

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

# **Einfluss von Erythropoietin auf die Frakturheilung im Alter**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät**

**Der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

**2020**

vorgelegt von: Johanna Baudach

geb. am: 23.07.1994 in Marl

Für meinen Vater

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Tina Histing

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Henning Madry

Tag der Promotion: 12.01.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung / Summary .....</b>	<b>9</b>
1.1 Zusammenfassung .....	9
1.2 Summary .....	10
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Biologie des Knochens.....</b>	<b>11</b>
2.1.1 Morphologie.....	11
2.1.2 Histologie .....	11
2.1.3 Physiologie .....	14
<b>2.2 Frakturheilung.....</b>	<b>15</b>
2.2.1 Primäre Frakturheilung.....	16
2.2.2 Sekundäre Frakturheilung .....	16
2.2.3 Biomarker der Frakturheilung .....	18
2.2.4 Tiermodelle zur Untersuchung der Frakturheilung.....	19
2.2.5 Frakturheilung im Alter.....	20
<b>2.3 Erythropoietin.....</b>	<b>21</b>
2.3.1 Struktur, Biosynthese und Wirkungsmechanismus.....	21
2.3.2 Therapeutische Anwendung.....	22
2.3.3 Experimentelle Anwendung .....	23
<b>2.4 Zielsetzung und Fragestellung.....</b>	<b>23</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Studienaufbau .....</b>	<b>25</b>
3.1.1 Studiendesign.....	25
3.1.2 Frakturmodell.....	26
3.1.3 Tiermodell .....	27
<b>3.2 Intervention .....</b>	<b>27</b>
3.2.1 Narkose.....	27



3.2.2 Operationstechnik.....	27
3.2.3 Postoperative Nachsorge .....	31
3.2.4 Medikation.....	31
3.2.5 Tötung der Tiere .....	31
3.2.6 Präparation der Knochen.....	31
<b>3.3 Auswertung .....</b>	<b>32</b>
3.3.1 Blutanalyse.....	32
3.3.2 Radiologie .....	32
3.3.2.1 Röntgen.....	32
3.3.2.2 Computertomographie.....	32
3.3.3 Biomechanik.....	33
3.3.4 Histologie .....	34
3.3.4 Western Blot.....	37
3.3.6 Statistik.....	38
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
4.1 Postoperativer Verlauf.....	39
4.2 Makroskopischer Befund .....	39
4.3 Blutanalyse.....	39
4.4 Radiologie .....	41
4.4.1 Röntgen.....	41
4.4.2 Mikrocomputertomographie.....	42
4.5 Biomechanik .....	46
4.6 Histologie .....	47
4.7 Western Blot .....	54
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>55</b>
5.1 Diskussion der Methoden.....	55
5.2 Diskussion der Ergebnisse .....	59
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>65</b>

<b>7 Publikation .....</b>	<b>75</b>
<b>7.1 Publikation.....</b>	<b>75</b>
<b>7.2 Posterpräsentation.....</b>	<b>75</b>
<b>8 Danksagung .....</b>	<b>76</b>
<b>9 Lebenslauf .....</b>	<b>77</b>

# Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A	Ampere
A. dest.	Aqua destilata
Abb.	Abbildung
ASBMR	American society for bone and mineral research
BMP-2	Bone Morphogenetic Protein 2
BV	Bone volume
ca.	Circa
CAr	Callus area
CD	Cluster of differentiation
CgAr	Cartilaginous tissue area
cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoietin
EPO-R	Erythropoietin Rezeptor
et al.	Et alii
FTAr	Fibrousus
g	Gramm
HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eisen
HPF	High power field
HRE	Hypoxia response element
IL	Interleukin
JAK2	Janus-Kinase 2
kDa	Kilodalton
keV	Kiloelektronenvolt
kg	Kilogramm
mg	Miligramm
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
N	Newton
OPG	Osteoprotegerin

PBS	Phosphat buffered saline
pH	Potentia hydrogenii
RANK	Receptor activator of nuclear factor kappa B
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand
®	registered
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-(SDS)-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SEM	Standard error of the mean
Tab.	Tabelle
TMD	Tissue mineral density
TM	trademark
TNF	Tumornekrosefaktor
TOTAr	Total-osseous tissue area
TRAP	Tartrat-resistant acid phosphatase
TV	Tissue volumne
U	Units
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VOI	Volumne of interest
W	Watt
μCT	Mikrocomputertomographie
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

# 1 Zusammenfassung / Summary

## 1.1 Zusammenfassung

Frakturen bei älteren Menschen heilen aufgrund des reduzierten Heilungspotenzials deutlich schlechter. Unter anderen wird dies durch eine verzögerte Angiogenese während des Heilungsprozesses verursacht. Erythropoietin (EPO) wirkt angiogen und es konnte gezeigt werden, dass EPO die Frakturheilung in jungen Mäusen verbessert. Ziel dieser Arbeit war es daher, zu untersuchen, ob EPO auch in alten Mäusen die Frakturheilung verbessert.

Untersucht wurde die Frakturheilung in einem Femurfrakturmodell der Maus. Die alten Mäuse erhielten täglich eine Dosis von 500 U/kg KG EPO intraperitoneal. Die Kontrollgruppe erhielt eine äquivalente Menge NaCl-Lösung. Die Knochen wurden radiologisch, biomechanisch, histomorphometrisch und mittels Western Blot untersucht.

Die Blutanalysen zeigten sowohl 14 als auch 35 Tage postoperativ höhere Hämoglobinkonzentrationen und höhere Hämatokritwerte bei den EPO-behandelten Tieren. In der Mikro-Computertomographie zeigte sich kein Unterschied bzgl. der knöchernen Volumenanteile im Kallusgewebe zwischen beiden Gruppen. Es konnte jedoch eine dreifach höhere Knochendichte des Kallus bei den EPO-behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen werden. Zudem war bei den EPO-behandelten Tieren die Knochendichte des Kallus verglichen mit der Knochendichte des unfrakturierten kontralateralen Femurs nahezu verdoppelt. Interessanterweise war die Biegesteifigkeit der Femora der EPO-behandelten Tiere signifikant geringer. Die histomorphometrischen Untersuchungen bzgl. der Kallusgröße und Kalluszusammensetzung waren in beiden Gruppen vergleichbar. Die Western Blot Analyse zeigte eine vermehrte Expression von Osteoprotegrin (OPG) und Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL) im Kallus der EPO-behandelten Tiere, was auf einen erhöhten Knochenumsatz hinweist. Die histologischen Untersuchungen hinsichtlich der Angiogenese zeigten eine höhere Gefäßdichte nach Behandlung mit EPO. Zudem war die Anzahl an tartrate-resistente acid phosphatase (TRAP) positiven Zellen erhöht.

Wahrscheinlich wird durch die Verschlechterung der Mikrozirkulation sowie durch den erhöhten Knochenumsatz die Frakturheilung bei alten Mäusen negativ beeinflusst. Eine Behandlung mit EPO sollte daher bei älteren Patienten nur zurückhaltend angewendet werden.

## 1.2 Summary

Fracture healing in the elderly is associated with a declined healing potential caused by multiple factors including a delay of vascularization. Erythropoietin (EPO) has been demonstrated to improve vascularization and fracture healing in adult mice. We, therefore, hypothesized that EPO in aged mice also improves fracture healing.

For this purpose, EPO was given daily in a femoral fracture model in aged mice and compared to vehicle-treated controls using radiological, biomechanical, histomorphometric and Western blot techniques.

Blood analyses revealed significantly higher concentrations of hemoglobin and a higher hematocrit in EPO-treated animals at 14 and 35 days after fracture. Micro-computed tomography ( $\mu$ CT) indicated that the fraction of bone volume/tissue volume within the callus did not differ between the two groups. However,  $\mu$ CT showed a 3-fold increased tissue mineral density (TMD) in the callus of EPO-treated animals compared to controls. The callus TMD of the EPO-treated animals was also 2-fold higher when compared to the TMD of the unfractured contralateral femur. Interestingly, biomechanical analyses revealed a reduced bending stiffness in femurs of EPO-treated animals at day 35. The histomorphometrically analyzed callus size and callus composition did not show significant differences between the study groups. However, Western blot analyses exhibited an increased expression of osteoprotegerin (OPG), but in particular of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) in the callus of the EPO-treated animals. Further histological analyses of the callus tissue showed that this was associated with an increased number of newly formed blood vessels and a higher number of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)+ cells.

Conclusion: In fracture healing of aged mice EPO treatment increases callus TMD as well as OPG and RANKL expression, indicating an accelerated bone turnover when compared to controls. However, EPO does not improve fracture healing in aged mice. The process of fracture healing may be altered by EPO due to a deterioration of the microcirculation caused by the worsened rheological properties of the blood and due to an increased bone fragility caused by the accelerated bone turnover. Thus, EPO may not be used to improve fracture healing in the elderly.

## 2 Einleitung

### 2.1 Biologie des Knochens

#### 2.1.1 Morphologie

Knochen werden ihrer Form entsprechend morphologisch gruppiert.

Ossa brevia sind kleine polygonale Knochen, zu denen beispielsweise die Hand- und Fußwurzelknochen gehören.

Ossa plana umfassen eine Gruppe platter Knochen, wie das Schulterblatt, die Rippen und das Brustbein.

Als Ossa longa werden röhrenförmige Knochen wie der Oberarm- und der Oberschenkelknochen bezeichnet. Röhrenknochen bestehen aus Epiphysen und dem dazwischen liegenden Schaft, der Diaphyse. Der Übergang zwischen Epi- und Diaphyse wird als Metaphyse bezeichnet [6].

Knochen bestehen aus einer zirkulären Außenschicht, Kompakta, und einer innenliegenden gitterartigen Spongiosa. Die Zwischenräume der Spongiosa werden durch rotes und gelbes Knochenmark ausgefüllt [79].

Der Heilungsprozess des Knochens wurde in der vorliegenden Studie im Bereich der Diaphyse untersucht.

#### 2.1.2 Histologie

Der Knochen ist ein vitales Gewebe mit der Fähigkeit zum Wachstum, Umbau und zur Heilung. Die mechanische Druck-, Biege- und Zugfähigkeit als Charakteristika des Knochens wird durch die extrazelluläre Matrix gewährleistet. Knochengewebe ist aus einer zellulären und einer azellulären Komponente aufgebaut. Zu den knochenspezifischen Zellen gehören Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten [79,119].

Die extrazelluläre Matrix besteht aus einem Verbund organischer und anorganischer Komponenten. Fibrilläres Kollagen, größtenteils Kollagen-Typ I, bildet ein zugfestes Gerüst,

indem vereinzelt spezifische Proteoglykane und Glykoproteine, z.B. Osteocalcin, vorkommen, welche anorganischen Ionen zur Mineralisation des Knochens binden. Die Druckfestigkeit wird durch kristallisierte anorganische Komponenten erreicht. Als Hauptbestandteil liegen hierfür Kalziumphosphate, als Hydroxyapatit ( $3 \text{ Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$ ), vor, welche ca. 45 % des Trockengewichtes des Knochens ausmachen. Der Mineralisationsgrad der Knochenmatrix ist abhängig von dem Kalzium- und Phosphatangebot im Organismus und unterliegt der hormonellen Regulation [79,119].

Die Ausrichtung und der Verlauf der Kollagenfibrillen sind ausschlaggebend für die räumliche Organisation der extrazellulären Matrix, so dass zwischen Geflecht- und Lamellenknochen unterschieden wird. Im Geflechtknochen verlaufen die Kollagenfibrillen in Bündeln und sind miteinander verwoben. Diese Bauform ist zellreich und tritt vorzugsweise bei schneller Knochenbildung, beispielweise bei der Frakturheilung, auf. Im weiteren Umbauprozess kommt es zur Ausbildung lamellärer Strukturen. Im Lamellenknochen liegen die Kollagenfibrillen mit gleichsinniger Ausrichtung in 3-5 µm dicken Schichten bzw. Lamellen vor. Zwischen den Lamellen liegen vereinzelt Osteozyten. Im Vergleich zum Geflechtknochen ist diese Bauform mechanisch stabiler [79,119].

Die innenliegende Spongiosa weist eine gitterartige Struktur auf. Die Lamellen verlaufen flächig und bilden ein Gerüst aus kleinen avaskulären Knochenbälkchen. Diese werden mittels Diffusion durch das angrenzende Knochenmark versorgt, weswegen die Trabekel maximal eine Dicke von ca. 300 µm im Durchmesser erreichen können. Die trajektorielle Ausrichtung der Bälkchen entspricht der mechanischen Beanspruchung des Knochens und wird dieser permanent angepasst [34,79].

Die zirkulär verlaufende Außenschicht des Knochens, Kompakta, wird auch als Kortikalis bezeichnet. Die Lamellen liegen geschichtet und größtenteils als Osteone organisiert vor. Osteone sind längliche rund-ovale Systeme mit einem Durchmesser bis zu 400 µm, deren Verlauf sich an der Längsrichtung des Knochens orientiert. Die Knochenlamellen verlaufen hierbei konzentrisch um einen Havers-Kanal, welcher mit der Markhöhle in Verbindung steht und neben vereinzelt Bindergewebszellen und Nervenendigungen ein Gefäß enthält. Zur Nutrition der Osteozyten ziehen vom Havers-Kanal radiär kleine Gänge durch die Knochenlamellen. Durch diese querverlaufende Gänge, welche als Volkmann-Kanäle bezeichnet werden, wird eine Verbindung zwischen den einzelnen Havers-Kanälen geschaffen, so dass ein weitreichendes System zur Versorgung des Knochens entsteht. Die äußerste und innere Lamelle umfassen als Generallamelle die gesamte Zirkumferenz des



Knochens. Schaltlamellen weisen auf den ständigen Umbau- und Anpassungsprozess des Knochens hin und liegen als Reste alter Osteone zwischen den Bestehenden [79,120].

Die Innenseite des Knochens und die Wände der Havers-Kanäle sind mit Endost überzogen, einer dünnen Schicht aus nicht mineralisierten Kollagenfibrillen gefolgt von einer kontinuierlichen Schicht aus mesenchymalen Stammzellen, Osteoblasten, Osteoprogenitorzellen, sowie Osteoklasten. Die Außenseite des Knochens, mit Ausnahme der mit Knorpel überzogenen Gelenkflächen, wird vom zweischichtigen Periost bedeckt. Das außenliegende Stratum fibrosum besteht aus straffem Bindegewebe, von welchem kollagene Sharpey-Fasern radiär in das Knocheninnere ziehen. Das Stratum osteogenicum liegt der Knochenmatrix direkt auf, dessen Aufbau entspricht dem des Endost. Durch sein osteogenes Potential trägt das End- und Periost entscheidend zu Umbau- und Heilungsprozessen des Knochens bei [79,120].

Die Bildung knöcherner Substanz erfolgt durch Osteoblasten. Hierbei handelt es sich um Zellen mesenchymalen Ursprungs, die durch Wachstumsfaktoren zu Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten reifen. Die Knochenbildung erfolgt durch Ablagerung neuer Knochensubstanz auf bereits Vorhandener. Hierbei bilden die Osteoblasten eine unmineralisierte Kollagenmatrix und stellen durch diverse Phosphatasen, z.B. die alkalische Phosphatase, hohen Mengen an anorganischem Phosphat und Kalzium für die Mineralisation zur Verfügung. Durch Ausfällung der Ionen mineralisiert die Matrix zunehmend. Während der Osteogenese liegt eine hohe Anzahl an Osteoblasten vor. Nach abgeschlossener Knochenbildung differenzieren die Blasten zum Teil zu Osteozyten aus, da sie von der nachfolgenden Osteoblastenfront mit neuer Knochensubstanz überlagert werden. Ein weiterer Teil geht nach Abschluss der obersten Lamelle wieder in einen inaktiven Zustand über und lagert sich in das Endost bzw. Periost ein. Mehr als die Hälfte der Osteoblasten wird nach abgeschlossener Knochenbildung hingegen nicht mehr gebraucht und durchläuft den programmierten Zelltod [62,79,120].

Osteoklasten sind polynukleäre Zellen. Diese entstehen aus der Fusion monozytären Vorläuferzellen und sind somit im Gegensatz zu den Osteoblasten, bzw. Osteozyten, hämatopoietischen und nicht mesenchymalen Ursprungs. Osteoklasten sind auf die Resorption der mineralisierten Matrix spezialisiert. Im aktiven Zustand liegen sie dieser direkt an und bauen sie ab, wobei Resorptionsgruben, Howship-Lakunen, entstehen. Über ein von den Osteoklasten geschaffenes saureres Milieu gehen die kristallisierten Kalziumphosphate wieder in Lösung, die organische Komponente wird enzymal abgebaut [62,79].

Im Gegensatz dazu haben Mäuse keine Havers-Systeme. Im Rahmen der Frakturheilung erfolgt der Knochenumbau über Resorptionshöhlen, welche nahe den Frakturrenden liegen und mit neuem Knochen gefüllt werden [90].

### 2.1.3 Physiologie

Der Bewegungsapparat umfasst einen aktiven, die Skelettmuskulatur, und einen passiven Anteil, die Knochen. Die Skelettmuskulatur führt Bewegungen einzelner Skelettanteile aus. Die Knochen werden zusammenfassend als Skelett bezeichnet und erfüllen die Halte- und Stützfunktion. Die kavitäre Form, z.B. der Schädel oder der Thorax, bietet Schutz für die inneren Organe. Darüber hinaus fungiert der Knochen als zentrales Speichermedium von Mineralien und ist über hormonelle Regelkreisläufe in die Kalzium- und Phosphathomöostase eingebunden [6].

Bereits makroskopisch ist erkennbar, dass die Knochenbinnenräume mit rotem und gelbem Knochenmark ausgefüllt werden. Das rote Knochenmark füllt primär alle Hohlräume des Knochens aus. Ab dem 5.-6. Fetalmonat ist es hämatopoetisch aktiv und versorgt den Organismus mit allen Blutzelllinien. Beim Adulten ist das rote Knochenmark reduziert und Fettgewebe füllt als gelbes Knochenmark den Großteil der Knochenbinnenräume. Die Hämatopoese ist vor allem in platten Knochen lokalisiert. Im Fall chronischer Hypoxie oder Anämie kann das Volumen des gelben Knochenmarks zu Gunsten des Roten reduziert werden. Somit gibt es mehr Raum für die Hämatopoese, insbesondere für die Erythropoese [10].

Der Knochen ist ein dynamisches Gewebe, welches sich durchgehend in einem Resorptions- und Formationsprozess befindet, woraus Wachstum, Modeling und Remodeling resultieren [33].

Der Wachstumsprozess des Knochens verläuft über die primäre Bildung von Geflechtknochen, dieser wird im späteren Modelingprozess (s.u.) in mechanisch stabileren Lamellenknochen umgebaut. Das Dickenwachstum des Knochens geht vom Stratum osteogenicum des Periosts aus, das Längenwachstum findet an den Epiphysen statt [79].

Als dynamisches Gewebe ist der Knochen fähig seine Architektur mechanischer Belastung anzupassen (Modeling). Das Potential hierzu sinkt jedoch mit voranschreitendem Alterungsprozess [31].

Der Prozess des Remodeling findet unabhängig mechanischer Belastung lebenslang statt. Als zentrale Funktion gilt die Reparatur von Mikrofrakturen, wobei zeitlich begrenzt eine anatomische Einheit aus Osteoklasten und Osteoblasten besteht. Die Formgebung oder das Volumen des Knochens ändern sich hierbei oder beispielsweise auch bei der Frakturheilung jedoch nicht [31].

Die Bildung knöcherner Strukturen beginnt mit der Verdichtung mesenchymalen Gewebes, anschließend wird zwischen desmaler und chondraler Ossifikation unterschieden. Bei beiden Ossifikationswegen wird zunächst Geflechtknochen gebildet. Die desmale Ossifikation beschreibt die direkte Osteoidbildung durch Osteoblasten. Bei der chondralen Ossifikation hingegen wird zunächst eine hyaline Matrix geschaffen, die als Matrize für den knöchernen Umbau dient [79].

## 2.2 Frakturheilung

Die Frakturheilung ist ein komplexer mehrstufiger Prozess zur Wiederherstellung der Kontinuität des Knochens. Aufgrund Reaktivierung embryonaler Vorgänge und kontinuierlichem Remodeling kann der Knochen fast narbenfrei heilen und biomechanisch regenerieren [39,83]. Die komplette Wiederherstellung der Knochenarchitektur wird jedoch eher bei infantilen Frakturen beobachtet [27]. Für eine adäquate Frakturheilung müssen nachfolgende Bedingungen erfüllt sein [28]:

- Ausreichende Durchblutung
- Ruhigstellung der Fraktur
- Kontakt zwischen den Knochenfragmenten

Eine Ruhigstellung der Fraktur ist entscheidend für den Heilungsprozess. Zu viel interfragmentärer Bewegung und Instabilität führt zu einer größeren Kallusmanschette, da Scher- und Stauchungskräfte das permanente Zerreißen der Kallusformation zur Folge haben. Das Entstehen einer Pseudarthrose, definiert als ausbleibende Konsolidierung der Fragmente 6 Monate nach dem Frakturgeschehen, wird begünstigt [104]. Schröter et al. beschrieben jedoch einen prolongierten Heilungsprozess bei mangelnder interfragmentärer Bewegung, da hierdurch mechanische Reize zur Knochenbildung fehlen [105].

## 2.2.1 Primäre Frakturheilung

Bei der primären Frakturheilung kann ein interfragmentärer Abstand von maximal 0,5 mm direkt mit Knochensubstanz aufgefüllt werden. Charakteristischerweise bleibt eine Kallusbildung und Aktivierung mesenchymaler Stammzellen aus. Kleine Knochendefekte heilen meist auf diesem Weg [27]. Ausschlaggebend ist die anatomisch korrekte Reposition der Knochenfragmente, deren mechanische Stabilisierung mittels Osteosynthese und Immobilisation sowie eine ausreichende Vaskularisation der Frakturzone [8,103].

Auf mikroskopischer Ebene wird zwischen Kontakt- und Spaltheilung unterteilt. Bei einem Frakturspalt von maximal 0,2 mm kann beim Menschen die Kontaktheilung erfolgen. An den Frakturenden wachsen die Osteone axial in das gegenüber liegende Fragment ein. Osteoklasten resorbieren frakturierte Matrixreste und bohren in das gegenüberliegende Fragment Kanäle, die durch Osteoblasten mit neuer lamellärer Knochensubstanz aufgefüllt werden. Auf mikroskopischer Ebene ist somit eine Verzahnung erkennbar [8,103].

Bei einem Abstand größer als 0,2 mm wird von Spaltheilung gesprochen. Interfragmentär wird zunächst Geflechtknochen gebildet, welcher im weiteren Heilungs- bzw. Remodelingprozess zu Lamellenknochen mit longitudinaler Orientierung umgebaut wird [8,103].

Bis dato wurde keine primäre Frakturheilung bei Mäusen nachgewiesen. In den meisten experimentellen Studien heilten die Frakturen sekundär oder rein intramembranös [35,43,46,55,80].

## 2.2.2 Sekundäre Frakturheilung

Bei der sekundären Frakturheilung wird intermediär eine den Frakturspalt überbrückende Bindegewebsmanschette gebildet. Diese als Kallus bezeichnete Gewebeformation gewährleistet eine primäre Stabilität der Bruchzone. Durch das Frakturereignis wird ein lokaler Entzündungsprozess initiiert, der zur Aktivierung mesenchymaler Stammzellen führt und somit die Bildung von Knorpel- und Knochenmasse generiert. Im weiteren Remodelingprozess erfolgt der Umbau zur Ursprungsform des Knochens [39,81].

Da diese Heilungsform keiner rigiden Stabilisierung und anatomisch korrekter Kongruenz der Knochenfragmente bedarf, tritt sie u.a. bei mangelnder Reposition der Fragmente bei

konservativer oder auch operativer, u.a. Marknagelung langer Röhrenknochen, Therapie auf [27,104].

Nach der Verletzungsphase bildet sich interfragmentär ein Hämatom, dessen Größe vom Ausmaß der Zerstörung ossärer (Spongiosa, Periost, Endost, Knochenmark) und vaskulärer Strukturen abhängt. Das Hämatom formt ein primäres Gerüst für den Kallus und gilt als Initiator des darauf folgenden Entzündungs- und Heilungsprozesses. Simultan mit dem Ausbreiten des Frakturhämatoms gelangen wichtige Entzündungsmediatoren in den Frakturspalt. Ein Entfernen des Hämatoms kann den Heilungsprozess prolongieren und das Entstehen einer Pseudarthrose begünstigen [25,65].

Die darauffolgende Entzündungsphase, etwa 48-72 Stunden nachdem Frakturereignis, ist durch erste Gefäßeinsprossung und Rekrutierung pluripotenter Stammzellen, neutrophiler Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen gekennzeichnet. Sie beginnt mit dem Ausbreiten des Frakturhämatoms und wird durch proinflammatorische Mediatoren reguliert. Neben den bekannten Funktionen der Zytokine und Wachstumsfaktoren zeigen sich auch knochenspezifische Funktionen. Beispielsweise steigert IL-20 die Osteoklasten-Aktivität und senkt die Osteoblastendifferenzierung. Auch IL-6 trägt zur Differenzierung der Osteoblasten und -klasten bei [19,39,57,58,103]. Angiogene Faktoren, z.B. VEGF (vascular endothelial growth factor), initiieren das Einsprossen neuer Kapillare und schaffen somit ein Gefäßnetz im Kallus, das neben nutritiven Funktion auch die Grundlage zur Migration mesenchymaler Stammzellen ist [15,81,81,103,104].

In der anschließenden Granulationsphase, 3.- 4. Woche nach Frakturereignis, wird ein weicher Kallus als erste fibrinreiche Verbindung zwischen den Fragmenten gebildet. Neben Lymphozyten, Fibroblasten und etlichen Kapillaren, sind in dieser Phase erste Mineralisationskerne zwischen den Kollagenfibrillen nachweisbar. Der weiche Kallus ist von geringer Rigidität und somit keine mechanisch belastbare Verbindung [103,104].

Bei der Maus wird der weiche Kallus binnen 14 Tage nach Frakturereignis gebildet [27].

Durch knöchernen Umbau wird der Kallus zunehmend rigider. Osteoprotegrin (OPG), Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) und Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor (M-CSF) zählen hierbei zu den dominierenden Regulatoren. Im Stratum osteogenicum werden Osteoprogenitorzellen aktiviert und auf desmalen Weg Geflechtknochen gebildet. Die Aktivierung ist nicht lokal begrenzt, so dass auch an der frakturfernen Kortikalis knöcherne Ablagerungen beobachtet werden können. Für den knöchernen Umbau des Kallus wird zunächst durch Chondroblasten ein hyalines

Primodialskelett geschaffen. Im weiteren Verlauf werden Mineralisationsinseln durch hypertrophe Chondroblasten gebildet. Durch das Einwachsen von Gefäßen in die primäre Matrix gelangen Osteoklasten und –blasten in die Heilungszone. Osteoklasten resorbieren die hyalinen Strukturen und mineralisierten Schollen. Einige von diesen werden für die Osteoblasten als Ossifikationskerne belassen und zur Auflagerung neuer Knochensubstanz genutzt. Mit zunehmender Größe verschmelzen die Ossifikationskerne und bilden erste knöcherne Strukturen, dessen Ausrichtung sich am Gefäßnetz des Kallus orientiert. Sobald eine feste Verbindung zwischen den Fragmente besteht wird von einem Fixationskallus gesprochen [26,103,104].

Als knöcherne Konsolidierung ist durch den Fixationskallus ist eine primäre Stabilität gewährleistet. Mehrere Monate nach dem Frakturereignis wird weiterhin ein Umbau- und Anpassungsprozess des Knochens zur Wiederherstellung der Integrität in das vorbestehende skelettale System beobachtet. Erst dadurch wird die vollständige mechanische Regeneration erreicht [39].

### 2.2.3 Biomarker der Frakturheilung

Der Zytokinkomplex aus RANK (receptor activator of nuclear factor kappa b), RANKL (RANK-Ligand) und OPG (Osteoprotegrin) ist integraler Bestandteil der Osteoklastenfunktion und an deren Proliferation, Differenzierung, Fusion, Migration, Funktion und Apoptose ausschlaggebend beteiligt. OPG neutralisiert RANKL, so dass ein physiologisches Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau ostealer Strukturen entsteht [5,31,123].

Als Mitglied der tumor necroses factor (TNF) Familie handelt es sich bei RANKL um einen Osteoklasten aktivierenden Faktor, welcher in löslicher oder in gebundener Form vorkommen kann. RANKL kann auch in Geweben wie Herzmuskel, Lunge oder Schilddrüse nachgewiesen werden, die höchsten Konzentrationen liegen jedoch im Knochen und lymphatischen Gewebe vor. Osteoblasten bilden größtenteils die gebundene Form, T-Lymphozyten sezernieren vermehrt den Liganden [2].

Der zugehörige Rezeptor ist auf Osteoklasten und deren Vorläufern lokalisiert. Die Bindung des Liganden führt zur Exozytose osteoklastäre Kollagenasen und Metalloproteinasen und somit zur Resorption knöcherner Strukturen [21].

Bei der Frakturheilung wird besonders in den Phasen des Ab- bzw. Umbaus mineralisierter Matrixstrukturen ein massiver Anstieg der RANKL-Konzentrationen im Kallus beobachtet. Im physiologischen Zustand ist die Expression deutlich geringer [67].

OPG hemmt übermäßigen Knochenabbau. Es wird ebenfalls von Osteoblasten sezerniert und neutralisiert die lösliche Form des RANKL und das membrangebundene Äquivalent. Bei reifen Osteoklasten initiiert es die Apoptose [70,108].

Am Rattenmodell konnte eine Korrelation erhöhter OPG-Konzentrationen mit der Genese der primär kartilaginären Matrix 24 Stunden nach dem Frakturereignis beobachtet werden. Ein weiterer Peak der Expression steht mit dem Beginn des Remodelingprozess ungefähr 7 Tage nach der Frakturierung in Zusammenhang [67].

## 2.2.4 Tiermodelle zur Untersuchung der Frakturheilung

Zur Untersuchung der Frakturheilung wurden bereits Mitte des 20. Jahrhunderts erste Tierversuche durchgeführt [114,116].

Tiermodelle bieten den Vorteil, dass der Heilungsprozess in einem lebenden Organismus untersucht werden kann. Durch die Verwendung von Großtiermodellen wie Ziegen, Schafen oder Hunden sind die anatomischen Verhältnisse sehr gut mit dem Menschen vergleichbar. Zusätzlich wurden auch Kleintiermodelle etabliert, da diese mit einem geringen Kostenaufwand für Materialien und Haltung verbunden sind. Ein besonderer Vorteil von Mäusen ist die Möglichkeit transgene knock-out Stämme zu verwenden, um die molekularen Mechanismen der Frakturheilung zu untersuchen. Untersuchungen zur Frakturheilung werden meist am Femur durchgeführt [47,59].

Es wird bei der Frakturierung wird zwischen offenen und geschlossenen Verfahren unterschieden. Offene Verfahren bieten die Möglichkeit einer definierten Osteotomie. Somit können beispielweise Pseudarthrosen gezielter untersucht werden. Das Weichteiltrauma hingegen kann den Heilungsverlauf prolongieren. Bei geschlossenen Verfahren wird der Knochen mit einer Guillotine frakturiert; die Stabilisierung erfolgt in der Regel minimal invasiv. Obwohl hierdurch ein stumpfes Weichteiltrauma entsteht, ist die Methode gewebeschonender [46]. Es gibt auch Studien, die die Fraktur nicht stabilisieren. Hierbei zeigte sich jedoch eine signifikant schlechtere Heilung. Histing et al. konnten zeigen, dass bei beiden, adulten und alten, Mäusen der Remodellingprozess verzögert ist [50].

Zu den offenen Frakturmodellen gehört die Pin-Clip-Osteosynthese. Ein intramedullärer Pin wird mit einem den Frakturspalt übergreifenden Clip kombiniert und gewährleistet somit eine Rotationstabilität. Das Verfahren ist mit geringen Materialkosten verbunden und für die Untersuchung von Pseudarthrosen geeignet. Als Nachteil gelten die aufwendige Operationstechnik sowie der zur Osteotomie erzeugte Weichteilschaden [56,86,98].

Beim Locking-Nail-System wird ein Nagel mit einem proximalen Gewinde verankert und über zwei Pins über eine Querbohrung rotationsstabil verankert. Somit können ebenfalls Knochendefekte untersucht werden [47].

Der Fixateur externe ist aus 4 Schrauben und einem extrakorporalen Verbindungselement aufgebaut und gewährleistet eine hohe Stabilität der Osteosynthese. Mit diesem Verfahren kann ebenfalls die Spaltgröße der Osteotomie variiert werden. Von Nachteil ist, dass die Größe der Apparatur zu Bewegungseinschränkungen und Beeinflussung des Gangbildes führen kann, was den Heilungsprozess beeinträchtigt [47,98,102].

Zusätzlich steht eine Plattenosteosynthese zur Verfügung. Die Platte wird mit vier winkelstabilen Schrauben am Knochen verankert [45,82,98].

Die MouseScrew (RISystem, Davos, Schweiz) ist ein geschlossenes Modell zur intramedullären Stabilisierung. Das Implantat wird von distal in das Femur eingebracht und verankert sich über ein proximales Gewinde in der Kortikalis. Distal hat die Schraube zur Verankerung einen erweiterten Konus. Durch die beidseitige Verankerung kann der Frakturspalt komprimiert werden. Das Implantat bietet dadurch eine definierte Rotationsstabilität. Durch das minimalinvasive Vorgehen wird das Weichteiltrauma möglichst gering gehalten [52,55,98].

In der vorliegenden Studie wird die MouseScrew zur Untersuchung der Frakturheilung verwendet.

## 2.2.5 Frakturheilung im Alter

In der zunehmend älter werdenden Bevölkerung wird eine steigende Inzidenz an Knochenbrüchen beobachtet, wie u.a. Chang et al. an einem gehäuften Auftreten osteoporotischer Frakturen ab dem 60. Lebensjahr zeigen konnten. Die Morbidität und Mortalität ist im Vergleich zu jüngeren Patienten deutlich erhöht [16,18].

Im Alter ist der Knochenmetabolismus verändert und zu Gunsten der Osteoklastogenese verschoben. Unter Anderem ist eine verminderte Qualität und Quantität mesenchymaler Stammzellen ursächlich. So weisen z.B. gealterte Stammzellen ein verändertes Expressionsmuster von RANKL und OPG auf. RANKL wird im Vergleich zu Jungen vermehrt



synthetisiert [73,78]. Somit wird eine gesteigerte osteoklastische Aktivität generiert und es resultiert ein kontinuierlicher Verlust an Knochenmasse [4,7,106]. Im Vergleich zu jungen Mäusen zeigte sich bei alten Mäusen eine reduzierte Kallusgröße mit signifikant niedrigeren Mineralisierungsgrad [76,78,125].

Die altersbedingte Abnahme der Regenerationskapazität zeigt sich im Rahmen der Vaskularisation durch eine verminderte Rekapillarisation und Kollateralisierung bei akuten und chronischen Ischämien [88,100]. Auch bei der Frakturheilung wird eine altersbedingte Dysfunktion des kapillären Systems als Faktor der verzögerten Angiogenese diskutiert [18,97].

## 2.3 Erythropoietin

Als mitogener Differenzierungsfaktor für erythroid-determinierte Vorläuferzellen gilt EPO als hormoneller Regulator der Erythropoese [68].

Die Erythropoese ist ein kontinuierlich ablaufender Prozess. Da die Lebensdauer eines Erythrozyts ca. 100 Tage beträgt, wirkt eine basale EPO-Synthese dem Abfall der Erythrozytenanzahl entgegen [60]. Ein Abfall des lokalen Sauerstoffpartialdruckes, als Zeichen einer Gewebehypoxie, führt zu einer immensen EPO-Synthese, so dass durch eine kompensatorische Erhöhung der Erythrozytenanzahl und somit gesteigertem Hämoglobingehalt des Blutes wieder eine adäquate Sauerstoffversorgung hergestellt wird. Beim Erwachsenen wird EPO größtenteils in der Niere produziert [71,111].

### 2.3.1 Struktur, Biosynthese und Wirkungsmechanismus

EPO gehört zur Familie der Zytokine. Es ist ein 30,4 kDa schweres globuläres Glykoprotein. Die Kohlenhydrathülle trägt zur Stabilität des Molekül in vivo bei. Sie macht ca. 40 % des Molekulargewichtes aus. 60 % des Gewichtes entfallen auf den Kern. Der Kern wird aus 165 Aminosäuren gebildet, welche 4  $\alpha$ -Helices formen. Diese Einheit interagiert mit dem EPO-R (EPO-Rezeptor) [22,24,60,121].

Die Transkription des EPO-Gens wird durch Hypoxie-induzierte Faktoren, sogenannte (HIFs), reguliert. Als Dimer bestehen sie aus einer  $\alpha$ -Untereinheit, von welcher drei Isoformen existieren (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ ), und einer  $\beta$ -Untereinheit [72,94]. HIF- $\alpha$  ist sauerstoffsensitiv. EPO-synthetisierende Zellen bilden den HIF- $\alpha$  konstitutiv. Es liegt im

Zytosol vor und wird bei ausreichend hohen Sauerstoffkonzentrationen abgebaut. Im Fall eines Sauerstoffmangels wird HIF- $\alpha$  vermindert abgebaut und akkumuliert somit. Die Alpha-Untereinheit transloziert in den Nucleolus, wo sie mit der  $\beta$ -Einheit einen Dimer bildet. Dieser Dimer bindet an die korrespondierende DNA-Sequenz (Hypoxia response element) und die Transkription des EPO-Gens wird nach Rekrutierung weiterer Kofaktoren initiiert [41]. Bei adäquater Sauerstoffversorgung führt ein Feedback-Mechanismus zu einer Senkung der EPO-Synthese [122].

Verschiedene Mechanismen können die Transkription des EPO-Genlocus unterbinden. In einem sauerstoffreichen Milieu ist der Promotor des EPO-Gens durch den Transkriptionsfaktor GATA-2 blockiert. Des Weiteren sorgt GATA-2 auch dafür, dass die EPO-Synthese in der Niere stattfindet, da es durch Blockierung des Genlocus die ektopische Synthese unterbindet. Im Fötus ist die Leber der Hauptproduktionsort des EPOs. Bei Umlokalisierung des Syntheseortes gegen Ende der Schwangerschaft wird auch eine Mitbeteiligung des GATA-2 diskutiert [41,60,92].

Proinflammatorische Mediatoren, z.B. IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , können des Weiteren die EPO-Synthese inhibieren [29,30,60].

Der EPO-R gehört als Glykoprotein zur Familie der Zytokin-Klasse-I-Rezeptoren. Er hat eine transmembranöse, eine extra- und eine intrazelluläre Domäne und wird aus insgesamt 484 Aminosäuren gebildet [61]. Ein EPO-Molekül initiiert die Dimerisierung zweier EPO-R und somit deren Konformationsänderung, wodurch die Autophosphorylierung einer konstitutiv intrazellulär gebundenen Janus-Kinase 2 (JAK2) induziert wird. Es wird eine Kette weitere Phosphorylierungen aktiviert, welchen in der enzymatischen Inhibierung der Apoptose und Begünstigung der Proliferation und Differenzierung der Zielzelle münden [109,118].

Neben den erythroiden Vorläufern wurde der EPO-R auch in nicht hämatologischen Geweben nachgewiesen. Es wird diskutiert, dass die Expression des Rezeptors auf myokardialen, endothelialen und osteogenen Zellen vordergündig mit einer gewebeschonenden, proliferationsfördernden und angiogenetischen Funktion in Zusammenhang steht [60,71].

### 2.3.2 Therapeutische Anwendung

Wegen seiner stimulierenden Wirkung auf die Blutbildung hat EPO sich im klinischen Alltag als potentes Medikament zur Anämiebehandlung bewährt. Neben renaler und tumorassoziierter Genese gehören auch die Gewinnung von Eigenblut vor elektiven

Operationen und die Ablehnung einer Fremdblutspende aufgrund religiöser Ansichten zu den zugelassenen Indikationen. In der Regel werden Dosierungen zwischen 80–120 U/kg Körpergewicht appliziert, um einen Hämoglobinanstieg von maximal 1–2 g/dl wöchentlich zu erreichen. Als Therapieziel wird meist ein Hämoglobinspiegel von 10–12 g/dl angestrebt. Zu den limitierenden Faktoren der Erythropoese zählt die Verfügbarkeit des Eisens, so dass gegebenenfalls eine Substitution erfolgen muss [32].

Unter Begleiterscheinungen wie Kopfschmerzen, allergische Reaktionen und Unruhe wird vor allem eine behandlungsbedürftige Hypertonie sowie ein gehäuftes Auftreten von Thrombosen als Nebenwirkung des EPO beobachtet. Aufgrund einer gestörten Mikrozirkulation durch Erhöhung der zellulären Komponente wird die Blutviskosität verändert, bzw. erhöht, und durch eine EPO-generierte Hypertrophie der glatten Gefäßmuskulatur die Entstehung vaskulärer Spasmen begünstigt. Daher sollte vor allem die Blutgerinnung laborchemisch kontrolliert werden und gegebenenfalls eine zusätzliche medikamentöse Antikoagulation erfolgen [9,32].

### 2.3.3 Experimentelle Anwendung

Es wurden bereits mehrere Studien durchgeführt, die eine gewebeprotective und proliferationsfördernde Wirkung des EPO belegen [13,56,75,96,110]. Analoge Syntheseinduktion und strukturelle Parallelen zu VEGF (vascular endothelial growth factor) erklären die Hypoxie induzierte EPO-vermittelte Angiogenese, so dass EPO bereits mehrfach Forschungsgegenstand war [1,63,124].

Im Rahmen der Frakturheilung zeigte EPO bei adulten Mäusen eine stimulierende Wirkung auf die Vaskularisierung und enchondrale Ossifikation des Kallus. Die biomechanische Stabilität des Kallus war erhöht und die Frakturheilung verbessert [37,56]. Zudem konnte eine positive Beeinflussung von EPO im Pseudarthrosenmodell nachgewiesen werden. Die Frakturzone wurde stärker vaskularisiert, die Osteogenese stimuliert und folglich die enchondrale Ossifikation und somit Regeneration gesteigert [56].

## 2.4 Zielsetzung und Fragestellung

Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass EPO die Frakturheilung bei jungen Mäusen signifikant verbessert [37,53,56]. Bis dato gibt es noch keine Untersuchungen, ob die Behandlung mit EPO auch bei alten Mäusen die Frakturheilung verbessert.

Ziel ist es daher, den Einfluss von EPO auf die Frakturheilung bei alten Mäusen zu untersuchen.

Die Nullhypothese lautet: „Die Gabe von Erythropoietin verbessert die Frakturheilung bei alten Mäusen nicht.“

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Studienaufbau

#### 3.1.1 Studiendesign

Die Versuche mit der Versuchsnummer 45/2015 wurden von der zuständigen Behörde, Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittel- und Veterinärwesen – Zentralstelle, Konrad-Zuse-Straße 11, 66115 Saarbrücken, genehmigt. Unter Aufsicht des Versuchsleiters wurden alle Tierversuche am Institut für experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes nach Bestimmung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Es wurden 38 Versuchstiere verwendet (s. Tab.1).

	EPO		Kontrolle		
	2 Wochen	5 Wochen	2 Wochen	5 Wochen	
Blutanalyse	n=8	n=8	n=8	n=8	n=32
Radiologie	n=8	n=8	n=8	n=8	n=32
Biomechanik	n=8	n=8	n=8	n=8	n=32
Histologie					n=32
<i>Safranin-O-Färbung</i>	n=8	n=8	n=8	n=8	
<i>HE-Färbung</i>	n=6		n=6		
<i>TRAP-Färbung</i>	n=6		n=6		
Western Blot	n=3		n=3		n=6
					n=38

Tab. 1: Versuchsprotokoll

Es erfolgte am selben Tier sowohl die biomechanische, radiologische und histologische Auswertung. Für die Western Blot Analyse wurden weitere 6 Tiere operiert (n=3 je Gruppe).

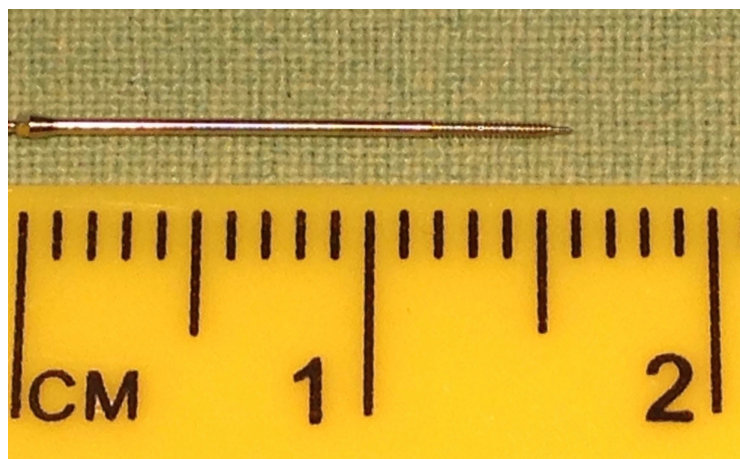
### 3.1.2 Frakturmodell

Zur Untersuchung der Frakturheilung wurde ein geschlossenes Frakturmodell (MouseScrew) verwendet. Die Frakturierung des linken Femurs erfolgte mittels Drei-Punkt-Biegevorrichtung (Abb. 1). Die Fraktur wurde mit einer stumpfer Guillotine und einem Fallgewicht von 80 g erzeugt [11,54].



*Abb. 1: stumpfe Guillotine*

Anschließend wurde die Fraktur mit einer intramedullären Zugschraube (MouseScrew; Abb. 2) stabilisiert. Das Implantat ist aus medizinischem Stahl gefertigt und misst in der Länge 17,2 mm und im Durchmesser 0,5 mm und wiegt 0,02 g. Durch ein proximales Gewinde und einen distalen Konus, im Durchmesser 0,8 mm, wird der Frakturspalt komprimiert.



*Abb. 2: MouseScrew*

### 3.1.3 Tiermodell

Als Versuchstiere wurden 18 Monate alte CD-1 Mäuse beider Geschlechter mit einem Körpergewicht von  $50 \pm 5$  g verwendet.

Die Versuchstiere wurden am Institut für experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes unter klimatisierten Raumbedingungen (Raumtemperatur  $23 \pm 1$  °C, relative Luftfeuchtigkeit 60 %) bei einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Futter in Pelletform (Altromin 1320, Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser stand den Tieren jederzeit ad libidum zur Verfügung.

## 3.2 Intervention

### 3.2.1 Narkose

Die Narkose erfolgt mittels intraperitonealer Applikation von Ketamin (75 mg/kg KG; Urostamin 100 mg/ml, Serumwerk Bernburg, Bernburg, Deutschland) und Xylazin (25 mg/kg KG; Rompun® 2 %, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland). Es erfolgte prä- und perioperativ eine regelmäßige Testung der Narkosetiefe mittels Schmerzreiz, Zwischenzehenreflex, und bedarfsgerechte Anpassung der Sedierung und Analgesie.

Peri- und postoperativ wurde Carprofen (Rimadyl™, Zoetis GmbH, Berlin, Deutschland) in einer Dosierung von 5 mg/kg KG als Analgetikum subkutan appliziert. Dexpanthenol (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital) wurde zum perioperativen Kornealschutz auf die Augen des Tieres aufgetragen. Es wurde mit einer Wärmeplatte als Unterlage gearbeitet, um das Auskühlen des Tieres perioperativ zu verhindern.

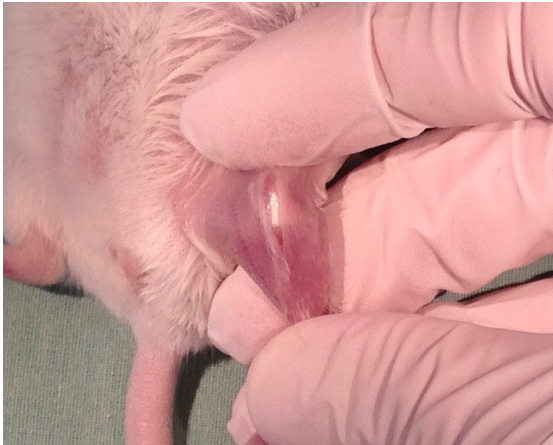
### 3.2.2 Operationstechnik

Die Operation wurde unter semisterilen Bedingungen durchgeführt. Sobald das Tier narkotisiert war, erfolgte die Rasur des linken Beines. Die verbliebenen Haare wurden mit einer Enthaarungscreme (asid® med – ASID BONZ GmbH, Herrenberg, Deutschland) entfernt. Das Bein wurde unter fließendem warmen Leitungswasser gereinigt und anschließend desinfiziert (Octeniderm, Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland).

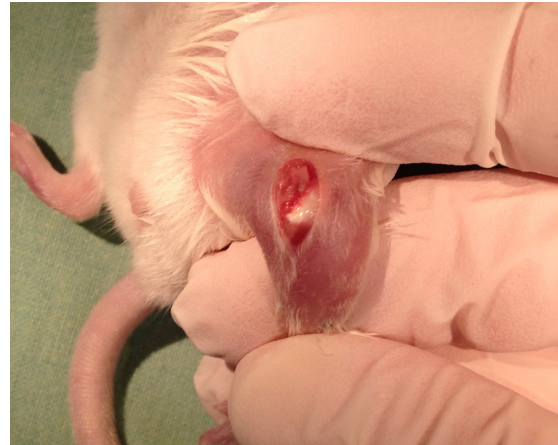
Zu Beginn wurde das Tier in Rückenlage gebracht. Das linke Bein des Tieres wurde flektiert und mit Daumen, Zeigefinger und Mittelfinger der rechten Hand fixiert, so dass die Haut über dem Knie der Maus gespannt war. Mit einer Skalpellklinge (Carbon steel Skalpellklinge 15 – Aesculap, Tutlingen, Deutschland) erfolgte die ca. 10 mm lange Hautinzision medial des Kniegelenkes und Darstellung der Patellarsehne (Abb. 3). Anschließend wurde diese mobilisiert und mittels feiner anatomischer Pinzette nach lateral luxiert, um das Gelenk zu öffnen und die Femurkondylen frei zu legen. Bei dem Manöver wurde darauf geachtet, dass die Patellarsehne intakt bleibt (Abb. 4).

Mit einer 24 G Injektionskanüle (Microlance 3 – 24 G, 0,55 mm x 25 mm, Becton Dickinson, Drogheda, Irland) wurde interkondylär die Markhöhle aufgebohrt (Abb. 5). Sobald die Kortikalis durchbohrt und der Markraum eröffnet war, wurde dieser mit einer feineren Injektionskanüle (Microlance 3 – 27 G, 0,4 mm x 19 mm, Becton Dickinson) aufgebohrt und die proximale Femurkortikalis durchstoßen. Das Tier wurde in Seitenlage gebracht und ein kanülierter Führungsdraht (Ø 0,2 mm RISystem) in das Femur retrograd vorgeschoben, bis dieser an der Haut dorsal palpierbar war. Durch eine ca. 2 mm lange Hautinzision konnte der Draht weiter vorgeschoben werden, so dass beiden Enden außerhalb der Maus liegen (Abb. 6). Mittels Drei-Punkt-Biege-Vorrichtung erfolgte die geschlossene Frakturierung des Femurs [54] (Abb. 7). Es erfolgte anschließend eine radiologische Kontrolle (Abb. 8). Zur Implantation der intramedullären Zugschraube wurde die Maus wieder in Seitenlage gebracht. Eingespannt in einen Schraubendreher wurde die Zugschraube auf den kanülierten Führungsdraht aufgesetzt und über diesen retrograd implantiert (Abb. 9). Die Zugschraube wurde soweit vorgedreht, bis der Konus vollständig im distalen Femurzugang versenkt wurde, so dass sich das Schraubengewinde in der proximale aufgebohrten Kortikalis verankern konnte (Abb. 10). Nach der Reluxation der Patella wurde die Kniegelenkscapsel mit einem nicht resorbierbaren monofilem Faden (5-0 Prolene® Ethicon Inc., Somerville, USA) in Einzelknopfnahntechnik verschlossen (Abb. 11). Der Hautverschluss erfolgte ebenfalls mit einem nicht resorbierbaren monofilen Faden (Abb. 12). Im Anschluss erfolgte die postoperative radiologische Kontrolle der Implantatlage (Abb. 13).

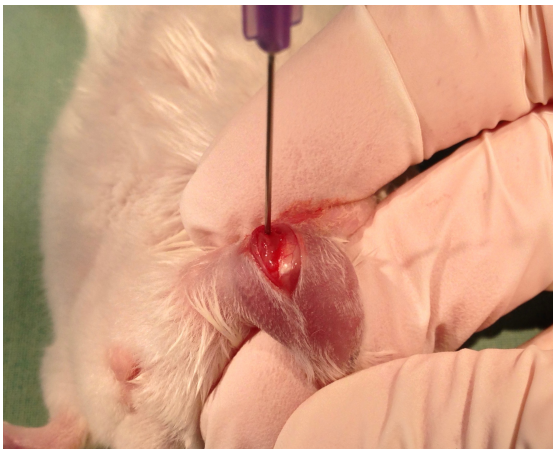




*Abb. 3: Sicht auf Patellarsehne*



*Abb. 4: Sicht auf Fossa intercondylaris*



*Abb. 5: Aufbohren des Markraums*



*Abb. 6: Eingebrachter Führungsdraht*



*Abb. 7: Fraktur mittels Guillotine*



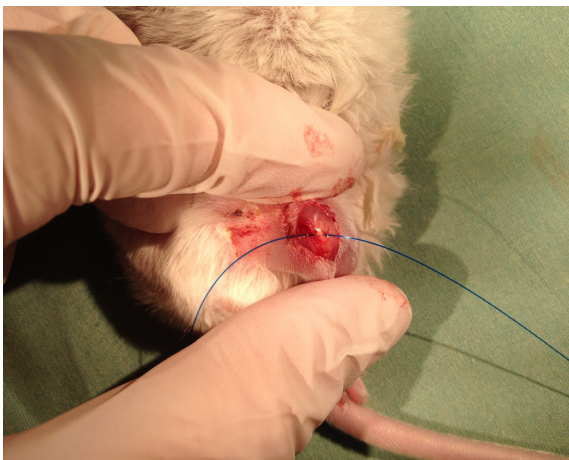
*Abb. 8: Röntgenkontrolle der Fraktur*



*Abb. 9: Implantation der Schraube*



*Abb. 10: Schraubenkonus im distalen Femurzugang*



*Abb. 11: Refixation der Patellarsehne*



*Abb. 12: Hautverschluss*



*Abb. 13: Röntgenkontrolle postoperativ*



### 3.2.3 Postoperative Nachsorge

Die Tiere wurden für circa 2 Stunden unter eine Infrarotlampe (230 V/ 100 W – Philips, Amsterdam, Niederlande) gelegt, bis die Wirkung der Narkose nachgelassen hat. Während der Behandlungsdauer erfolgte die tägliche Inspektion zum Ausschluss von anhaltenden Schmerzen, Bewegungseinschränkungen, Infektionen oder Implantatdislokationen.

### 3.2.4 Medikation

In einem zeitlichen Abstand von  $24 \pm 2$  Stunden erfolgte die Gabe von EPO intraperitoneal (500 U/kg KG, n=19). Die Kontrollgruppe erhielt gewichtsadaptiert das äquivalente Volumen isotoner Kochsalzlösung. (NaCl 0,9 %, Braun, Melsungen, Deutschland)

### 3.2.5 Tötung der Tiere

Nach 2 bzw. 5 Wochen wurden die Tiere mit Ketamin (75 mg/kg KG, Ursotamin®, Serumwerk Bernburg) und Xylazin (25 mg/kg KG, Rompun®, Bayer Vital) erneut sediert. Über eine mediane Laparotomie erfolgte die Darstellung der Vena cava. Diese wurde punktiert und 1 ml Blut aspiriert. Anschließend erfolgte, in Narkose, durch Genickbruch die Tötung der Mäuse.

### 3.2.6 Präparation der Knochen

Beide Femora wurden explantiert. Über einen Hautschnitt von der Hüfte bis zum Knie wurden die Femora freipräpariert. Dann erfolgte die Exartikulation in der Hüfte und im Knie. Unter Zuhilfenahme einer feinen Pinzette wurden die Femora vorsichtig von Bindegewebe und Muskelfasern frei präpariert. Der Konus des Implantats wurde mit einem Nadelhalter gefasst und das Implantat entfernt. Es wurde darauf geachtet, dass die Femora bei Explantation und den folgenden Analyseverfahren kontinuierlich mit isotonischer Kochsalzlösung feucht gehalten wurden.

## 3.3 Auswertung

### 3.3.1 Blutanalyse

Die Blutuntersuchung wurde am Ende der Behandlung von je 2 bzw. 5 Wochen durchgeführt. Es wurde venöses Vollblut der Vena cava inferior untersucht. Die Tiere waren zum Entnahmezeitpunkt narkotisiert (s. 3.2.1 Narkose). Das entnommene Vollblut wurde in eine EDTA-Lösung gegeben und binnen 30 min mittels elektrischer Impedanz die Hämoglobinkonzentration (g/dl) und der Hämatokrit (%) gemessen.

### 3.3.2 Radiologie

#### 3.3.2.1 Röntgen

Intraoperativ, postoperativ und vor Explantation der Femora wurden Röntgen-Aufnahmen gemacht. Das Röntgengerät (Faxitron® MX-20 Cabinet X-ray System, Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, USA) war mit einer Belichtungszeit von 0,01 s, einer Stromstärke von 10 A und einer Stromspannung von 25 kV eingestellt. Die anfertigten Aufnahmen hatten eine Auflösung von 1336 x 2000 Pixel.

In dieser Studie wurden die Aufnahmen zur Kontrolle der Fraktur, der Implantatlage und der Reposition der Knochenfragmente sowie abschließend zum Ausschluss einer Implantatdislokation verwendet.

Die Heilung wurde mittels CT analysiert.

#### 3.3.2.2 Computertomographie

Für die computertomographische (CT) Auswertung wurden die Knochen in ein kleines mit isotoner Kochsalzlösung gefülltes Kunststoffgefäß gegeben.

Zur Analyse wurde ein Mikro-CT der Firma Bruker (Skyscan 1172 X-Ray Microtomograph, Skyscan/Bruker microCT, Kontich, Belgien) verwendet. Der Strahlengang war senkrecht zum Knochen. Bei einer Anodenspannung von 50 keV erfolgte die Bildaufnahme im Abstand von 0,4 Grad Rotation. Es wurde bei einer räumlichen Auflösung von 6,5 µm unter Einsatz eines

Aluminium-Filter, 0,5 mm, gearbeitet. Die Speicherung erfolgte als dreidimensionaler Datensatz. Mit einem Rekonstruktionsprogramm (NRecon 1.6.9.8; Skyscan/Bruker microCT) wurden axiale Schnittbilder angefertigt. Das hierfür definierte Volumen of interest (VOI) war der Gesamtkallus, welcher manuell möglichst exakt konturiert wurde. Anhand von Kalzium-Hydroxyapatit-Phantomen mit bekannter Mineralisationsdichte von 0,25 g/cm<sup>3</sup> und 0,75 g/cm<sup>3</sup> erfolgte die Kalibrierung der Grauwerte. Ab einer Mineralisationsdichte  $\geq 0,410$  g/cm<sup>3</sup> wurde von mineralisiertem Knochen gesprochen [93]. Anschließend wurde die Analyse der VOI durchgeführt (CTAnalyzer Version 1.14.4.1, Skyscan/Bruker microCT).

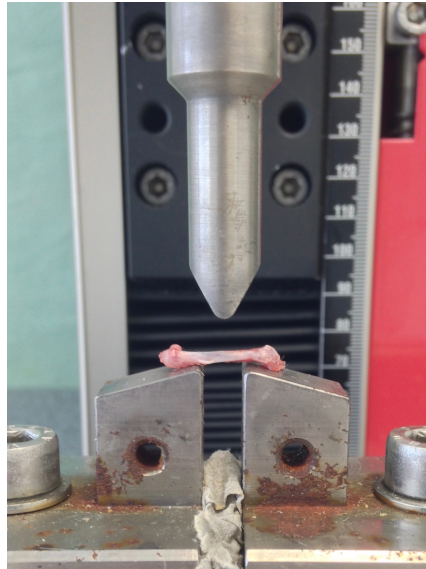
Folgende Parameter wurden gemessen:

- Knochenvolumen (BV; bone volume) in mm<sup>3</sup>
- Gesamtkallusvolumen (TV; tissue volume) in mm<sup>3</sup>
- Knochenvolumen/ Gesamtkallusvolumen (BV/TV) in %
- Mineralisationsdichte des Kallus (TMD; tissue mineral density) in g/cm<sup>3</sup>

Zur Beurteilung der Mineralisationsdichte des kontralateralen Femurs wurde die Kortikalis als VOI markiert und nach oben genanntem Verfahren analysiert.

### 3.3.3 Biomechanik

Zur biomechanischen Analyse wurde die Mini-Zwick Z 2,5 – Zwick GmbH, Ulm, Deutschland verwendet [42]. Die Femora wurden einheitlich je mit der ventralen Seite nach oben in der Apparatur positioniert, der Abstand der Auflagestempel betrug 6 mm (Abb. 14).



*Abb. 14: 3-Punkt-Biege-Testung*

Es wurde darauf geachtet, den Kallus zentriert unter dem Prüfstempel zu positionieren. Mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/min erfolgte die Messung. Um die Individualität der einzelnen Femora zu berücksichtigen, wurde die Messung beendet, sobald der Verlauf des Weg-Kraft-Diagramms mehr als 1 % von einem linearen Verlauf abwich. Die Biegesteifigkeit wurde anhand des Weg-Kraft-Diagramms ermittelt. Die Biegesteifigkeit (N/mm) des frakturierten Femurs und des unfrakturierten Femurs desselben Tiers wurde gemessen. Anschließend wurde die prozentuale Biegesteifigkeit (%) des Kallus zum unfrakturierten kontralateralen Femur berechnet.

### 3.3.4 Histologie

Nach biomechanischer und radiologischer Analyse erfolgte die histologische Aufarbeitung der Knochen.

Zunächst wurden die frakturierten Femora einzeln in Einbettkassetten gegeben und für 24 Stunden in 4 % Formalin fixiert. Darauf erfolgte die Entkalkung in 10 %iger EDTA-Lösung bei 4 °C für 2 bis 3 Wochen. Anschließend wurden die Präparate unter fließendem Leitungswasser gespült, bevor sie in aufsteigender Alkohol-Reihe (70 %, 80 %, 90 %, 3 x 100 %) für je eine Stunde entwässert wurden. Die Femora wurden durch das Einlegen in Xylol (4 x 1 Stunde) paraffingängig gemacht, bevor sie mit heißem Paraffin eingebettet wurden. Mit einem Rotationsmikrotom erfolgte die Anfertigung von sagittal-longitudinal Schnitten mit einer Dicke von 2 µm. Nach Übertragung auf die Objektträger wurden die

Schnitte bei 60 °C in einem Wärmeschrank für 24 Stunden getrocknet und somit auf dem Objektträger fixiert. Anschließend erfolgte die jeweilige Färbung (s.u.).

Zur Digitalisierung der histologischen Präparate wurde mit einem 1,25x Weitwinkelobjektiv und einem an das Mikroskop (Olympus BX60 microscope, Olympus, Shinjuku, Japan) angeschlossenen Kamera-System (Zeiss Axio Cam and Axio Vision 3.1, Zeiss, Jena, Deutschland) gearbeitet. Es wurde eine 50-fache Vergrößerung erzielt. Zur Messung von Arealen im Kallus wurde das Bildauswertungsprogramm ImageJ Analysis System® (NIH, Bethesda, USA) verwendet.

Als Kallus wurde ausschließlich periosteal gelegenes Gewebe definiert.

Die Gewebezusammensetzung des Kallus wurde unter Anwendung der Safranin-O-Färbung analysiert.

Zunächst erfolgte die Eisenhämatoxylinfärbung nach Weigert. Die Schnittpräparate wurden hierzu für 1 Minute mit einer Eisenhämatoxylinlösung eingefärbt. Hierfür wurden zwei Lösungen hergestellt. Für die Hämatoxylinlösung wurde 1 g Hämatoxylin (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA) in 100 ml 96 %igem Ethanol gegeben und reifte für eine Woche. Die Eisenchloridlösung enthielt 2,48 g Eisen-Hexahydrat (VWR International) in 100 ml A.dest, es wurde ein 1 ml konzentrierte Salzsäure hinzu gesetzt. Erst kurz vor dem Färbeprozess wurden beide Lösungsansätze zu gleichen Teilen miteinander vermengt und aufgetragen. Anschließend wurde mit A.dest. gespült. Zur Differenzierung wurden die Schnitte fünfmal in HCL-Alkohol eingetaucht und anschließend unter fließendem Leitungswasser gebläut. Im Anschluss erfolgte die 4-minütige Färbung in 0,02 %iger Fast-Greenlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland), eine weitere Spülung mit 1 %iger Essigsäure und die Färbung mit 0,1 %iger-Safranin-O-Lösung (Merck). Nach 5 Minuten wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe entwässert. Vor dem Eindecken wurden die gefärbten Präparate mit Xylol gespült.

Mit der angewandten Safranin-O-Färbung stellten sich die verschiedenen Gewebearten wie folgt dar.

- Knochen = türkis
- Knorpel = rot
- Bindegewebe = lila

Es wurde die absolute periosteale Kallusfläche gemessen und sowie die Knochen-, Knorpel- und Bindegewebsanteile [40].

- Periosteale Kallusfläche: CAr (callus area) in mm<sup>2</sup>

- Knochenanteil:                   TOTAr (total osseous tissue area) / CAr in %
- Knorpelanteil:                   CgAr (cartilaginous tissue) / CAr in %
- Bindegewebeanteil:           FTAr (fibrous tissue) / CAr in %

Zur Bestimmung der Gefäßdichte des Kallus wurden die Anzahl der Blutgefäße bestimmt. Hierzu wurde die HE-Färbung nach Böhmer verwendet.

Die Präparate wurden mit Xylol, einer absteigender Alkoholreihe und A. dest. gespült. Anschließend erfolgte die Hämatoxylinfärbung nach Böhmer. Hierzu wurden zwei Stammlösungen hergestellt. 1 g Hämatoxylin (VWR International) wurde in 10 ml absolutem Ethanol gelöst. Für die zweite Lösung wurden 20 g Kaliumaluminiumsulfat in 200 ml warmen A. dest. gelöst, mit 1 ml Salzsäure versetzt und filtriert. Beide Stammlösungen wurden gemischt und reiften für eine Woche offen bei Raumluft. Die gereifte Färbelösung wurde für 3 Minuten auf die Präparate gegeben. Anschließend erfolgte, nach Spülen mit A. dest., die Differenzierung durch HCL-Alkohol und das Bläuen unter fließendem Leitungswasser. Die Präparate wurden im Anschluss für 30 s mit Eosin gegen gefärbt. Nach dem Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe wurden die Präparate mit Xylol versetzt und eingedeckt.

Zur Auswertung wurden in der periostealen Kallusfläche 4 gleich große Areale (High Power Field, HPF) definiert und die Gefäße wurden anhand der Lumenmorphologie identifiziert. Die Vaskularisationsdichte wurde als Gefäße / HPF angegeben.

Mittels TRAP-Färbung wurde die Quantität der Osteoklasten im periostealen Kallus bestimmt.

Die Schnittpräparate wurden mit Xylol entparaffiniert. Die TRAP-Färbelösung bestand aus 5 mg Naphtol-AS-MX-Phosphat (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und 11 mg Fast-Red-Violet LB Salz (Sigma Aldrich) in 10 ml Natrium-Acetat-Puffer (0,2 M, pH 5, Sigma Aldrich) zusammensetzte. Je Schnitt wurden 500 µl aufgetragen. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37 °C für 45 Minuten. Nachdem Färben wurden die Präparate mit A. dest gespült und die Zellkerne mit Hämalaun (Merck) gegen gefärbt, bevor sie eingedeckt wurden.

Für die Auswertung wurde bei 400 x Vergrößerung gearbeitet (Olympus BX60 Mikroskop). Die Anzahl der TRAP-positiven Zellen wurde in der Versuchs- und Kontrollgruppe im periostealen Kallus quantifiziert und unter Verwendung von 4 HPF als TRAP-positive Zellen/HPF angegeben.



### 3.3.4 Western Blot

Die Expression von OPG und RANK-L im Kallus wurde nach zweiwöchiger Heilungsphase mittels Western Blot analysiert. Bei 6 Tieren, 3 je Gruppe, erfolgte gemäß o. g. Methodik Operation, Therapie sowie Tötung. Das Kallusgewebe (knorpeliger und fibröser Anteil) wurde isoliert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung und Analyse bei -80 °C kryokonserviert.

Zur Extraktion der Proteine wurde das Kallusgewebe mit einem Lyse-Puffer (10 mM Tris pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5 % Triton-X 100, 0,02% NaN<sub>3</sub>, 0,2 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), Protease Inhibitor Cocktail (1:100 v/v), Phosphatase Inhibitor Cocktail (1:100 v/v); Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) mechanisch homogenisiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis und Zentrifugation bei 16000 x g und 4°C, erfolgte die Messung der Proteinkonzentration mittels der Methode nach Lowry.

Nach Denaturierung wurden die Proteinextrakte mittels SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-(SDS)-Polyacrylamidgel-Elektrophorese) aufgrund ihrer Molekülgröße getrennt und das resultierende Proteinbandenmuster auf eine Polyvinylendifluorid-Membran übertragen bzw. geblottet. Nachdem freie unspezifische Bindungsstellen blockiert worden waren, erfolgte die Inkubation der Membranen mit den Primärantikörpern (Kaninchen Anti-Maus OPG (1:50 über Nacht bei 4°C, 1:300 4 Stunden bei Raumtemperatur, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) bzw. Kaninchen Anti-Maus RANK-L (1:100 über Nacht bei 4°C, 1:300 3 Stunden bei Raumtemperatur, Bioss, Antibodies Online, Aachen, Deutschland)). Abschließend wurden die Membranen mit einem Meerrettich-Peroxisdase (POD) konjugierten Sekundärantikörper (Ziege Anti-Kaninchen-IgG POD (1:2500, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)) für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Proteinexpression wurde mit einem Luminol-enhanced Chemilumineszenz Reagenz (ECL Western Blotting Analysis System, GE Healthcare, Freiburg Deutschland) visualisiert und mittels ECL ChemoCam Imager (ChemoStar und LabImage 1D Software, Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland) analysiert. Ungleiche Beladung wurde über das jeweilige  $\beta$ -Aktin-Signal (Maus Anti-Maus  $\beta$ -Aktin, 2 Stunden bei Raumtemperatur, 1:5000, Sigma-Aldrich) korrekturgerechnet.

Von einer Analyse der Proteinexpression nach fünfwöchiger Therapiedauer wurde abgesehen, da in diesem Heilungsstadium nur wenig Kallusgewebe vorlag und das Remodelling im Rahmen der Frakturheilung weitgehend abgeschlossen war.

### 3.3.6 Statistik

Die erhobenen Daten wurden statistisch mit dem Programm SigmaPlot 13 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) ausgewertet. Vorab erfolgte durch einen Shapiro-Wilk-Test die Überprüfung auf Normalverteilung. Als Mittel zur Untersuchung der Varianzgleichheit im Gruppenvergleich wurde der student's t-test gewählt. Bei nicht-parametrischen Daten wurde der Mann-Whitney-Rank-Sum-Test angewendet.

Im Folgenden werden die Daten jeweils als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM; standard error of the mean) angegeben.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Postoperativer Verlauf

Postoperativ zeigten die Tiere zunächst eine Schonhaltung des frakturierten Beines. Am ersten postoperativen Tag erfolgte neben der Medikamentengabe die zweite subkutane Gabe des Analgetikums (5 mg/kg KG Carprofen (Rimadyl® 50 mg/ml – Zoetis Deutschland GmbH)). Im Verlauf von wenigen Tagen konnte eine Abnahme der Schonhaltung und zunehmende physiologische Belastung des Beines beobachtet werden.

### 4.2 Makroskopischer Befund

Makroskopisch fiel das rot-violette Hautkolorit der EPO-Tiere auf. Der Frakturspalt war makroskopisch mit Kallusgewebe überbaut. Nach 5 Wochen zeigte sich eine kleinere Kallusformation als 2 Wochen postoperativ, die exakte Größenbestimmung des Kallus erfolgte jedoch radiologisch.

### 4.3 Blutanalyse

Im venösen Blut der Tiere wurden die Hämoglobinkonzentration und der Hämatokrit bestimmt.

Nach zweiwöchiger EPO-Therapie wurde bei den Tieren mit  $18,4 \pm 0,9$  g/dl eine nahezu doppelt so hohe Hämoglobinkonzentration wie in der entsprechenden Kontrollgruppe ( $10,7 \pm 0,6$  g/dl) nachgewiesen ( $p < 0,05$ ; Abb. 15 A). Auch 5 Wochen postoperativ zeigte sich nach der EPO-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant erhöhte Hämoglobinkonzentration ( $p < 0,05$ ; Abb. 15 B).

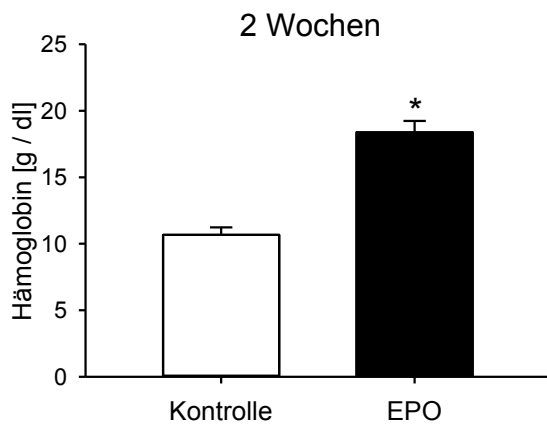
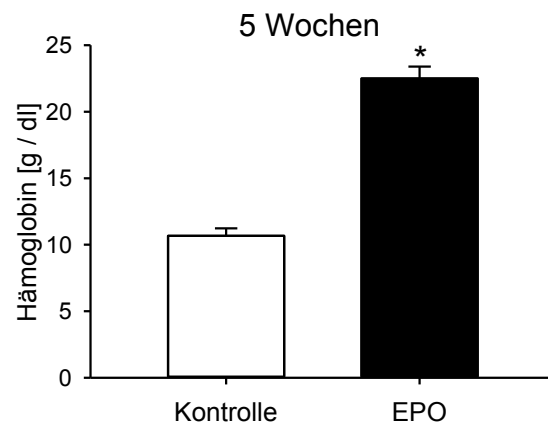
**A****B**

Abb. 15: Hämoglobinkonzentration der Kontrolle (weiße Balken) und der EPO-Gruppe (schwarze) Balken 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ .

Der Hämatokritwert war nach 2 Wochen EPO-Behandlung mit  $68,6 \pm 3$  % signifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ; Abb. 16 A). Eine insgesamt fünfwöchige EPO-Behandlung zeigte einen weiteren Anstieg des Hämatokritwertes auf ca. 80 %. Der Unterschied zur entsprechenden Kontrollgruppe war ebenfalls signifikant ( $p < 0,05$ ; Abb. 16 B).

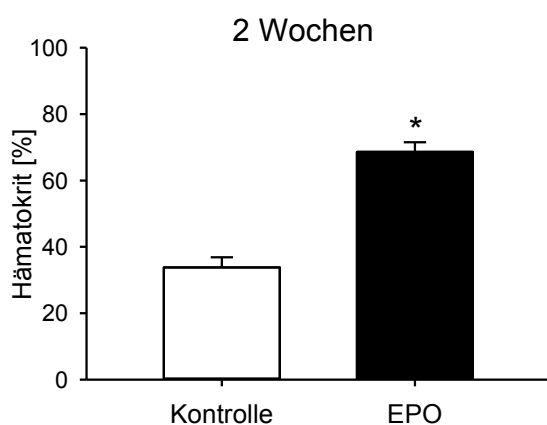
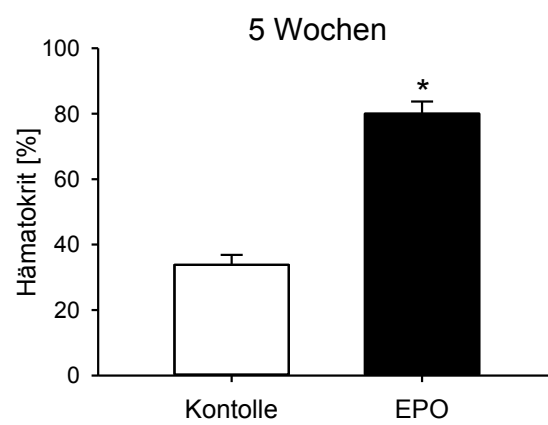
**A****B**

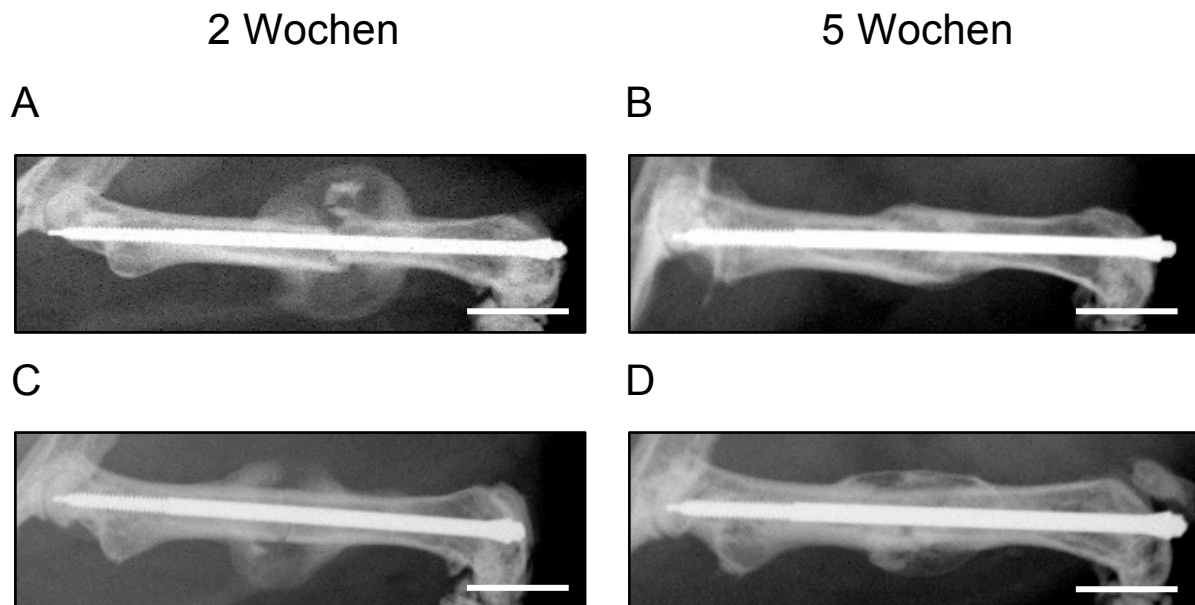
Abb. 16: Hämatokritwert der Kontrolle (weiße Balken) und der EPO-Gruppe (schwarze) Balken 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ .

## 4.4 Radiologie

### 4.4.1 Röntgen

In der vorliegenden Studie wurden die Röntgenaufnahmen zum Ende des jeweiligen Behandlungszeitraums zur Beurteilung der Frakturheilung und Ausschluss einer Implantatdislokation verwendet. Es wurde keine Analyse durchgeführt.

Nach zweiwöchiger Behandlung war in beiden Gruppen der Frakturspalt mit Kallus überbrückt. Im Vergleich konnte nach 5 Wochen eine Größenabnahme und weitere knöcherne Durchbauung des Frakturspalts als typische Zeichen des Remodelingprozess beobachtet werden. Es lag bei keinem Tier eine Implantatdislokation vor (Abb. 17).



*Abb. 17: Repräsentative Röntgenbilder der frakturierten und stabilisierten Femora 2 (A, C) und 5 Wochen (B, D) postoperativ bei mit EPO-behandelten Tieren (C, D) im Vergleich zur Kontrolle (A, B). Maßstab entspricht 2 mm.*

#### 4.4.2 Mikrocomputertomographie

Mittels Mikrocomputertomographie wurde der relative Knochenanteil (BV/TV) und die Mineralisationsdichte (TMD) des periostealen Kallus und des unfrakturierten Femurs der EPO-Tiere im Vergleich zur Kontrolle ermittelt.

Sowohl nach 2 Wochen postoperativ und nach 5 Wochen postoperativ zeigte sich zwischen den Gruppen hinsichtlich des relativen Knochenanteils kein signifikanter Unterschied (Abb. 18 A und B). 5 Wochen postoperativ war der knöcherner Anteil des Kallus in beiden Gruppen auf ca. 20 % angestiegen (Abb. 18 B).

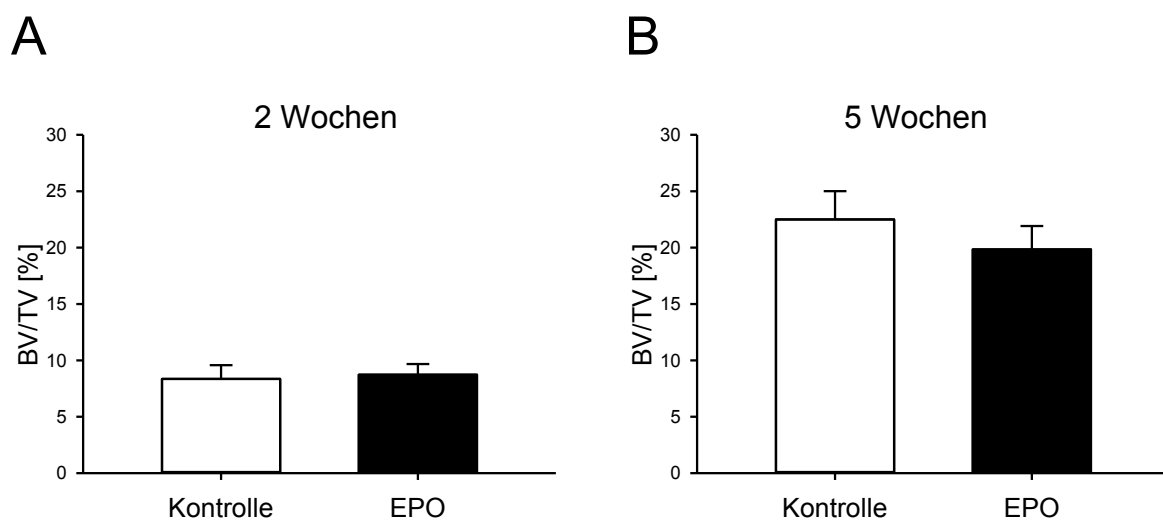


Abb. 18: Relativer Knochenvolumenanteil des Kallus (BV/TV) der Kontrolle (weiße Balken) und der EPO-Gruppe (schwarze) Balken 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). Mittelwert  $\pm$  SEM.

2 Wochen postoperativ wurde in der EPO-Gruppe mit durchschnittlich  $3,1 \pm 0,1 \text{ g/mm}^3$  eine signifikant höhere Mineralisationsdichte des periostealen Kallusvolumen gemessen ( $p < 0,05$ ; Abb. 19 A). Im späten Heilungsstadium, 5 Wochen postoperativ, lag die Mineralisationsdichte des Kallus weiterhin bei durchschnittlich  $3,05 \pm 0,7 \text{ g/mm}^3$ , der Unterschied zur entsprechenden Kontrollgruppe war signifikant ( $p < 0,05$ ; Abb. 19 B).

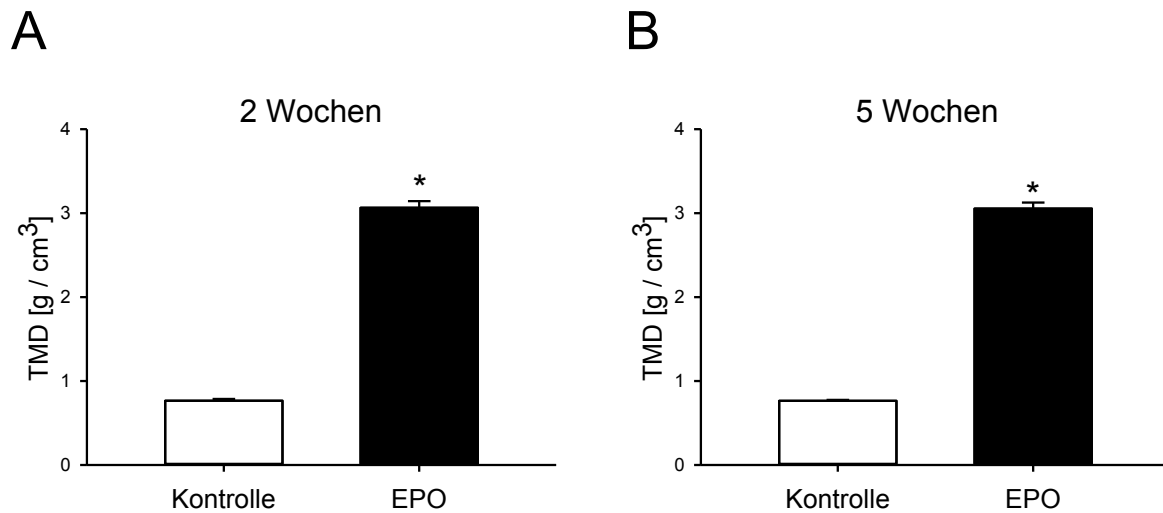


Abb. 19: Mineralisationsdichte (TMD) des Kallus der Kontrolle (weiße Balken) und der EPO-Gruppe (schwarze) Balken 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ .

Interessanterweise wurde nach zweiwöchiger EPO-Therapie eine signifikant höhere Mineralisationsdichte der kontralateralen unfrakturierten Femurkortikalis beobachtet ( $p < 0,05$ ; Abb. 20 A). 5 Wochen postoperativ wurde zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen ( $p > 0,05$ ; Abb. 20 B).

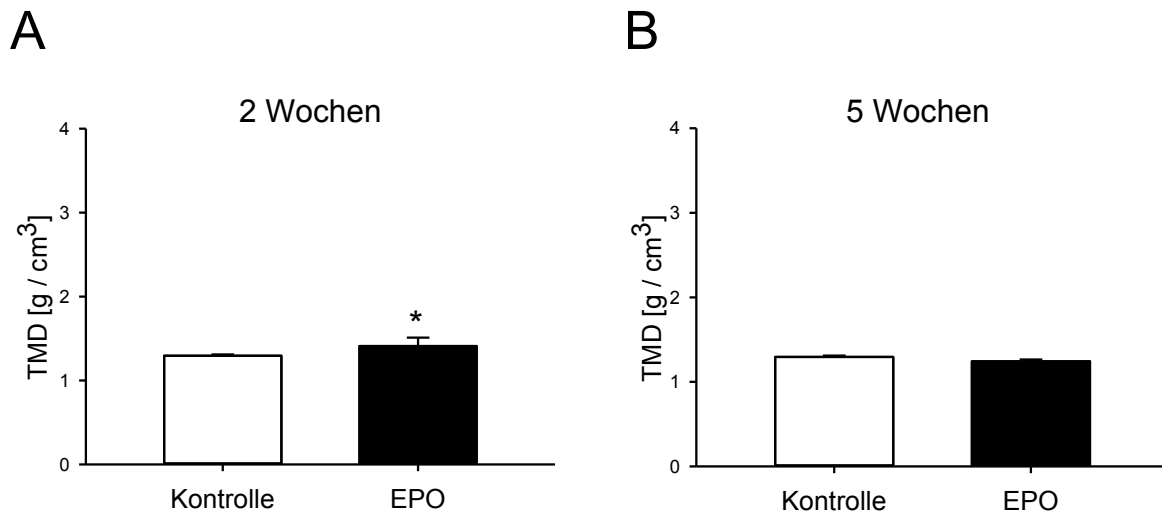


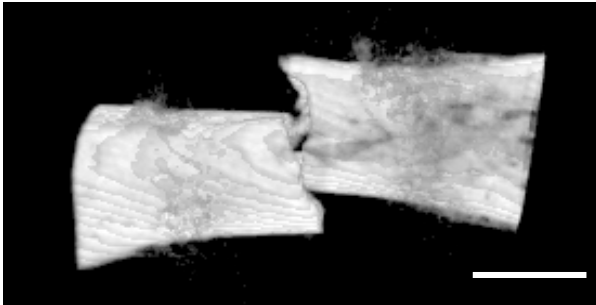
Abb. 20: Mineralisationsdichte (TMD) der unfrakturierten kontralateralen Femurkortikalis bei der Kontrolle (weiße Balken) und EPO-Gruppe (schwarze Balken) 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ .



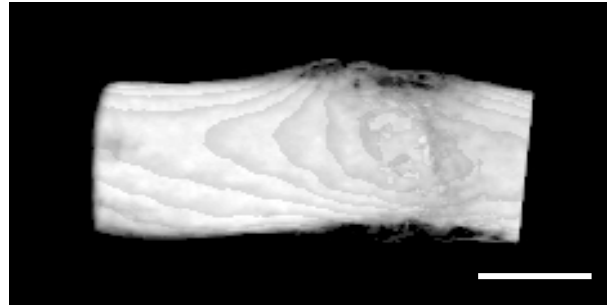
2 Wochen

5 Wochen

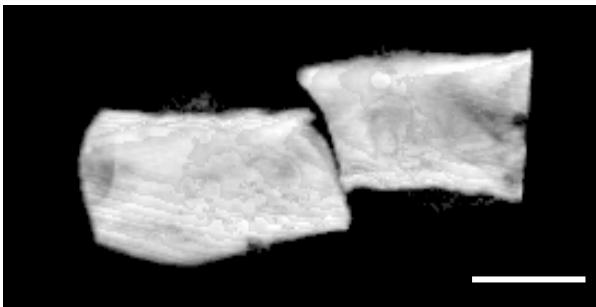
A



B



C



D

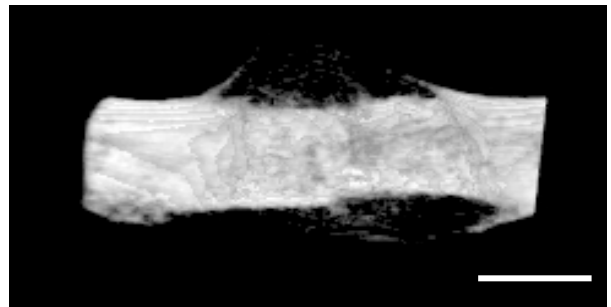


Abb.21: Repräsentative  $\mu$ CT-Bilder 2 (A, C) und 5 Wochen (B, C) postoperativ bei den mit EPO-behandelten Tieren (A, B) und Kontrollen (C, D). Maßstab entspricht 1 mm.

## 4.5 Biomechanik

Zur biomechanischen Analyse wurde die relative 3-Punkt Biegesteifigkeit des Frakturkallus bestimmt.

2 Wochen postoperativ zeigte sich nach EPO-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle kein Unterschied. 5 Wochen postoperativ zeigte sich eine signifikant geringere Biegesteifigkeit bei den Tieren, die mit EPO behandelt wurden (Abb. 22 B).

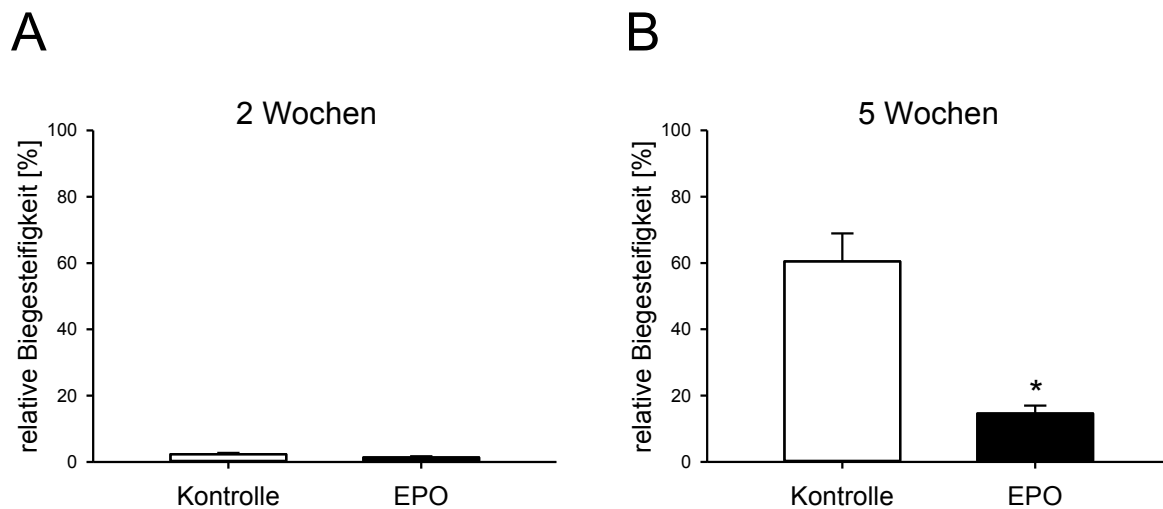


Abb. 22: Relative Biegesteifigkeit der Kontrolle (weiße Balken) und der EPO-Gruppe (schwarze) Balken 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ .

## 4.6 Histologie

Zur histologischen Analyse wurde je ein sagittaler Longitudinalschnitt des Femurs ausgewertet. Die Wahl der Schnittebene orientierte sich an dem maximalen Kallusdurchmesser.

Die Schnittpräparate, welche mit Safranin-O-gefärbt waren, wurden zur Analyse der Kallusmorphologie verwendet. Es erfolgte die Messung der absoluten periostealen Kallusfläche. Innerhalb der Kallusfläche wurde der relative Knochen-, Knorpel- und Bindegewebsanteil bestimmt.

Die absolute periosteale Kallusfläche war in beiden Gruppen in der frühen (2 Wochen) und späten Heilungsphase (5 Wochen) vergleichbar (Abb. 23 A und B). Entsprechend dem Remodellingprozess nahm die Kallusfläche weiter ab.

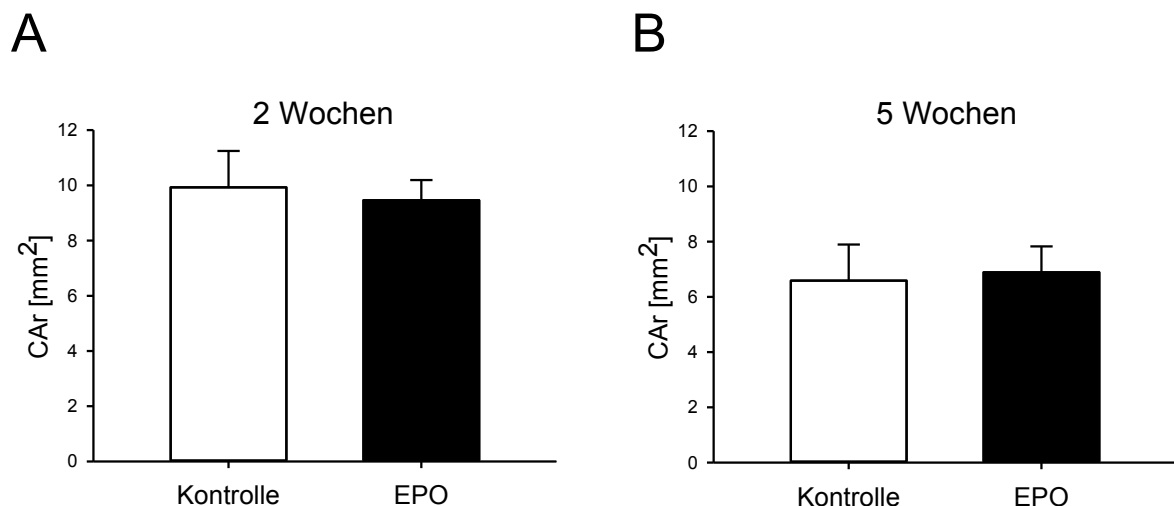


Abb. 23: Periosteale Kallusfläche der Kontrolle (weiße Balken) und der EPO-Gruppe (schwarze) Balken 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). Mittelwert  $\pm$  SEM.

2 Wochen postoperativ war der knöcherner Anteil bei den Tieren, die mit EPO behandelt wurden, geringer (Abb. 24 A). Nach fünfwöchiger Heilungsphase war in beiden Gruppen der Knochenanteil vergleichbar (Abb. 24 B).

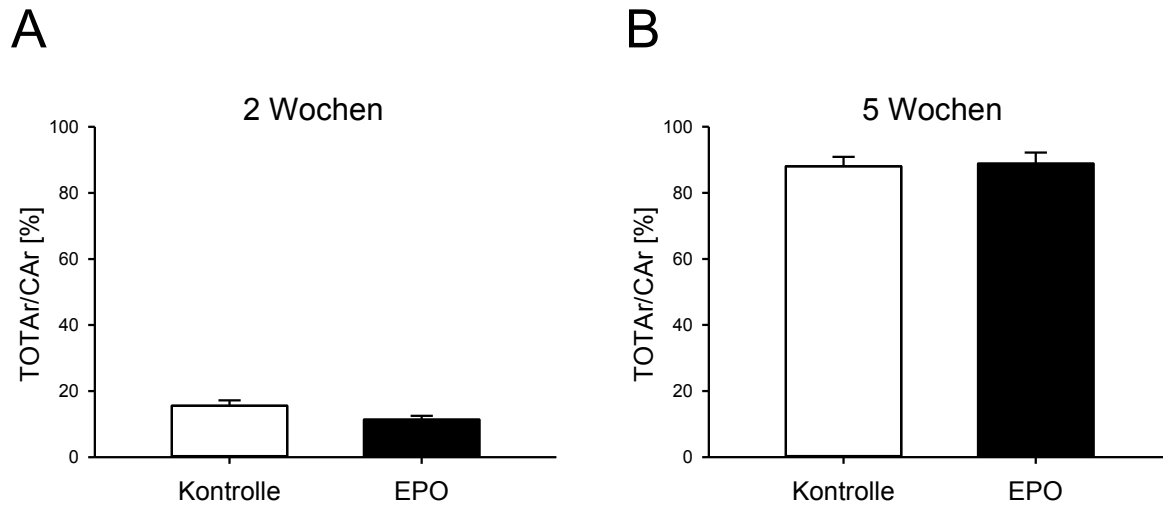


Abb. 24: Relativer Knochenanteil der Kallusfläche der Kontrolle (weiße Balken) und der EPO-Gruppe (schwarze) Balken 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). Mittelwert  $\pm$  SEM.

Zudem war 2 Wochen postoperativ der durchschnittliche Knorpelanteil in der EPO-Gruppe geringer als in der Kontrollgruppe (Abb. 25 A). Nach fünfwöchiger Frakturheilung war in beiden Gruppen nur noch vereinzelt Knorpelgewebe nachweisbar (Abb. 25 B).

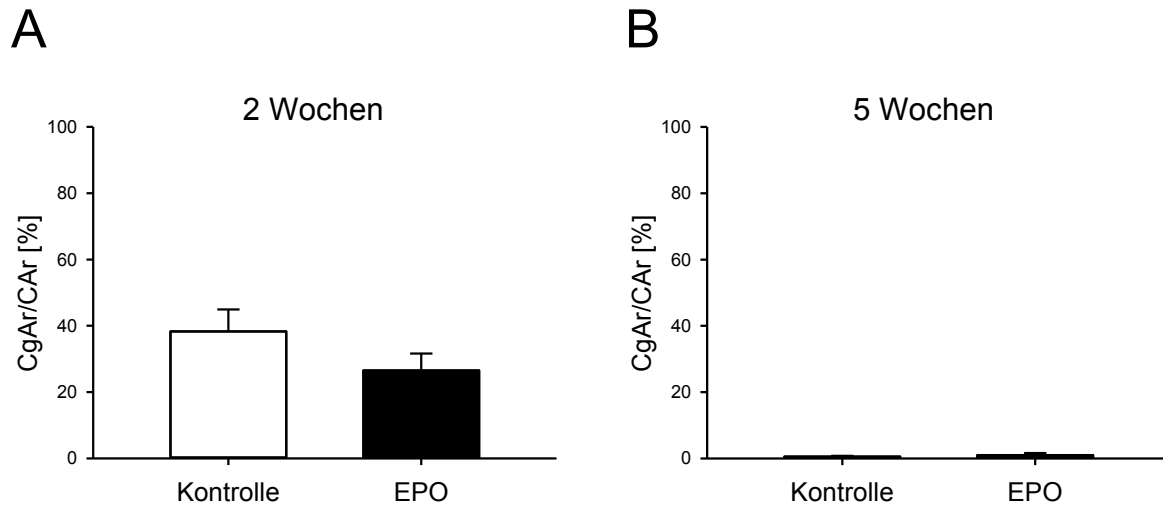


Abb. 25: Relativer Knorpelanteil der Kallusfläche der Kontrolle (weiße Balken) und der EPO-Gruppe (schwarze) Balken 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). Mittelwert  $\pm$  SEM.

2 Wochen postoperativ war der Bindegewebsanteil in der EPO-Gruppe größer. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 26 A).

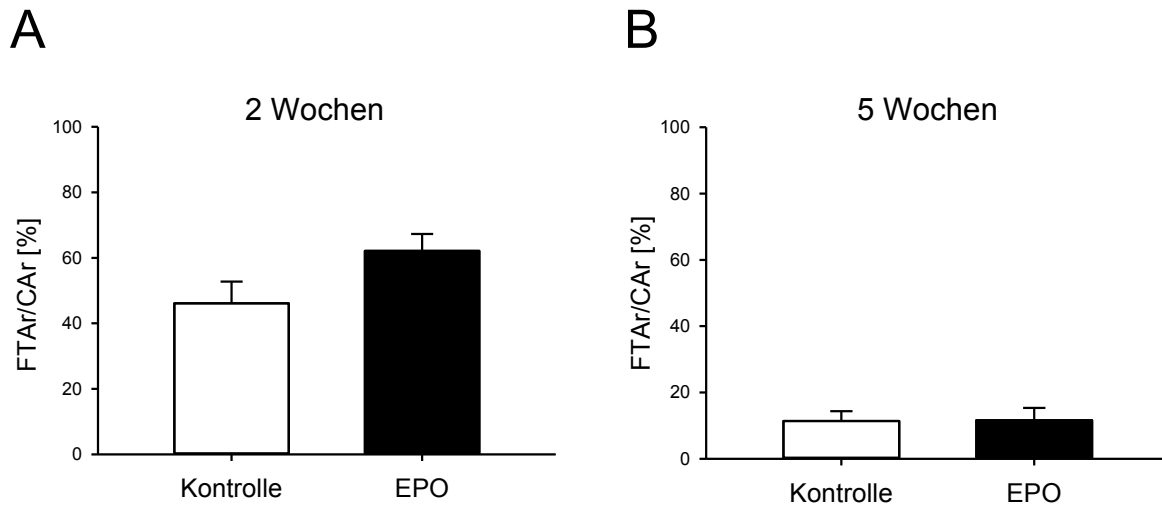


Abb. 26: Relativer Bindegewebsanteil der Kallusfläche der Kontrolle (weiße Balken) und der EPO-Gruppe (schwarze) Balken 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). Mittelwert  $\pm$  SEM.

Die Gewebeverteilung des Kallus zeigte folgende Zusammensetzung (Abb. 27).

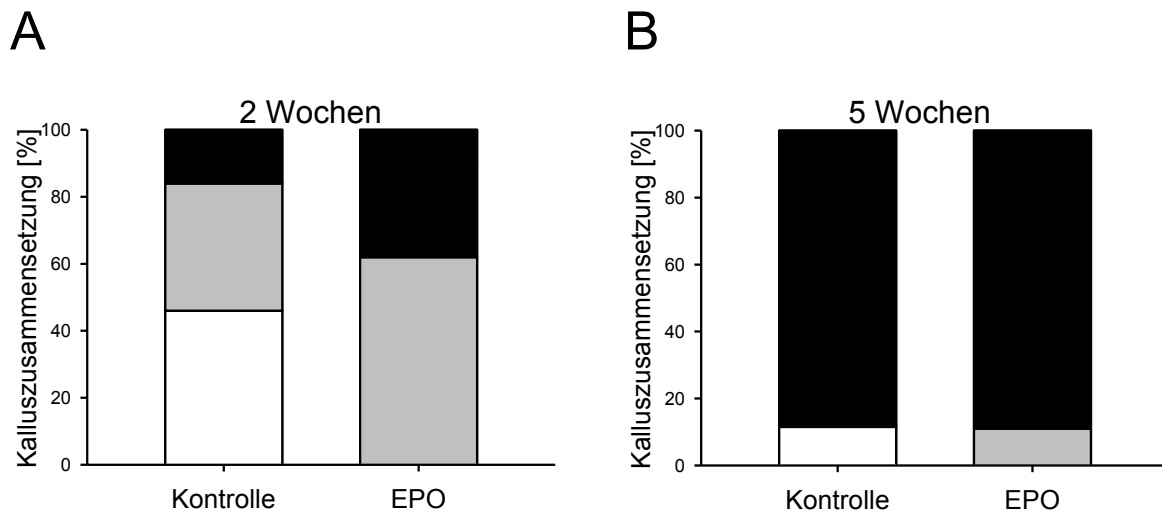


Abb. 27: Histologische Analyse der Kalluszusammensetzung: Knochen (schwarz), Knorpel (grau) und Bindegewebe (weiß). 2 (A) und 5 Wochen (B) postoperativ.

2 Wochen

5 Wochen

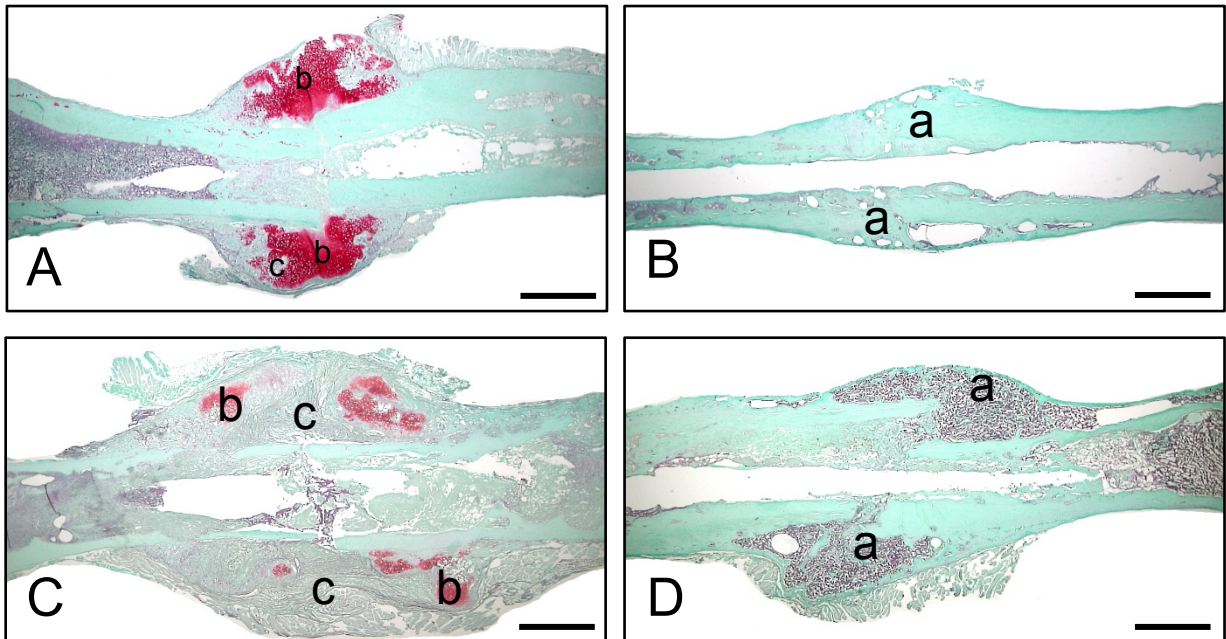


Abb. 28: Repräsentative histologische Präparate in Safranin-O-Färbung mit Darstellung der verschiedenen Gewebearten: Knochen (a), Knorpel (b) und Bindegewebe (c) 2 (A, C) und 5 Wochen (B, D) postoperativ bei mit EPO-behandelten Tieren (C,D) und der Kontrolle (A, B). Maßstab entspricht 500  $\mu$ m

Unter Anwendung der HE-Färbung wurde die Anzahl der Gefäße ausgezählt. Diese wurden innerhalb der definierten high power fields (HPF's) ausgezählt. Mit durchschnittlich 7 Gefäßen pro HPF zeigte der Kallus der mit EPO-behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant höhere Vaskularisationsdichte ( $7,3 \pm 1,2$  versus  $2,7 \pm 0,5$ ;  $p < 0,05$ ; Abb. 29).

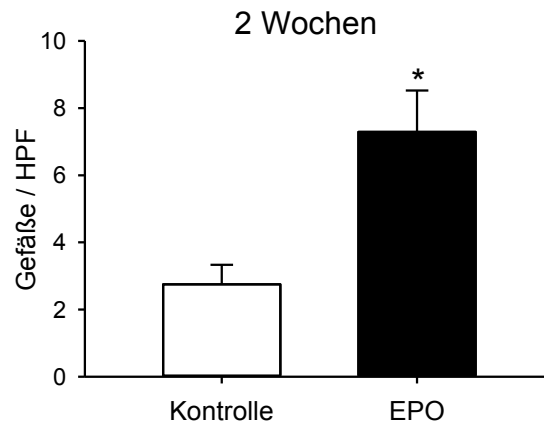
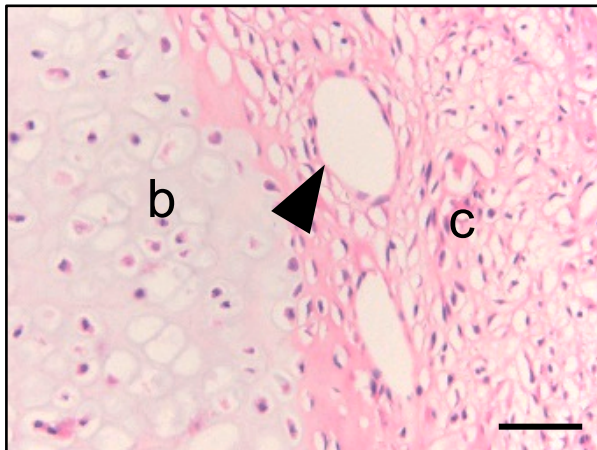


Abb.29: Gefäße / HPF bei der Kontroll- (weiße Balken) und EPO-Gruppe (schwarze Balken) 2 Wochen postoperativ. Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ .

A



B

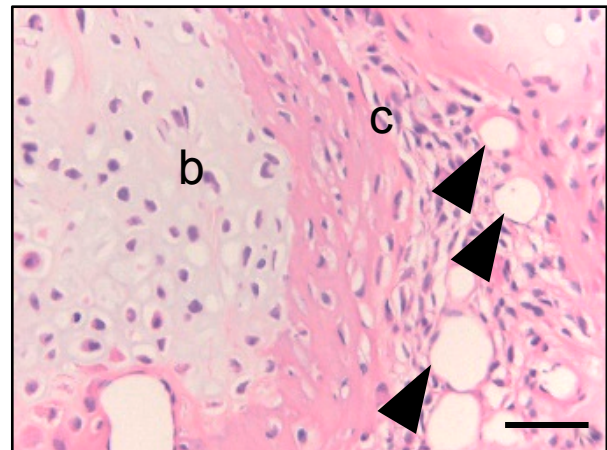


Abb.30: repräsentative histologische Schnittpräparate (Hämatotoxylin-Eosin-Färbung) mit Darstellung der Blutgefäße (Pfeil), Knorpel (b) und Bindegewebe (c) 2 Wochen postoperativ in der Kontroll- (A) und EPO-Gruppe (B). Maßstab entspricht  $50 \mu\text{m}$ .



2 Wochen nach EPO-Behandlung konnte eine signifikant höhere Anzahl TRAP positiver Zellen im Kallus nachgewiesen werden ( $23,2 \pm 2,6$  versus  $3,1 \pm 0,7$ ;  $p < 0,05$ ; Abb. 31).

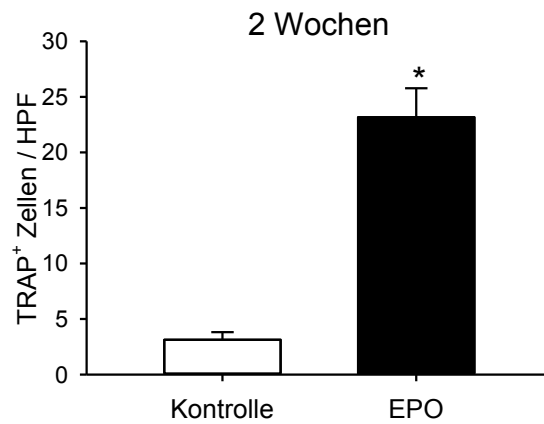


Abb. 31: TRAP<sup>+</sup> Zellen / HPF bei der Kontroll- (weiße Balken) und EPO-Gruppe (schwarze Balken) 2 Wochen postoperativ. Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ .

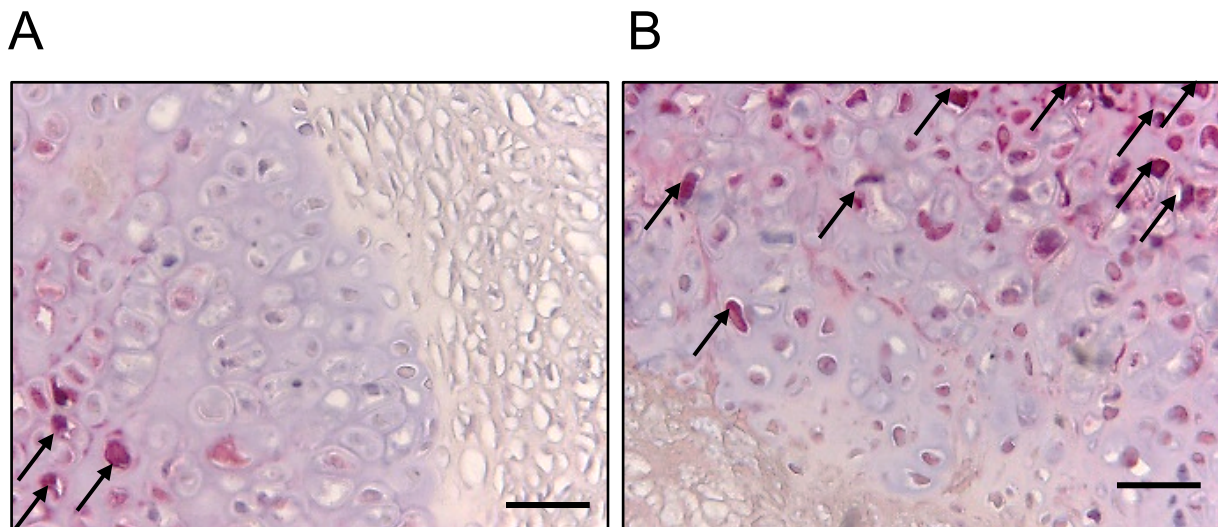


Abb. 32: repräsentative histologische Schnittpräparate (TRAP-Färbung) mit Darstellung der TRAP positiven Zellen (Pfeil) 2 Wochen postoperativ in der Kontroll- (A) und EPO-Gruppe (B). Maßstab entspricht  $50 \mu\text{m}$ .

## 4.7 Western Blot

In der Western Blot Untersuchung wurde die Expression von Osteoprotegrin (OPG) und RANKL analysiert.

Osteoprotegrin wurde im Kallus der EPO-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen verstärkt exprimiert. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 33 A). Die Expression von RANKL war 2 Wochen postoperativ nach EPO-Behandlung deutlich erhöht (Abb. 33 B).

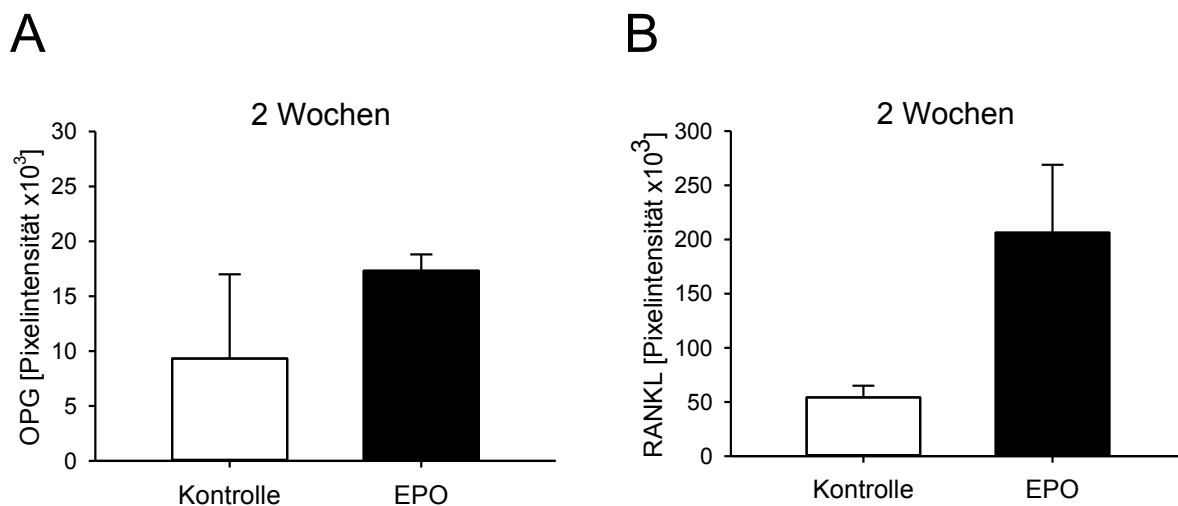


Abb. 33: Western Blot Analyse der Expression von OPG (A) und RANKL (B) bei der Kontroll- (weiße Balken) und EPO-Gruppe (schwarze Balken) 2 Wochen postoperativ. Mittelwerte  $\pm$  SEM.

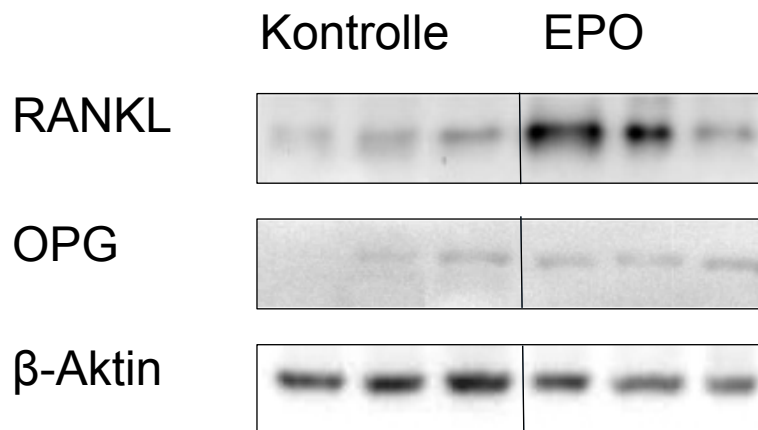


Abb. 34: Western Blots der RANKL-, OPG- und  $\beta$ -Aktin-Expression im Kallus in den Kontrollen und EPO-behandelten Tieren 2 Wochen postoperativ.

# 5 Diskussion

## 5.1 Diskussion der Methoden

Die Frakturheilung ist ein komplexer dynamischer Prozess, der durch ein breites Spektrum an Signalproteinen koordiniert wird. Verschiedene Zelltypen werden aktiviert und sind am Heilungsprozess beteiligt, so dass die Frakturheilung ein multifaktoriellen Prozess darstellt.

Die Verwendung von Versuchstieren macht es möglich, die Knochenheilung in einem lebenden Organismus zu analysieren. Es kann zwischen Groß- und Kleintiermodellen unterschieden werden. Großtiere bieten zwar dem Menschen ähnliche biomechanische und anatomische Verhältnisse, Haltung und Zucht sind jedoch mit einem hohen Kostenaufwand verbunden. Kleintiermodelle sind deutlich günstiger. Die Frakturheilung ist bei Mäusen nach 35 Tagen weitgehend abgeschlossen, wodurch der Zeitaufwand für experimentelle Studien reduziert ist. Da das gesamte Mausgenom bereits entschlüsselt ist, besteht die Möglichkeit durch den Einsatz von Knock-Out-Stämmen explizit den Einfluss molekularer Mechanismen auf die Frakturheilung zu evaluieren [12,47,59].

Die Ergebnisse aus Tiermodellen sind jedoch kritisch zu bewerten und nicht vollständig auf den Menschen übertragbar, da u.a. anatomische Unterschiede, z.B. das Fehlen von Havers-Systemen im Knochen der Maus, zu berücksichtigen sind [90]. Erste Versuche mit Alters-Tieren wurden bereits 2001 von Meyer et al. durchgeführt, die Arbeitsgruppe untersuchte Ratten, die teilweise bis zu 50 Monaten alt waren [85]. Bei Mäusen zeigte sich hingegen bereits im Alter von 18 Monaten ein reduziertes Heilungspotenzial im Vergleich zu 4 Monate alten Mäusen. Auch in weiteren Studien zur Frakturheilung im Alter wurden Mäusen in diesem Alter verwendet [50,78]. In der vorliegenden Studie wurden ebenfalls 18-Monate alte CD-1 Mäusen verwendet.

Der Heilungsverlauf wird durch die Art der Frakturierung beeinflusst. Es werden hierbei offene von geschlossenen Verfahren unterschieden. Offene Modelle verursachen einen größeren Weichteilschaden, der die Frakturheilung prolongieren kann. Offene Verfahren gewährleisten eine höhere Rotationsstabilität im Vergleich zu nicht invasiven Verfahren [17,64]. Bei nicht-stabilisierten Frakturen wird sowohl bei adulten als auch bei alten Mäusen ein prolongierter Heilungsprozess beobachtet, so dass bereits verschiedene Osteosyntheseverfahren für Mäuse entwickelt worden sind [36,38,47,51,52,54,55]. Die MouseScrew, eine intramedulläre Zugschraube, bietet eine gute Rotationstabilität durch

Kompression der Fragmente und stellt somit ein standardisiertes Osteosyntheseverfahren dar. Ein weiterer Vorteil ist, dass durch die geschlossene Frakturierung und die minimal-invasive Implantation der Schraube das Weichteiltrauma gering bleibt [38,54]. In der vorliegenden Studie wurde die Fraktur mittels Guillotine erzeugt und die MouseScrew zur Stabilisierung verwendet.

Das Glycoprotein Erythropoietin ist ein Zytokin der Erythropoese. Über den EPO-R interagiert es mit erythroblastären Vorläuferzellen und fördert deren Proliferation und Reifungsprozess. Auch auf Zellen nicht hämatopoietischen Ursprungs konnte eine proliferative Wirkung des EPO gezeigt werden, allerdings ist die Wirkung von der Dosis und der Gabe abhängig. Tierexperimentell konnte dies bereits im Rahmen der Wundheilung gezeigt werden. Durch eine einmalige Hochdosis EPO wurde der Wundverschluss beschleunigt und die Bildung neuer Gefäße im Heilungsareal gefördert. Repetitive Gaben von hochdosiertem EPO führten zu einem prolongierten Heilungsprozess. Die Erythrozytenanzahl war enorm gesteigert und dadurch die Fließeigenschaften des Blutes beeinträchtigt, so dass insbesondere die Vaskularisation und der Heilungsprozess geschädigt wurden. Repetitive Niedrigdosen zeigten zwar auch eine fördernde Wirkung auf den Heilungsprozess und die Vaskularisierung, jedoch wurde durch die initiale Hochdosis bessere Ergebnisse erzielt [110].

In Frakturstudien konnte bei adulten Mäusen eine Verbesserung der Frakturheilung unter täglicher Applikation von 500 U/kg KG EPO beobachtet werden [37,56]. Daher wurde in der vorliegenden Studie ebenfalls eine Dosis von 500 U/kg KG EPO intraperitoneal appliziert. Um einen konstanten Spiegel aufrecht zu halten, erfolgten repetitive Gaben im Abstand von 24 Stunden [37,56].

In vorangegangenen Studien zur Frakturheilung wurde der Heilungsprozess bei adulten Mäusen nach 2 und 5 Wochen untersucht. Bei einem physiologischen Heilungsprozess erreicht der Kallus nach 2 Wochen sein Maximum. Nach fünfwöchiger Heilungsphase war der Frakturspalt knöchern durchbaut und die Frakturheilung war abgeschlossen [37,46,48,51]. Im Vergleich zu adulten ist bei geriatrischen Mäusen die Frakturheilung prolongiert [76–78,85,125]. Histing et al. untersuchten 2 und 5 Wochen postoperativ den Einfluss mechanischer Stabilität auf die Frakturheilung bei adulten und alten Mäusen. Im Vergleich zu den adulten war bei den alten Tieren die Frakturheilung nach 5 Wochen noch nicht abgeschlossen [50]. Um die Ergebnisse der vorliegenden Studie mit den Erkenntnissen vorangegangener besser zu vergleichen zu können, wurde bei den alten Mäusen die Frakturheilung ebenfalls 2 und 5 Wochen postoperativ untersucht.

In der vorliegenden Studie wurden den Tieren nach 2 bzw. 5 Wochen 1 ml Blut aus der V. cava zur Bestimmung der Hämoglobinkonzentration sowie des Hämatokrits entnommen. Zur Blutentnahme können grundsätzlich verschiedene Lokalisationen gewählt werden. Für repetitive Punktionen eignen sich der retrobulbäre Venenplexus oder die Schwanzvenen. Mengen von ca. 0,07 - 0,08 ml können problemlos aspiriert werden. Diese Menge entspricht ca. 10 % des gesamten Blutvolumens einer Maus und stellt keine vitale Bedrohung dar. Kardiale, cavale oder aortale Punktionen ermöglichen Aspirationsmengen bis zu 1ml sind jedoch letal für das Tier [23]. Der laborchemische EPO-Spiegel korreliert positiv mit dem Hämoglobinwert und dem Hämatokrit, so dass diese Parameter zur Evaluation der Therapie eingesetzt werden können [95]. Diese Messmethodik konnte bereits in vorangegangenen Studien eingesetzt werden [37,56].

Zur biomechanischen Testung der Knochen existieren verschiedene Messmethoden. Destruierende Verfahren haben den Nachteil, dass der Knochen anschließend nicht mehr für weitere Analysen verwendet werden kann, wodurch die Anzahl der Versuchstiere ansteigt [74]. Bei nicht-destruierenden Verfahren bleibt die Kontinuität des Knochens erhalten. Bei bereits geringen rotatorischen Abweichungen treten jedoch vermehrt Messungenauigkeiten auf [74]. Bei der 3-Punkt-Biegetestung übt ein Prüfstempel auf eine geringe Fläche maximalen Druck aus. Die 4-Punkt-Biege-Testung arbeitet mit zwei Prüfstempeln. Bei dieser Methode ist eine Mindestlänge des Knochens mit einem 16 - fachen des Durchmesser erforderlich. Da der Durchmesser eines Mäusefemurs ca. 2 mm beträgt, gilt eine Länge von 32 mm in diesem Zusammenhang bei Mäusen als unrealistisch, so dass die 3-Punkt-Biegetestung Anwendung findet [80].

Als bildgebende Verfahren wurden in dieser Studie die Mikrocomputertomographie genutzt. Der Einsatz des konventionellen zweidimensionalen Röntgen galt lediglich zur Kontrolle der Implantatlage postoperativ sowie am Ende des Therapiezeitraumes.

Die Nutzung eines dreidimensionalen Datensatzes mittels  $\mu$ CT bietet die Möglichkeit explizite Messungen der Kallusgröße durchzuführen und mittels Grauton-Abstufung hoch und niedrig mineralisierte Areale zu definieren. Bereits in vorherigen Arbeiten konnte die Mineralisationsdichte zur Beurteilung der Kallus- und Knochenqualität erfolgreich angewendet werden [14,36,54,93].

Die histomorphometrische Untersuchung wurde gemäß den Vorgaben von Gerstenfeld et al. umgesetzt [40]. Zur Bestimmung der Kallusgröße und – Zusammensetzung wurde nach den Empfehlungen der ASBMR ein repräsentativer longitudinaler Sagittalschnitt auf Höhe des

maximalen Kallusdurchmessers untersucht. Da zur Analyse lediglich ein histologisches Präparat je Maus verwendet wurde und nur eine zweidimensionale Darstellung gegeben ist, ist die Aussagekraft beschränkt. Vorgegangene Studien setzten diese Methodik jedoch als sinnvolle Ergänzung zur Interpretation weiterer radiologischer, biomechanischer und biochemischer Daten ein [37,42,49,50,56].

Unter dem Aspekt, dass EPO als angiogener Faktor agiert, wurde ein weiterer Datensatz an HE-gefärbten Präparaten analysiert. Gerade in der frühen Heilungsphase ist es essenziell, dass die Frakturzone vaskularisiert, daher ist es sinnvoll 2 Wochen postoperativ die Gefäßdichte im Kallus zu beurteilen. Untersuchungsreihen zum Einfluss von EPO auf die Frakturheilung konnten diese Methodik erfolgreich zur Beurteilung der Gefäßdichte einsetzen. Die Arbeitsgruppe Holstein et al. konnte nach 2 Wochen ebenfalls vermehrt Gefäße in der Frakturzone nachweisen [37,56].

Via Western Blot erfolgte die Analyse der Proteinexpression im Kallus. Die Extraktion erfolgte nach zweiwöchiger Heilungsphase. Zu diesem Zeitpunkt ist die Kallusexpansion in der Regel maximal, so dass ausreichend Probenmaterial gewonnen werden kann [54].

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass die Frakturheilung bei alten Mäusen nicht durch die Behandlung mit EPO verbessert wird. Durch die EPO-Therapie waren die Hämoglobinkonzentration und der Hämatokrit signifikant angestiegen. Mittels CT zeigte sich eine erhöhte Mineralisationsdichte des Kallus, jedoch ging dies mit einer niedrigen biomechanischen Stabilität einher. Durch die EPO-Behandlung konnte histologisch eine erhöhte Anzahl an Blutgefäßen und TRAP-positiven Zellen im Kallus ermittelt werden. Die Western Blot Analysen ergaben eine vermehrte Expression von OPG und insbesondere von RANKL.

Im Gegensatz dazu konnten Studien an jungen Mäusen zeigen, dass die Behandlung mit EPO die Frakturheilung verbessert [37,53,56].

Erythropoietin ist ein aus 165 Aminosäuren bestehendes Glycoprotein, das hauptsächlich in Niere und Leber synthetisiert wird und als wichtiger Wachstumsfaktor in der Erythropoese agiert. Nach Bindung an den zugehörigen transmembranösen Rezeptor werden mehrere intrazellulärer Signalkaskaden initiiert, welche durch Phosphorylierungen in der Aktivierung von Enzymen und Transkriptionsfaktoren münden. Die Proliferation und Differenzierung der erythroiden Vorläuferzellen wird stimuliert [87]. Panjeta et al. zeigten bereits, dass die Hämoglobinkonzentration und der Hämatokrit des Blutes durch die Behandlung mit EPO ansteigten [95]. Bei adulten Mäusen wurden Hämoglobinspiegel von ca. 20 g/dl nach regelmäßiger EPO-Gabe beschrieben und als valide Parameter zur Beurteilung des Applikationserfolg verwendet [37,53,56]. Auch in der vorliegenden Studie wurden vergleichbar hohe Hämoglobinkonzentrationen nach EPO - Gabe beobachtet.

Garcia et al. applizierten bei adulten Mäusen 500 U/kg KG EPO in einem zeitlichen Abstand von 24 Stunden über 2 und 5 Wochen, wodurch eine Verbesserung der Frakturheilung nachgewiesen werden konnte [37]. Daher wurde in der vorliegenden Studie das gleiche Applikationsschema verwendet. Sorg et al. untersuchten 2009, wie unterschiedliche EPO-Dosierungen die Wundheilung bei Mäusen beeinflussen. Repetitive Hochdosen von 5000 U/kg KG führten zu einer massiven Beeinträchtigung der Gewebe- und Gefäßregeneration. Vor allem wurden die EPO-bedingten Veränderungen der Blutrheologie als Ursache gesehen, so dass die Mikrozirkulation im Wundareal beeinträchtigt wurde. Die tägliche niedrigdosierte EPO-Gabe (500 U/kg KG) beeinflusste den Heilungsprozess nicht negativ.

Die einmalige initiale Gabe war jedoch mit dem stärksten Stimulus zur Genese und Reifung eines neugebildeten Gefäßnetzes und Epithelialisierung verbunden und besserte die Wundheilung [110]. Im Ratttenmodell wurde ebenfalls der Einfluss von EPO auf die Wundheilung untersucht. Nur während den ersten 5 Behandlungstagen konnte durch EPO (400 U/kg KG, täglich) eine verbesserte Heilung ischämischer Wunden erreicht werden. Ein längerer Therapiezeitraum war mit einem verschlechterten Regenerationsprozess verbunden [3]. In den oben genannten Studien wurde mit adulten Tieren gearbeitet [3,37,56,110]. Daher können die Ergebnisse mit der aktuellen Studie mit alten Mäusen nicht uneingeschränkt verglichen werden. Unter anderem kann eine altersbedingte Abnahme der EPO-Pharmakokinetik vermutet werden. Durch einen prolongierten Abbau- und somit Inaktivierungsprozess des EPO kann die tägliche Applikation eine Akkumulation begünstigen haben. Möglicherweise ist ein Monitoring des EPO-Spiegels sinnvoll sein, um eine Akkumulation zu vermeiden [99].

Neben der Hämoglobinkonzentration war auch der Hämatokrit erhöht, weswegen Garcia et al. annehmen, dass dies ebenfalls eine Ursache für eine verbesserte Knochenheilung bei adulten Mäusen sein könnte [37]. Bei den alten Mäusen wurde ebenfalls ein signifikanter Anstieg des Hämatokrit durch die EPO-Behandlung nachgewiesen. Jedoch wurde ein durchschnittlicher Hämatokrit von 70 – 80 % bestimmt. Es ist fraglich, in wieweit alte Mäuse auf eine erhöhte Blutviskosität reagieren. Es ist bereits bekannt, dass im Rahmen des physiologischen Alterungsprozesses der Hämatokrit abnimmt. Paradoxe Weise steigt die Tendenz zur Koagulation. Dies wird unter anderem durch eine Abnahme der Erythrozyten-Plastizität verursacht [107]. Basierend darauf könnte der EPO-induzierte Anstieg des Hämatokrits bei den alten Tieren zur weiteren Beeinträchtigung der Blutrheologie geführt und folglich die Mikrozirkulation, v.a. in der Frakturzone, konsekutiv verschlechtert haben. Da ein derartiges Phänomen bei adulten Mäusen nicht beschrieben wird, haben diese anscheinend ausreichende Kompensationsmechanismen gegenüber veränderten Fließeigenschaften des Blutes, so dass die Frakturheilung unter EPO-Therapie nicht beeinträchtigt wird [37,56]. Ein niedriger knöcherner Kallusanteil und höhere Knorpel- und Bindegewebsanteile sprechen bei den alten Tieren eher für eine gestörte Frakturheilung. Auch die signifikant verminderte biomechanische Stabilität nach fünfwöchiger Therapie weist auf die beeinträchtigende Wirkung von EPO auf die Frakturheilung hin.

Die Vaskularisationskapazität ist im Alter reduziert. Beispielsweise fallen bei geriatrischen Patienten mit peripherer Verschlusskrankheit eine geringere Kollateralisierung oder bei Infarkten und Insulten eine prolongierte Rekapillarisation auf [88,100]. Unter anderem wird hierfür eine verminderte Antwort auf die hypoxie-induzierte Angiogenese gesehen [20]. Vor



allem in der frühen Heilungsphase wird die Vaskularisierung des Kallus als essenziell für den weiteren Heilungsprozess gesehen. Durch das Einwachsen neuer Gefäße wird nicht nur die Nutrition gewährleistet, auch Stammzellen gelangen so in die Frakturzone. EPO wirkt fördernd auf die Gefäßneubildung. Aufgrund Parallelen zur VEGF - induzierten Angiogenese wurde EPO schon erfolgreich eingesetzt, um die Vaskularisation des regenerierenden hypoxen Areals zu steigern, wie mehrere tierexperimentelle Studien zeigen [37,56,112]. Auch in der vorliegenden Versuchsreihe konnte durch EPO die Angiogenese verbessert und ein dichtes Gefäßnetz im Kallus ausgebildet werden. Es konnte jedoch nicht erklärt werden, in wie fern das ausgeprägte Kapillarnetz des Kallus mit der verstärkten Mineralisationsdichte und zeitgleich reduzierten Biegesteifigkeit in Zusammenhang steht.

Es existieren bereits mehrere Studien, die den Einfluss von EPO auf den Knochenmetabolismus untersuchten [44,66,69,101,117]. Rölfig et al. konnten in Zellkulturen einen stimulierenden Effekt des EPO auf Osteoblasten nachweisen. Ähnlich wie bei Erythroblasten, wurden durch Aktivierung des EPO-R intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die die Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten förderten. Auch in vivo wurde eine proliferative Wirkung beschrieben, da bereits im frühen Heilungsstadium ein weitgehend knöcherner Kallus vorlag [37,53,56,101]. Sowohl die histomorphometrischen als auch die radiologischen Untersuchungsergebnisse konnten diesen Effekt bei den alten Tieren nicht nachweisen. Vielmehr war im Vergleich zur Kontrollgruppe ein geringerer Anteil an Knochengewebe nachweisbar. Wie schon Hiram-Bab et al. beschrieben haben, wirkt EPO auch osteokatabol, indem es proliferativ und stimulierend auf monozytäre und osteoklastäre Zellen wirkt. Durch Aktivierung des EPO-R wird eine akzelerierte Proliferation und Differenzierung von osteoklastären Vorläuferzellen beschrieben, so dass ein vermehrter Knochenabbau beobachtet wird [44]. Eine langfristige EPO-Applikation scheint vor allem osteokatabol zu wirken. Interessanterweise beobachteten Kolomansky et al. 2020, dass EPO (540 U wöchentlich) bei adulten Mäusen zu einer kontinuierlichen Abnahme der TMD und Knochenmasse führt. Selbst nach Beendigung der EPO-Therapie zeigte sich keine Regeneration des Knochens und der Verlust an Knochenmasse war irreversibel [66].

Die MikroCT-Analysen der vorliegenden Studie zeigten nach EPO-Behandlung eine erhöhte TMD. Interessanterweise konnte auch in den unfrakturierten Knochen ein Anstieg der TMD erhoben werden, so dass eine systemische Aktivierung der Osteoblasten vermuten werden kann. Nach zweiwöchiger EPO-Gabe entsprach die TMD im unfrakturierten Knochen physiologischen Werten einer adulten Maus [91]. Jedoch scheint dies nur ein temporärer osteoanaboler Effekt zu sein, da nach fünfwöchiger EPO-Gabe TMD des unfrakturierten Knochens wieder gesunken war. Interessanterweise war diese mit durchschnittlich  $1,24 \pm$

0,02 versus  $1,29 \pm 0,02 \text{ g/cm}^3$  leicht niedriger als bei den Kontrollen, wodurch auf die von Kolomansky postulierte kontinuierliche Abnahme der Knochenmasse bei langfristiger EPO Gabe hin gedeutet werden könnte [66].

Der Alterungsprozess geht mit Abnahme der Regenerationskapazität einher. Lopas et al. analysierten die Frakturheilung bei alten Mäusen (25 Monate) und bei adulten Mäusen (5 Monate). Bei den alten Tieren wurde ein verzögerter Heilungsverlauf festgestellt. Die Kallusexpansion fiel viel geringer aus. Radiologisch war der Knochenanteil und die Mineralisationsdichte vermindert und die Ossifikation des Kallus prolongiert. Dies wurde durch eine quantitative Abnahme mesenchymaler Stammzellen mit reduzierter Proliferationskapazität begründet [76]. In der vorliegenden Studie wurde bei der Kontrollgruppe 5 Wochen postoperativ eine Kallus - TMD von durchschnittlich  $0,76 \text{ g/cm}^3$  erhoben. O'Neill beschrieb 2010 mittels MikroCT jedoch bei adulten Mäusen physiologische Mineralisationsdichten des Kallus von  $1,27 \pm 0,54 \text{ g/cm}^3$  [91]. Demnach bestätigt die vorliegende Studie ein reduziertes Heilungspotenzial bei alten Mäusen.

Die Mikro-CT-Analysen zeigten weiterhin, dass bei nahezu gleichen knöchernen Kallusanteilen die TMD nach EPO-Therapie nahezu verdoppelt war im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der EPO-Gruppe war der Kallus sowohl 2 als auch 5 Wochen postoperativ auch verglichen mit der unfrakturierten kontralateralen Femurkortikalis, deutlich stärker mineralisiert. Auch bei adulten Mäusen konnte durch die Behandlung mit EPO ein Anstieg der TMD bei der Pseudarthrosen - Behandlung festgestellt werden, der mit einem verbesserten Heilungsverlauf und rascheren Anstieg der biomechanischen Stabilität verbunden war [56]. Eine hohe Mineralisationsdichte verbessert die Biegesteifigkeit des Knochens, allerdings war die Biegesteifigkeit des Kallus bei den alten Mäusen nach fünfwöchiger EPO-Gabe massiv reduziert, verglichen mit den Kontrollen.

Die biomechanische Qualität des Knochens wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Entscheidend ist, welche und vor allem in welchem Verhältnis die verschiedenen Knochenkomponenten vorliegen. Nur durch eine adäquate Relation zwischen organischen und anorganischen Materialien kann der Knochen seinen physiologischen biomechanischen Ansprüchen gerecht werden. Die Osteoporose ist ein klassisches Beispiel, hier gilt ein verminderter anorganischer Knochenanteil als Hauptgrund für eine erhöhte Knochenbrüchigkeit. Anorganischer Anteil und Festigkeit des Knochens hängen jedoch nicht proportional zusammen. Pathologien mit erhöhter Knochendichte, z.B. Morbus Paget des Knochens führen auch zu porösen Knochen. Als lokalisierte Skelettkrankheit wird bei Morbus Paget eine erhöhte Mineralisationsdichte durch einen verstärkten Knochenumsatz generiert

[84]. Ein massiver osteoklastärer Knochenabbau wird durch eine vermehrte Osteoblastenaktivität kompensiert. Ein rapider Knochenumsatz generiert allerdings mechanisch minderwertigen Knochen [89,115]. Interessanterweise wird auch eine Hypervaskularisation beschrieben, jedoch ohne Kausalität für die Biomechanik [84]. Jedenfalls kann dadurch erklärt werden, warum 5 postoperativ in der EPO-Gruppe eine reduzierte biomechanische Stabilität des Kallus bei simultanem Anstieg der TMD erhoben wurde. Ein akzelerierter Knochenumsatz kann daher als Ursache der erhöhten TMD und der verminderte biomechanische Qualität des Kallus vermutet werden.

Die biomechanischen Ergebnisse lassen sich nicht plausibel durch die histologische Gewebeanalyse erklären. Hier fielen sowohl im frühen als auch im späten Heilungsstadium keine signifikanten Unterschiede zwischen der EPO- und der Kontrollgruppe auf. Es konnte 5 Wochen postoperativ bei weitgehend knöcherner Durchbauung von einem physiologischen Heilungsprozess ausgegangen werden. Garcia et al. stellten fest, dass bei adulten Mäusen der Kallus bereits nach zweiwöchiger EPO-Behandlung fast vollständig ossifiziert war [37]. Zu diesem Zeitpunkt wurde bei den alten Tieren ein vor allem bindegewebiger Kallus beobachtet. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren die Knochen- und Knorpelanteile leicht vermindert, wodurch eine prolongierte Frakturheilung angedeutet wird. Interessanterweise ist bei adulten Mäusen 2 Wochen postoperativ bei regelrechtem Heilungsverlauf ein knöcherner Kallusanteil von ca. 25 % als physiologisch beschrieben [49,50,64]. Auch hier lassen sich Anzeichen eines reduzierten Heilungspotenzials bei alten Tieren finden, da in der Kontrollgruppe dieser Studie 2 Wochen postoperativ ein knöcherner Kallusanteil von durchschnittlich 15 % vorlag.

Die Western Blot Analysen zeigten, dass durch die EPO-Therapie die Expression von OPG nahezu verdoppelt und die Expression von RANKL vervierfacht war, verglichen mit der Kontrollgruppe. Diese Resultate deuten auf einen vermehrten osteoklastären Knochenabbau hin. Osteoklasten exprimieren den EPO-Rezeptor. Nach Initialisierung wird die Osteoklastogenese stimuliert [44]. Zusätzlich wurden bei der EPO - Gruppe vermehrt TRAP positive Zellen im Kallus nachgewiesen. Somit sprechen die Ergebnisse der Western Blot Analyse und der TRAP-Färbung für eine intensivierete Osteoklastenaktivität. Es kann ein Zusammenhang mit der applizierten EPO-Dosis vermutet werden. In vitro führt eine low-dose Therapie zwar zu einer verminderten Osteoblastendifferenzierung, jedoch ohne vermehrten Knochenabbau. Im Gegenteil dazu, wurde bei lang bestehenden hohen EPO-Spiegeln sowohl eine erhöhte Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität festgestellt [99,113]. Daher wird von einem Anstieg des Knochenumsatzes ausgegangen, der zu einer verminderten Knochenmasse führte. Die erwähnten Studien sind teilweise Studien in vitro oder

untersuchten die Frakturheilung in jungen Mäusen. Daher sind die Ergebnisse mit denen der vorliegenden Studie nicht uneingeschränkt vergleichbar.

### Schlussfolgerung

Die Studie untersuchte erstmalig den Einfluss von EPO auf die Frakturheilung bei alten Mäusen. Es konnte gezeigt werden, dass EPO signifikant die Knochenmineralisationsdichte und die Expression von OPG und RANKL erhöht. Dies kann als Zeichen eines erhöhten Knochenumsatzes gedeutet werden. Dies führte zu einer Verschlechterung der Frakturheilung. Zusätzlich kann eine verschlechterte Mikrozirkulation aufgrund veränderter rheologischer Eigenschaften des Blutes die Frakturheilung negativ beeinflusst haben. Daher kann die Behandlung mit EPO zur Verbesserung der Frakturheilung bei alten Patienten nicht empfohlen werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, Levinson R, Steiner M (1990) Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5978–5982
2. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390:175–179
3. Arslantaş MK, Arslantaş R, Tozan EN (2015) Effects of Systemic Erythropoietin on Ischemic Wound Healing in Rats. *Ostomy Wound Manag* 61:28–33
4. Asumda FZ, Chase PB (2011) Age-related changes in rat bone-marrow mesenchymal stem cell plasticity. *BMC Cell Biol* 12:44
5. Aubin JE, Bonnellye E (2000) Osteoprotegerin and its ligand: A new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int* 11:905–913
6. Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wennemuth G, Wolff W, Wurzinger LJ, Zilch H-G (2017) *Duale Reihe Anatomie*.
7. Beane OS, Fonseca VC, Cooper LL, Koren G, Darling EM (2014) Impact of aging on the regenerative properties of bone marrow-, muscle-, and adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. *PLoS One* 9:e115963
8. Berchtold R, Bruch H, Trentz O (2008) *Berchtold Chirurgie*. 6. Auflage edition. Elsevier. München
9. Beubler E, Beubler E (2018) *Blut, Blutdruck und Durchblutung*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
10. Boecker W, Denk H, Heitz P, . (2004) *Pathologie*. 3. Auflage edition. Elsevier, München
11. Bonnarens F, Einhorn TA (1984) Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 2:97–101
12. Bourque W, Gross M, Hall B (1992) A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Lab Anim Sci* 42:369–374
13. Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A, Brines M (2003) Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4802–4806
14. Cano J, Campo J, Vaquero JJ, Martínez González JM, Bascones A (2008) High

- resolution image in bone biology II. Review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 13:E31-5
15. Carlier A, Geris L, Gastel N van, Carmeliet G, Oosterwyck H Van (2015) Oxygen as a critical determinant of bone fracture healing-A multiscale model. *J Theor Biol* 365:247–264
  16. Chang KP, Center JR, Nguyen T V, Eisman JA (2004) Incidence of hip and other osteoporotic fractures in elderly men and women: Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study. *J Bone Miner Res* 19:532–536
  17. Claes L, Maurer-Klein N, Henke T, Gerngross H, Melnyk M, Augat P (2006) Moderate soft tissue trauma delays new bone formation only in the early phase of fracture healing. *J Orthop Res* 24:1178–1185
  18. Clark D, Nakamura M, Miclau T, Marcucio R (2017) Effects of Aging on Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep* 15:601–608
  19. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levin BZ (1996) Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 271:736–741
  20. Croley AN, Zwetsloot KA, Westerkamp LM, Ryan NA, Pendergast AM, Hickner RC, Pofahl WE, Gavin TP (2005) Lower capillarization, VEGF protein, and VEGF mRNA response to acute exercise in the vastus lateralis muscle of aged vs. young women. *J Appl Physiol* 99:1872–1879
  21. Darnay BG, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB (1999) Activation of NF- $\kappa$ B by rank requires tumor necrosis factor receptor- associated factor (TRAF) 6 and NF- $\kappa$ B-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif. *J Biol Chem* 274:7724–7731
  22. Davis JM, Arakawa T, Strickland TW, Yphantis DA (1987) Characterization of Recombinant Human Erythropoietin Produced in Chinese Hamster Ovary Cells. *Biochemistry* 26:2633–2638
  23. Desjardins D (1986) Indwelling vascular cannulas for remote blood sampling, infusion and long-term instrumentation of small laboratory animals. In: *Methods of Animal Experimentation*. Acad Press Inc Orlando VII. Part:143–194
  24. Dordal MS, Wang FF, Goldwasser E (1985) The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology* 116:2293–2299
  25. Echeverri LF, Herrero MA, Lopez JM, Oleaga G (2014) Early Stages of Bone Fracture Healing: Formation of a Fibrin–Collagen Scaffold in the Fracture Hematoma. *Bull Math Biol* 77:156–183
  26. Einhorn TA, Hirschman A, Kaplan C, Nashed R, Devlin VJ, Warman J (1989) Neutral protein-degrading enzymes in experimental fracture callus: A preliminary report. *J Orthop Res* 7:792–805

27. Einhorn TA (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* S7-21
28. Epari DR, Duda GN, Thompson MS (2010) Mechanobiology of bone healing and regeneration: In vivo models. *Proc Inst Mech Eng Part H J Eng Med* 224:1543–1553
29. Fandrey J, Huwiler A, Frede S, Pfeilschifter J, Jelkmann W (1994) Distinct Signaling Pathways Mediate Phorbol-Ester-Induced and Cytokine-Induced Inhibition of Erythropoietin Gene Expression. *Eur J Biochem* 226:335–340
30. Faquin WC, Schneider TJ, Goldberg MA (1992) Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production. *Blood* 79:1987–1994
31. Fleisch H (1997) Bisphosphonates: Mechanisms of action and clinical use in osteoporosis - An update. *Horm Metab Res* 29:145–150
32. Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S, Freissmuth M (2020) *Pharmaka mit Wirkung auf die Blutbildung*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
33. Frost HM (1987) Bone “mass” and the “mechanostat”: A proposal. *Anat Rec* 219:1–9
34. Frost HM (2000) The Utah paradigm of skeletal physiology: An overview of its insights for bone, cartilage and collagenous tissue organs. *J Bone Miner Metab* 18:305–316
35. Garcia P, Holstein JH, Histing T, Burkhardt M, Culemann U, Pizanis A, Wirbel RJ, Pohlemann T, Menger MD (2008) A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: Impact of stability on fracture healing. *J Biomech* 41:1689–1696
36. Garcia P, Holstein JH, Maier S, Schaumlöffel H, Al-Marrawi F, Hannig M, Pohlemann T, Menger MD (2008) Development of a Reliable Non-Union Model in Mice. *J Surg Res* 147:84–91
37. Garcia P, Speidel V, Scheuer C, Laschke MW, Holstein JH, Histing T, Pohlemann T, Menger MD (2011) Low dose erythropoietin stimulates bone healing in mice. *J Orthop Res* 29:165–172
38. Garcia P, Herwerth S, Matthys R, Holstein JH, Histing T, Menger MD, Pohlemann T (2011) The lockingmousenail - A new implant for standardized stable osteosynthesis in mice. *J Surg Res* 169:220–226
39. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA (2003) Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 88:873–884
40. 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
41. Haase VH (2013) Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev* 27:41–53

42. Herath SC, Lion T, Klein M, Stenger D, Scheuer C, Holstein JH, Mörsdorf P, Rollmann MFR, Pohlemann T, Menger MD, Histing T (2015) Stimulation of angiogenesis by cilostazol accelerates fracture healing in mice. *J Orthop Res* 33:1880–1887
43. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT (1993) A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res* 11:305–312
44. Hiram-Bab S, Liron T, Deshet-Unger N, Mittelman M, Gassmann M, Rauner M, Franke K, Wielockx B, Neumann D, Gabet Y (2015) Erythropoietin directly stimulates osteoclast precursors and induces bone loss. *FASEB J* 29:1890–1900
45. Histing T, Holstein JH, Garcia P, Matthys R, Kristen A, Claes L, Menger MD, Pohlemann T (2009) Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture. *J Orthop Res* 27:1152–1156
46. Histing T, Garcia P, Matthys R, Leidinger M, Holstein JH, Kristen A, Pohlemann T, Menger MD (2010) An internal locking plate to study intramembranous bone healing in a mouse femur fracture model. *J Orthop Res* 28:397–402
47. Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke MW, Wehner T, Bindl R, Recknagel S, Stuermer EK, Vollmar B, Wildemann B, Lienau J, Willie B, Peters A, Ignatius A, Pohlemann T, Claes L, Menger MD (2011) Small animal bone healing models: Standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 49:591–599
48. Histing T, Klein M, Stieger A, Stenger D, Steck R, Matthys R, Holstein JH, Garcia P, Pohlemann T, Menger MD (2012) A new model to analyze metaphyseal bone healing in mice. *J Surg Res* 178:715–721
49. Histing T, Anton C, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger MD (2012) Melatonin impairs fracture healing by suppressing rankl-mediated bone remodeling. *J Surg Res* 173:83–90
50. Histing T, Heerschoop 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 Investig Surg* 29:202–208
51. Histing T, Heerschoop K, Klein M, Scheuer C, Stenger D, Holstein JH, Pohlemann T, Menger MD (2016) Characterization of the healing process in non-stabilized and stabilized femur fractures in mice. *Arch Orthop Trauma Surg* 136:203–211
52. Histing T, Bremer P, Rollmann MF, Herath S, Klein M, Pohlemann T, Menger MD, Fritz T (2018) A minimally invasive model to analyze endochondral fracture healing in mice under standardized biomechanical conditions. *J Vis Exp* 2018
53. 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

54. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T (2007) Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech* 40:215–219
55. Holstein JH, Matthys R, Histing T, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Meier C, Pohlemann T, Menger MD (2009) Development of a Stable Closed Femoral Fracture Model in Mice. *J Surg Res* 153:71–75
56. Holstein JH, Orth M, Scheuer C, Tami A, Becker SC, Garcia P, Histing T, Mörsdorf P, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2011) Erythropoietin stimulates bone formation, cell proliferation, and angiogenesis in a femoral segmental defect model in mice. *Bone* 49:1037–1045
57. Hsu YH, Li HH, Hsieh MY, Liu MF, Huang KY, Chin LS, Chen PC, Cheng HH, Chang MS (2006) Function of interleukin-20 as a proinflammatory molecule in rheumatoid and experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 54:2722–2733
58. Hsu YH, Chen WY, Chan CH, Wu CH, Sun ZJ, Chang MS (2011) Anti-IL-20 monoclonal antibody inhibits the differentiation of osteoclasts and protects against osteoporotic bone loss. *J Exp Med* 208:1849–1861
59. Jacenko O, Olsen BR (1995) Transgenic mouse models in studies of skeletal disorders. *J Rheumatol Suppl* 43:39–41
60. Jelkmann W (1992) Erythropoietin: Structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 72:449–489
61. Jelkmann W (2004) Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 43:649–659
62. Junqueira L, Carneiro J (2004) *Histologie. neue Approbationsordnung. 6.Auflage.* Springer. Berlin
63. Kertesz N, Wu J, Chen TH-P, Sucov HM, Wu H (2004) The role of erythropoietin in regulating angiogenesis. *Dev Biol* 276:101–110
64. Klein M, Stieger A, Stenger D, Scheuer C, Holstein JH, Pohlemann T, Menger MD, Histing T (2015) Comparison of healing process in open osteotomy model and open fracture model: Delayed healing of osteotomies after intramedullary screw fixation. *J Orthop Res* 33:971–978
65. Kolar P, Schmidt-Bleek K, Schell H, Gaber T, Toben D, Schmidmaier G, Perka C, Buttgerit F, Duda GN (2010) The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue Eng Part B Rev* 16:427–34
66. Kolomansky A, Hiram-Bab S, Ben-Califa N, Liron T, Deshet-Unger N, Mittelman M, Oster HS, Rauner M, Wielockx B, Neumann D, Gabet Y (2020) Erythropoietin Mediated Bone Loss in Mice Is Dose-Dependent and Mostly Irreversible. *Int J Mol Sci* 21:3817
67. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn

- TA (2001) Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 16:1004–1014
68. Krantz SB (1991) Erythropoietin. *Blood* 77:419–434
  69. Kristjansdottir HL, Lewerin C, Lerner UH, Herlitz H, Johansson P, Johansson H, Karlsson M, Lorentzon M, Ohlsson C, Ljunggren Ö, Mellström D (2020) High Plasma Erythropoietin Predicts Incident Fractures in Elderly Men with Normal Renal Function: The MrOS Sweden Cohort. *J Bone Miner Res* 35:298–305
  70. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165–176
  71. Lappin TR, Maxwell AP, Johnston PG (2002) EPO's alter ego: erythropoietin has multiple actions. *Stem Cells* 20:485–92
  72. Lee FS, Percy MJ (2011) The HIF Pathway and Erythrocytosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 6:165–92
  73. Lin T-H, Gibon E, Loi F, Pajarinen J, Córdova LA, Nabeshima A, Lu L, Yao Z, Goodman SB (2017) Decreased osteogenesis in mesenchymal stem cells derived from the aged mouse is associated with enhanced NF- $\kappa$ B activity. *J Orthop Res* 35:281–288
  74. Lind PM, Lind L, Larsson S, Örborg J (2001) Torsional testing and peripheral quantitative computed tomography in rat humerus. *Bone* 29:265–270
  75. Lipsic E, Schoemaker RG, van der Meer P, Voors AA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH (2006) Protective effects of erythropoietin in cardiac ischemia: from bench to bedside. *J Am Coll Cardiol* 48:2161–7
  76. Lopas LA, Belkin NS, Mutyaba PL, Gray CF, Hankenson KD, Ahn J (2014) Fractures in Geriatric Mice Show Decreased Callus Expansion and Bone Volume. *Clin Orthop Relat Res* 472:3523–3532
  77. Lu C, Miclau T, Hu D, Hansen E, Tsui K, Puttlitz C, Marcucio RS (2005) Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *J Orthop Res* 23:1300–1307
  78. Lu C, Hansen E, Sapozhnikova A, Hu D, Miclau T, Marcucio RS (2008) Effect of age on vascularization during fracture repair. *J Orthop Res* 26:1384–9
  79. Lüllmann-Rauch R, Asan E (2019) Taschenlehrbuch Histologie. Georg Thieme Verlag
  80. Manigrasso MB, O'Connor JP (2004) Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma* 18:687–95
  81. Marsell R, Einhorn TA (2011) The biology of fracture healing. *Injury* 42:551–555

82. Matthys R, Perren SM (2009) Internal fixator for use in the mouse. *Injury* 40:S103-9
83. McKibbin B (1978) The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Jt Surg - Ser B* 60 B:150–162
84. Meunier PJ, Coindre JM, Edouard CM, Arlot ME (1980) Bone histomorphometry in paget's disease quantitative and dynamic analysis of pagetic and nonpagetic bone tissue. *Arthritis Rheum* 23:1095–1103
85. Meyer RA, Tsahakis PJ, Martin DF, Banks DM, Harrow ME, Kiebzak GM (2001) Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *J Orthop Res* 19:428–435
86. Mills LA, Simpson AHRW (2012) In vivo models of bone repair. *J Bone Jt Surg - Ser B* 94:865–74
87. Mocini D, Leone T, Tubaro M, Santini M, Penco M (2007) Structure, Production and Function of Erythropoietin: Implications for Therapeutical Use in Cardiovascular Disease. *Curr Med Chem* 14:2278–2287
88. Nakae I, Fujita M, Miwa K, Hasegawa K, Kihara Y, Nohara R, Miyamoto S, Ueda K, Tamaki SI, Sasayama S (2000) Age-dependent impairment of coronary collateral development in humans. *Heart Vessels* 15:176–180
89. Nebot Valenzuela E, Pietschmann P (2017) Epidemiologie und Pathologie des Morbus Paget – ein Überblick. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 167:2–8
90. Nunamaker DM (1998) Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* S56-65
91. O'Neill KR, Stutz CM, Mignemi NA, Burns MC, Murry MR, Nyman JS, Schoenecker JG (2012) Micro-computed tomography assessment of the progression of fracture healing in mice. *Bone* 50:1357–1367
92. Obara N, Suzuki N, Kim K, Nagasawa T, Imagawa S, Yamamoto M (2008) Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood* 111:5223–5232
93. Orth M, Kruse NJ, Braun BJ, Scheuer C, Holstein JH, Khalil A, Yu X, Murphy WL, Pohlemann T, Laschke MW, Menger MD (2017) BMP-2-coated mineral coated microparticles improve bone repair in atrophic non-unions. *Eur Cells Mater* 33:1–12
94. Paliege A, Rosenberger C, Bondke A, Sciesielski L, Shina A, Heyman SN, Flippin LA, Arend M, Klaus SJ, Bachmann S (2010) Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  expressing interstitial fibroblasts are the only renal cells that express erythropoietin under hypoxia-inducible factor stabilization. *Kidney Int* 77:312–318
95. Panjeta M, Tahirovic I, Karamehic J, Sofic E, Ridic O, Coric J (2015) The Relation of Erythropoietin Towards Hemoglobin and Hematocrit in Varying Degrees of Renal Insufficiency. *Mater Socio Medica* 27:144

96. Ponce LL, Navarro JC, Ahmed O, Robertson CS (2013) Erythropoietin neuroprotection with traumatic brain injury. *Pathophysiology* 20:31–38
97. Prisby RD, Ramsey MW, Behnke BJ, Dominguez JM, Donato AJ, Allen MR, Delp MD (2007) Aging reduces skeletal blood flow, endothelium-dependent vasodilation, and no bioavailability in rats. *J Bone Miner Res* 22:1280–1288
98. Qi B, Yu J, Zhao Y, Zhu D, Yu T (2016) Mouse fracture models: A primer. *Int J Clin Exp Med* 9:12418–12429
99. Rauner M, Franke K, Murray M, Singh RP, Hiram-Bab S, Platzbecker U, Gassmann M, Socolovsky M, Neumann D, Gabet Y, Chavakis T, Hofbauer LC, Wielockx B (2016) Increased EPO Levels Are Associated With Bone Loss in Mice Lacking PHD2 in EPO-Producing Cells. *J Bone Miner Res* 31:1877–1887
100. Rivard A, Fabre JE, Silver M, Chen D, Murohara T, Kearney M, Magner M, Asahara T, Isner JM (1999) Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation* 99:111–120
101. Rölfing JHD, Baatrup A, Stiehler M, Jensen J, Lysdahl H, Bünger C (2014) The Osteogenic Effect of Erythropoietin on Human Mesenchymal Stromal Cells is Dose-Dependent and Involves Non-Hematopoietic Receptors and Multiple Intracellular Signaling Pathways. *Stem Cell Rev Reports* 10:69–78
102. Röntgen V, Blakytyn R, Matthys R, Landauer M, Wehner T, Göckelmann M, Jermendy P, Amling M, Schinke T, Claes L, Ignatius A (2010) Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator. *J Orthop Res* 28:1456–1462
103. Rueter A, Trentz O, Wagner M (2003) *Unfallchirurgie*. 2. Auflage edition. Elsevier. München
104. Scharf H, Rüter A, Pohlemann T, Marzi I, Kohn D, Günther K (2009) *Orthopädie und Unfallchirurgie: Facharztwissen nach der neuen Weiterbildungsordnung*. 1. Auflage edition. Elsevier. München
105. Schröter S, Hoffmann T, Döbele S, Welke B, Hurschler C, Schwarze M, Stöckle U, Freude T, Ateschrang A (2018) Biomechanical properties following open wedge high tibial osteotomy: Plate fixator combined with dynamic locking screws versus standard locking screws. *Clin Biomech* 60:108–114
106. Sethe S, Scutt A, Stolzing A (2006) Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev* 91–16
107. Simmonds MJ, Meiselman HJ, Baskurt OK (2013) Blood rheology and aging. *J Geriatr Cardiol* 10:291–301
108. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trall G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D,

- Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309–319
109. Sinclair AM (2013) Erythropoiesis stimulating agents: Approaches to modulate activity. *Biol Targets Ther* 7:161–174
  110. Sorg H, Krueger C, Schulz T, Menger MD, Schmitz F, Vollmar B (2009) Effects of erythropoietin in skin wound healing are dose related. *FASEB J* 23:3049–3058
  111. Stockmann C, Fandrey J (2006) Hypoxia-induced erythropoietin production: A paradigm for oxygen-regulated gene expression. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33:968–979
  112. Street J, Bao M, DeGuzman L, Bunting S, Peale F V, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, Van Bruggen N, Redmond HP, Carano RAD, Filvaroff EH (2002) Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9656–9661
  113. Suresh S, de Castro LF, Dey S, Robey PG, Noguchi CT (2019) Erythropoietin modulates bone marrow stromal cell differentiation. *Bone Res* 7:21
  114. Tonna EA (1964) Fracture callus formation in young and old mice observed with polarized light microscopy. *Anat Rec* 150:349–361
  115. Tranquilli Leali P, Doria C, Zachos A, Ruggiu A, Milia F, Barca F (2009) Bone fragility: Current reviews and clinical features. *Clin Cases Miner Bone Metab* 6:109–113
  116. Urist MR, McLean FC (1950) Bone repair in rats with multiple fractures. *Am J Surg* 80:685–695
  117. Wan L, Zhang F, He Q, Tsang WP, Lu L, Li Q, Wu Z, Qiu G, Zhou G, Wan C (2014) EPO promotes bone repair through enhanced cartilaginous callus formation and angiogenesis. *PLoS One* 9:e102010
  118. Watowich SS (2011) The erythropoietin receptor: Molecular structure and hematopoietic signaling pathways. *J Investig Med* 59:1067–1072
  119. Webb JCJ, Tricker J (2000) A review of fracture healing. *Curr Orthop* 457–463
  120. Welsch U, Deller T (2014) Sobotta, Lehrbuch Histologie.
  121. Wen D, Boissel JP, Showers M, Ruch BC, Bunn HF (1994) Erythropoietin structure-function relationships. Identification of functionally important domains. *J Biol Chem* 269:22839–22846
  122. Wenger RH, Hoogewijs D (2010) Regulated oxygen sensing by protein hydroxylation in renal erythropoietin-producing cells. *Am J Physiol - Ren Physiol* 298:F1287-96
  123. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K (1998) Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin

- (OPG): A mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 139:1329–1337
124. Ylä-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J (2007) Vascular Endothelial Growth Factors. Biology and Current Status of Clinical Applications in Cardiovascular Medicine. *J Am Coll Cardiol* 49:1015–1026
  125. Yukata K, Xie C, Li TF, Takahata M, Hoak D, Kondabolu S, Zhang X, Awad HA, Schwarz EM, Beck CA, Jonason JH, O’Keefe RJ (2014) Aging periosteal progenitor cells have reduced regenerative responsiveness to bone injury and to the anabolic actions of PTH 1-34 treatment. *Bone* 62:79–89

## 7 Publikation

### 7.1 Publikation

Orth M, **Baudach J**, Scheuer C, Osche D, Veith NT, Braun BJ, Rollmann M, Herath SC, Pohlemann T, Menger MD, Histing T (2019) Erythropoietin does not improve bone healing in aged mice. *Experimental gerontology* 122:1-9.

### 7.2 Posterpräsentation

Orth M, **Baudach J (Vortragende)**, Rollmann M, Osche D, Herath SC, Menger MD, Pohlemann T, Histing T (2019). In geriatrischen Mäusen verbessert Erythropoietin die Knochenheilung nicht. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie. Berlin, Deutschland.

## 8 Danksagung

Meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Tina Histing möchte ich besonders danken für die Überlassung des Themas und die unvergleichbar intensive Unterstützung in allen Phasen meiner Arbeit. Die hervorragende und fachlich kompetente Betreuung hat diese Dissertationsarbeit ermöglicht.

Ein großer Dank gilt Herrn PD Dr. Marcel Orth für seine unermüdliche und tatkräftige Hilfe und die Erarbeitung der Publikation.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Menger möchte ich mich für Überlassung der Räumlichkeiten und Gerätschaften des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes bedanken. Ich möchte mich auch für seine Hilfe bei der Interpretation der Daten bedanken.

Frau Dr. rer. nat. C. Scheuer, Frau Julia Parakenings und Frau Janine Becker möchte ich ebenfalls für die Unterstützung bei der Probenaufarbeitung bedanken.

Bei Frau Dr. med. vet. Monika Frings und Frau Dr. med. vet. Christina Körbel möchte ich mich für Anleitung und Hilfestellung bei den Tierversuchen bedanken.

Allen Mitarbeitern und Doktoranden am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie gilt mein großer Dank. Durch die kollegiale Zusammenarbeit herrschte stets ein angenehmes Arbeitsklima.

Meiner Familie gilt ein besonderer Dank. Durch intensive Gespräche mit meinem Vater wurde mein Interesse an der medizinischen Forschung geweckt und die Motivation aufrecht gehalten, diese Arbeit fertig zu stellen. Durch Zuwendung und Unterstützung hat mich meine Mutter besonders in den Phasen des Schreibens immer wieder aufgebaut.



## 9 Lebenslauf

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