochenmarks besteht aus retikulärem Bindegewebe. Entsprechend enthält das Stroma Retikulumzellen, sowie Fettzellen und Osteoblasten. Die große Mehrheit der Zellen im roten Mark stellen reife und unreife Stadien der verschiedenen Blutzellreihen, sowie Plasmazellen dar. Das Stroma des Knochenmarks schafft ein geeignetes Milieu, in dem Gerüstzellen durch Zytokine und andere Faktoren die Hämatopoiese beeinflussen (Boecker et al., 2004).

Spongiosa-Trabekel werden komplett von Endost überzogen, das sich entsprechend der obigen Beschreibung bis in die Havers-Kanäle der Kompakta fortsetzt. Das Endost bezeichnet eine dünne Schicht von nicht-mineralisierten Kollagenfibrillen und einer kontinuierlichen Lage von Zellen, die in diesem Zusammenhang auch Lining Cells genannt werden. Es finden sich hauptsächlich mesenchymale Vorläuferzellen (Stammzellen, Osteoprogenitorzellen), Osteoblasten, sowie Osteoklasten. Bei Bedarf können diese Zellen aktiviert werden und sofort an jedem Ort im Knochen mit Umbaumaßnahmen beginnen. Dies ist besonders im Rahmen von Frakturen von großer Bedeutung (Lüllmann-Rauch et al., 2006).

Die Vorläuferzellen befinden sich nicht nur endostal, sondern auch an der äußeren Knochenoberfläche und in den Havers-Kanälen. Sie werden durch hormonelle Stimulation in Osteoblasten umgewandelt und können dann neue Knochengrundsubstanz bilden (Osteoid), die im Verlauf von den Osteoblasten mithilfe der alkalischen Phosphatase mineralisiert wird. Die Mineralisation dauert beim Menschen in der Spongiosa etwa 25, in der Kortikalis etwa 35 Tage (Junqueira et al., 2004). Osteoblasten werden nach diesem Vorgang entweder apoptotisch abgebaut, oder in die EZM eingemauert und verwandeln sich dann in Osteozyten bzw. gehen in den inaktiven Zustand zurück, sofern sie nach der Knochenneubildung nicht von EZM umschlossen sind (Lüllmann-Rauch et al., 2006).

Osteoklasten sind polynukleäre Riesenzellen (50-100 μm), die je nach Vorkommen auch Chondro- bzw. Odontoklasten genannt werden. Sie entwickeln sich im Gegensatz zu anderen Knochenzellen aus hämatopoietischen Vorläuferzellen und sind im Knochen für den Abbau von mineralisierter Matrix verantwortlich. Ihr Haushalt wird durch die Osteoblasten kontrolliert. Osteoklasten finden sich in Vertiefungen der Knochenoberfläche (sog. Howship-Lakunen), sowie in der Kortikalis an Stellen, die für Gefäßkanäle neuer Osteone abgebaut werden sollen. So baut ein Osteoklast dieselbe Menge an Knochen ab, die 100-150 Osteoblasten zeitgleich produzieren können (Lüllmann-Rauch et al., 2006) (Junqueira et al., 2004).

Die EZM des Knochens besteht zu 65 % aus anorganischen und zu 35 % aus organischen Komponenten. Der anorganische Anteil setzt sich vor allem aus Mineralien wie Calciumphosphaten und Calciumcarbonaten zusammen. Der organische Anteil unterteilt sich zu 90 % in Kollagen und zu 10 % in nicht-kollagene Proteine und Lipide (Junqueira et al., 2004).

Nach der räumlichen Organisation der EZM unterscheidet man folgende Arten von Knochengewebe:

Im Geflechtknochen, oder auch Faserknochen, liegen die Kollagenfibrillen in Bündeln vor, die kreuz und quer miteinander verflochten sind. Diese Art von Knochengewebe entsteht zunächst bei jeder Knochenneubildung und bildet sich entlang der Kapillaren. Der Zellreichtum ist im Geflechtknochen groß, und die Verteilung der Osteozyten sehr diffus. (Lüllmann-Rauch et al., 2006) (Junqueira et al., 2004).

Im Verlauf wird der Geflechtknochen zu Lamellenknochen umdifferenziert. Lamellenknochen wächst entlang der Kraftlinien und weist im Vergleich zu Geflechtknochen Kollagenfaserbündel in der EZM auf, die regelmäßig im Havers-System angeordnet sind. Die Anzahl von Zellen ist vergleichsweise niedrig, entsprechend hat Lamellenknochen einen größeren Anteil an anorganischen Bestandteilen (Junqueira et al., 2004).

Die histologische Knochenstruktur der Maus ist im Gegensatz zu der des Menschen relativ primitiv. Ein Havers-System ist nicht vorhanden. Der Knochenumbau in der Maus erfolgt über Resorptionshöhlen, die in der Nähe einer Fraktur entstehen und sich im Laufe der Frakturheilung mit Osteoblasten füllen (Nunamaker, 1998).

2.1.3 Physiologie

Die Hauptaufgaben des Knochens bestehen in einer Stütz- und Strukturfunktion, sowie einer Mobilitätsfunktion. Durch den hohen Anteil an Calcium stellt Knochen zugleich einen essenziellen Faktor für die Calciumhomöostase im menschlichen Körper dar. Mit Blick auf die Wirbelsäule oder den knöchernen Brustkorb wird zudem die Funktion von Knochen als Schutz anderer Körperbereiche deutlich (Aumüller et al., 2007) (Schiebler & Korf, 2007).

Um diesen Funktionen gerecht werden zu können, sind repetitive Formations- und Resorptionsvorgänge nötig, die durch folgende Aspekte charakterisiert sind (Frost, 1987):

- Wachstum
- Modeling
- Remodeling

Das Längenwachstum des Knochens geht hauptsächlich von den Epiphysenfugen im Bereich der Metaphysen aus. Das Dickenwachstum des Knochens erfolgt vor allem durch das Stratum osteogenicum des Periosts (Lüllmann-Rauch et al., 2006) (Junqueira et al., 2004).

Als Modeling wird die Fähigkeit des Knochens bezeichnet, auf spezifische mechanische Erfordernisse mit gezielten Formveränderungen zu reagieren. Diese Fähigkeit ist besonders in der Wachstumsphase ausgeprägt und nimmt mit zunehmendem Alter ab (Fleisch, 1997).

Dynamische, belastungsunabhängige Umbauprozesse im Knochen werden als Remodeling bezeichnet. Sie laufen lebenslang ab und führen nicht zu einer Zunahme des Knochenvolumens. Ziel dieses Prozesses ist vielmehr die Reparatur von Mikrofrakturen. In diesem Zusammenhang ist auch der Begriff Coupling von Bedeutung, der das Gleichgewicht von Knochenresorption und neuem Knochenanbau beschreibt. Die dazugehörige morphologische Struktur bezeichnet man als BRU (bone remodeling unit) (Fleisch, 1997).

2.2 Arten der Frakturheilung

2.2.1 Primäre Frakturheilung

Unter primärer Frakturheilung, oder auch direkter Frakturheilung, versteht man eine Knochenheilung ohne äußere Kallusmanschette. Sie erfolgt durch direkte Knochenneubildung zwischen stabil fixierten, gut durchbluteten Fragmenten, die makroskopisch ohne erkennbaren Zwischenraum zusammengefügt sind. Dementsprechend muss für diesen Typ der Frakturheilung eine ausreichende Vaskularität und eine ausreichende mechanische Frakturstabilität gegeben sein. Eine Grundvoraussetzung für die primäre Knochenheilung ist daher die Stabilisierung einer Fraktur mittels Osteosynthese nach anatomischer Frakturresposition. Das medulläre Gefäßsystem wird im Rahmen der primären Frakturheilung innerhalb weniger Tage durch Kapillaraussprossung wiederhergestellt (Rueter et al., 2003) (Berchtold et al., 2008).

Bei einem Frakturspalt von unter 0,2 mm kommt es beim Menschen zur Kontaktheilung, die durch eine Verzahnung der Fragmente aufgrund vorwachsender Osteone gekennzeichnet ist. Hierbei „bohren“ Osteoklasten einen Resorptionskanal in die Kortikalis des jeweils gegenüberliegenden Fragmentes und geben dadurch den Weg für nachfolgende Osteoblasten vor, die konsekutiv im Zuge der Wiederauffüllung des Resorptionskanals Lamellenknochen bilden. So kommt es zu einem longitudinalen Einwachsen der Osteone und einer direkten Vereinigung der Knochenfragmente (Rueter et al., 2003) (Berchtold et al., 2008).

Ist der Frakturspalt beim Menschen größer als 0,2 mm, spricht man im Rahmen der primären Knochenheilung von Spaltheilung. Diese ist charakterisiert durch eine Auffüllung der mikroskopischen Spalten mit Geflechtknochen. Dieser Vorgang dauert beim Menschen im Regelfall zwischen drei bis vier Wochen. In einer zweiten Phase wird das neu gebildete Knochengeflecht im Rahmen eines funktionellen Remodelings zu Lamellenknochen (Ausrichtung parallel zur Schaftachse) umgebaut (Rueter et al., 2003) (Berchtold et al., 2008).

Bis dato ist nicht bekannt, ob eine primäre Frakturheilung bei der Maus unter o.g. Voraussetzungen möglich ist. Bisher angewandte Frakturmodelle führen zu einer sekundären Frakturheilung (Garcia et al., 2008) (Garcia et al., 2008b) (Garcia et al., 2009) (Hiltunen et al., 1993) (Histing et al., 2009b) (Holstein et al., 2007b) (Holstein et al., 2009b) (Manigrasso & O'Connor, 2004).

2.2.2 Sekundäre Frakturheilung

Diese Form der Knochenheilung wird auch indirekte Frakturheilung genannt und stellt die natürliche und häufigere Art der Frakturheilung dar. Sie ist gekennzeichnet durch die Bildung eines

Zwischengewebes (Kallus), das die Fraktur zunächst fixiert, um sie subsequent mechanisch zu stabilisieren (Scharf et al., 2009).

Die sekundäre Frakturheilung erfolgt immer dann, wenn keine anatomische Reposition der Knochenfragmente erreicht wird. Sie tritt vor allem bei konservativ behandelten Frakturen oder im Rahmen von nicht auf anatomische Reposition ausgerichteten Osteosynthesen wie z.B. der Marknagelung auf (Rueter et al., 2003) (Berchtold et al., 2008) (Scharf et al., 2009).

Die indirekte Frakturheilung lässt sich in fünf, sich teilweise überlappende Phasen gliedern:

Während der Frakturphase werden durch eine Gewalteinwirkung die Kontinuität der Kortikalis, der Spongiosa, des Knochenmarks und des Periosts in unterschiedlichem Ausmaß unterbrochen. Die gleichzeitige Durchtrennung periostaler und medullärer Blutgefäße führt zur Bildung eines Frakturhämatoms im Frakturspalt und angrenzenden Weichteilgewebe. Bereits in einem Zeitraum von Minuten bis Stunden nach der Fraktur kommt es im Bruchspalt zur Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, sowie zur Aktivierung pluripotenter Zellen (Scharf et al., 2009).

Die Entzündungsphase beginnt mit der Hämatomausbildung und ist somit direkt mit der Frakturphase verbunden. Sie reicht bis zur Ausbildung des bindegewebigen Kallus und hält beim Menschen i.d.R. 48 bis 72 Stunden an. In dieser Phase kommt es - begünstigt durch das Frakturhämatom - zu einer überschießenden Kapillaraussprossung, sowie einer Kaskade der Proliferation, Migration und Differenzierung von überwiegend pluripotenten Stammzellen, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen. Während die Rolle von Granulozyten, Makrophagen und Stammzellen im Rahmen von Heilungsprozessen allgemein bekannt ist, konnte die Rolle der Mastzellen diesbezüglich noch nicht eindeutig geklärt werden. Durch die Ausschüttung von Heparin und heparinähnlichen Substanzen kann jedoch vermutet werden, dass Mastzellen die lokale Vaskularisation und die Zellmigration beeinflussen. Darüber hinaus wird in verschiedenen Studien propagiert, dass Mastzellen als Sprösslinge des hämatopoietischen Systems Vorläuferzellen der Osteoklasten darstellen (Rueter et al., 2003) (Boyle et al., 2003) (Teitelbaum & Ross, 2003) (Thomann et al. 2009) (Scharf et al., 2009).

Eine weitere Zellart, die im Rahmen der sekundären Frakturheilung von Bedeutung ist, sind Spindelzellen. Sie liegen zwischen der Kambiumschicht des Periosts und der Knochenoberfläche (s. 2.1.2). Morphologisch sind Spindelzellen nicht von Fibroblasten zu unterscheiden. Angesichts der Tatsache, dass aus ihnen Osteoblasten hervorgehen können, werden sie auch Osteoprogenitorzellen genannt (Rueter et al., 2003).

Im Rahmen der Entzündungsphase scheint die Angiogenese eine entscheidende Rolle für die Zellmigration und -nutrition zu spielen. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, dass mesenchymale Vorläuferzellen direkt dem einsprießenden Gefäßendothel entstammen (Tremain et al., 2001). Während der Entzündungsphase zeigt sich eine gesteigerte Gewebepfusion, die durch eine

„Flussumkehr“ ermöglicht wird. Statt der physiologischen zentrifugalen Ernährung der inneren zwei Drittel der Kortikalis durch Markraumgefäße, wird die Kortikalis nach einer Frakturierung hauptsächlich durch periostale Gefäße perfundiert und ernährt. Beim Menschen wird ein Maximum der Durchblutung in der zweiten Woche nach dem Trauma mit Werten um das Sechsfache der Norm erreicht. Trotz der intensiven angiogenen Aktivität im Bereich der Fraktur bleibt die Sauerstoffspannung jedoch niedrig und der pH-Wert im sauren Bereich, da selbst die vermehrte Sauerstoffzufuhr dem Zellreichtum und dem damit verbundenen Bedarf an Sauerstoff kaum gerecht werden kann (Rueter et al., 2003) (Scharf et al., 2009).

Der Entzündungsphase folgt die Granulationsphase. Im Bereich des Frakturhämatoms wandern während dieser Phase Fibroblasten ein. Zudem zeigt sich ein lichtetes Netz aus Fibrin und Kollagenfibrillen. Es ist eine Organisation des Frakturhämatoms zu erkennen. Das Hämatom wird rasch durch Granulationsgewebe ersetzt. Dieses besteht aus Lymphozyten, Fibroblasten, neu gebildetem Kollagen und zahlreichen Kapillaren. Bereits in diesem frühen Stadium der Frakturheilung finden sich in Kollagenfibrillen und damit in unmittelbarer Nähe zu Fibroblasten liegende Mineraldepots. Am Ende dieser Phase sind die Fragmente durch Bindegewebe und Knorpel weich miteinander verbunden. Es ist der sog. weiche Kallus entstanden (Rueter et al., 2003) (Scharf et al., 2009).

Zudem werden in dieser Phase abgestorbene Fragmentenden durch Osteoklasten abgebaut. Aus mesenchymalen Vorläuferzellen entwickeln sich Chondroblasten, während zeitgleich subperiostal eine direkte Knochenneubildung aus Osteoblasten einsetzt (desmale / membranöse Ossifikation oder primäre Kallusreaktion). Zeitgleich wandert ein Blastem aus dem Markraum in den Bereich des Frakturhämatoms ein und füllt den Frakturspalt als sog. medullärer Kallus (Rueter et al., 2003) (Scharf et al., 2009).

Während diese Phase beim Menschen etwa drei bis vier Wochen dauert, lässt sich dieses Stadium der Frakturheilung bei der Maus bereits nach 10 bis 14 Tagen beobachten (Manigrasso & O'Connor, 2004) (Rueter et al., 2003) (Scharf et al., 2009).

Die nachfolgende Phase der Kallushärtung ist durch eine zunehmende Mineralisation des Kallusgewebes gekennzeichnet. Im Rahmen der enchondralen Ossifikation härtet der Knochen aus und es entsteht Geflechtknochen (s. 2.1.2), der sich nicht entlang der mechanischen Belastungslinien, sondern entlang neuer Kapillarsprossen ausbildet. Das hierfür benötigte Calcium entstammt Mitochondrien hypertrophierter Chondrozyten. Zudem kommt es zeitgleich zu einer frakturspaltfernen Osteoblastenproliferation und somit zu einer Ablagerung von Geflechtknochen zwischen Diaphysenoberfläche und Periost (Rueter et al., 2003).

Terminologisch kommt es in dieser Phase zu einer Umwandlung von weichem Kallus in einen sog. Fixationskallus oder harten Kallus. Dieser Vorgang ist erst abgeschlossen, sobald die Knochenfragmente fest miteinander verbunden sind (Scharf et al., 2009).

Im Rahmen der Frakturheilung ist für den Abbau des nekrotischen Knochens und den Umbau mineralisierten Knorpels in Knochen die sog. BRU verantwortlich. Diese bereits o.g. multizelluläre Grundeinheit besteht aus Zellen, Interzellulärsubstanz und Kapillaren und hat zeitabhängig unterschiedliche Aktivitäten und Fähigkeiten. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass calcifizierter Knorpel durch Osteoklasten resorbiert und durch osteoblastär gebildeten Geflechtknochen ersetzt wird (Scharf et al., 2009) (Rueter et al., 2003).

In der anschließenden und letzten Phase des Modelings und Remodelings kommt es zum Knochenumbau. Diese Phase beginnt beim Menschen i.d.R. sechs Wochen nach dem Trauma und dauert Wochen bis zu mehreren Monaten. Entsprechend der mechanischen Belastung bildet sich mithilfe der BRU Geflechtknochen in Lamellenknochen um (Modeling). Klinisch ist die sekundäre Frakturheilung abgeschlossen, sobald der Knochen an der Frakturstelle seine normale Festigkeit wiedererlangt hat. Biologisch ist sie erst abgeschlossen, sobald sämtliche reparative Prozesse an der Bruchstelle zum Stillstand gekommen sind (Scharf et al., 2009). Als Remodeling wird in diesem Zusammenhang die Wiederherstellung der normalen Knochenkontur, sowie des ursprünglichen Markraums bezeichnet (Rueter et al., 2003).

2.2.3 Verzögerte und defekte Frakturheilung (Pseudarthrose)

Im Rahmen der Frakturheilung spricht man beim Menschen von verzögerter Heilung, wenn nach vier Monaten noch keine knöcherne Überbrückung der Fraktur stattgefunden hat, jedoch eine Heilungsaktivität zu erkennen ist. Kommt es innerhalb eines Zeitraums von sechs Monaten nicht zu einer knöchernen Konsolidierung der Fragmente, spricht man von einer Pseudarthrose bzw. einem posttraumatischen Fehl- / Scheingelenk (Scharf et al., 2009).

Ätiologisch kann eine Pseudarthrose durch mechanische oder biologische, bzw. exogene oder endogene Faktoren oder aber auch durch eine Kombination dieser Faktoren bedingt sein (Scharf et al., 2009).

Mechanische Faktoren ergeben sich hauptsächlich aus einer lokalen Instabilität oder mangelnden Ruhigstellung der Fraktur. Im Verlauf kommt es hierdurch zu einer repetitiven Scherung und Stauchung im Frakturbereich. Dadurch wird der im Rahmen der sekundären Frakturheilung aus Kallusgewebe gebildete Geflechtknochen (s. 2.2.2) immer wieder zerrissen und zerstört (Scharf et al., 2009).

Den wichtigsten biologischen Faktor für die Entstehung einer Pseudarthrose stellen Mikroangiopathien im Bereich der Knochenfragmentenden dar. Diese Art der Durchblutungsstörung führt zu einer völligen Devitalisierung des Knochens. Ähnlich wirken sich eine schwere Anämie und die dadurch veränderte Sauerstoffspannung im Bereich der Frakturstelle auf die Entwicklung eines Scheingelenks aus.

Andere Faktoren sind Denervierung, Substanzverlust, Durchblutungsstörungen der angrenzenden Weichteile, Infektionen mit Sequesterbildung, sowie allgemeine Faktoren, die die Vitalität des Gewebes herabsetzen und die Frakturheilung verzögern (z.B. Alter des Patienten, medikamentöse Dauerbehandlung) (Scharf et al., 2009).

Endokrine Faktoren, die zur Ausbildung eines Fehlgelenks führen können, sind meist mit einer Osteopenie bzw. einer mangelnden Mineralisierung des Knochengewebes verbunden. Ursachen sind z.B. ein Glukokortikoidüberschuss, ein Gonadenhormonmangel, ein Diabetes mellitus, oder ein Mangel an Vitamin D bzw. seiner Metaboliten (Scharf et al., 2009).

Die ursächlichen Faktoren in der Pseudarthroseentstehung spiegeln sich auch im morphologisch-röntgenologischen Befund wider. Ist ein Falschgelenk vorrangig durch eine mechanische Instabilität zu erklären, zeigt sich typischerweise eine besonders voluminöse periostale, teilweise elefantenfußähnliche Kallusbildung an beiden Fraktarenden, ohne dass jedoch eine knöcherne Überbrückung eintritt. Diese Form des Scheingelenks wird reaktionsfähige, hypertrophe Pseudarthrose genannt. Von einer reaktionsunfähigen, atrophen Pseudarthrose spricht man, wenn zwischen den avitalen Fragmenten keine Gewebsreaktion möglich ist. Es bildet sich kein Kallus aus, und die Fragmente atrophieren (Scharf et al., 2009).

Hinsichtlich des Therapiekonzepts muss neben dieser Klassifizierung weiterhin zwischen infizierten und nicht-infizierten Pseudarthrosen unterschieden werden (Scharf et al., 2009).

Bei voller Ausprägung einer Pseudarthrose ist i.d.R. die pathologische Beweglichkeit eines Skelettabschnitts das führende Symptom. Ist diese nicht nachzuweisen, wird das klinische Bild durch Schmerz, Schwellung und Belastungsunfähigkeit charakterisiert (Scharf et al., 2009).

Bezüglich der Klassifikation ist das Röntgenbild von diagnostisch entscheidender Bedeutung. Die knöcherne Durchbauung der Fraktur ist mittels computertomographischer Bildgebung bestmöglich zu beurteilen. Bezüglich der Vitalität des Knochens ist eine Kernspintomographie anderen diagnostischen Methoden überlegen (Scharf et al., 2009).

Ist eine Pseudarthrose sicher nachgewiesen, richtet sich das therapeutische Regime nach der Ätiologie. Die Behandlung einer hypertrophen Pseudarthrose erfordert eine stabile Osteosynthese. Gegebenenfalls muss die Pseudarthrosenmembran reseziert werden, und die Frakturheilung durch Anfrischen der Knochenenden induziert werden (Scharf et al., 2009).

Ziel in der Behandlung einer atrophen Pseudarthrose ist die Wiederherstellung der Vitalität des Knochens. Hierzu werden im aktuellen klinischen Vorgehen die atrophen Knochenanteile reseziert, und in der Regel eine Knochentransplantation durchgeführt. Neben der Verbesserung der Vaskularisation im Bereich der Fraktur, ist in vielen Fällen eine zusätzliche Verbesserung der

Vaskularität des umliegenden Weichteilgewebes nötig. Hierzu eignen sich z.B. Muskellappenplastiken (Scharf et al., 2009).

In allen Phasen der Frakturheilung spielen Zytokine als chemische Mediatoren zwischen den verschiedenen involvierten Zellen eine zentrale Rolle. Sie vermitteln und regulieren den Ablauf der Frakturheilung und kontrollieren das umgebende Milieu. Entsprechend dieser großen Bedeutung im Rahmen der Frakturheilung wird versucht, Zytokine therapeutisch zu nutzen, jedoch ist die Frage nach der optimalen Konzentration und einer geeigneten Trägersubstanz bisher nur ungenügend geklärt (Scharf et al., 2009).

Im Einzelnen sind folgende Zytokine von besonderer Bedeutung:

Der Platelet Derived Growth Factor (PDGF) dient der Verbesserung der Zellproliferation und ist vor allem im Bereich des Frakturhämatoms in hohen Konzentrationen nachweisbar (Scharf et al., 2009).

Die Bone Morphogenic Proteins (BMPs) werden von Stammzellen gebildet und sind für die Differenzierung dieser in Chondroblasten und Osteoblasten verantwortlich (Scharf et al., 2009). Zusammen mit einer stabilen Fixierung eines Transplantats kann die Applikation von rekombinanten BMPs (z.B. rhBMP-2) bei großen segmentalen Knochendefekten zur Heilung führen (Boyce et al. 2009).

Ein weiteres wichtiges Zytokin der Knochenheilung ist VEGF. Hierbei handelt es sich um einen essenziellen angiogenen und osteogenen Wachstumsfaktor. Unmittelbar auf eine Frakturierung folgend setzt eine starke Zellproliferation insbesondere von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen zusammen mit einer überschießenden Kapillareinsprossung in der Frakturzone ein (s. 2.2.2). Diese Neovaskularisation dient im Rahmen der enchondralen Ossifikation einerseits der Nutrition der Zellen vor Ort, andererseits kommt es zu einem „Einschwemmen“ und zur Proliferation sowie Weiterdifferenzierung mesenchymaler Zellen aus dem Gefäßendothel (Tremain et al., 2001). Hierfür ist in erster Linie VEGF verantwortlich (Street et al., 2002). Im weiteren Verlauf der Frakturheilung ist VEGF für die Resorption von hypertrophem Knorpelgewebe verantwortlich, sodass eine Blockierung von VEGF zu einer signifikanten Verzögerung der Rekrutierung und Differenzierung von Mediatoren der Knorpelresorption führt und darüber hinaus Chondroklasten hemmt (Gerber et al., 1999). Weiterhin führt eine Hemmung von VEGF zu einer signifikanten Reduktion der nodulären Osteoblastenformierung sowie zu einer verminderten Produktion alkalischer Phosphatase durch Osteoblasten (Street et al., 2002).

Zudem haben weitere Wachstumsfaktoren wie z.B. BFGF, TGF β und IGF einen essentiellen Einfluss auf die Knochenheilung und sind in den verschiedenen Heilungsphasen in unterschiedlicher Konzentration nachweisbar.

Im Rahmen der Behandlung von Pseudarthrosen mithilfe von Zytokinen wurden in den vergangenen Jahren verschiedene gentherapeutische Methoden experimentell untersucht. Das Ziel dieser Therapieform ist die Anhebung der Zytokinkonzentration im Frakturspalt. Hierzu werden die ortsständigen Zellen angeregt, o.g. Mediatoren in hohem Maß zu produzieren. Trotz eines zunehmenden Verständnisses der biologischen Abläufe, bedarf es diesbezüglich jedoch noch weiterer Grundlagenforschung (Scharf et al., 2009).

2.3 Frakturmodelle

Obwohl in der Vergangenheit zahlreiche Erkenntnisse über die Physiologie der Knochenheilung durch *in-vitro*-Studien, sowie klinische Studien gewonnen werden konnten, sind bis heute tierexperimentelle Modelle von essenzieller Bedeutung und fester Bestandteil in der Forschung der Knochenheilung.

In diesem Zusammenhang sind viele Frakturmodelle an verschiedenen Säugetier- und Vogelarten entwickelt worden. In Abhängigkeit von der jeweiligen Fragestellung der Studie werden Spezies unterschiedlichster Größe und Anatomie von Kleinnagetieren wie z.B. der Maus (Hiltunen et al., 1993) oder der Ratte (Sigurdson et al., 2009) bis hin zu Großtiersäugern wie etwa dem Schaf (Cheal et al., 1991) (Kirker-Head et al., 1995) als Versuchstiere verwendet. Konsekutiv müssen die unterschiedliche Biologie der Knochenheilung, sowie die Anatomie der jeweiligen Spezies in dem Aufbau der Experimente und der Interpretation der Ergebnisse stets Beachtung finden, da eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen immer diskutiert werden muss (Rhineland, 1974) (Nunamaker, 1998).

Es bestehen große Ähnlichkeiten im Genom der verschiedenen in tierexperimentellen Studien verwendeten Säugetiere, jedoch muss diesbezüglich beachtet werden, dass bestimmte Gene in Abhängigkeit von der jeweiligen Spezies zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert werden. Diese speziesabhängigen Unterschiede sind vor allem in Hinblick auf die Expression von Zytokinen von Bedeutung und sollten in tierexperimentellen Studien stets Beachtung finden. Dementsprechend ist auch der Applikationszeitpunkt und die Dosierung von Zytokinen in tierexperimentellen Studien stets zu diskutieren (Nunamaker, 1998).

Neben anatomischen Verhältnissen ist bei der Auswahl eines geeigneten Tiermodells die unterschiedliche Response verschiedener Spezies auf Medikamente ein weiteres wichtiges Kriterium. Sieht man von individuellen Schwankungen innerhalb einer Spezies ab, weisen verschiedene Tierarten ein völlig unterschiedliches Metabolisierungspotenzial bestimmter Wirkstoffe auf. Dies führt zu differenten Effekten der Medikamente im Organismus der jeweiligen Spezies und erfordert folglich eine Anpassung der Applikationsdosis. Beispielhaft sei an dieser Stelle die toxische Wirkung von nichtsteroidalen Antiphlogistika auf Katzen und Hunde erwähnt (Herrgesell, 1967) (Jones et al., 1992) (Nunamaker, 1998).

Darüber hinaus wird die Frakturheilung durch das Alter des Versuchstiers entscheidend beeinflusst. Prinzipiell gilt, dass ein juveniler, noch nicht ausgewachsener Knochen einen schnelleren Heilungsablauf aufweist, als ein seniler Knochen (Lu et al., 2005) (Rossant & Nagy, 1995). Als Hinweis auf ein abgeschlossenes Knochenwachstum kann der Schluss der Wachstumsfuge radiologisch nachgewiesen werden (Nunamaker, 1998).

Im Folgenden werden die am häufigsten in tierexperimentellen Studien verwendeten Spezies dargestellt.

2.3.1 Maus

Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden zahlreiche Tiermodelle für die Reproduktion physiologischer und pathologischer Prozesse während der Frakturheilung entwickelt. Nachdem primär Großtiermodelle zur Untersuchung der Knochenbruchheilung benutzt wurden, haben sich in jüngster Vergangenheit zunehmend Kleintiermodelle vor allem an der Maus etabliert.

Die Entwicklung von Frakturmodellen an der Maus stellt aufgrund der anatomischen Größenverhältnisse eine große Herausforderung für die praktische Durchführung dar. Die Frakturierung und osteosynthetische Stabilisierung eines Mäusefemurs mit einer Länge von etwa 15 mm und einem Durchmesser von knapp 2 mm erfordert ein hohes Maß technischen und operativen Geschicks (Holstein et al., 2009) (Manigrasso & O'Connor, 2004).

Die bis dato angewandten und publizierten Frakturmodelle an der Maus untersuchen die Knochenbruchheilung vor allem an der Rippe, der Tibia, sowie dem Femur (Hiltunen et al., 1993) (Bourque et al., 1992) (Nakase et al., 1994) (Manigrasso & O'Connor, 2004) (Holstein et al., 2007b) (Garcia et al. 2008). Frakturmodelle an Rippen sind aufgrund der ungünstigen Anatomie für biomechanische Testmethoden wenig geeignet und sind daher bisher fast ausschließlich im Rahmen von Genexpressionsanalysen während der Frakturheilung angewandt worden (Nakase et al., 1994) (Ito et al., 1999) (Yamagiwa et al., 1999). Im Gegensatz zur Rippe sind die Tibia und das Femur gut für biomechanische Testungen geeignet. Die anatomischen Vorteile des Mäusefemurs gegenüber der Tibia liegen in einem einheitlichen runden Querschnitt, sowie einer guten Weichteildeckung (Cheung et al., 2003).

Grundsätzlich werden bei Tibia- sowie Femurfrakturmodellen offene und geschlossene Methoden der Frakturierung unterschieden. Die geschlossenen Formen der Frakturierung lassen sich hauptsächlich auf das von Bonnarens und Einhorn 1984 an der Ratte beschriebene Modell zurückführen (Bonnarens & Einhorn, 1984). Durch eine stumpfe Guillotine wird hierbei ein standardisierter transverser Frakturverlauf unter minimalem Weichteilschaden erzeugt. Dieses Modell wurde im Folgenden von Hiltunen und Kollegen 1993 an der Tibia der Maus und von Manigrasso und O'Connor 2004 am Femur der Maus publiziert (Hiltunen et al., 1993) (Manigrasso & O'Connor, 2004). Die offene

Femurfrakturierung erfolgt meist über einen lateralen longitudinalen Zugang, um den Knochen unter Sicht zu frakturieren bzw. zu osteotomieren (Cheung et al., 2003) (Garcia et al. 2008b).

Die Tibia bzw. das Femur des Versuchstiers wird i.d.R. nach definierten Zeitabschnitten post mortem explantiert und die Knochenbruchheilung mit verschiedenen analytischen Methoden untersucht. Hierzu zählen radiologische, biomechanische, histologische und proteinbiochemische Verfahren (Holstein et al., 2009).

An der Maus wird vor allem die intramedulläre Pin-Stabilisierung als Osteosynthesetechnik eingesetzt, jedoch stellt die ungenügende Rotationsstabilität im Frakturbereich einen großen Nachteil dieser Methode dar. Darüber hinaus war lange Zeit eine Frakturierung aufgrund der schwierigen Reposition primär nur nach vorheriger Implantateinbringung möglich (Holstein et al., 2009).

Cheung und Kollegen beschrieben 2003 eine Osteosynthese mit einem Fixateur externe, die im Gegensatz zur Marknagelung eine suffiziente Stabilität im Frakturspalt gewährleistete (Cheung et al., 2003).

Unsere Arbeitsgruppe hat kürzlich ein Verriegelungsmarknagel-Modell entwickelt. Durch Verwendung einer beidseits abgeflachten Spritzkanüle wurde erstmals eine rotationsstabile, geschlossene Osteosynthese ermöglicht und so das „mechanical environment“ innerhalb des Frakturspalts standardisiert (Holstein et al., 2007b). Im Gegensatz zu dem von Cheung und Kollegen vorgestellten Modell, das bis dato das einzige rotationsstabile Osteosyntheseverfahren an der Maus darstellte, erfordert dieses Verfahren keinen offenen Zugang und auch die Frakturierung selbst ist unter Verwendung eines Führungsdrahtes geschlossen ohne liegendes Implantat möglich (Holstein et al., 2007).

Ein alternatives Operationsverfahren an der Maus stellt das Schraubenmodell unserer Arbeitsgruppe dar. Hierbei wird am distalen Femurende sowie über dem Trochanter major der Knochen eröffnet und ähnlich dem Verriegelungsmarknagel ein Führungsdraht eingeführt. Nach Frakturierung ohne liegendes Implantat wird die sog. MouseScrew über den Führungsdraht von distal aus vorgeschoben und im proximalen Fragment verschraubt. Axiale Stabilität und Rotationsstabilität werden durch die interfragmentäre Kompression der Schraube erreicht (MouseScrew®) (Holstein et al., 2009b).

Histing und Kollegen entwickelten 2009 ein weiteres Modell zur Knochenheilung an der Maus. Um die Implantation eines intramedullären Fremdkörpers zu umgehen und eine intramembranöse Knochenheilung zu ermöglichen, wird dem Knochen von außen eine Platte angelegt und mit zwei Schrauben je Fragment befestigt. Konsekutiv kann dann der Knochen im stabilisierten Bereich osteotomiert werden (LockingMousePlate®) (Histing et al., 2009b).

Im Jahr 2008 hat unsere Arbeitsgruppe ein reproduzierbares Modell zur Untersuchung einer Pseudarthrose entwickelt (Garcia et al. 2008b). Prinzipiell wird ähnlich dem

Verriegelungsmarknagelmodell zunächst eine Spritzkanüle longitudinal von distal nach proximal durch den Femurschaft eingeführt. In einem zweiten Schritt der Operation wird das Femur von lateral her freigelegt, um einen Clip im Femur zu verankern zwischen dessen Schenkeln nachfolgend ein definierter Defekt von 1,8 mm erzeugt wird. Dieses Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit angewandt und wird genauer unter 3.1.3 beschrieben.

Garcia und Kollegen haben 2009 ein weiteres Modell entwickelt, das diesem Verfahren sehr ähnelt. Hierbei wird ein Pin auf gleiche Weise eingeführt. Nachfolgend werden jedoch anstatt des Clips mithilfe eines Führungsinstruments zwei Stifte durch den Pin bikortikal verankert, sodass der Knochen zwischen diesen osteotomiert werden kann (LockingMouseNail®) (Garcia et al., 2009).

2.3.2 Ratte

Während die Maus erst seit relativ kurzer Zeit als Tiermodell für die Untersuchung der Knochenheilung verwendet wird, sind Modelle an der Ratte schon seit längerer Zeit etabliert. Verschiedene Studien haben bisher u.a. Femur, Tibia, Schädel, Metatarsale, Radius und Ulna als Frakturlokalisierung genutzt (Hietaniemi et al., 1995) (Utvag et al., 1994).

Der große Vorteil der Ratte gegenüber der Maus liegt in der Dimension ihrer Körpermaße. Die größeren Knochen erleichtern sowohl das operative Handling, als auch die biomechanische Knochentestung. Besonders Tibia- und Femur-Frakturmodelle an der Ratte lassen sich jedoch grundsätzlich mit denen an der Maus vergleichen. Entsprechend haben sich in der Vergangenheit auch bei der Ratte stabile Fixationstechniken unter Verwendung von Implantaten wie dem Verriegelungsmarknagel, der Platte, bzw. dem Fixateur externe (Willie et al., 2011) (Wingerter et al., 2007) gegenüber instabilen Pin-Osteosynthesen durchgesetzt (Bonnarens & Einhorn, 1984).

Auch ein Modell der Pseudarthrose wurde an der Ratte vor der Maus veröffentlicht (Hietaniemi et al., 1995). Jedoch handelt es sich hierbei um ein rotationsinstabiles Modell, das dementsprechend einen großen Nachteil im Vergleich zu dem von Garcia und Kollegen publizierten Modell an der Maus aufweist.

2.3.3 Kaninchen

Neben der Ratte und Maus ist das Kaninchen die dritte Nagetier-Spezies, die für tierexperimentelle Studien der Knochenbruchheilung genutzt wird (Ashhurst et al., 1982) (Stafford et al., 1994) (Strong et al., 1992). Während sich die Maus vor allem für molekularbiologische Studien eignet, ist das Kaninchen aufgrund der Körpergröße besonders für biophysikalische Untersuchungen einsetzbar. Die verschiedenen angesprochenen Stabilisierungssysteme wie z.B. Fixateur externe, Platte und Verriegelungsmarknagel sind am Kaninchen ohne besonders großen technischen Aufwand

anzuwenden (Brighton et al., 1985) (Danckwardt-Lilieström et al., 1970) (Deibert et al., 1994) (Kaplan et al., 1985) (Terjesen & Johnson, 1986).

Im Vergleich zu größeren Säugetieren wie etwa dem Hund oder Schaf erlaubt die Körpergröße des Kaninchens die Applikation höherer Dosen kostenintensiver Substanzen. Auch wenn Kaninchen gegenüber Klein-Nagetieren in der Anschaffung, Zucht und Haltung teurer sind, so haben sie gegenüber Groß-Säugetieren einen ökonomischen Vorteil (Nunamaker 1998) (Critchlow et al., 1995).

2.3.4 Katze

Die Knochenbruchheilung der Katze wurde bis dato sowohl im Rahmen veterinärmedizinischer Therapiestudien, als auch im Rahmen von Forschungsarbeiten an Frakturmodellen untersucht (Henry et al., 1985) (Puech et al., 1990) (Toombs et al., 1985). In diesem Zusammenhang sind verschiedenste Methoden der operativen Stabilisierung, sowie der konservativen Behandlung von Frakturen beschrieben worden (Henry et al., 1985) (Puech et al., 1990).

Die Anatomie der langen Röhrenknochen der Katze, insbesondere des Femurs, begünstigt aufgrund der langen und geraden Konfiguration sowohl die Einbringung intramedullärer Implantate, als auch Platten- und Schrauben-Osteosynthesen (Toombs et al., 1985).

2.3.5 Hund

Aufgrund des großen veterinärmedizinischen Interesses an der Frakturheilung des Hundes sind viele Informationen bezüglich der Behandlung und der biologischen Heilungsabläufe von Frakturen an dieser Spezies verfügbar (Johnson & Stein, 1988). Doch auch im Rahmen tierexperimenteller Studien ist der Hund ein beliebtes Modell für die Untersuchung der Frakturheilung. Zahlreiche Frakturmodelle mit verschiedensten Techniken wurden entwickelt. So unterscheidet man z.B. Modelle mit internen und externen Stabilisierungstechniken, sowie Modelle ohne Stabilisierung (Lenehan et al., 1985) (Peter et al., 1996) (Black et al., 1985) (Chao et al., 1989) (Daum et al., 1983) (Egger et al., 1993) (Georgiadis et al., 1990) (Lewallen et al., 1984) (Roush & Wilson, 1990) (Davy & Connolly, 1982). Darüber hinaus lassen sich auch Modelle zur Untersuchung verzögerter bzw. ausbleibender Frakturheilung am Hund finden (Heckman et al., 1991) (Muller et al., 1968) (Volpon, 1994).

2.3.6 Schaf

Das Schaf ist besonders für die Entwicklung und Testung neuer Human-Implantate eine beliebte Spezies (Cheal et al., 1991) (Kirker-Head et al., 1995) (Richardson & Nunamaker, 1991) (Steen et al.,

1988) (Steen & Fjeld, 1989). Beispielsweise nutzte die Association for the Study of Internal Fixation (ASIF) wiederholt das Schaf als Versuchstier für die Untersuchung der Frakturheilung unter Verwendung von Platten- bzw. Schraubenosteosynthesen (Nunamaker & Perren, 1979) (Perren et al., 1969) (Schenk & Willenegger, 1977) (Nunamaker, 1998). Konsekutiv ist die primäre Knochenheilung am Schaf, deren Remodelingprozesse über das Havers-System erfolgen, gut beschrieben (Schenk & Willenegger, 1977).

Das Schaf stellt außerdem ein geeignetes Versuchstier zur Untersuchung der sekundären Knochenheilung nach intramedullärer Stabilisierung dar, da Schafe die behandelte Extremität früh belasten und so den erwünschten Kompressionseffekt auf die Fraktur erzeugen. Darüber hinaus finden sich Studien an Schafen mit Fokus auf Untersuchungen der verzögerten Frakturheilung (Peters et al., 2010).

Mit Blick auf ökonomische Faktoren sind die Kosten für Zucht und Haltung von Schafen als relativ hoch zu werten, sodass diese Spezies in Studien mit großen Versuchsgruppen nur schwer einsetzbar ist (Nunamaker, 1998).

2.3.7 Ziege

Im Gegensatz zum Schaf hat sich die Ziege als Versuchstier zur Untersuchung der Knochenheilung bisher nicht durchsetzen können (Curtis et al., 1995). Die Aussagekraft von konventionellen Frakturheilungsstudien an dieser Spezies ist aufgrund der hohen Inzidenz von Pathologien und Erkrankungen des Bewegungs- und Stützapparates deutlich limitiert. Beispielsweise sei an dieser Stelle die infektiöse Ziegenarthritis erwähnt (Adams et al., 1983).

2.3.8 Pferd

Das Pferd ist aufgrund des hohen Körpergewichts und der hohen Haltungs- und Zuchtkosten als Versuchstier für Frakturheilungsstudien nicht geeignet. Da das Pferd eine mangelnde Compliance aufweist, ist trotz eines hohen veterinärmedizinischen Aufwands eine suffiziente Frakturheilung häufig nicht möglich. Folglich ist der Versuch einer osteosynthetischen Frakturversorgung am Pferd eine nicht nur technisch, sondern auch veterinärmedizinisch enorme Herausforderung, die tierexperimentelle Studien an dieser Spezies nicht rechtfertigt (Nunamaker et al., 1991).

Nichtsdestotrotz ist das Pferd in der Untersuchung der Frakturheilung eingesetzt worden. Besonders unter Verwendung von internen Stabilisierungssystemen bzw. externen Fixateuren, die postoperativ eine sofortige volle Gewichtsbelastung erlauben, lassen sich Studien am Pferd finden (Nunamaker et al., 1986).

2.3.9 Primat

Primaten haben entsprechend der Phylogenese eine mit dem Menschen größtenteils vergleichbare Knochenstruktur. Doch neben den hohen Kosten für Zucht und Haltung dieser Spezies sind tierexperimentelle Studien zur Frakturheilung an Primaten vor allem aus ethischen Gründen weitestgehend obligat (Nunamaker, 1998).

2.4 Erythropoietin

Erythropoietin ist ein Glykoprotein-Hormon, das über die spezifische Interaktion mit dem Zelloberflächen-Rezeptor EPOR primär die Erythrozytenproliferation im Rahmen der Hämatopoese reguliert (Krantz, 1991). Dementsprechend zählt EPO zu den „Erythropoiesis Stimulating Agents“ (ESA).

Immuncytochemische Hybridisierungsuntersuchungen haben gezeigt, dass EPOR zudem in non-hämatopoietischen Zelltypen exprimiert wird (D'Andrea et al., 1989). Entsprechende Studien belegen, dass EPO über eine Interaktion mit EPOR auch im Rahmen der Regeneration neuronaler Verletzungen (Brines et al., 2000), sowie der Zellproliferation in verschiedenen Gewebestypen wie etwa der Niere, dem Gastrointestinaltrakt und dem Skelettmuskel eine wichtige Rolle spielt (Westenfelder et al., 1999) (Ogilvie et al., 2000) (Juul et al., 2001).

Darüber hinaus ist der EPO-Rezeptor in Endothelzellen detektiert worden (Anagnostou et al., 1994), sodass EPO eine Stimulation der Angiogenese zugesprochen wird (Anagnostou et al., 1990). Erst kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass EPO zudem einen positiven Einfluss auf die Knochenheilung hat (Holstein et al., 2007) (Garcia et al., 2011).

Im Gegensatz zu anderen hämatopoietischen Wachstumsfaktoren, die häufig in verschiedenen Organen gleichzeitig produziert werden, wird EPO hauptsächlich in der Niere gebildet (Bodó et al., 2007).

Biotechnologisch hergestelltes EPO wird heutzutage vor allem in der Behandlung der Anämie bei Dialysepatienten, sowie nach aggressiven Chemotherapiezyklen eingesetzt. Daneben erwarb sich EPO durch zahlreiche Dopingskandale - insbesondere im Radsport - den zweifelhaften Ruf eines „Dopingmittels“ (Jelkmann, 2007) (Dicato & Plawny, 2010) (Gore et al., 2003).

2.4.1 Historie

Erkenntnisgewinne über Erythropoietin - historisch auch Hämatopoietin genannt - hängen aufgrund seiner essenziellen Bedeutung für die Hämatopoese unweigerlich mit der Forschungsgeschichte des Blutes zusammen.

Die erste erfolgreiche Bluttransfusion am Menschen wurde von dem Leibarzt von Ludwig XIV Jean-Baptiste Denis und seinem Assistenten Paul Emmerez 1667 in Paris mit dem Blut eines Lammes durchgeführt. Der genaue Hintergrund der Wirkung ihrer Therapie blieb den behandelnden Ärzten jedoch verborgen (Maluf, 1954).

Einen direkten Zusammenhang zwischen verminderter Sauerstoffversorgung des Knochenmarks und der Bildung von Erythrozyten stellte erstmals Friedrich Miescher 1893 fest. Auf dieser Grundlage gab es Bestrebungen, Anämien durch gezielt induzierte Hypoxien zu therapieren (Jelkmann, 2007).

Im Jahr 1906 stellten der Franzose Paul Carnot und seine Mitarbeiterin Catherine Deflandre erstmals die Hypothese auf, dass ein humoraler Faktor die Blutbildung regle. Ihre Hypothese gründete auf Experimenten, bei denen die Transfusion von Blut anämischer Kaninchen zu einem signifikanten Erythrozytenanstieg in nicht-anämischen Tieren führte. Die beiden finnischen Nephrologen Eva Bonsdorff und Eeva Jalavisto gaben dem hierfür verantwortlichen Faktor 1948 schließlich den Namen Erythropoietin, kurz EPO (Jelkmann, 2007).

Als eigentlicher Entdecker von EPO gilt Allan Jacob Erslev, der 1953 die ersten fundierten wissenschaftlichen Publikationen veröffentlichte, durch die die Existenz von EPO zweifelsfrei bewiesen wurde (Erslev, 1953) (Erslev et al., 1953).

In der weiteren EPO-Forschung wurde Eugene Goldwasser zur Schlüsselfigur. Nachdem er und seine Arbeitsgruppe 1954 zunächst die Arbeiten Erslevs bestätigen konnten, folgten 1957 in Zusammenarbeit mit Leon Orris Jacobson der Nachweis, dass EPO in der Niere gebildet wird und 1977 die Isolierung humanen Erythropoietins aus Urin (Jacobson et al., 1957) (Miyake et al., 1977).

1983 gelang Fu-Kuen Lin die Identifizierung des humanen EPO-Gens, und im folgenden Jahr konnte eine erfolgreiche Klonierung und Expression von rekombinantem humanem EPO in *E. coli* und konsekutiv auch in Säugetierzellen verzeichnet werden (Lee-Huang, 1984) (Jacobs et al., 1985) (Lin et al., 1985). Hierdurch wurde die Produktion von rhEPO in großtechnischen Anlagen und hohen Mengen möglich.

2.4.2 Biosynthese und Struktur

Phylogenetisch gehört das Glykoprotein-Hormon EPO zur Zytokinfamilie. Erythropoietin wird zu etwa 85-90 % in den peritubulären interstitiellen Zellen der Niere gebildet. Die übrigen 10-15 % entstehen größtenteils in den Hepatozyten der Leber, jedoch wurden auch Syntheseaktivitäten in Gehirn, Milz, Hoden, Uterus und Haarfollikelzellen nachgewiesen (Jelkmann, 2004) (Bodó et al., 2007).

Die Synthese von EPO unterliegt tagesrhythmischen Schwankungen. Sie erreicht um Mitternacht ein Maximum und zeigt ein Minimum in den frühen Morgenstunden. Während der Schwangerschaft steigt der EPO-Spiegel auf das 3- bis 4-fache an (Dettmer et al., 2005) (Jelkmann, 2004).

Das menschliche EPO-Gen befindet sich auf Chromosom 7 (Position 7q21 – 7q22) und besteht aus 5,4 kb, 5 Exons und 4 Introns. Es codiert für ein PräPro-EPO-Protein, das aus 193 Aminosäureresten zusammen gesetzt ist.

Im Rahmen der Biosynthese von EPO spielt der sog. „Hypoxie-induzierte Faktor“ (HIF), ein Transkriptionsfaktor verschiedener Hypoxie-sensitiver Gene, eine Schlüsselrolle. HIF besteht aus einer im Zytoplasma vorliegenden α -Untereinheit und einer im Zellkern nachweisbaren β -Untereinheit. Beide Untereinheiten werden sauerstoffunabhängig konstant gebildet. Im normoxischen Fall wird HIF- α allerdings schnell abgebaut und ist dementsprechend kaum nachweisbar. Dieser Abbau erfolgt durch Hydroxylierung von Prolin in einer bestimmten Region des Moleküls, die als „oxygen-dependent degradation domain“ (ODD) bezeichnet wird, sodass HIF- α von pVHL, das Teil eines Ubiquitin-Ligase-Komplexes ist, erkannt und an das Proteasom weitergeleitet werden kann. Da die Aktivität der Prolyl-Hydroxylase sauerstoffabhängig ist, kann hieraus eine direkte Verbindung zwischen Sauerstoffkonzentration und Regulation der EPO-Produktion abgeleitet werden. Ist hingegen die Sauerstoffsättigung des Blutes vermindert, wirkt dies stimulierend auf die EPO-Produktion, indem HIF- α nicht hydroxyliert werden kann und folglich nicht abgebaut wird. Stattdessen wird HIF- α vom Zytoplasma in den Zellkern EPO-exprimierender Zellen transloziert. Dort bindet HIF- α an HIF- β , wodurch das Heterodimer HIF-1 entsteht. Im Nucleus findet sich eine Asparagin-Hydroxylase, die ähnlich dem zytoplasmatischen Abbauweg unter normoxischen Bedingungen eine Anlagerung von Transkriptionsfaktoren an eine C-terminale Domäne von HIF- α verhindert. Im Falle einer Hypoxie wird eine Hydroxylierung verhindert, sodass die Transkriptionsfaktoren CREB und p300 gebunden werden können. Dadurch entsteht der fertige, aus drei Elementen bestehende Proteinkomplex, der sich an die 3'-Flanke des EPO-Gens anlagert und so die Transkription einleitet. Nach abgeschlossener Transkription und ribosomaler Translation werden im Rahmen der posttranslationalen Modifikation insgesamt 28 Aminosäurereste abgespalten, wodurch schließlich humanes Erythropoietin als Endprodukt mit 165 Aminosäureresten und einer Molekülmasse von etwa 30,4 kDa entsteht (Bruick & McKnight, 2002).

Die Sekundärstruktur des Proteins besteht aus vier antiparallelen α -Helices inklusive benachbarter Schleifen. Etwa 39 % der Masse sind auf den Kohlenhydratanteil zurückzuführen, der aus einer O-

glykosidisch (an Ser 126) und drei N-glykosidisch (an Asn 24, 38, 83) gebundenen Zuckerseitenketten gebildet wird. Die Seitenketten ihrerseits besitzen mehrere Verzweigungen, die man auch als „Antennen“ bezeichnet, und setzen sich aus Mannose, Galaktose, Fucose, N-Acetylglucosamin, N-Acetylgalactosamin, sowie N-Acetylneuraminsäure zusammen (Davis et al., 1987) (Dubé et al., 1988).

Während die Aminosäuresequenz des EPO-Moleküls konstant ist, kann die Zuckerstruktur variieren. So ist die Abfolge der Monosaccharide in den Zuckerseitenketten bzw. die Anzahl der endständigen N-Acetylneuraminsäuren - trivialerweise auch Sialinsäure genannt - variabel. In diesem Zusammenhang spricht man auch von der Mikroheterogenität des EPO-Moleküls, die sowohl im nativen, als auch im rekombinanten Molekül auftreten kann (Jelkmann, 2007).

Die Sialinsäuren sind unterdessen entscheidend für die biologische Aktivität des Glykoproteins. Je höher der Sialyierungsgrad ist, desto höher ist die Aktivität und Serumhalbwertszeit des Hormons. Interessanterweise zeigen jedoch hoch-sialylierte Isoformen in *in-vitro*-Experimenten eine geringe Affinität zum EPO-Rezeptor. Konsekutiv werden asialylierte Isoformen aufgrund der hohen Rezeptoraffinität unmittelbar in der Leber durch EPOR-tragende Hepatozyten abgefangen und somit inaktiviert (Goldwasser et al., 1974) (Dubé et al., 1988). Funktionale, d.h. sialylierte Isoformen von EPO werden dagegen zusammen mit anderen ESAs schrittweise über verschiedene Wege abgebaut. Zum einen wird EPO durch andere, EPOR-tragende Körperzellen mittels rezeptorvermittelter Endozytose in Lysosomen internalisiert, weiter zerlegt und schließlich abgebaut. Zum anderen werden auch EPOR-unabhängige Abbauewege genutzt, die zwar detektiert worden sind, jedoch im Einzelnen noch einer weiteren Spezifizierung bedürfen. Weiterhin scheint eine Degradierung der ESAs im Knochenmark eine entscheidende Rolle für den Abbau von EPO zu spielen (Agoram et al., 2009).

Die Zuckerseitenketten beeinflussen darüber hinaus die Stabilität des EPO-Moleküls und üben dabei eine Schutzfunktion aus. Dementsprechend ist deglykosyliertes EPO deutlich empfindlicher gegenüber pH- und temperaturinduzierten Denaturierungen als natürliches, glykosyliertes EPO (Narhi et al., 1991). Teilweise findet sich auch eine Sulfatierung der N-glykosidischen Zuckerseitenketten, jedoch ist die Funktion dieser Sulfatierung bisher noch unklar (Kawasaki et al., 2001).

2.4.3 Funktion und Wirkmechanismus

Die Serumkonzentration des aktiven EPO-Moleküls im gesunden Menschen liegt zwischen 6 und 32 mU/ml, die Plasmahalbwertszeit zwischen 2 und 13 Stunden (Foley, 2008).

Erythropoietin wirkt an allen Zellen, die einen EPO-Rezeptor ausbilden. Dies sind vor allem die Vorläuferzellen der Erythrozyten im Knochenmark Erythroid Burst Forming Unit (BFU-E) und Erythroid Colony Forming Unit (CFU-E). Sie zeigen die stärkste Expression des EPOR. Es wurden jedoch auch non-hämatopoietische Zellen mit Expression des EPOR nachgewiesen. Diese finden sich beispielsweise in der Niere, im Gehirn, im Herzen, sowie im Skelettmuskel (Brines et al., 2000)

(Westenfelder et al., 1999) (Ogilvie et al., 2000). Auch retinale Zellen und Chondrozyten bilden den EPOR aus (Foley, 2008) (Holstein et al., 2007).

Der EPO-Rezeptor ist ein spezifischer, transmembranöser Rezeptor und gehört zur Familie der Zytokin-Rezeptoren, deren strukturelle Gemeinsamkeiten in zwei oder mehr Immunglobulin-ähnlichen Domänen, vier gleich angeordneten Cystein-Resten und einer bestimmten extrazellulären Sequenz bestehen (D'Andrea et al., 1989) (Jelkmann, 2007).

Die extrazelluläre Bindung von EPO an EPOR führt im Rahmen einer Konformationsänderung zur Homodimerisierung des Rezeptors, die auf intrazellulärer Seite zur Transphosphorylierung bestimmter Moleküle der Tyrosin-Proteinkinase 2 führt. Hierbei handelt es sich um ein rezeptorgekoppeltes Enzym, das zur Janus-Familie gehört und auch kurz als JAK-2 bezeichnet wird (Foley, 2008).

Im nachfolgenden Schritt werden EPOR-assoziierte Tyrosinreste, die sich in der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors befinden, phosphoryliert. Auf diese Weise können solche Bereiche als Kopplungsstation für SH2-Domänen weiterer Signalproteine dienen. Nach Kopplung dieser Signalproteine kommt es zu einer JAK-2-vermittelten Phosphorylierung und somit zu einer Weiterleitung der Signaltransduktion. Diese Kopplung setzt verschiedene Signaltransduktionskaskaden in Gang, an denen insgesamt 94 Proteine beteiligt sind. Ein Beispiel hierfür ist das Signaltransduktionsprotein STAT-5, das im Rahmen einer Signalkaskade in den Zellkern transloziert wird, um dort Zielgene, die zum Überleben der Zelle, sowie zum Zellwachstum und zur Zelldifferenzierung beitragen, zu aktivieren. Andere Mechanismen, die durch EPOR aktiviert werden, involvieren die Phosphatidylinositol-3-Kinase und die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (Foley, 2008).

Diese Mechanismen der intrazellulären Wirkung von EPO über das Signalkaskadensystem können weitestgehend auf non-hämatopoietische Zellen übertragen werden (Foley, 2008).

Eine wichtige Funktion von EPO basiert auf der Inhibition des programmierten Zelltods. Die Apoptosehemmung erfolgt zum einen durch eine EPO-induzierte Transkription anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie (Silva et al., 1999). Zum anderen werden pro-apoptotische Proteine wie z.B. Caspase 9, Bad oder Glykogen-Synthase-Kinase-3 β durch Phosphorylierung inaktiviert (Kashii et al., 2000). Die anti-apoptotische Wirkung von EPO führt im Knochenmark zusammen mit anderen Wachstumsfaktoren zu einer Proliferation und Differenzierung pluripotenter Stammzellen und stimuliert so die Erythropoese (Foley, 2008). In non-hämatopoietischen Geweben wie z.B. der Niere, dem Gastrointestinaltrakt, dem Skelettmuskel, oder dem Knorpelgewebe kommt es entsprechend der weiter oben angeführten Mechanismen aufgrund der Apoptosehemmung zu einem relativen Anstieg der mitotischen Aktivität (Westenfelder et al., 1999) (Ogilvie et al., 2000) (Juul et al., 2001) (De Spiegelaere et al., 2010).

Im Gehirn - insbesondere in der Region des Hippocampus - wurden spezifische Bindungsstellen für EPO nachgewiesen, deren Stimulation einen positiven Effekt auf kognitive Fähigkeiten hat. So konnte im Mausmodell eine EPO-assoziierte erhöhte neuronale Aktivität nachgewiesen werden (Adamcio et al., 2008).

EPO werden darüber hinaus zytoprotektive Eigenschaften zugesprochen. Diese Wirkung ist vermutlich auf die α -Helix B im EPO-Molekül (AS-Sequenz 58-82) zurückzuführen und wird über einen heterokomplex geformten EPOR sowie CD131 vermittelt (Brines et al., 2008). Zellprotektive Eigenschaften von EPO zeigen sich insbesondere im Rahmen von ischämischen Zuständen im Bereich des Herzens, des Gehirns, der Niere, der quergestreiften Muskulatur, sowie der Leber (Sepodes et al., 2006) (Patel et al., 2004) (Contaldo et al., 2007) (Burger et al., 2009). Diese Schutzfunktion ist vermutlich auf eine eNOS-vermittelte gefäßdilatierende Wirkung von EPO auf mikrovaskulärer Ebene zurückzuführen. Dadurch wird der Blutfluss verbessert und das Ischämieareal ausreichend mit Sauerstoff versorgt, sodass das Ausmaß einer Gewebsnekrose signifikant reduziert wird (Rezaeian et al., 2010).

Hinsichtlich der angiogenen Wirkung von EPO konnten signifikante Parallelen zur VEGF-vermittelten Angiogenese aufgezeigt werden (Anagnostou et al., 1990) (Kertesz et al., 2004) (Ylä-Herttuala et al., 2007). So wird die Expression sowohl von VEGF, als auch von EPO über analoge Mechanismen durch Hypoxie stimuliert. Zudem zeigen die beiden entsprechenden Gene große Ähnlichkeiten in Bezug auf Struktur und Enhancer Elemente (Goldberg et al., 1988) (Steinbrech et al., 2000). Aufgrund dieser Ähnlichkeiten zwischen EPO und VEGF rückte auch der Einfluss von EPO auf die Frakturheilung in den Fokus der Forschung (Ferguson et al., 1999). So konnte 2007 eine Verbesserung der frühen Frakturheilung durch eine exogene Beeinflussung des EPOR-Signalwegs im Rahmen tierexperimenteller Studien nachgewiesen werden (Holstein et al., 2007).

2.5 Zielsetzung

Ziel der Dissertationsarbeit war es, zu untersuchen, ob EPO die gestörte Frakturheilung stimuliert.

Die entsprechenden Informationen sollten durch tierexperimentelle Versuche an der Maus nach einem bewährten Tiermodell gewonnen werden.

2.6 Fragestellung

Die durchgeführten tierexperimentellen Studien sollten die Frage beantworten, inwieweit ein Unterschied zwischen der Heilungstendenz einer Pseudarthrose, die durch EPO behandelt wird, gegenüber der Heilungstendenz einer Pseudarthrose ohne entsprechende Behandlung besteht.

Trotz des großen allgemeinen Interesses an EPO, das durch die vielfältigen Wirkmechanismen an verschiedenen Zelltypen begründet ist, liegen bislang keine Informationen bezüglich des Potenzials von EPO in der der Behandlung von Pseudarthrosen vor.

Die Nullhypothese lautet:

„Die Behandlung von Pseudarthrosen durch EPO (Verum) führt an der Maus zu keiner verbesserten Knochenheilung im Vergleich zu unbehandelten Pseudarthrosen (Kontrollen).“

Die Knochenheilung wurde nach zwei und zehn Wochen mit radiologischen, histologischen und proteinbiochemischen Methoden am postmortalen Knochen-Präparat untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Intervention

3.1.1 Versuchsprotokoll

Der Tierversuch wurde von der zuständigen Behörde (Dezernat 5, Saarpfalz-Kreis, 66424 Homburg / Saar) unter dem AZ H1 2.4.2. Versuchsvorhaben 03/2009 genehmigt und am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg / Saar nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Für die Versuchsdurchführung wurden 78 Mäuse verwendet. Diese Anzahl wurde auf sechs verschiedene Gruppen aufgeteilt (Tab. 1). 40 Tiere wurden mit EPO (500 IE/kg Körpergewicht) behandelt, 38 weiteren Tieren wurde zur Kontrolle 0,9 % Natriumchloridlösung appliziert. Die Auswertung der Knochen erfolgte nach zwei Wochen, bzw. zehn Wochen mit radiologischen, histologischen und proteinbiochemischen Methoden.

	2 Wochen PS+			10 Wochen PS+			10 Wochen PS-		
	<i>Histo</i>	μ CT	WB	<i>Histo</i>	μ CT	WB	<i>Histo</i>	μ CT	WB
EPO	n=9	n=9	n=3	n=11	n=11	n=3	n=11	n=11	n=3
Kontrolle	n=10	n=10	n=3	n=8	n=8	n=3	n=11	n=11	n=3

Tab. 1: Versuchsprotokoll. In zwei Gruppen wurde das Periost auf einer Strecke von 2 mm proximal und distal des Defekts reseziert (PS+), wohingegen in einer Gruppe die Verletzung des Periosts vermieden wurde (kein Periost-Stripping; PS-). Die Auswertungsmethoden beinhalteten Histologie (Histo), Mikrocomputertomographie (μ CT), und Western Blot (WB). Für die histologische und mikrocomputertomographische Auswertung konnten dieselben Gewebeproben verwendet werden.

3.1.2 Tiermodell

Als Versuchstiere dienten ausgewachsene CD-1 Mäuse mit einem Körpergewicht von 30-40 g. Die Tierhaltung der Mäuse erfolgte im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes unter klimatisierten Raumbedingungen (Lufttemperatur: 22-24 °C, relative Luftfeuchtigkeit 60 %) bei 12-stündigem Tag- / Nachtrhythmus. Wasser sowie Standarddiätfutter (Altromin 1320, Altromin, Lage, Deutschland) wurden in Pelletform ad libitum bereitgestellt.

Für die tierexperimentelle Untersuchung der Knochenheilung wurde in der aktuellen Studie ein standardisiertes Pseudarthrosemodell an der Maus verwendet (Garcia et al., 2008b).

3.1.3 Operation

Die Operationen wurden im Tieroperationssaal des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes an allen Versuchstieren in gleicher standardisierter Weise durchgeführt.

Die Versuchstiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 2 % Xylazin (2 mg/kg Körpergewicht) und Ketamin (75 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Zudem erhielten die Tiere am Operationstag und am ersten postoperativen Tag eine Analgesierung mit 0,05 ml Carprofen®.

Nach Narkotisierung der Tiere wurde das jeweils rechte Bein und der rechte Hüftbereich enthaart und die Haut mit Softasept® desinfiziert (Abb. 2). Im weiteren Verlauf erfolgte medial der Patella eine etwa 4 mm lange Hautinzision (Abb. 3). Danach wurde die Kniegelenkscapsel eröffnet und die Patella nach lateral luxiert. Über die Fossa intercondylaris wurde der Markraum mit einem Mikrobohrer ($\varnothing = 0,5$ mm; 8000 Umdrehungen / Minute) eröffnet (Abb. 4). Anschließend wurde eine Spritzkanüle ($\varnothing = 0,45$ mm) über den Bohrkanal vollständig in den Markraum eingebracht, um die Markraumlänge zu bestimmen (Abb. 5). Die entsprechende Längenmarkierung wurde konsekutiv auf eine Spritzkanüle ($\varnothing = 0,55$ mm) übertragen. An dieser Stelle wurde die Kanüle über eine Strecke von etwa 0,8 cm abgeflacht. Im weiteren Verlauf der Operation wurde die abgeflachte Spritzkanüle über den Bohrkanal in den Markraum bis in das proximale Ende des Femurs eingebracht (Abb. 6) und nach Bildwandler-Dokumentation der Pinimplantation am Eingang des Bohrkanals gekürzt (Abb. 7). Anschließend wurde der Pin vollständig im Knochen versenkt (Abb. 8), die Patella reponiert und die Gelenkscapsel, sowie die Haut mit 5-0 Prolene® Nähten verschlossen (Abb. 9 und 10).

In einem zweiten Operationsschritt wurde die Maus auf die linke Seite umgelagert und der rechte Oberschenkel von lateral durch eine etwa 5 mm lange Hautinzision eröffnet (Abb. 11). Die lateralen Muskelzüge wurden stumpf nach ventral und dorsal verlagert (Abb. 12), sodass das Femur frei lag und ein Klemmchen unter dem Knochen hindurch geschoben werden konnte (Abb. 13).

Alle folgenden Operationsschritte wurden nun unter zehnfacher Vergrößerung des Operationsmikroskops durchgeführt.

Das fixierte Femur wurde zunächst distal etwa am Ende des zweiten Drittels des Schafts mit einem Mikrobohrer ($\varnothing = 0,5$ mm; 8000 Umdrehungen / Minute) lateral des Pins und medial der Substantia compacta perforiert (Abb. 14). Als Clip diente eine Spritzkanüle ($\varnothing = 0,45$ mm), die U-förmig vorgebogen wurde. Nach Implantation des Clips im Bereich des distalen Bohrlochs wurde das proximale Bohrloch in gleicher Technik entsprechend der Cliplänge angelegt (Abb. 15 und 16). Nun konnte der Clip vollständig implantiert werden. Im Anschluss wurden die Arme des Clips nach innen

gebogen, um die Stabilität des Clips zu erhöhen (Abb. 17). Abschließend wurde ein Knochendefekt in einer Länge von 1,8 mm mit zwei Fräsköpfen ($\varnothing = 0,25$ mm und 1,8 mm) zirkulär um den Pin herum erzeugt (Abb. 18 und 19). Nach erneuter Bildwandler-Kontrolle wurde das Operationsfeld mit einer 0,9 % Natriumchlorid-Lösung ausgespült, und die Wunde mit 5-0 Prolene® Nähten verschlossen (Abb. 20 und 21).

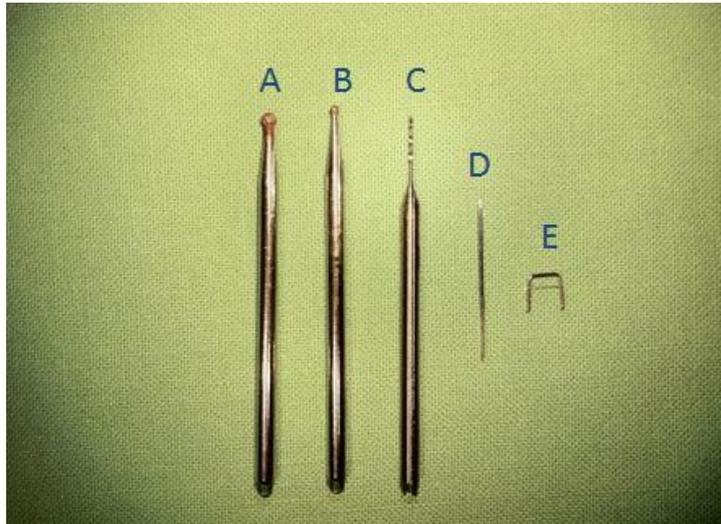


Abb. 1: Operationsinstrumente. Der Defektspace wurde mit zwei Fräsköpfen (A und B) erzeugt. Nach Vorbohrung mit einem Mikrobohrer (C) wurden der Pin (D) und der Clip (E) in den Knochen implantiert.



Abb. 2: Fixierung des Beines während der Operation.



Abb. 3: Hautschnitt über einen medio-patellaren Zugang und Sicht auf das Ligamentum patellae.



Abb. 4: Markraumeröffnung im Bereich der Fossa intercondylaris nach Luxation der Patella.



Abb. 5: Bestimmung der Markraumlänge mit einer Spritzkanüle.



Abb. 6: Einbringung der abgeflachten Spritzkanüle.

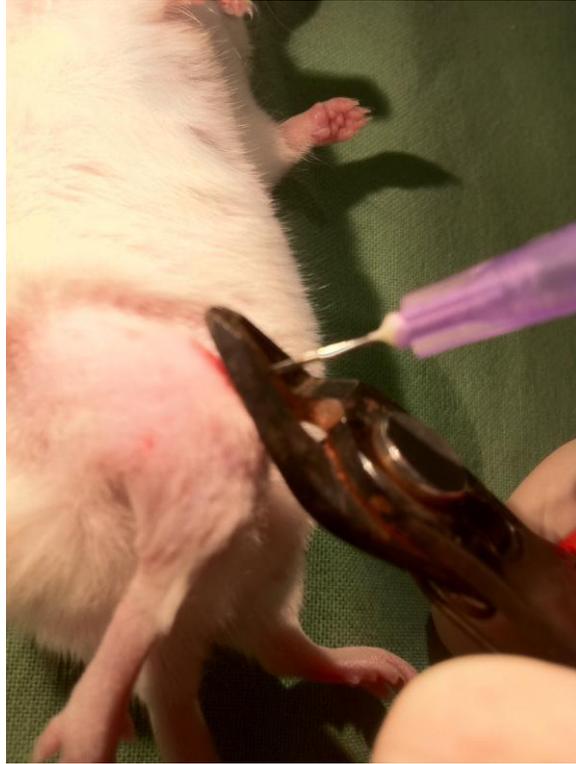


Abb. 7: Kürzung der Spritzkanüle entsprechend der zuvor angebrachten Längenmarkierung.

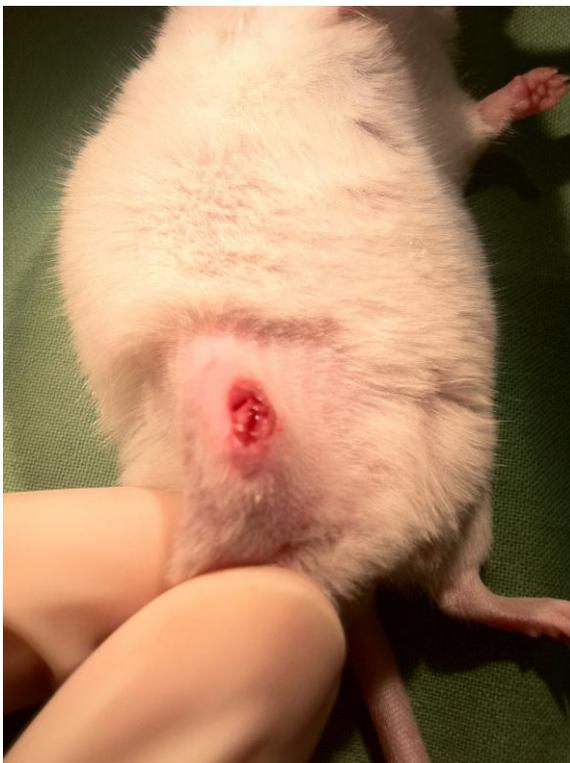


Abb. 8: Aufsicht auf die Fossa intercondylaris nach Einbringung der Spritzkanüle.

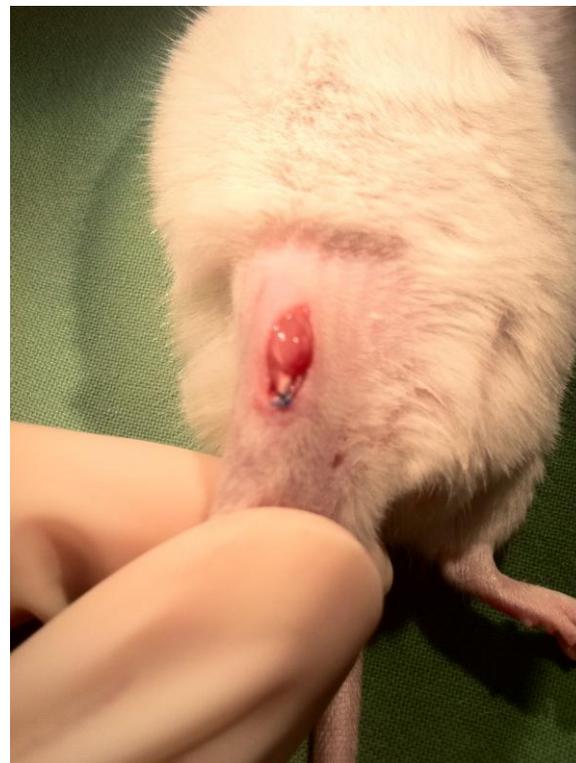


Abb. 9: Reposition und Refixation der Patellarsehne mit Verschluss des Kniegelenks.



Abb. 10: Hautnaht mit 5-0 Prolene®.



Abb. 11: Eröffnung des lateralen Zugangsweges.



Abb. 12: Stumpfe Freilegung des Femurs.



Abb. 13: Eröffnung des Operationsfeldes zur Clip-Implantation.

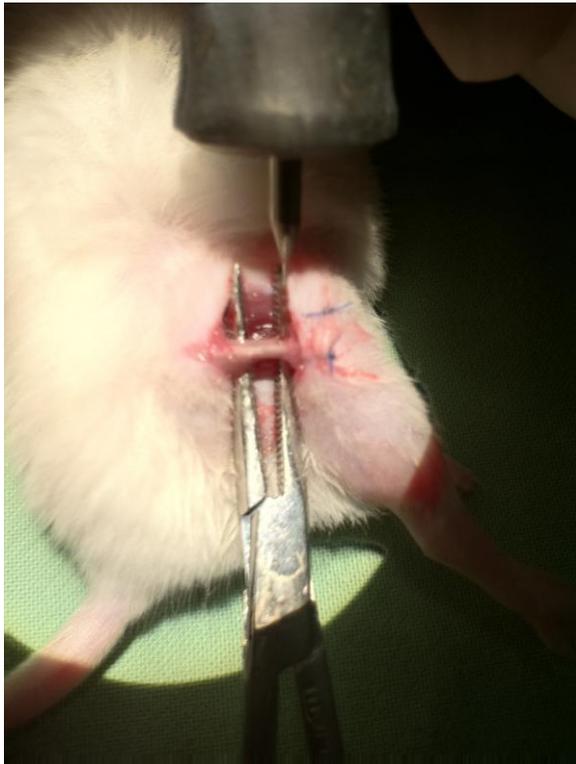


Abb. 14: Bohrung des distalen Bohrlochs für den Clip.

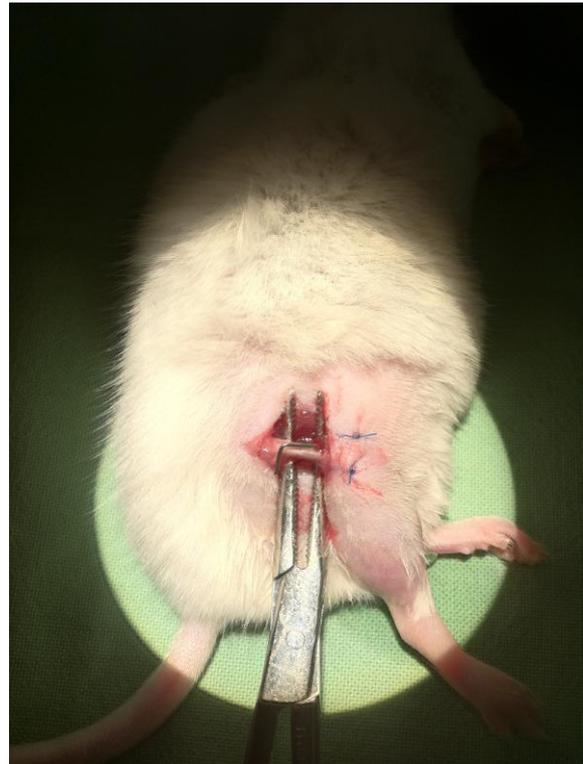


Abb. 15: Distale Clip-Implantation und Messung für das proximale Bohrloch.



Abb. 16: Bohrung des proximalen Bohrlochs.



Abb. 17: Vollständige Clip-Implantation und Biegung der dorsalen Enden nach innen.

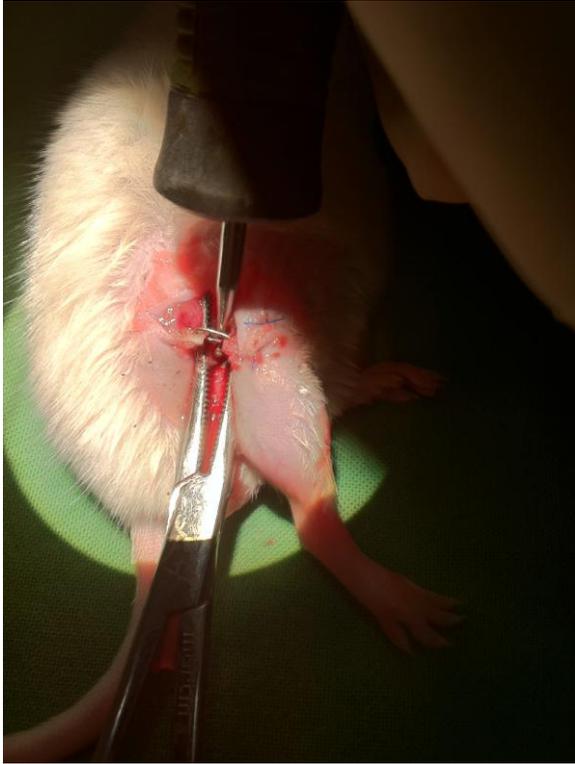


Abb. 18: Knochen mithilfe der Fräsen zirkulär um den Pin osteotomieren.

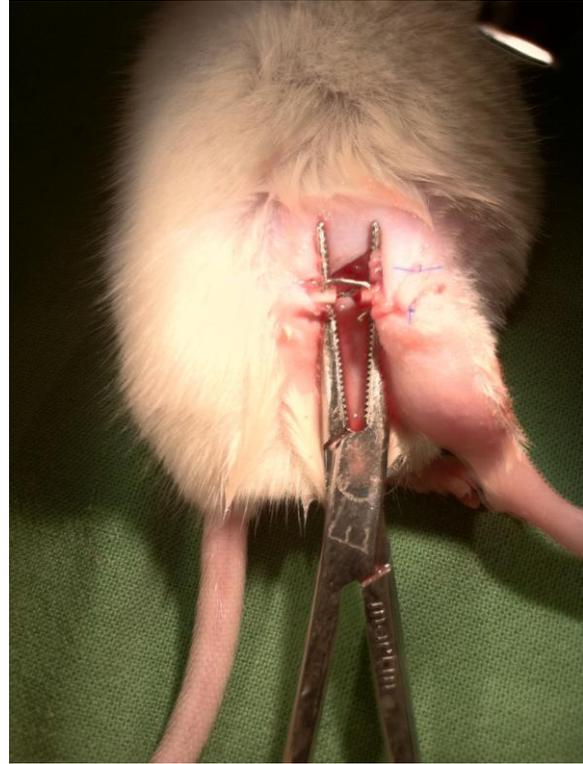


Abb. 19: Defektspalt von 1,8 mm induziert.



Abb. 20: Spannungsfreie Adaptation der Muskulatur mit 5-0 Prolene®.



Abb. 21: Hautnaht mit 5-0 Prolene®.

3.1.4 Medikamentenapplikation

Je nach Versuchsgruppe wurde den Tieren täglich über einen Zeitraum von zwei bzw. zehn Wochen 0,2 ml Erythropoietin (500 IE/kg Körpergewicht) bzw. die gleiche Menge 0,9 % Natriumchloridlösung intraperitoneal appliziert. Beide Substanzen wurden bei 4 °C gelagert.

3.1.5 Tötung der Tiere

Die Versuchstiere wurden zwei bzw. zehn Wochen post operationem durch interperitoneale Applikation einer Überdosis Pentobarbital getötet.

3.1.6 Blutentnahme

Nach Injektion der Überdosis Phenobarbital wurde das Tier in Rückenlage an den Extremitäten 4-Punkt-fixiert. Über eine mediane Laparotomie wurde die Vena cava inferior freigelegt. Mit einer zuvor heparinisierten Spritze (1 ml) und einer 45° abgewinkelten Spritzkanüle wurde unter zehnfacher Vergrößerung etwa 1 ml Blut aus der Mündungsstelle der Vv. iliacae communes in die V. cava inferior entnommen.

3.1.7 Präparation der Knochen

Unmittelbar nach Tötung der Tiere wurde das operierte Femur explantiert und für die weiteren Untersuchungen präpariert. Hierzu wurde das Femur im Hüft- und Kniegelenk exartikuliert und der entsprechende Weichteilmantel reseziert. Die distale Epiphyse des operierten Femurs wurde osteotomiert, so dass der Pin ohne Verletzung des Knochendefektareals entfernt werden konnte. Im Anschluss wurden die nach innen gebogenen Abschnitte der Arme des Clips gekürzt, sodass der Clip nach ventral gezogen und ohne Beschädigung des Knochendefektareals entfernt werden konnte.

3.2 Zielkriterien und Auswertung

3.2.1 Blutwerte

Um den Einfluss der täglichen EPO-Applikation auf die Erythropoiese zu untersuchen, wurde die Hämoglobinkonzentration der Tiere nach zwei- und zehnwöchiger Behandlung gemessen und mit der unbehandelten Kontrollen verglichen. Hierzu wurde das Blut direkt nach der Entnahme in das

Blutgasanalysegerät Rapidlab 855 (Bayer, Leverkusen, Deutschland) überführt und die Daten maschinell ermittelt.

3.2.2 Radiologie

3.2.2.1 Röntgen

Unmittelbar vor Tötung der Versuchstiere wurden im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes unter Narkose seitliche Röntgenaufnahmen der operierten Femora angefertigt (Faxitron® MX-20 Cabinet X-ray System, Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, USA). Hierbei wurde eine Belichtungszeit von 0,01 s bei einer Stromstärke von 10 A und einer Spannung von 25 kV gewählt. Die Röntgenaufnahmen wurden mit der eingebauten Kamera und einer Auflösung zwischen 10 lp/mm bis 50 lp/mm aufgenommen und digitalisiert.

Folgende Kriterien wurden analysiert:

- Implantatlage
- Knochenstellung
- Knöcherner Defektdurchbauung

3.2.2.2 Mikrocomputertomographie

Die mikrocomputertomographische Auswertung der Femora fand in den Räumlichkeiten der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen (AO) in Davos, Schweiz, im Rahmen des CRC-Austausch-Programms zwischen Davos und Homburg statt.

Nach Explantation und Präparation der Femora wurden die Knochen zunächst kryokonserviert und zur μ CT-Untersuchung aufgetaut. Während der mikrocomputertomographischen Analyse wurden die Präparate in 4 % gepuffertem Formalin fixiert und gelagert.

Die Knochenheilung im Defektspaltspalt wurde mit dem μ CT-Gerät μ CT 40 der Firma Scanco Medical (Brüttisellen, Schweiz) untersucht. Das Gerät besitzt eine Röntgenröhre, die einen Röntgenstrahl mit Kegelstrahlgeometrie und einer Fokusgröße von 5 μ m erzeugt und mit einem Kathodenstrom von 114 μ A und einer Beschleunigungsspannung von 70 keV arbeitet. Die Integrationszeit wurde auf 200 ms gesetzt. Zur Untersuchung wurde die Längsachse des Femurs senkrecht zur Achse des Röntgenstrahls positioniert. Die analysierten Knochenvolumina wurden aus zweidimensionalen CT-Bildern rekonstruiert, die aus 1024x1024 Pixel-Matrizen aus 500 Projektionen erzeugt wurden. Hierbei handelt es sich um ein standardisiertes Rückprojektionsverfahren (Garcia et al., 2010).

Nachdem der Knochen in Position gebracht worden war, wurde eine Übersichtsaufnahme erstellt, um die zu analysierende Region zwischen den Bohrlöchern des Clips zu bestimmen. Die Bilder wurden in einer 3D Abfolge mit einer isotropischen Voxelgröße von 12 μm gespeichert.

Zur Beurteilung des Knochendefekts wurden folgende Zielparameter berechnet:

- Volumen und Dichte des niedrig mineralisierten Knochengewebes im Defektspalt
- Volumen und Dichte des hoch mineralisierten Knochengewebes im Defektspalt
- Trägheitsmoment [mm^4] der Verknöcherung

Die zu analysierende Region („Region of Interest“ / ROI), die durch die Größe des Defektspalts bestimmt wurde, wurde nach Erstellung der Projektionen exakt konturiert, um vorbestehendes kortiales Knochengewebe aus der Berechnung auszuschließen. In diesem Zusammenhang wurde eine dreidimensionale Gauss'sche Filterfunktion zur Reduktion von Geräuschen verwendet.

Um eine Differenzierung zwischen niedrig und hoch mineralisiertem Knochengewebe, sowie dem jeweiligen Volumen und der Dichte zu ermöglichen, wurde die ROI basierend auf dem Histogramm aller Grauwerte unterteilt. Grauwerte zwischen 14,5 % und 36 % des maximalen Grauwertes wurden dem niedrig mineralisierten Knochengewebe zugeordnet, während Grauwerte zwischen 36 % und 70 % den kortikalen Knochen definierten. Diese Werte basieren auf vorangegangenen vergleichbaren Untersuchungen mit o.g. μCT -Gerät, sowie histologischen Schnitten (Gabet et al., 2004) (Gröngroft et al., 2009).

Das Trägheitsmoment für niedrig und hoch mineralisierten Knochen innerhalb der ROI ergab sich aus einer in das μCT -Gerät eingebauten, voreingestellten Auswertungsmethode. Anhand der mikrocomputertomographisch ermittelten Grauwerte wurden die biomechanischen Eigenschaften des Knochendefekts berechnet. Basierend auf der Konturierung und der weiteren o.g. Einstellungen der ROI wurde hierbei der polare Torsionswiderstand [mm^4] (PMOI) ermittelt. Der PMOI beschreibt allgemein den Widerstand von Kreisquerschnitten und geschlossenen Kreisringquerschnitten gegen Torsion und ist proportional zum Quadrat des Abstands (mm^2) eines Flächenelements zur Torsions- bzw. Biegeachse, sowie zum Flächeninhalt eines Flächenelements (mm^2). Daraus ergibt sich die Einheit mm^4 . Folglich ist der PMOI abhängig von der Geometrie des zu untersuchenden Gegenstandes und wird zudem von den Elastizitätsmodulen der Stoffe beeinflusst.

Bezogen auf die Knochenheilung bedeutet dies, dass zu Beginn des Heilungsprozesses eine geringere Mineralisierung des Kallusgewebes durch eine höhere Querschnittsgeometrie kompensiert wird, während im weiteren Verlauf des Heilungsprozesses die steigende Mineralisierung des Knochens die Resorption des Kallusgewebes bedingt (Abb. 22).

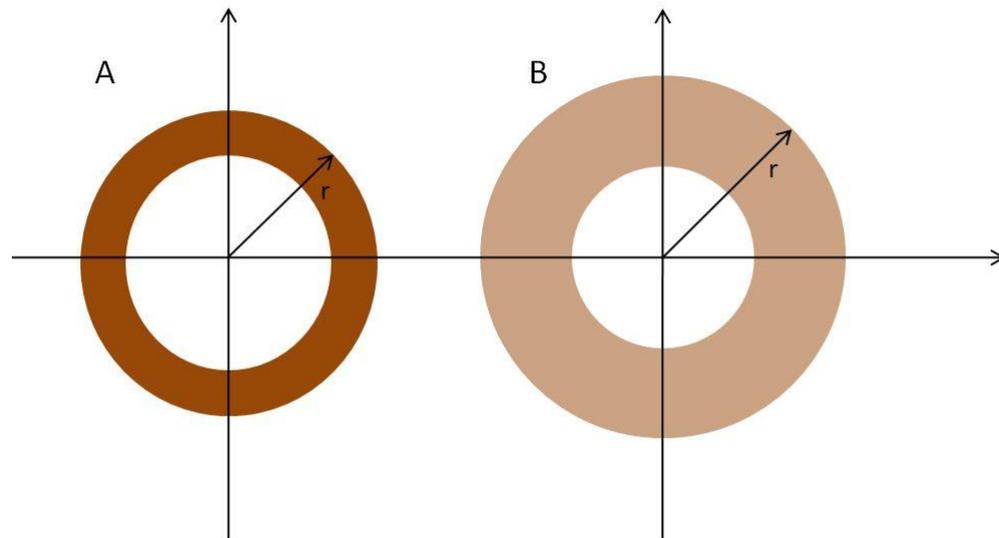


Abb. 22: Polarer Torsionswiderstand. Bild A skizziert den Querschnitt eines gesunden, hoch mineralisierten Knochens, der einen bestimmten Radius r zur Torsionsachse aufweist. Niedrig mineralisiertes Kallusgewebe (B) kompensiert die geringere Rotationssteifigkeit während der Heilungsphase durch eine höhere Querschnittsgeometrie bzw. einen größeren Abstand zur Torsionsachse (größerer Radius r).

3.2.3 Histomorphometrie

Die histomorphometrische Auswertung der Femora erfolgte in den Räumlichkeiten des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie am Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg / Saar.

Die Histomorphometrie diente der quantitativen Analyse der Größe, sowie der Gewebezusammensetzung des Kallus. Eine eventuelle Überbrückung des Defektspalts wurde mithilfe eines Punktesystems evaluiert.

Nach Analyse der Femora im μ CT-Gerät wurden die Knochen für 48 Stunden in 4 % gepuffertem Formalin fixiert und für weitere 4 Wochen in 10 % EDTA bei 4 °C entkalkt. Die entkalkten Präparate wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils eine Stunde mit 70 %, 80 %, 90 %, sowie viermal eine Stunde mit 100 % Alkohol) entwässert. Im Anschluss wurden die Proben dreimal für jeweils eine Stunde mit Xylol behandelt, um das Gewebe paraffingängig zu machen. Abschließend wurden die Knochen für eine weitere Stunde in heißem Paraffin eingebettet.

Im weiteren Verlauf wurden 5 μ m dicke Schnittpräparate in sagittaler longitudinaler Schnittführung angefertigt und nach der Masson-Goldner-Methode gefärbt. Hierzu wurden die Präparate zunächst 1-2 min in Weigerts Eisenhämatoxylin gefärbt, im Folgenden 10-15 min unter fließendem Wasser gespült und anschließend weitere 5-7 min in Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin gefärbt. Nach Spülung mit 1 % Essigsäure erfolgte die Behandlung mit Molybdätosphorsäure-Orange bzw. Wolframatophosphorsäure-Orange bis zur völligen Entfärbung des Bindegewebes. Nach erneuter

Spülung mit 1 % Essigsäure wurden die Präparate mit Lichtgrün für 5 Minuten gegengefärbt und abschließend mit 1 % Essigsäure für 5 Minuten ausgewaschen sowie in Isopropanol entwässert.

Mit einem 1,25 x Weitwinkelobjektiv (Olympus BX60 Microscope, Olympus, Tokio, Japan) wurden die histologischen Schnitte aufgenommen und digitalisiert (Zeiss Axio Cam and Axio Vision 3.1, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Die Auswertung der Bilder erfolgte mithilfe des Bildauswertungsprogramms ImageJ Analysis System (NIH, Bethesda, USA). Folgende Parameter wurden bestimmt (Abb. 23):

- Kallusfläche [mm^2]
- Fläche des knorpeligen Anteils innerhalb des Kallus [mm^2]
- Fläche des bindegewebigen Anteils innerhalb des Kallus [mm^2]
- Fläche des knöchernen Anteils innerhalb des Kallus [mm^2]

Als Zielwerte wurden gemäß der Empfehlungen der American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR) (Parfitt et al., 1987) folgende Parameter berechnet:

- Knöcherne Kallusfläche / Kallusfläche (B.Cl.Ar / Cl.Ar [mm])
- Knorpelige Kallusfläche / Kallusfläche (Cg.Cl.Ar / Cl.Ar [mm])
- Bindegewebige Kallusfläche / Kallusfläche (Fb.Cl.Ar / Cl.Ar [mm])

Zudem wurde die Überbrückung des Defektspalts in Abhängigkeit der Gewebeart nach einem Punktesystem bewertet. Hierbei wurden beide Korticalices unabhängig voneinander auf eine knöcherne Überbrückung [2 Punkte], eine knorpelige Überbrückung [1 Punkt] oder eine bindegewebige Überbrückung [0 Punkte] evaluiert. Folglich wurden vier Punkte als Zeichen einer kompletten knöchernen Ausheilung des Defekts und null Punkte als Zeichen einer persistenten Pseudarthrose gewertet.

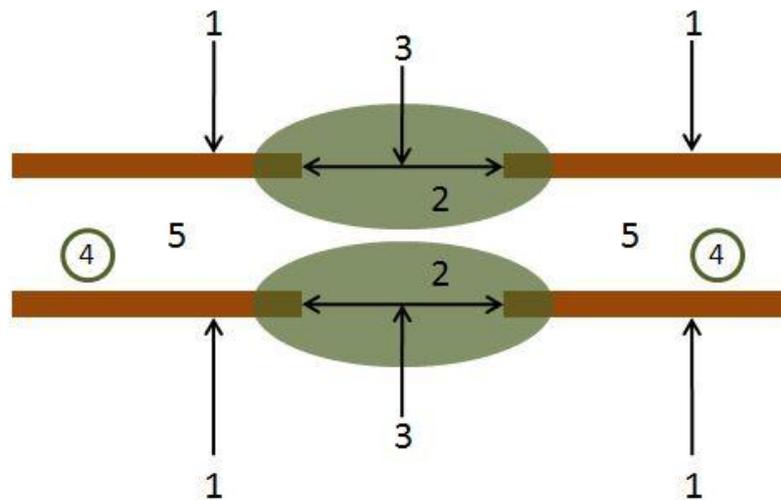


Abb. 23: Schematische Skizze der histologischen Auswertungsparameter. Zwischen den Kortikales (1) befindet sich die Zone des Defektspalts (2), die aus Binde-, Knorpel- und Knochengewebe bestehen kann. (3) beschreibt die Defektweite. (4) kennzeichnet die Löcher des Clips im Markraum (5).

Im Rahmen der quantitativen Analyse der Gefäßneubildung wurden zudem die histologisch sichtbaren Gefäße mithilfe eines Rastersystems in vier repräsentativen Bereichen innerhalb des Defektareals gezählt.

3.2.4. Immunhistologie

In der vorliegenden Arbeit wurde in Tieren mit Periost-Stripping die Expression des Proliferationsmarkers PCNA sowie des angiogenen und osteogenen Wachstumsfaktors VEGF mit immunhistologischen Methoden untersucht.

Die bereits für die histomorphometrische Auswertung verwendeten Präparate wurden zunächst entparaffiniert. Hierzu wurden die Proben mit Xylol 3 x 3 min behandelt und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe von absolutem bis 70 % Ethanol für jeweils 2-3 min rehydriert. Nach dem Spülen in A. dest. wurde die endogene Peroxidase durch 10-minütiges Einlegen der Präparate in 3 % H₂O₂ geblockt. Als Blockierungsreagenz diente eine Mischung aus 1 ml PBS und 30 µl Normalserum. 75 µl dieser Mischung wurden dann auf das Präparat pipettiert, das konsekutiv 30 min in feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

Nach erneuter Spülung mit A. dest. wurden die Schnitte angedaut. Hierzu wurden die Proben in 200 ml Citratpuffer pH 6,0 bei 700 W in einer großen Küvette gekocht. Während und nach dem Kochen wurde A. dest. aufgefüllt. Nach 25-minütiger Abkühlung bei Raumtemperatur wurden die Schnitte zunächst mit A. dest. und anschließend mit PBS gespült.

Im Folgenden wurden die entsprechenden Primärantikörper gegen PCNA (monoklonaler Maus-Antikörper; 1:200; Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark), sowie VEGF (monoklonaler Maus-Antikörper; 1:25; Abcam, Cambridge, UK) appliziert. Nach Auflegen des Deckglases wurden die Schnitte in feuchter Kammer bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte 3 min in PBS gespült und nach Ausguss des Puffers erneut mit PBS für 5 min gespült.

Im nächsten Schritt wurden 100 ml des Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpers gegen den jeweiligen Primärantikörper im Verhältnis von 1:200 aufgetragen und 30 min in feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Sowohl für VEGF, als auch für PCNA handelte es sich hierbei um einen Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-Maus-IgG Antikörper (Abcam, Cambridge, UK). Die nachfolgende Spülung entsprach dem bereits oben beschriebenen Vorgehen nach Inkubation des Primärantikörpers.

Im Anschluss wurde Diaminobenzidin (DAB) angesetzt, das als Chromogen diente. Hierzu wurde 1 ml A. dest. mit je einer Tablette DAB und H_2O_2 gemischt. 100 μ l dieses Reagenz wurden aufgetragen und 3 min in feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben 5 min mit A. dest. gespült.

Zur Gegenfärbung der Schnitte diente die Methode Hämalan nach Meyer. Die Schnitte wurden in A. dest. gespült und 8 min unter fließendem Leitungswasser gewässert. Nach erneuter Spülung mit A. dest. wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (von 70 % bis 100 % Ethanol) für je 3 min entwässert. Abschließend wurden die Proben erneut für 3 x 3 min mit Xylol behandelt und die Schnitte schließlich eingedeckt.

Im Rahmen der quantitativen Analyse wurden die positiv gefärbten Zellen des jeweiligen Zelltyps gezählt und in Relation zur Gesamtzahl des entsprechenden Zelltyps ausgewertet. Hierbei wurden mithilfe eines Rastersystems vier repräsentative Areale innerhalb des Defektareals untersucht.

3.2.5. Western Blot

Das Western- oder Immunoblotting dient als quantitative Messmethode der Ermittlung von Proteinexpressionen in entsprechenden Gewebeprobe. Hierbei werden die extrahierten Proteine zunächst in einer vertikalen Gelmatrix durch ein elektrisches Feld aufgetrennt. Im Anschluss werden die resultierenden Proteinbanden in einer zweiten horizontalen Elektrophorese vom Gel auf eine proteinbindende Membran transferiert. Mithilfe von Enzym-konjugierten Antikörpern werden die spezifischen Targetproteine markiert und die Stärke der Proteinexpression mit einer lichtemittierenden Enzym-Substrat-Reaktion auf einem Röntgenfilm detektiert.

Um die Proteinexpression verschiedener Proben bei gleicher Beladung der Geltaschen und gleichmäßigem Gel-Membran-Transfer quantitativ vergleichen zu können, werden die gewonnenen Proteinextrakte auf eine identische Proteinkonzentration eingestellt. Die Absicherung dieser Quantifizierbarkeit wird durch das „Mitführen“ eines ubiquitär konstitutiv exprimierten Proteins (i.d.R. α -Tubulin oder β -Actin) gewährleistet. Entsprechend muss dieses Protein in allen zu vergleichenden Ansätzen die gleiche Expressionsstärke aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des Proliferationsmarkers PCNA, des angio- und osteogenen Wachstumsfaktors VEGF, des Angiopoietin-Rezeptors Tie-2, sowie der NO-Synthasen iNOS und eNOS mittels Western-Blot-Analyse nach zwei- und zehnwöchiger Frakturheilung quantifiziert. Vor Tötung der Tiere wurde hierzu nach kallusschonender Pin- und Clip-Entfernung der Weichteilmantel um die Femur-Diaphyse unter Narkose reseziert und der Kallus explantiert. Entsprechend bestanden die Kallusproben aus Knochen, Knorpel und Bindegewebe. Um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern, wurden die Proben sofort nach Explantation bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ konserviert.

Die kryokonservierten Proben wurden zunächst mit je $150\text{ }\mu\text{l}$ vorgekühltem Lyse-Puffer, einem Proteaseinhibitor-Cocktail (1:75; Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und 100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (1:75; PMSF) homogenisiert. Danach wurden die Proben für 30 Minuten auf Eis inkubiert und für weitere 30 min mit 13000 U/min (16000 x G) bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert (Biofuge Fresco, Kendro, Hanau, Deutschland). Abschließend wurden die Überstände abpipetiert und Aliquots der gewonnenen Proteinextrakte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kryokonserviert.

Die aus der Proteinextraktion gewonnenen Proben wurden mit A. dest. auf 1:10 verdünnt. Unmittelbar vor der Protein-Bestimmung wurde folgende Messlösung angesetzt:

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

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

Nach einer erneuten Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption des entstandenen Farbkomplexes bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen A. dest. photometrisch gemessen (GeneQuant pro, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). Die Proteinkonzentration wurde mithilfe einer BSA-Standardkurve ermittelt. Hierbei wurde für jedes Proteinextrakt eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Extrakte wurden auf gleiche Proteingehalte ($13,5\text{ }\mu\text{g}/15\text{ }\mu\text{l}$)

eingestellt und mit Laemmli-Puffer (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) (Laemmli, 1970) für 2 x 5 min in kochendem Wasserbad denaturiert.

Die Western-Blot-Analysen wurden als eindimensionale SDS-PAGE unter diskontinuierlichen Bedingungen nach Laemmli (Laemmli, 1970) mit einer Acrylamidkonzentration von 5 % im Sammelgel und einer Acrylamidkonzentration von 10 % im Trenngel durchgeführt (30 % Acrylamid / Bis Solution; 29:1; BioRad, München, Deutschland) (Tab. 2)

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

Tab. 2: Zusammensetzung der für die Western-Blot-Analysen verwendeten Sammel- und Trenngele.

Die Gele wurden in einer vertikalen Flachapparatur mit Gießstand für Minigele (Mini-Protean II, BioRad, München, Deutschland) entsprechend der Anleitung des Herstellers gegossen. Nach Einfüllen der Trenngellösung wurden vorsichtig ca. 200 µl Isopropanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) überschichtet, um eine Hemmung der Polymerisation an der Geloberfläche durch Luftsauerstoff zu verhindern und die Ausbildung einer glatten Trennfläche zwischen Trenn- und Sammelgel zu gewährleisten. Nach einer einstündigen Polymerisationszeit wurde nach Entfernung des Alkohols das Sammelgel in die Apparatur gegossen. Unmittelbar im Anschluss wurden die entsprechenden Geltaschen, die ein maximales Beladungsvolumen von 15 µl zulassen, mit einem Teflonkamm (15 Zähne; 4 mm x 1 cm x 0,75 mm; BioRad, München, Deutschland) gesetzt. Nach einer Stunde Polymerisierung wurden 15 µl der Proben in die Geltaschen aufgetragen. Im weiteren Verlauf wurden die Proteine in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Mini-Protean II, BioRad, München, Deutschland) entsprechend ihrer Molekülgröße in einem TRIS / Glycinpuffer (0,125 M TRIS Base, 0,96 M Glycin, 0,5 % SDS; Roth, München, Deutschland) getrennt. Um die erforderliche Niederspannung zu gewährleisten, wurde ein spezielles Netzgerät für stabilisierten Gleichstrom (Power Pac, BioRad, München, Deutschland) verwendet. Hierbei wurde eine anfängliche Spannung von 100 V angelegt, um die Proteine im Sammelgel zu konzentrieren. Diese wurde nach 15 Minuten auf 140 V für etwa 1 Stunde zur Passage des Trenngels erhöht. Nachdem die „blaue Lauffront“ der Bromphenolblau-Bande des Sample Buffers das untere Gelende erreicht hatte, wurde die Auftrennung der Proteine beendet. Im Anschluss wurden die Gele aus der Kammer genommen und in einem

Transferpufferbad (12 mM TRIS Base, 96 mM Glycin; Roth, Karlsruhe, Deutschland) für das weitere Membranblotting äquilibriert.

Zur Durchführung des sogenannten Tankblottings im Rahmen des horizontalen Proteintransfers wurde eine Mini-Trans-Blotkammer (BioRad, München, Deutschland) verwendet. Um Oberflächenladungen auszugleichen, wurde die PVDF-Membran (0,2 µm Porengröße, BioRad, München, Deutschland) für 20 Sekunden in Methanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gebadet und sofort mit destilliertem Wasser abgespült. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Äquilibration in Transferpuffer (12 mM TRIS Base, 96 mM Glycin in destilliertem Wasser). Für den Blotsandwich wurden die äquilibrierte PVDF-Membran und das Gel luftblasenfrei zwischen zwei Transferpuffer-getränkten Schwämmen mit entsprechendem Filterpapier (Whatman, Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland) in die Blotkassette eingelegt. Die verschlossene Sandwichkassette wurde so in der Blotkammer ausgerichtet, dass der Stromfluss einen Proteintransfer vom Gel zur Membran gewährleistete. Zur Beibehaltung einer gleichmäßig niedrigen Temperatur wurden ein sog. Eis-Spacer und ein Magnetrührer verwendet. Nach Auffüllung der Blotkammer mit Transferpuffer wurde über 2 Stunden ein stabilisierender Gleichstrom (Anfangsstromstärke 800 mA / 2 Gele) bei konstanter Spannung (50 V) angelegt. Die proteinbeladene Membran wurde über Nacht in TBS-T-Puffer (1,5 mM TRIS Base pH 7,5, 1 % NaCl, 0,01 % Tween 20 (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in destilliertem Wasser) bei 4 °C zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

Die Detektion der Targetproteine erfolgte über eine spezifische Antikörperfärbung der membrantransferierten Proteine. Alle Handhabungen zur Antikörperfärbung der Membranen wurden auf einem Horizontalschüttler (Heidolph Polymax 1040, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) durchgeführt. Die über Nacht in TBS-T aufbewahrten Membranen wurden vor der Saturierung noch dreimal mit TBS-T gewaschen. Die Membran wurde in 5 % Lösung aus Milchpulver (Blotting Grade Blocker non-fat dry milk, BioRad, München, Deutschland) und TBS-T für 30 Minuten inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach drei weiteren Waschschrritten mit TBS-T wurden die entsprechenden Primärantikörper nach einem jeweils unterschiedlichen Zeitschema bei Raumtemperatur inkubiert (Tab. 3).

Antikörper	Klon / Spezies	Bezugsquelle	Verdünnung / Inkubation
<i>PCNA</i>	C-1 Maus	DAKO Cytomation, Hamburg, Deutschland	1:1000 / 4h RT
<i>iNOS</i>	C-1 Maus	Abcam, Cambridge, UK	1:200 / über Nacht bei 4 °C + 4h RT
<i>eNOS</i>	C-1 Maus	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	1:250 / über Nacht bei 4 °C + 4h RT

<i>Tie-2</i>	C-1 Maus	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland	1:500 / 4h RT
<i>VEGF</i>	C-1 Maus	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland	1:250 / über Nacht bei 4 °C + 4h RT
<i>α-Tubulin</i>	C-1 Maus	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	1:1000 / 4h RT

Tab. 3: Primärantikörper für die Western-Blot-Analysen.

Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit unterschiedlich stark verdünnten Sekundärantikörpern (Tab. 4):

Primär-Ak	Sekundär-Ak	Bezugsquelle des Sekundär-Ak	Verdünnung / Inkubation
<i>PCNA</i>	Schaf-anti-Maus-IgG- POD	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland	1:5000 / 1,5h RT
<i>iNOS</i>	Esel-anti-Kaninchen- IgG-POD	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland	1:5000 / 1,5h RT
<i>eNOS</i>	Esel-anti-Kaninchen- IgG-POD	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland	1:5000 / 1,5h RT
<i>Tie-2</i>	Esel-anti-Ziege-IgG- POD	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland	1:5000 / 1,5h RT
<i>VEGF</i>	Esel-anti-Kaninchen- IgG-POD	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland	1:5000 / 1,5h RT
<i>α-Tubulin</i>	Schaf-anti-Maus-IgG- POD	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland	1:5000 / 1,5h RT

Tab. 4: Sekundärantikörper für die Western-Blot-Analysen.

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

Die entsprechenden Signale der behandelten Membranen wurden auf Röntgenfilmen (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) detektiert und visualisiert. Als interner Standard wurde zur Kontrolle der Proteinbeladung und des Proteintransfers der monoklonale α -Tubulin-Antikörper verwendet. Als eines der höchst-konservierten eukaryotischen Proteine mit konstanter intrazellulärer Verteilung im Zytoskelett eignet sich α -Tubulin als Proteinkonzentrationsstandard. Konsekutiv wurde die densitometrisch ermittelte optische Dichte auf gleiche α -Tubulin-Konzentrationen korrigiert.

Die Röntgenfilme wurden mit einem Gel-Dokumentationssystem (Gel Doc, BioRad, München, Deutschland) und einem entsprechenden Quantifizierungsprogramm (Quantity One-Gel Doc, BioRad, München, Deutschland) ausgewertet. Die quantitative Analyse der Proteinmuster erfolgte durch densitometrische Bestimmung der Lichtabsorption, indem die optische Dichte der Banden über die Fläche ihrer Ausdehnung analysiert wurde. Die ermittelten Daten wurden abschließend über den internen α -Tubulin-Standard korrigiert.

3.3. Statistik

Alle statistischen Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Nach Überprüfung der Normalverteilung wurden die Daten der einzelnen Versuchsgruppen mit einseitiger ANOVA bzw. einem Student-Newman-Keuls-Test miteinander verglichen. Für Mehrfachvergleiche wurde eine Bonferroni-Abgleichung durchgeführt. Die Statistik wurde mithilfe des SigmaStat Software Package (Jandel, San Rafael, USA) durchgeführt. Um signifikante Unterschiede anzuzeigen, wurde ein p-Wert von $< 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 Postoperativer Verlauf

Die Versuchstiere wurden unmittelbar nach der Operation bis zum völligen Wiedererlangen des Bewusstseins, sowie im Rahmen der täglichen Injektionen während der gesamten Standzeit von zwei bzw. zehn Wochen beobachtet und auf pathologische Verhaltensmuster hin untersucht.

Als postoperative Ausschlusskriterien dienten ein nachgewiesener Knochen- oder Weichteilinfekt bzw. weitere pathologische Veränderungen der operierten Extremität, eine signifikante Gewichtsabnahme, sowie eine makroskopisch oder radiologisch erkennbare Implantatdislokation.

Die angebotene Futterdiät wurde sowohl präoperativ, als auch postoperativ in adäquater Menge aufgenommen.

Während die Tiere zunächst direkt postoperativ eine Schonhaltung des operierten Beines aufwiesen, konnte nach etwa 1-2 Tagen eine Aufbelastung des osteotomierten Femurs beobachtet werden und konsekutiv ein dem präoperativen Zustand vergleichbares physiologisches Verhalten ohne wesentliche erkennbare Beeinträchtigung des Bewegungsablaufs oder äußere Schmerzzeichen dokumentiert werden.

4.2 Makroskopischer Befund

Alle Tiere wurden im Rahmen der Blutentnahme und der nachfolgender Explantation der operierten Femora post mortem auf eventuelle Pathologien hin untersucht. Bei der makroskopischen Untersuchung wurde insbesondere auf die femoro-patellaren und femoro-tibialen Gelenkverhältnisse, die Beinmuskulatur, sowie die Osteotomielokalisation geachtet. Es fanden sich bei keinem der Tiere Hinweise auf Patella- oder Kniegelenksluxationen, Infekte, Wundheilungsstörungen oder Muskelatrophien bzw. andere postoperative Ausschlusskriterien.

Darüber hinaus wiesen alle in die Studie aufgenommenen Tiere in der makroskopischen Begutachtung während der Explantation eine korrekte Lage des intramedullär verlaufenden Pins sowie des Clips und einen festen Sitz derselben auf.

Nach Resektion des Weichteilmantels und Entfernung zunächst des Pins und nachfolgend des Clips wurde die Überbauung des Osteotomiespalts begutachtet. Hierbei zeigte sich nach zweiwöchiger Standzeit sowohl in den EPO-behandelten Tieren als auch in den Kontrolltieren eine schlaaffe Überbrückung des Knochendefekts ohne deutlich erkennbare Kallusformation. Makroskopisch musste

bei allen Tieren ungeachtet der Behandlung mit EPO von einer bestehenden Pseudarthrose ausgegangen werden.

Nach zehnwöchiger Standzeit konnte hinsichtlich der Qualität des Kallus in EPO-behandelten Tieren makroskopisch teilweise eine festere Überbrückung des Osteotomiespalts und demzufolge ein vergleichsweise größerer Anteil an hartem Kallus im Vergleich zu Kontrolltieren beobachtet werden.

4.3 Blutwerte

In den Blutanalysen zeigte sich nach zwei sowie nach zehn Wochen in EPO-behandelten Tieren ein signifikant erhöhter Hämoglobinwert. EPO-behandelte Tiere mit einer Standzeit von zwei Wochen zeigten eine mittlere Hämoglobinkonzentration von $14,5 \pm 0,8$ g/dl gegenüber einer mittleren Hämoglobinkonzentration von $11,0 \pm 0,3$ g/dl in Kontrollen. Nach einer Standzeit von zehn Wochen zeigte sich ein mittlerer Hämoglobinwert von $21,9 \pm 0,8$ g/dl bei Tieren, die mit EPO behandelt worden waren versus einem mittleren Hämoglobinwert von $12,4 \pm 0,2$ g/dl in der entsprechenden Kontrollgruppe. Somit waren die Hämoglobinkonzentrationen sowohl nach 2 Wochen als auch nach 10 Wochen in EPO-behandelten Tieren signifikant höher als in Kontrolltieren (Abb. 24).

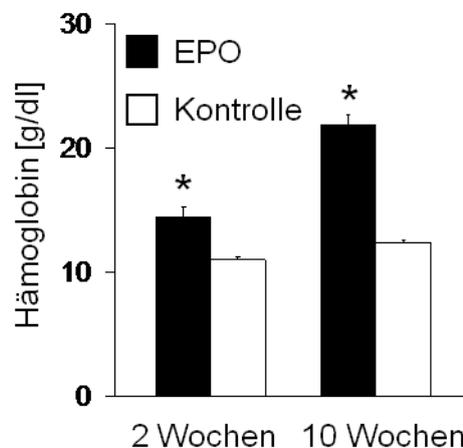


Abb. 24: Hämoglobinkonzentrationen in EPO-behandelten Tieren (schwarze Balken) und Kontrollen (weiße Balken) nach 2 und 10 Wochen. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar (* $p < 0,05$ versus der zugehörigen Kontrollgruppe).

4.4 Radiologie

4.4.1 Röntgen

Die röntgenologische Auswertung der Knochenbruchheilung erfolgte anhand der Röntgenübersichtsaufnahmen des operierten Femurs, die zum einen direkt postoperativ, sowie zwei bzw. zehn Wochen nach der Operation angefertigt wurden. Somit konnten die korrekte Implantatlage und weitere Ausschlusskriterien zu Beginn und am Ende der Versuchsdauer überprüft werden (Abb. 25).

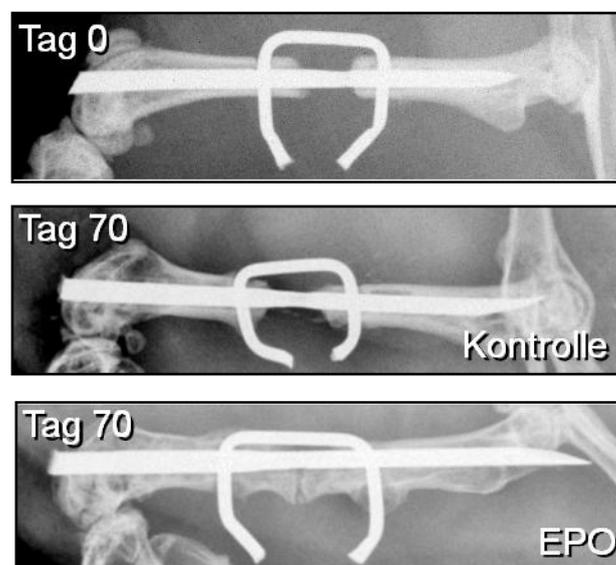


Abb. 25: Röntgenaufnahme eines osteotomierten Mäusefemurs mit einem segmentalen Defekt von 1,8 mm, der mit der Pin- / Clip-Technik stabilisiert wurde (obere Abbildung). Nach 10 Wochen zeigte dieses Modell in Kontrolltieren eine Pseudarthroserate von 100 % (mittlere Abbildung), wohingegen eine EPO-Behandlung über den gleichen Zeitraum dazu in der Lage war, eine knöcherne Überbrückung des Osteotomiespalts zu erzielen (untere Abbildung).

4.4.2 Mikrocomputertomographie

Zur Auswertung im Rahmen der mikrocomputertomographischen Untersuchungen kamen das Volumen des hoch bzw. niedrig mineralisierten Knochens im Osteotomiespalt, die Knochendichte des hoch bzw. niedrig mineralisierten Knochens im Osteotomiespalt, sowie der aus den Volumen- und Dichtewerten abgeleitete polare Torsionswiderstand als biomechanischer Parameter.

Nach einer Standzeit von zwei Wochen zeigten EPO-behandelte Tiere ein mittleres Volumen an hoch mineralisiertem Knochen von $0,015 \pm 0,004 \text{ mm}^3$. Kontrolltiere wiesen im Vergleich dazu ein mittleres

Volumen hoch mineralisierten Knochens von $0,006 \pm 0,002 \text{ mm}^3$ auf. Hieraus resultiert für die EPO-behandelten Tiere ein signifikant höheres Volumen an hoch mineralisiertem Knochen als für die Kontrolltiere ($p < 0,05$) (Abb. 27 und 29).

In Tieren, die über einen Zeitraum von zehn Wochen mit EPO behandelt worden waren und ein Periost-Stripping erhalten hatten, zeigte sich ein mittleres Volumen an hoch mineralisiertem Knochen von $0,452 \pm 0,085 \text{ mm}^3$. Die entsprechende Kontrollgruppe wies ein mittleres Volumen hoch mineralisierten Knochens von $0,176 \pm 0,053 \text{ mm}^3$ auf. Hieraus resultiert für die EPO-Gruppe im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe ein signifikant höheres Volumen hoch mineralisierten Knochens ($p < 0,05$) (Abb. 26 und 28).

Die dritte Gruppe wurde ebenfalls täglich mit EPO über einen Zeitraum von zehn Wochen behandelt, doch wurde bei diesen Tieren kein Periost-Stripping durchgeführt. Diese Versuchsgruppe wies ein mittleres Volumen hoch mineralisierten Knochens von $0,546 \pm 0,104 \text{ mm}^3$ auf. Die Versuchstiere der entsprechenden Kontrollgruppe zeigten ein mittleres Volumen hoch mineralisierten Knochens von $0,287 \pm 0,064 \text{ mm}^3$. Hieraus ergibt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen ($p < 0,05$) (Abb. 26 und 28).

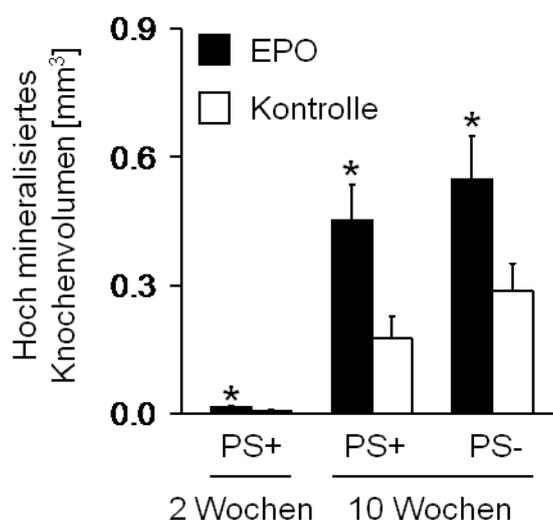


Abb. 26: Volumen in mm^3 des hoch mineralisierten Knochens in EPO-behandelten Tieren (schwarze Balken) und Kontrollen (weiße Balken) mit bzw. ohne Periost-Stripping (PS+ und PS-) nach 2 und 10 Wochen. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar (* $p < 0,05$ versus der zugehörigen Kontrollgruppe).

Das Volumen niedrig mineralisierten Knochens in EPO-behandelten Tieren mit einer Standzeit von zwei Wochen betrug $0,103 \pm 0,024 \text{ mm}^3$. Die entsprechende Kontrollgruppe zeigte nach zwei Wochen ein mittleres Volumen niedrig mineralisierten Knochens von $0,065 \pm 0,010 \text{ mm}^3$. Demzufolge zeigte sich zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied im Volumen niedrig mineralisierten Knochens ($p > 0,05$) (Abb. 27 und 28).

In Tieren, denen EPO über einen Zeitraum von zehn Wochen bei zusätzlichem Periost-Stripping appliziert wurde, zeigte sich ein Volumen niedrig mineralisierten Knochens im Osteotomiespalt von $0,423 \pm 0,097 \text{ mm}^3$. Das Volumen niedrig mineralisierten Knochens betrug in der entsprechenden Kontrollgruppe $0,360 \pm 0,124 \text{ mm}^3$. Zusammenfassend zeigte sich zwischen den beiden Versuchsgruppen auch hier kein signifikanter Unterschied im Volumen niedrig mineralisierten Knochens ($p > 0,05$) (Abb. 27 und 28).

EPO-behandelte Tiere ohne Periost-Stripping wiesen im Gegensatz dazu nach zehn Wochen ein signifikant erhöhtes Volumen niedrig mineralisierten Knochens im Vergleich zu der entsprechenden Kontrollgruppe auf ($0,715 \pm 0,131 \text{ mm}^3$ versus $0,337 \pm 0,143 \text{ mm}^3$; $p < 0,05$) (Abb. 27 und 28).

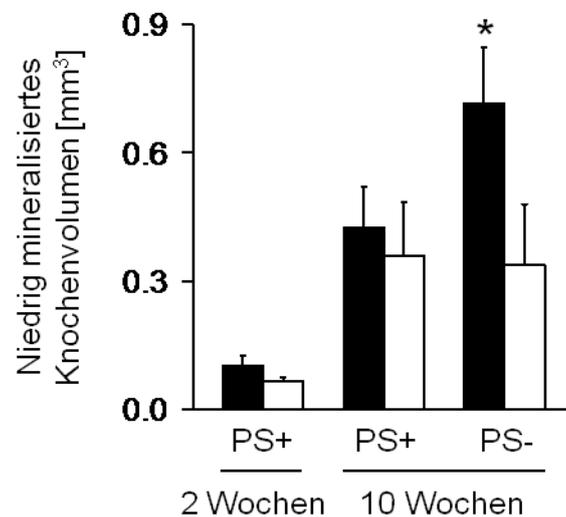


Abb. 27: Volumen in mm^3 des niedrig mineralisierten Knochens in EPO-behandelten Tieren (schwarze Balken) und den jeweiligen Kontrollen (weiße Balken) mit bzw. ohne Periost-Stripping (PS+ und PS-) nach 2 und 10 Wochen. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar (* $p < 0,05$ versus der zugehörigen Kontrollgruppe).

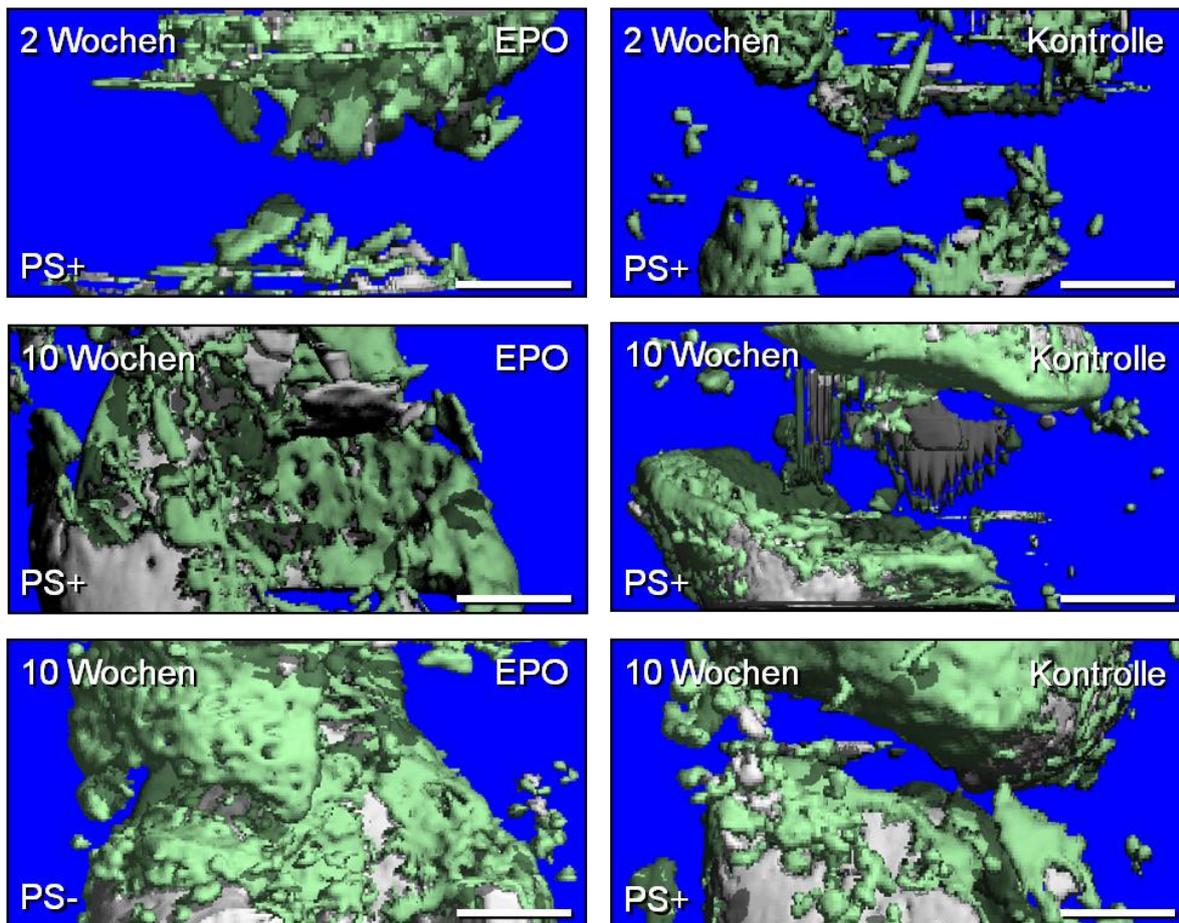


Abb. 28: Dreidimensionale Darstellung des Osteotomiespalts EPO-behandelter Tiere (linke Bildhälfte) im Vergleich zu Kontrolltieren (rechte Bildhälfte) 2 (obere Bildreihe) bzw. 10 (mittlere und untere Bildreihe) Wochen postoperativ. In Tieren der unteren Bildreihe wurde auf ein Periost-Stripping verzichtet (PS-), wohingegen in Tieren der oberen und mittleren Bildreihe das Periost auf einer Strecke von 2 mm proximal und distal des Defekts reseziert wurde (PS+). In Grau ist hoch mineralisierte Knochensubstanz dargestellt, in Grün zeigt sich niedrig mineralisierte Knochensubstanz. Der Maßstabsbalken zeigt eine Distanz von 0,5 cm an.

In zwei Tieren, die über einen Zeitraum von zehn Wochen mit EPO behandelt wurden, konnte mikrocomputertomographisch eine komplette knöcherne Überbrückung des Osteotomiespalts festgestellt werden (Abb. 29).

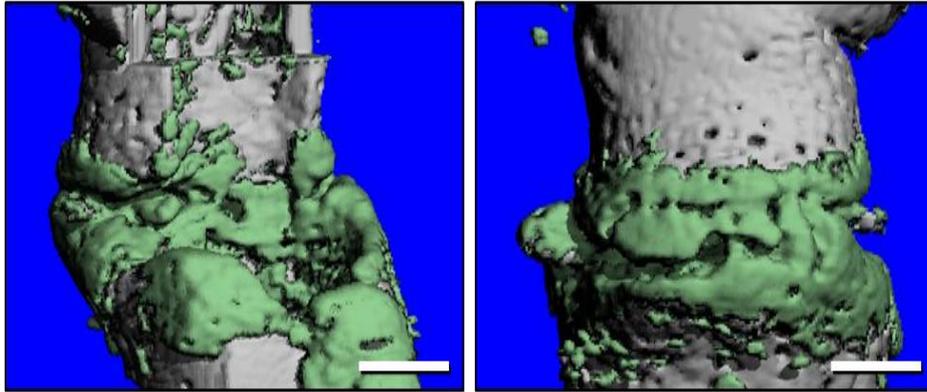


Abb. 29: Knöcherne Überbrückung des Osteotomiespalts in zwei Versuchstieren, die über 10 Wochen mit EPO behandelt wurden. Der Maßstabsbalken zeigt eine Distanz von 0,5 cm an.

Neben dem Kochenvolumen wurde zudem die Knochendichte im Defektspalt untersucht (Abb. 30 und 31).

EPO-behandelte Tiere mit einer Standzeit von zwei Wochen wiesen eine mittlere Dichte hoch mineralisierten Knochens von $1210 \pm 19 \text{ mg HA/cm}^3$ auf, während die mittlere Dichte niedrig mineralisierten Knochens bei $518 \pm 13 \text{ mg HA/cm}^3$ lag. Hoch mineralisierter Knochen der Kontrolltiere zeigte eine mittlere Dichte von $1226 \pm 26 \text{ mg HA/cm}^3$, während niedrig mineralisierter Knochen eine mittlere Dichte von $545 \pm 12 \text{ mg HA/cm}^3$ aufwies. Dies bedeutet, dass die zweiwöchige EPO-Behandlung nicht zu einem signifikanten Unterschied in der Dichte hoch und niedrig mineralisierten Knochens führte (p jeweils $> 0,05$).

Für EPO-behandelte Tiere mit Periost-Stripping zeigte sich nach 10 Wochen verglichen mit Kontrollen ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Dichte hoch mineralisierten Knochens ($1124 \pm 18 \text{ mg HA/cm}^3$ versus $1118 \pm 24 \text{ mg HA/cm}^3$; $p > 0,05$). Auch hinsichtlich der Dichte niedrig mineralisierter Knochensubstanz ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen EPO-behandelten Tieren und Kontrollen ($618 \pm 9 \text{ mg HA/cm}^3$ versus $565 \pm 33 \text{ mg HA/cm}^3$; $p > 0,05$).

Im Gegensatz dazu wiesen EPO-behandelte Tiere ohne Periost-Stripping nach 10 Wochen eine signifikant höhere Dichte hoch mineralisierten Knochens auf, als Kontrollen ($1142 \pm 24 \text{ mg HA/cm}^3$ versus $1098 \pm 10 \text{ mg HA/cm}^3$; $p < 0,05$). Kein signifikanter Unterschied zeigte sich in der Dichte niedrig mineralisierten Knochens ($606 \pm 16 \text{ mg HA/cm}^3$ versus $609 \pm 8 \text{ mg HA/cm}^3$; $p > 0,05$).

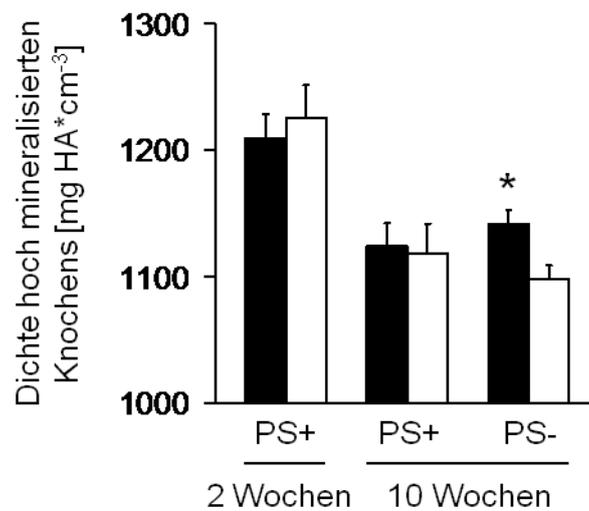


Abb. 30: Dichte in mg HA/cm³ hoch mineralisierten Knochens im Defektspalt EPO-behandelter Tiere (schwarze Balken) und der jeweiligen Kontrollen (weiße Balken) mit bzw. ohne Periost-Stripping (PS+ und PS-) nach 2 und 10 Wochen. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar (* $p < 0,05$ versus der zugehörigen Kontrollgruppe).

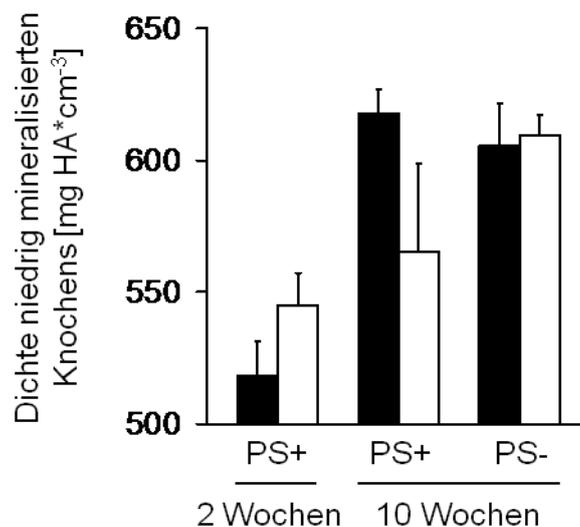


Abb. 31: Knochendichte in den Abschnitten des Defektspalts mit niedrig mineralisiertem Knochen. Die schwarzen Balken repräsentieren die EPO-Gruppen, die weißen Balken die jeweilige Kontrollgruppe. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar.

Die Berechnung der biomechanischen Eigenschaften des Gewebes innerhalb des Osteotomiespalts erfolgte anhand der ermittelten Grauwerte aus dem μ CT-Datensatz. Diesbezüglich steht der polare Torsionswiderstand (PMOI) als wichtigster Parameter im Vordergrund. Er beschreibt die Rotationssteifigkeit des Defektspalts.

Gemäß des makroskopischen Befunds zeigte sich in der Gruppe mit einer Standzeit von zwei Wochen kein signifikanter Unterschied des PMOI zwischen EPO-behandelten Tieren und Kontrollen ($0,035 \pm 0,009 \text{ mm}^4$ versus $0,026 \pm 0,005 \text{ mm}^4$; $p > 0,05$) (Abb. 32).

EPO-behandelte Tiere mit Periost-Stripping wiesen nach 10 Wochen einen etwas höheren PMOI auf als Kontrollen, jedoch erwies sich der Unterschied statistisch als nicht signifikant ($0,277 \pm 0,068 \text{ mm}^4$ versus $0,178 \pm 0,048 \text{ mm}^4$; $p > 0,05$) (Abb. 32).

Im Gegensatz dazu zeigte sich der PMOI in EPO-behandelten Tieren ohne Periostresektion nach zehn Wochen signifikant erhöht im Vergleich zu Kontrolltieren ($0,571 \pm 0,114 \text{ mm}^4$ versus $0,296 \pm 0,078 \text{ mm}^4$) (Abb. 32).

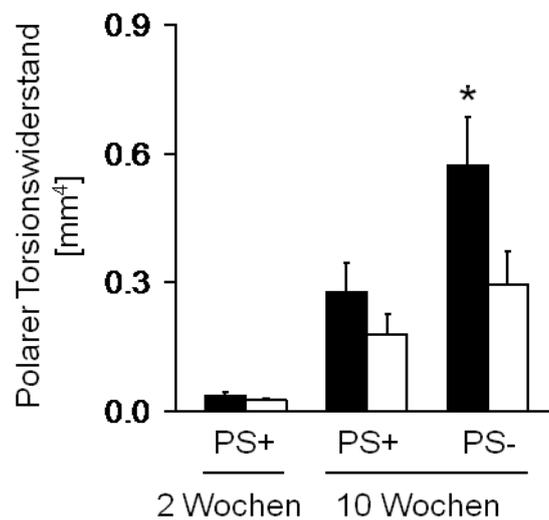


Abb. 32: Polarer Torsionswiderstand in EPO-behandelten Tieren (schwarze Balken) und den jeweiligen Kontrollen (weiße Balken) mit bzw. ohne Periost-Stripping (PS+ und PS-) nach 2 und 10 Wochen. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar (* $p < 0,05$ versus der zugehörigen Kontrollgruppe).

4.5. Histomorphometrie

Die histomorphometrische Auswertung des Kallusgewebes erfolgte am sagittalen longitudinalen Schnittpräparat im Bereich des maximalen Femurdurchmesser.

Die quantitative Analyse der histologischen Gesamt-Kallusfläche ergab nach 2 Wochen keinen signifikanten Unterschied zwischen EPO-behandelten Tieren und Kontrollen ($0,90 \pm 0,30 \text{ mm}^2$ versus $0,73 \pm 0,13 \text{ mm}^2$; $p > 0,05$) (Abb. 33 und 36).

Auch nach zehn Wochen zeigten sowohl Tiere mit Periost-Stripping als auch Tiere ohne Periost-Stripping unter EPO-Behandlung keine vergrößerte Kallusfläche verglichen mit Kontrollen (PS+: $1,99 \pm 0,46 \text{ mm}^2$ versus $2,39 \pm 0,48 \text{ mm}^2$; PS-: $1,63 \pm 0,26 \text{ mm}^2$ versus $1,81 \pm 0,13 \text{ mm}^2$; $p > 0,05$) (Abb. 33 und 36).

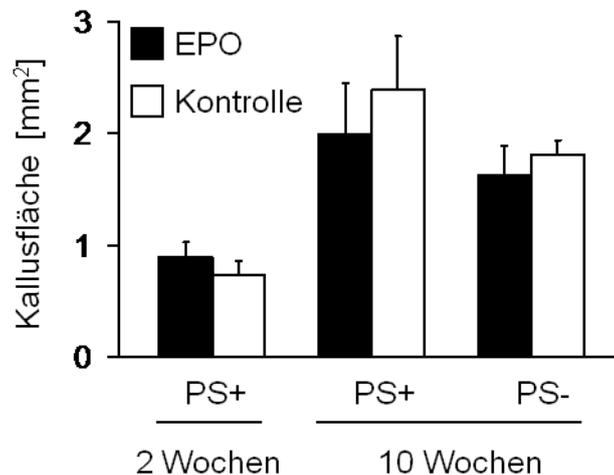


Abb. 33: Kallusfläche in mm^2 EPO-behandelter Tiere (schwarze Balken) und der jeweiligen Kontrollen (weiße Balken) mit bzw. ohne Periost-Stripping (PS+ und PS-) nach 2 und 10 Wochen. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar.

In der Analyse des prozentualen Gewebeanteils am Gesamtkallus wurde zwischen Knochengewebe, Knorpelgewebe und Bindegewebe unterschieden. Die Fläche der entsprechenden Gewebeart wurde zudem in das Verhältnis zur Gesamtfläche des Kallus gesetzt.

Diesbezüglich fanden sich in keiner der drei untersuchten Gewebearten nach zweiwöchiger EPO-Behandlung signifikante Unterschiede zu Kontrollen (Knochengewebe: $0 \pm 0 \%$ versus $0 \pm 0 \%$, Knorpelgewebe: $4 \pm 4 \%$ versus $1 \pm 1 \%$, Bindegewebe: $96 \pm 4 \%$ versus $99 \pm 1 \%$; p jeweils $> 0,05$) (Abb. 34 und 36).

Im Gegensatz dazu ließ sich nach zehnwöchiger Behandlung sowohl in der Gruppe mit Periost-Stripping, als auch in der Gruppe ohne Periost-Stripping ein signifikanter Unterschied in der Kallusgewebezusammensetzung zwischen EPO-behandelten Tieren und Kontrollen feststellen. Tiere mit Periost-Stripping zeigten nach einer zehnwöchigen EPO-Behandlung einen signifikant höheren Anteil an Knochengewebe als Kontrollen ($20 \pm 7 \%$ versus $1 \pm 1 \%$; $p < 0,05$). Keine signifikanten Unterschiede zwischen EPO-behandelten Tieren und Kontrollen mit Periost-Stripping ergaben sich im Kallusgehalt an Knorpelgewebe ($6 \pm 2 \%$ versus $10 \pm 7 \%$; $p > 0,05$) und Bindegewebe ($74 \pm 6 \%$ versus $89 \pm 7 \%$; $p > 0,05$) (Abb. 34 und 36).

Während sich nach 10 Wochen kein signifikanter Unterschied im Knochenanteil des Kallus zwischen EPO-behandelten Tieren und Kontrollen ohne Periost-Stripping zeigte ($12 \pm 3\%$ versus $9 \pm 5\%$; $p > 0,05$), war der Knorpelanteil in EPO-behandelten Tieren signifikant erhöht im Vergleich zu Kontrollen ($45 \pm 9\%$ versus $4 \pm 3\%$; $p < 0,05$) sowie der Bindegewebsanteil signifikant vermindert ($43 \pm 9\%$ versus $87 \pm 7\%$; $p < 0,05$) (Abb. 34 und 36).

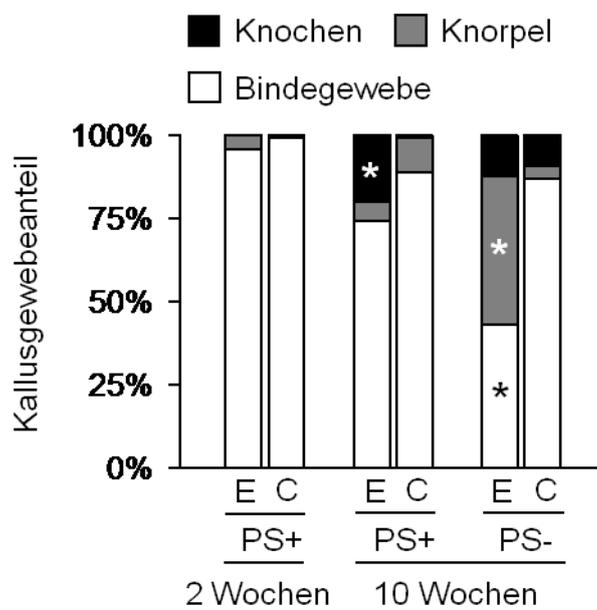


Abb. 34: Histologische Analyse der Kallusgewebezusammensetzung (Knochen-, Knorpel- und Bindegewebe) innerhalb des Osteotomiespalts in EPO-behandelten Tieren (E) und den jeweiligen Kontrollen (C) mit bzw. ohne Periost-Stripping (PS+ und PS-) 2 bzw. 10 Wochen postoperativ. Die Daten stellen Mittelwerte dar (* $p < 0,05$ versus der zugehörigen Kontrollgruppe).

Neben der Vermessung der Kallusfläche und ihrer unterschiedlichen, gewebsspezifischen Anteile wurde zudem die Überbrückung des Defektspalts in Abhängigkeit der Gewebeart untersucht und nach einem Punktesystem, das genauer unter 3.2.2 beschrieben ist, bewertet.

In den Gruppen mit einer Behandlungsdauer von zwei Wochen konnte für kein Tier eine knorpelige oder knöcherne Überbrückung festgestellt werden. Entsprechend lagen diesbezüglich die Werte sowohl für EPO-behandelte Tiere als auch für Kontrollen bei null Punkten (Abb. 35 und 36).

Nach einer Behandlung mit EPO über zehn Wochen kam es bei einem Tier mit Periost-Stripping zu einer kompletten Ausheilung des Knochendefekts. Hiermit verbunden war ein mittlerer Überbrückungsscore von $0,9 \pm 0,5$. Im Gegensatz dazu wiesen alle Kontrolltiere eine fortbestehende Pseudarthrose auf bei einem mittleren Überbrückungsscore von $0,1 \pm 0,1$. Aufgrund der hohen SEM erwies sich dieser Unterschied allerdings als statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$) (Abb. 35 und 36).

Auch in EPO-behandelten Versuchstieren ohne Periost-Stripping zeigte sich bei einem Tier eine knöcherne Überbauung des Defektpalts, während die entsprechenden Kontrollen nach 10 Wochen weiter eine persistente Pseudarthrose aufwiesen. Hiermit verbunden war ein signifikant höherer Überbrückungsscore in EPO-behandelten Tieren verglichen mit Kontrollen ($1,1 \pm 0,3$ versus $0,3 \pm 0,3$; $p < 0,05$) (Abb. 35 und 36).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl nach zwei, wie auch nach zehn Wochen in keinem einzigen Kontrolltier eine knöcherne Überbrückung nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde in zwei von 22 Versuchstieren, denen EPO über einen Zeitraum von zehn Wochen appliziert wurde, eine knöcherne Überbrückung des Osteotomiespalts beobachtet. Dies war gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren mit einem höheren mittleren Überbrückungsscore in Tieren, die über einen Zeitraum von zehn Wochen mit EPO behandelt worden waren, assoziiert.

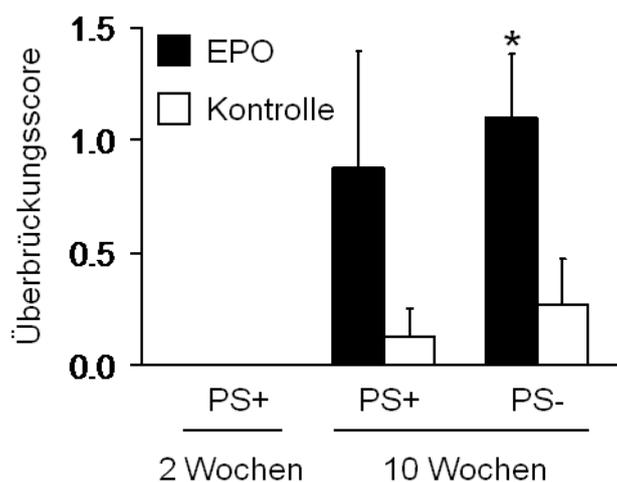


Abb. 35: Histologische Untersuchung der Überbrückung des Osteotomiespalts, die in Abhängigkeit von der Gewebeart nach einem Punktesystem klassifiziert wurde: Beide Korticalices wurden unabhängig voneinander auf eine knöcherne Überbrückung [2 Punkte], eine knorpelige Überbrückung [1 Punkt] oder eine bindegewebige Überbrückung [0 Punkte] evaluiert. Folglich wurden 4 Punkte als Zeichen einer kompletten knöchernen Ausheilung des Defektes und 0 Punkte als Zeichen einer persistenten Pseudarthrose gewertet. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar (* $p < 0,05$ versus der zugehörigen Kontrollgruppe).

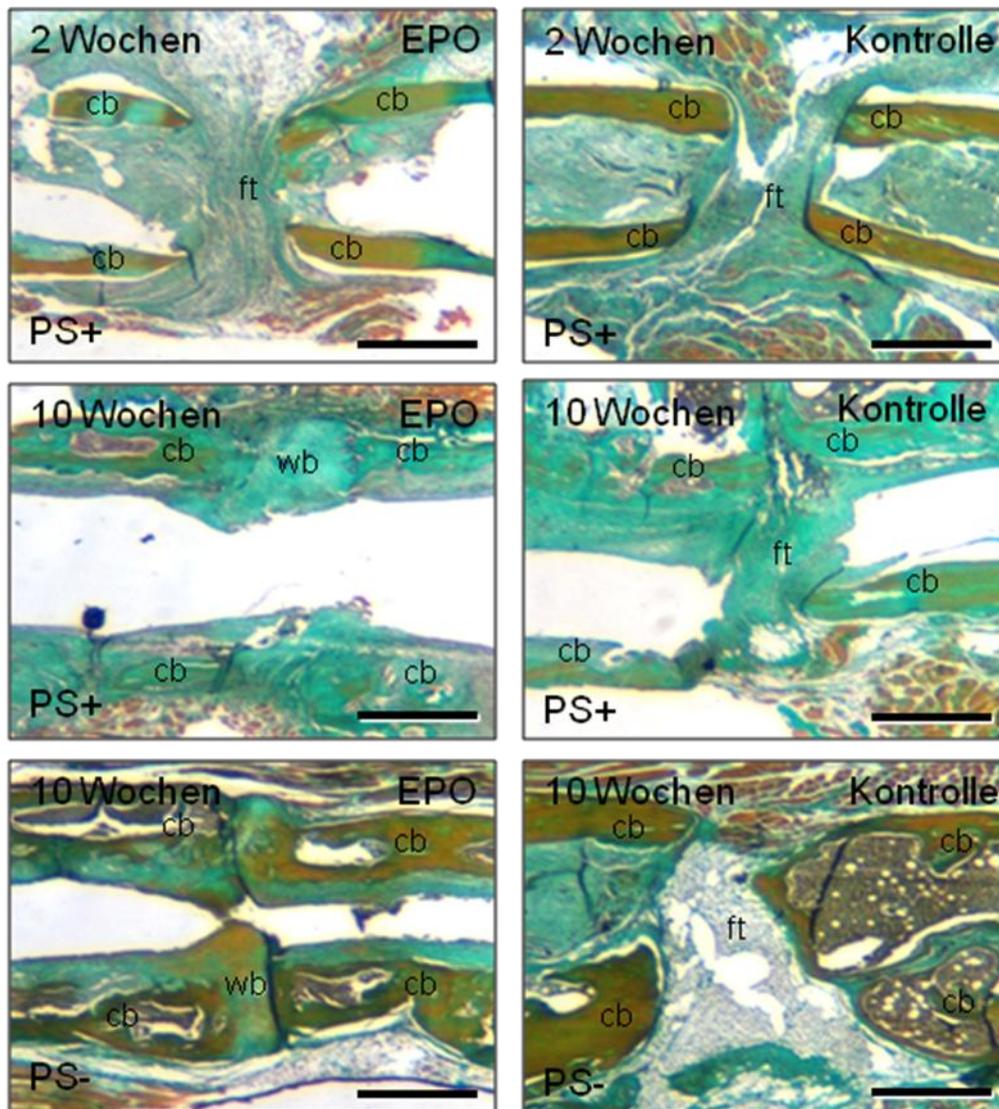


Abb. 36: Sagittale longitudinale histologische Femur-Schnittpräparate im Bereich des maximalen Femurdurchmessers in der Masson-Goldner-Färbung. Die linke Bildhälfte zeigt EPO-behandelte Tiere, die rechte Bildhälfte zeigt jeweilige Kontrolltiere 2 (obere Bildreihe) bzw. 10 (mittlere und untere Bildreihen) Wochen postoperativ. In Tieren der unteren Bildreihe wurde auf ein Periost-Stripping verzichtet (PS-), wohingegen in Tieren der mittleren und oberen Bildreihe das Periost auf einer Strecke von 2 mm proximal und distal des Defekts reseziert wurde (PS+). Nach 2 Wochen ist der Osteotomiespalt, der durch die Enden des kortikalen Knochens (cb) begrenzt wird, hauptsächlich von Bindegewebe (ft) gefüllt. Nach zehn Wochen ist das Bindegewebe in dem EPO-behandelten Tier größtenteils durch neu gebildeten Geflechtknochen (wb) ersetzt worden, während sich in der entsprechenden Kontrolle weiterhin Bindegewebe zeigt. Der Maßstabsbalken zeigt eine Distanz von 1 mm an.

Darüber hinaus wurde in den histologischen Schnittpräparaten die Gefäßdichte im Defektspalt untersucht und in Gefäßen pro „High Power Field“ (HPF) angegeben. Diesbezüglich zeigte sich in der Gruppe mit zweiwöchiger Behandlungsdauer eine signifikant höhere Gefäßdichte als in Kontrollen ($6,9 \pm 0,4$ Gefäße / HPF versus $4,2 \pm 0,5$ Gefäße / HPF; $p < 0,05$). Im Gegensatz dazu ergaben sich nach zehnwöchiger Behandlungsdauer keine signifikanten Unterschiede in der Gefäßdichte zwischen EPO-

behandelten Tieren und Kontrollen (PS+: $5,0 \pm 0,8$ versus $4,9 \pm 0,8$; $p > 0,05$; PS-: $4,0 \pm 0,6$ versus $4,8 \pm 0,4$; $p > 0,05$) (Tabelle 5).

	2 Wochen PS+	10 Wochen PS+	10 Wochen PS-
	<i>GefäÙe / HPF</i>	<i>GefäÙe / HPF</i>	<i>GefäÙe / HPF</i>
EPO	6.9 ± 0.4	5.0 ± 0.8	4.0 ± 0.6
Kontrolle	4.2 ± 0.5	4.9 ± 0.8	4.8 ± 0.4
P	<0.01	0.91	0.80

Tabelle 5: Histomorphometrische Analyse der GefäÙdichte innerhalb des Osteotomiespalts. Tiere, deren Periost 2 mm proximal und distal des Defektspalts entfernt wurde, werden mit PS+ gekennzeichnet, während Tiere ohne Periost-Stripping mit PS- markiert sind. Die Anzahl an GefäÙen wurde in 4 „High Power Fields“ (HPF) im zentralen Bereich des Osteotomiespalts untersucht.

4.6. Immunhistologie

Im Rahmen der quantitativen immunhistologischen Analyse wurden die positiv gefärbten Zellen des jeweiligen Zelltyps gezählt und in Relation zur Gesamtzahl des entsprechenden Zelltyps ausgewertet. Hierzu wurden mithilfe eines Rastersystems vier repräsentative Areale innerhalb des Defektareals untersucht (Abb. 37).

Nach einer Behandlungsdauer von zwei Wochen konnten sowohl VEGF-, als auch PCNA-positiv gefärbte Zellen hauptsächlich in neu gebildetem Bindegewebe innerhalb des Osteotomiespalts gefunden werden. Vorbestehendes kortikales Knochengewebe wies hingegen keine positiv gefärbten Zellen auf. In Gruppen mit einer Untersuchungsdauer von zehn Wochen fanden sich zusätzlich positive Signale für VEGF und PCNA in proliferierenden Chondrozyten, insbesondere in EPO-behandelten Tieren (Abb. 37).

Die quantitative Analyse zeigte eine signifikant höhere Anzahl VEGF-positiver Zellen in Tieren mit zweiwöchiger EPO-Behandlung als in Kontrollen ($38,9 \pm 0,7$ Zellen / HPF versus $20,3 \pm 0,7$ Zellen / HPF; $p < 0,05$). Für PCNA ließ sich in dieser Gruppe kein signifikanter Unterschied zwischen EPO-behandelten Tieren und Kontrollen nachweisen ($23,8 \pm 1,6$ Zellen / HPF versus $20,1 \pm 5,7$ Zellen / HPF; $p > 0,05$) (Tabelle 6).

Nach zehnwöchiger Standzeit war in EPO-behandelten Tieren mit Periost-Stripping hingegen der Anteil PCNA-positiver Zellen signifikant höher, als in Kontrollen ($34,0 \pm 2,4$ versus $8,5 \pm 2,0$ Zellen / HPF; $p < 0,05$), während sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl VEGF-positiver Zellen

zwischen EPO-behandelten Tieren und Kontrollen zeigte ($38,3 \pm 2,1$ Zellen / HPF versus $40,6 \pm 4,3$ Zellen / HPF; $p > 0,05$) (Tabelle 6).

	2 Wochen PS+	10 Wochen PS+	2 Wochen PS+	10 Wochen PS+
	<i>VEGF⁺ Zellen / HPF</i>	<i>VEGF⁺ Zellen / HPF</i>	<i>PCNA⁺ Zellen / HPF</i>	<i>PCNA⁺ Zellen / HPF</i>
EPO	$38,9 \pm 0,7$	$38,3 \pm 2,1$	$23,8 \pm 1,6$	$34,0 \pm 2,4$
Kontrolle	$20,3 \pm 0,7$	$40,6 \pm 4,3$	$20,1 \pm 5,7$	$8,5 \pm 2,0$
P	$<0,01$	0,62	0,16	$<0,01$

Tabelle 6: Immunhistologische Analyse der VEGF- sowie PCNA-positiven Zellen () innerhalb des Osteotomiespalts. Das Periost wurde über eine Strecke von 2 mm proximal und distal des Defektspalts (PS+) reseziert.*

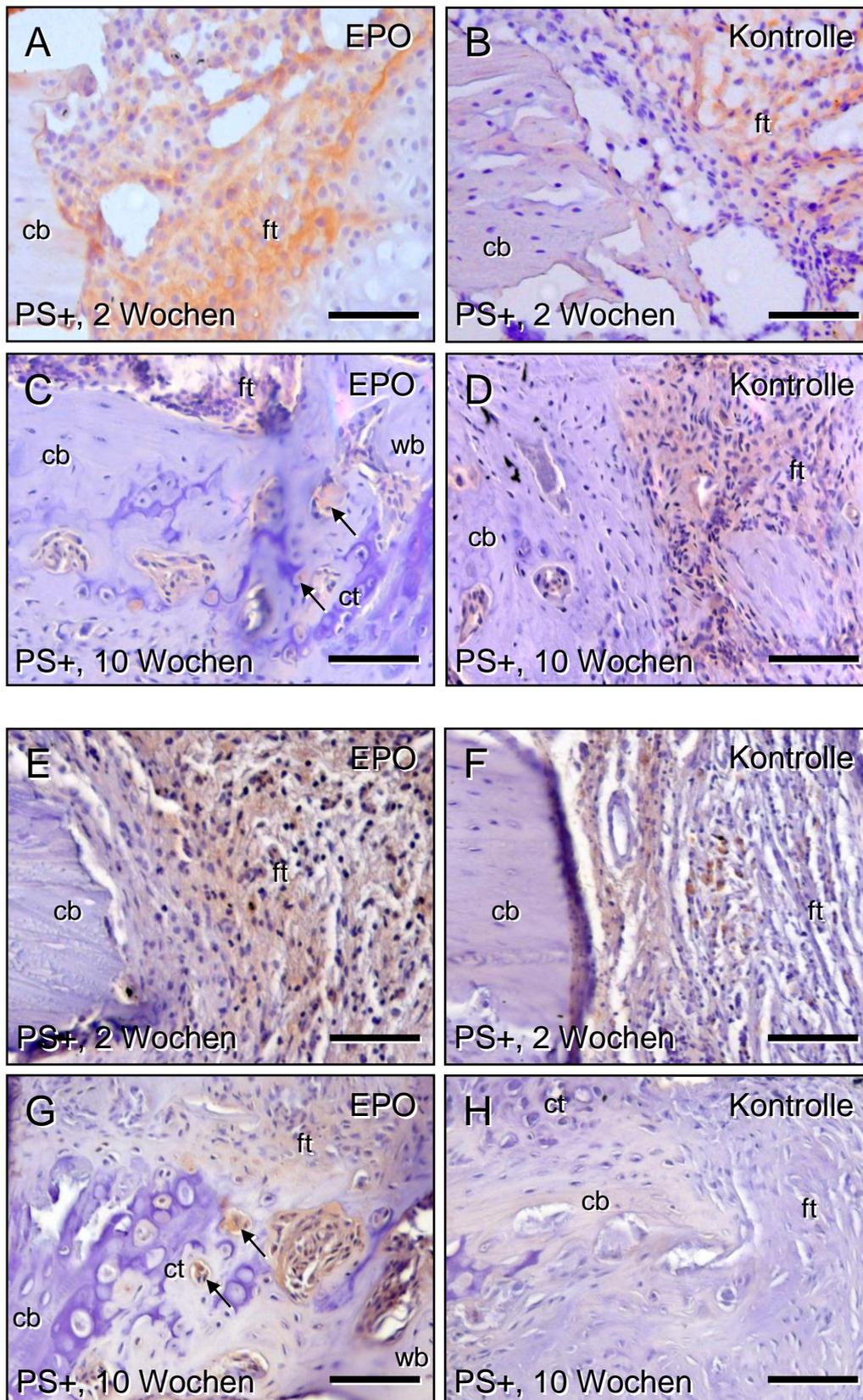


Abb. 37: Sagittale longitudinale immunhistologische Femur-Schnittpräparate im Bereich des maximalen Femurdurchmessers. A-D zeigen VEGF-gefärbte Schnitte, E-H PCNA-gefärbte Schnitte. Die linke Bildhälfte zeigt EPO-behandelte Tiere (A, C, E, G), die rechte Bildhälfte jeweilige Kontrollen (B, D, F, H). Dargestellt sind Präparate 2 (A, B, E, F) bzw. 10 (C, D, G, H) Wochen postoperativ mit Periost-Stripping (PS+). cb: cortical bone

(kortikaler Knochen), ct: cartilage tissue (Knorpelgewebe), ft: fibrous tissue (Bindegewebe). Nach 2 Wochen wurden sowohl VEGF-, als auch eine PCNA-positive Signale (braune Signale) hauptsächlich in neu gebildetem Bindegewebe innerhalb des Osteotomiespalts gefunden, während vorbestehender kortikaler Knochen weder VEGF-, noch PCNA-positive Zellen aufwies. Nach 10 Wochen wurden zusätzlich positive Signale für VEGF und PCNA in proliferierenden Chondrozyten, insbesondere in EPO-behandelten Tieren (Pfeile) gefunden. Der Maßstabsbalken zeigt eine Distanz von 100 μm an.

4.7. Western Blot

Im Rahmen der Western Blot Analyse wurde die Expression des angiogenen und osteogenen Wachstumsfaktors VEGF, des Proliferationsmarkers PCNA, des Angiopoietin-Rezeptors Tie-2, sowie der induzierbaren und endothelialen NO-Synthase (iNOS und eNOS) untersucht.

Die densitometrische Auswertung der Western Blots ergab nach zweiwöchiger Behandlung mit EPO eine signifikant höhere Expression des Wachstumsfaktors VEGF, als in Kontrollen ($16,3 \pm 0,8 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ versus $9,7 \pm 1,5 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$; $p < 0,05$). Im Gegensatz dazu zeigte sich nach zehn Wochen eine vergleichbar starke Expression von VEGF in EPO-behandelten Tieren und Kontrollen (PS+: $16,6 \pm 2,8 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ versus $19,6 \pm 5,7 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$; $p > 0,05$; PS-: $12,6 \pm 1,9 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ versus $16,6 \pm 1,2 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$; $p > 0,05$) (Abb. 38).

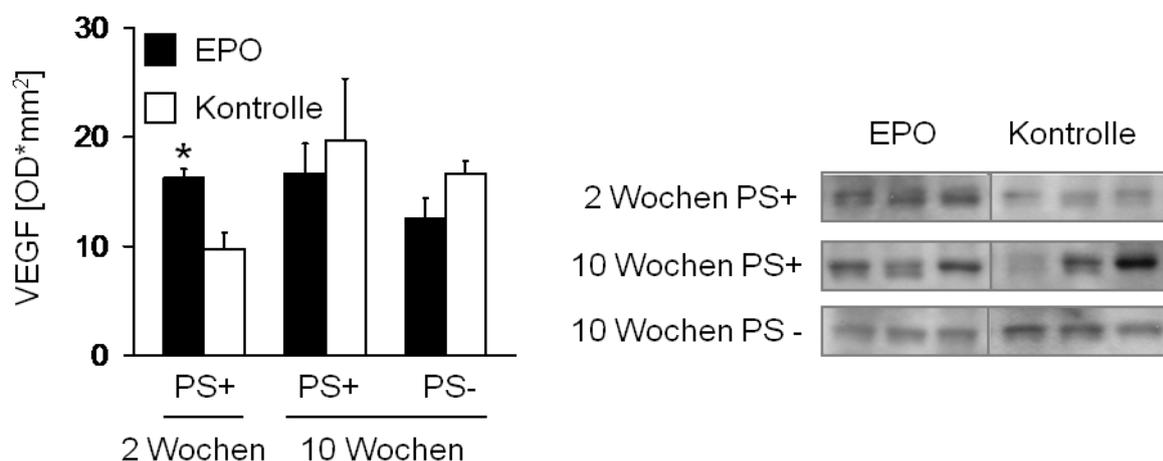


Abb. 38: Western Blot Analyse der Expression des osteogenen und angiogenen Wachstumsfaktors VEGF in EPO-behandelten Tieren (schwarze Balken) und Kontrollen (weiße Balken) mit bzw. ohne Periost-Stripping (PS+ und PS-) nach 2 und 10 Wochen. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar (* $p < 0,05$ versus der zugehörigen Kontrollgruppe).

Nach zehn Wochen fand sich im Osteotomiespalt EPO-behandelter Tiere mit Periost-Stripping verglichen mit Kontrollen eine signifikant erhöhte Expression des Proliferationsmarkers PCNA ($16,2 \pm$

3,0 OD*mm² versus 4,5 ± 0,8 OD*mm²; p < 0,05). Tiere mit gleicher Behandlungsdauer, jedoch ohne Periost-Stripping, sowie Tiere mit zweiwöchiger EPO-Behandlung zeigten keine signifikanten Unterschiede in der PCNA-Expression (10W PS-: 12,0 ± 1,9 OD*mm² versus 4,6 ± 0,8 OD*mm²; p > 0,05) (2W PS+: 12,2 ± 0,4 OD*mm² versus 9,0 ± 1,6 OD*mm²; p > 0,05) (Abb. 39).

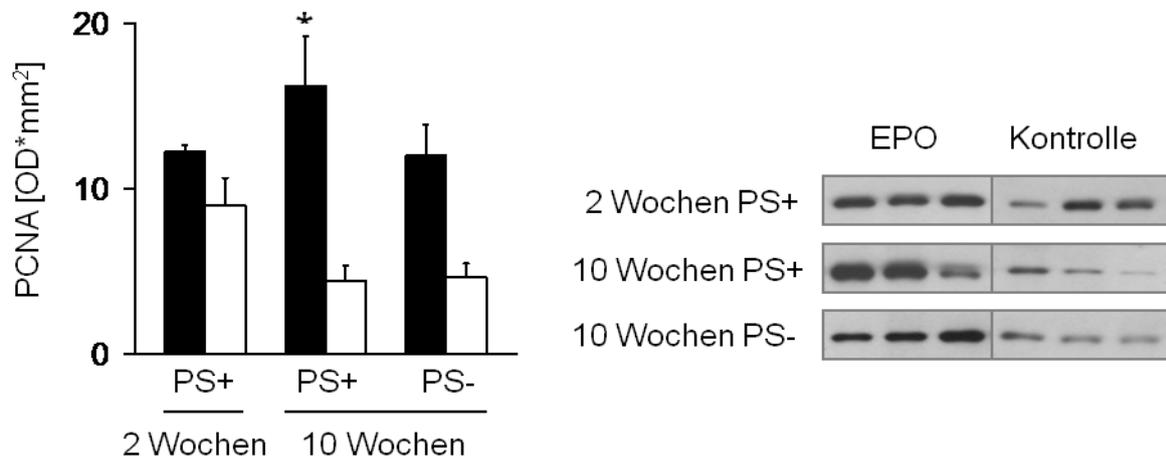


Abb. 39: Western Blot Analyse der Expression des Proliferationsmarkers PCNA in Erythropoietin-behandelten Tieren (schwarze Balken) und Kontrollen (weiße Balken) mit bzw. ohne Periost-Stripping (PS+ und PS-) nach 2 und 10 Wochen. Die Daten stellen Mittelwerte ± SEM dar (* p < 0,05 versus der zugehörigen Kontrollgruppe).

In Hinblick auf den Angiopoietin-Rezeptor Tie-2 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen EPO-behandelten Tieren und Kontrollen (2W PS+: 3,0 ± 0,4 OD*mm² versus 3,1 ± 0,1 OD*mm²; p > 0,05; 10W PS+: 4,2 ± 0,4 OD*mm² versus 4,5 ± 1,0 OD*mm²; p > 0,05; 10W PS-: 6,7 ± 1,0 OD*mm² versus 6,8 ± 0,8 OD*mm²; p > 0,05) (Abb. 40).

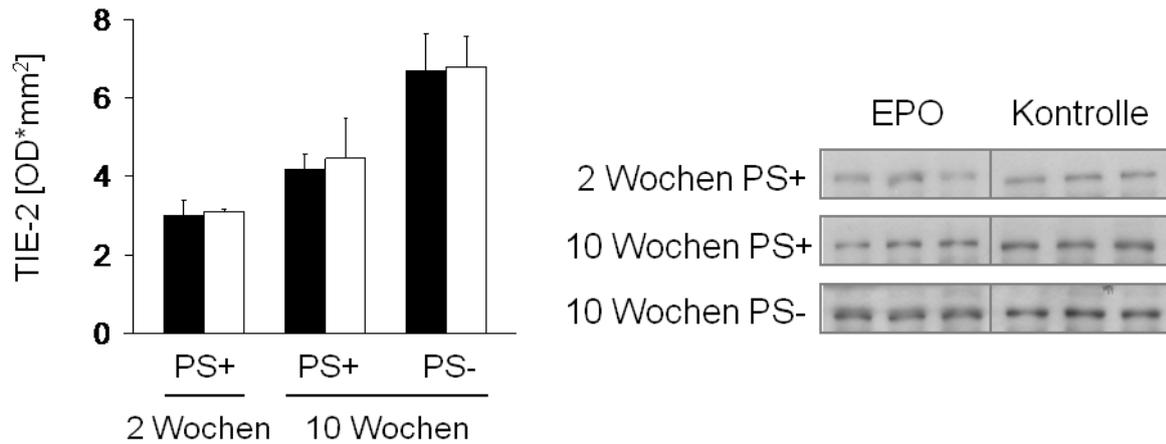


Abb. 40: Western Blot Analyse der Expression des Angiotensin-Rezeptors Tie-2 in EPO-behandelten Tieren (schwarze Balken) und Kontrollen (weiße Balken) mit bzw. ohne Periost-Stripping (PS+ und PS-) nach 2 und 10 Wochen. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar.

Ebenso zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Tieren mit EPO-Behandlung und Kontrollen hinsichtlich der Expression der induzierbaren und endothelialen NO-Synthase im Osteotomiespalt (unveröffentlichte Daten).

5. Diskussion

5.1. Diskussion der Methoden

Die Knochenheilung ist ein komplexer biologischer Prozess, der die Interaktion verschiedener knochenfremder Gewebetypen, wie z.B. des Periosts, des Gefäßsystems, oder des periostären Weichteilgewebes erfordert. Die verschiedenen Phasen der Knochenheilung werden durch ein kompliziertes örtliches und zeitliches Zusammenspiel vieler Faktoren beeinflusst. Aus diesem Grund ist das ossäre „micro-environment“ nur schlecht reproduzierbar, sodass *in-vitro*-Untersuchungen zur Knochenheilung nur sehr begrenzt aussagekräftig sind (Friedman et al., 1996). Daher wurde die vorliegende Studie am Tiermodell durchgeführt.

Im Gegensatz zum Menschen besitzt die Maus kein Havers-System. Diese Tatsache kann in Bezug auf die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Studien an der Maus auf den Menschen durchaus als Nachteil gewertet werden. Jedoch finden sich zwischen der Ausbildung sog. Resorptionshöhlen im Rahmen der murinen Frakturheilung deutliche Parallelen zum Remodelingprozess, der für die Knochenheilung im Menschen charakteristisch ist (Nunamaker, 1998). Darüber hinaus ist die Durchführung von Studien an der Maus aufgrund der relativ geringen Haltungs- und Zuchtkosten und einer daraus resultierenden guten Realisierbarkeit großer Gruppenstärken sinnvoll. Zusätzlich ist von großem Vorteil, dass das Genom der Maus bereits vollständig entschlüsselt ist und folglich für keine andere Spezies ein derart großes Spektrum transgener Stämme sowie spezifischer Antikörper verfügbar ist (Rossant & Nagy, 1995). Daher entschieden wir uns im Rahmen dieser Arbeit für die Verwendung von ausgewachsenen CD1-Mäusen als Versuchstiere.

Die mechanischen Gegebenheiten im Frakturspalt haben einen enormen Einfluss auf die Knochenheilung (Claes et al., 1998). Daher sind die Ergebnisse von Studien mit instabiler Pin-Osteosynthese nur sehr begrenzt aussagekräftig und es ist folglich für die Untersuchung der Knochenheilung essenziell, ein stabiles Osteosyntheseverfahren wie beispielsweise das Pin-Clip-Verfahren zu verwenden.

Das angewandte Pin-Clip-Modell wurde von unserer Arbeitsgruppe auch als Pseudarthrosemodell etabliert (Garcia et al., 2008b). Dieses Modell stellt nach unserem aktuellen Wissensstand das einzige zuverlässige Modell einer atrophischen Pseudarthrose in der Maus dar (Garcia et al., 2008b) (Garcia et al., 2011). Choi und Kollegen veröffentlichten zwar 2004 ein murines Pseudarthrosemodell an der Tibia (Choi et al., 2004), jedoch konnte in diesem Modell lediglich eine Pseudarthroserate von 60 % nach 27 Tagen erreicht werden. Eine weitere Analyse der Knochenheilung über den 27. Tag hinaus fand nicht statt, so dass die Kriterien der zuverlässigen Ausbildung einer Pseudarthrose in jenem Modell nicht erfüllt sind.

Oetgen und Kollegen haben 2008 ein Modell der hypertrophen Pseudarthrose unter Verwendung einer instabilen Osteosynthese in Kombination mit einer Kauterisation des Periosts an der Maus entwickelt (Oetgen et al., 2008). Dieses Modell ist allerdings nur von eingeschränkter klinischer Relevanz, da die hypertrophe Pseudarthrose in den meisten Fällen durch eine stabile Osteosynthese suffizient therapiert werden kann (Garcia et al., 2010b). Zudem geht aus der Modellbeschreibung keine Information bezüglich der Rate an induzierten Pseudarthrosen hervor (Memisoglu & Kesemenli, 2009).

Andere Modelle zur Frakturheilung an der Maus, die unter 2.3.1 beschrieben wurden, eignen sich nur bedingt für die Untersuchung von Pseudarthrosen. So ist z. B. für das Schraubenmodell von Holstein und Kollegen die Kompression der Fragmente essenziell, um eine Rotationsstabilität zu gewährleisten (Holstein et al., 2009b). Die von Histing und Kollegen publizierte Plattenosteosynthese am Mäusefemur eignet sich für die Stabilisierung größerer Segmentdefekte, jedoch konnte die zuverlässige Etablierung einer Pseudarthrose unter Verwendung dieses Implantats bislang nicht gezeigt werden (Histing et al., 2009) (Histing et al., 2009b). Der von Garcia et al. entwickelte LockingMouseNail® eignet sich ebenfalls für die Stabilisierung von Femur-Segmentdefekten bis zu einer Länge von 2 mm (Garcia et al., 2009). Da das Pin-Clip-Modell allerdings bereits in einer vorangegangenen Studie zur Rolle von EPO in der Knochenheilung angewandt wurde, wurde dieses Modell auch für die aktuelle Studie gewählt, um eine bessere Vergleichbarkeit der Daten aus den zwei Studien zu ermöglichen (Garcia et al., 2011).

Als nachteilig ist der hohe Grad an Invasivität des verwendeten Modells zu diskutieren. Wie alle offenen Verfahren erfordert auch das Pin-Clip-Modell einen longitudinalen Zugang am lateralen Oberschenkel, sodass insbesondere im Vergleich zu minimal-invasiven geschlossenen Frakturmodellen, die teilweise lediglich eine Inzision über dem Kniegelenk erfordern (Holstein et al., 2007b), ein vergleichsweise großes Operationsfeld eröffnet wird. Trotz der invasiven Operationstechnik konnten wir jedoch bereits 1-2 Tage nach der Operation einen physiologischen Bewegungsablauf der Tiere beobachten, sodass von einer adäquaten Belastung der operierten Extremität bei stabiler Implantatlage ausgegangen werden kann.

Wir können also retrospektiv das gewählte Tiermodell ohne wesentliche Einschränkungen als reproduzierbar und für die Fragestellung geeignet beurteilen und würden das Modell auch für Folgeversuche heranziehen.

Der operative Eingriff, die Allgemeinnarkose und die postoperative Analgesierung wurden von den Versuchstieren gut toleriert. Die Narkosedauer von etwa 30 min erwies sich für den durchgeführten Eingriff sowie die postoperative Röntgenkontrolle als zeitlich ausreichend kalkuliert.

Bei Tötung der Tiere konnten die Beobachtungen, die während der Behandlungsphase bereits gemacht wurden, bestätigt werden. So fanden sich im Zuge der Explantation der Knochen keine Anzeichen von Infekten oder sonstigen unerwarteten Pathologien.

Die Behandlungsdauer der Versuchstiere in der hier vorgestellten Arbeit wurde auf zwei bzw. zehn Wochen festgelegt. Hierdurch konnte sowohl ein kurzfristiger, als auch ein langfristiger Effekt von EPO auf die Entwicklung einer atrophen Pseudarthrose untersucht werden. Diesbezüglich muss beachtet werden, dass die Knochenregenerationsrate bei der Maus wesentlich schneller verläuft als beim Menschen (Bourque et al., 1992). Manigrasso und O'Connor untersuchten 2004 in einem Marknagel-Modell den zeitlichen Ablauf der ungestörten Frakturheilung an der Maus (Manigrasso & O'Connor, 2004). Es zeigte sich eine maximale Kallusbildung nach zwei Wochen. Dementsprechend wurde dieser Zeitpunkt in der vorliegenden Studie für die Untersuchung der frühen Knochenheilung gewählt.

In der erwähnten Studie von Manigrasso und O'Connor konnte bei den meisten Versuchstieren nach 28 Tagen eine knöcherne Durchbauung des Frakturkallus und nach sechs Wochen ein Remodelingprozess beobachtet werden. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch die gestörte Knochenheilung untersucht werden sollte, war ein späterer Zeitpunkt erforderlich, um die Ausbildung einer Pseudarthrose zu beurteilen. Basierend auf Daten vorangehender Publikationen (Bourque et al., 1992) (Garcia et al., 2008b) (Garcia et al., 2010) wurde die Knochenheilung in der aktuellen Studie nach zehn Wochen untersucht. Entsprechend der histologischen und mikrocomputertomographischen Auswertung bestätigte sich zu diesem Zeitpunkt retrospektiv in allen Kontrolltieren das Bild einer atrophen Pseudarthrose.

Aufgrund der geringen Menge an zirkulierendem Gesamtblutvolumen stellt die Blutentnahme bei der Maus im Vergleich zu größeren Tierspezies eine gewisse Herausforderung dar. Insgesamt beläuft sich das Blutvolumen einer Maus auf etwa 0,07-0,08 ml/g Körpergewicht, wobei die Entnahme von bis zu 10 % des Gesamtvolumens von den Tieren i.d.R. ohne erkennbare Nebenwirkung toleriert wird. Die Maus bietet verschiedene Lokalisationen zur Blutentnahme: die Aorta, die Vena cava, die Schwanzvene, der retrobulbäre Venenplexus, sowie das Herz (Desjardins, 1986). Sind wiederholte Blutentnahmen kleinerer Mengen (1-2 Tropfen bzw. bis zu 0,001 ml/g KG täglich) an der Maus nötig, eignet sich vor allem die Schwanzvene und der retrobulbäre Venenplexus. Alle weiteren Lokalisationen dienen der letalen Blutentnahme, wobei eine maximale Blutmenge von 0,7-1,0 ml gewonnen werden kann (Desjardins, 1986). In der vorliegenden Arbeit wurde den Versuchstieren nach Injektion einer Überdosis Phenobarbital unmittelbar vor dem Tod etwa 1 ml Blut aus der unteren Hohlvene entnommen, um konsekutiv die Hämoglobinkonzentration EPO-behandelter Tiere im Vergleich zu der von Kontrolltieren zu untersuchen.

In den meisten Modellen wird die Knochenheilung nach definierten Zeitabschnitten mit radiologischen, biomechanischen, histologischen, und proteinbiochemischen Methoden analysiert. In der vorliegenden Arbeit mussten die Versuchstiere für die histologische und proteinbiochemische Auswertung getötet werden. Prinzipiell ist es allerdings auch möglich, mithilfe verschiedener Bildgebungsverfahren die Knochenheilung am lebenden Tier zu untersuchen. Techniken wie beispielsweise μ PET und μ MRT, sowie innovative Verfahren der molekularen Biolumineszenz- oder Nukleartomographie bieten diesbezüglich neue Möglichkeiten der Darstellung von Gewebemorphologie, Genexpression,

Proteindegradation, Zellmigration und Zelltod in lebenden Tieren (Lee et al., 2009) (Lu et al., 2005) (Zachos et al., 2007).

Etablierte bildgebende Verfahren sind neben der konventionellen Röntgenaufnahme vor allem die 2D- sowie 3D-Microcomputertomographie. Während die Röntgenuntersuchung lediglich eine zweidimensionale Übersichtsaufnahme des Knochens, sowie eine Beurteilung der Größe und Dichte des Kallusgewebes ermöglicht (Augat et al., 2005) (Garcia et al., 2008b) (Holstein et al., 2007), bietet die Computertomographie eine dreidimensionale Rekonstruktion des Knochens einschließlich einer Berechnung biomechanischer Parameter des Knochens (Cano et al., 2008).

In der hier vorgestellten Studie verwendeten wir die konventionelle Röntgendiagnostik sowie das μ CT. Mit der Röntgenaufnahme des operierten Femurs konnte die korrekte Implantatlage direkt postoperativ sowie vor Tötung der Tiere überprüft werden. Durch die dreidimensionale Rekonstruktion des μ CT-Datensatzes konnte der Defektspace in sagittaler, axialer, sowie koronarer Ebene untersucht werden und die Überbrückung des Osteotomiespalts quantitativ analysiert werden.

Zudem diene der mikrocomputertomographische Datensatz der Berechnung biomechanischer Parameter des Knochens. Generell stehen für die biomechanische Knochentestung verschiedene Verfahren zur Verfügung: Zum einen ist zur Messung der Biomechanik die 3-Punkt-Biegung möglich. Nachteil dieses Verfahrens ist, dass die maximale Belastung über lediglich einem Punkt des Knochens gemessen wird. Da sich das atrophe Gewebe von Pseudarthrosen über eine längere Distanz erstrecken kann, ist diese Technik demzufolge für das in dieser Arbeit angewandte Modell ungeeignet (Burstein & Frankel, 1971). Weiterhin kann für die biomechanische Knochentestung die 4-Punkt-Biegung verwendet werden, jedoch ist dies bei einer durchschnittlichen Femurlänge von etwa 15 mm technisch nur schwer umsetzbar, da bei diesem Verfahren die maximale Kraft über eine relativ große Fläche verteilt wird. So sollte die Länge des Knochens mindestens das 16-fache des Durchmessers betragen, um Messungenauigkeiten zu vermeiden (Manigrasso & O'Connor, 2004). Bei einem durchschnittlichen Durchmesser des Mäusefemurs von knapp 2 mm, müsste das Femur also mindestens 32 mm lang sein, sodass die 4-Punkt-Biegetestung an der Maus praktisch nicht anwendbar ist (Manigrasso & O'Connor, 2004). Zudem bieten beide Verfahren den Nachteil, dass nur ein geringfügiges Verdrehen des Knochens ausreicht, um die Präzision und Reproduzierbarkeit der Testung deutlich einzuschränken (Lind et al., 2001).

Ein weiteres biomechanisches Verfahren stellt die Rotationstestung dar, deren Vorteil gegenüber den Biegetests in einer höheren Messgenauigkeit auch bei leichten Veränderungen in der Knochengeometrie liegt.

Für die Berechnung der Brechkraft ist bei allen beschriebenen Messverfahren die Zerstörung des Knochens erforderlich, sodass dieser nicht für weitere Analysen verwertet werden kann. Im Gegensatz dazu stellen mikrocomputertomographische Berechnungen der biomechanischen Knocheneigenschaften eine gewebsschonende Methode dar, deren Ergebnisse mit denen einer

konventionellen 3-Punkt-Biegung korrelieren (Lind et al., 2001). Die Reproduzierbarkeit von μ CT-Berechnungen biomechanischer Parameter ist umso höher, je größer die Versuchstiere sind, jedoch sind auch an Mäusen realistische Ergebnisse erzielbar (Morgan et al., 2009) (Jämsä et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit entschieden wir uns daher für die biomechanische Auswertung mittels μ CT. Diesbezüglich wurde der polare Torsionswiderstand in zwei Achsen analysiert. Hierbei handelt es sich um einen Parameter, der sich in vorangegangenen Studien als signifikanter Indikator zur Beurteilung biomechanischer Knocheneigenschaften in verschiedenen Nagetieren erwiesen hat (Turner & Burr, 1993) (Ekeland et al., 1981) (Ferretti et al., 1993) (Raab et al., 1990) (Peng et al., 1994). Auch in der vorliegenden Arbeit erwies sich die μ CT-Untersuchung, durch die die Anzahl an benötigten Versuchstieren gegenüber einer konventionellen biomechanischen Testung halbiert werden konnte, als geeignete Methode zur Evaluation der biomechanischen Eigenschaften der operierten Mäusefemora.

Die quantitative histologische Analyse stellt die Standardmethode zur Untersuchung der Knochenheilung dar (Gerstenfeld et al., 2005). Die histomorphometrischen Analysen wurden in der aktuellen Arbeit gemäß der Empfehlungen zu Messparametern und Nomenklatur der American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR) durchgeführt (Parfitt et al., 1987). Angesichts der heterogenen dreidimensionalen Struktur des Defektspalts gestaltet es sich schwierig, die verschiedenen Gewebstypen in standardisierter Weise an zweidimensionalen Schnittpräparaten zu untersuchen. Jedoch ist es mithilfe von longitudinalen Schnittpräparaten im Bereich des maximalen Femurdurchmessers dennoch möglich, das Defektareal reproduzierbar und repräsentativ darzustellen. Entsprechend wählten wir basierend auf den Erfahrungen aus vorangegangenen Studien eine longitudinale, middiaphysäre Schnittführung um den Defektspalt histomorphometrisch auszuwerten (Garcia et al., 2008b) (Holstein et al., 2007).

Grundsätzlich kann eine histologische Auswertung der Knochenheilung am calcifizierten und decalcifizierten Knochen stattfinden. In der vorliegenden Studie entschieden wir uns für die Untersuchung am decalcifizierten Knochen, da dadurch eine bessere Möglichkeit zur immunhistologischen Färbung der Schnittpräparate besteht. Somit war es uns möglich eine *in-situ*-Detektion von Proteinen wie z.B. Zytokinen und Zellmarkern innerhalb des Defektspalts durchzuführen (Gerstenfeld et al., 2005) (Holstein et al., 2007). Jedoch lässt die histologische Analyse am decalcifizierten Knochen nur schwer Aussagen über den Kalksalzgehalt des untersuchten Bereichs zu. Dieser Parameter fand in der vorliegenden Studie allerdings im Rahmen der mikrocomputertomographischen Auswertung Berücksichtigung, sodass in der histologischen Analyse der Fokus auf der Gewebzusammensetzung des Defektspalts und dem Nachweis spezifischer Proteine im Defektspalt lag.

Im Rahmen der immunhistologischen Analysen untersuchten wir die Expression der Proteine PCNA und VEGF, um die Wirkung von EPO auf die Zellproliferation, Angiogenese und Osteogenese *in situ* im Defektareal zu erforschen. PCNA ist ein proliferationspezifischer Zellmarker (Holstein et al., 2007).

Aus der Proliferationsrate des jeweiligen Zelltyps lassen sich somit Rückschlüsse auf die Regenerationskapazität des entsprechenden Gewebetyps ziehen. PCNA wird im Rahmen der frühen G1-Phase bis zur S-Phase des Zellteilungszyklus exprimiert, wohingegen die Expression in der G2-Phase und der M-Phase abnimmt. Angesichts der hohen Expressionsraten während der verschiedenen Phasen des Zellzyklus wird die Spezifität von PCNA als Proliferationsmarker zwar kontrovers diskutiert (McCormick et al., 1993), jedoch konnten Wildemann und Kollegen zeigen, dass PCNA im Rahmen der Knochenheilung einen zuverlässigen Marker zur Untersuchung der Zellproliferation darstellt (Wildemann et al., 2003). Iwaki und Kollegen konnten im Frakturkallus von Rattenfemora eine vermehrte PCNA-Expression bis zum 14. Tag postoperativ nachweisen (Iwaki et al., 1997), sodass wir in der vorliegenden Arbeit ebenfalls die Expression von PCNA nach zweiwöchiger Knochenheilung untersuchten. Da es sich bei dem von Iwaki et al. verwendeten Modell jedoch nicht um ein Pseudarthrosemodell bzw. ein Modell mit gestörter Knochenheilung handelte, erachteten wir es als sinnvoll, die PCNA-Expression darüber hinaus auch nach 10 Wochen zu untersuchen.

Es konnte bereits in einer vorangegangenen Studie gezeigt werden, dass EPO die enchondrale Osteogenese stimuliert (Holstein et al., 2007). Ein hoch potenter osteogener und angiogener Wachstumsfaktor ist VEGF. So konnten Street und Kollegen VEGF eine essenzielle Bedeutung für die Einsprossung von Gefäßen und die Calcifizierung des Frakturkallus zusprechen (Street et al., 2002). Vor diesem Hintergrund führten wir immunhistologische Färbungen durch, um zu untersuchen, inwieweit EPO die Expression von VEGF fördert. Da sowohl Vaskularisierung, als auch Calcifizierung des Kallusgewebes bei der Maus bereits nach zwei Wochen zu beobachten sind (Holstein et al., 2008), analysierten wir die Expression von VEGF sowohl nach 2 Wochen, als auch - vor dem Hintergrund der gestörten Knochenheilung in dem aktuellen Modell - nach 10 Wochen.

Um einerseits die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung zu verifizieren und andererseits die Expression weiterer Proteine im Defektspalt zu untersuchen, wurden zusätzliche Western-Blot-Analysen durchgeführt.

Da während der Wundheilung eine NOS-vermittelte Wirkung von EPO auf die Gewebsregeneration gezeigt werden konnte (Galeano et al., 2006) untersuchten wir, inwieweit EPO die Expression der induzierbaren und endothelialen NO-Synthase (iNOS und eNOS) während der Knochenheilung beeinflusst.

Weiterhin wurde die Expression des Angiopoietin-Rezeptors Tie-2 im Defektspalt proteinbiochemisch untersucht. Tie-2 ist ein Tyrosin Kinase-Rezeptor in Endothelzellen, an den natürlicherweise sog. Angiopoietine binden, wodurch die Proliferation und Apoptose der Zellen gesteuert wird. Darüber hinaus wird die vaskuläre Permeabilität sowie die Kapillarsprossung mithilfe von Tie-2 reguliert (Martin et al., 2008). Vor dem Hintergrund dass die beschriebenen Tie-2-vermittelten Ereignisse eine wichtige Rolle auch während der Knochenheilung spielen, untersuchten wir, inwieweit EPO die Expression dieses Proteins im Defektareal beeinflusst.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen unsere Hypothese, dass die Behandlung mit EPO die Knochenregeneration in atrophen Pseudarthrosen verbessert. Diese Erkenntnis korrespondiert mit vorangegangenen Studien, die zeigen konnten, dass EPO die Frakturheilung stimuliert (Holstein et al., 2007) (Garcia et al., 2011).

Im Rahmen des angewandten Pin-Clip-Modells wurde ein 1,8 mm großer segmentaler Knochendefekt erzeugt, der eine sekundäre Knochenheilung durch enchondrale und membranöse Ossifikation induzierte. Zwei Wochen postoperativ bestand der Defektspalt sowohl in EPO-behandelten Tieren, als auch in Kontrolltieren fast ausschließlich aus Bindegewebe. Im Hinblick auf die zeitlichen Abläufe der ungestörten Frakturheilung (Manigrasso & O'Connor, 2004) weist dies auf einen signifikant verzögerten Ablauf der Knochenheilung hin. Zehn Wochen nach der Operation zeigten Kontrolltiere histomorphometrisch weiterhin eine sehr begrenzte Ausbildung von Knorpel- und Knochengewebe. Kein Kontrolltier zeigte histologisch oder mikrocomputertomographisch eine knöcherne Überbrückung des Osteotomiespalts, sodass bei diesen Tieren eine Pseudarthrose-Rate von 100 % vorlag. Die Behandlung mit EPO bewirkte einen signifikanten Anstieg der Knochen- und Knorpelbildung, wodurch eine Stimulation der enchondralen Ossifikation impliziert wird. Die Gabe von EPO bewirkte in 2 von 22 Versuchstieren nach zehn Wochen eine knöcherne Überbrückung des Osteotomiespalts. Die Berechnung des polaren Torsionswiderstands zeigte, dass EPO die Festigkeit des operierten Knochens am ehesten durch einen Anstieg der Knochen- und Knorpel-Fraktion innerhalb des Osteotomiespalts steigert.

Eine Verletzung des Periosts wird als ein potenzieller Risikofaktor für Heilungsstörungen des Knochens und die Ausbildung einer Pseudarthrose angesehen (Rodriguez-Merchan & Forriol, 2004) (Eyre-Brook, 1984). Daher resezierten wir in einigen Gruppen das Periost, wohingegen in anderen Gruppen eine Verletzung des Periosts vermieden wurde. Die mikrocomputertomographischen und histologischen Analysen lassen eine leicht gesteigerte Heilungskapazität in Tieren ohne Periost-Stripping vermuten. Jedoch wurden die Schlüsselergebnisse der vorliegenden Studie dadurch nicht verändert: Kontrolltiere wiesen unabhängig vom Periost-Stripping keinerlei Tendenz einer knöchernen Überbrückung des Defektspalts auf. Hingegen bewirkte EPO eine Ausheilung der Pseudarthrose nach zehnwöchiger Behandlung sowohl in einem Versuchstier, dessen Periost reseziert worden war, als auch in einem Tier ohne Periost-Stripping.

In der Klinik stellt die Behandlung der atrophen Pseudarthrose nach wie vor eine große Herausforderung dar (Rodriguez-Merchan & Forriol, 2004) (Megas, 2005). Dementsprechend ist es von essenzieller Bedeutung neue Behandlungsstrategien zu entwickeln, die zu einer Verbesserung des Outcomes atropher Pseudarthrosen führen. Im Gegensatz zur hypertrophen Pseudarthrose, die üblicherweise durch ein zu hohes Maß an interfragmentärer Bewegung ausgelöst wird, ist die Ursache der atrophen Pseudarthrose auf eine gestörte biologische Heilungskapazität zurückzuführen (Rodriguez-Merchan & Forriol, 2004) (Megas, 2005). Demzufolge können hypertrophe

Pseudarthrosen erfolgreich durch eine suffiziente Frakturstabilisierung therapiert werden, wohingegen der Schwerpunkt in der Behandlung der atrophen Pseudarthrose auf der Stimulation der biologischen Prozesse im Rahmen der Knochenheilung liegen sollte (Einhorn, 1995) (Rodriguez-Merchan & Forriol, 2004) (Megas, 2005). Diese Prozesse beinhalten die Expression osteogener Zytokine, die Ausbildung von Blutgefäßen, sowie die Zellproliferation (Carano & Filvaroff, 2003) (Einhorn, 1998) (Gerstenfeld et al., 2003) (Glowacki, 1998).

Die Zellproliferation wird als einer der Schlüsselmechanismen der Knochenheilung angesehen (Iwaki et al., 1997) (Glowacki, 1998). Daher ist es von besonderem Interesse, dass für EPO eine Stimulation der Zellproliferation in einer Vielzahl von Geweben wie z.B. der Niere, dem Gastrointestinaltrakt, sowie der Skelettmuskulatur nachgewiesen wurde (Westenfelder et al., 1999) (Ogilvie et al., 2000) (Juul et al., 2001). In Übereinstimmung mit diesen Erkenntnissen konnten wir zeigen, dass die Behandlung mit EPO die Zellproliferation auch im Rahmen des Heilungsprozesses von atrophen Pseudarthrosen stimuliert. Dieser positive Effekt von EPO auf die Zellproliferation konnte in der aktuellen Studie ausschließlich nach zehnwöchiger Behandlung beobachtet werden, während nach zwei Wochen die PCNA-Expression in EPO-behandelten Tieren quantitativ vergleichbar mit der von Kontrolltieren war. Diese Ergebnisse stimmen mit vorangegangenen Studien überein, die keinen Einfluss von EPO auf die PCNA-Expression während der frühen, geschlossenen Frakturheilung zeigen konnten (Holstein et al., 2007). Immunhistologische Färbungen in der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass PCNA nach zwei Wochen ausschließlich von Bindegewebszellen exprimiert wird. Hingegen konnte nach zehn Wochen insbesondere in EPO-behandelten Tieren eine zusätzliche positive Färbung für PCNA in proliferierenden Chondrozyten nachgewiesen werden. Dies korrespondiert mit Ergebnissen von Iwaki et al., der im Rahmen der regelrechten Frakturheilung eine Expression von PCNA in proliferierenden Chondroblasten nachweisen konnte (Iwaki et al., 1997). Wir schlussfolgern daher, dass die verstärkte Expression von PCNA auf eine erhöhte Anzahl an proliferierenden Chondrozyten in EPO-behandelten Tieren im Vergleich zu Kontrollen zurückzuführen ist.

Es ist davon auszugehen, dass EPO die Zellproliferation darüber hinaus durch einen angiogenen Effekt beeinflusst. So konnten verschiedene Studien nachweisen, dass die Zellproliferation während der Osteogenese stark von der Ausbildung neuer Blutgefäße abhängig ist (Garcia et al., 2011) (Glowacki, 1998) (Lee et al., 2008). VEGF ist einer der potentesten angiogenen und osteogenen Wachstumsfaktoren im Rahmen der Knochenheilung (Geiger et al., 2005) (Gerber et al., 1999) (Beamer et al., 2009) und wird nach zweiwöchiger Frakturheilung in der Maus vor allem von hypertrophen Chondrozyten, proliferierenden Endothelzellen und Osteoblasten exprimiert (Carlevaro et al., 2000). Daher ist es von besonderem Interesse, dass EPO wichtige genetische und funktionelle Homologien zu VEGF aufweist, die eine ähnliche Rolle beider Zytokine in der Knochenheilung vermuten lassen (Steinbrech et al., 2000) (Goldberg et al., 1988) (Jaquet et al., 2002) (Keramaris et al., 2008).

Unmittelbar auf eine Frakturierung folgend setzt eine starke Zellproliferation insbesondere von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen zusammen mit einer

überschießenden Kapillareinsprossung in der Frakturzone ein. Diese Neovaskularisation dient einerseits der Nutrition der Zellen vor Ort, andererseits kommt es zu einem „Einschwemmen“ und zur Proliferation mesenchymaler Zellen aus dem Gefäßendothel (Tremain et al., 2001). Hierfür ist in erster Linie VEGF verantwortlich (Street et al., 2002). Entsprechend konnte nachgewiesen werden, dass eine Blockade des VEGF-Rezeptors die Kapillareinsprossung in die Frakturzone nahezu vollständig unterdrückt (Gerber et al., 1999; Street et al., 2002). Da die Neovaskularisation für die Weiterdifferenzierung mesenchymaler Zellen im Rahmen der enchondralen Ossifikation von großer Bedeutung ist, dürfte die angiogene Wirkung von EPO daher indirekt auch die Differenzierung und Proliferation mesenchymaler Zellen beeinflussen.

Im weiteren Verlauf der Frakturheilung ist VEGF für die Resorption von hypertrophem Knorpelgewebe verantwortlich, sodass sich im Tiermodell nachweisen ließ, dass die Blockierung von VEGF zu einer signifikanten Verzögerung der Rekrutierung und Differenzierung von Mediatoren der Knorpelresorption führt und darüber hinaus Chondroklasten hemmt (Gerber et al., 1999). Weiterhin ist zu vermuten, dass eine Hemmung von VEGF zu einer signifikanten Reduktion der nodulären Osteoblastenformierung führt sowie die Produktion von alkalischer Phosphatase durch Osteoblasten vermindert (Street et al., 2002).

Für EPO konnte eine Stimulation der Geweberegeneration nach Hautverletzungen und myokardialer Ischämie über VEGF-vermittelte Signalwege nachgewiesen werden (Westenbrink et al., 2010) (Galeano et al., 2006). Schaffer und Kollegen konnten diesbezüglich zeigen, dass eine Inhibierung von VEGF durch Rapamycin die dermale Wundheilung beeinträchtigt (Schaffer et al., 2007).

In der aktuellen Studie konnten die Ergebnisse der Western Blot-Analysen sowie der immunhistologischen Untersuchungen zeigen, dass die Behandlung mit EPO die Expression von VEGF während der frühen Phase des Heilungsprozesses stimuliert. Zusätzlich war die EPO-Behandlung nach zwei Wochen mit einer erhöhten Anzahl an Blutgefäßen innerhalb des Osteotomiespalts assoziiert. Diese Daten lassen vermuten, dass EPO die frühe Neovaskularisation während der Knochenheilung über VEGF-vermittelte Signalwege stimuliert.

Als weiterer Erklärungsansatz für die angiogene und zellproliferative Wirkung von EPO während der Knochenheilung sind VEGF-unabhängige Signalwege zu diskutieren. So konnte im Rahmen von *in-vivo*-Experimenten gezeigt werden, dass EPO die Proliferation von zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen über Angiopoietin-1- / Tie-2-Signalwege fördert (Wang et al., 2011). Um zu evaluieren, ob Angiopoietin-1- / Tie-2-Signalwege in der Stimulation der Angiogenese durch EPO während der Knochenheilung involviert sind, untersuchten wir die Tie-2 Expression im Osteotomiespalt mittels Western Blot-Analyse. Die gewonnenen Ergebnisse zeigten quantitativ vergleichbare Signale für Tie-2 in Geweben von EPO-behandelten Tieren und Kontrolltieren. Hieraus kann geschlossen werden, dass eine EPO-induzierte Hochregulation von Tie-2 bei der EPO-abhängigen Stimulation der Angiogenese während der Knochenheilung nicht beteiligt ist.

Ein weiterer möglicher Mechanismus, über den EPO die Knochenheilung stimuliert, ist der NO-abhängige Signalweg. So konnte eine Verbesserung der Heilung von Weichteilgewebe durch EPO aufgrund einer Hochregulation der endothelialen und induzierbaren NO-Synthase nachgewiesen werden (Galeano et al., 2006) (Haroon et al., 2003). Interessanterweise werden diese beiden Enzyme auch während der Frakturheilung von Perizyten und Chondrozyten gebildet (Zhu et al., 2002). Daher untersuchten wir, ob eine Behandlung mit EPO in der Lage ist, die Expression von iNOS und eNOS in dem regenerierenden Gewebe innerhalb des Osteotomiespalts zu stimulieren. Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse zeigten allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Expression von eNOS und iNOS zwischen EPO-behandelten Tieren und Kontrollen. Hieraus schließen wir, dass NO-abhängige Signalwege im Rahmen des stimulierenden Effekts von EPO auf die Knochenheilung bei Pseudarthrosen nicht involviert sind.

Die vorliegende Studie hat gewisse Limitierungen. Die wichtigste Limitierung ist, dass nach täglicher Applikation von 500 U EPO/kg/d über einen Zeitraum sowohl von zwei, als auch von zehn Wochen im Vergleich zu Kontrolltieren ein signifikant erhöhter Hämoglobinwert nachgewiesen wurde. Somit konnte post mortem zwar von einer erfolgreichen Behandlung mit EPO ausgegangen werden, jedoch könnte der erhöhte Hämoglobinwert den Heilungsprozess beeinflusst haben. Einerseits könnte es durch den erhöhten Hämoglobinwert zu einer verbesserten Sauerstoffversorgung innerhalb des Osteotomiespalts gekommen sein. Andererseits wäre es trotz der starken Zunahme der Knochenregeneration denkbar, dass hohe Hämoglobinkonzentrationen in EPO-behandelten Tieren zu einer Beeinträchtigung der Knochenheilung durch eine erhöhte Blutviskosität und damit einen verminderten Blutfluss sowie eine herabgesetzte Mikrozirkulation geführt haben. Daher sind weitere Studien mit spezifischen Erythropoietinen ohne hämatopoietische Eigenschaften erforderlich, um einen potentiellen Einfluss erhöhter Hämoglobinkonzentrationen auf die Knochenheilung abschätzen zu können.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass die Behandlung mit EPO die Knochenheilung in atrophen Pseudarthrosen durch eine Stimulation der Zellproliferation, der Angiogenese und der Expression des osteogenen und angiogenen Wachstumsfaktors VEGF verbessert (Abb. 41). Im Gegensatz zu VEGF ist EPO bereits als weit verbreitetes Medikament mit einem bekannten Sicherheitsprofil etabliert (Krantz, 1991) (Garcia et al., 2011). Daher stellt EPO eine vielversprechende Substanz zur Behandlung der atrophen Pseudarthrose auch im Menschen dar.

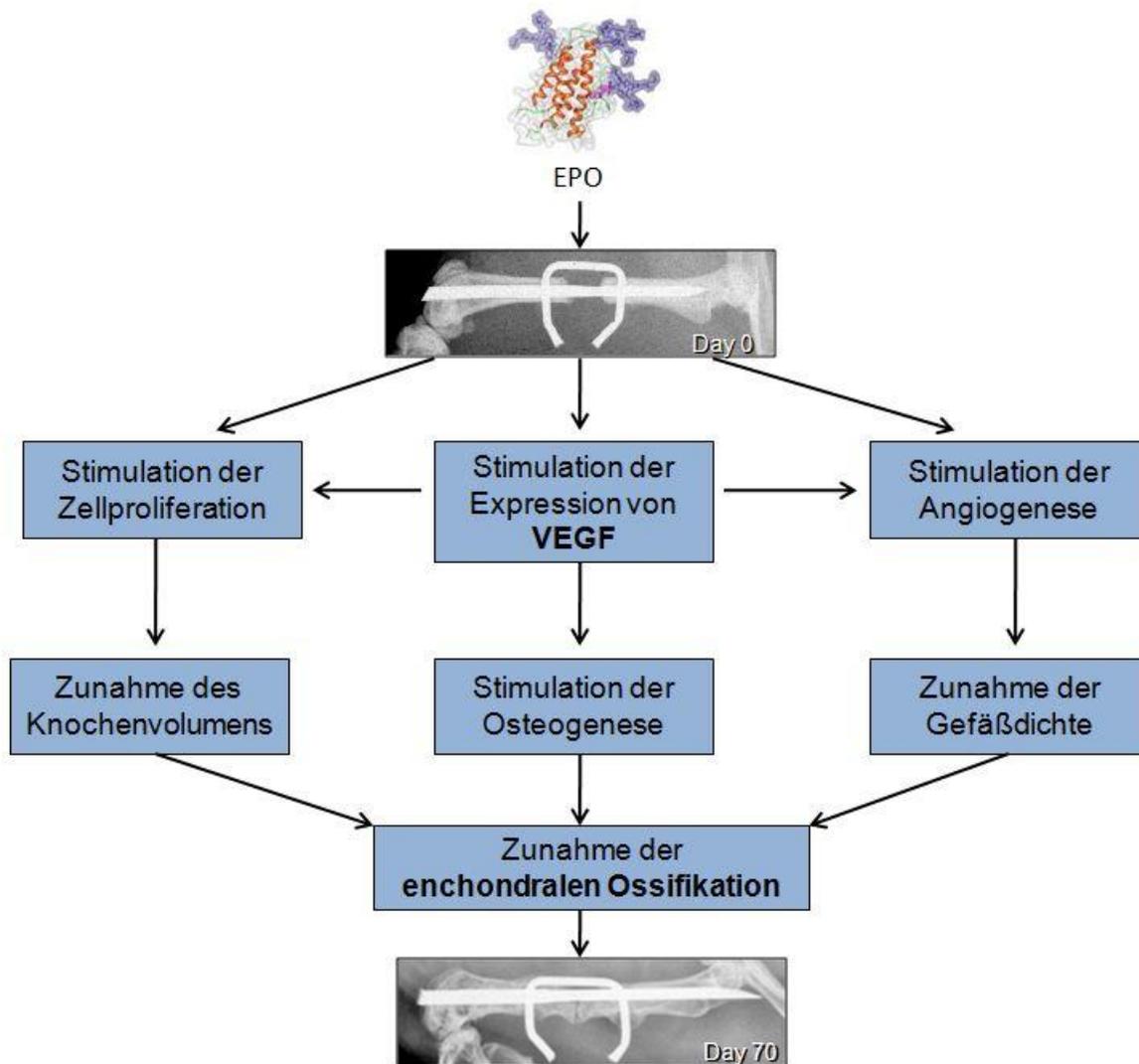


Abb. 41: Diagramm zur potenziellen Wirkung von EPO in atropen Pseudarthrosen

5.3. Schlussfolgerungen

1. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Pin-Clip-Modell erwies sich als geeignet, um die Wirkung von EPO auf atrophe Pseudarthrosen an der Maus zu untersuchen. Die entsprechenden mikrocomputertomographischen, biomechanischen, histomorphometrischen, immunhistologischen sowie proteinbiochemischen Parameter lieferten zuverlässige Daten.
2. Während nach zweiwöchiger Behandlungsdauer radiologisch und histomorphometrisch keine signifikanten Unterschiede zwischen Tieren mit bzw. ohne EPO-Behandlung festgestellt werden konnten, zeigten sowohl mikrocomputertomographische, als auch histologische Analysen verglichen zur Kontrolle eine deutlich gesteigerte Knochenregeneration in Tieren, die über einen Zeitraum von zehn Wochen mit EPO behandelt wurden. Das Periost-Stripping führte hierbei zu keinen entscheidenden Veränderungen der Ergebnisse.

3. Nach zweiwöchiger Standzeit konnte proteinbiochemisch eine vermehrte Expression des angiogenen und osteogenen Wachstumsfaktors VEGF in EPO-behandelten Tieren im Vergleich zu Kontrollen nachgewiesen werden. Hiermit vergesellschaftet war eine höhere Anzahl an Blutgefäßen in EPO-behandelten Tieren verglichen mit Kontrollen.
4. Nach zehnwöchiger Behandlungsdauer zeigte sich proteinbiochemisch nach Gabe von EPO im Vergleich zu Kontrolltieren eine signifikante Zunahme der Zellproliferation.
5. Proteinbiochemisch konnte kein Effekt von EPO auf die Expression des Angiopoietin-Rezeptors Tie-2 sowie der endothelialen und induzierbaren NO-Synthase nachgewiesen werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Adamcio B, Sargin D, Stradomska A, Medrihan L, Gertler C, Theis F, Zhang M, Müller M, Hassouna I, Hannke K, Sperling S, Radyushkin K, El-Kordi A, Schulze L, Ronnenberg A, Wolf F, Brose N, Rhee JS, Zhang W, Ehrenreich H (2008) Erythropoietin enhances hippocampal long-term potentiation and memory. *BMC Biol.* 6:37
2. Adams DS, Klevjer-Anderson P, Carlson JL, McGuire TC, Gorham JR (1983) Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am J Vet Res.* 44:1670-5
3. Agoram B, Aoki K, Doshi S, Gegg C, Jang G, Molineux G, Narhi L, Elliott S (2009) Investigation of the effects of altered receptor binding activity on the clearance of erythropoiesis-stimulating proteins: Nonerythropoietin receptor-mediated pathways may play a major role. *J Pharm Sci.* 98:2198-211
4. Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, Levinson R, Steiner M (1990) Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87:5978-82
5. Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT (1994) Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91:3974-8
6. Ashhurst DE, Hogg J, Perren SM (1982) A method for making reproducible experimental fractures of the rabbit tibia. *Injury.* 14:236-42
7. Augat P, Simon U, Liedert A, Claes L (2005) Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. *Osteoporos Int.* 16:S36-43
8. Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wolff W, Wurzinger LJ, Zilch HG (2007) *Duale Reihe Anatomie. 1. Auflage.* Georg Thieme Verlag. Stuttgart
9. Beamer B, Hettrich C, Lane J (2009) Vascular Endothelial Growth Factor: An Essential Component of Angiogenesis and Fracture Healing. *HSS J.* [Epub ahead of print]
10. Berchtold R, Bruch HP, Trentz O (2008) *Berchtold Chirurgie. 6. Auflage.* Elsevier. München
11. Black J, Balligand MH, Nunamaker DM, Brighton CT (1985) Electrical Stimulation of fresh fractures: Faradic stimulation of tibial osteotomies in the dog. *Trans Orthop Res Soc.* 10:29
12. Bodó E, Kromminga A, Funk W, Laugsch M, Duske U, Jelkmann W, Paus R. (2007) Human hair follicles are an extrarenal source and a nonhematopoietic target of erythropoietin. *FASEB J.* 21:3346-54
13. Boecker W, Denk H, Heitz PU (2004) *Pathologie. 3. Auflage.* Elsevier. München
14. Bonnarens F, Einhorn TA (1984) Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res.* 2:97-101
15. Bourque WT, Gross M, Hall BK (1992) A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Lab Anim Sci.* 42:369-74

16. Boyce AS, Reveal G, Scheid DK, Kaehr DM, Maar D, Watts M, Stone MB (2009) Canine investigation of rhBMP-2, autogenous bone graft, and rhBMP-2 with autogenous bone graft for the healing of a large segmental tibial defect. *J Orthop Trauma*. 23:685-92
17. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 423:337-42
18. Brighton CT, Hozack WJ, Brager MD, Windsor RE, Pollack SR, Vreslovic EJ, Kotwick JE (1985) Fracture healing in the rabbit fibula when subjected to various capacitively coupled electrical fields. *J Orthop Res*. 3:331-40
19. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A (2000) Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:10526-31
20. Brines M, Patel NS, Villa P, Brines C, Mennini T, De Paola M, Erbayraktar Z, Erbayraktar S, Sepodes B, Thiemermann C, Ghezzi P, Yamin M, Hand CC, Xie QW, Coleman T, Cerami A (2008) Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105:10925-30
21. Bruick RK, McKnight SL (2002) Transcription. Oxygen sensing gets a second wind. *Science*. 295:807-8
22. Bucher O, Wartenberg H (1997) *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. 12. Auflage. Huber. Bern
23. Burger D, Xiang F, Hammoud L, Lu X, Feng Q (2009) Role of heme oxygenase-1 in the cardioprotective effects of erythropoietin during myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 296:H84-93
24. Burstein AH, Frankel VH (1971) A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech*. 4:155-8
25. Cano J, Campo J, Vaquero JJ, Martínez González JM, Bascones A (2008) High resolution image in bone biology II. Review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 13:E31-5
26. Carano RA, Filvaroff EH (2003) Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today*. 8:980-9
27. Carlevaro MF, Cermelli S, Cancedda R, Descalzi Cancedda F (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci*. 113:59-69
28. Chao EY, Aro HT, Lewallen DG, Kelly PJ (1989) The effect of rigidity on fracture healing in external fixation. *Clin Orthop Relat Res*. 241:24-35
29. Cheal EJ, Mansmann KA, DiGioia AM 3rd, Hayes WC, Perren SM (1991) Role of interfragmentary strain in fracture healing: ovine model of a healing osteotomy. *J Orthop Res*. 9:131-42
30. Cheung KM, Kaluarachi K, Andrew G, Lu W, Chan D, Cheah KS (2003) An externally fixed femoral fracture model for mice. *J Orthop Res*. 21:685-90
31. Choi P, Ogilvie C, Thompson Z, Miclau T, Helms JA (2004) Cellular and molecular characterization of a murine non-union model. *J Orthop Res*. 22:1100-7
32. Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D, Seidl W, Margevicius KJ, Augat P (1998) Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clin Orthop Relat Res*.

- 355:S132-47
33. Contaldo C, Meier C, Elsherbiny A, Harder Y, Trentz O, Menger MD, Wanner GA (2007) Human recombinant erythropoietin protects the striated muscle microcirculation of the dorsal skinfold from postischemic injury in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293:H274-83
 34. Critchlow MA, Bland YS, Ashhurst DE (1995) The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit. *Bone.* 16:521-7
 35. Curtis MJ, Brown PR, Dick JD, Jinnah RH (1995) Contaminated fractures of the tibia: a comparison of treatment modalities in an animal model. *J Orthop Res.* 13:286-95
 36. D'Andrea AD, Lodish HF, Wong GG (1989) Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell.* 57:277-85
 37. Danckwardt-Lillieström G, Lorenzi GL, Olerud S (1970) Intramedullary nailing after reaming. An investigation on the healing process in osteotomized rabbit tibias. *Acta Orthop Scand Suppl.* 134:1-78
 38. Daum WJ, Chang SL, Simmons DJ, Webster D, Shoenecker PL (1983) Healing of canine femoral osteotomies. Effects of compression plates versus Eggers' plates. *Clin Orthop Relat Res.* 180:291-300
 39. Davis JM, Arakawa T, Strickland TW, Yphantis DA (1987) Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry.* 26:2633-8
 40. Davy DT, Connolly JF (1982) The biomechanical behavior of healing canine radii and ribs. *J Biomech.* 15:235-47
 41. De Spiegelaere W, Cornillie P, Van den Broeck W (2010) Localization of erythropoietin in and around growing cartilage. *Mol Cell Biochem.* 337:287-91
 42. Deibert MC, Mcleod BR, Smith SD, Liboff AR (1994) Ion resonance electromagnetic field stimulation of fracture healing in rabbits with a fibular osteotomy. *J Orthop Res.* 12:878-85
 43. Desjardins D (1986) Indwelling vascular cannulas for remote blood sampling, infusion and long-term instrumentation of small laboratory animals. In: *Methods of Animal Experimentation.* Vol VII. Part A. S143-194. Academic Press Inc. Orlando
 44. Dettmer U, Folkerts M, Kächler E, Sönnichsen A (2005) *Intensivkurs Biochemie: Studentconsult.* 1. Auflage. Elsevier. München
 45. Dicato M, Plawny L (2010) Erythropoietin in cancer patients: pros and cons. *Curr Opin Oncol.* 22:307-11
 46. Dubé S, Fisher JW, Powell JS (1988) Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion, and biological function. *J Biol Chem.* 263:17516-21
 47. Egger EL, Gottsauner-Wolf F, Palmer J, Aro HT, Chao EY (1993) Effects of axial dynamization on bone healing. *J Trauma.* 34:185-92
 48. Einhorn TA (1995) Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am.* 77:940-56
 49. Einhorn TA (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 355:S7-21
 50. Ekeland A, Engesæter LB, Langeland N (1981) Mechanical properties of fractured and intact rat femora evaluated by bending, torsional, and tensile tests. *Acta Orthop Scand.* 52:605-13
 51. Erslev A (1953) Humoral regulation of red cell production. *Blood.* 8:349-57

52. Erslev A, Laviertes PH, Van Wagenen G (1953) Erythropoietic stimulation induced by anemic serum. *Proc Soc Exp Biol Med.* 83:548-50
53. Eyre-Brook AL (1984) The periosteum: its function reassessed. *Clin Orthop Relat Res.* 189:300-7
54. Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA (1999) Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation?. *Mech Dev.* 87:57-66
55. Ferretti JL, Capozza RF, Mondelo N, Zanchetta JR (1993) Interrelationships between densitometric, geometric, and mechanical properties of rat femora: Inferences concerning mechanical regulation of bone modeling. *J Bone Miner Res.* 8:1389-96
56. Fleisch H (1997) Bisphosphonates: mechanisms of action and clinical use in osteoporosis--an update. *Horm Metab Res.* 29:145-50
57. Foley RN (2008) Erythropoietin: physiology and molecular mechanisms. *Heart Fail Rev.* 13:405-14
58. Friedman RJ, An YH, Ming J, Draughn RA, Bauer TW (1996) Influence of biomaterial surface texture on bone ingrowth in the rabbit femur. *J Orthop Res.* 14:455-64
59. Frost HM (1987) Bone "mass" and "mechanostat": a proposal. *Anat Rec.* 219:1-9
60. Galeano M, Altavilla D, Bitto A, Minutoli L, Calo M, Lo Cascio P, Polito F, Giugliano G, Squadrito G, Mioni C, Giuliani D, Venuti FS, Squadrito F (2006) Recombinant human erythropoietin improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. *Crit Care Med.* 34:1139-46
61. Gabet Y, Müller R, Regev E, Sela J, Shteyer A, Salisbury K, Chorev M, Bab I (2004) Osteogenic growth peptide modulates fracture callus structural and mechanical properties. *Bone.* 35:65-73
62. Garcia P, Holstein JH, Histing T, Burkhardt M, Culemann U, Pizanis A, Wirbel RJ, Pohlemann T, Menger MD (2008) A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: impact of stability on fracture healing. *J Biomech.* 41:1689-96
63. Garcia P, Holstein JH, Maier S, Schaumloffel H, Al-Marrawi F, Hannig M, Pohlemann T, Menger MD (2008b) Development of a reliable non-union model in mice. *J Surg Res.* 147:84-91
64. Garcia P, Herwerth S, Matthys R, Holstein JH, Histing T, Menger MD, Pohlemann T (2009) The LockingMouseNail-A New Implant for Standardized Stable Osteosynthesis in Mice. *J Surg Res.* 169:220-6
65. Garcia P, Schwenzer S, Slotta JE, Scheuer C, Tami AE, Holstein JH, Histing T, Burkhardt M, Pohlemann T, Menger MD (2010) Inhibition of angiotensin-converting enzyme stimulates fracture healing and periosteal callus formation - role of a local renin-angiotensin system. *Br J Pharmacol.* 159:1672-80
66. Garcia P, Histing T, Holstein JH, Pohlemann T, Menger MD (2010b) Femoral non-union models in the mouse. *Injury.* 41:1093-4
67. Garcia P, Speidel V, Scheuer C, Laschke MW, Holstein JH, Histing T, Pohlemann T, Menger MD (2011) Low dose erythropoietin stimulates bone healing in mice. *J Orthop Res.* 29:165-72

68. Geiger F, Bertram H, Berger I, Lorenz H, Wall O, Eckhardt C, Simank HG, Richter W (2005) Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J Bone Miner Res.* 20:2028-35
69. Georgiadis GM, Minster GJ, Moed BR (1990) Effects of dynamization after interlocking tibial nailing: an experimental study in dogs. *J Orthop Trauma.* 4:323-30
70. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N (1999) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med.* 5:623-8
71. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA (2003) Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem.* 88:873-84
72. Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA (2005) Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. *J Bone Miner Res.* 20:1715-22
73. Glowacki J (1998) Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* 355:S82-9
74. Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF (1988) Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science.* 242:1412-5
75. Goldwasser E, Kung CK, Eliason J (1974) On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. 13. The role of sialic acid in erythropoietin action. *J Biol Chem.* 249:4202-6
76. Gore CJ, Parisotto R, Ashenden MJ, Stray-Gundersen J, Sharpe K, Hopkins W, Emslie KR, Howe C, Trout GJ, Kazlauskas R, Hahn AG (2003) Second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica.* 88:333-44
77. Gröngroft I, Heil P, Matthys R, Lezuo P, Tami A, Perren S, Montavon P, Ito K (2009) Fixation compliance in a mouse osteotomy model induces two different processes of bone healing but does not lead to delayed union. *J Biomech.* 42:2089-96
78. Haroon ZA, Amin K, Jiang X, Arcasoy MO (2003) A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response. *Am J Pathol.* 163:993-1000
79. Heckman JD, Boyan BD, Aufdemorte TB, Abbott JT (1991) The use of bone morphogenetic protein in the treatment of non-union in a canine model. *J Bone Joint Surg Am.* 73:750-64
80. Henry WB Jr, Schachar NS, Wadsworth PL, Castronovo FP Jr, Mankin HJ (1985) Feline model for the study of frozen osteoarticular hemijoint transplantation: qualitative and quantitative assessment of bone healing. *Am J Vet Res.* 46:1714-20
81. Herrgesell JD (1967) Aspirin poisoning in the cat. *J Am Vet Med Assoc.* 151:452-5
82. Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P (1995) An experimental model for non-union in rats. *Injury.* 26:681-6
83. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT (1993) A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res.* 11:305-12
84. 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.* 27:1152-6
85. Histing T, Garcia P, Matthys R, Leidinger M, Holstein JH, Kristen A, Pohlemann T, Menger MD

- (2009b) An internal locking plate to study intramembranous bone healing in a mouse femur fracture model. *J Orthop Res.* 28:397-402
86. Holstein JH, Menger MD, Scheuer C, Meier C, Culemann U, Wirbel RJ, Garcia P, Pohlemann T (2007) Erythropoietin (EPO): EPO-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing. *Life Sci.* 80:893-900
87. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T (2007b) Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech.* 40:215-9
88. Holstein JH, Klein M, Garcia P, Histing T, Culemann U, Pizanis A, Laschke MW, Scheuer C, Meier C, Schorr H, Pohlemann T, Menger MD (2008) Rapamycin affects early fracture healing in mice. *Br J Pharmacol.* 154:1055-62
89. Holstein JH, Garcia P, Histing T, Kristen A, Scheuer C, Menger MD, Pohlemann T (2009) Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration. *J Orthop Trauma.* 23:S31-8
90. Holstein JH, Matthys R, Histing T, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Meier C, Pohlemann T, Menger MD (2009b) Development of a stable closed femoral fracture model in mice. *J Surg Res.* 153:71-5
91. Ito H, Akiyama H, Shigeno C, Iyama K, Matsuoka H, Nakamura T (1999) Hedgehog signaling molecules in bone marrow cells at the initial stage of fracture repair. *Biochem Biophys Res Commun.* 262:443-51
92. Iwaki A, Jingushi S, Oda Y, Izumi T, Shida JI, Tsuneyoshi M, Sugioka Y (1997) Localization and quantification of proliferating cells during rat fracture repair: detection of proliferating cell nuclear antigen by immunohistochemistry. *J Bone Miner Res.* 12:96-102
93. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EF, et al. (1985) Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature.* 313:806-10
94. Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, Plzak L (1957) Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature.* 179:633-4
95. Jämsä T, Jalovaara P, Peng Z, Väänänen HK, Tuukkanen J (1998) Comparison of three-point bending test and peripheral quantitative computed tomography analysis in the evaluation of the strength of mouse femur and tibia. *Bone.* 23:155-61
96. Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck KH (2002) Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res.* 64:326-33
97. Jelkmann W (2004) Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med.* 43:649-59
98. Jelkmann W (2007) Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol.* 78:183-205
99. Johnson AL, Stein LE (1988) Morphologic comparison of healing patterns in ethylene oxide-sterilized cortical allografts and untreated cortical autografts in the dog. *Am J Vet Res.* 49:101-5
100. Jones RD, Baynes RE, Nimitz CT (1992) Nonsteroidal anti-inflammatory drug toxicosis in dogs and cats: 240 cases (1989-1990). *J Am Vet Med Assoc.* 201:475-7

101. Junqueira LC, Carneiro J, Gratzl M (2004) Histologie. Neue Approbationsordnung. 6. Auflage. Springer. Berlin
102. Juul SE, Ledbetter DJ, Joyce AE, Dame C, Christensen RD, Zhao Y, DeMarco V (2001) Erythropoietin acts as a trophic factor in neonatal rat intestine. *Gut*. 49:182-9
103. Kaplan SJ, Hayes WC, Mudan P, Lelli JL, White AA (1985) Monitoring the healing of a tibial osteotomy in the rabbit treated with external fixation. *J Orthop Res*. 3:325-30
104. Kashii Y, Uchida M, Kirito K, Tanaka M, Nishijima K, Toshima M, Ando T, Koizumi K, Endoh T, Sawada K, Momoi M, Miura Y, Ozawa K, Komatsu N (2000) A member of Forkhead family transcription factor, FKHL1, is one of the downstream molecules of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt activation pathway in erythropoietin signal transduction. *Blood*. 96:941-9
105. Kawasaki N, Haishima Y, Ohta M, Itoh S, Hyuga M, Hyuga S, Hayakawa T (2001) Structural analysis of sulfated N-linked oligosaccharides in erythropoietin. *Glycobiology*. 11:1043-9
106. Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, Schemitsch EH, Giannoudis PV (2008) Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury*. 39:S45-57
107. Kertesz N, Wu J, Chen TH, Sucov HM, Wu H (2004) The role of erythropoietin in regulating angiogenesis. *Dev Biol*. 276:101-10
108. Kirker-Head CA, Gerhart TN, Schelling SH, Hennig GE, Wang E, Holtrop ME (1995) Long-term healing of bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2. *Clin Orthop Relat Res*. 318:222-30
109. Krantz SB (1991) Erythropoietin. *Blood*. 77:419-34
110. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-5
111. Lee DY, Cho TJ, Kim JA, Lee HR, Yoo WJ, Chung CY, Choi IH (2008) Mobilization of endothelial progenitor cells in fracture healing and distraction osteogenesis. *Bone*. 42:932-41
112. Lee SW, Padmanabhan P, Ray P, Gambhir SS, Doyle T, Contag C, Goodman SB, Biswal S (2009) Stem cell-mediated accelerated bone healing observed with in vivo molecular and small animal imaging technologies in a model of skeletal injury. *J Orthop Res*. 27:295-302
113. Lee-Huang S (1984) Cloning and expression of human erythropoietin cDNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 81:2708-12
114. Lenehan TM, Balligand M, Nunamaker DM, Wood FEJ (1985) Effect of EHDP on fracture healing in dogs. *J Orthop Res*. 3:499-507
115. Lewallen DG, Chao EY, Kasman RA, Kelly PJ (1984) Comparison of the effects of compression plates and external fixators on early bone-healing. *J Bone Joint Surg Am*. 66:1084-91
116. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z, et al. (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82:7580-4
117. Lind PM, Lind L, Larsson S, Orberg J (2001) Torsional testing and peripheral quantitative computed tomography in rat humerus. *Bone*. 29:265-70
118. Lu C, Miclau T, Hu D, Hansen E, Tsui K, Puttlitz C, Marcucio RS (2005) Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *J Orthop Res*. 23:1300-7

119. Lüllmann-Rauch R (2006) Taschenlehrbuch Histologie. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart
120. Maluf NS (1954) History of blood transfusion. *J Hist Med Allied Sci.* 9:59-107
121. Manigrasso MB, O'Connor JP (2004) Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma.* 18:687-95
122. Martin V, Liu D, Fueyo J, Gomez-Manzano C (2008) Tie2: a journey from normal angiogenesis to cancer and beyond. *Histol Histopathol.* 23:773-80
123. McCormick D, Yu C, Hobbs C, Hall PA (1993) The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation-associated antigens. *Histopathology.* 22:543-7
124. Megas P (2005) Classification of non-union. *Injury.* 36:S30-7
125. Memisoglu K, Kesemenli CC (2009) Re: Development of a femoral non-union model in the mouse. *Injury.* 40:467
126. Miyake T, Kung CK, Goldwasser E (1977) Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem.* 252:5558-64
127. Morgan EF, Mason ZD, Chien KB, Pfeiffer AJ, Barnes GL, Einhorn TA, Gerstenfeld LC (2009) Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone.* 44:335-44
128. Muller J, Schenk R, Willenegger H (1968) Experimental studies on the development of reactive pseudarthroses on the canine radius. *Helv Chir Acta.* 35:301-8
129. Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y, Oikawa S, Ono K, Takaoka K (1994) Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res.* 9:651-9
130. Narhi LO, Arakawa T, Aoki KH, Elmore R, Rohde MF, Boone T, Strickland TW (1991) The effect of carbohydrate on the structure and stability of erythropoietin. *J Biol Chem.* 266:23022-6
131. Nunamaker DM, Perren SM (1979) A radiological and histological analysis of fracture healing using prebending of compression plates. *Clin Orthop Relat Res.* 138:167-74
132. Nunamaker DM, Richardson DW, Butterweck DM, Provost MT, Sigafos RD (1986) A new external skeletal fixation device that allows immediate full weightbearing: Application in the horse. *Vet Surg.* 15:1345-55
133. Nunamaker DM, Richardson DW, Butterweck DM (1991) Mechanical and biological effects of plate luting. *J Orthop Trauma.* 5:138-45
134. Nunamaker DM (1998) Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* 355:S56-65
135. Oetgen ME, Merrell GA, Troiano NW, Horowitz MC, Kacena MA (2008) Development of a femoral non-union model in the mouse. *Injury.* 39:1119-26
136. Ogilvie M, Yu X, Nicolas-Metral V, Pulido SM, Liu C, Ruegg UT, Noguchi CT (2000) Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. *J Biol Chem.* 275:39754-61
137. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR

- (1987) Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 2:595-610
138. Patel NS, Sharples EJ, Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Britti D, Yaqoob MM, Thiemermann C (2004) Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia/reperfusion in the mouse kidney in vivo. *Kidney Int.* 66:983-9
139. Peng Z, Tuukkanen J, Zhang H, Jämsä T, Väänänen HK (1994) The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. *Bone.* 15:523-32
140. Perren SM, Huggler A, Russenberger M, Allgower M, Mathys R, Schenk R, Willenegger H, Muller ME (1969) The reaction of cortical bone to compression. *Acta Orthop Scand Suppl.* 125:19-29
141. Peter CP, Cook WO, Nunamaker DM, Provost MT, Seedor JG, Rodan GA (1996) Effect of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs. *J Orthop Res.* 14:74-9
142. Peters A, Schell H, Bail HJ, Hannemann M, Schumann T, Duda GN, Lienau J (2010) Standard bone healing stages occur during delayed bone healing, albeit with a different temporal onset and spatial distribution of callus tissues. *Histol Histopathol.* 25:1149-62
143. Puech B, Cameli M, Chancrin JL, Pierre C, Dufour M, Elizagaray A (1990) Biointegration of massive bone allografts: imaging and histological studies in cat. *Biomaterials.* 11:75-8
144. Raab DM, Smith EL, Crenshaw TD, Thomas DP (1990) Bone mechanical properties after exercise training in young and old rats. *J Appl Physiol.* 68:130-4
145. Rezaeian F, Wettstein R, Egger JF, Sandmann F, Rücker M, Tobalem M, Vollmar B, Menger MD, Harder Y (2010) Erythropoietin-induced upregulation of endothelial nitric oxide synthase but not vascular endothelial growth factor prevents musculocutaneous tissue from ischemic damage. *Lab Invest.* 90:40-51
146. Rhinelander FW (1974) Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 105:34-81
147. Rodriguez-Merchan EC, Forriol F (2004) Nonunion: general principles and experimental data. *Clin Orthop Relat Res.* 419:4-12
148. Rossant J, Nagy A (1995) Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat Med.* 1:592-4
149. Richardson DW, Nunamaker DM (1991) Evaluation of plate luting, using an in vivo ovine osteotomy model. *Am J Vet Res.* 52:1468-73
150. Roush JK, Wilson JW (1990) Effects of plate luting on cortical vascularity and development of cortical porosity in canine femurs. *Vet Surg.* 19:208-14
151. Rueter A, Trentz O, Wagner M (2003) *Unfallchirurgie.* 2. Auflage. Elsevier. München
152. Schaffer M, Schier R, Napirei M, Michalski S, Traska T, Viebahn R (2007) Sirolimus impairs wound healing. *Langenbecks Arch Surg.* 392:297-303
153. Scharf HP, Rüter A, Pohlemann T, Marzi I, Kohn D, Günther KP (2009) *Orthopädie und Unfallchirurgie: Facharztwissen nach der neuen Weiterbildungsordnung.* 1. Auflage. Elsevier. München
154. Schenk RK, Willenegger HR (1977) Histology of primary bone healing: modifications and limits of recovery of gaps in relation to extent of the defect (author's transl). *Unfallheilkunde.* 80:155-60

155. Schiebler TH, Schmidt W (2003) *Anatomie*. 8. Auflage. Springer. Berlin
156. Schiebler TH, Korf HW (2007) *Anatomie*. 10. Auflage. Springer. Berlin
157. Sepodes B, Maio R, Pinto R, Sharples E, Oliveira P, McDonald M, Yaqoob M, Thiemermann C, Mota-Filipe H (2006) Recombinant human erythropoietin protects the liver from hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transpl Int*. 19:919-26
158. Sigurdson UE, Reikeras O, Utvag SE (2009) External fixation compared to intramedullary nailing of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop*. 80:375-9
159. Silva M, Benito A, Sanz C, Prosper F, Ekhterae D, Nuñez G, Fernandez-Luna JL (1999) Erythropoietin can induce the expression of bcl-x(L) through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines. *J Biol Chem*. 274:22165-9
160. Stafford HJ, Roberts MT, Oni OO, Hay J, Gregg P (1994) Localisation of bone-forming cells during fracture healing by osteocalcin immunocytochemistry: an experimental study of the rabbit tibia. *J Orthop Res*. 12:29-39
161. Steen H, Fjeld TO, Bjerkreim I, Tevik A, Aldegheri R, Trivella G (1988) Limb lengthening by diaphyseal corticotomy, callus distraction, and dynamic axial fixation. An experimental study in the ovine femur. *J Orthop Res*. 6:730-5
162. Steen H, Fjeld TO (1989) Lengthening osteotomy in the metaphysis and diaphysis. An experimental study in the ovine tibia. *Clin Orthop Relat Res*. 247:297-305
163. Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saadeh PB, Greenwald JA, Spector JA, Gittes GK, Longaker MT (2000) VEGF expression in an osteoblast-like cell line is regulated by a hypoxia response mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*. 278:C853-60
164. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV Jr, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH (2002) Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:9656-61
165. Strong ML, Wong-Chung J, Babikian G, Brody A (1992) Rotational remodeling of malrotated femoral fractures: a model in the rabbit. *J Pediatr Orthop*. 12:173-6
166. Teitelbaum SL, Ross FP (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet*. 4:638-49
167. Terjesen T, Johnson E (1986) Effects of fixation stiffness on fracture healing. External fixation of tibial osteotomy in the rabbit. *Acta Orthop Scand*. 57:146-8
168. Thomann KD, Schröter F, Grosser V (2009) *Orthopädisch-unfallchirurgische Begutachtung: Praxis der klinischen Begutachtung*. 1. Auflage. Elsevier. München
169. Toombs JP, Wallace LJ, Bjorling DE, Rowland GN (1985) Evaluation of Key's hypothesis in the feline tibia: an experimental model for augmented bone healing studies. *Am J Vet Res*. 46:513-8
170. Tremain N, Korkko J, Ibberson D, Kopen GC, DiGirolamo C, Phinney DG (2001) MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages. *Stem Cells*. 19:408-18
171. Turner CH, Burr DB (1993) Basic biomechanical measurements of bone: A tutorial. *Bone*. 14:595-608

172. Utvag SE, Grundnes O, Reikeras O (1994) Healing of segmental and simple fractures in rats. *Acta Orthop Scand.* 65:559-63
173. Volpon JB (1994) Nonunion using a canine model. *Arch Orthop Trauma Surg.* 113:312-7
174. Wang L, Chopp M, Teng H, Bolz M, Francisco MA, Aluigi DM, Wang XL, Zhang RL, Chrsitensen S, Sager TN, Szalad A, Zhang ZG (2011) Tumor necrosis factor alpha primes cerebral endothelial cells for erythropoietin-induced angiogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 31:640-7
175. Westenbrink BD, Ruifrok WP, Voors AA, Tilton RG, van Veldhuisen DJ, Schoemaker RG, van Gilst WH, de Boer RA (2010) Vascular endothelial growth factor is crucial for erythropoietin-induced improvement of cardiac function in heart failure. *Cardiovasc Res.* 87:30-9
176. Westenfelder C, Biddle DL, Baranowski RL (1999) Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors. *Kidney Int.* 55:808-20
177. Wildemann B, Schmidmaier G, Ordel S, Stange R, Haas NP, Raschke M (2003) Cell proliferation and differentiation during fracture healing are influenced by locally applied IGF-I and TGF-beta1: comparison of two proliferation markers, PCNA and BrdU. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 65:150-6
178. Willie BM, Blakytyn R, Glöckelmann M, Ignatius A, Claes L (2011) Temporal Variation in Fixation Stiffness Affects Healing by Differential Cartilage Formation in a Rat Osteotomy Model. *Clin Orthop Relat Res.* [Epub ahead of print]
179. Wingerter S, Calvert G, Tucci M, Tsao A, Russell G, Benghuzzi H (2007) Comparison of two different fixation techniques for a segmental defect in a rat femur model. *J Invest Surg.* 20:149-55
180. Ylä-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J (2007) Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol.* 49:1015-26
181. Zachos TA, Bertone AL, Wassenaar PA, Weisbrode SE (2007) Rodent models for the study of articular fracture healing. *J Invest Surg.* 20:87-95
182. Zhu W, Murrell GA, Lin J, Gardiner EM, Diwan AD (2002) Localization of nitric oxide synthases during fracture healing. *J Bone Miner Res.* 17:1470-7

7. Abkürzungs- / Abbildungs- / Tabellenverzeichnis

7.1 Abkürzungsverzeichnis

∅	Durchmesser
%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius
®	Registered Trademark
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
μA	Mikroampere
μCT	Mikrocomputertomographie
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μMol	Mikromol
μMRT	Mikro-Magnetresonanztomographie
μPET	Mikro-Positronen-Emissions-Tomographie
A	Ampère
Abb.	Abbildung
A. dest.	Destilliertes Wasser (Aqua destillata)
Ak	Antikörper
ANOVA	Analysis Of Variance
APS	Ammoniumpersulfat
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
AS	Aminosäure
ASIF	Association for the Study of Internal Fixation
Asn	Asparagin
Bcl 2	B-Cell Lymphoma 2
B.Cl.Ar	Knöchernen Kallusfläche (Bone Callus Area)
BFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BFU-E	Erythroid Burst Forming Unit
BHK	Baby Hamster Kidney
Bis	Bis-Acrylamid
BMPs	Bone Morphogenic Proteins
BRP	Biological Reference Preparation
BRU	Bone Remodeling Unit
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff

ca.	circa
CD	Clusters of Differentiation
cm	Zentimeter
CERA	Continuous Erythropoietin Receptor Activator
Cg.CI.Ar	Knorpelige Kallusfläche (Cartilage Callus Area)
CHO	Chinese Hamster Ovary
CFU-E	Erythroid Colony Forming Unit
CI.Ar	Kallusfläche (Callus Area)
CRC	Collaborative Research Center zwischen dem AO Research Institute, Davos, Schweiz und der AO Foundation sowie der Universität des Saarlandes
CREB	cAMP-Response-Element-Binding-Protein
CT	Computertomographie
Cu-Sulfat	Kupfersulfat
DAB	Diaminobenzidin
d.h.	das heißt
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EPO	Erythropoietin
EPOR	Erythropoietin-Rezeptor
ESA	Erythropoiesis Stimulating Agents
et al.	et alii / et aliae
etc.	et cetera
EZM	Extrazellulärmatrix
Fb.CI.Ar	Bindegewebige Kallusfläche (Fibrous Callus Area)
FDA	Food and Drug Association
g	Gramm
G	Erdschwerebeschleunigung (Standardwert $G = 9,80665 \text{ m/s}^2$)
g/dl	Gramm pro Deziliter
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HIF- α	α -Untereinheit des Hypoxie-induzierten Faktors
HIF- β	β - Untereinheit des Hypoxie-induzierten Faktors; auch: Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator bzw. ARNT
Histo	Histologie
HPF	High Power Field
HWZ	Halbwertszeit
i.d.R.	in der Regel
IE	Internationale Einheit
IE/kg	Internationale Einheit pro Kilogramm

IGF	Insulin-like Growth Factor
INN	International Nonproprietary Names
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
i.p.	intraperitoneal
JAK-2	Januskinase-2
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
keV	Kiloelektronen Volt (1 keV = $1.60217646 \times 10^{-16}$ Joule)
kg	Kilogramm
KNa-Tartrat	Kaliumnatriumtartrat
lp/mm	Linienpaare pro Millimeter
M	Mittelwert
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-Activated-Protein-Kinase
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
Min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mm ³	Biege Widerstand [m ⁴] / maximalen Radius [m]
mm ⁴	Quadrat des Abstands eines Flächenelements [mm ²] zum Flächeninhalt eines Flächenelements [mm ²]
ms	Millisekunden
mU/ml	Milliunits pro Milliliter
N	Stickstoff
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
O	Sauerstoff
ODD	Oxygen-Dependent Degradation Domain
o.g.	oben genannte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PEG	Polyethylenglykol
PMOI	Polar Moment Of Inertia (= polarer Torsionswiderstand) [mm ⁴]
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PS	Periost-Stripping

PS+	Periost-Stripping wurde durchgeführt
PS-	Periost-Stripping wurde nicht durchgeführt
PVDF	Polyvinylidendifluorid
pVHL	Produkt des von-Hippel-Lindau Tumorsuppressorgens
rhBMP-2	rekombinantes humanes Bone Morphogenic Protein 2
rhEPO	rekombinantes humanes Erythropoietin
ROI	Region of Interest
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Ser	Serin
SH2	Src homology 2
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannte
STAT-5	Signal Transducer and Activator of Transcription 5
Tab.	Tabelle
TBS-T-Puffer	TRIS-gepuffertes salziges Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF β	Transforming Growth Factor beta
TRIS	Tris-hydroxymethylaminomethan
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vs	versus
W	Watt
WB	Western Blot
x	Multiplikationszeichen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

7.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Operationsinstrumente
- Abb. 2: Fixierung des Beines während der Operation
- Abb. 3: Hautschnitt über einen medio-patellaren Zugang und Sicht auf das Ligamentum patellae

- Abb. 4: Markraumeröffnung im Bereich der Fossa intercondylaris nach Luxation der Patella
- Abb. 5: Bestimmung der Markraumlänge mit einer Spritzkanüle
- Abb. 6: Einbringung der abgeflachten Spritzkanüle
- Abb. 7: Kürzung der Spritzkanüle entsprechend der zuvor angebrachten Längenmarkierung
- Abb. 8: Aufsicht auf die Fossa intercondylaris nach Einbringung der Spritzkanüle
- Abb. 9: Reposition und Refixation der Patellarsehne mit Verschluss des Kniegelenks
- Abb. 10: Hautnaht
- Abb. 11: Eröffnung des lateralen Zugangsweges
- Abb. 12: Stumpfe Freilegung des Femurs
- Abb. 13: Eröffnung des Operationsfeldes zur Clip-Implantation
- Abb. 14: Bohrung des distalen Bohrlochs für den Clip
- Abb. 15: Distale Clip-Implantation und Messung für das proximale Bohrloch
- Abb. 16: Bohrung des proximalen Bohrlochs
- Abb. 17: Vollständige Clip-Implantation und Biegung der dorsalen Enden nach innen
- Abb. 18: Knochen mithilfe der Fräsen zirkulär um den Pin osteotomieren
- Abb. 19: Defektspalt von 1,8 mm induziert
- Abb. 20: Spannungsfreie Adaptation der Muskulatur
- Abb. 21: Hautnaht
- Abb. 22: Schematische Skizze zur Erklärung des polaren Torsionswiderstands
- Abb. 23: Schematische Skizze der histologischen Auswertungsparameter
- Abb. 24: Hämoglobinwerte der einzelnen Gruppen mit bzw. ohne EPO-Behandlung
- Abb. 25: Röntgenaufnahme der osteotomierten Mäusefemora direkt postoperativ und 10 Wochen nach der Operation
- Abb. 26: Volumen in mm^3 des hoch mineralisierten Knochens in der μCT -Auswertung
- Abb. 27: Volumen in mm^3 des niedrig mineralisierten Knochens in der μCT -Auswertung
- Abb. 28: Dreidimensionale mikrocomputertomographische Darstellung des Osteotomiespalts
- Abb. 29: Dreidimensionale mikrocomputertomographische Darstellung der knöchernen Überbrückung des Osteotomiespalts
- Abb. 30: Knochendichte in Abschnitten des Defektspalts mit hoch mineralisiertem Knochen
- Abb. 31: Knochendichte in Abschnitten des Defektspalts mit niedrig mineralisiertem Knochen
- Abb. 32: Mikrocomputertomographisch berechneter polarer Torsionswiderstand als biomechanischer Parameter
- Abb. 33: Im Rahmen der histologischen Auswertung gemessene Kallusfläche
- Abb. 34: Histologische Analyse der drei Kallusanteile Knochen-, Knorpel- und Bindegewebe innerhalb des Osteotomiespalts im Verhältnis zur Gesamtkallusfläche
- Abb. 35: Histologische Untersuchung der Überbrückung des Osteotomiespalts (Überbrückungsscore)
- Abb. 36: Sagittale longitudinale histologische Femur-Schnittpräparate in der Masson-Goldner-Färbung
- Abb. 37: Sagittale longitudinale immunhistologische Femur-Schnittpräparate
- Abb. 38: Western Blot Analyse mit densitometrischer Auswertung der Expression von VEGF

- Abb. 39: Western Blot Analyse mit densitometrischer Auswertung der Expression von PCNA
Abb. 40: Western Blot Analyse mit densitometrischer Auswertung der Expression von Tie-2
Abb. 41: Diagramm zur potenziellen Wirkung von EPO in atrophen Pseudarthrosen

7.3 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1 Versuchsprotokoll
Tab. 2 Zusammensetzung der für die Western-Blot-Analysen verwendeten Sammel- und Trenngele
Tab. 3 Primärantikörper für die Western-Blot-Analysen
Tab. 4 Sekundärantikörper für die Western-Blot-Analysen
Tab. 5 Histomorphometrische Analyse der Gefäßdichte innerhalb des Osteotomiespalts
Tab. 6 Immunhistologische Analyse der VEGF- sowie PCNA-positiven Zellen innerhalb des Osteotomiespalts

8. Publikation

Die vorliegende Arbeit wird wie folgt publiziert:

Holstein JH, Orth M, Scheuer C, Tami A, Becker SC, Garcia P, Histing T, Mörsdorf P, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2011) Erythropoietin stimulates bone formation, cell proliferation, and angiogenesis in a femoral segmental defect model in mice. Bone (zur Publikation akzeptiert)

9. Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor des Instituts für Klinisch-Experimentellen Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes, sowie den Räumlichkeiten der AO Foundation in Davos, Schweiz, erstellt. Mein herzlicher Dank gilt:

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

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

Prof. Dr. med. Michael Menger. Für die Hilfe bei der Durchführung der Arbeit, seine produktiven Anmerkungen und für das großzügige Bereitstellen der Räumlichkeiten und Gerätschaften.

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

Dr. sc. techn. Andrea Tami. Für die intensive Hilfeleistung während der mikrocomputertomographischen Analysen in Davos, Schweiz, und seine sehr hilfreichen Erklärungen der technischen Hintergründe.

Dr. med. vet. Monika Frings. Für die Unterstützung und ihr Einverständnis zur Durchführung des Tierversuchs.

Ferner möchte ich mich bei allen Kollegen aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie in Homburg / Saar und der AO Foundation in Davos, Schweiz, für ein sehr angenehmes Arbeitsklima und die erstklassige Zusammenarbeit bedanken.