

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

---

**Forcierte physische Aktivität nach operativer  
Frakturstabilisierung hat im Mausmodell keinen  
Einfluss auf die Knochenbruchheilung**

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

---

vorgelegt von: Martin Fiedler  
geb. am: 29.11.1981 in Neunkirchen/Saar

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

**1. Gutachter:**

**2. Gutachter:**

**Jahr der Promotion: 2017**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
1.1 Zusammenfassung	3
1.2 Summary	4
<b>2. Einleitung</b>	<b>5</b>
2.1 Knochen	5
2.1.1 Morphologie	5
2.1.2 Histologie	5
2.1.3 Physiologie	8
2.2 Frakturheilung	9
2.2.1 Primäre Frakturheilung	9
2.2.2 Sekundäre Frakturheilung	10
2.3 Vascular endothelial growth factor (VEGF)	12
2.4 Frakturmodell	15
2.5 Physische Aktivität und Frakturheilung	18
2.6 Zielsetzung	20
2.7 Fragestellung	20
<b>3. Material und Methodik</b>	<b>21</b>
3.1 Intervention	21
3.1.1 Versuchstiere	21
3.1.2 Implantatentwicklung	21
3.1.3 Versuchsprotokoll	24
3.1.4 Operation	25
3.2 Zielkriterien und Auswertung	33
3.2.1 Biomechanik	33
3.2.2 Histomorphometrie	34
3.2.3 Western Blot	34
3.3 Statistik	35
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>36</b>
4.1 Postoperativer Verlauf	36
4.2 Laufstrecke	36
4.3 Makroskopie	37
4.4 Radiologie	37
4.5 Biomechanik	38
4.6 Histomorphometrie	39

## Inhaltsverzeichnis

---

4.7 Western Blot	40
<b>5. Diskussion</b>	<b>42</b>
5.1 Diskussion der Methoden	42
5.2 Diskussion der Ergebnisse	48
5.3 Schlussfolgerungen	51
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>53</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchmesser
°	Grad
°C	Grad Celsius
°/s	Grad pro Sekunde
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
%	Prozent
Abb.	Abbildung
ANOVA	analysis of variance
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese
ASBMR	American Society of Bone and Mineral Research
ASIF	Association for the Study of Internal Fixation
AZ	Aktenzeichen
BMP	bone morphogenetic protein
BRU	basic remodeling unit
BSA	bovines Serum-Albumin
CT	Computertomographie
d	Tag
D	Durchmesser
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
e.g.	for example
et al.	et alteri
FGF	fibroblast growth factor
FIFG	c-fos induced growth factor
flt	fms-like tyrosine kinase
flk	fetal liver kinase
g	Gramm
g	mittlere Erdbeschleunigung
IGF	insulin-like growth factor
IL	Interleukin
K	Kontrollgruppe
KG	Körpergewicht
km	Kilometer
km/d	Kilometer pro Tag
L	Länge

## Abkürzungsverzeichnis

---

LR	Laufradgruppe
mA	Milliampère
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mm/s	Millimeter pro Sekunde
mm <sup>2</sup> /mm	Quadratmillimeter pro Millimeter
MPa	Megapascal
MRT	Magnetresonanztomographie
mV	Millivolt
N	Newton
Nmm	Newtonmillimeter
Nmm/°	Newtonmillimeter pro Grad
PCNA	proliferating cell nuklear antigen
PDGF	platelet derived growth factor
PET	Positronenemissionstomographie
PIGF	placental growth factor
s	Sekunde
s.o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
TGF-β	transforming growth factor beta
VEGF	vascular endothelial growth factor
VPF	vascular permeability factor

# 1. Zusammenfassung

## 1.1 Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten wurde in vielfachen klinischen und experimentellen Arbeiten der Effekt von körperlicher Aktivität auf die Frakturheilung dargestellt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass physische Aktivität und mechanische Frakturbelastung einen entscheidenden Einfluss auf Verlauf und Qualität der Frakturheilung haben. Während bislang fast ausschließlich die Mechanobiologie im Frakturspalt als wichtiger Einflussfaktor hinsichtlich der Hemmung bzw. Beschleunigung der Knochenbruchheilung untersucht wurde, wurde die systemische Rolle körperlicher Aktivität während der Frakturheilung unseres Wissens nach nicht experimentell analysiert.

Ziel der hier vorgestellten Studie war es daher, interfragmentäre Relativbewegungen im Frakturspalt durch die Entwicklung einer rotations- und achsstabilen Osteosynthesetechnik für das Mäusefemur zu minimieren und somit den mechanobiologie-unabhängigen Effekt physischer Aktivität auf die Knochenbruchheilung an der Maus zu untersuchen.

Nach zwei- und fünfwöchigem täglichem Laufradtraining konnten wir in der histomorphometrischen und biomechanischen Auswertung des Frakturkallus weder eine Beschleunigung noch eine Hemmung der Frakturheilung beobachten.

Korrespondierend damit zeigten Western Blot Analysen des Kallus keine vermehrte Expression des Proliferationsmarkers PCNA und des angio- sowie osteogenen Wachstumsfaktors VEGF.

Somit ziehen wir die Schlussfolgerung, dass vermehrte körperliche Aktivität unter Ausschluss mechanobiologischer Einflussfaktoren keine Auswirkung auf die Knochenbruchheilung hat. Gleichzeitig unterstreichen unsere Ergebnisse den wichtigen Einfluss der Osteosynthesetechnik und relativieren die systemische Bedeutung körperlicher Aktivität auf die Frakturheilung.

## 1.2 Summary

The aim of the present study was to analyse the systemic biological effect of increased physical exercise on fracture healing. We used a very stable fracture fixation technique to minimise the biomechanical impact of exercise on the interfragmentary environment and thereby to focus on the systemic biological effect of exercise on bone repair. We feel that it is important to distinguish between the local biomechanical effect of exercise on the fracture gap and the systemic biological effect of exercise on the total organism, which includes e.g., changes in blood circulation, metabolic conditions, and tissue oxygenation.

Two groups of SKH mice were studied. Animals of the first group (n=36) were housed in cages supplied with a running wheel, while mice of the second group (n=37) were housed in standard cages for control. Using a closed femur fracture model, bone repair was analysed by histomorphometry and biomechanical testing at 2 and 5 weeks. At 2 weeks, we additionally evaluated the expression of the proliferation marker PCNA (proliferating cell nuclear antigen) and the angiogenic and osteogenic growth factor VEGF (vascular endothelial growth factor). To standardise the mechanical conditions in the fracture gap, we used an intramedullary compression screw for stable fracture fixation.

Each mouse of the exercise group run a mean total distance of 23.5 km after 2 weeks and 104.3 km after 5 weeks. Histomorphometric analysis of the size and the tissue composition of the callus could not reveal significant differences between mice undergoing exercise and controls. Accordingly, biomechanical testing showed a comparable torsional stiffness, peak rotation angle, and load at failure of the healing bones in the two groups. The expression of PCNA and VEGF did also not differ between mice of the exercise group and controls.

We conclude that increased exercise does not affect bone repair after stable fracture fixation.



## **2. Einleitung**

### **2.1 Knochen**

#### **2.1.1 Morphologie**

Unterteilt werden Knochen anhand ihrer Form in:

- lange Knochen
- kurze Knochen
- platte Knochen

Untersucht wurden für die vorliegende Arbeit lange Knochen, die auch Röhrenknochen genannt werden.

Ein Röhrenknochen setzt sich aus drei verschiedenen Bereichen zusammen:

- die längliche, schaffförmige Diaphyse
- die Epiphysen an den beiden Knochenenden
- die Metaphysen, gelegen zwischen Diaphyse und Epiphysen

Als Frakturlokalisierung diente in dieser Arbeit die Diaphyse des jeweiligen Knochens.

#### **2.1.2 Histologie**

Der Knochen gliedert sich histologisch in:

- eine äußere Substantia compacta (Kompakta), bestehend aus kortikalem Knochen
- eine innere Substantia spongiosa (Spongiosa), bestehend aus trabekulärem Knochen

Beim Menschen besteht die dicht gebaute Kompakta (Kortikalis) aus Osteonen beziehungsweise dem Havers-System. Es handelt sich hierbei um eine etwa 250 µm x 1 - 5 cm große funktionelle Einheit aus 2 - 3 µm dicken Knochenlamellen (Havers-Lamellen oder Speziallamellen), die konzentrisch um den Zentralkanal (Havers-Kanal) geschichtet sind. Im Zentralkanal verlaufende Blutgefäße (Havers-Gefäße) sind über seitliche Verzweigungen, die so genannten Volkmann-Kanäle, miteinander verbunden. Neben Gefäßen enthält der

Zentralkanal vegetative Nerven und Bindegewebe. Zwischen den Osteonen befinden sich, Reststücke von alten, teilweise abgebauten Havers-Systemen, die Schaltlamellen. Als äußere Generallamellen werden die an das Periost angrenzenden äußeren Lamellen als innere Generallamellen, die an die Spongiosa angrenzenden inneren Lamellen bezeichnet (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996).

Im Gegensatz zum Menschen besitzt die Maus eine recht primitive Knochenstruktur ohne Havers-System. Der Knochenumbau nach einer Knochenverletzung erfolgt über sogenannte Resorptionshöhlen. Diese entstehen in der Nähe der Fraktur und füllen sich dann im Laufe der Frakturheilung mit Osteoblasten auf (NUNAMAKER, 1998).

Die Spongiosa ist aus einem komplexen System aus Knochenbälkchen und Knochenplatten aufgebaut, in deren Zwischenräumen sich das Knochenmark befindet (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996).

Beim Menschen wird das Knochenmark während der Embryogenese als sogenanntes rotes blutbildendes Mark angelegt. Ab dem 5. - 6. Fetalmonat findet hier die Hämatopoese statt. Die Hauptaufgabe des Knochenmarks ist die Beteiligung an der Blutneubildung. In den langen Röhrenknochen wird das rote Mark ab dem vollendeten ersten Lebensjahr zunehmend von gelbem Fettmark ersetzt. Aufgrund dessen wird die Blutbildung im höheren Lebensalter weitestgehend von den kurzen und platten Knochen übernommen. Im Bedarfsfall (chronische Hypoxie und Anämie) ist eine Umkehr dieser Entwicklung möglich (BÖCKER et al., 2004).

Das Knochenmark besteht histologisch aus hämatopoetischen Zellen, Stroma und Blutgefäßen. Das Stroma enthält zudem Retikulozyten, Lipozyten und Osteoblasten. Die von den Retikulozyten gebildete Matrix bindet hämatopoetische Wachstumsfaktoren und Interleukine und präsentiert sie in biologisch aktiver Form den hämatopoetischen Zellen (BÖCKER et al., 2004).

Unterteilt wird das Knochengewebe grundsätzlich in zwei verschiedene Arten:

- Geflecht- und Faserknochen
- Lamellenknochen

Im Zuge der Knochenneubildung entsteht zunächst Geflechtknochen, welcher sich im weiteren Verlauf zu Lamellenknochen umdifferenziert (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996).

Geflechtknochen, dessen Kollagenfaserbündel unregelmäßig in der Grundsubstanz verlaufen, weist im Vergleich zu Lamellenknochen, einen größeren Zellreichtum, eine diffuse Verteilung der Osteozyten und einen geringeren Anteil anorganischer Bestandteile auf. Das Wachstum des Lamellenknochens erfolgt entlang mechanischer Kraftlinien, das des Geflechtknochens entlang der Kapillaren (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996).

Lamellen sind 3 - 7 µm dicke Knochenschichten, bestehend aus Osteozyten und parallel dazu verlaufenden, schraubenförmig angeordneten Kollagenfasern. Diese Bauweise ermöglicht die Modellierung von Zug- und Druckbelastungen auf den Knochen (BUCHER, WARTENBERG, 1997).

In den Knochenhöhlen (Lacunae osseae), welche von zwei Lamellen begrenzt werden, liegen die Osteozyten. Von dort aus ziehen radiär Knochenkanälchen (Caniculi ossei) mit eingeschlossenen Osteozytenfortsätzen zu benachbarten Osteonen. Sie stellen somit eine Verbindung zum Havers-Kanal her (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996).

Der Knochen enthält neben den Osteozyten mesenchymale Vorläuferzellen, Osteoblasten und Osteoklasten. Die mesenchymalen Vorläuferzellen befinden sich sowohl an der inneren und äußeren Knochenoberfläche als auch in den Havers-Kanälen. Sie wandeln sich bei entsprechender, vor allem hormoneller Stimulation in Osteoblasten um. Diese wiederum bilden an der Oberfläche der Knochenbälkchen neue Knochengrundsubstanz, welche im weiteren Verlauf mit Hilfe der alkalischen Phosphatase mineralisiert wird. (Beim Menschen dauert dies in der Spongiosa etwa 25, in der Kortikalis etwa 35 Tage) (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996).

Inaktive Osteoblasten liegen der Knochenoberfläche auf. Sie werden deswegen auch Belegzellen (Lining Cells) genannt, welche sich, nachdem sie vollständig von neu produziertem Osteoid umschlossen wurden, in Osteozyten umwandeln (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996).

Im Gegensatz zu den anderen Knochenzellen mit mesenchymalem Ursprung entwickeln sich Osteoklasten aus hämatopoetischen Vorläuferzellen. In Form von mehrkernigen Riesenzellen dienen sie dem Abbau mineralisierter Knochengrundsubstanz. Sie liegen in der Kortikalis, in der sie Gefäßkanäle für neue Osteonen formen, oder in Vertiefungen an der Knochenoberfläche (Howship-Lakunen). Ein Osteoklast baut in dergleichen Zeit dieselbe Menge an Knochen ab, die ca. 100 - 150 Osteoblasten produzieren (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996).

Die Knochengrundsubstanz (Interzellulärsubstanz) besteht zu 65 % aus anorganischen und zu 35 % aus organischen Komponenten. Der anorganische Anteil setzt sich vor allem aus Knochenmineralien wie Calciumphosphaten und Calciumcarbonaten zusammen. Der organische Anteil besteht zu etwa 90 % aus Kollagen und zu etwa 10 % aus nicht-kollagenen Proteinen und Lipiden (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996).

Außer den knorpeligen Gelenkflächen wird der Knochen von Periost überzogen. Untergliedert wird es funktionell in zwei unterschiedliche Schichten:

- Stratum fibrosum
- Stratum osteogenicum

Durch Kollagenfaserbündel (Sharpey-Fasern) ist das Stratum fibrosum mit der Kortikalis teils fest, teils locker verbunden. Die Kollagenfasern der Sehnen und Bänder strahlen in das Stratum fibrosum ein, um die Zugbelastung auf den Knochen an deren Ansatz zu verringern. Die Zugkräfte verteilen sich somit auf eine größere Ansatzfläche (SCHIEBLER, SCHMIDT, 2003).

Das Stratum osteogenicum, welches auch als Kambiumschicht bezeichnet wird, enthält kleine Gefäße und Kapillaren, die die Ernährung der Knochensubstanz durch die Versorgung der Volkmann- und Havers-Gefäße der Kompakta ermöglichen. Es enthält außerdem sensible Nervenfasern, die die Schmerzempfindungen im Bereich des Periosts hervorrufen und trägt zur Neubildung von Knochengrundsubstanz durch Differenzierung der Osteoblasten während des periostalen Knochenwachstums bei. Nach Abschluss des physiologischen Knochenwachstums nimmt diese Differenzierung wieder ab, kann aber im Rahmen der Frakturheilung (periostale Knochenneubildung) wieder einsetzen (SCHIEBLER, SCHMIDT, 2003).

### **2.1.3 Physiologie**

Zu den Hauptaufgaben des Knochens zählen:

- Stützfunktion
- Strukturfunktion
- Mobilitätsfunktion
- Calciumhomöostase

Sich ständig wiederholende Formations- und Resorptionsvorgänge bilden die grundlegende Voraussetzung für die Aufrechterhaltung dieser Funktionen. Sie sind durch die folgenden Abläufe gekennzeichnet:

- Wachstum
- Modeling
- Remodeling

Das Knochenwachstum findet hauptsächlich an den Epiphysenfugen statt. Es führt dort zu einem Längenzuwachs sowie zu einer Zunahme der Knochenmasse an sich (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996).

Unter Modeling versteht man die Fähigkeit des Knochens auf spezifische mechanische Erfordernisse mit gezielten Formveränderungen zu reagieren. Während diese Fähigkeit vor allem während der Wachstumsphase stark ausgeprägt ist, nimmt sie hingegen mit zunehmendem Alter ab (FLEISCH, 1997).

Im Gegensatz hierzu beschreibt das Remodeling dynamische Umbauprozesse im Knochen. Diese sind belastungsunabhängig und führen daher auch zu keiner Zunahme an Knochenvolumen. Ziel dieses lebenslang ablaufenden Vorganges ist beispielsweise die Reparatur von Mikrofrakturen. Coupling bezeichnet das ständige Gleichgewicht von Knochenresorption und neuem Knochenanbau. Die dazugehörige morphologische Struktur wird als Basic Remodeling Unit (BRU) bezeichnet (FLEISCH, 1997).

## **2.2 Frakturheilung**

### **2.2.1 Primäre Frakturheilung**

Hierunter versteht man die Vereinigung von Frakturfragmenten unter Umgehung einer äußeren Kallusmanschette. Man unterscheidet in Abhängigkeit von der absoluten Frakturspaltweite (beim Menschen größer oder kleiner als etwa 0,2 mm) zwei Formen:

- Kontaktheilung
- Spaltheilung

Bei der Kontaktheilung erfolgt die Knochenregeneration durch longitudinal einwachsende Osteone. Osteoklasten bilden dabei einen so genannten Resorptionskanal in der Kortikalis

des gegenüberliegenden Frakturfragmentes. Dieser Kanal ermöglicht es, den Osteoblasten durch Wiederauffüllung Lamellenknochen zu bilden. Die Knochenfragmente werden auf diese Weise direkt miteinander vereinigt (RÜTER et al., 2003).

Im Gegensatz dazu wird bei der Spalthheilung der Frakturspalt innerhalb von 3 - 4 Wochen zunächst mit Geflechtknochen aufgefüllt. In einer zweiten Phase wird dieser dann anschließend zu Lamellenknochen, welcher parallel zur Schaftachse ausgerichtet ist, umgewandelt (RÜTER et al., 2003).

Für die primäre Frakturheilung müssen einige Voraussetzungen erfüllt sein. Hierzu zählen unter anderem eine ausreichende Vaskularität sowie eine mechanische Frakturstabilität. Durch Kapillaraussprossung wird das medulläre Gefäßsystem innerhalb weniger Tage wiederhergestellt. Im Allgemeinen wird dies nur nach osteosynthetischer Frakturstabilisierung erreicht (RÜTER et al., 2003).

Alle bisher an der Maus durchgeführten Frakturmodelle führen zu einer sekundären Frakturheilung. Ob unter den oben genannten Voraussetzungen an der Maus ebenfalls eine primäre Knochenbruchheilung möglich ist, ist bislang nicht bekannt (HILTUNEN et al., 1993; MANIGRASSO, O'CONNOR, 2004; HISTING et al., 2011).

### **2.2.2 Sekundäre Frakturheilung**

Die meisten Frakturen heilen durch eine sekundäre Frakturheilung aus. Diese geschieht, wenn keine anatomische Reposition der Knochenfragmente erreicht wird. Die sekundäre Knochenbruchheilung gliedert sich in fünf, teilweise überlappende Phasen:

- Frakturphase
- Entzündungsphase
- Granulationsphase
- Phase der Kallushärtung
- Phase des Modeling und Remodeling

Die Frakturphase beginnt mit dem Einsetzen einer Gewalteinwirkung auf den Knochen und das ihn umgebende Weichteilgewebe und endet zu dem Zeitpunkt, in dem die gesamte Kraft durch den brechenden Knochen und das umliegende Gewebe aufgehoben wird. Verletzt werden dabei Kortikalis, Spongiosa, Knochenmark, Periost und in unterschiedlichem

Ausmaß angrenzende Weichteile. Dadurch bildet sich ein Hämatom im Frakturbereich (RÜTER et al., 2003).

Unmittelbar danach kommt es zu einer kaskadenartigen Proliferation, Migration und Differenzierung von überwiegend pluripotenten Stammzellen, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen sowie zu einer überschießenden Kapillaraussprossung. Die Rolle der Mastzellen ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht eindeutig geklärt. Vermutet wird, dass Mastzellen durch Ausschüttung von Heparin und heparinähnlichen Substanzen sowohl die lokale Vaskularisation als auch die Zellmigration beeinflussen. Unterschiedliche Studien belegen, dass diese vom hämatopoetischen System abstammenden Zellen außerdem als Vorläuferzellen der Osteoklasten angesehen werden können (BOYLE et al., 2003; RÜTER et al., 2003; TEITELBAUM, ROSS, 2003).

Die Angiogenese scheint in dieser frühen Phase der Frakturheilung eine wichtige Rolle für die Zellmigration und die Zellnutrition zu spielen. Des Weiteren wird darüber diskutiert, ob mesenchymale Vorläuferzellen direkt dem einsproßenden Gefäßendothel entstammen (TREMAIN et al., 2001). Eine „Flussumkehr“ bewirkt während der Entzündungsphase eine gesteigerte Gewebsperfusion. Die Kortikalis wird unter physiologischen Bedingungen zentrifugal von etwa zwei Drittel der Markraumgefäße ernährt. Ist die Kortikalis hingegen frakturiert, erfolgt die Gefäßperfusion hauptsächlich über die periostalen Gefäße. Posttraumatisch erreicht die Durchblutung beim Menschen in der zweiten Woche ein Maximum mit Werten um das Sechsfache der Norm (RÜTER et al., 2003).

Zwischen der periostalen Kambiumschicht und der Knochenoberfläche befinden sich so genannte Spindelzellen. Diese unterscheiden sich morphologisch nicht von normalen Fibroblasten. Da aus ihnen allerdings Osteoblasten hervorgehen können, werden sie auch als Osteoprogenitorzellen bezeichnet (RÜTER et al., 2003).

Die Entzündungsphase ist nach etwa 2 - 3 Tagen abgeklungen. Im entstandenen Hämatom lässt sich bereits ein Netzwerk, bestehend aus Fibrin und Kollagenfibrillen, nachweisen. Durch Granulationsgewebe, welches aus Lymphozyten, Fibroblasten, neu gebildetem Kollagen und zahlreichen Kapillaren besteht, erfolgt ein rascher Ersatz dieses Netzwerks. Innerhalb von Kollagenfibrillen und in unmittelbarer Nähe zu den Fibroblasten finden sich bereits in diesem frühen Stadium der Frakturheilung Mineraldepots. Ein so genannter weicher Kallus entsteht durch erste Granulationsgewebsbrücken zwischen den Knochenfragmenten. Des Weiteren wird in dieser Phase mit dem Abbau der abgestorbenen Fragmentenden durch Osteoklasten begonnen. Subperiostal findet eine direkte

Knochenneubildung durch Osteoblasten (desmale Ossifikation oder „primäre Kallusreaktion“) statt. Zur gleichen Zeit differenzieren sich aus mesenchymalen Vorläuferzellen Chondroblasten (RÜTER et al., 2003).

Ebenfalls zeitgleich wandert ein sogenanntes Blastem aus dem Markraum in das Frakturhämatom ein und füllt den Frakturspalt als medullärer Kallus. Im Gegensatz zum Menschen, bei dem nach etwa 3 - 4 Wochen die Fragmente durch Bindegewebe und Knorpel weich miteinander verbunden sind (RÜTER et al., 2003), ist dieses Stadium an der Maus bereits nach 10 - 14 Tagen zu beobachten (MANIGRASSO, O'CONNOR, 2004).

Die zunehmende Mineralisation der Grundsubstanz führt zur „Aushärtung des Kallus“. Das hierfür notwendige Calcium stammt aus den Mitochondrien hypertropher Chondrozyten. Während der reife Lamellenknochen entlang mechanischer Belastungslinien verläuft, bildet sich der entstehende Geflechtknochen (enchondrale Ossifikation) entlang neuer Kapillarsprossen. Zeitgleich erfolgt frakturspaltfern eine periostale Osteoblastenproliferation. Dies führt zu einer Ablagerung von Geflechtknochen zwischen der Diaphysenoberfläche und dem Periost (intramembranöse Ossifikation) (RÜTER et al., 2003).

Die BRU ist auch während der Frakturheilung für den Abbau des nekrotischen Knochens sowie für den Umbau des mineralisierten Knorpels in Knochen verantwortlich. Calcifizierter Knorpel wird folglich durch Osteoklasten resorbiert und durch osteoblastär gebildeten Geflechtknochen ersetzt (RÜTER et al., 2003).

Dieser, im Zuge der Kallusbildung entstandene, Geflechtknochen wird entsprechend seiner mechanischen Belastung in Lamellenknochen umgewandelt (Modeling). In der letzten Phase der Knochenbruchheilung wird die normale Knochenkontur und der ursprüngliche Markraum wiederhergestellt (Remodeling) (RÜTER et al., 2003).

### **2.3 Vascular endothelial growth factor (VEGF)**

Für die Weiterdifferenzierung mesenchymaler Zellen zu Chondrozyten spielt das Einsprießen neuer Blutgefäße während der sekundären Frakturheilung (enchondrale Ossifikation) eine große Rolle (CAPLAN, 1990; CHIM et al., 2013; SARAN et al., 2014; STEGEN et al., 2015). Im Rahmen von Studien zur sekundären Frakturheilung konnte der sogenannte vascular endothelial growth factor (VEGF) als Schlüsselmolekül für die Angiogenese identifiziert werden (BRIGHTON, HUNT, 1997; FERGUSON et al., 1999). VEGF scheint darüber hinaus auch Einfluss auf die Formierung und Mineralisierung des



neuen Knochens zu nehmen (GEIGER et al., 2005; KLEIN et al., 2015; HISTING et al., 2016).

Erstmals isoliert und als vascular permeability factor (VPF) publiziert, wurde VEGF von Senger et al. 1983 (SENGER et al., 1983). Durch unterschiedliche Arbeitsgruppen konnte in den Folgejahren gezeigt werden, dass VEGF einer der wichtigsten Überlebens- und Wachstumsfaktoren des Gefäßendothels ist (FERRARA, HENZEL, 1989; GOSPODAROWICZ et al., 1989; TISCHER et al., 1989; HANKENSON et al., 2011; CHIM et al., 2013). Bis heute ließen sich mehrere Untertypen des VEGF, wie etwa VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, FIGF (c-fos-induced growth factor) oder PlGF (placental growth factor) 1, 2 und 3, identifizieren (PLATE, WARNKE, 1997). Die genaue Funktion dieser Subtypen wurde in diversen Studien untersucht (JOUKOV et al., 1997; JUSSILA, ALITALO, 2002; SCHOPPMANN et al., 2002). Allgemein lässt sich zusammenfassend festhalten, dass grundsätzlich alle Mitglieder der VEGF-Familie die Fähigkeit besitzen, Endothelzellen zu stimulieren (NICOSIA, 1998).

Im menschlichen Organismus entstehen durch alternatives Splicen des VEGF-Genes fünf verschiedene Isoformen (HOUCK et al., 1991; FERRARA, KEYT, 1997). Diese werden nach der Länge ihrer Aminosäureketten unterschieden (VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 und VEGF206) und haben somit auch unterschiedliche Eigenschaften. Die kürzeren Formen VEGF121, VEGF145 und VEGF165 sind weitgehend frei diffundierend und zeigen ein sehr hohes angiogenes Potential. VEGF189 und VEGF206 haben im Gegensatz dazu eine sehr viel stärkere Affinität zu Molekülkomplexen aus Kohlenhydraten und Proteinen der Zelloberfläche und der extrazellulären Matrix (Heparin-Sulfat-enthaltende Proteoglykane). Aufgrund dessen diffundieren sie entsprechend schlechter und besitzen ein geringeres angiogenes Potential (WEINDEL et al., 1992). Die meisten Zellen exprimieren verschiedene VEGF-Isoformen gleichzeitig. Vorherrschend während der Frakturheilung sind jedoch die Splicevarianten VEGF121 und VEGF189 (PETERSEN et al., 2001).

Charakterisiert und identifiziert wurden VEGF-Zell-Rezeptoren erstmals 1990 (VAISMAN et al., 1990). Bei ihnen handelt es sich um intrazelluläre membranständige Rezeptoren, die der Untergruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren angehören. Unterschieden werden drei Subtypen: VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase 1 [flt-1]) (DECKERS et al., 2000), VEGFR-2 (fetal liver kinase 1 [flk-1]) (TISCHER et al., 1989; YANG, CEPKO, 1996) und VEGFR-3 (fetal liver kinase 4 [flt-4]) (JUSSILA et al., 1998). VEGF121 und VEGF165 werden von VEGFR-1, VEGF145 zusätzlich von VEGFR-2 gebunden (NEUFELD et al., 1999).

VEGF-Rezeptoren werden sowohl von Endothelzellen als auch von unterschiedlichen anderen Zelltypen wie etwa Trophoblasten (CHARNOCK-JONES et al., 1994), Monozyten (BARLEON et al., 1996), Lymphgefäß-Zellen (JUSSILA et al., 1998), renalen Mesangiumzellen (TAKAHASHI et al., 1995), hämatopoetischen Stammzellen (KATOH et al., 1995), Megakaryozyten, retinalen Vorläuferzellen (CHAVAKIS et al., 2002), Tumorzellen, Osteoblasten und Chondrozyten (PUFE et al., 2002) exprimiert.

Im Rahmen der Organogenese konnte belegt werden, dass VEGF ein essentieller Wachstumsfaktor des kardiovaskulären Systems ist (CARMELIET et al., 1996; FERRARA et al., 1996). Außerdem konnte gezeigt werden, dass VEGF im Erwachsenenalter eine wichtige Rolle während physiologischer Reproduktions- und Regenerationsprozesse wie etwa dem weiblichen Ovarialzyklus (LEE et al., 1997; TORRY et al., 1996) oder im Rahmen der Wund- und Frakturheilung (FERRARA, 1999) spielt. Eine vermehrte Expression von VEGF konnte aber auch bei pathologischen Prozessen wie beispielsweise der diabetischen Retinopathie (CHAVAKIS et al., 2002), der altersbedingten Makuladegeneration, der rheumatischen Arthritis (PUFE et al., 2001) und vor allem der Tumorgenese (KAKEJI et al., 2002; PAYDAS et al., 2002; RESTUCCI et al., 2002) nachgewiesen werden. Des Weiteren scheint VEGF durch Stimulation der NO-Synthase in Endothelzellen eine Gefäßdilatation im Rahmen der physiologischen Herz-Kreislauf-Regulation zu bewirken (YANG et al., 1996).

Obwohl VEGF eine große Bedeutung hinsichtlich der verschiedenen Reparationsprozesse der Knochenbruchheilung hat (FERGUSON et al., 1999; YANG et al., 2012; OGILVIE et al., 2012; HANKENSON et al., 2015), lässt es sich im unfrakturierten Knochen nicht nachweisen (PUFE et al., 2002). In der frühen Phase der Frakturheilung wird VEGF vor allem für die Revaskularisierung des Frakturareals verantwortlich gemacht. Innerhalb dieser Zeit wird VEGF primär von Thrombozyten innerhalb des Frakturhämatoms produziert (MALONEY et al., 1998). Einsproßende Endothelzellen sowie migrierende Entzündungszellen, wie Granulozyten, Makrophagen und Monozyten, produzieren daraufhin Wachstumsfaktoren wie FGF (fibroblast growth factor) (BAIRD et al., 1985), PDGF (platelet derived growth factor) (SHIMOKADO et al., 1985), TGF- $\beta$  (transforming growth factor-beta) (SAADEH et al., 1999) sowie Interleukin 1 und 6 (EINHORN et al., 1995). Diese stimulieren wiederum die Produktion von VEGF (BOLANDER, 1992; TOHIDNEZHAD et al., 2014), um damit erneut Entzündungszellen anzulocken (EINHORN et al., 1995). Ferner wird die Expression und Freisetzung von VEGF durch BMP-2 (bone morphogenetic protein 2) (BONNARENS, EINHORN, 1984) und Prostaglandine (SAADEH et al., 2000) angeregt.

VEGF bewirkt im Rahmen der Frakturheilung weiterhin die Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten, Osteoblasten und Chondroblasten aus mesenchymalen Vorläuferzellen (HARADA et al., 1995; CARLEVARO et al., 2000; GERBER, FERRARA, 2000; HU, OLSEN, 2016; BARATI et al., 2016). Im reifen Zustand exprimieren Osteo- und Chondroblasten selbst VEGF und stimulieren so die umgebenden Zellen (CARLEVARO et al., 2000). Mit dem Grad der Chondrozytenhypertrophie nimmt die VEGF-Produktion und die Gefäßneubildung zu. Vom Knochen ausgehende Blutgefäße wachsen gleichzeitig in den avaskulären Knorpel ein und führen vermutlich zur Migration von Chondroblasten, welche die Knorpelmatrix abbauen und dadurch die Formierung neuen Geflechtknorpels ermöglichen (CARLEVARO et al., 2000; GERBER et al., 1999; HARPER, KLAGSBRUN, 1999). Im Gegensatz dazu wird in ruhenden und proliferierenden Knorpelzellen kein VEGF gebildet (HARPER, KLAGSBRUN, 1999).

Tierexperimentelle Studien konnten belegen, dass eine Blockierung des VEGF-Rezeptors VEGFR-3 zu einer deutlichen Volumenminderung des knöchernen Kallus führt (STREET et al., 2002). Andererseits vermittelt die exogene Gabe von VEGF eine gesteigerte Osteoblastenaktivität und Kallusvaskularisierung (GEIGER et al., 2005).

## 2.4 Frakturmodelle

Erkenntnisse über die Physiologie der Knochenbruchheilung konnten in der Vergangenheit sowohl durch klinische Studien am Menschen als auch durch In-vitro-Studien gewonnen werden. Studien an Tiermodellen sind jedoch bis heute essentieller und unverzichtbarer Bestandteil der Frakturheilungsforschung (BIRGHAM-SADEGH, ORYAN, 2015). Zahlreiche Frakturmodelle wurden im Laufe der Jahre in diesem Zusammenhang an verschiedenen Säugetierarten entwickelt. Abhängig von Art und Fragestellung der Studie wurden Spezies unterschiedlichster Größe und Anatomie von Kleinnagetieren wie der Maus (HILTUNEN et al., 1993), bis hin zu Großtiersäugern wie beispielsweise dem Schaf (CHEAL et al., 1991; KIRKER-HEAD et al., 1995), als Versuchstiere ausgesucht. Darauf aufbauend versuchte man weitestgehend, Unterschiede in der Anatomie der Spezies sowie der entsprechenden Biologie der Knochenbruchheilung im Aufbau der Experimente und in der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen, da eine Übertragbarkeit der Studie auf den Menschen immer diskutiert werden muss (RHINELANDER, 1974).

Bestimmte Gene werden speziesabhängig zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert. Obwohl große Ähnlichkeiten im Genom der verschiedenen Säugetiere existieren, sollten daher in tierexperimentellen Studien speziesabhängige Unterschiede in der zeitlichen

Expression von Zytokinen immer Beachtung finden. Entsprechend sind Dosierung und Applikationszeitpunkt von Zytokinen im Rahmen dieser Studien stets zu diskutieren (NUNAMAKER, 1998).

Ein weiterer wichtiger Punkt für die Auswahl eines entsprechenden Tiermodells ist die unterschiedliche Response verschiedener Spezies auf Medikamente, da sie vollkommen unterschiedliche Metabolisierungspotentiale hinsichtlich bestimmter Wirkstoffe aufweisen. Aufgrund dieser Tatsache kommt es zu differenten Effekten der Medikamente auf den Organismus der jeweiligen Tierspezies. Eine Anpassung der Applikationsdosis ist somit zwingend erforderlich. Es wurde beispielsweise eine toxische Wirkung von nichtsteroidalen Antiphlogistika auf Katzen und Hunde nachgewiesen (HERRGESELL, 1967; JONES et al., 1992).

Auch das Alter der Versuchstiere hat einen entscheidenden Einfluss auf die Frakturheilung. Ein juveniler Knochen weist einen schnelleren Heilungsablauf als ein seniler Knochen auf (LU et al., 2005; LU et al., 2008; HISTING et al., 2013). Als Parameter für ein abgeschlossenes Knochenwachstum sollte ein Schluss der Wachstumsfuge radiologisch nachweisbar sein (NUNAMAKER, 1998).

Zahlreiche Tiermodelle wurden im Laufe der letzten Jahrzehnte für die Reproduktion und Analyse physiologischer und pathologischer Prozesse während der Frakturheilung entwickelt.

In jüngerer Vergangenheit haben sich zunehmend Kleintiermodelle, vor allem an der Maus, etabliert. Aufgrund geringer Beschaffungs-, Zucht- und Haltungskosten ist es möglich, große Versuchsgruppen zu realisieren. Das Genom der Maus ist in seiner Gesamtheit entschlüsselt. Dies bringt einen enormen Vorteil, was die Durchführung molekularbiologischer Studien betrifft, mit sich. Für keine andere Spezies existiert folglich ein derart großes Spektrum verfügbarer transgener Stämme sowie spezifischer Antikörper (ROSSANT, NAGY, 1995). Die Maus und ebenso die Ratte besitzen, wie bereits oben ausgeführt, im Gegensatz zu größeren Tieren eine recht primitive Knochenstruktur ohne Havers-System. Aufgrund dessen sollte dieses anatomische Merkmal hinsichtlich der Übertragbarkeit von Studienergebnissen auf den Menschen stets Beachtung finden. Die diffizile Anatomie der Maus stellt eine große Herausforderung in der Entwicklung von Frakturmodellen dar. Die Frakturierung und osteosynthetische Stabilisierung eines Mäusefemurs mit einer Länge von etwa 15 mm und einem Durchmesser von rund 1,5 mm erfordert ein hohes Maß an operativem Geschick (HOLSTEIN et al., 2007).

In den bis zum heutigen Zeitpunkt publizierten Frakturmodellen an der Maus wurde die Knochenbruchheilung vor allem an Rippe, Tibia und Femur untersucht (BOURQUE et al., 1992; HILTUNEN et al., 1993; NAKASE et al., 1994; MANIGRASSO, O'CONNOR, 2004; HOLSTEIN et al., 2007).

Aufgrund der ungünstigen Anatomie eignen sich Frakturmodelle an Rippen schlecht für biomechanische Testungen. Sie fanden daher fast ausschließlich für Genexpressionsanalysen Verwendung (NAKASE et al., 1994; ITO et al., 1999; YAMAGIWA et al., 1999).

Die Tibia sowie das Femur eignen sich hingegen gut für biomechanische Testungen. Die anatomischen Vorteile des Mäusefemur gegenüber der Tibia liegen in einem einheitlichen runden Querschnitt bei guter Weichteildeckung (CHEUNG et al., 2003). Bei Tibia- und Femur-Frakturmodellen an Maus und Ratte wird primär zwischen geschlossener und offener Frakturierung unterschieden. Die geschlossenen Frakturmodelle lassen sich im Wesentlichen auf das von Bonnarens und Einhorn 1984 an der Ratte beschriebene Modell zurückzuführen (BONNARENS, EINHORN, 1984). Hierbei wird mit Hilfe einer stumpfen Guillotine ein standardisierter transverser Frakturverlauf unter minimalem Weichteilschaden erzeugt. Das entsprechende Modell an der Maus wurde von Hiltunen und Kollegen 1993 an der Tibia (HILTUNEN et al., 1993) sowie von Manigrasso und O'Connor 2004 am Femur publiziert (MANIGRASSO, O'CONNOR, 2004). Was die offene Femurfrakturierung betrifft, so wird hier meist ein lateraler longitudinaler Zugang gewählt, um den Knochen unter Sicht zu frakturieren bzw. zu osteotomieren (CHEUNG et al., 2003). Die Explantation des jeweiligen Knochens erfolgt nach definierten Zeitabschnitten. Die Knochenbruchheilung wird mit radiologischen, biomechanischen und histologischen Methoden analysiert. Für die Durchführung der biomechanischen Testung wird mehrheitlich eine Drei-Punkt-, Vier-Punkt- oder Rotationsmessung angewandt (HOLSTEIN et al., 2007).

Die intramedulläre Pin-Stabilisierung gilt als die am meisten im Mausmodell eingesetzte Osteosynthesetechnik. Ein großer Nachteil dieser Methode ist jedoch die unzureichende Rotationsstabilität im Frakturbereich. Ferner wurde wegen der schwierigen Reposition eine Frakturierung ursprünglich nur nach vorheriger Implantateinbringung durchgeführt (NUNAMAKER, 1998; RÜTER et al., 2003). Nach Entwicklung eines Fixateur externes (CHEUNG et al., 2003) sowie einer winkelstabilen Platten-Osteosynthese für das Mäusefemur (MATTHYS, PERREN, 2008) konnte hingegen eine suffiziente Stabilität im Frakturspalt erzielt werden. Nachteile im Gegensatz zur Marknagelung sind hierbei allerdings die offene Einbringung der genannten Implantate und damit die größere Invasivität des

Verfahrens sowie das höhere Implantatgewicht mit daraus folgender Behinderung der physiologischen Bewegungsabläufe der Maus (CHEUNG et al., 2003).

Um das „mechanical environment“ innerhalb des Frakturspaltes zu standardisieren, entwickelte unsere Arbeitsgruppe ein Verriegelungsmarknagel-Modell, in dem durch eine beidseitige Abflachung einer herkömmlichen Spritzkanüle erstmals eine rotationsstabile, geschlossene Osteosynthese erreicht wurde (HOLSTEIN et al., 2007). Vorteil gegenüber dem Fixateur externe bzw. der winkelstabilen Platten-Osteosynthese ist die deutlich niedrigere Invasivität dieser Technik. Für sie wird kein offener lateraler Zugang benötigt und damit unter anderem auch der Weichteilschaden minimiert. Unter Verwendung eines Führungsdrahtes ist zudem eine geschlossene Frakturierung ohne liegendes Implantat möglich (HOLSTEIN et al., 2007). In Weiterentwicklung dieses Modells wurde eine rotations- und zusätzlich achsstable intramedulläre Kompressionsschraube konzipiert, welche in der vorliegenden Arbeit für die Frakturstabilisierung verwendet wurde (HOLSTEIN et al., 2009b).

## 2.5 Physische Aktivität und Frakturheilung

Die meisten Gewebstypen bilden nach einer Verletzung Narbengewebe aus. Der frakturierte Knochen jedoch ist in der Lage, seine ursprüngliche Funktion und Morphologie wieder uneingeschränkt herzustellen. Dieser komplexe, postnatale Entwicklungsprozess gliedert sich im Wesentlichen in folgende zeitliche Abschnitte: Entzündungsreaktion, Zellkondensation, Chondrogenese, Angiogenese und Ossifikation sowie Knochen-Remodeling (MICLAU, HELMS, 2000; FERGUSON et al., 1999). Im Bereich des Frakturspaltes finden sich unmittelbar nach Frakturierung des Knochens Entzündungszellen, Makrophagen und Thrombozyten. Zytokine wie PDGF, TGF- $\beta$ , IL-1 oder IL-6 führen zu einer Proliferation mesenchymaler Zellen im Bereich des Periostes (MICLAU, HELMS, 2000; FERGUSON et al., 1999; BRIGHTON, HUNT, 1991; EINHORN et al., 1995; DERYNCK et al., 1998; BOLANDER 1992; NODA et al., 2009; VI et al., 2015). Diskutiert wird weiterhin, ob mesenchymale Zellen aus einsprossenden Gefäßendothelien, dem Knochenmark und dem umgebenden Weichteilgewebe einwandern (YOO, JOHNSTONE, 1999; BREITBART et al., 1998; CAPLAN, 1997; BARNES et al., 1999; BOSTROM et al., 1995; ONISHI et al., 1998). Mesenchymale Zellen und Osteoprogenitorzellen exprimieren BMP-2, BMP-3, BMP-4 und BMP-7, welche allesamt einen wichtigen Einfluss auf Zellproliferation, Zellapoptose und Zelldifferenzierung haben (MICLAU, HELMS, 2000; BOSTROM et al., 1995; ONISHI et al., 1998). Von großer Bedeutung für die Weiterdifferenzierung von mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten (enchondrale Ossifikation) ist das Einsprießen neuer Blutgefäße (CAPLAN, 1990). Für die Angiogenese konnten im Rahmen der Frakturheilung folgende

Schlüsselmoleküle identifiziert werden: FGFs, IGFs, TGF- $\beta$  und VEGF (FERGUSON et al., 1999; BRIGHTON, HUNT, 1991). VEGF scheint zudem die Formierung und Mineralisierung neuen Knochens direkt zu beeinflussen (GEIGER et al., 2005; AMIZUKA et al., 2003; HANKENSON et al., 2015).

Verschiedene Studien konnten belegen, dass all diese Prozesse unmittelbar mit den mechanischen Gegebenheiten (Mechanobiologie) im Frakturspalt zusammenhängen (CARTER et al., 1998). Bei insuffizienter Frakturstabilisierung kann die Frakturheilung unter übermäßiger Belastung verzögert oder sogar ganz verhindert werden. Unter konsequenter Immobilisierung hingegen heilt der Knochen meist komplikationslos aus (BUCKWALTER, GRODZINSKY, 1999). Mehrere experimentelle Arbeiten konnten trotz alledem nachweisen, dass kontrollierte Belastung die Kallusbildung stimuliert und die enchondrale Ossifikation sowie das Knochen-Remodeling beschleunigt (SARMIENTO et al., 1977; KENWRIGHT et al., 1991; KERSHAW et al., 1993; GOODSHIP, KENWRIGHT, 1985). Die Volumenzunahme des Kallus, eine erhöhte Zellproliferation sowie eine verbesserte Matrixsynthese scheinen dabei eine wichtige Rolle zu spielen. Im Gegensatz dazu, scheint mechanische Belastung innerhalb der Frühphase der Frakturheilung (Entzündungsphase) die Knochenregeneration zu behindern (BUCKWALTER, GRODZINSKY, 1999). Sowohl hinsichtlich Beschleunigung als auch hinsichtlich einer Verzögerung der Frakturheilung werden als verantwortlicher Faktor Relativbewegungen im Frakturspalt angesehen. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass Qualität und Quantität der Relativbewegungen im Frakturspalt den entscheidenden Ausschlag für den Erfolg der Knochenbruchheilung geben (CLAES et al., 1998; STECK et al., 2011).

Neben den mechanischen Gegebenheiten im Frakturspalt sind für die Knochenregeneration auch die Expression verschiedener Wachstumsfaktoren (s.o.) und die frühzeitige Bereitstellung einer suffizienten Blutversorgung von entscheidender Bedeutung (BLOOR, 2005). Von besonderem Interesse ist hierbei, dass die Regulierung wichtiger Wachstumsfaktoren, wie etwa VEGF, in verschiedenen Geweben durch die physische Aktivität des Organismus beeinflusst wird (CLAES et al., 1998; BLOOR, 2005; HOLSTEIN et al., 2011). Während zahlreiche Arbeitsgruppen die Rolle der mechanischen Gegebenheiten im Frakturspalt untersucht haben, wurde in der vorliegenden Arbeit der systemische Einfluss körperlicher Aktivität auf die Frakturheilung experimentell untersucht.

## 2.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, nach Minimierung interfragmentärer Relativbewegungen durch eine suffiziente Frakturstabilisierung, den mechanobiologieunabhängigen Einfluss physischer Aktivität auf die Knochenbruchheilung zu untersuchen. Hierzu sollten Daten anhand tierexperimenteller Versuche nach einem bewährten Tiermodell gewonnen werden.

## 2.7 Fragestellung

Die durchgeführten tierexperimentellen Studien sollten die Frage beantworten, inwiefern physische Aktivität mittels Laufradtraining, nach Femurschaftfraktur am Mausmodell, einen Einfluss auf die Knochenbruchheilung hat. Es war dabei bisher nicht bekannt, ob initiale physische Aktivität den Ablauf der Frakturheilung am Extremitätenknochen hemmt, fördert oder unbeeinflusst lässt.

Die Nullhypothese lautet:

*„Physische Aktivität mittels Laufradtraining (Verum) hat im Mausmodell nach Femurschaftfraktur gegenüber fehlendem Laufradtraining (Kontrollen) keinen Einfluss auf die Knochenbruchheilung.“*

Die Knochenbruchheilung wurde 2 und 5 Wochen nach Frakturierung mit Hilfe radiologischer, biomechanischer, histomorphometrischer sowie proteinbiochemischer Methoden am postmortalen Knochen-Präparat untersucht.



## **3. Material und Methodik**

### **3.1 Intervention**

#### **3.1.1 Versuchstiere**

Als Versuchstiere wurden ausgewachsene, haarlose Mäuse (SKH1-Hr) mit einem Körpergewicht von 30 - 40 g verwendet. Die Tierhaltung der Mäuse erfolgte unter klimatisierten Raum-Bedingungen (Lufttemperatur: 22 - 24 °C, relative Luftfeuchtigkeit 60 %) im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes bei 12-stündigem Tag- / Nachtrhythmus in Einzelkäfigen. Wasser sowie Standarddiätfutter der Firma Altromin (Altromin 1320, Altromin, Lage, Deutschland) wurden in Pelletform ad libidum bereitgestellt.

#### **3.1.2 Implantatentwicklung**

Standardisierte Versuchsbedingungen stellen eine grundlegende Voraussetzung für die tierexperimentelle Untersuchung von physiologischen und pathophysiologischen Abläufen der Frakturheilung dar. Rotationsinstabile Osteosynthesetechniken sind daher für Frakturstudien ungeeignet.

Aus diesem Grund wurde, um interfragmentäre Relativbewegungen im Frakturspalt zu minimieren und damit den Versuchstieren bereits am Operationstag ein regelmäßiges „Laufradtraining“ zu ermöglichen, eine minimalinvasive rotations- und distraktionsstabile Osteosynthesetechnik entwickelt (HOLSTEIN et al., 2009b).

Bei dieser Technik wird die erwünschte Distraktions- und Rotationsstabilität durch eine Frakturkompression mittels einer intramedullären Zugschraube (Länge [L] 18,0 mm; Durchmesser [D] 0,5 mm; Abb. 1 A und B) erzielt (Entwicklung mit Unterstützung des AO Developmental Institute, Davos, Schweiz). Die Titanschraube besitzt einen konischen Schraubenkopf ( $D_{\max}$  0,8 mm) sowie ein distales Gewinde (D 0,5; L 4,0 mm). Am Gewindeende wurde die Schraube mit einem longitudinalen Lumen (L 1,0 mm; D 0,2 mm) versehen, in das ein Führungsdraht eingebracht werden kann (HOLSTEIN et al., 2009b).

Für die biomechanische Testung des Knochen-Implantat-Verbundes wurde eine spezielle Testapparatur konstruiert, die eine Distraktions- und Rotationstestung ermöglicht. In Vorversuchen wurden ex vivo Mäusefemora in der Schaftmitte frakturiert und danach

entweder mit der intramedullären Zugschraube, dem Verriegelungsnagel (HOLSTEIN et al., 2007) oder mittels Pin (MANIGRASSO et al., 2004) stabilisiert und gegeneinander getestet. Zur Evaluierung der biomechanischen Eigenschaften von unfrakturierten Knochen wurden zudem intakte Femora biomechanisch getestet (HOLSTEIN et al., 2009b).

Für die Distractionstestung wurden die Knochen im Bereich der Kondylen an einem Messsensor und im Bereich des Schenkelhalses an einem Testschlitten verankert. Durch den mit konstanter Geschwindigkeit (0,145 mm/s) fahrenden Testschlitten wurde eine ansteigende Distractionskraft auf den Knochen ausgeübt, die mit Hilfe des Messsensors quantifiziert wurde. Die entsprechenden Weg-Distractionkurven ergaben eine vergleichbare Distractionsteifigkeit der unfrakturierten und der mittels Schraubenosteosynthese versorgten frakturierten Knochen. Die frakturierten Femora, die durch einen Verriegelungsnagel oder einen Pin stabilisiert wurden, wiesen hingegen eine signifikant verminderte Distractionsteifigkeit auf (Abb. 2 A) (HOLSTEIN et al., 2009b).

Um die Rotationssteifigkeit der Proben zu analysieren, wurden die Knochenenden longitudinal an zwei frei rotierenden Achsen mit Knochenzement fixiert. Während die erste Achse mit konstanter Geschwindigkeit (0,42 °/s) rotiert wurde, wurde an der zweiten Achse das rotationsabhängige Drehmoment über einen Messsensor quantifiziert. Die durch eine Zugschraubenosteosynthese stabilisierten Femora wiesen eine signifikant höhere Rotationssteifigkeit auf als die mittels Verriegelungsnagel oder Pin fixierten Knochen. Keine Osteosynthesetechnik erreichte hingegen die Rotationssteifigkeit von unfrakturierten Knochen (Abb. 2 B) (HOLSTEIN et al., 2009b).

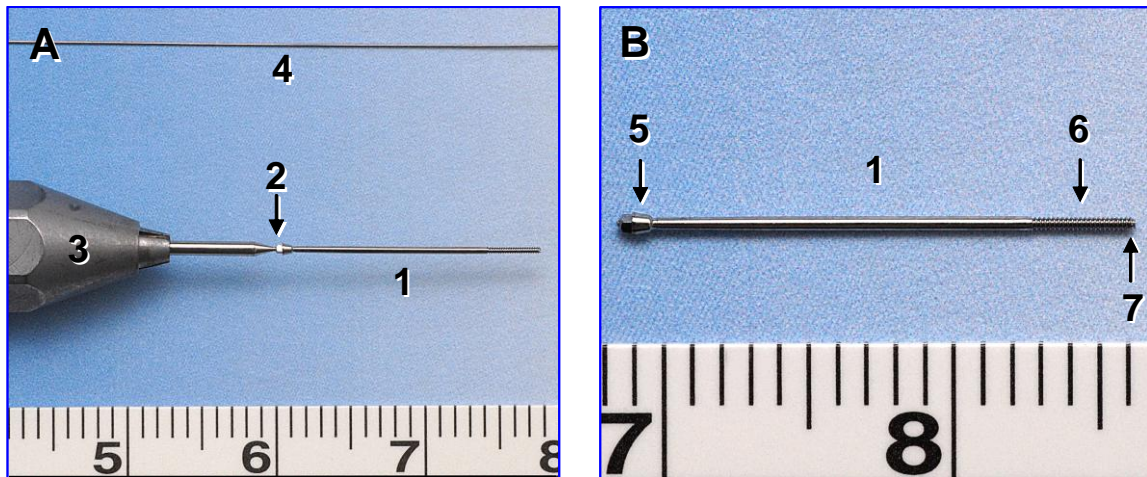


Abb. 1 A und B: Intramedulläre Zugschraube (1). Die Titanschraube ist mit einem konischen Schraubenkopf (5) und einem distalen Gewinde (6) versehen. Am Gewindeende wurde die Schraube mit einem longitudinalen Lumen (7) ausgestattet, in das ein Führungsdraht (4) eingeführt werden kann. Über eine Sollbruchstelle (2) ist die Schraube mit dem Eindrehinstrumentarium (3) verbunden. Bei einem definierten Drehmoment kommt es zum Versagen der Sollbruchstelle, so dass alle Frakturen mit der gleichen Kompression verschraubt werden (HOLSTEIN et al., 2009b).

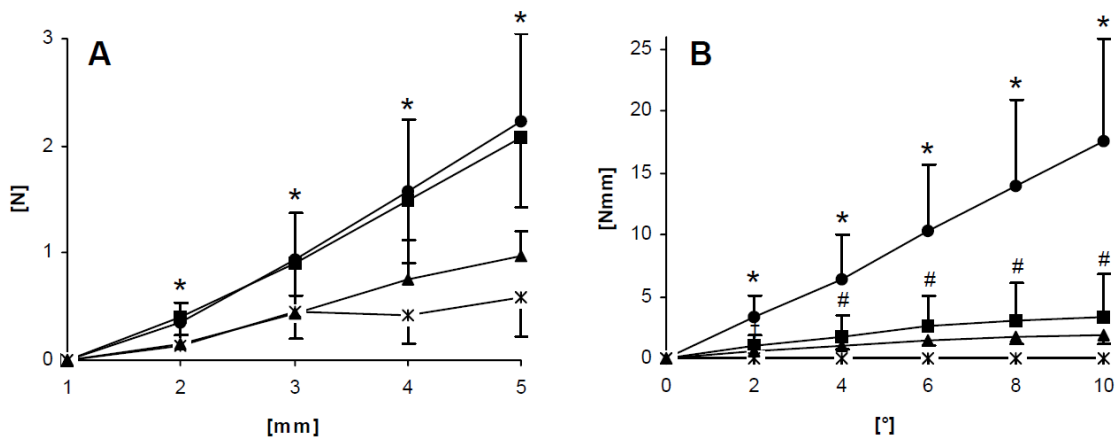


Abb. 2 A und B: Weg-Distraktionskurven (A) und Rotations-Drehmomentkurven (B) von unfrakturierten Knochen (Kreise) sowie von frakturierten Knochen, die mittels Schraubenosteosynthese (Rechtecke), mittels Verriegelungsnagel (Dreiecke) oder mittels Pin (Kreuze) stabilisiert wurden. \* $p < 0.05$  vs. Verriegelungsnagel und Pin (A), bzw. \* $p < 0,05$  vs. Schraube, Verriegelungsnagel und Pin (B); # $p < 0.05$  vs. Verriegelungsnagel und Pin (B). Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben (HOLSTEIN et al., 2009b).

### 3.1.3 Versuchsprotokoll

Der Tierversuch wurde nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und nach Genehmigung durch die zuständige Behörde (Dezernat 5, Saarpfalz-Kreis, 66406 Homburg/Saar) unter dem AZ K110/180-07 am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Für die aktuelle Studie wurden ausgewachsene SKH-1Hr Mäuse (30 - 40 g Körpergewicht [KG]) zunächst für zwei Tage in Käfigen mit Laufrad (ausgestattet mit einem Wegstrecken-Tachometer) gehalten (Abb. 3). Als Einschlusskriterium in die Verumgruppe wurde eine freiwillige Laufstrecke von 0,5 km/d festgelegt. Tiere der Verumgruppe wurden über den gesamten Versuchszeitraum weiter in Käfigen mit Laufrädern gehalten. Tiere der Kontrollgruppe wurden in Käfigen ohne Laufrad gehalten. Die Tiere beider Versuchsgruppen wurden nach 2 oder 5 Wochen durch eine Überdosis Barbiturate getötet. Vor Tötung der Tiere wurde eine Röntgenaufnahme des operierten Femurs angefertigt (Inside IP-21 high resolution dental films, Kodak, Rochester, NY, USA). Die Knochen wurden nach Tötung der Tiere vom Weichteilgewebe befreit und nach Implantatentfernung für die histomorphometrische, biomechanische und proteinbiochemische Auswertung präpariert (Tab. 1).



Abb. 3: Laufrad mit Streckentachometer (Pfeil)

In die Studie wurden insgesamt 73 Tiere eingeschlossen.

Standzeit	Laufрад		Kontrollen	
	2 Wochen	5 Wochen	2 Wochen	5 Wochen
Radiologie	n=20	n=16	n=22	n=15
Biomechanik	n=8	n=8	n=9	n=7
Histomorphometrie	n=8	n=8	n=9	n=8
Western Blot	n=4	n=0	n=4	n=0

Tab. 1: Versuchsprotokoll

### 3.1.4 Operation

Die Operation wurde im Tieroperationssaal des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes durchgeführt. Hierbei wurden alle Versuchstiere in gleicher, standardisierter Weise operiert.

Die Versuchstiere wurden mittels intraperitonealer Injektion einer Narkoselösung, bestehend aus 1 ml Xylazin 2 % (Rompun, Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland), 0,75 ml Ketamin 0,1 % (Ketavet, Pharmacia, Erlangen, Deutschland) und 8,25 ml physiologischer Kochsalzlösung, narkotisiert. Appliziert wurde eine Dosis von 0,01 ml pro 1 g Körpergewicht. Nach etwa 10 Minuten waren die Versuchstiere hierdurch für eine Dauer von etwa 30 min analgosediert.

Unter Analgosedierung erfolgte eine sorgfältige Desinfektion der vorderen rechten Kniegelenksregion mit Softasept N (Braun, Melsungen, Deutschland). Danach wurde unter semisterilen Bedingungen nach manueller Fixation des Beines (Abb. 4) eine etwa 4 mm lange Längsinzision der Haut medial der Patella durchgeführt (Abb. 5 und Abb. 6). Anschließend wurde nach Eröffnung der Kniegelenkskapsel die Patella nach lateral luxiert (Abb. 7). Über die Fossa intercondylaris wurde daraufhin der Markraum des Femurs mit einer Injektionsnadel ( $\varnothing = 0,55$  mm) eröffnet (Abb. 8). Eine weitere Injektionsnadel ( $\varnothing = 0,4$  mm) wurde konsekutiv transmedullär durch die proximale Kortikalis im Bereich des Trochanter major perkutan ausgeleitet (Abb. 8). Über das Nadellumen wurde ein Wolfram-Führungsdraht ( $\varnothing = 0,2$  mm) vorgeschoben (Abb. 9). Aufgrund der hohen Härte dieses Drahtes (Vickers-Härteindex: 500, Zugfestigkeit: 1920 MPa) wird eine Verbiegung während

der nachfolgenden Frakturierung weitestgehend vermieden. Mit Hilfe einer Guillotine-ähnlichen Drei-Punkt-Vorrichtung (Abb. 10 A und B, Abb. 11 und Abb. 12) wurde nach Entfernung der Nadel das Femur bei liegendem Führungsdraht frakturiert. Im Anschluss daran wurde die Zugschraube über den Führungsdraht vorgeschoben und mit einem definierten Drehmoment eingedreht (Abb. 13 und Abb. 14). Nach Reposition der Patella (Abb. 15) und Verschluss der Wunde (Abb. 16) erfolgte die abschließende radiologische Kontrolle von Implantatlage und Fraktur (entsprechend AO/ASIF-Klassifikation Typ A2-3) (KOCH et al., 1990) (Abb. 17). Hierzu wurden seitliche Röntgenaufnahmen der betroffenen Femora in der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde der Universität des Saarlandes angefertigt (Dentalröntgengerät Heliodent DS, Sirona Dental Systems, Bensheim, Deutschland; Inside IP-21 high resolution dental films, Kodak, Rochester, USA; Entwickler Periomat plus, Dürr Dental, Bietigheim-Bissingen, Deutschland). Die Belichtungszeit der Aufnahmen betrug 0,08 s bei einer Stromstärke von 7 mA und einer Spannung von 60 mV.

Zur Linderung postoperativer Schmerzen wurden die Tiere durch eine subcutane Injektion von 0,05 ml Carprofen (Rimadyl, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) unmittelbar nach Beendigung der Operation analgesiert.

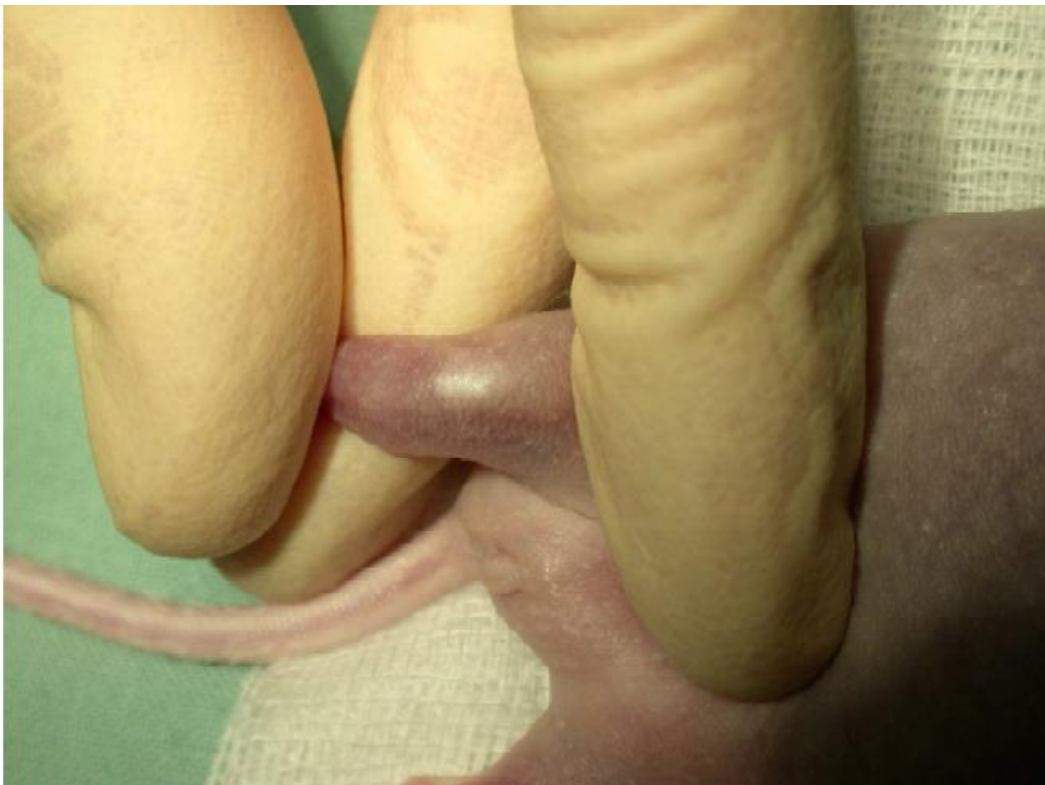


Abb. 4: Fixierung des Beines während der Operation (KLEIN, 2008)

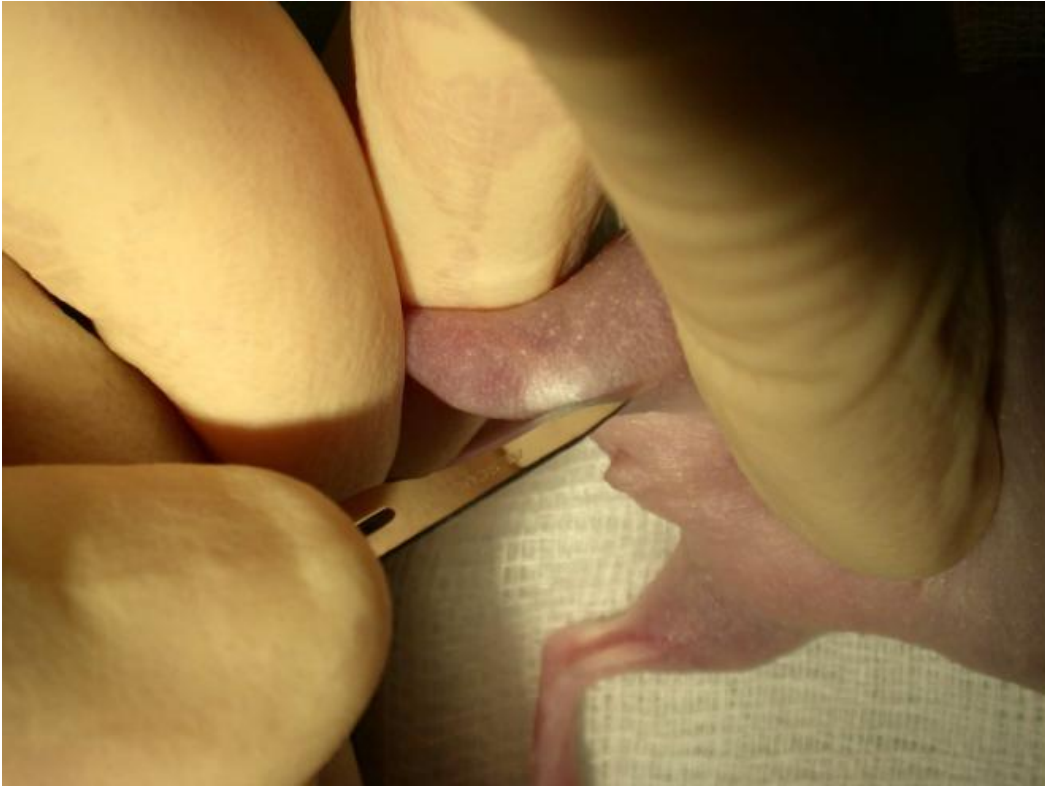


Abb. 5: Hautschnitt über einen mediopatellaren Zugang (KLEIN, 2008)



Abb. 6: Sicht auf das Ligamentum patellae (KLEIN, 2008)



Abb. 7: Sicht auf die Fossa intercondylaris nach Eröffnung der Kniegelenkscapseln und Luxation der Patella nach lateral



Abb. 8: Transmedulläre Einbringung einer Injektionsnadel nach Markraumeröffnung im Bereich der Fossa intercondylaris





Abb. 9: Wolfram-Führungsdraht im Markraum des Femurs nach Vorschieben über das Nadellumen

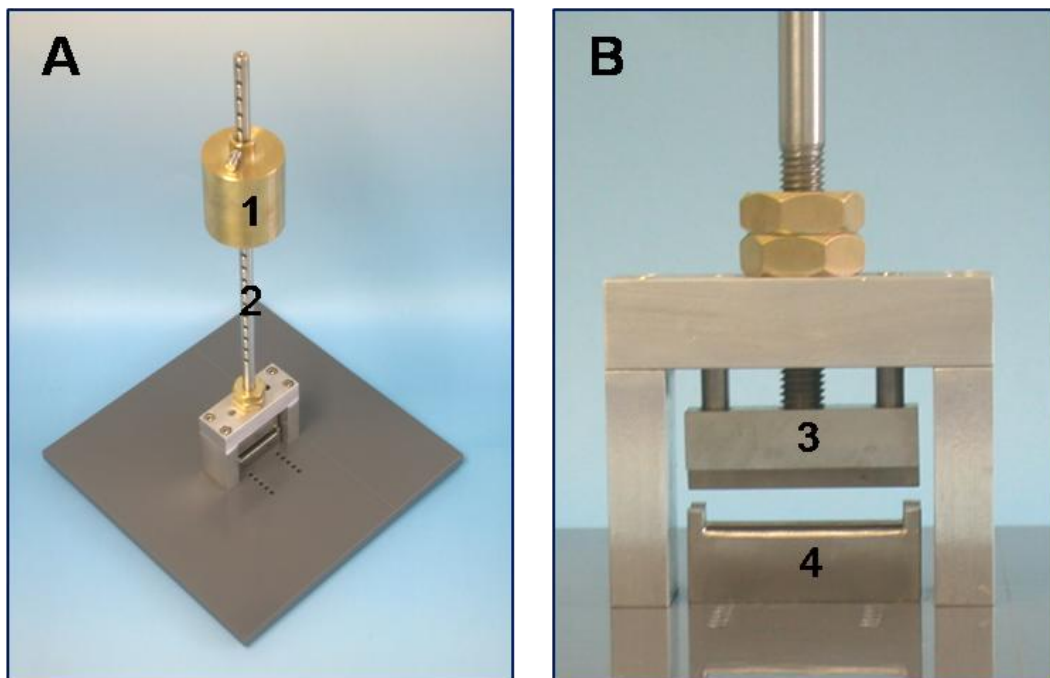


Abb. 10 A und B: Frakturapparat nach Schmidmaier et al. (1) Fallgewicht von 80g, (2) Führungsstab, (3) Stempelplatte, (4) Gegenhalter (SCHMIDMAIER et al., 2004)



Abb. 11: Positionierung des Beines in der Frakturapparatur (KLEIN, 2008)

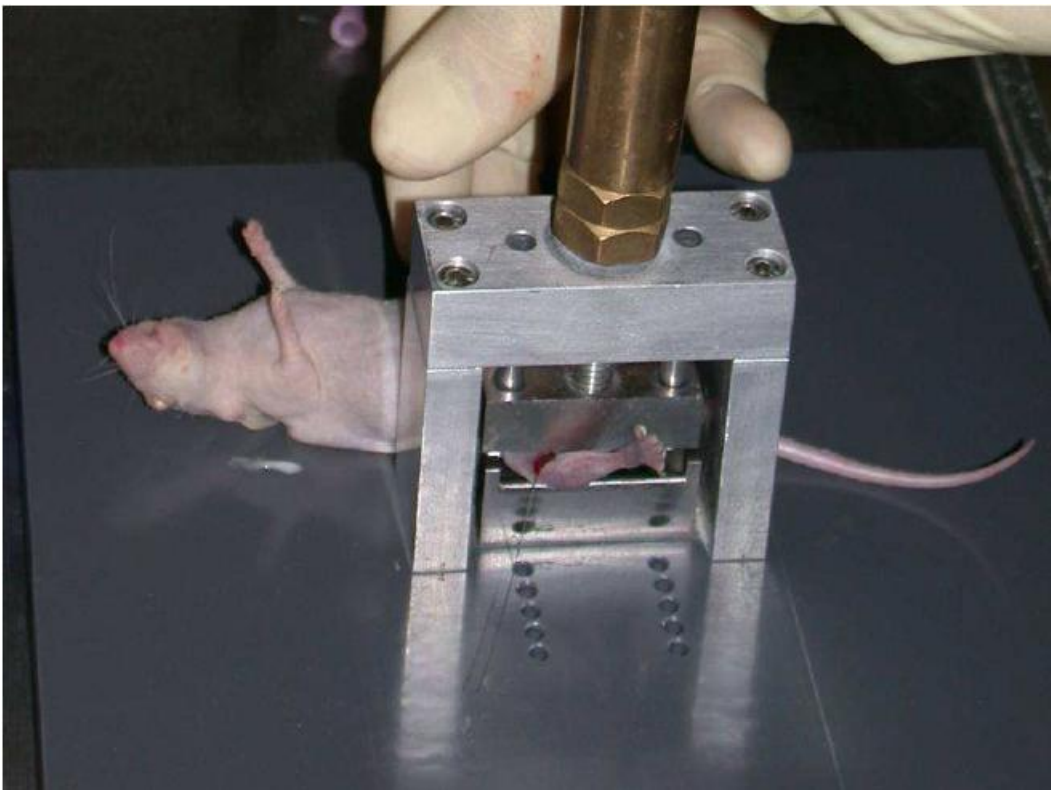


Abb. 12: Geschlossene Frakturierung des Femurs (KLEIN, 2008)

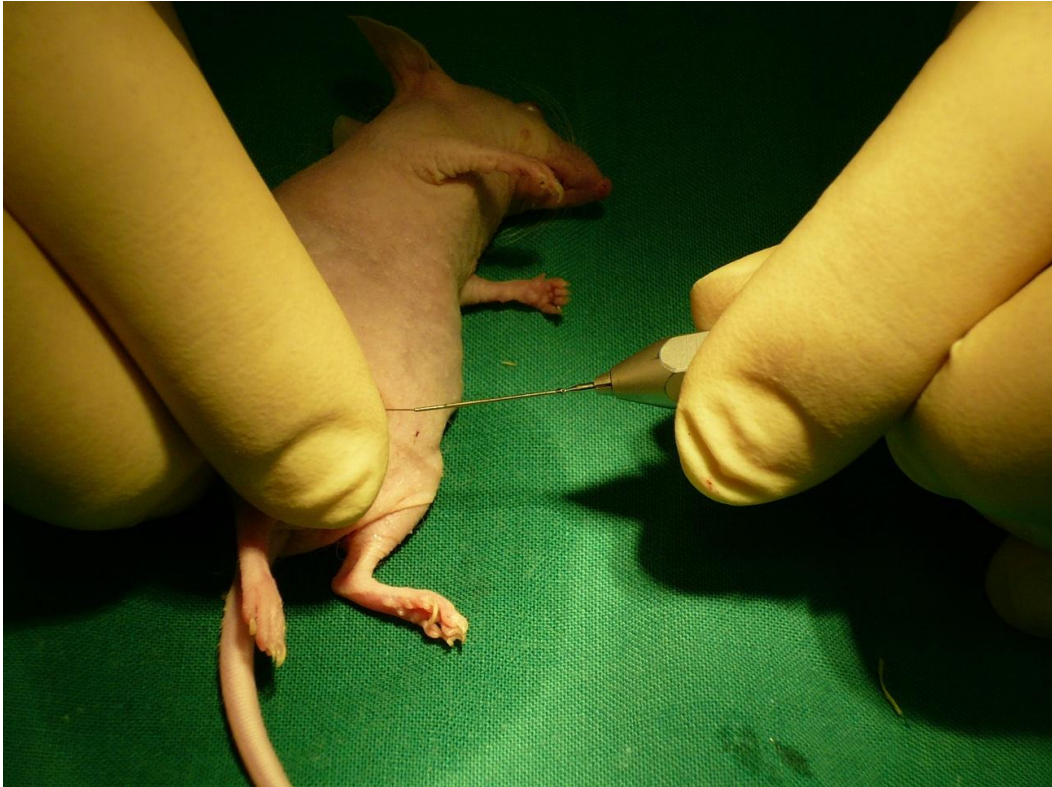


Abb. 13: Vorschieben der Zugschraube über den Führungsdraht



Abb.14: Eindrehen der Zugschraube mit einem definierten Drehmoment bis zum Versagen der Sollbruchstelle



Abb. 15: Reposition und Refixation der Patellarsehne mit Verschluss des Kniegelenks (KLEIN, 2008)



Abb. 16: Hautnaht



Abb. 17: Postoperative Röntgenaufnahme zur Dokumentation der Fraktur und der Implantatlage

## 3.2 Zielkriterien und Auswertung

### 3.2.1 Biomechanik

Nach Implantatentfernung wurden die präparierten Femora entsprechend der im Abschnitt Implantatentwicklung beschriebenen Rotationstestung in die Messapparatur eingespannt (Abb. 18 A und B). Unter konstanter Rotation ( $0,42 \text{ }^\circ/\text{s}$ ) wurden folgende Parameter bestimmt:

- Drehmoment bei (erneutem) Bruch des (ausgeheilten) Knochens [Nmm]
- Rotationswinkel bei (erneutem) Bruch des (ausgeheilten) Knochens [ $^\circ$ ]
- Torsionssteifigkeit des (ausgeheilten) Knochens [Nmm/ $^\circ$ ]

Außerdem wurde das intakte kontralaterale Femur jedes Tieres biomechanisch getestet, um individuelle Qualitätsunterschiede bezüglich der Knochen der einzelnen Tiere zu berücksichtigen. Die Messergebnisse der operierten Knochen wurden in Relation zu den unfrakturierten Knochen gesetzt.

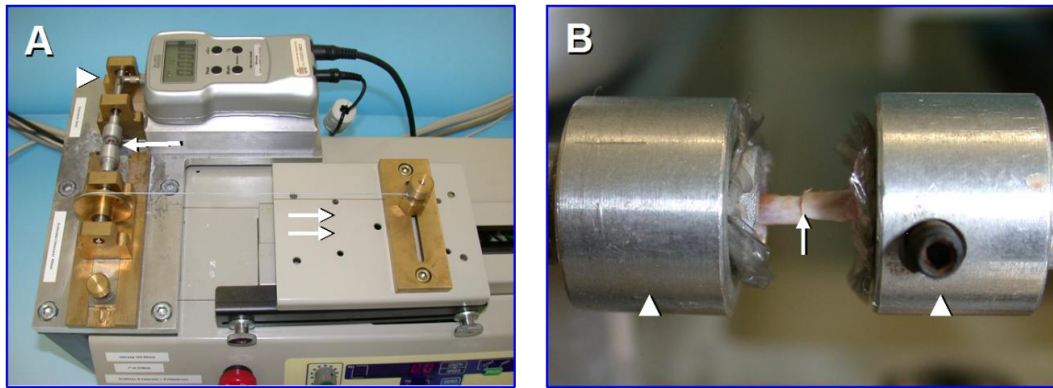


Abb. 18 A und B: Rotationstestung: Das an den Knochenenden, longitudinal an zwei frei rotierenden Achsen fixierte Femur (Pfeil) wurde mittels einer Zugmaschine (Doppelpfeil) rotiert. Während die erste Achse mit konstanter Geschwindigkeit ( $0,42 \text{ }^\circ/\text{s}$ ) rotiert wurde, wurde an der zweiten Achse das rotationsabhängige Drehmoment über einen Messsensor (Pfeilspitze) quantifiziert (A). Das proximale und distale Ende des Femurs wurden jeweils mittels Knochenzement (Polymethylmethacrylat) in Stahlzylindern fixiert (B, Pfeilspitzen).

### 3.2.2 Histomorphometrie

Für die histomorphometrische Auswertung wurden die präparierten Knochen für 24 h in 4 % phosphatgepuffertem Formalin fixiert und anschließend für weitere 5 Wochen in 10 % EDTA bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  entkalkt. Nach Einbettung in Paraffin wurden longitudinale Schnitte ( $5 \text{ }\mu\text{m}$ ) hergestellt. Entsprechend den Empfehlungen der *American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR)* (PARFITT et al., 1987) wurden die Bilder in Masson-Goldner-Färbung bei einer Vergrößerung von  $1,25 \times$  (Olympus BX60 Microscope, Olympus, Tokio, Japan) digitalisiert (Zeiss Axio Cam und Axio Vision 3.1, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und folgende Parameter analysiert (ImageJ Analysis System, NIH, Bethesda, MD, USA):

- Fläche des periostalen Kallus / Femurdurchmesser [mm]
- Fläche des knöchernen periostalen Kallus / Fläche des periostalen Kallus [%]
- Fläche des knorpeligen periostalen Kallus / Fläche des periostalen Kallus [%]
- Fläche des bindegewebigen periostalen Kallus / Fläche des periostalen Kallus [%]

### 3.2.3 Western Blot

Um die Zellproliferationsrate innerhalb des Kallus zu evaluieren, wurden Western Blot-Analysen für das *Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)* durchgeführt. Zudem wurde die Proteinexpression des Wachstumsfaktors VEGF mittels Western Blot-Analyse quantifiziert. Für die Extraktion der Gesamtproteinfraktion wurden gefrorene Kallusproben ( $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ ) in

Lösungspuffer homogenisiert, für 30 Minuten inkubiert und für weitere 30 Minuten zentrifugiert (16000 g). Nachdem die Gesamtproteinfraktion aus dem Überstand gewonnen wurde, wurden die Proteinkonzentrationen mit dem *Lowry Assay* (mit bovinem Serum-Albumin [BSA] als Standard) bestimmt. Im Anschluss wurden 60 µg Protein pro Kammer auf 10 % Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel verteilt und auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (BioRad, München, Deutschland) transferiert. Nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen für 2 Stunden mit einem monoklonalen Maus-anti-PCNA-Antikörper (DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark), bzw. einem monoklonalen Maus-anti-VEGF-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), inkubiert. Die Proteinexpression wurde mittels Chemiluminiszenz (ECL) auf UV-sensitiven Autoradiographie-Filmen visualisiert (Hyperfilm ECL; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Die Signale wurden desitometrisch ausgewertet (Geldoc, Quantity one software; BioRad, Hercules, CA, USA) und gegen  $\beta$ -Aktin normalisiert (mouse anti- $\beta$ -actin; Sigma, Taufkirchen, Deutschland).

### 3.3 Statistik

Alle statistischen Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Versuchsgruppen wurden mittels einseitigem ANOVA bzw. Student-Newman-Keuls-Test miteinander verglichen, so dass der Alpha-Fehler für Mehrfachvergleiche ausgeglichen wurde. Die Statistik wurde mit Hilfe des SigmaStat Software Package (Jandel, San Rafael, USA) durchgeführt. Es wurde ein P-Wert von  $< 0,05$  festgelegt, um signifikante Unterschiede anzuzeigen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Postoperativer Verlauf

Im postoperativen Verlauf kam es meistens bereits am OP-Tag, spätestens jedoch innerhalb von 2 Tagen, zu einer Aufbelastung des frakturierten Beines. Zu diesem Zeitpunkt waren die Tiere mobil und zeigten, verglichen mit dem präoperativen Zustand ein ähnliches Verhalten. Äußere Schmerzzeichen oder eine Beeinträchtigung des Bewegungsablaufes waren nicht erkennbar.

Postoperative Ausschlusskriterien:

- nachgewiesener Knochen- oder Weichteilinfekt
- Gewichtsabnahme von mehr als 20 % des Körpergewichtes
- makroskopisch oder radiologisch erkennbare Implantatdislokation
- Frakturen, bei denen keine Frakturkonfiguration Typ A2 oder A3 gemäß der AO/ASIF-Klassifikation (KOCH et al., 1990) in Schaftmitte erzielt wurde

### 4.2 Laufstrecke

Alle Tiere der Verumgruppe benutzten das ihnen angebotene Laufrad sowohl vor als auch nach der Operation. Die durchschnittlich zurückgelegte Laufstrecke betrug 2 Wochen nach Frakturierung 23,5 km und 5 Wochen nach Frakturierung 104,3 km. Dementsprechend betrug die täglich zurückgelegte Laufstrecke in der 2-Wochen-Verumgruppe 1,7 km/d und in der 5-Wochen-Verumgruppe 3,0 km/d (Abb. 19 A und B).



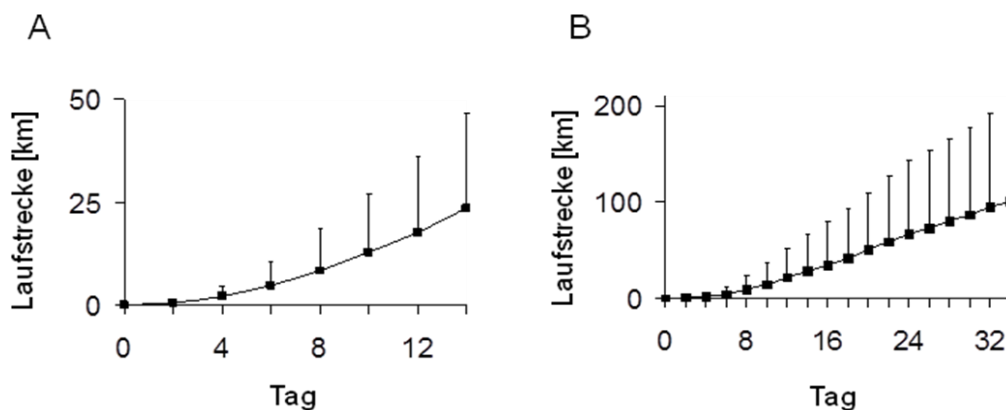


Abb. 19 A und B: Durchschnittlich zurückgelegte Laufstrecke (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung) der Laufrattiere nach 2 Wochen (A) und 5 Wochen (B)

### 4.3 Makroskopie

Post mortem wurden alle Tiere während der Explantation der operierten Femora auf eventuelle Pathologien hin untersucht. Dabei wurde besonderer Wert auf die Begutachtung der femoro-patellaren und der femoro-tibialen Gelenkverhältnisse, der Beinmuskulatur sowie der Frakturlokalisierung gelegt. In diesem Zusammenhang waren keine Hinweise auf Patella- oder Kniegelenksluxationen, Wundheilungsstörungen, Infekte oder Muskelatrophien erkennbar. Weiterhin wurde die korrekte Lage der Schraube und deren fester Sitz bei jedem Tier überprüft. Alle in die Studie eingeschlossenen Tiere wiesen makroskopisch eine middiaphysäre Femurschaftfraktur ohne erkennbare Implantatdislokation auf.

Nach primärer Resektion des Weichteilmantels wurde zuerst die Überbauung des Frakturspaltes begutachtet. Hierbei zeigte sich im Frakturbereich eine deutliche Kallusbildung, wobei sich hinsichtlich Kallusgröße und Kallusbeschaffenheit makroskopisch keine erkennbaren Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ergaben. Zudem war keine Achsabweichung der Knochen erkennbar.

### 4.4 Radiologie

Die bei Tötung nach 2 bzw. 5 Wochen angefertigten Röntgenaufnahmen zeigten verglichen mit den postoperativen Röntgenbildern sowohl eine unveränderte, achsgerechte Frakturstellung als auch eine unveränderte Implantatlage. Korrespondierend zur makroskopischen Begutachtung waren radiologisch Zeichen einer Frakturüberbrückung erkennbar. Es ergaben sich keine ersichtlichen Unterschiede bezüglich Größe und

radiologischer Dichte des Frakturkallus. Radiologische Zeichen einer verzögerten oder ausbleibenden Knochenbruchheilung fanden sich bei keinem Versuchstier.

## 4.5 Biomechanik

Quantifiziert wurde die biomechanische Stabilität der verheilten Knochen durch eine Rotationstestung. Hierbei wurde, um interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren zu berücksichtigen, eine Testung sowohl des frakturierten rechten Femurs als auch des intakten, unfrakturierten linken Femurs durchgeführt. Folglich wurden die Messwerte der rechten Seite in Relation zur intakten linken Seite gesetzt.

Die Versuchsgruppen wiesen in der quantitativen Auswertung der relativen Kallussteifigkeit sowie des relativen Drehmoments und Winkel bei Kallusversagen weder nach zweiwöchiger noch nach fünfwöchiger Frakturheilung signifikante Unterschiede auf (Abb. 20).

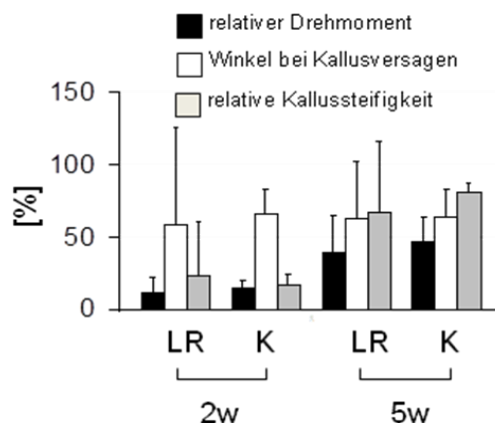


Abb. 20: In der biomechanischen Rotationstestung zeigten sich weder nach 2 Wochen (2w) noch nach 5 Wochen (5w) signifikante Unterschiede hinsichtlich relativem Drehmoment (schwarz) sowie Winkel (weiß) bei Kallusversagen und relativer Kallussteifigkeit (grau). Die Messwerte der operierten Femora sind in Prozent der kontralateralen intakten Gegenseite dargestellt (LR=Laufradgruppe, K=Kontrollgruppe). Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

## 4.6 Histomorphometrie

Die Auswertung des Frakturkallus erfolgte am sagittalen longitudinalen Schnittpräparat. Es wurde jeweils der Bereich des max. Frakturkallus gewählt.

Die Untersuchung der Schnitte aller 4 Gruppen zeigte histologisch das charakteristische Bild einer sek. Frakturheilung mit membranöser und endochondraler Ossifikation. Histologische Zeichen einer ausbleibenden oder verzögerten Frakturheilung, wie beispielsweise eine durchgehende Bindegewebsformation zwischen den beiden Frakturenden waren bei keiner Probe zu erkennen (Abb. 21 A, B, C und D). Somit konnte bei allen Tieren eine knöcherne oder knorpelige Überbrückung der Fraktur nachgewiesen werden. Histomorphometrisch ergaben sich weder nach zweiwöchiger noch nach fünfwöchiger Frakturheilung signifikante Unterschiede was die Kallusgröße und die quantitative Gewebszusammensetzung des Kallus betrifft (Abb. 22 A und B).

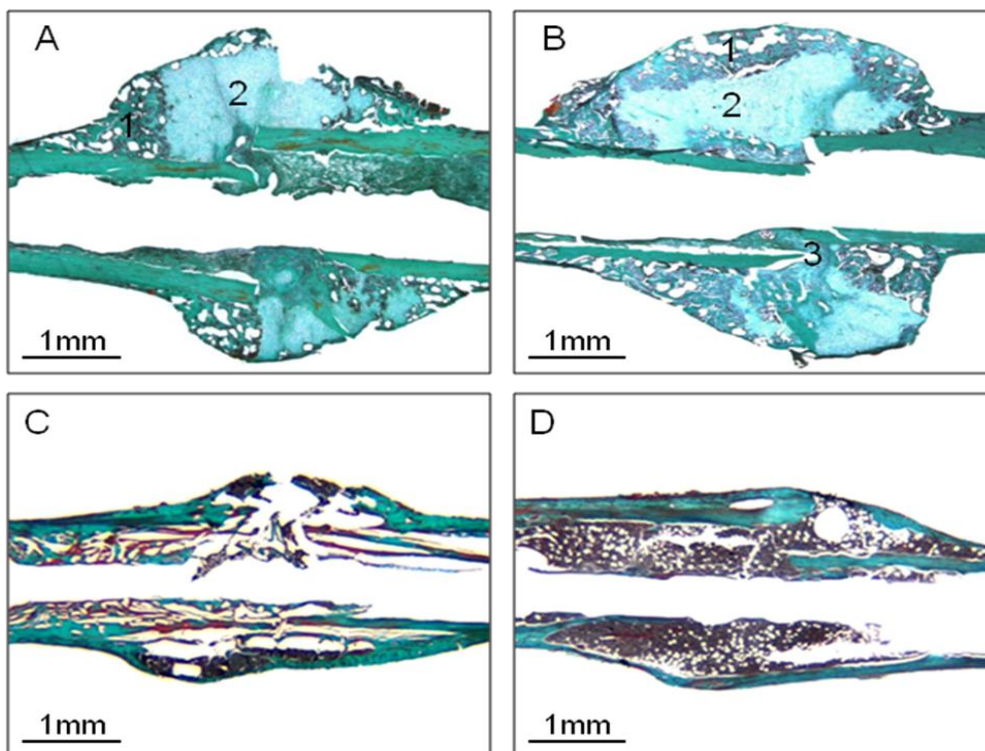


Abb. 21 A, B, C und D: Repräsentative histologische Schnitte des Frakturkallus nach 2 (A und B) und nach 5 (C und D) Wochen Knochenbruchheilung. Die Abbildungen (A) und (C) zeigen den Frakturkallus eines Versuchstieres, (B) und (D) den Kallus eines Kontrolltieres. Nach zwei Wochen Frakturheilung zeigt sich eine Kalluszusammensetzung aus Knochen- (1), Knorpel- (2) und Bindegewebe (3) im Sinne einer sekundären Frakturheilung mit membranöser und enchondraler Ossifikation. Nach fünf Wochen wurde das Knorpel- und Bindegewebe im Rahmen des Remodellingprozesses durch Geflechtknochen ersetzt.

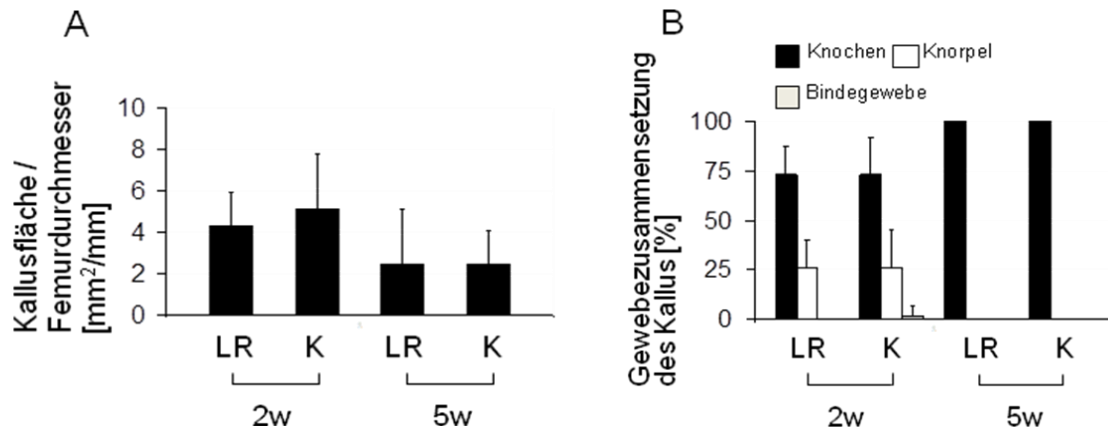


Abb. 22 A und B: Histomorphometrisch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen hinsichtlich der Kallusgröße (A) und der qualitativen Gewebezusammensetzung von Knochen (schwarz), Knorpel (weiß) und Bindegewebe (grau) innerhalb des Kallus (B). Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

#### 4.7 Western Blot

In der Western Blot-Analyse konnte für alle Versuchstiere der Nachweis der Expression des Proliferationsmarkers PCNA und des Wachstumsfaktors VEGF erbracht werden. Hier konnten auch in der quantitativen Analyse der unterschiedlichen Proteinexpressionen entsprechend den Ergebnissen der biomechanischen und histomorphometrischen Auswertungen keine gruppenspezifischen Unterschiede festgestellt werden (Abb. 23 und Tab. 2).

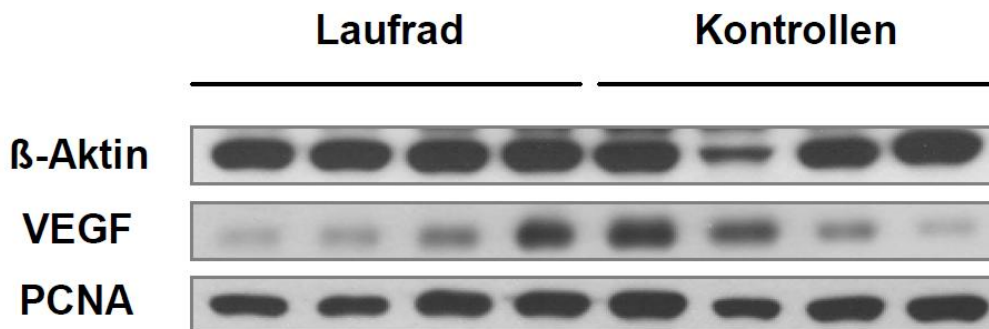


Abb. 23: Western Blot-Analyse der Expression des Wachstumsfaktors VEGF sowie des Proliferationsmarkers PCNA. Die Signale wurde desitometrisch ausgewertet und gegen  $\beta$ -Aktin normalisiert.

## Ergebnisse

	<b>Laufрад</b>	<b>Kontrollen</b>	<b>P</b>
VEGF [OD*mm <sup>2</sup> ]	9,4 ± 10,2	3,4 ± 3,7	0,34
PCNA [OD*mm <sup>2</sup> ]	20,1 ± 3,0	15,9 ± 3,0	0,09

Tab. 2: Quantitative Analyse der Expression von VEGF und PCNA innerhalb des Kallus nach 2 Wochen Frakturheilung. Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben.

## 5. Diskussion

### 5.1 Diskussion der Methoden

Die Knochenbruchheilung stellt einen komplexen biologischen Prozess dar, der die Interaktion zahlreicher auch knochenfremder Gewebstypen, wie etwa des periostären Weichteilgewebes oder des Gefäß-Kreislauf-Systems, erfordert (STREET et al., 2002). Aufgrund des komplexen örtlichen und zeitlichen Zusammenspiels der verschiedenen Phasen der Frakturheilung und aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit des ossären „micro-environments“ sind In-vitro-Untersuchungen zur Knochenbruchheilung nur sehr begrenzt aussagekräftig (FRIEDMAN et al., 1996). In dieser Studie wurde daher der Einfluss von forcierter physischer Aktivität auf die Knochenbruchheilung am Tiermodell untersucht.

Es gibt viele Gründe, warum Kleintiermodelle, insbesondere Modelle an der Maus, Vorteile gegenüber Großtiermodellen für Studien zur Frakturheilung aufweisen. Geringe Kosten für die Beschaffung, Zucht und Haltung dieser Spezies ermöglichen es, große Versuchsgruppen zu bilden. Das Genom der Maus ist zudem in seiner Gesamtheit entschlüsselt. Hierdurch entsteht ein enormer Vorteil, was die Durchführung molekularbiologischer Studien zur Untersuchung der Knochenbruchheilung betrifft. Außerdem hat die Maus aufgrund einer Vielzahl verfügbarer Knockout-Stämme und spezifischer Antikörper während der letzten Jahre als Versuchstier für Frakturstudien wesentlich an Bedeutung gewonnen (MICLAU, HELMS, 2000).

Die geringe Größe der Maus stellt in der Entwicklung von Frakturmodellen eine große Herausforderung dar. Große Röhrenknochen, wie Femur und Tibia, sind daher am besten für Studien zur Frakturheilung geeignet (HILTUNEN et al., 1993; MANIGRASSO, O'CONNOR, 2004). Frakturmodelle an Rippenknochen hingegen erwiesen sich wegen ihrer ungünstigen Anatomie als eher unbrauchbar für biomechanische Testmethoden. Sie wurden daher fast ausschließlich für Genexpressionsanalysen während der Frakturheilung angewandt (NAKASE et al., 1994; ITO et al., 1999; YAMAGIWA et al., 1999).

Als etabliertestes Mausmodell zur Untersuchung der Frakturheilung gilt das von Hiltunen et al. 1993 beschriebene Frakturmodell an der Mäusetibia (HILTUNEN et al., 1993). Wegen des nach distal abnehmenden Durchmessers der Tibia entstehen jedoch durch nur leicht abweichende Frakturhöhen merklich unterschiedliche Kallusgrößen. Die Genauigkeit biomechanischer Tests wird zudem durch den triangulären Querschnitt und die gebogene Achse der Tibia eingeschränkt. Ein weiteres Problem stellt die Tatsache dar, dass in

geschlossenen Tibia-Frakturmodellen meist auch die Fibula bricht. Hierbei kommt es entweder zur Bildung von zwei getrennten Kalli oder von einem kombinierten Kallusverbund (Abb. 24). Konsekutiv unterliegt die Kallusgröße und Kallusbeschaffenheit in diesen Modellen einer großen Heterogenität. Um eine Fibulafaktur zu verhindern, muss die Tibia sehr weit distal, in der Nähe der Metaphyse frakturiert werden. Dies ist jedoch in Studien mit geschlossenen Frakturmodellen nicht in standardisierter Form praktikabel (HOLSTEIN et al., 2009a).



Abb. 24: In geschlossenen Tibia-Frakturmodellen an der Maus wird meist auch die Fibula frakturiert, was entweder in zwei getrennten Kalli oder in einem kombinierten Kallusverbund resultiert (HILTUNEN et al., 1993).

Betrachtet man die anatomischen Vorteile des Mäusefemurs, so liegen diese gegenüber der Tibia in einem einheitlichen runden Querschnitt bei guter Weichteildeckung (CHEUNG et al., 2003). Die Kallusgröße von diaphysären Frakturen auf unterschiedlicher Höhe ist somit vergleichbar. Anhand der geraden longitudinalen Achse des Mäusefemurs kann daher mit großer Sicherheit eine standardisierte Fraktur erreicht werden. Was die biomechanische Testung angeht, so ist diese aufgrund der anatomischen Gegebenheiten am Femur ebenfalls zuverlässiger als an der Tibia. Zusammengefasst ist das in der hier vorgestellten Studie gewählte Mäusefemur, im Vergleich zur Tibia, als geeigneter für Studien zur Frakturheilung anzusehen (HOLSTEIN et al., 2009a).

In Untersuchungen zur Knochenbruchheilung werden sowohl offene als auch geschlossene Frakturmodelle verwendet. Bei geschlossenen Modellen liegt der Vorteil in dem relativ einfachen Zugangsweg, durch den nur ein minimaler Weichteilschaden verursacht wird. In Modellen mit offener Fraktur wird das Femur meist durch einen lateralen longitudinalen Zugang unter Sicht frakturiert oder osteotomiert (CHEUNG et al., 2003; GARCIA et al.,

2008). Durch die deutlich invasivere Vorgehensweise kommt es bei dieser Operation jedoch zu einem relativ großen Weichteilschaden, der die Frakturheilung potentiell beeinflusst. Extramedulläre Implantate werden meist in offenen, intramedulläre Implantate hingegen in geschlossenen Frakturmodellen verwendet. Betrachtet man die geschlossenen Modelle, wird deutlich, dass intramedulläre Implantate sowohl das Knochenmark als auch das Endost verletzen können, da aufgrund der Schwierigkeit einer Einbringung nach Frakturierung der Knochen bei liegendem Implantat frakturiert wird. In unserem geschlossenen Modell wurde allerdings über einen zuvor eingebrachten Führungsdraht eine Frakturierung ohne einliegendes Implantat ermöglicht, so dass durch diese Technik ein klinisches Trauma-Szenario reproduziert wird.

Viele der bisherigen Frakturstudien an Mäusen wurden wegen der fehlenden Möglichkeit einer stabilen Osteosynsetechnik unter Verwendung von instabilen intramedullären Pin-Fixationstechniken (BHANDARI et al., 2000; STREET et al., 2002; MANIGRASSO, O'CONNOR, 2004) oder ganz ohne Stabilisierung der Fraktur (LE et al., 2001; COLNOT et al., 2003; OPOLKA et al., 2007) durchgeführt. Es konnte in Großtiermodellen gezeigt werden, dass exzessive Relativbewegungen zwischen den Knochenfragmenten zu einer signifikant erniedrigten Knochensubstanz im Bereich des Frakturkallus führen und somit in der Ausbildung einer hypertrophen Pseudarthrose resultieren können (CLAES et al., 2002; LIENAU et al., 2006). Die zwischen den Frakturrenden auftretenden Scherkräfte führen zudem zu einer herabgesetzten Knochensteifigkeit innerhalb des Frakturspaltes (RÖNTGEN et al., 2010). Dahingegen verursacht eine axiale Stauchung der Frakturrenden eine höhere Knochendichte des Frakturkallus (AUGAT et al., 2003). In weiteren Studien konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass übermäßige Relativbewegungen zwischen den Frakturrenden eine Hemmung der Angiogenese hervorrufen (CLAES et al., 2002; LIENAU et al., 2005). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression angiogener und osteogener Zytokine durch das „biomechanical environment“ im Frakturspalt beeinflusst wird (NOMURA, TAKANO-YAMAMOTO, 2000; LIENAU et al., 2005; OGILVIE et al., 2012). Auch in Frakturstudien am Mausmodell konnte der Einfluss von mechanischen Faktoren während der Frakturheilung auf den Ablauf der chondrogenen und osteogenen Zytokin-Induktion, auf die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen sowie auf die Größe und Gewebszusammensetzung des Frakturkallus demonstriert werden (LE et al., 2001; GARCIA et al., 2008). In Großtiermodellen ist die Verwendung von standardisierten Osteosynsetechniken, welche definierte biomechanische und biologische Konditionen zur Untersuchung der Frakturheilung garantieren, mittlerweile selbstverständlich (AUER et al., 2007). Bei Modellen zu Frakturstudien an der Maus, deren Hauptanwendungsgebiet in der Erforschung der molekularen Aspekte der Frakturheilung liegt, wird hingegen oft diskutiert,



ob biomechanischen Standards benötigt werden (HOLSTEIN et al., 2008; HOLSTEIN et al., 2009a). Aufgrund der Tatsache, dass die Stabilität der Osteosynthese auch an der Maus einen enormen Einfluss auf den Ablauf der Knochenbruchheilung und insbesondere auf die Expression angiogener und osteogener Zytokine hat, sind entsprechende Argumente nicht nachvollziehbar, so dass stabile Osteosynsetechniken auch an der Maus anzustreben sind (HOLSTEIN et al., 2009a; STECK et al., 2011; HISTING et al., 2016).

Vor dem Hintergrund, dass die mechanischen Gegebenheiten im Frakturspalt einen hohen Einfluss auf die Knochenbruchheilung haben, sind die Ergebnisse solcher Studien nur sehr begrenzt aussagekräftig (AUGAT et al., 1998). Der Nachteil einer rotations- und achsstabilen Osteosynthese am Mausmodell mit Hilfe eines Fixateur externe (CHEUNG et al., 2003) liegt beispielsweise im hohen Implantatgewicht (etwa 25 % des KG der Maus). Der physiologische Bewegungsablauf der Maus wird folglich stark behindert.

Durch eine von unserer Arbeitsgruppe entwickelte intramedulläre Zugschraube, war es in dieser Studie erstmals möglich, bei minimalinvasiver Operationstechnik eine distraktions- und rotationsstabile Osteosynthese an der Maus zu etablieren (HOLSTEIN et al., 2009b). Wegen der minimalen Behinderung durch das intramedulläre Implantat und des wenig traumatisierenden Eingriffs konnte bei den Versuchstieren bereits am ersten bis zweiten postoperativen Tag ein physiologischer Bewegungsablauf beobachtet werden. Demzufolge benutzten die Tiere schon am Tag der Operation die ihnen angebotenen Laufräder und absolvierten am ersten bis dritten postoperativen Tag mit präoperativ vergleichbare Laufstrecken. Es konnten somit standardisierte Bedingungen geschaffen werden, um die Effekte von physischer Aktivität auf die Knochenbruchheilung zu untersuchen.

Der operative Eingriff, die Allgemeinnarkose und die postoperative Analgesierung wurden von den Versuchstieren gut toleriert. Eine Narkosedauer von etwa 30 Minuten erwies sich sowohl für den durchgeführten Eingriff als auch für die postoperative Röntgenkontrolle als zeitlich ausreichend kalkuliert. Da die Tiere bereits am ersten bis zweiten postoperativen Tag einen physiologischen Bewegungsablauf aufwiesen, ist von einer postoperativ adäquaten Belastung der Extremität bei stabiler Osteosynthese auszugehen. Zum Tötungszeitpunkt fanden sich bei standardisiert reproduzierbarer Frakturheilung keine Anzeichen von Wundheilungsstörungen, Infekten oder sonstigen Pathologien. Retrospektiv kann das gewählte Tiermodell daher ohne wesentliche Einschränkungen als reproduzierbar und für die Fragestellung als geeignet beurteilt werden.

Entsprechend der radiologischen Auswertungen führte das beschriebene Modell zu einem typischen sekundären Frakturheilungsverlauf mit maximaler Kallusbildung nach zwei- bzw. knöcherner Frakturüberbauung nach fünfwöchiger Frakturheilung. Die Analyse von Manigrasso und O'Connor zeigte 2004 in einem Femurmarknagel-Modell den zeitlichen Ablauf der Frakturheilung an der Maus (MANIGRASSO, O'CONNOR, 2004). Hierin konnte eine maximale Kallusbildung nach 2 Wochen nachgewiesen werden. Nach 4 Wochen zeigte sich bei den meisten Versuchstieren eine knöcherne Durchbauung des Frakturkallus, während sich der Knochen nach einer Dauer von 6 Wochen in der Phase des Remodelings befand. Ab dem Zeitpunkt einer sicheren knöchernen Durchbauung gilt eine Fraktur unter klinischen Bedingungen als weitestgehend stabil verheilt (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1996). Vor diesem Hintergrund wählten wir in unserer Studie einen 2- und einen 5-Wochen-Zeitpunkt aus, um den Einfluss von physischer Aktivität auf die Knochenbruchheilung zu untersuchen.

Die Knochenbruchheilung wird in den meisten Frakturmodellen nach definierten Zeitabschnitten mit radiologischen, biomechanischen und histologischen Methoden analysiert.

Zur Durchführung der biomechanischen, histologischen und proteinbiochemischen Untersuchungen mussten die Versuchstiere in unserer Studie getötet werden. Es ist jedoch grundsätzlich möglich, die Frakturheilung auch am lebenden Tier mit verschiedenen Bildgebungsverfahren zu analysieren. Neben Mikro-PET- und Mikro-MRT-Untersuchungen, gibt es auch innovative Verfahren der molekularen Bildgebung, wie etwa Biolumineszenz- oder Nukleartomographie, die bezüglich der Darstellung von Gewebemorphologie, Genexpression, Proteindegradation, Zellmigration und Zelltod in lebenden Tieren neue Möglichkeiten eröffnen (LEE et al., 2008; LU et al., 2005; ZACHOS et al., 2007). Hochauflösende Röntgenaufnahmen und 2D- sowie 3D-Mikro-CT-Untersuchungen sind jedoch etablierte Standardverfahren der Knochenbildgebung. Mittels konventioneller Röntgenaufnahmen ist es möglich, Größe und radiologische Dichte des Kallusgewebes sowohl in vivo als auch am resezierten Knochen zu analysieren (AUGAT et al., 2005; GARCIA et al. 2008; HOLSTEIN et al., 2007b). In dieser Arbeit entschieden wir uns für die konventionelle Röntgendiagnostik, um die Lage des intramedullären Implantats nach durchgeführter Osteosynthese sowie vor Tötung der Versuchstiere zu kontrollieren. Die vor Tötung der Versuchstiere angefertigten Röntgenaufnahmen dienten zudem der quantitativen Analyse der Kallusgröße. Die Eignung dieser Messmethode für die Untersuchung der Kallusgröße konnte durch eine Korrelation der radiologischen und histologischen Ergebnisse bestätigt werden.

Die Standardmethode in der Untersuchung der Frakturheilung stellt die quantitative histologische Auswertung (Histomorphometrie) des Frakturkallus dar (GERSTENFELD et al., 2005). Zur Gewährleistung von standardisierten histomorphometrischen Analysen wurde unsere Studie gemäß den Empfehlungen zu Messparametern und Nomenklatur der ASBMR durchgeführt (PARFITT et al., 1987). Zusätzlich zur Histomorphometrie ermöglichen immunhistochemische Analysen die In-situ-Detektion von Proteinen wie Zytokinen und Zellmarkern innerhalb des Frakturkallus (HOLSTEIN et al., 2007b). Die Schwierigkeit in der Gewebstypenanalyse von standardisierten, zweidimensionalen Schnittpräparaten liegt in der heterogenen dreidimensionalen Struktur des Frakturkallus. Dennoch ermöglichen longitudinale Schnittpräparate im Bereich des maximalen Femurdurchmessers hierbei eine reproduzierbare und repräsentative Darstellung der Kallusgröße sowie der Gewebezusammensetzung des Frakturkallus. Dementsprechend wählten wir zur histomorphometrischen Auswertung des Frakturkallus eine, in Anlehnung an vergleichbare Frakturstudien an Maus und Ratte, longitudinale middiaphysäre Schnittführung (GERSTENFELD et al., 2005). Grundsätzlich kann sowohl ein calcifizierter als auch ein decalcifizierter Knochen histologisch aufgearbeitet werden (GERSTENFELD et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden die histologischen Untersuchungen am decalcifizierten Knochen durchgeführt, da so die Möglichkeit einer zusätzlichen immunhistochemischen Färbung der Schnittpräparate besteht. Ein Nachteil histomorphometrischer Analysen besteht darin, dass Aussagen zum Kalksalzgehalt am decalcifizierten Knochen nicht eindeutig getroffen werden können.

Für die biomechanische Knochentestung stehen generell drei etablierte Verfahren zur Verfügung: Die 3-Punkt-Biegung, die 4-Punkt-Biegung und die in dieser Arbeit verwendete Rotationstestung (BURSTEIN & FRANKEL, 1971). Der Nachteil der 3-Punkt-Biegung liegt in der maximalen Belastung über nur einem Punkt des Knochens (BURSTEIN & FRANKEL, 1971). Bei der 4-Punkt-Biegung hingegen wird die maximale Kraft über eine größere Fläche verteilt (BURSTEIN & FRANKEL, 1971). Für diese Messmethode muss jedoch bei einem Knochen mit einem Durchmesser von etwa 1,9 mm die einwirkende Kraft auf eine etwa 30 mm lange Messfläche verteilt werden. Die Verwendung einer 4-Punkt-Biegung ist daher aufgrund der durchschnittlichen Länge des Mäusefemurs von etwa 15 mm (MANIGRASSO & O'CONNOR, 2004) technisch schwer umsetzbar. Ein weiterer Nachteil dieser Methoden ist die Tatsache, dass in beiden biomechanischen Biegungstestungsverfahren ein nur geringfügiges Verdrehen des Knochens ausreicht, um die Präzision und Wiederholbarkeit der Testung stark einzuschränken (LIND et al., 2001). Der Vorteil der Rotationstestung liegt darin, dass hier leichte Veränderungen in der Knochengometrie keine wesentlichen Auswirkungen auf die Quantifizierung der Rotationssteifigkeit haben, da das Drehmoment

gleichmäßig über die gesamte Länge des Femurs verteilt wird (LIND et al., 2001; STEINER et al., 2015). In der klinischen Praxis wird ein überschüssiges Drehmoment als ein gängiger Frakturmechanismus betrachtet (BURSTEIN & FRANKEL, 1971). Die Rotationstestung imitiert somit ein realitätsnahes klinisches Fraktur-Szenario. Demzufolge sehen wir in der Rotationstestung eine geeignete Messmethode zur Untersuchung der biomechanischen Eigenschaften des heilenden Knochens.

Die Erfassung der Zellproliferation innerhalb des Frakturkallus erfolgte mittels Western Blot durch Nachweis des Proliferationsmarkers PCNA. Die Zellproliferation stellt wie in jedem regenerierenden Gewebe auch während der Knochenheilung den zentralen Regenerationsprozess dar. Durch einen Antikörper gegen PCNA, welches von der frühen G1-Phase bis zur S-Phase exprimiert wird, kann die Zellproliferation im Frakturkallus nachgewiesen werden. Während der G2- und M-Phase nimmt die Expression von PCNA ab. Wildemann et al. konnten, trotz der teilweise kontroversen Diskussionen über die Spezifität von PCNA als Proliferationsmarker aufgrund seiner hohen Expressionsrate während der verschiedenen Phasen des Zellzyklus (McCORMICK et al., 1993) zeigen, dass PCNA einen zuverlässigen Marker zur Analyse der Zellproliferation während der Frakturheilung darstellt (WILDEMANN et al., 2003). Im Frakturkallus der Ratte konnten Iwaki et al. eine vermehrte PCNA-Expression bis zum 14. Tag nach Frakturierung nachweisen (IWAKI et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit analysierten wir die Expression von PCNA daher ebenfalls nach zweiwöchiger Frakturheilung.

Mittels Western Blot untersuchten wir zudem die Expression von VEGF während der Frakturheilung. Verschiedene Studien konnten belegen, dass VEGF eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Calcifizierung des Frakturkallus und der Einsprossung von Gefäßen in den Frakturkallus spielt (STREET et al., 2002; HANKENSON et al., 2011; OGILVIE et al., 2012; YANG et al., 2012; SARAN et al., 2014). Da man sowohl Vaskularisierung als auch Calcifizierung des Frakturkallus an der Maus nach ungefähr zweiwöchiger Frakturheilung beobachten kann, analysierten wir die Expression von VEGF am 14. postoperativen Tag.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass forcierte physische Aktivität nach operativer Frakturstabilisierung am Extremitätenknochen keinen Einfluss auf die Knochenbruchheilung hat.

Der Einfluss von täglichem Laufradtraining auf den Knochenstoffwechsel und die späte Frakturheilung wurde von der Arbeitsgruppe um Grundnes und Reikeras bereits 1991/92 unter Anwendung einer herkömmlichen Pin-Fixierung an der Ratte untersucht (GRUNDNES, REIKERAS, 1991; GRUNDNES, REIKERAS, 1992). Aufgrund der Pin-Stabilisierung war ein Laufradtraining in den ersten vier Wochen nach Frakturierung jedoch nicht möglich. Daher beschränkte sich die Untersuchung des Einflusses physischer Aktivität und mechanischer Frakturbelastung in der frühen Phase der Knochenbruchheilung bislang auf die Analyse der Mechanobiologie im Frakturspalt (BUCKWALTER et al., 1999; SARMIENTO et al., 1977; KENWRIGHT et al., 1991; KERSHAW et al., 1993; GOODSHIP, KENWRIGHT, 1985; CLAES et al., 1998). Verschiedene tierexperimentelle Studien konnten so zeigen, dass durch physische Aktivität aufgrund von Mikrobewegungen im Frakturspalt die Kallusgröße erhöht und die Zellproliferationsrate beschleunigt werden kann (BUCKWALTER et al., 1999; SARMIENTO et al., 1977; GOODSHIP, KENWRIGHT, 1985). Ferner ist bekannt, dass beispielsweise übermäßige Scherbewegungen die Bindegewebsformation im Frakturkallus fördern und die enchondrale Ossifikation hemmen (CARTER et al., 1998; CLAES et al., 1998; HISTING et al., 2011; STECK et al. 2011). Unsere Ergebnisse belegen, dass vermehrte körperliche Aktivität unter einer Minimierung der Mikrobewegungen im Frakturspalt keinerlei Auswirkung auf die Frakturheilung des Extremitätenknochens hinsichtlich Morphologie und Stabilität des Frakturkallus hat. Wir konnten somit weder eine Größenzunahme des Kallus noch Anzeichen einer beschleunigten Frakturheilung erkennen. Sowohl der Anteil des neu gebildeten Knochens als auch des Knorpel- und Bindegewebes innerhalb des Frakturkallus änderte sich im Vergleich zu den Kontrolltieren nach vermehrter physischer Aktivität nicht. Analog zu den histomorphometrischen Daten war kein Unterschied in den biomechanischen Eigenschaften des Kallus als Folge des Laufradtrainings zu erkennen. Eine erhöhte Zellproliferationsrate, wie sie als Folge einer veränderten Mechanobiologie unter körperlicher Aktivität beobachtet wurde (BUCKWALTER et al., 1999), konnten wir unter suffizienter Frakturstabilisierung ebenso wenig beobachten. So zeigte die Expression des Proliferationsmarkers PCNA im Kallus verglichen mit den Kontrolltieren keine signifikante Erhöhung nach zweiwöchiger Frakturheilung unter körperlichem Training. Im Gegensatz dazu konnten wir kürzlich nachweisen, dass beispielsweise eine medikamentöse Hemmung der Frakturheilung zu einer signifikant verminderten Expression von PCNA führt (HOLSTEIN et al., 2008).

Verschiedene Studien konnten demonstrieren, dass körperliche Aktivität in anderen Gewebstypen, wie beispielsweise dem Skelettmuskel oder dem Myokard, zu einer vermehrten Angiogenese führt (BREEN et al., 1996; GAVIN et al., 2004; AMARAL et al., 2001). Eine Studie unserer Arbeitsgruppe wies nach, dass vermehrtes körperliches Training

im Mausmodell zu einer gesteigerten Angiogenese während der Knochendefektheilung führt. In dieser Studie wurden die Heilungsvorgänge am Knochen unter Ausschaltung direkter mechanischer Einflüsse untersucht. Hierfür wurde ein standardisiertes Kalotten-Defektmodell an der Maus etabliert (HOLSTEIN et al., Injury 2011). Unter Verwendung eines Diamantkugelfräasers wurde ein kreisrunder, monokortikaler Knochendefekt erzeugt, ohne dabei die innere Kortikalis zu verletzen. Alle Versuchstiere wurden postoperativ regelmäßig intravitalmikroskopisch untersucht. Zudem erfolgte eine histomorphometrische und eine immunhistochemische Analyse der Knochenpräparate. Es konnte gezeigt werden, dass physische Aktivität neben einer Steigerung der Angiogenese während der Knochendefektheilung auch die Verknöcherung des Kalottendefektes beschleunigt (HOLSTEIN et al., J Orthop Res 2011). Die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse der zitierten sowie der aktuellen Studie müssen im Kontext der unterschiedlichen Versuchsmodelle diskutiert werden. Während in dem Kalotten-Defektmodell Versuche an platten Knochen durchgeführt wurden, erfolgten die Versuche in dem aktuellen Femur-Frakturmodell an Röhrenknochen. Ein monokortikaler Schädeldefekt heilt durch desmale (= direkte) Ossifikation, eine middiaphysäre Femurschaftfraktur durch chondrale (= indirekte) Ossifikation (RÜTER et al., 2003). Ein weiterer Unterschied zwischen den Versuchsmodellen besteht in den lokal auf den Knochen wirkenden mechanischen Kräften. Im Bereich eines Knochendefektes an der Kalotte kann, auch bei vermehrter körperlicher Aktivität, ein lokaler Einfluss der mechanischen Kräfte ausgeschlossen werden. Im aktuell verwendeten Femur-Frakturmodell muss, trotz Minimierung der Relativbewegungen im Frakturspalt, von einer direkten mechanischen Wirkung am belasteten Femur dennoch ausgegangen werden. Makroskopisch konnte nach 3 Wochen im Schädel-Modell das ursprüngliche Defektareal nicht mehr vom umliegenden Knochen unterschieden werden. Histomorphometrisch fand sich bei allen histologischen Schnittpräparaten das typische Bild einer desmalen Knochenregeneration. Demgegenüber konnte man in den Femurpräparaten eine deutliche Kallusbildung im Frakturbereich erkennen. Analog hierzu zeigte sich histologisch das charakteristische Bild einer sekundären Frakturheilung mit membranöser und enchondraler Ossifikation. In den intravitalmikroskopischen Untersuchungen des Defekts an der Schädelkalotte konnte in der Laufradgruppe, verglichen mit der Kontrollgruppe, neben einem signifikant erhöhten, durchschnittlichen Gefäßdurchmesser (9. und 12. Tag postoperativ) auch eine signifikant verringerte Defektfläche (6. und 9. Tag postoperativ) nachgewiesen werden. Korrelierend dazu fanden sich immunhistochemisch zahlreiche VEGF- und PCNA-positive Zellen im neu gebildeten Geflechtknochen und im Neo-Periost (HOLSTEIN et al., J Orthop Res 2011).

Überträgt man die Ergebnisse der beiden Studien auf die klinische Situation, lässt sich daraus schlussfolgern, dass physikalische Aktivität durchaus ein potenter Stimulus in der Therapie von Knochendefekten an platten Knochen sein kann. Hiervon betroffen scheinen insbesondere die mechanisch wenig belasteten Knochen der Schädelregion zu sein. Im Gegensatz dazu haben die Ergebnisse der aktuellen Studie das Therapiepotential physischer Aktivität als systemischer Stimulus auf frakturierte Röhrenknochen relativiert. Vor dem Hintergrund der aktuellen Studienlage scheinen die lokalen mechanobiologischen Effekte physischer Aktivität mögliche systemische Einflussfaktoren zu überwiegen (CARTER et al., 1998; BUCKWALTER, GRODZINSKY, 1999).

Die Hochregulierung der Expression von VEGF im Zielgewebe gilt als wichtiger Pathomechanismus der Angiogenese und der Knochenneubildung (BREEN et al., 1996; GAVIN et al., 2004; AMARAL et al., 2001; CARTER, 1998; BUCKWALTER, 1999). Interessanterweise war keine vermehrte VEGF-Expression in den heilenden Röhrenknochen als Folge des Laufradtrainings festzustellen, während in den konsolidierenden Defekten an der Schädelkalotte die VEGF-Expression durch die vermehrte physische Aktivität der Tiere deutlich gesteigert war. Korrespondierend hierzu induzierte vermehrtes Laufradtraining im Kalottenmodell eine vermehrte PCNA-Expression, wohingegen die Zellproliferation in dem Femurmodell von der physischen Aktivität der Tiere unbeeinflusst blieb.

Zusammenfassend konnten wir belegen, dass verstärkte körperliche Aktivität vom ersten Tag nach einer Fraktur an unter suffizienter Frakturstabilisierung die experimentelle Knochenbruchheilung am Extremitätenknochen weder hemmt noch fördert. Vor diesem Hintergrund sind bisherige Ergebnisse zur Beeinflussung der Frakturheilung des Extremitätenknochens durch körperliche Aktivität vornehmlich auf die Mechanobiologie im Frakturspalt und weniger auf systemische Effekte, wie beispielsweise eine vermehrte VEGF-Expression oder eine gesteigerte Zellproliferation, zurückzuführen.

### **5.3 Schlussfolgerungen**

1. Das für die Studie angewandte Tiermodell ist geeignet um den Einfluss von forcierter physischer Aktivität nach operativer Frakturstabilisierung auf die Knochenbruchheilung zu untersuchen.
2. Die Ergebnisse der radiologischen, biomechanischen, histologischen und proteinbiochemischen Auswertung lieferten reproduzierbare und untereinander vergleichbare Daten. Hierbei zeigte sich eine Korrelation der histomorphometrisch

und radiologisch bestimmten Kallusfläche mit den biomechanischen Eigenschaften des Frakturkallus.

3. In allen Versuchsgruppen zeigte sich in den histologischen, biomechanischen und radiologischen Untersuchungen eine fortgeschrittene Frakturheilung. Nach 5 Wochen konnte außerdem eine höhere Stabilität des Knochens im Vergleich zu den Ergebnissen nach 2 Wochen nachgewiesen werden.
4. Die Auswertungen ergaben, dass forcierte physische Aktivität nach operativer Frakturstabilisierung weder nach 2 Wochen noch nach 5 Wochen einen signifikanten Einfluss auf die Knochenbruchheilung hat.



---

## 6. Literaturverzeichnis

1. Amaral SL, Papanek PE, Greene AS. Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-term exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001, 281: H1163-9
2. Amizuka N, Shimomura J, Maeda T, Ozawa H. Mineralization and vascular invasion during endochondral bone formation. *Clin Calcium* 2003, 13: 405-12
3. Auer JA, Goodship A, Arnoczky S, Pearce S, Price J, Claes L, von Rechenberg B, Hofmann-Antenbrinck M, Schneider E, Muller-Terpitz R, Thiele F, Rippe KP, Grainger DW (2007) Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. *BMC Musculoskelet Disord* 8: 72
4. Augat P, Margevicius K, Simon J, Wolf S, Suger G, Claes L. Local tissue properties in bone healing: influence of size and stability of the osteotomy gap. *J Orthop Res* 1998, 16: 475-81
5. Augat P, Burger J, Schorlemmer S, Henke T, Peraus M, Claes L (2003) Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model. *J Orthop Res* 21(6): 1011-1017
6. Augat P, Simon U, Liedert A & Claes L (2005) Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. *Osteoporos Int* 16 Suppl 2: S36-43
7. Baird A, Mormede P & Bohlen P (1985) Immunoreactive fibroblast growth factor in cells of peritoneal exudate suggests its identity with macrophage-derived growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 126: 358-364
8. Barati D, Shariati SR, Moeinzadeh S, Melero-Martin JM, Khademhosseini A, Jabbari E (2016) Spatiotemporal release of BMP-2 and VEGF enhances osteogenic and vasculogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and endothelial colony-forming cells co-encapsulated in a patterned hydrogel. *J Control release* 223: 126-36
9. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A & Marme D (1996) Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87: 3336-3343
10. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999, 24: 1805-15
11. Bhandari M, Guyatt GH, Tong D, Adili A, Shaughnessy SG (2000) Reamed versus nonreamed intramedullary nailing of lower extremity long bone fractures: a systematic overview and meta-analysis. *J Orthop Trauma* 14(1): 2-9
12. Birgham-Sadegh A, Oryan A (2015) Selection of animal models for pre-clinical strategies in evaluating the fracture healing, bone graft substitutes and bone tissue regeneration and engineering. *Connect Tissue Res* 56(3): 175-94

13. Bloor CM. Angiogenesis during exercise and training. *Angiogenesis* 2005, 8 :263-71
14. Böcker W, Denk H, Heitz PU (2004) *Pathologie*. Urban & Fischer bei Elsevier
15. Bolander ME (1992) Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 200: 165-170
16. Bonnarens F & Einhorn TA (1984) Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 2: 97-101
17. Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, Missri AA, Tomin E, Weiland A, Doty SB, Glaser D, Rosen VM. Immunolocalization and expression of bone morphogenic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* 1995, 13: 357-67
18. Bourque WT, Gross M, Hall BK (1992) A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Lab Anim Sci* 42(4): 369-374
19. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423(6937): 337-342
20. Breen EC, Johnson EC, Wagner H, Tseng HM, Sung LA, Wagner PD. Angiogenic growth factor mRNA responses in muscle to a single bout of exercise. *J Appl Physiol* 1996, 81: 355-61
21. Breitbart AS, Grande DA, Kessler R, Ryaby JT, Fitzsimmons RJ, Grant RT. Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells. *Plat Reconstr Surg* 1998, 101: 567-76
22. Brighton CT, Hunt RM. Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J BJS* 1991, 73: 832-47
23. Brighton CT & Hunt RM (1997) Early histologic and ultrastructural changes in microvessels of periosteal callus. *J Orthop Trauma* 11: 244-253
24. Bucher O, Wartenberg H (1997) *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Huber Verlag, Bern
25. Buckwalter JA, Grodzinsky AJ. Loading of healing bone, fibrous tissue, and muscle: implications for orthopaedic practice. *J Am Acad Orthop Surg*. 1999, 7: 291-9
26. Burstein AH & Frankel VH (1971) A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech* 4: 155-158
27. Caplan AI (1990) Cartilage begets bone versus endochondral myelopoiesis. *Clin Orthop Relat Res* 257-267
28. Caplan AI: Bone development and repair. *Bioassays* 1997, 6: 171-5
29. 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

30. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A & al. (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380: 435-439
31. Carter DR, Beaupre GS, Giori NJ, Helms JA. Mechanobiology of skeletal regeneration. *Clin Orthop Relat Res* 1998, 355S: 41-55
32. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Boocock CA, Ahmed A, Plevin R, Ferrara N & Smith SK (1994) Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells. *Biol Reprod* 51: 524-530
33. Chavakis E, Riecke B, Lin J, Linn T, Bretzel RG, Preissner KT, Brownlee M & Hammes HP (2002) Kinetics of integrin expression in the mouse model of proliferative retinopathy and success of secondary intervention with cyclic RGD peptides. *Diabetologia* 45: 262-267
34. 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(1): 131-142
35. 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(4): 685-690
36. Chim SM, Tickner J, Chow ST, Kuek V, Guo B, Zhang G, Rosen V, Erber W, Xu J (2013) Angiogenic factors in bone local environment. *Cytokine Growth Factor Rev* 24(3): 297-310
37. Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D, Seidl W, Margevicius KJ, Augat P. Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clin Orthop Relat Res* 1998, 355S: 132-47
38. Claes L, Eckert-Hubner K, Augat P (2002) The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J Orthop Res* 20(5): 1099-1105
39. Colnot C, Thompson Z, Miclau T, Werb Z, Helms JA (2003) Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development* 130(17): 4123-4133
40. Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE & Lowik CW (2000) Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology* 141: 1667-1674
41. Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* 1998, 95: 737-40
42. Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM & Horowitz MC (1995) The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* 10: 1272-1281
43. Ferguson C, Alpern E, Miclau T & Helms JA (1999) Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* 87: 57-66

44. Ferrara N & Henzel WJ (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparinbinding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161: 851-858
45. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ & al. (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380: 439-442
46. Ferrara N & Keyt B (1997) Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications. *EXS* 79: 209-232
47. Ferrara N (1999) Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 77: 527-543
48. Fleisch H (1997) Bisphosphonates: mechanisms of action and clinical use in osteoporosis--an update. *Horm Metab Res* 29(3): 145-150
49. 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(3): 455-464
50. Garcia P, Holstein JH, Histing T, Burkhardt M, Culemann U, Pizanis A, Wirbel RJ, Pohlemann T, Menger MD (2008) A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: impact of stability on fracture healing. *J Biomech* 41(8): 1689-1696
51. Gavin TP, Robinson CB, Yeager RC, England JA, Nifong LW, Hickner RC. Angiogenic growth factor response to acute systemic exercise in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2004, 96: 19-24
52. 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: 2028-2035
53. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z & Ferrara N (1999) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5: 623-628
54. Gerber HP & Ferrara N (2000) Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med* 10: 223-228
55. Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO & Einhorn TA (2005) Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. *J Bone Miner Res* 20: 1715-1722
56. Goodship AE, Kenwright J. The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures. *J Bone Joint Surg Br* 1985, 67: 650-5
57. Gospodarowicz D, Abraham JA & Schilling J (1989) Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7311-7315

58. Grundnes O, Reikeras O. Mechanical effects of function on bone healing. Nonweight bearing and exercise in osteotomized rats. *Acta Orthop Scand* 1991, 62: 163-5
59. Grundnes O, Reikeras O. Effects of function on rat femora. *Acta Orthop Scand* 1992, 63: 70-3
60. Hankenson KD, Gagne K, Shaughnessy M (2015) Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 94: 3-12
61. Hankenson KD, Dishowitz M, Gray C, Schenker M (2011) Angiogenesis in bone regeneration. *Injury* 42(6): 556-61
62. Harada S, Rodan SB & Rodan GA (1995) Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in osteoblasts. *Clin Orthop Relat Res* 76-80
63. Harper J & Klagsbrun M (1999) Cartilage to bone--angiogenesis leads the way. *Nat Med* 5: 617-618
64. Herrgesell JD (1967) Aspirin poisoning in the cat. *J Am Vet Med Assoc* 151(4): 452-455
65. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT (1993) A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res* 11(2): 305-312
66. Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke MW, Wehner T, Bindl R, Recknagel S, Stuermer EK, Vollmar B, Wildemann B, Lienau J, Willie B, Peters A, Ignatius A, Pohlemann T, Claes L, Menger MD. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone*. 2011 Oct;49(4):591-9
67. Histing T, Kuntz S, Stenger D, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2013) Delayed fracture healing in aged senescence-accelerated P6 mice. *J Invest Surg* 26(1): 30-5
68. Histing T, Heerschop K, Klein M, Scheuer C, Stenger D, Herath SC, Pohlemann T, Menger MD (2016) Effect of Stabilization on the Healing Process of Femur Fractures in Aged Mice. *J Invest Surg* 18: 1-5
69. Histing T, Heerschop K, Klein M, Scheuer C, Stenger D, Holstein JH, Pohlemann T, Menger MD (2016) Characterization of the healing process in non-stabilized and stabilized femur fractures in mice. *Arch Orthop Trauma Surg* 136(2): 203-11
70. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T (2007) Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech* 40(1): 215-219
71. 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

72. 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(5): 1055-1062
73. Holstein JH, Garcia P, Histing T, Kristen A, Scheuer C, Menger MD, Pohlemann T (2009a) Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration. *J Orthop Trauma* 23(5 Suppl): 31-38
74. 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(1): 71-75
75. Holstein JH, Becker SC, Fiedler M, Scheuer C, Garcia P, Histing T, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2011) Exercise enhances angiogenesis during bone defect healing in mice. *J Orthop Res* 29(7): 1086-92
76. Holstein JH, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Histing T, Klein M, Laschke MW, Corsten M, Pohlemann T, Menger MD (2011) Intravital microscopic studies of angiogenesis during bone defect healing in mice calvaria. *Injury* 42(8): 765-71
77. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B & Leung DW (1991) The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5: 1806-1814
78. Hu K, Olsen BR (2016) Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *J Clin Invest* 126(2): 509-26
79. 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(2): 443-451
80. 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
81. 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(3): 475-477
82. Joukov V, Kaipainen A, Jeltsch M, Pajusola K, Olofsson B, Kumar V, Eriksson U & Alitalo K (1997) Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C. *J Cell Physiol* 173: 211-215
83. Junqueira L, Carneiro J (1996) *Histologie*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York
84. Jussila L, Valtola R, Partanen TA, Salven P, Heikkila P, Matikainen MT, Renkonen R, Kaipainen A & al. (1998) Lymphatic endothelium and Kaposi's sarcoma spindle cells

- detected by antibodies against the vascular endothelial growth factor receptor-3. *Cancer Res* 58: 1599-1604
85. Jussila L & Alitalo K (2002) Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev* 82: 673-700
  86. Kakeji Y, Koga T, Sumiyoshi Y, Shibahara K, Oda S, Maehara Y & Sugimachi K (2002) Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 21: 125-129
  87. Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A & Satow Y (1995) Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res* 55: 5687-5692
  88. Kenwright J, Richardson JB, Cunningham JL, White SH, Goodship AE, Adams MA, Magnussen PA, Newman JH. Axial movement and tibial fractures. A controlled randomised trial of treatment. *J Bone Joint Surg Br* 1991, 73: 654-9
  89. Kershaw CJ, Cunningham JL, Kenwright J. Tibial external fixation, weight bearing, and fracture movement. *Clin Orthop Relat Res* 1993, 293: 28-36
  90. Klein M (2008) Rapamycin beeinträchtigt die frühe Frakturheilung in der Maus. Dissertation der medizinischen Fakultät des Saarlandes
  91. Klein M, Stieger A, Stenger D, Scheuer C, Holstein JH, Pohlemann T, Menger MD, Histing T (2015) Comparison of healing process in open osteotomy model and open fracture model: Delayed healing of osteotomies after intramedullary screw fixation. *J Orthop Res* 33(7): 971-8
  92. 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): 222-230
  93. Koch P, Müller ME, Nazarian S (1990) *The Comprehensive Classification of Fractures of Long Bones*. Springer-Verlag, Berlin
  94. Le AX, Miclau T, Hu D, Helms JA (2001) Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures. *J Orthop Res* 19(1): 78-84
  95. Lee A, Christenson LK, Patton PE, Burry KA & Stouffer RL (1997) Vascular endothelial growth factor production by human luteinized granulosa cells in vitro. *Hum Reprod* 12: 2756-2761
  96. Lee SW, Padmanabhan P, Ray P, Gambhir SS, Doyle T, Contag C, Goodman SB & Biswal S (2008) 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*

97. Lienau J, Schell H, Duda GN, Seebeck P, Muchow S, Bail HJ (2005) Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability. *J Orthop Res* 23(3): 639-645
98. Lienau J, Schell H, Epari DR, Schutze N, Jakob F, Duda GN, Bail HJ (2006) CYR61 (CCN1) protein expression during fracture healing in an ovine tibial model and its relation to the mechanical fixation stability. *J Orthop Res* 24(2): 254-262
99. Lind PM, Lind L, Larsson S & Orberg J (2001) Torsional testing and peripheral quantitative computed tomography in rat humerus. *Bone* 29: 265-270
100. 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(6): 1300-1307
101. Lu C, Hansen E, Sapozhnikova A, Hu D, Miclau T, Marcucio RS (2008) Effect of age on vascularization during fracture repair. *J Orthop Res* 26(10): 1384-1389
102. Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, Wang J, Tuder RM & Voelkel NF (1998) In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am J Physiol* 275: H1054-61
103. Manigrasso MB, O'Connor JP (2004) Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma* 18(10): 687-695
104. Matthys R, Perren S (2008) Internal fixation systems for improved genetic and biomechanical studies in mice. 54th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society: San Francisco, CA: Poster No. 1005
105. 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: 543-547
106. Miclau T, Helms JA. Molecular aspects of fracture healing. *Curr Opin Orthop* 2000, 11: 367-71
107. 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(5): 651-659
108. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S & Poltorak Z (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13: 9-22
109. Nicosia RF (1998) What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis? *Am J Pathol* 153: 11-16
110. Noda M, Nagao M, Hanyu R, Miyai K, Ezura Y (2009) Bone fracture and the healing mechanisms. *Molecular bases of fracture healing. Clin Calcium* 19(5): 634-40
111. Nomura S, Takano-Yamamoto T (2000) Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol* 19(2): 91-96



112. Nunamaker DM (1998) Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* (355 Suppl): 56-65
113. Ogilvie CM, Lu C, Marcucio R, Lee M, Thompson Z, Hu D, Helms JA, Miclau T (2012) Vascular endothelial growth factor improves bone repair in a murine nonunion model. *Iowa Orthop J* 32: 90-4
114. Onishi T, Ishidou Y, Nagamine T, et al. Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenic protein (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats. *Bone* 1998, 22: 605-12
115. Opolka A, Ratzinger S, Schubert T, Spiegel HU, Grifka J, Bruckner P, Probst A, Grassel S (2007) Collagen IX is indispensable for timely maturation of cartilage during fracture repair in mice. *Matrix Biol* 26(2): 85-95
116. 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
117. Paydas S, Zorludemir S, Baslamisli F & Tuncer I (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in plasmacytoma. *Leuk Lymphoma* 43: 139-143
118. Petersen W, Wildemann B & Pufe T (2001) Das angiogenetische Peptid VEGF wird während der Frakturheilung exprimiert. *Z Orthop*
119. Plate KH & Warnke PC (1997) Vascular endothelial growth factor. *J Neurooncol* 35: 365-372
120. Pufe T, Petersen W, Tillmann B & Mentlein R (2001) Splice variants VEGF121 and VEGF165 of the angiogenic peptide vascular endothelial cell growth factor are expressed in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28: 1482-1485
121. Pufe T, Wildemann B, Petersen W, Mentlein R, Raschke M & Schmidmaier G (2002) Quantitative measurement of the splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor in the time flow of fracture healing: a study in the rat. *Cell Tissue Res* 309: 387-392
122. Restucci B, Papparella S, Maiolino P & De Vico G (2002) Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 39: 488-493
123. Rhinelander FW (1974) Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* (105): 34-81
124. Röntgen V, Blakytyn R, Matthys R, Landauer M, Wehner T, Göckelmann M, Jermendy P, Amling M, Schinke T, Claes L, Ignatius A (2010) Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an ajustable external fixator. *J Orthop Res* 28(11): 1456-62

125. Rossant J, Nagy A (1995) Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat Med* 1(6): 592-594
126. Rüter A, Trentz O, Wagner M (2003) *Unfallchirurgie*. Urban & Fischer bei Elsevier
127. Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Dudziak ME, Greenwald JA, Luchs JS, Spector JA, Ueno H & al. (1999) Transforming growth factor-beta1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts. *Am J Physiol* 277: C628-37
128. Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Spector JA, Greenwald JA, Chin GS, Ueno H, Gittes GK & al. (2000) Mechanisms of fibroblast growth factor-2 modulation of vascular endothelial growth factor expression by osteoblastic cells. *Endocrinology* 141: 2075-2083
129. Saran U, Gemini Piperni S, Chatterjee S (2014) Role of angiogenesis in bone repair. *Arch Biochem Biophys* 561: 109-17
130. Sarmiento A, Schaeffer JF, Beckerman L, Latta LL, Enis JE. Fracture healing in rat femora as affected by functional weight-bearing. *J Bone Joint Surg Am* 1977, 59: 369-75
131. Schiebler TH, Schmidt W (2003) *Anatomie*. Springer Verlag, Berlin
132. Schmidmaier G, Wildemann B, Melis B, Krummrey G, Einhorn T, Haas N, Raschke M (2004) Development and characterization of a standard closed tibial fracture model in the rat. *Eur J Trauma* 30: 35-42
133. Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, Kriehuber E, Nagy K & al. (2002) Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 161: 947-956
134. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS Dvorak HF (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983-985
135. Shimokado K, Raines EW, Madtes DK, Barrett TB, Benditt EP & Ross R (1985) A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell* 43: 277-286
136. Steck R, Ueno M, Gregory L, Rijken N, Wullschleger ME, Itoman M, Schuetz MA (2011) Influence of internal fixator flexibility on murine fracture healing as characterized by mechanical testing and microCT imaging. *J Orthop Res* 29(8): 1245-50
137. Stegen S, van Gastel N, Carmeliet G (2015) Bringing new life to damaged bone: the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone* 70: 19-27
138. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FVJ, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J & al. (2002) Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9656-9661

139. Steiner M, Volkheimer D, Meyers N, Wehner T, Wilke HJ, Claes L, Ignatius A (2015) Comparison between different methods for biomechanical assessment of ex vivo fracture callus stiffness in small animal bone healing studies. *PLoS One* 10(3): e0119603
140. Takahashi T, Shirasawa T, Miyake K, Yahagi Y, Maruyama N, Kasahara N, Kawamura T, Matsumura O & al. (1995) Protein tyrosine kinases expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: Flt-1 and VEGF expression in renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 209: 218-226
141. Teitelbaum SL, Ross FP (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4(8): 638-649
142. Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, Crisp T, Fiddes JC & al. (1989) Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 165: 1198-1206
143. Tohidnezhad M, Wruck CJ, Slowik A, Kweider N, Beckmann R, Bayer R, Houben A, Brandenburg LO, Varoga D, Sönmez TT, Stoffel M, Jahr H, Lippross S, Pufe T (2014) Role of platelet-released growth factors in detoxification of reactive oxygen species in osteoblasts. *Bone* 65: 9-17
144. Torry DS, Holt VJ, Keenan JA, Harris G, Caudle MR & Torry RJ (1996) Vascular endothelial growth factor expression in cycling human endometrium. *Fertil Steril* 66: 72-80
145. 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(5): 408-418
146. Vaisman N, Gospodarowicz D & Neufeld G (1990) Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 265: 19461-19466
147. Vi L, Baht GS, Whetstone H, Ng A, Wei Q, Poon R, Mylvaganam S, Grynepas M, Alman BA (2015) Macrophages promote osteoblastic differentiation in-vivo: implications in fracture repair and bone homeostasis. *J Bone Miner Res* 30(6): 1090-102
148. Weindel K, Marme D & Weich HA (1992) AIDS-associated Kaposi's sarcoma cells in culture express vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 183: 1167-1174
149. Wildemann B, Schmidmaier G, Ordell 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: 150-156

150. Yamagiwa H, Tokunaga K, Hayami T, Hatano H, Uchida M, Endo N, Takahashi HE (1999) Expression of metalloproteinase-13 (Collagenase-3) is induced during fracture healing in mice. *Bone* 25(2): 197-203
151. Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, Ross J & Jin H (1996) Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol* 27: 838-844
152. Yang X & Cepko CL (1996) Flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF), is expressed by retinal progenitor cells. *J Neurosci* 16: 6089-6099
153. Yang YQ, Tan YY, Wong R, Wenden A, Zhang LK, Rabie AB (2012) The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci* 4(2): 64-8
154. Yoo J, Johnstone B. The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair. *Clin Orthop* 1998, 273: 73-81
155. Zachos TA, Bertone AL, Wassenaar PA & Weisbrode SE (2007) Rodent models for the study of articular fracture healing. *J Invest Surg* 20: 87-95