

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
und dem Julius Wolff Institut der Charité

Dissertation

**Der Einfluss
des Schädel-Hirn-Traumas
auf die Eigenschaften des Kallus
während der Knochenheilung**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tim Lünemann

aus Neuss

Datum der Promotion: 18.12.2020

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Locher RJ, Lünemann T, Garbe A, Schaser K, Schmidt-Bleek K, Duda G, Tsitsilonis S. *Traumatic brain injury and bone healing: radiographic and biomechanical analyses of bone formation and stability in a combined murine trauma model.* J Musculoskelet Neuronal Interact. 2015 Dec;15(4):309-15.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Abstrakt	VIII
Abstract	X
1. Einleitung.....	1
1.1 Frakturheilung beim Menschen	1
1.2 Knochenheilung bei der Maus	6
1.3 Das Schädel-Hirn-Trauma	7
1.4 Beschleunigte Frakturheilung bei SHT-Patienten	7
1.5 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit	9
2. Material und Methoden.....	10
2.1 Versuchstiere.....	10
2.1.1 Fütterung und Haltung	10
2.1.2 Studiendesign	11
2.2 Operationsmethoden	13
2.2.1 Peri- und postoperatives Procedere.....	13
2.2.2 Das <i>Controlled Cortical Impact Injury</i> -Modell.....	14

Inhaltsverzeichnis

2.2.3	Das Femurosteotomie-Modell.....	18
2.3	MikroCT-Untersuchung.....	22
2.3.1	Spezifikationen.....	22
2.3.2	Messparameter	24
2.3.3	Qualitative MikroCT-Untersuchung	27
2.4	Tötung und Präparation.....	28
2.4.1	Tötung.....	28
2.4.2	Präparation	29
2.5	Biomechanische Testung.....	30
2.5.1	Das Torsions-Prüfgerät	30
2.5.2	Einbettung der Probe	31
2.5.3	Der Torsionstest	34
2.5.4	Bearbeitung der Daten.....	35
2.6	Statistische Methoden	37
3.	Ergebnisse	38
3.1	MikroCT-Untersuchung.....	39
3.1.1	Kallusvolumen.....	40
3.1.2	Mineralisierungsdichte des Kallus.....	41
3.1.3	Qualitative MikroCT-Untersuchung	43
3.2	Biomechanische Torsionstestung	45

Inhaltsverzeichnis

3.2.1	Torsionsfestigkeit	45
3.2.2	Torsionssteifigkeit.....	48
4.	Diskussion.....	51
5.	Zusammenfassung.....	72
6.	Literaturverzeichnis	74
7.	Anhang.....	81
7.1	Lebenslauf.....	81
7.2	Publikationsliste.....	82
7.3	Eidesstattliche Versicherung	83
7.4	Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	84
7.5	Danksagung	85

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Die Phasen der sekundären Frakturheilung	2
Abbildung 1.2: Zellen und Wachstumsfaktoren der Frakturheilung.....	4
Abbildung 1.3: Mikrostrukturelle Unterschiede zwischen Mäuse- und Menschenknochen	6
Abbildung 2.1: Gruppeneinteilung der Versuchstiere	11
Abbildung 2.2 Gruppeneinteilung mit postoperativen Fallzahlen.....	12
Abbildung 2.3: Zeitlicher Verlauf von Interventionen in der Fraktur- und der Kombinations-Gruppe.....	13
Abbildung 2.4: Zeitlicher Verlauf von Interventionen in der Kontroll- und in der SHT-Gruppe	13
Abbildung 2.5: Kontusionseinheit des <i>Controlled Cortical Impact Injury</i> -Modells (<i>Model AMS 201</i>).....	15
Abbildung 2.6: Intraoperative Sicht durchs Mikroskop.....	18
Abbildung 2.7: Fixateur mit Pins	19
Abbildung 2.8: Implantatspezifische Instrumente	20
Abbildung 2.9: Übersicht der einzelnen Operationsschritte	21
Abbildung 2.10: Röntgenübersichtsaufnahme (<i>Scout View</i>).....	23
Abbildung 2.11: Bildschirmausschnitt des Scanco IPLv5.15-Programms.....	25
Abbildung 2.12: 3D-Darstellung des Frakturkallus.....	26
Abbildung 2.13: Beispielbilder der qualitativen MikroCT-Auswertung.....	28

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.14: Gruppenübersicht der biomechanischen Testung.....	30
Abbildung 2.15: Material Prüfgerät.	31
Abbildung 2.16: Einbettung der Probe.....	32
Abbildung 2.17: Einbettung der Probe, mit zweiter Einbettform.....	33
Abbildung 2.18: Probenhalter der Bose [®] TestBench mit eingesetzter Probe.....	34
Abbildung 2.19: Bildschirmausschnitt des WinTest [®] -Programms während einer Torsionstestung	35
Abbildung 2.20 In Excel [®] erstellter Graph zur Berechnung von Torsionsfestigkeit/-steifigkeit.....	36
Abbildung 3.1: Entwicklung der Kallusvolumina [in mm ³] über vier Wochen	40
Abbildung 3.2: Entwicklung der Kallusdichte (in mg HA/cm ³) über vier Wochen	42
Abbildung 3.3: Vergleich der qualitativen MikroCT-Auswertung von Fraktur- und Kombinations-Gruppe nach 3 und 4 Wochen	44
Abbildung 3.4 Biomechanische Testung des maximalen Drehmoments (in Nmm) 3 und 4 Wochen nach Operation	45
Abbildung 3.5 Biomechanische Testung des maximalen Drehmoments (in Nmm) 3 und 4 Wochen nach Operation	46
Abbildung 3.6 Biomechanische Testung der Torsionssteifigkeit (in Nmm/°) 3 und 4 Wochen nach Operation	48
Abbildung 3.7 Biomechanische Testung der Torsionssteifigkeit (in Nmm/°) 3 und 4 Wochen nach Operation	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppenübersicht der einzelnen Interventionen.....	11
Tabelle 2: Spezifikationen des SCANCO vivaCT 40	22
Tabelle 3: Fallzahlen der einzelnen MikroCT-Auswertungen	39
Tabelle 4: Ergebnisse der Kallusvolumen-Untersuchung.	41
Tabelle 5: Ergebnisse der Kallusdichtemessung	42
Tabelle 6: Ergebnisse der qualitativen MikroCT-Auswertung 3 und 4 Wochen nach Operation.....	43
Tabelle 7: Ergebnisse der Torsionsfestigkeiten (maximales Drehmoment).....	47
Tabelle 8: Ergebnisse der Torsionssteifigkeiten	50
Tabelle 9: Übersicht der veröffentlichten experimentellen Studien zum Thema SHT und Frakturheilung mit radiologischer und/oder biomechanischer Auswertung	52

Abkürzungsverzeichnis

μA	Mikroampere
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AIS	abbreviated injury Scale
AP	Alkalische Phosphatase
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP	bone morphogenetic protein
CCII	controlled cortical impact injury
cm³	Kubikzentimeter
g	Gramm
HA	Hydroxylapatit
HO	Heterotope Ossifikationen
HU	Houndsfield units
i.p.	intraperitoneal
ISS	injury severity score
keV	Kiloelektronenvolt
KG	Körpergewicht
kV	Kilovolt
kVp	Kilovolt Peak
m	Meter
mg	Milligramm
mm	Millimeter
mm³	Kubikmillimeter
ms	Millisekunde
MTF	Modulations-Transfer-Funktion
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drugs
p.o.	postoperativ
s.c.	subkutan
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abstrakt

Zielsetzung: Klinische Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass Frakturen langer Röhrenknochen bei Schädel-Hirn-Trauma (SHT)-Patienten unter einer vermehrten Kallusbildung frühzeitig heilen. Bis zum heutigen Tag gibt es keinen detaillierten quantitativen Beweis für diese Hypothese. Ziel dieser Arbeit war es, an einem Mausmodell mikrocomputertomographisch und biomechanisch zu untersuchen, ob das SHT einen Einfluss auf die Kallusbildung während der Frakturheilung hat.

Methoden: Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde C57/Black6-Mäuse (n=133, weiblich, 12-15 Wochen alt) in vier Gruppen randomisiert (Fraktur-Gruppe, Kombinations-Gruppe, SHT-Gruppe, Kontroll-Gruppe). In der Fraktur-Gruppe wurde den Mäusen das linke Femur mit einem externen Fixateur versorgt und im Anschluss eine Osteotomie durchgeführt. In der Kombinations-Gruppe wurde vor der Osteotomie zusätzlich ein SHT mit dem CCII-Modell (Controlled Cortical Impact Injury Modell) gesetzt. Die Mäuse der SHT-Gruppe erhielten nur ein SHT. Eine Gruppe ohne Operation diente als Kontroll-Gruppe. Der Knochenheilungsverlauf der Kombinations-Gruppe (n=29) und Fraktur-Gruppe (n=30) wurde in wöchentlichen Abständen mikrocomputer-tomographisch beobachtet. Die biomechanischen Eigenschaften des Kallus wurden im Torsionstest untersucht.

Ergebnisse: Die Ergebnisse der MikroCT-Untersuchung zeigten, dass sich in der zweiten, dritten und vierten Woche signifikant mehr Kallus in der Kombinations-Gruppe als in der Fraktur-Gruppe gebildet hat (Woche 2: $p=0,020$, Woche 3 $p=0,039$, Woche 4 $p<0,001$). Die Kallusdichte stieg während der ersten drei Wochen in beiden Gruppen auf ähnliche Werte an. In der vierten Woche nahm die Dichte in der Kombinations-Gruppe stärker zu. Dieser Unterschied erreichte aber keine statistische Signifikanz ($p=0,053$). In der vierten postoperativen Woche war der Kallus in der Kombinations-Gruppe signifikant fester ($p=0,029$). Die biomechanischen Tests der Femora ergaben nach drei Wochen eine signifikant höhere Festigkeit und Steifigkeit in der Kontroll-Gruppe im Vergleich zur SHT-Gruppe ($p=0,029$ und $p=0,040$).

Schlussfolgerung: Die Kombination aus SHT und Femurfraktur führt bei Mäusen zu vermehrter Kallusbildung, höherer biomechanischer Kallusfestigkeit und Steifigkeit im Vergleich zur normalen Knochenheilung. Die biomechanischen Ergebnisse der SHT- und Kontroll-Gruppe geben Anlass zu der Vermutung, dass nur die Kombination von SHT und Verletzung eines langen Röhrenknochens zu einer verbesserten Knochenheilung führt. Ohne eine assoziierte Knochenverletzung scheint das SHT eine Schwächung der biomechanischen Eigenschaften des Knochens zu bewirken. Dies könnte für eine Aktion-Reaktion zwischen Gehirn und Knochen sprechen.

Die vorliegenden Studienergebnisse bestätigten die klinischen Beobachtungen, dass ein zeitgleich vorliegendes SHT die Knochenheilung beeinflusst. Ein genaueres Verständnis der zugrunde liegenden Stoffwechselwege könnte zu neuen Therapieansätzen in der Frakturversorgung führen.

Abstract

Background: Clinical observations have led to the hypothesis that exuberant callus formation in long bone fractures results from the simultaneous presence of a traumatic brain injury (TBI). Until today, no detailed quantitative proof for this hypothesis exists. Aim of this experimental study was to investigate the influence of TBI on the callus formation with the use of MikroCT and biomechanical trails in a mouse model.

Materials and methods: In this study, C57/Black6 mice (n=133, female, 12-15 weeks aged) were randomized into four groups (fracture group, TBI group, combined-trauma group, control group). Femoral osteotomy and stabilization with an external fixator were performed in the fracture group. In the combined-trauma group, prior to femoral osteotomy TBI was induced by the CCII-Model (Controlled Cortical Impact Injury Model). In the TBI group, only TBI was induced. A group with no operation served as control group. The bone healing process of the combined-trauma group (n=29) and the fracture group (n=30) was examined weekly by micro-CT scans. The biomechanical characteristics of the callus were examined by torsional testing.

Results: The results of the Micro-CT Scans showed that after two, three and four weeks there was significantly more callus formation in the combined-trauma group compared to the fracture group (week 2: $p=0,020$, week 3: $p=0,039$, week 4: $p<0,001$). The increased mineral density was comparable in both groups during the first three weeks. In the fourth week, mineral density was higher in the combined-trauma group however, without statistical significance ($p=0,053$). In the fourth week, the torsional strength was significantly higher in the combined-trauma group ($p=0,029$). Biomechanical test of the femora after three weeks revealed significantly higher torsional strength and torsional stiffness in the control group compared to the TBI group ($p=0,029$ and $p=0,040$).

Conclusions: The combination of TBI and long bone fracture results in an increased formation of callus, higher biomechanical torsional strength and stiffness compared to bone healing without TBI in mice. The biomechanical results of the TBI and control group show that only the combination of TBI with long bone fracture leads to

Abstract

improved bone healing. Without an associated long bone fracture TBI leads to decreased biomechanical properties of the bone. This suggests an action-reaction between the brain and the bone.

The present study results confirm the empirical clinical observations of TBI-stimulated bone healing. Further research of the underlying metabolic pathways could lead to new therapy strategies in fracture care.

1. Einleitung

1.1 Frakturheilung beim Menschen

Die Knochenheilung lässt sich in eine primäre und eine sekundäre Knochenheilung unterteilen. Stehen die Bruchenden nach einer Fraktur anatomisch genau zueinander und ist nur ein minimaler Frakturspalt vorhanden, kann es unter ausreichender mechanischer Stabilität und Vaskularität zu einer primären Frakturheilung (intramembranöse Heilung) ohne Ausbildung einer äußeren Kallusmanschette kommen¹. Hierbei entsteht analog zu dem natürlichen Knochenumbauprozess eine direkte knöcherne Überbrückung des Frakturspalts durch die Aktivierung von Osteoklasten und Osteoblasten. Diese Defektheilung ist, da nur unter genauer Reposition und absoluter Stabilität möglich, bei der natürlichen Knochenheilung kaum anzutreffen².

Die in der Natur ausschließlich vorkommende sekundäre Frakturheilung geht mit der Bildung von Kallus einher. Die sekundäre Frakturheilung lässt sich in fünf Phasen unterteilen, die teilweise gleichzeitig nebeneinander ablaufen².

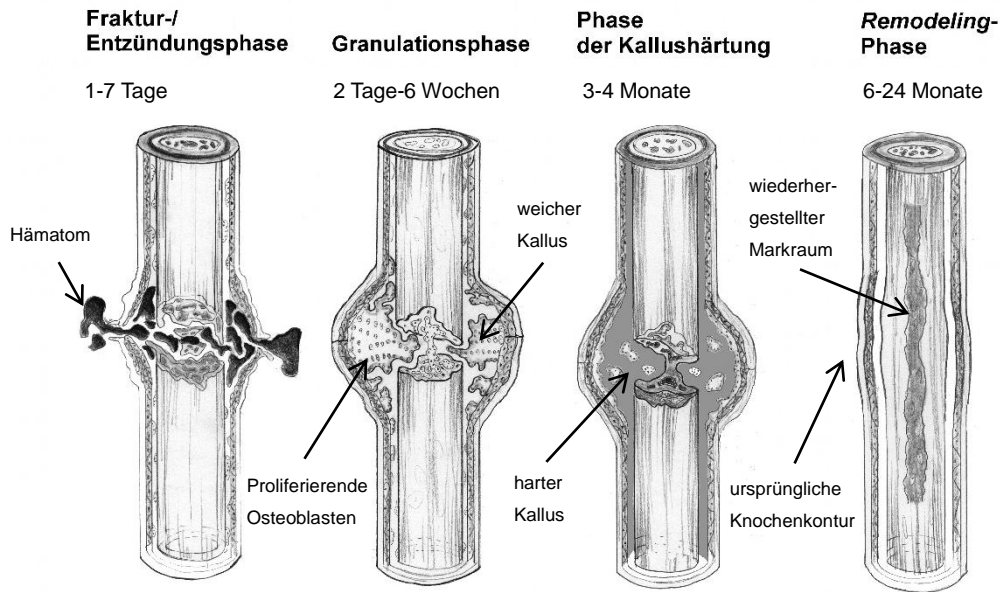


Abbildung 1.1: Die Phasen der sekundären Frakturheilung

Frakturphase: Durch eine äußere Gewalteinwirkung auf den Knochen und das ihn umgebende Weichteilgewebe kommt es zur Verletzung von Periost, Kortikalis, Spongiosa, Knochenmark und in unterschiedlicher Ausprägung auch der angrenzenden Weichteile. Die frakturbedingte Zerstörung von Gefäßen führt zu einem Hämatom im Frakturspalt² (Abbildung 1.1).

Entzündungsphase: Mit der Zerstörung von Gefäßen wird zeitgleich eine Entzündungsreaktion ausgelöst, die in den ersten 24 Stunden ihren Höhepunkt hat und nach ca. sieben Tagen abgeschlossen ist³. Durch das Hämatom bedingt kommt es zur Hypoxie und einem Abfall des pH-Wertes. Lymphozyten, Monozyten und polymorphkernige neutrophile Granulozyten infiltrieren das Frakturhämatom und setzen eine Kaskade von Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen in Gang. Makrophagen und die im späteren Verlauf wichtigen Osteoklasten entwickeln sich aus den eingewanderten Monozyten. Aus einwandernden mesenchymalen Stammzellen entwickeln sich später die Osteoblasten und Chondrozyten. Diese komplexen zellulären Reaktionen werden durch eine Reihe von pro-inflammatorischen Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen wie Interleukinen (IL), *tumor necrosis factor α* (TNF-α), *receptor activator of nuclear factor κB ligand*

(RANKL), Parathormon (PTH), *growth hormone* (GH), *insulin-like growth factors* (IGF) und Mitgliedern der *transforming growth factor β* (TGF- β)-Superfamilie wie dem *bone morphogenic protein* (BMP) gesteuert. Durch die Hypoxie im Frakturbereich werden auch angiogene Faktoren wie der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und der *platelet-derived growth factor* (PDGF) sezerniert. In Folge dessen kommt es zu einer überschießenden Aussprossung von Kapillaren, wodurch die Migration und Ernährung der einwandernden Zellen gewährleistet wird^{4,5}.

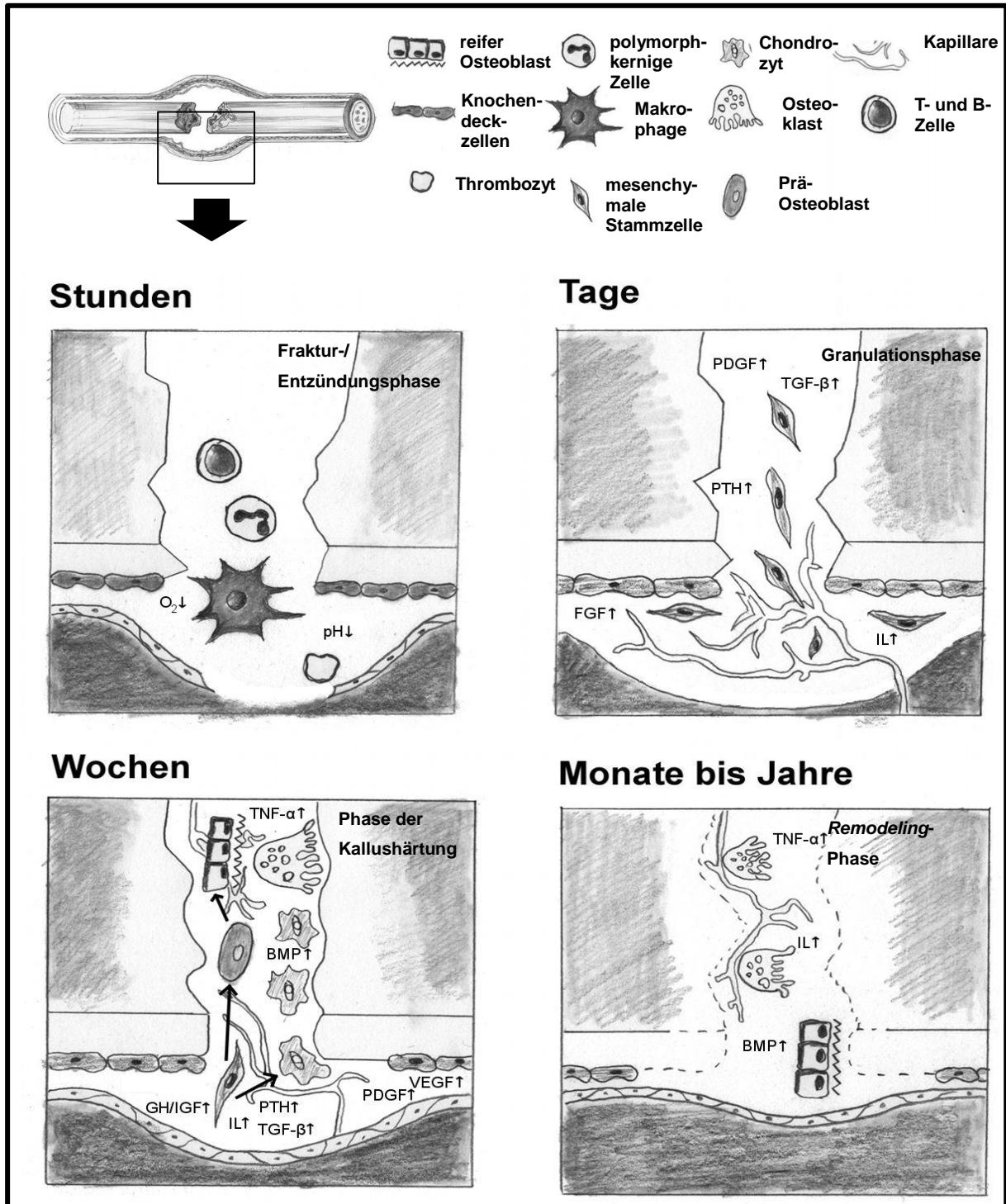


Abbildung 1.2: Zellen und Wachstumsfaktoren der Frakturheilung

Die akute Entzündungsreaktion ist gekennzeichnet durch Hypoxie, einen Abfall des pH-Wertes und die Migration von Entzündungszellen. Aussprossende Kapillaren tragen zur Ernährung und Migration der Zellen bei. Zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren führen zur Rekrutierung von mesenchymalen Stammzellen und deren Differenzierung zu Osteoblasten und Chondrozyten, welche Knochen und Knorpel bilden. Die letzte Phase ist charakterisiert durch ein Zusammenspiel von Kallusabbau durch Osteoklasten und Aufbau von Lamellenknochen durch Osteoblasten. Modifiziert nach Balogh et al.⁶

Granulationsphase: Nach zwei bis drei Tagen wird das Frakturhämatom durch eingewanderte Fibroblasten von peripher nach zentral in ein Granulationsgewebe umgeformt. Über das neu gewachsene Gefäßgeflecht gelangen erforderliche Bausteine in die Frakturregion und es entsteht Typ-1-Kollagen. Innerhalb der neu gebildeten Kollagenfibrillen formieren sich bereits Mineraldepots. Durch die Bildung erster Brücken von Granulationsgewebe zwischen den Knochenfragmenten entsteht nach ungefähr vier bis sechs Wochen ein provisorischer bindegewebiger Kallus. Nekrotisches Knochengewebe wird von Osteoklasten und Makrophagen abgebaut. Osteoblasten produzieren Osteoid und führen gemeinsam mit Chondrozyten im Verlauf zur enchondralen Ossifikation⁵ (Abbildung 1.2).

Phase der Kallushärtung: Das Osteoid wird zunehmend mineralisiert und es bildet sich Geflechtknochen entlang der Kapillarsprossen. Das hierbei benötigte Kalzium wird durch die hypertrophierten Chondrozyten bereitgestellt. Der Knochen erreicht durch diesen Prozess wieder langsam seine physiologische Steifigkeit⁵. Dieser Prozess dauert ca. drei bis vier Monate⁷ (Abbildung 1.2).

Remodeling-Phase: Innerhalb von ca. 6–24 Monaten wird der vorläufige Geflechtknochen sukzessive wieder in Lamellenknochen umgewandelt. Die Ausrichtung des reifen Lamellenknochens orientiert sich dabei an den mechanischen Belastungsvektoren (Wolffsches Gesetz). Jetzt nimmt auch die biomechanische Festigkeit wieder zu. Überschüssiger Knochen wird durch Osteoklasten abgebaut, so dass die ursprüngliche Knochenkontur sowie der ursprüngliche Markraum wiederhergestellt werden^{5,7} (Abbildung 1.2).

Abhängig von Frakturform und lokalen Begleitverletzungen sind beim Menschen die meisten Frakturen innerhalb von drei bis vier Monaten verheilt⁸. Ist nach vier bis sechs Monaten noch ein Frakturspalt zu erkennen, spricht man von einer verzögerten Heilung (*delayed union*). Ist die Fraktur nach sechs bis acht Monaten immer noch nicht zur Ausheilung gekommen, hat sich eine Pseudarthrose (*non-union*) gebildet^{2,8}.

1.2 Knochenheilung bei der Maus

Der Knochen kleiner Nagetiere wie Mäuse und Ratten ist, anders als beim Menschen, ohne Havers-System aufgebaut⁹. Im Rahmen der Knochenheilung wird das *remodeling* (Knochenumbauprozess) bei diesen Tieren nicht über die Havers-Systeme sondern über Resorptionshöhlen vermittelt. Diese Resorptionshöhlen bilden sich in der Nähe von Frakturen und werden im Verlauf der Heilung mit Osteoblasten ausgefüllt⁹. Dieser Prozess ist dem *remodeling* bei vorhandenem Havers-System sehr ähnlich.

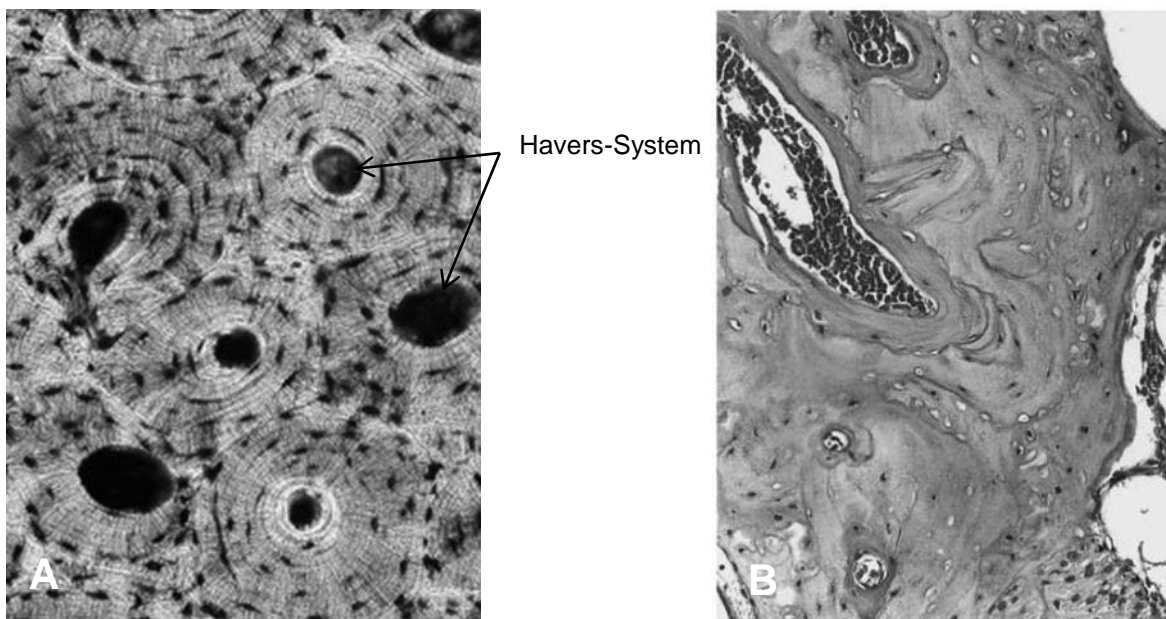


Abbildung 1.3: Mikrostrukturelle Unterschiede zwischen Mäuse- und Menschenknochen

A: Mikroskopisches Bild vom menschlichen Lamellenknochen. Kollagenfasern sind lamellenförmig um zentrale Kanälchen (Havers-System) angeordnet (dunkle Flächen). B: Mikroskopischer Schnitt durch das Felsenbein einer ausgewachsenen Maus. Es sind keine Havers-Systeme vorhanden.

Auch die Dauer der Knochenheilung unterscheidet sich zwischen Maus und Mensch. So ist der Knochenheilungsprozess bei der Maus nach ca. vier Wochen abgeschlossen¹⁰. Beim Menschen hingegen sind die meisten Knochenbrüche in Abhängigkeit von Frakturform und lokalen Begleitverletzungen erst nach drei bis vier Monaten vollständig verheilt⁸.

1.3 Das Schädel-Hirn-Trauma

In der Europäischen Union werden pro Jahr ca. eine Millionen Menschen aufgrund eines Schädel-Hirn-Traumas (SHT) im Krankenhaus behandelt¹¹. Für Deutschland wird die Häufigkeit des schweren SHT mit 27.000 bis 40.000 Fällen pro Jahr angegeben^{12,13}. Die Häufigkeit aller Schweregrade wird auf 200–300 pro 100.000 Einwohner geschätzt¹⁴. Die meisten SHT entstehen durch direkte stumpfe Unfallmechanismen bei Verkehrs-, Freizeit- und Arbeitsunfällen¹⁴. Laut epidemiologischen Analysen erleiden mehr als zwei Drittel der polytraumatisierten Patienten ein SHT. Bei einem Drittel der polytraumatisierten Patienten liegt eine Kombination von SHT und Extremitätenverletzung vor^{15,16}. Mit steigendem Schweregrad der Schädel-Hirn-Verletzung steigt dabei auch die Letalität des Polytraumas¹².

Die Ausprägungen des SHT sind so vielfältig, wie die zugrunde liegenden Verletzungsmechanismen. Durch eine direkte Gewalteinwirkung auf den Schädel können fokale Verletzungen wie Rissquetschwunden, Frakturen, Kontusionen, epi- und subdurale Hämatome sowie intrazerebrale Blutungen entstehen^{12,14}. Davon abzugrenzen sind die diffusen axonalen Verletzungen, die Folge einer plötzlichen Akzeleration oder Dezeleration des Kopfes sind¹². Diese Verletzungen sind irreversibel und werden als primärer Gehirnschaden bezeichnet¹².

Unter den sekundären Gehirnschäden versteht man unter anderem Schäden, die durch Gehirnschwellung, erhöhten intrakraniellen Druck, Hypoxie und Ischämie verursacht werden¹⁷. Diese Schäden entstehen erst im späteren klinischen Verlauf und sind das Ziel therapeutischer Interventionen¹⁴.

1.4 Beschleunigte Frakturheilung bei SHT-Patienten

Unter den praktisch tätigen Ärztinnen und Ärzten besteht seit langer Zeit die aus dem klinischen unfallchirurgischen Alltag stammende Hypothese, dass Frakturen bei SHT-Patienten besser und schneller heilen können^{18,19}. Ursprung dieser Hypothese sind einzelne Fallberichte über SHT-Verletzte mit einer frühzeitigen und übermäßigen

Kallusbildung¹⁹⁻²¹. So gibt es z.B. Berichte über extreme Fälle, bei denen Frakturen frühzeitig in Fehlstellung verheilten, weil sie nicht unmittelbar nach dem Trauma reponiert wurden^{18,20,22}. Erstmals wurde die Frage nach einem Zusammenhang zwischen SHT und beschleunigter Frakturheilung in den 60er Jahren gestellt²³.

Seitdem wurde eine Vielzahl an klinischen und präklinischen Studien zu diesem Thema publiziert²⁴. Einige Autoren konnten in Assoziation mit einem SHT eine schnellere Frakturheilung nachweisen^{18,20,22,25-30}. Andere Autoren kamen zu gegenteiligen Ergebnissen³¹⁻³³.

Die Aussagekraft der bisherigen Studien ist durch fehlende Kontrollgruppen oder kleine Fallzahlen limitiert^{18,32-34}. Auch ist ein Vergleich zwischen den Studien schwierig. Unterschiedliche Frakturformen und Lokalisationen, unterschiedliche zur Beurteilung der Knochenheilung eingesetzte Methoden und verschiedenste therapeutische Interventionen stellen dabei die größten Probleme dar. Deshalb ist bis zum heutigen Tag nicht eindeutig geklärt, ob beim Menschen ein SHT tatsächlich zu einer schnelleren Frakturheilung führt¹⁹.

Im Laufe der Zeit wurde für einen möglichen Zusammenhang zwischen SHT und beschleunigter Frakturheilung eine Vielzahl von Erklärungsansätzen diskutiert¹⁹. So wird von einigen Autoren der Einfluss von zentralen Hormonen propagiert^{20,22}. Andere glauben an lokale im Zentralen-Nervensystem (ZNS) befindliche Faktoren, welche im Rahmen einer Verletzung des ZNS die Bluthirnschranke überwinden und über die Blutbahn zum Knochen gelangen^{35,36}. Garland und Mitarbeiter kamen aufgrund ihrer klinischen Studien zu dem Schluss, dass es sich bei der Knochenneubildung im Frakturbereich nicht um eine beschleunigte Heilung, sondern um eine Art heterotope Ossifikation (HO) handeln könnte³¹⁻³³. HO sind außerhalb des Knochens auftretende Verknöcherungen im Bereich von Muskulatur und Sehngewebe. Sie können nach Traumen, idiopathisch oder in Assoziation mit neurologischen Erkrankungen entstehen³⁷. Ob es sich bei dem neu gebildeten Knochen tatsächlich um eine Art von HO handelt, ist bislang nicht belegt^{18,25,38,39}.

Bevor die Frage eines zugrundeliegenden Pathomechanismus beantwortet werden kann, muss erstens dargestellt werden, ob das SHT wirklich zu einer veränderten Frakturheilung führt und zweitens, worin genau sich diese Veränderung manifestiert.

1.5 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

Die primäre Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass die Tiere mit Femurosteotomie und zusätzlichem SHT im Laufe der ersten vier posttraumatischen Wochen eine schnellere Knochenheilung entwickeln würden als die Tiere mit Femurosteotomie ohne zusätzliches SHT. Die Hypothese wurde computertomographisch und biomechanisch evaluiert.

Im Einzelnen sollten mit Hilfe von tierexperimentellen Versuchen an der Maus folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss hat das SHT auf das Kallusvolumen?
 - Bilden die Tiere mit Femurosteotomie und SHT mehr Kallus im Osteotomiebereich als die Tiere mit Femurosteotomie ohne SHT?
2. Welchen Einfluss hat das SHT auf die Kallusdichte?
 - Ist bei den Tieren mit Femurosteotomie und SHT der Kallus im Osteotomiebereich dichter als bei den Tieren mit Femurosteotomie ohne SHT?
3. Welchen Einfluss hat das SHT auf die biomechanischen Eigenschaften des Kallus?
 - Ist der Kallus bei den Tieren mit Femurosteotomie und SHT biomechanisch fester und/oder steifer als bei den Tieren mit Femurosteotomie ohne SHT?
4. Wann tritt ein eventueller Unterschied zwischen den Gruppen innerhalb der ersten vier postoperativen Wochen auf?

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Das Versuchstiorvorhaben wurde beim Landesamt für Gesundheit und Soziales (La.Ge.So.) beantragt und genehmigt (G0009/12). Die Versuchstiere wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Bei den Tieren handelte es sich um 12–15 Wochen alte weibliche C57/Black6/N-Wildtyp-Mäuse (Gewicht 20–25 g). Weibliche Mäuse haben den Vorteil, dass sie in Gruppen von 6–12 Tieren pro Käfig gehalten werden können, während ihre männlichen Artgenossen angesichts einer größeren Aggressivität oft in Einzelkäfigen untergebracht werden müssen.

2.1.1 Fütterung und Haltung

Die Tiere wurden in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin des Campus Virchow Klinikum der Charité (FEM) unter klimatisierten Bedingungen ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) in Gruppen von bis zu 10 Tieren in Macrolon-Typ 4-Käfigen gehalten. Um das Risiko einer Übertragung von pathogenen Keimen auf andere Tiere der Versuchseinrichtung zu minimieren und den Tieren Zeit zur Anpassung und Gewöhnung zu geben, wurden sie in der ersten Woche in einem gesonderten Raum in Quarantäne gehalten. Die Tiere erhielten Nagetierfutter (Ssniff Spezialdiät GmbH, Soest, Deutschland) und Leitungswasser *ad libitum*. Als Nistmaterial wurden Holzspäne verwendet. Zum Nestbau wurde den Tieren Zellstoff sowie zur Beschäftigung verschiedene Spielmaterialien (kleine Plastikhäuschen und Plastikröhren) angeboten. Um einen Tag-Nacht-Rhythmus zu erhalten, wurde das Raumlicht jeweils alle 12 Stunden (von 07:00 bis 19:00 Uhr) angepasst. Als Identifizierungsmerkmal wurden Löcher in die Ohrmuscheln der Tiere gestanzt.

2.1.2 Studiendesign

Für die Studie wurden die Tiere randomisiert in vier Gruppen unterteilt. Eine Kontroll-Gruppe, eine SHT-Gruppe, eine Fraktur-Gruppe und eine Gruppe mit kombiniertem Trauma (Kombinations-Gruppe) (Abbildung 2.1).

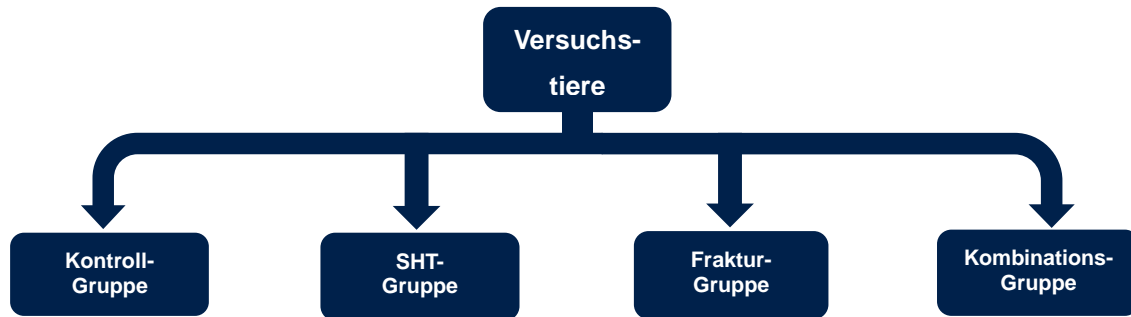


Abbildung 2.1: Gruppenaufteilung der Versuchstiere

Bei der Kontroll-Gruppe erfolgte keine Operation. In der SHT-Gruppe wurde den Tieren mit dem *Controlled Cortical Impact Injury*-Modell (CCII-Modell) ein SHT gesetzt. Bei den Tieren in der Fraktur-Gruppe wurde das linke Femur mit einem externen Fixateur versorgt und im Anschluss eine Osteotomie durchgeführt. Bei den Tieren in der Kombinations-Gruppe wurden beide Operationen durchgeführt (SHT und Femurosteotomie).

In den Gruppen mit Operation (SHT-Gruppe, Fraktur-Gruppe, Kombinations-Gruppe) wurde eine postoperative Gruppengröße von 30 Tieren angestrebt. Die Kontroll-Gruppe wurde mit 25 Tieren geplant. Aufgrund der unterschiedlichen Belastung der einzelnen Operationen wurden deshalb 39 Tiere in der Kombinations-Gruppe, 36 Tiere in der SHT-Gruppe und 33 Tiere in der Fraktur-Gruppe operiert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Gruppenübersicht der einzelnen Interventionen

Versuchs-Gruppe	Tierzahl vor Intervention	In die Auswertung eingegangene Tiere	MikroCT	Biomechanik
Kontroll-Gruppe	25	25	-	11
SHT-Gruppe	36	30	-	12
Fraktur-Gruppe	33	30	30	12
Kombinations-Gruppe	39	29	29	12

Für eine genaue Beobachtung der Knochenheilung wurde bei allen Tieren mit Femurosteotomie (Fraktur- und Kombinations-Gruppe) in wöchentlichen Abständen das Kallusvolumen und die Kallusdichte *in vivo* mittels Mikrocomputertomographie (MikroCT) untersucht (Abbildung 2.3).

Um Aussagen über den biomechanischen Verlauf der Knochenheilung zu gewinnen, wurden die linken Femora aller Versuchstiere an zwei unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten biomechanisch getestet (nach drei und nach vier Wochen). Anders als die CT-Analysen konnten die biomechanischen Torsionstestungen nur *ex vivo* durchgeführt werden. Deshalb wurden 60 % der Tiere nach drei Wochen und 40 % der Tiere nach vier Wochen in tiefer Narkose durch eine Herzpunktion euthanasiert und die linken Femora für die Torsionstestung entnommen (Abbildung 2.2).

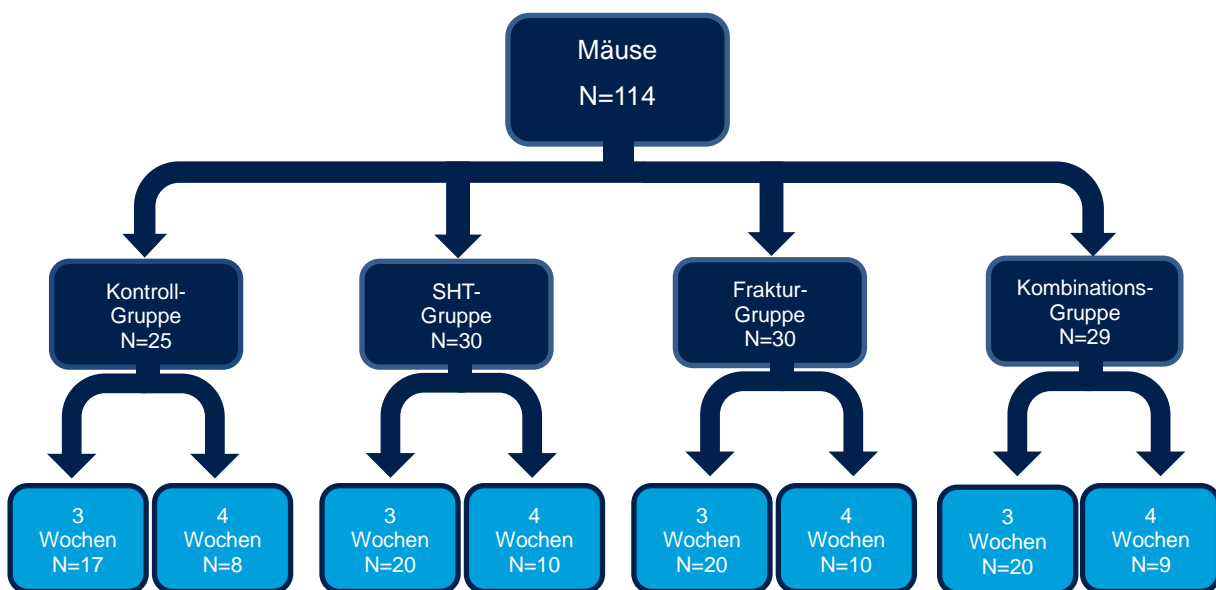


Abbildung 2.2 Gruppeneinteilung mit postoperativen Fallzahlen

Um den postoperativen Heilungsverlauf zu kontrollieren und evtl. gesundheitliche Probleme zu erkennen, wurde bei allen Tieren das Körpergewicht wöchentlich gemessen und dokumentiert.



Abbildung 2.3: Zeitlicher Verlauf von Interventionen in der Fraktur- und der Kombinations-Gruppe

Bei den Versuchstieren ohne Femurosteotomie (Kontroll- und SHT-Gruppe) erfolgten keine MikroCT-Untersuchungen. Auch diese Tiere wurden nach drei bzw. vier Wochen postoperativer Standzeit euthanasiert und die Femora biomechanisch untersucht (Abbildung 2.4).



Abbildung 2.4: Zeitlicher Verlauf von Interventionen in der Kontroll- und in der SHT-Gruppe

2.2 Operationsmethoden

2.2.1 Peri- und postoperatives Procedere

Alle Operationen fanden unter tiefer Narkose statt. Zur Narkoseeinleitung wurde ein Isofluran/O₂-Gemisch (2,5 % Isofluran in 0,5 l/min O₂) (FORENE[®], Abott GmbH, Wiesbaden) verwendet. Die Versuchstiere wurden dafür für zwei Minuten in einen gasdurchströmten Induktionsbehälter gesetzt, bis eine ausreichende Narkosetiefe erreicht wurde. Zur Aufrechterhaltung der Narkose bekamen die Tiere nach

Umlagerung ein Gasgemisch mit einem prozentualen Isoflurangehalt von 1,5 in 0,5 l/min O₂ über eine Maske, die während der Operation über Maul und Nase gehalten wurde. Die Versuchstiere atmeten zu jedem Zeitpunkt spontan. Die Narkosetiefe wurde während der gesamten Operation anhand des Reflexstatus überprüft. Dazu wurde ein Schmerzreiz auf die linke Hinterpfote ausgeübt und die Pfotenflexion beobachtet. Blieb eine Schmerzreaktion aus, wurde von einer ausreichenden Narkosetiefe ausgegangen. Das expirierte Atemgas wurde von einer Vakuumpumpe kontinuierlich abgesaugt.

Zur analgetischen Abdeckung während der Operation erfolgte direkt nach Narkoseeinleitung eine subkutane (s.c.) Injektion von 0,1 ml Bubrenorphin (TEMGESIC[®] 1 mg/kg KG, Reckitt Benckiser, Mannheim, Deutschland). Zudem wurde eine s.c. *single shot*-Injektion von 0,02 ml Clindamycin-2-Dihydrogenphosphat (SOBELIN[®] 300, Pfizer Pharma, Karlsruhe, Deutschland) zur antibiotischen Abdeckung verabreicht. Während der gesamten Narkosedauer wurde die Körpertemperatur der Tiere mit Hilfe einer heizbaren OP-Unterlage stabilisiert (36,7°C).

Während der ersten zwei postoperativen Stunden wurden die Tiere engmaschig beobachtet. Dabei wurde insbesondere auf Atmung (Tachypnoe, Bradypnoe), Schmerzzeichen (Gesichtsausdruck, gekrümmte Körperhaltung, Vermeiden von Bewegung) und die Belastung der operierten Extremität geachtet. Zur postoperativen Analgesie erhielten die Tiere für sieben Tage Tramadol über das Trinkwasser *ad libitum* (TRAMAL[®] Tropfen 25 mg/l 7 Tropfen/Trinkflasche, Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland).

2.2.2 Das *Controlled Cortical Impact Injury*-Modell

Das *Controlled Cortical Impact Injury*-Modell (CCII-Modell) (AmScien Instruments, Richmond, U.S.A.) wurde im *Biomedical Science Department* der *General Motors Research Laboratories* entwickelt und erstmals im *Bioengineering Department* des *Medical College of Virginia* für die Ratte gebaut⁴⁰. Dieses SHT-Modell wird aufgrund seiner relativen Nähe zum unfallbedingten Schädel-Hirn-Trauma und einer sehr guten Reproduzierbarkeit von vielen Arbeitsgruppen eingesetzt⁴⁰⁻⁴².

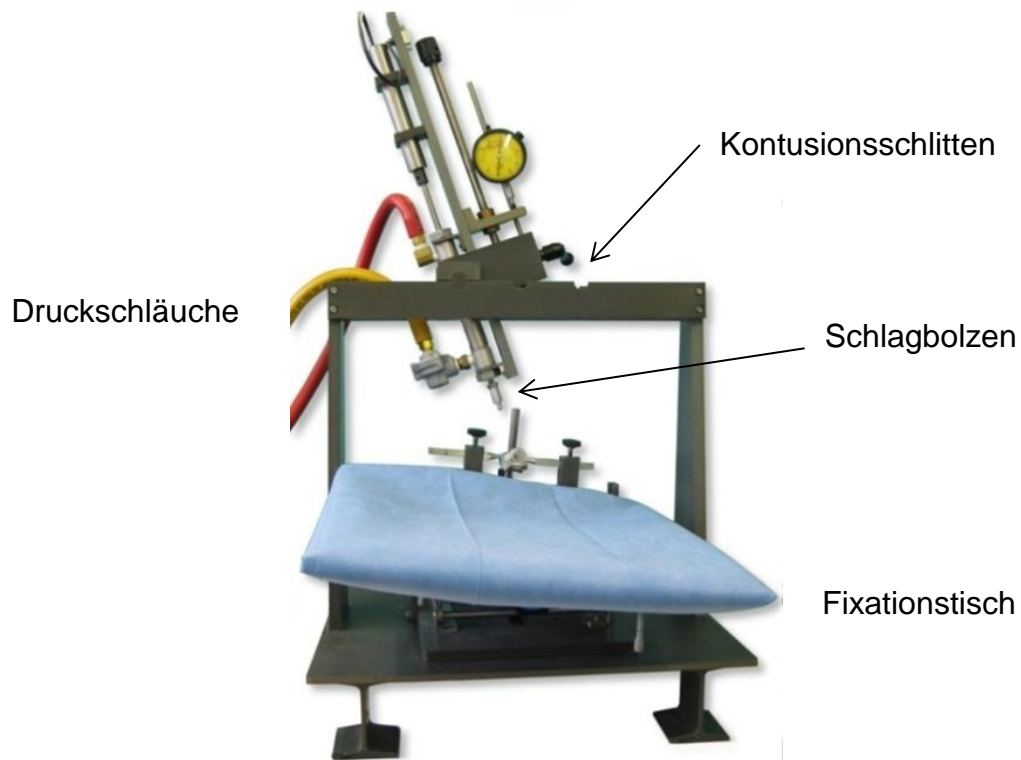


Abbildung 2.5: Kontusionseinheit des *Controlled Cortical Impact Injury-Modells (Model AMS 201)*

Dargestellt ist der Kontusionsschlitten mit Fixationstisch und den zuführenden Druckschläuchen. (Die pneumatische Kontrollstation ist nicht mit abgebildet.)

Die Apparatur besteht aus einem Fixationstisch, einem Kontusionsschlitten und einer pneumatischen Kontrollstation mit Stickstoffzuleitung. Der Kontusionsschlitten besteht aus einem Druckzylinder, einer Kontusionsstange und einem Schlagbolzen. Der Schlagbolzen ist mit einem Gewinde an der 19,75 mm langen Kontusionsstange montiert, sodass die Eindringtiefe des Schlagbolzens manuell eingestellt werden kann. Eine Umdrehung entspricht einer Höhenverstellung um 1 mm. Zur Fixierung der Eindringtiefe dient eine gegenläufige Mutter. Der Schlagbolzen besitzt eine konvexe Oberfläche und trifft zum Zeitpunkt des Traumas in einem Winkel von 45° auf die freigelegte Dura mater des Versuchstiers. Zur Fixierung der Maus dient ein unter dem Kontusionsschlitten angebrachter Fixationstisch. Der Fixationstisch ist höhenverstellbar und im Raum frei beweglich. Die Maus wird für das Trauma stereotaktisch durch zwei Metallstifte fixiert. Die konisch zulaufenden Metallstifte werden dabei im äußeren Gehörgang der Maus positioniert. Die Kontusionsstange wird durch einen Druckzylinder bewegt. Dieser ist in zwei Druckkammern aufgeteilt, welche über zuführende Schläuche mit der pneumatischen Kontrollstation verbunden

sind. Über ein Hochdrucksystem wird die schnelle Abwärtsbewegung des Schlagbolzens gesteuert. Ein Niederdrucksystem führt den Bolzen zurück zur Ausgangsposition. Über einen dritten Schlauch bezieht das System als Druckmedium hochgereinigten Stickstoff (Linde Stickstoff 5.0, Linde AG, Pullach, Deutschland).

2.2.2.1 Präparation für das SHT

2.2.2.1.1 Material

- sterile Einmalhandschuhe
- sterile Tupfer, 20 x 20 cm
- steriles OP-Tuch
- Heizkissen (AEG HK 5510, Electrolux Hausgeräte Vertriebs GmbH, Nürnberg, Deutschland)
- neurochirurgisches Mikroskop (Carl Zeiss Meditec AG, Oberkochen, Deutschland)
- steriles OP-Besteck mit:
 - Einmalskalpell (No. 10, Feather Safety Razor Co. Ltd, Osaka, Japan)
 - Präparierschere (Aeskulap AG, Tuttlingen, Deutschland)
 - chirurgische Schere (Aeskulap AG, Tuttlingen, Deutschland)
 - 3 x gebogene Moskitoklemme (Aeskulap AG, Tuttlingen, Deutschland)
 - Nadelhalter (Aeskulap AG, Tuttlingen, Deutschland)
 - chirurgische Pinzette (Aeskulap AG, Tuttlingen, Deutschland)
 - Tasthäkchen (Aeskulap AG, Tuttlingen, Deutschland)
- Elektrokauter (Erbotom Bipolar, Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen, Deutschland)
- Dentalbohrer (Micromot 40/E, Proxxon Werkzeug GmbH, Niersbach, Deutschland)
- Zwei-Komponenten-Zement (Zinkphosphat Cement[®] normalhärtend, Hoffmann Dental Manufaktur GmbH, Berlin, Deutschland)
- Povidon-Iod, 7,5-%-Lösung (BRAUNOL[®], B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

- Nahtmaterial (Ethicon Prolene® 6-0, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland)

Um das SHT setzen zu können, mussten die Versuchstiere zuerst präpariert werden. Dazu wurde der Kopf der Tiere stereotaktisch mit zwei Metallstiften fixiert. Die gesamte Präparation erfolgte mikrochirurgisch mit Hilfe eines neurochirurgischen Mikroskops (Carl Zeiss Meditec AG, Oberkochen, Deutschland). In tiefer Narkose wurde die Kopfhaut mit Bupivacain (Bupivacain-RPR-Actavis®, 0,5%ige Lösung, 1 ml/kg KG, Actavis GmbH & Co. KG, München, Deutschland) subkutan infiltriert. Anschließend wurde das Fell im Kopfbereich mit einer Schere vorsichtig entfernt. Der Hautschnitt erfolgte mit einem 10er-Skalpell. Hierbei wurde in der Medianlinie in Höhe der Augen bis zum Ohransatz eine 2 cm lange Inzision gesetzt. Danach folgte ein Entlastungsschnitt von 0,5 cm in transversaler Richtung nach links temporal. Zur besseren Übersicht wurden die Wundränder mit drei gebogenen Klemmchen evertiert. Zur weiteren Darstellung wurde der nun freiliegende Musculus temporalis mit einem Elektrokauter (Erbotom Bipolar, Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen, Deutschland) am proximalen Ansatz abgelöst und nach distal geklappt. Auf dem jetzt freipräparierten linken tempoparietalen Kortex wurde daraufhin eine Kraniektomie innerhalb der anatomischen Begrenzungen durch Jochbogen, Scheitel-, Lambda- und Koronarnaht durchgeführt. Für die Kraniektomie wurde mit einem Dentalbohrer (Micromot 40/E, Proxxon Werkzeug GmbH, Niersbach, Deutschland) ein ca. 6 x 6 mm großes Knochenfenster gefräst. Der dabei entstandene Knochenlappen wurde mit einem Tasthäkchen vorsichtig entfernt, ohne dabei die Dura mater zu verletzen.

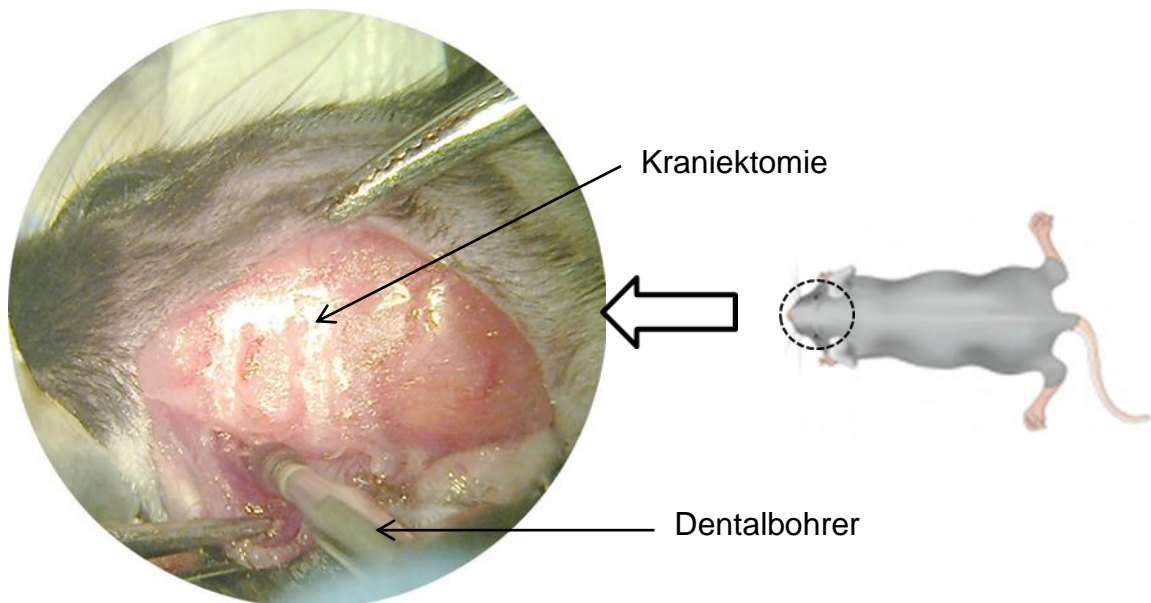


Abbildung 2.6: Intraoperative Sicht durchs Mikroskop

Mit dem Dentalbohrer wurde ein Knochenfenster gefräst. Rechts im Bild ist die Position der Maus während der Operation dargestellt.

2.2.2.2 Durchführung des Schädel-Hirn-Traumas

Das fertig präparierte Versuchstier wurde anschließend auf dem Fixationstisch des CCII eingespannt. Nach der exakten Ausrichtung des Tieres unmittelbar unter dem Schlagbolzen wurde das Trauma mit einer Penetrationstiefe von 0,25 mm, einer Anprallgeschwindigkeit von 3,5 m/s und einer Kontaktdauer von 150 ms durchgeführt. Um einen Dekompressionseffekt zu vermeiden, wurde anschließend der zuvor entnommene Knochenlappen unter mikroskopischer Sicht zurückgelegt und im Sinne einer Kranioplastik mit einem Zwei-Komponenten-Zement (Zinkphosphat Cement® normalhärtend, Hoffmann Dental Manufaktur GmbH, Berlin, Deutschland) befestigt. Der Hautverschluss erfolgte ebenfalls unter mikroskopischer Sicht mit Einzelknopfnähten (Ethicon Prolene® 6-0, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland).

2.2.3 Das Femurosteotomie-Modell

Für die Simulation einer Fraktur wurde das *MouseExFix*-System (RISystem AG, Davos, Schweiz) verwendet. Es handelt sich hierbei um ein externes Fixateur-System mit vier Fixateurpins.

2.2.3.1 Material

- Implantate
 - 1 x MouseExFix simple 100 % (RIS.611.200)
 - 4 x MouseExFix-Pins 0,45 mm (RIS.411.100)

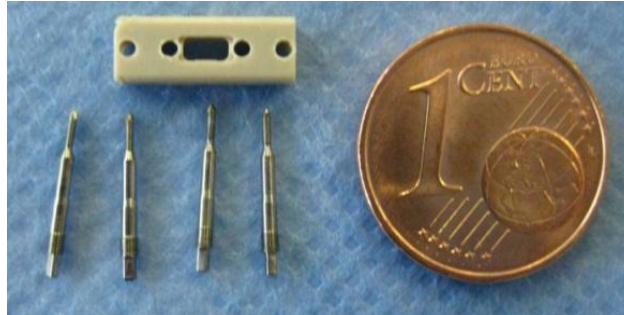


Abbildung 2.7: Fixateur mit Pins

- implantatsspezifische Instrumente
 - 3 x Handbohrer (RIS.390.130)
 - 1 x Bohreraufsatz 1 mm
 - 1 x Bohreraufsatz 0,45 mm (RIS.590.201)
 - 1 x Square box-Schraubenschlüssel 0,70 mm (RIS.590.112)
 - 1 x Gigli wire-Säge 0,70 mm

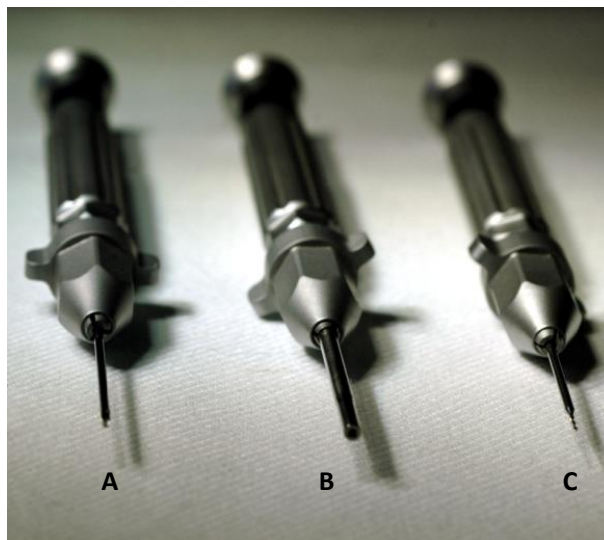


Abbildung 2.8: Implantatspezifische Instrumente

A: Handbohrer mit 1-mm-Bohreraufsatz. B: Handbohrer mit Schraubenschlüsselaufsatz. C: Handbohrer mit 0,45-mm-Bohreraufsatz.

- sonstiges Material
 - sterile Einmalhandschuhe
 - sterile Tupfer, 20 x 20 cm
 - steriles OP-Tuch
 - 2 x Pinzette
 - Einmalskalpell No. 10 (Feather Safety Razor Co. Ltd, Osaka, Japan)
 - Nahtmaterial (Ethicon Prolene 5-0, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland)
 - Povidon-Iod, 7,5%-Lösung (Braunol[®], B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
 - Enthaarungscreme (Veet[®] Creme, Reckitt Benckiser, Mannheim, Deutschland)
 - Wattestäbchen (Holzvariante)

2.2.3.2 Operationstechnik

Haare im Operationsgebiet wurden entfernt und die freiliegende Haut anschließend mit BRAUNOL[®] (Povidon-Iod, 7,5%-Lösung, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Mit einem 11er-Skalpell erfolgte eine longitudinale Hautinzision entlang des Femurs vom Knie bis zum Ansatz des Hüftgelenks. Danach wurde die nun freiliegende Fascia lata mit einer Schere durchtrennt. Unter Schonung des Nervus ischiadicus wurden der Musculus vastus lateralis, der Musculus biceps femoris und der Musculus tensor fasciae latae stumpf bis auf den Knochen präpariert. Das Femur wurde dann fast in seiner kompletten Länge vorsichtig zirkulär frei präpariert. Mit einem 1-mm-Bohrer wurde unmittelbar proximal der Kniegelenkscapsel eine Vertiefung für den ersten Bohrkanal geschaffen. Mit einem 0,45-mm-Bohrer wurde daraufhin an dieser Stelle der erste Bohrkanal senkrecht zur Längsachse des Femurs gesetzt. Im Anschluss wurde der distalste Pin in den Fixateur eingesetzt und der Fixateur mit Pin in den angelegten Bohrkanal eingeschraubt (Abbildung 2.9).

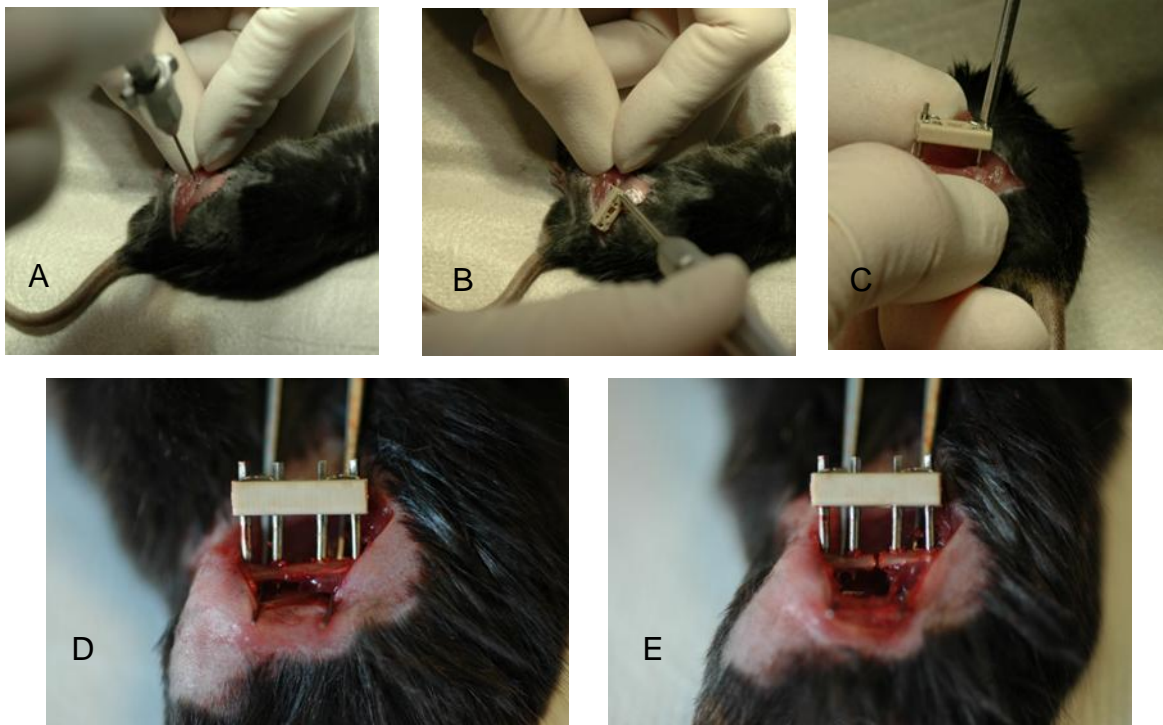


Abbildung 2.9: Übersicht der einzelnen Operationsschritte

A: Der BohrkanaI für den ersten Pin wird vorgebohrt. B: Der erste Pin wird mit Fixateur in den BohrkanaI geschraubt. C: Der zweite Pin wird eingesetzt. D: Intaktes Femur mit vollständig eingesetztem Fixateur. E: Femur mit Fixateur nach Osteotomie mit der *Gigli wire*-Säge (Säge nicht abgebildet).

Mit dem ersten Pin wurde dabei die exakte Ausrichtung des Fixateurs zum Femur festgelegt. Für die verbleibenden Pins wurde direkt mit dem 0,45-mm-Bohrer über dem bereits sitzenden Fixateur der BohrkanaI geschaffen. Nach dem regelrechten Einsetzen aller vier Pins wurde der Knochen mit einem 0,7 mm starken Sägedraht (*Gigli wire*, RISystem AG, Davos, Schweiz) von Hand osteotomiert. Dafür wurde die Säge unter dem Knochen exakt mittig der beiden medialen Pins durchgeführt und langsam mit konstanter Geschwindigkeit tangential auf und ab bewegt. Ein Assistent stabilisierte dabei mit beiden Händen das Femur mit eingebrachtem Fixateur. Der Wundverschluss erfolgte mit Einzelknopfnähten bzw. mit U-Nähten zwischen den Pins (Ethicon Prolene 5-0, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland). Um potentiellen Wundheilungsstörungen vorzubeugen, wurde die Hautnaht abschließend mit Bepanthen[®]-Salbe (Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) bedeckt.

2.3 MikroCT-Untersuchung

Alle Mäuse mit Femurosteotomie wurden zur morphologisch quantitativen Bestimmung des neu gebildeten Kallus im MikroCT untersucht. Hoch auflösende MikroCT-Untersuchungen haben in den letzten Jahren in der Knochenforschung stark an Bedeutung gewonnen (Kapitel 4, Methodendiskussion).⁴³ In dieser Arbeit wurde ein *Cone-beam in vivo*-MikroCT-Scanner der Firma Scanco Medical (Scanco vivaCT 40, Scanco Medical AG, Brüttisellen, Schweiz) verwendet.

2.3.1 Spezifikationen

Tabelle 2: Spezifikationen des SCANCO vivaCT 40

Übernommen von <http://www.scanco.ch/en/systems-solutions/preclinical/vivact40.html> (02. Juni 2013).
Abkürzungen: kVp=Kilovolt *Peak*, keV=Kiloelektronenvolt, MTF=Modulations-Transfer-Funktion.

Type	<i>Cone-beam in vivo microCT Fully shielded</i>
X-ray source	<i>Sealed Air-cooled 30–70 kVp / 20–50 keV (160 µA)</i>
Resolution	<i>< 14 µm (10% MTF) 5–76 µm nominal isotropic (pixel size) Image matrix: 512 x 512 to 4096 x 4096 pixel</i>

Die angefertigten Projektionen wurden zunächst unter Angabe der Scan-Nummer, des Scan-Datums und des Benutzernamens auf einer Festplatte des angeschlossenen Computers gespeichert. Die weitere Verarbeitung der Daten erfolgte mit der Scanco IPL v5.15-Software.

Um detaillierte Informationen über den zeitlichen Verlauf der Frakturheilung zu erlangen, war es notwendig, die Versuchstiere *in vivo* zu untersuchen. Dazu wurden die Tiere mit einem intraperitoneal (i.p.) verabreichten DORMITOR[®]-KETAMIN[®]-Gemisch narkotisiert (0,3 ml/kg Medetomidin, Orion Pharma, Bad Homburg, Deutschland + 0,6 ml/kg KETAMIN[®] 10 %, Actavis GmbH & Co. KG, München, Deutschland). In tiefer Narkose wurde die Maus bei erhaltener Spontanatmung in einen speziell angefertigten Probenhalter gelegt. Der operierte linke Oberschenkel wurde dabei in exakt longitudinaler Richtung im Probenhalter ausgerichtet. Dabei war

darauf zu achten, dass auch die horizontale und sagittale Ebene exakt senkrecht zur Achse des Probenhalters verliefen. Die konkrete Achse des Femurs konnte dabei durch die Ausrichtung des Fixateurs genau beobachtet werden. Durch die präzise Positionierung des Femurs konnten Artefakte verhindert werden, welche andernfalls durch Fixateurpins im Strahlengang entstanden wären. Nach korrekter Lagerung der Maus wurde das Tier mit zwei Pflasterstreifen fixiert, um Bewegungsartefakte zu reduzieren. Ein Pflasterstreifen wurde über den Fixateur geklebt, der andere über den seitlichen Thorax der Maus. Dabei war darauf zu achten, dass die Spontanatmung durch einen zu straff angelegten Pflasterstreifen nicht beeinträchtigt wurde.

Vor jeder Messung musste eine Präkalibration für den Schwarzabgleich von fünf Minuten ohne Probe durchgeführt werden. Nach erfolgter Kalibration konnte der Probenhalter mit Versuchstier in den Röntgenkanal eingebracht werden. Zunächst wurde ein konventionelles Röntgenbild entsprechend einer Übersichtsaufnahme (*Scout View*, Abbildung 2.10) aufgenommen, um noch einmal die korrekte Ausrichtung des Frakturspalts zu verifizieren und den Messbereich für die Datenermittlung optimal zu erfassen.

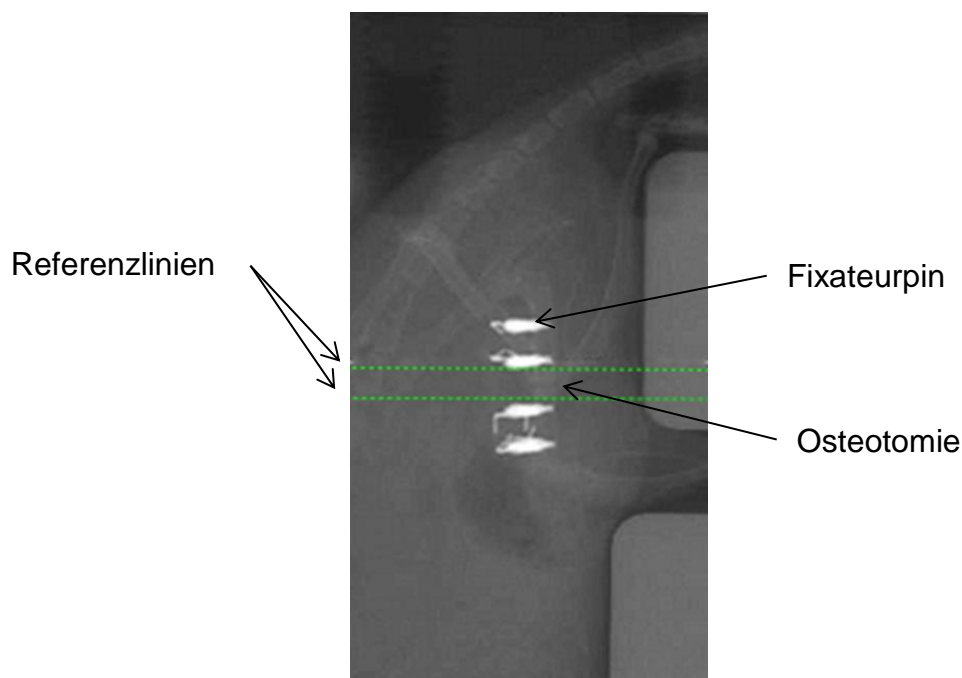


Abbildung 2.10: Röntgenübersichtsaufnahme (*Scout View*)

Der Messbereich wird durch die grün gepunkteten Linien festgelegt. Die strahlendichten Fixateurpins werden auf der Röntgenaufnahme mit abgebildet.

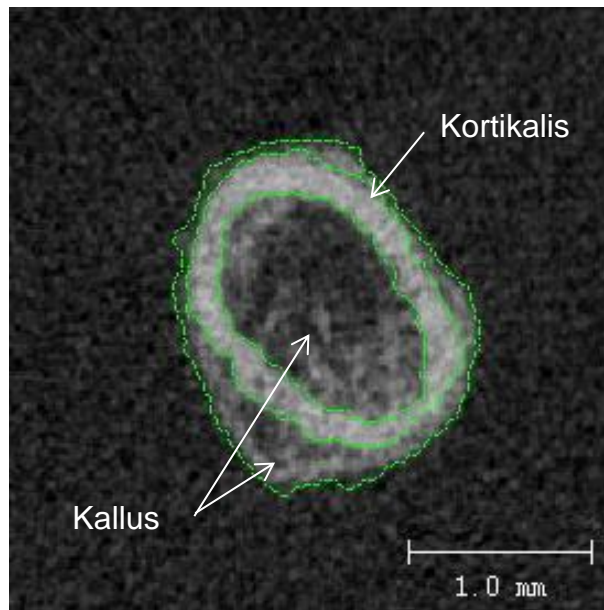
Der Messbereich wurde anhand zweier Referenzlinien in der Übersichtsaufnahme eingezeichnet. Die Lage des Messbereichs ist dabei so gewählt worden, dass sich der Frakturspalt genau mittig zwischen beiden Referenzlinien befand. Für den Messbereich wurde eine Breite von 3,18 mm definiert. Dies entsprach 212 Schnittbildern mit einer Dicke von 15 μm pro Schnittbild.

2.3.2 Messparameter

Die Messung des Osteotomiespalt wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

Röntgenspannung:	55 kV
Stromstärke:	145 μA
Anzahl der Ansichten:	Projektion 180°
Integrationszeit:	381 ms
Effektive Voxelgröße:	isotrop, 15 μm
Anzahl der Schnittbilder:	212
Auflösung:	1024 x 1024 Pixel

Bei einer Messdauer von 4,5 Sekunden pro Schicht dauerte die CT-Untersuchung eines Versuchstiers 15,9 Minuten. Mittels zweidimensionaler Bildrekonstruktion wurden einzelne Schnittbilder des gescannten Bereiches berechnet (Abbildung 2.11). Die 212 gescannten Schnittbilder beinhalteten den Osteotomiespalt mit den jeweils angrenzenden Fixateurpins. Um nur den neu gebildeten Kallus im Osteotomiespalt zu erfassen und nicht den neu gebildeten Knochen im Bereich der Bohrkanäle, wurde eine *Region of Interest* (ROI) von 1,05 mm Breite (70 Schnittbilder) festgelegt.



Um genau die gleiche ROI bei jedem Versuchstier erfassen zu können, wurden spezielle Landmarken definiert: Das Schnittbild, auf dem die Kortikalis die erste Kontinuitätsunterbrechung aufweist, und das Schnittbild, auf dem die Kortikalis wieder vollständig geschlossen war, wurden bei jedem Tier aufgesucht und notiert. Daraufhin wurde das Schnittbild, welches sich genau zwischen diesen beiden Punkten befand, als Osteotomiemittelpunkt definiert. Lag dieser Mittelpunkt genau zwischen zwei Schnittbildern, wurde aufgerundet und das weiter distal liegende Schnittbild ausgewählt. Von diesem definierten Mittelpunkt aus wurden dann die 35 proximal liegenden und 35 distal liegenden Schnittbilder ausgewertet.

Um bei der Evaluierung des Knochens ausschließlich den Kallus zu erfassen, war es notwendig, in jedem dieser 70 Schnittbilder den Kallus sowie die Kortikalis einzuzeichnen. Dazu wurde zunächst auf jedem der 70 Transversalschnitte der Knochen komplett umrandet. Im Anschluss wurde auf jedem Bild die innere und äußere Grenze der Kortikalis eingezeichnet. Dies war nötig, weil auch der Kallus im Markraum mit in die Auswertung einfließen sollte. Bei der Konturierung des Knochens konnten Konturierungsalgorithmen des MikroCT-Programms genutzt

werden. Dies erleichterte das Einzeichnen der ROIs erheblich. Allerdings musste jede durch das Programm entstandene ROI zusätzlich sorgfältig kontrolliert werden. Zuletzt wurden die beiden Konturen fusioniert und als Datei gespeichert.

Um die einzelnen Messungen miteinander vergleichen zu können, musste ein fixer *Threshold*-Bereich bestimmt werden. Werte in diesem *Threshold*-Bereich werden üblicherweise als Knochen interpretiert. Liegen die Werte außerhalb dieses Messbereichs, werden sie als Hintergrund ausgewertet. Zur Bestimmung des *Thresholds* wurde für jede dritte Messung manuell ein passender *Threshold* ausgewählt. Von den ermittelten *Threshold*-Werten wurde dann ein Durchschnitt berechnet und auf alle Messungen angewendet. In unserem Fall ergab sich für den unteren *Threshold* ein Wert von 2195 HU ($374,6 \text{ HA/cm}^3$) und für den oberen *Threshold* ein Wert von 6345 HU ($1117,0 \text{ HA/cm}^3$).

Anhand dieser Werte konnten 3D-Rekonstruktionen des Kallus angefertigt werden. Diese Rekonstruktionen wurden zwar nicht für die weitere Berechnung verwendet, waren aber für eine optische Begutachtung und ein besseres räumliches Verständnis hilfreich.

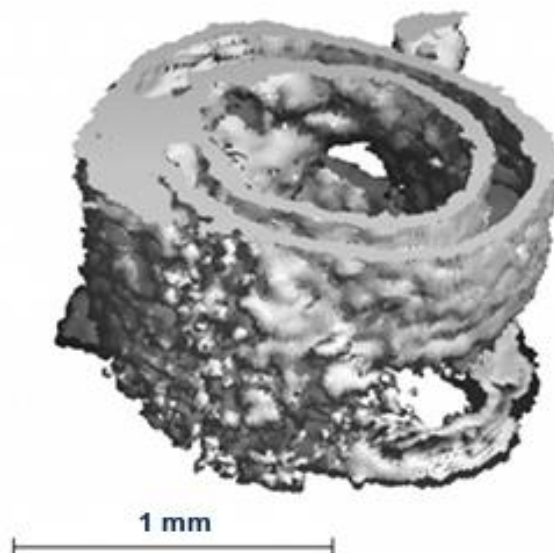


Abbildung 2.12: 3D-Darstellung des Frakturkallus

Abgebildet ist der Kallus einer Maus aus der Fraktur-Gruppe zwei Wochen nach Operation. Der Osteotomiespalt ist im rechten Teil des Bildes noch erkennbar. In der linken Hälfte des Bildes ist der Osteotomiespalt von Kallus überbrückt.

Nach der CT-Untersuchung wurden die Tiere wieder aus dem Probenhalter befreit. Durch 0,02 ml intraperitoneal appliziertes ANTISEDAN[®] (Orion Pharma, Bad Homburg, Deutschland) wurde die Wirkung des Medetomidins antagonisiert und die Narkose hiermit beendet.

Die Temperatur im Untersuchungsraum des MikroCT wurde für optimale Testbedingungen herunter reguliert. Um einen stärkeren Abfall der Körpertemperatur während des Aufenthaltes zu vermeiden, wurden die Versuchstiere vor und nach der Untersuchung mit einer Heizlampe gewärmt.

2.3.3 Qualitative MikroCT-Untersuchung

Anhand eines adaptierten Protokolls wurde eine qualitative MikroCT-Evaluation durchgeführt.⁴⁴ Die 3 und 4 Wochen postoperativ angefertigten CT-Bilder wurden mit Hilfe der Scanco IPLv5.15-Software ausgewertet. Hierfür wurden die Schnittbilder in zwei zueinander senkrechten Ebenen (sagittal und koronar) gemustert und nach folgendem *Scoring* beurteilt⁴⁴ :

- A: komplette Überbrückung (vier Kortizes überbrückt durch Kallus)
- B: inkomplette Überbrückung (ein bis drei Kortizes überbrückt durch Kallus)
- C: keine Überbrückung (Präsenz von Kallus aber keine Überbrückung der Kortizes durch Kallus)
- D: verzögerte Heilung (abgerundete Kortizes und fast kein Kallus im Frakturspalt vorhanden)

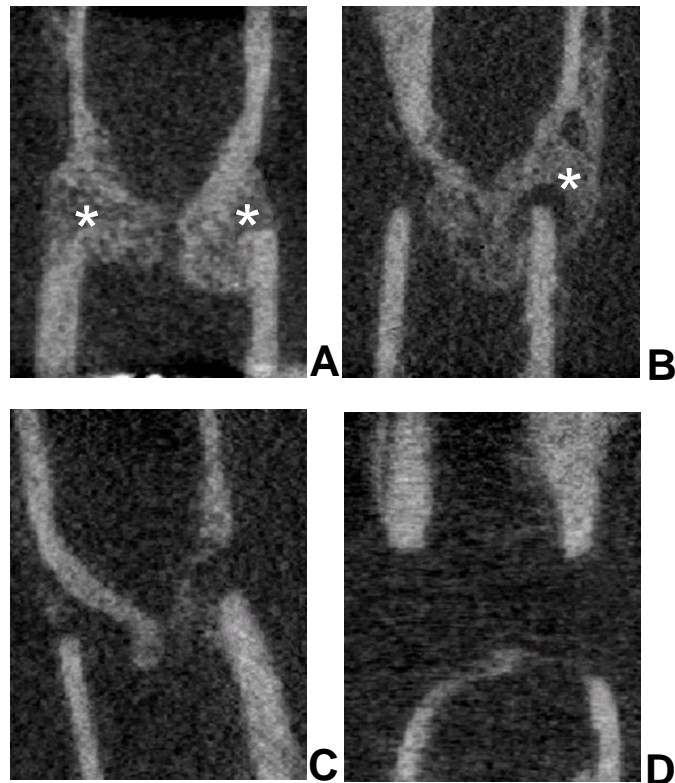


Abbildung 2.13: Beispielbilder der qualitativen MikroCT-Auswertung

Zu sehen sind exemplarische Aufnahmen aus der XZ-Ebene vier Wochen nach Operation. A-, B-, C-, D-Score: A: komplette Überbrückung. B: inkomplette Überbrückung. C: keine Überbrückung. D: verzögerte Heilung. Weiße Sternchen zeigen die Kallusüberbrückungen.

Das *Scoring* wurde von zwei unabhängigen Untersuchern durchgeführt. Im Falle eines unterschiedlichen *Scorings* traf ein dritter unabhängiger Beobachter die Entscheidung.

2.4 Tötung und Präparation

2.4.1 Tötung

Die Tötung der Versuchstiere erfolgte durch Entbluten. Dazu wurden die Versuchstiere durch ein i.p. appliziertes DORMITOR[®]/KETAMIN[®]-Gemisch narkotisiert (0,3 ml/kg Medetomidin + 0,6 ml/kg Ketamin 10 %). Die Entblutung erfolgte über eine intrakardiale Punktion in Rückenlage mit einer 17er-Kanüle. Durch digitales Ertasten des maximalen Herzspitzenstoßes konnte die optimale

Punktionsstelle (etwa 5. Interkostalraum, vordere Axillarlinie) aufgesucht werden. In einem Winkel von ca. 70 Grad zur Sagittalebene wurde die Haut durchstoßen und die Kanüle langsam weiter vorgeschoben bis die Pulsation des Herzens zu spüren war und Blut aus der Kanüle austrat. In dieser Position wurde das Blut mit einer 1-ml-Spritze abpunktiert. Dabei war es wichtig, die Blutentnahme langsam durchzuführen; ein zu hoher negativer Druck hätte zum Herzkollaps geführt, welcher eine weitere Abnahme unmöglich gemacht hätte. War es durch dieses Vorgehen nicht möglich, eine konsequente Entblutung zu erreichen, wurde der Brustkorb eröffnet und das Herz unter Sicht punktiert. Das bei der Tötung entnommene Blut (ca. 0,8 ml) wurde für biochemische Untersuchungen in anderen Studien verwendet.

2.4.2 Präparation

Unmittelbar nach der Tötung des Versuchstiers wurde das linke Femur freipräpariert und in Knie- und Hüftgelenk exartikuliert. Dabei wurde mit Schere, Pinzette und Skalpell präpariert. Bänder und Sehnen wurden durchtrennt und die Weichteile vom Knochen abgelöst. Bei den Tieren mit Osteotomie wurde ein schmaler Muskelmantel in Diaphysenmitte belassen, um ein versehentliches Beschädigen des Kallus auszuschließen. Dieser Muskelmantel hatte den weiteren Vorteil, dass ein Austrocknen des Knochens während der Einbettung verhindert wurde. Am proximalen und distalen Ende des Femurs wurde der Knochen auch vom Periost befreit, um eine optimale Einbettung zu gewährleisten.

Bei den Versuchstieren mit Femurosteotomie wurde anschließend der Fixateur mit Pins durch einen Schraubenschlüssel entfernt. Um nur minimale Belastung auf den Osteotomiespalt auszuüben, wurde das Femur mit Daumen und Zeigefinger fixiert und die Pins unter vorsichtigen Drehbewegungen aus ihrer Verankerung gelöst. Die fertig präparierten Femora wurden dann zusätzlich mit einer Mullkomresse umhüllt und mit 0,9%iger Kochsalzlösung angefeuchtet, um einem Austrocknen und damit einer Veränderung der biomechanischen Eigenschaften des Knochens entgegenzuwirken.

2.5 Biomechanische Testung

Für die biomechanische Testung wurden insgesamt 47 Tiere herangezogen. Es wurden 12 Tiere aus der Fraktur-Gruppe, 12 Tiere aus der SHT-Gruppe, 12 Tiere aus der Kombinations-Gruppe und 11 Tiere aus der Kontroll-Gruppe getestet. Die Testungen wurden in allen Gruppen nach 3 und 4 Wochen durchgeführt (Abbildung 2.14).

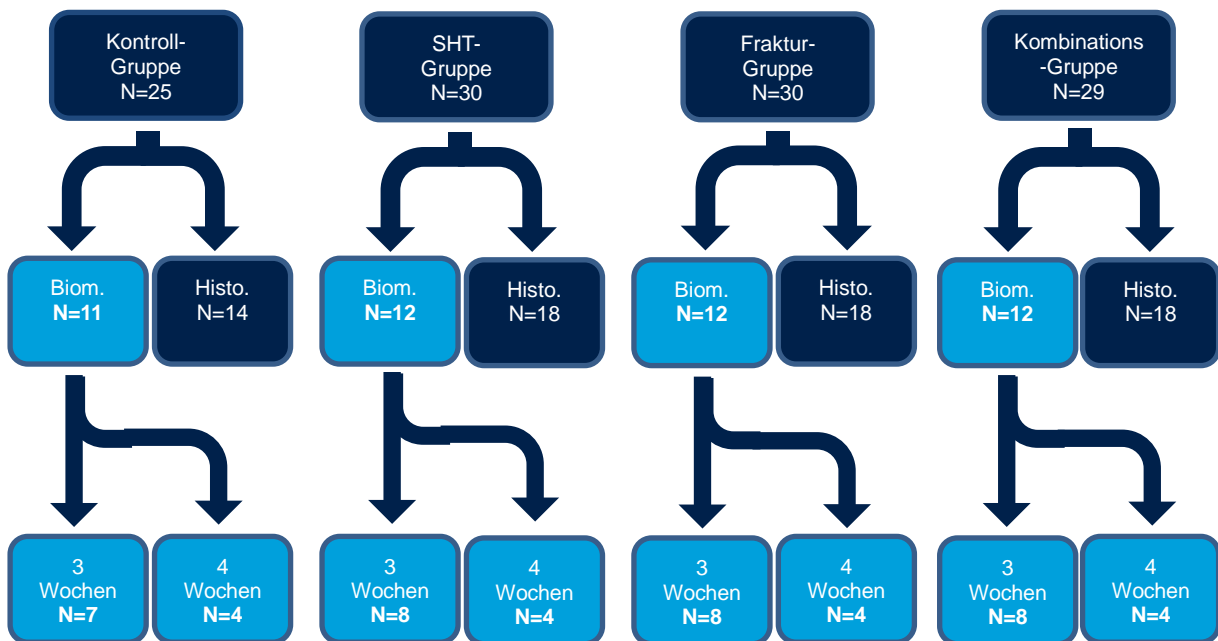


Abbildung 2.14: Gruppenübersicht der biomechanischen Testung

Die Tiere, welche biomechanisch getestet wurden, sind mit hellblauem Hintergrund dargestellt. Biom.=Biomechanische Testung, Histo.=Histologie.

2.5.1 Das Torsions-Prüfgerät

Zur biomechanischen Untersuchung der Femora wurde ein Torsionstest mit dem ElectroForce[®] TestBench-System der Firma Bose[®] (Bose[®] GmbH ElectroForce Systems Group, Friedrichsdorf, Deutschland) durchgeführt. Bei der ElectroForce[®] TestBench handelt es sich um ein modulares Materialprüfsystem im unteren Kraftbereich bis 200 N. Sie besteht aus einer schwingungsentkoppelten Grundplatte, auf welcher der Torsionsantrieb montiert ist, einem Linearantrieb, einem Kraftsensor und einer Probenhaltevorrichtung. Die vertikale Ausrichtung der Antriebe ermöglicht eine schwerkraftunabhängige Testung des Knochens. Gesteuert werden die Antriebe

über eine Kontrollstation durch die WinTest[®]-Software (WinTest[®] 7 Controls, Bose[®] Corporation – ElectroForce[®] System Group, Minnesota, U.S.A).

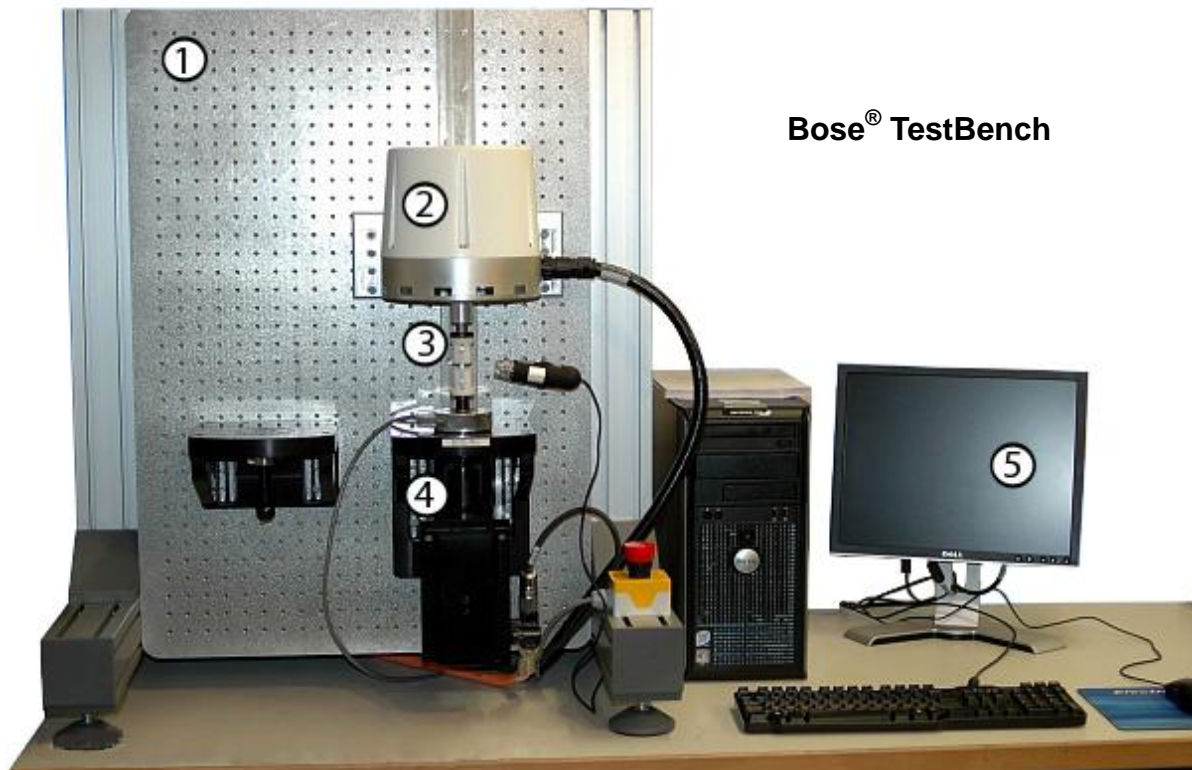


Abbildung 2.15: Material Prüfgerät.

1: TestBench. 2: Axialer Antrieb. 3: Probenhalter. 4: Torsionsantrieb. 5: WinTest[®]-Kontrollstation.

2.5.2 Einbettung der Probe

Material

- Technovit[®] 3040-Pulver (Technovit[®] 3040, kaltpolymerisierender Kunststoff, gelb, Heraeus-Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland)
- Technovit[®]-Universal-Flüssigkeit (Methylmethacrylat, N,N-dimethyl-p-toluidin, Heraeus-Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland)
- Rührstab
- PVC-Becher, 2 Stück
- Spritze zum Abmessen der Technovit[®]-Flüssigkeit, Größe 5 ml
- Spritze zum Einfüllen der Einbettmasse, Größe 5 ml
- Einbettformen paarweise, Eigenbau

- Verbindungssteg 30 mm + 2 Schrauben, Eigenbau
- Wattestab (Holzvariante)
- Teflon-Paste (PTFE-Paste, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Kochsalzlösung
- Mullverband (schmaler Streifen)
- Einbetthilfe, Eigenbau
- Montagehilfe, Eigenbau
- Inbusschlüssel für Auswurfschraube, Größe 2 mm
- Inbusschlüssel für Montage des Verbindungssteges, Größe 2,5 mm

Im ersten Schritt wurde die Einbettform von innen mit einer Teflon-Paste dünn beschichtet, damit das Einbettmedium nach der Testung wieder ohne Rückstände entfernt werden konnte. Daraufhin wurde die Einbettform in der Einbetthilfe positioniert und das Femur mit dem proximalen Ende nach oben am Femurkopf mit der Zange gefasst und mittig sowie lotrecht ausgerichtet.

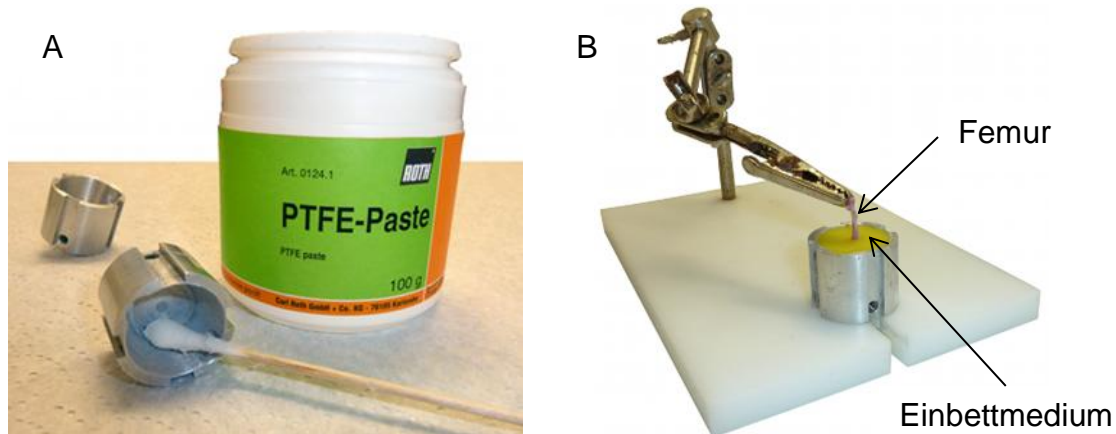


Abbildung 2.16: Einbettung der Probe

A: Die Einbettform wird mit Teflon-Paste von innen beschichtet. B: Eingebettetes Femur mit Einbetthilfe.

Anschließend wurde unter ständigem Rühren zu ca. 1,6 ml Technovit[®]-Flüssigkeit solange Technovit[®]-Pulver hinzugegeben, bis die Masse anfing am Rührstab Fäden zu ziehen. Die erste Einbettform wurde daraufhin mit der angerührten Masse aufgefüllt.

Nach ca. acht Minuten war die Masse vollständig ausgehärtet. Mit einem in Kochsalzlösung getränkten Mullverbandstreifen wurde der Knochen umwickelt und damit feucht gehalten. Eine Veränderung der biomechanischen Eigenschaften, die durch ein Austrocknen der Probe entstehen würde, konnte hierdurch minimiert werden.

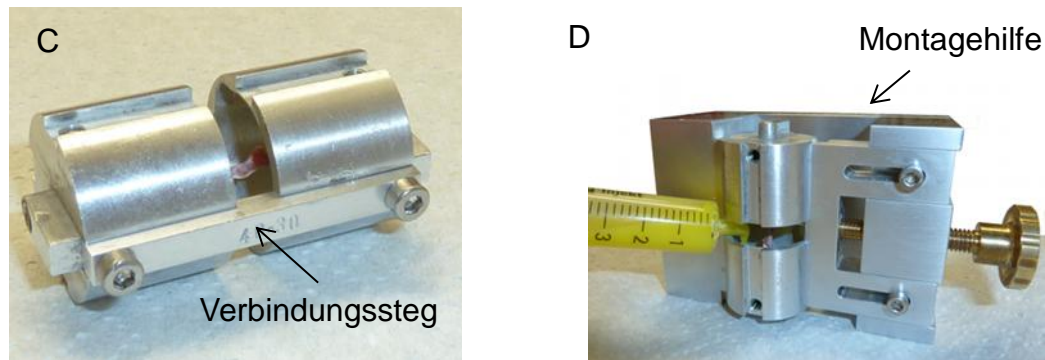


Abbildung 2.17: Einbettung der Probe, mit zweiter Einbettform

C: Die beiden Einbettformen sind mit einem Steg verbunden. D: Die Einbettformen sind in der Montagehilfe ausgerichtet und die zweite Einbettform wird mit Technovit® befüllt.

Die zweite Einbettform wurde nun mit einem Steg an der ersten befestigt und in die Montagehilfe eingesetzt. Die Montagehilfe diente dabei der exakten Ausrichtung der beiden Einbettformen. Die zweite Einbettform wurde daraufhin wie zuvor beschrieben mit Technovit® gefüllt (Abbildung 2.17).

Nach weiteren acht Minuten konnten die Einbettformen aus der Montagehilfe entnommen und zur Testung in die Probenhaltevorrichtung der Bose®-Materialprüfmaschine eingesetzt werden.

2.5.3 Der Torsionstest

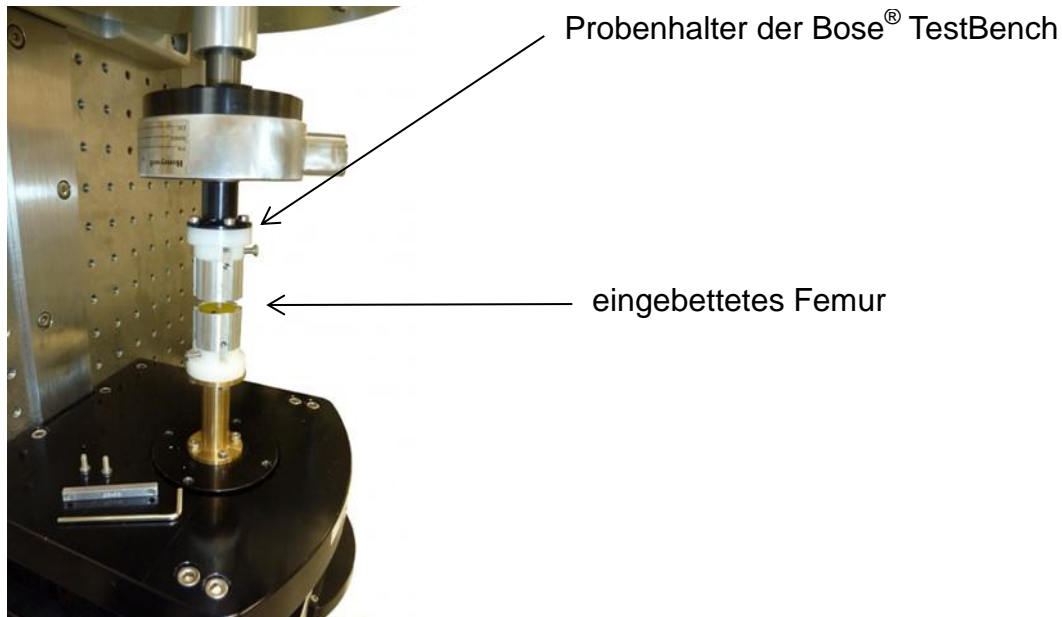


Abbildung 2.18: Probenhalter der Bose[®] TestBench mit eingesetzter Probe
Der Verbindungssteg ist für die Testung entfernt worden.

Beim Einsetzen der Probe in die Probenhaltervorrichtung wurde der Knochen so arretiert, dass die Femurlängsachse mit der Rotationsachse der Bose[®]-Anlage übereinstimmte. Bevor die Torsionstestung durchgeführt werden konnte, mussten die Kontrollparameter tariert und die Probe manuell entlastet werden. Nach dem Entfernen des Verbindungsstegs wurde die Testung gestartet.

Während der Messung wurde ein Ende der Probe kontinuierlich um 0,6 Grad pro Sekunde verdreht. Aus dieser Verdrehung resultierte eine Verkürzung der Probe. Um eine aus der Materialverkürzung entstehende Zugbelastung auszugleichen, wurde auf die Probe kontinuierlich eine axiale Vorlast von 0,3 Newton ausgeübt. Alle 0,75 Sekunden wurden das Torsionsmoment und der Winkelgrad erfasst und am Computer in Echtzeit als Graph abgebildet (Abbildung 2.19).

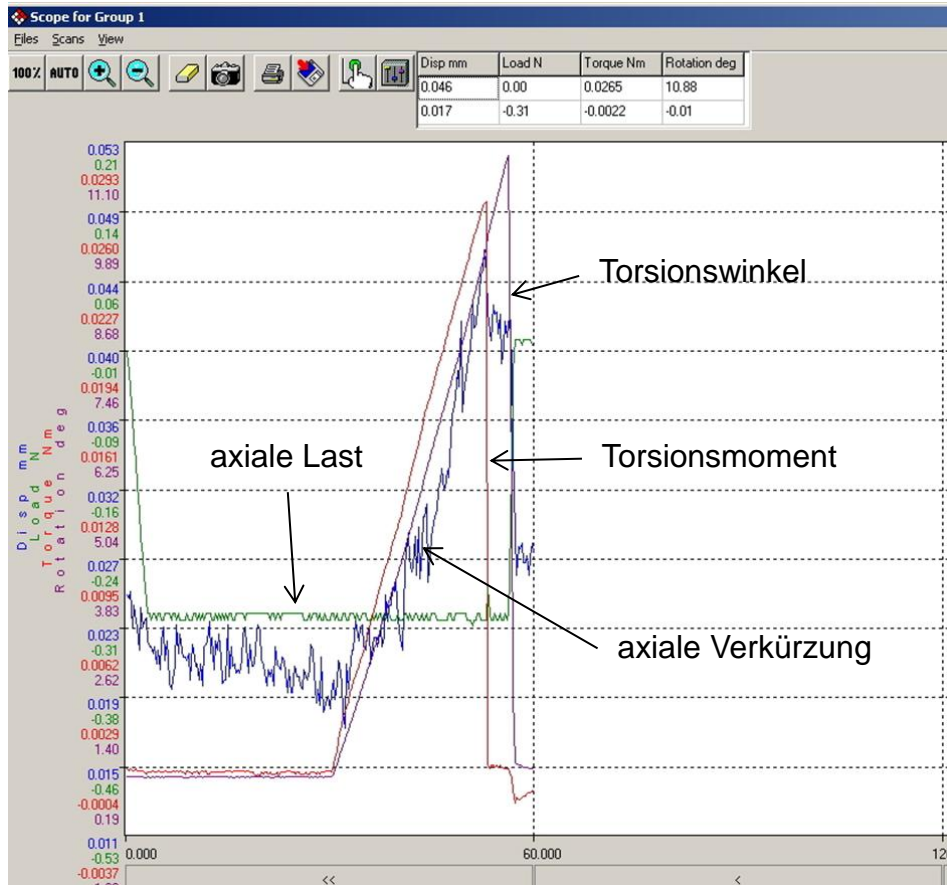


Abbildung 2.19: Bildschirmausschnitt des WinTest[®]-Programms während einer Torsionstestung

In Rot ist das Torsionsmoment, in Grün die axiale Last, in Blau die Verkürzung der Probe und in Violett der Torsionswinkel abgebildet. Auf der y-Achse ist die Zeit angegeben.

Als Endpunkt jeder Messung wurde das Erreichen des maximalen Torsionsmoments definiert. Dies entspricht dem Zeitpunkt, an dem der Knochen bricht. Dieser Moment konnte anhand eines deutlichen Abfalls des Torsionsmoments um mehr als die Hälfte erkannt werden. Nach diesem Abfall wurde die Testung manuell gestoppt und die erhobenen Rohdaten abgespeichert.

2.5.4 Bearbeitung der Daten

Um die Kallusfestigkeit (*strength*) und die Kallussteifigkeit (*stiffness*) zu berechnen, wurden die Daten mit Excel[®] (Excel[®] 2010 (Windows), Microsoft Corporation) bearbeitet. Zur graphischen Darstellung wurde das Drehmoment (*torsional load*) in Newtonmillimeter (Nmm) auf der y-Achse gegen die Winkeländerung (*deformation*) in Grad (°) auf der x-Achse aufgetragen (Abbildung 2.20). Die Kallusfestigkeit konnte daraufhin anhand des maximalen Drehmoments (*maximum torsional moment*) direkt

aus der Kurve abgelesen werden. Die Steifigkeit entsprach der Steigung der Kurve, die über die Gleichung ($m = Y_b - Y_a / X_b - X_a$) berechnet wurde. Sie gibt an, wie viel Widerstand ein Material einer Verformung entgegensetzt. Um eine repräsentative Steifigkeit zu erhalten, wurde die Steigung aus dem mittleren linearen Bereich angegeben. Dies war nötig, weil die Kurve im Anfangsbereich und beim Maximum nicht immer linear verlief.

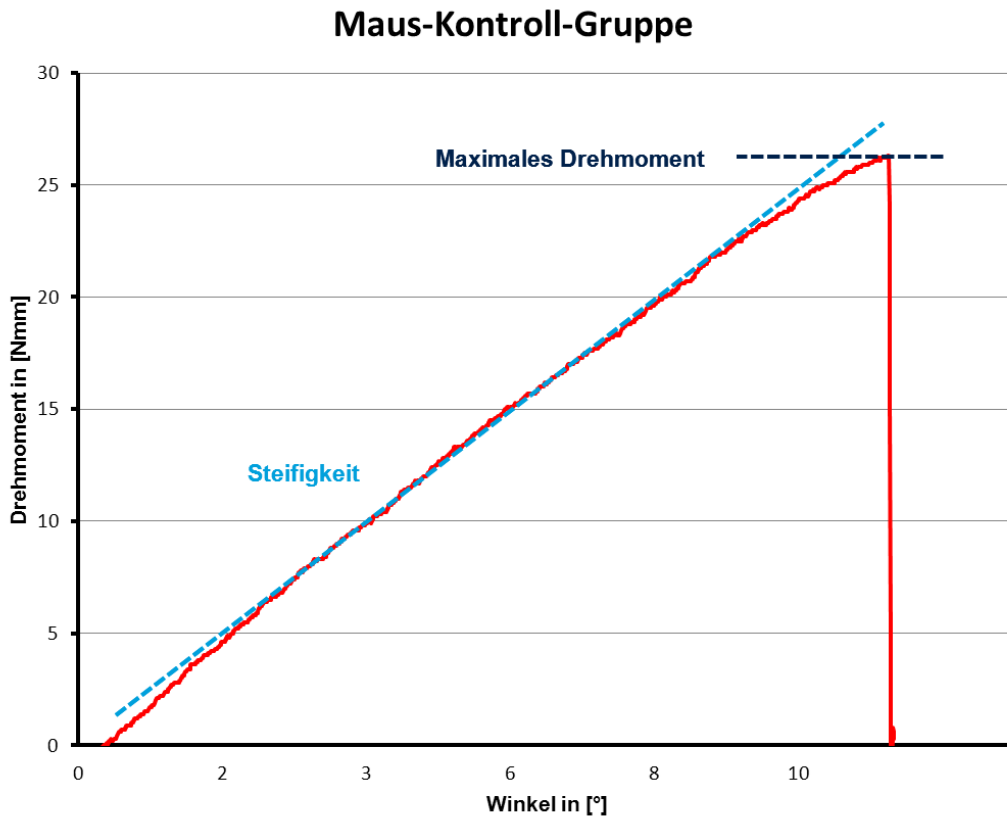


Abbildung 2.20 In Excel® erstellter Graph zur Berechnung von Torsionsfestigkeit/-steifigkeit
 Das Drehmoment ist gegen den Torsionswinkel aufgetragen. Die Steifigkeit entspricht der Steigung (hellblau) der Kurve. Die Festigkeit entspricht dem Maximum der Kurve (dunkelblau).

2.6 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS[®] 20 (*Statistical Package for Social Science*, SPSS Inc. Chicago, Illinois). Die Studiengruppen wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Nicht normalverteilte Gruppen wurden mithilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests verglichen.

Für die qualitative MikroCT-Auswertung wurde der exakte Test nach Fisher angewendet. Die Begutachter-Übereinstimmung (*Interobserver-Variabilität*) hinsichtlich der Kalluskonsolidierung wurde mit Hilfe der Kappa-Statistik berechnet und betrug 0,77.

In der tabellarischen Darstellung der Ergebnisse wurde der Median sowie die 25. und 75. Perzentile angegeben. Die Ergebnisse wurden mit einem 95%-Konfidenzintervall berechnet. Ein $p < 0,05$ wurde als Level statistischer Signifikanz angenommen.

Die Boxplots im Ergebnisteil (Abbildung 3.1, Abbildung 3.2, Abbildung 3.4, Abbildung 3.5, Abbildung 3.6, Abbildung 3.7) stellen den Median in der Mitte des Rechtecks als weißen Balken dar. Das obere Ende des Rechtecks zeigt das 25. und das untere das 75. Perzentil. An diesem Rechteck schließen sich T-förmige Whiskers an. Sie umfassen zum einen die Werte unter dem 25%-Quartil und zum anderen die Werte über dem 75%-Quartil. Ausreißer sind über oder unter dem Boxplot als Kreise gekennzeichnet. Ein Strich mit darüber liegendem Sternchen stellt im Boxplot einen Unterschied $p < 0,05$ zwischen den Versuchsgruppen dar. Ein Trend wird mit einem Strich und darüber liegender Raute dargestellt.

3. Ergebnisse

Eine Stunde nach Operation hatten sich die meisten Versuchstiere von der Narkose erholt und zeigten ein reges Verhalten (Putzen, Umherlaufen, Umpflügen des Nistmaterials). Die operierte Extremität wurde in den meisten Fällen direkt nach Erwachen aus der Narkose regelrecht belastet. Bei fünf Tieren wurde der operierte linke Hinterlauf postoperativ nachgezogen und die ersten 24 h nicht voll belastet. Der Befund besserte sich bei allen betroffenen Tieren innerhalb der ersten zwei bis drei Tage bis zur regelrechten Belastung des Hinterlaufs.

Der Fixateur wurde sehr gut toleriert und beeinträchtigte die Tiere kaum in ihrem Bewegungsumfang. Zu Beginn der Studie blieben einige wenige Tiere mit ihrem Fixateur an den Spielmaterialien im Käfig (Plastikhäuschen, Plastikröhre) hängen. Im Verlauf der Studie wurde deshalb beschlossen, diese Spielmaterialien bei den Mäusen mit Fixateur aus dem Käfig zu entfernen. Den Tieren ohne Fixateur (Kontroll-Gruppe, SHT-Gruppe) wurden weiterhin Spielmaterialien angeboten.

Insgesamt wurden die Daten von 114 Tieren ausgewertet. In der Fraktur-Gruppe kam es zu 3 *drop outs*, in der SHT-Gruppe zu 6 und in der Kombinations-Gruppe zu 10 *drop outs*. Im Folgenden werden die einzelnen Gründe der *drop outs* aufgeführt.

In der **Fraktur-Gruppe** kam es bei zwei Mäusen innerhalb der ersten sieben Tage zum Auswandern des proximalen Pins. Die daraus resultierende Achsabweichung der Frakturrenden von über 20° erfüllte ein Abbruchkriterium, weshalb die Tiere euthanasiert und die Daten aus der Wertung genommen wurden. Eine weitere Maus dieser Gruppe ist nach der MikroCT-Untersuchung nicht mehr aus der Narkose erwacht.

In der **SHT-Gruppe** sind insgesamt sechs Tiere verstorben. Intraoperativ verstarben drei Versuchstiere und unmittelbar postoperativ zwei Tiere. Eine Maus wurde bei der morgendlichen Kontrolle am fünften postoperativen Tag tot im Käfig vorgefunden.

In der **Kombinations-Gruppe** sind vier Tiere intraoperativ gestorben. Zwei Tiere sind aus der Narkose für die CT-Untersuchung nicht mehr erwacht. Bei zwei Mäusen kam es auch in dieser Gruppe zum Auswandern des proximalen Pins mit daraus

resultierender Abkipfung der Frakturenden von über 20°. Eine Maus musste aufgrund einer Wundinfektion, die mit Gentamycinsalbe nicht beherrschbar war, aus der Studie ausgeschlossen werden. Ein weiteres Tier zeigte am zweiten postoperativen Tag Schmerzzeichen (vermeidende Belastung der operierten Extremität, reduziertes Trink- und Essverhalten). Weil sich diese Schmerzzeichen auch nach zusätzlicher Schmerzmittelgabe nicht besserten, wurde dieses Tier euthanasiert.

3.1 MikroCT-Untersuchung

Tabelle 3: Fallzahlen der einzelnen MikroCT-Auswertungen

Abgebildet sind die Fallzahlen der einzelnen MikroCT-Auswertungen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt. Zwei fehlende Messungen, die aus technischen Gründen nicht auswertbar waren, sind mit Sternchen markiert.

Zeitpunkt post OP	Versuchsgruppe	Qualitative Auswertung	Kallusvolumen	Kallusdichte
Woche 1	Fraktur	30	30	30
	kombiniertes Trauma	29	29	29
Woche 2	Fraktur	30	30	30
	kombiniertes Trauma	29	29	29
Woche 3	Fraktur	30	28*	28*
	kombiniertes Trauma	29	29	29
Woche 4	Fraktur	10	10	10
	kombiniertes Trauma	9	9	9

In der Fraktur-Gruppe konnte von zwei Versuchstieren die Messung vom 21. postoperativen Tag aufgrund eines Systemabsturzes während des Speichervorgangs nicht für die Berechnung von Kallusvolumen und Kallusdichte verwendet werden. Deshalb sind in dieser Gruppe nur 28 statt 30 Tiere bezüglich Kallusvolumen und Kallusdichte untersucht worden (Tabelle 3).

3.1.1 Kallusvolumen

In beiden Gruppen kam es bis zur dritten Woche zu einem Volumenanstieg gefolgt von einem Abfall bis zur vierten Woche (Abbildung 3.1).

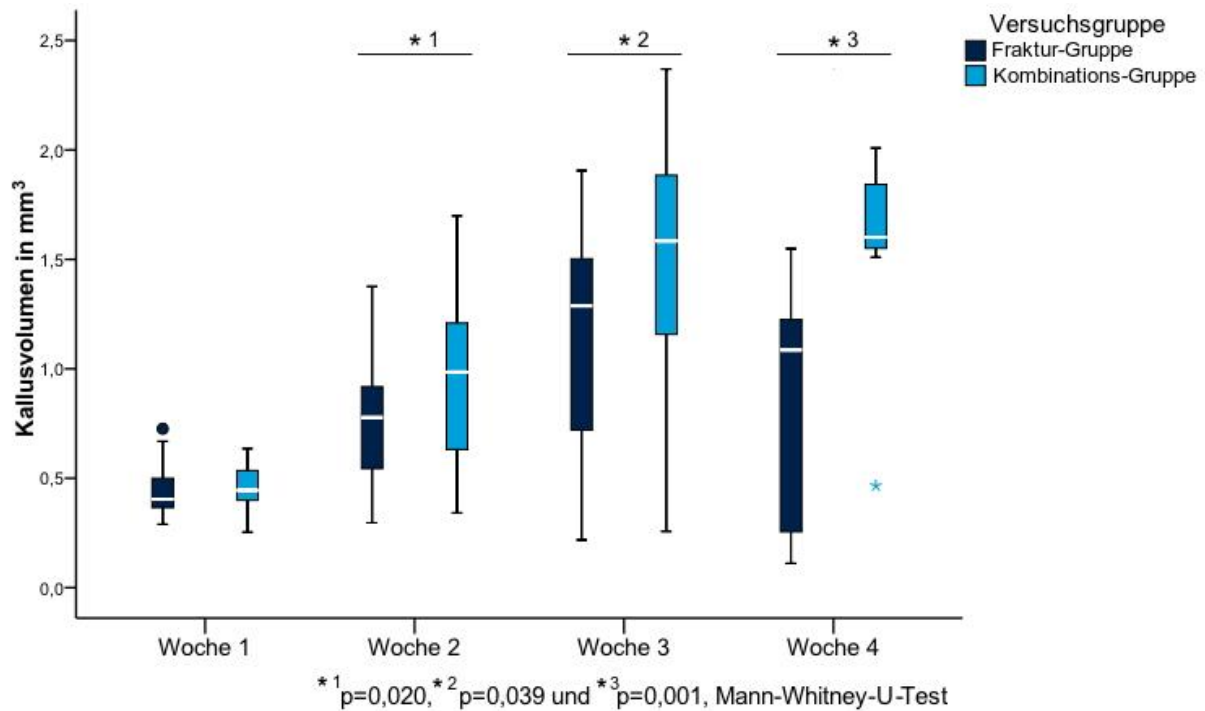


Abbildung 3.1: Entwicklung der Kallusvolumina [in mm³] über vier Wochen

Vergleich von Fraktur-Gruppe (dunkelblau) mit der Kombinations-Gruppe (hellblau). Die signifikanten Unterschiede sind mit Sternchen markiert.

Vergleicht man die im MikroCT untersuchten Tiere, zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen der Fraktur- und Kombinations-Gruppe nach 2, 3 und 4 Wochen (Abbildung 3.1).

Eine Woche nach Operation waren keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen erkennbar. In Woche 2, 3 und 4 war das Kallusvolumen in der Kombinations-Gruppe signifikant höher ($p=0,020$, $p=0,039$, $p<0,001$) als bei den Mäusen in der Fraktur-Gruppe (Tabelle 4).

Ergebnisse

Tabelle 4: Ergebnisse der Kallusvolumen-Untersuchung.

Angegeben sind die Gruppengrößen (N), der Median mit dem 25. und 75. Perzentil (Kallusvolumen in mm³) und die p-Werte (Mann-Whitney-U-Test). In fett gedruckt dargestellt: p<0,05.

Zeitpunkt post OP	Versuchsgruppe	N	Kallusvolumen in [mm ³]	
			Median (25.–75. Perzentil)	p-Wert
Woche 1	Fraktur	30	0,40 (0,36–0,51)	0,255
	kombiniertes Trauma	29	0,45 (0,39–0,55)	
Woche 2	Fraktur	30	0,70 (0,54–0,95)	0,020
	kombiniertes Trauma	29	0,99 (0,61–1,26)	
Woche 3	Fraktur	28	1,29 (0,67–1,52)	0,039
	kombiniertes Trauma	29	1,58 (1,15–1,89)	
Woche 4	Fraktur	10	1,09 (0,25–1,25)	<0,001
	kombiniertes Trauma	9	1,60 (1,53–1,90)	

3.1.2 Mineralisierungsdichte des Kallus

Die Kallusdichte zeigte in beiden Gruppen bis zur 2. Woche keine starken Veränderungen. Von der 2. bis zur 3. Woche stieg der Hydroxylapatitgehalt in beiden Gruppen deutlich an. In der 4. Woche gab es eine drastische Zunahme der Dichte (Abbildung 3.2).

Ergebnisse

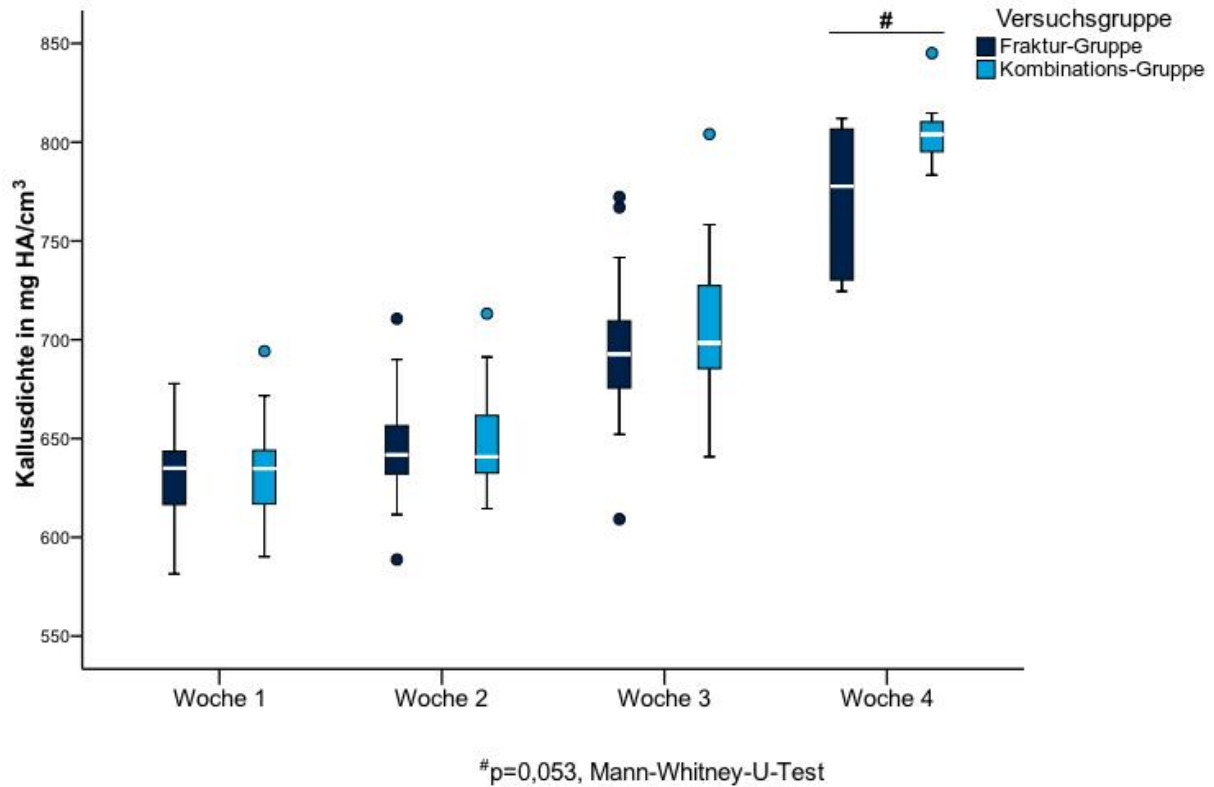


Abbildung 3.2: Entwicklung der Kallusdichte (in mg HA/cm³) über vier Wochen

Vergleich der Fraktur-Gruppe (dunkelblau) mit der Kombinations-Gruppe (hellblau). Der tendenzielle Unterschied ist mit einer Raute gekennzeichnet. (HA=Hydroxylapatit).

Nach einer Woche zeigten sich keine Unterschiede in den beiden Gruppen. Auch in Woche 2 und Woche 3 gab es in beiden Gruppen eine gleichmäßige Dichtezunahme ohne signifikante Gruppenunterschiede. In der 4. Woche war die Mineralisierungsdichte in der Kombinations-Gruppe tendenziell höher ($p=0,053$) als in der Fraktur-Gruppe (Abbildung 3.2).

Tabelle 5: Ergebnisse der Kallusdichtemessung

Angegeben sind die Gruppengrößen, der Median mit dem 25. und 75. Perzentil (Kallusdichte in mg HA/cm³) und die p-Werte (Mann-Whitney-U-Test). HA=Hydroxylapatit.

Zeitpunkt post OP	Versuchsgruppe	N	Kallusdichte in [mg HA/cm ³]	
			Median (25.–75. Perzentil)	p-Wert
Woche 1	Fraktur	30	634,95 (616,23–644,16)	1,000
	kombiniertes Trauma	29	634,72 (615,72–644,66)	
Woche 2	Fraktur	30	642,68 (631,31–657,15)	0,903
	kombiniertes Trauma	29	640,80 (631,61–662,49)	
Woche 3	Fraktur	28	692,74 (675,53–709,59)	0,444
	kombiniertes Trauma	29	698,41 (682,61–728,68)	
Woche 4	Fraktur	10	777,71 (729,01–807,23)	0,053
	kombiniertes Trauma	9	803,91 (793,08–812,49)	

3.1.3 Qualitative MikroCT-Untersuchung

Vergleicht man beide Gruppen, so zeigten sich an beiden Untersuchungszeitpunkten deutlich mehr überbrückte Femora in der Kombinations-Gruppe. Nach 3 Wochen war bei 79% der Tiere in der Kombinations-Gruppe und bei 60% der Tiere in der Fraktur-Gruppe die Osteotomie vollständig mit Kallus überbrückt. In der 4. Woche waren es 89% in der Kombinations-Gruppe und 60% in der Fraktur-Gruppe (Abbildung 3.3, Tabelle 6). Dieser Unterschied erreichte allerdings keine statistische Signifikanz ($p > 0,05$).

Tabelle 6: Ergebnisse der qualitativen MikroCT-Auswertung 3 und 4 Wochen nach Operation

Zeitpunkt post OP	MikroCT Kallus-Überbrückungs-Score	Fraktur-Gruppe	Kombinations-Gruppe
Woche 3	A = komplette Überbrückung	18	23
	B = inkomplette Überbrückung	3	0
	C = keine Überbrückung	6	3
	D = verzögerte Heilung	3	3
	Gesamt	30	29
Woche 4	A = komplette Überbrückung	6	8
	B = inkomplette Überbrückung	0	0
	C = keine Überbrückung	0	0
	D = verzögerte Heilung	4	1
	Gesamt	10	9

Nach 4 Wochen wurden in beiden Gruppen keine Femora mehr der Kategorie B oder C zugeordnet. Bei allen Tieren, die in Woche 3 im CT eine inkomplette Überbrückung zeigten (Score B), war in Woche 4 eine vollständige Überbrückung (Score A) erkennbar. Alle Tiere, bei denen in Woche 3 keine Überbrückung aber Kallus im Frakturspalt vorhanden war (Score C), zeigten in Woche 4 einen deutlichen Rückgang des Kallus sowie eine Abrundung der Kortizes (Score D).

Qualitativer Kallus-Bewertungs-Score

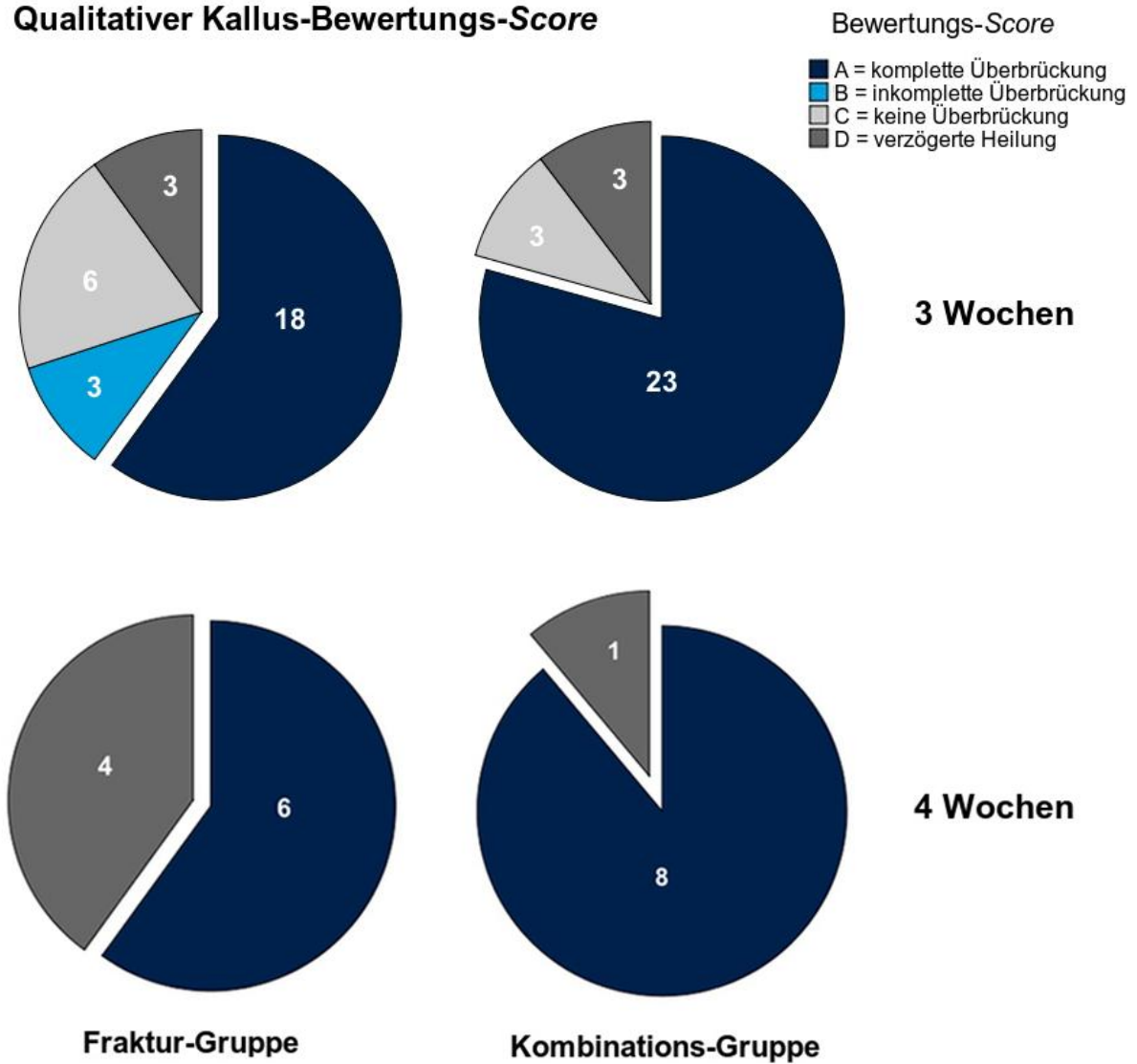


Abbildung 3.3: Vergleich der qualitativen MikroCT-Auswertung von Fraktur- und Kombinations-Gruppe nach 3 und 4 Wochen
In weißer Schrift sind die Fallzahlen angegeben.

3.2 Biomechanische Torsionstestung

3.2.1 Torsionsfestigkeit

Betrachtet man die Ergebnisse der biomechanischen Torsionstestung, waren 4 Wochen nach der Operation die Femora der Kombinations-Gruppe signifikant fester als die Femora der Fraktur-Gruppe ($p=0,029$) (Abbildung 3.4). Nach 3 Wochen war kein Unterschied zwischen den Gruppen nachweisbar.

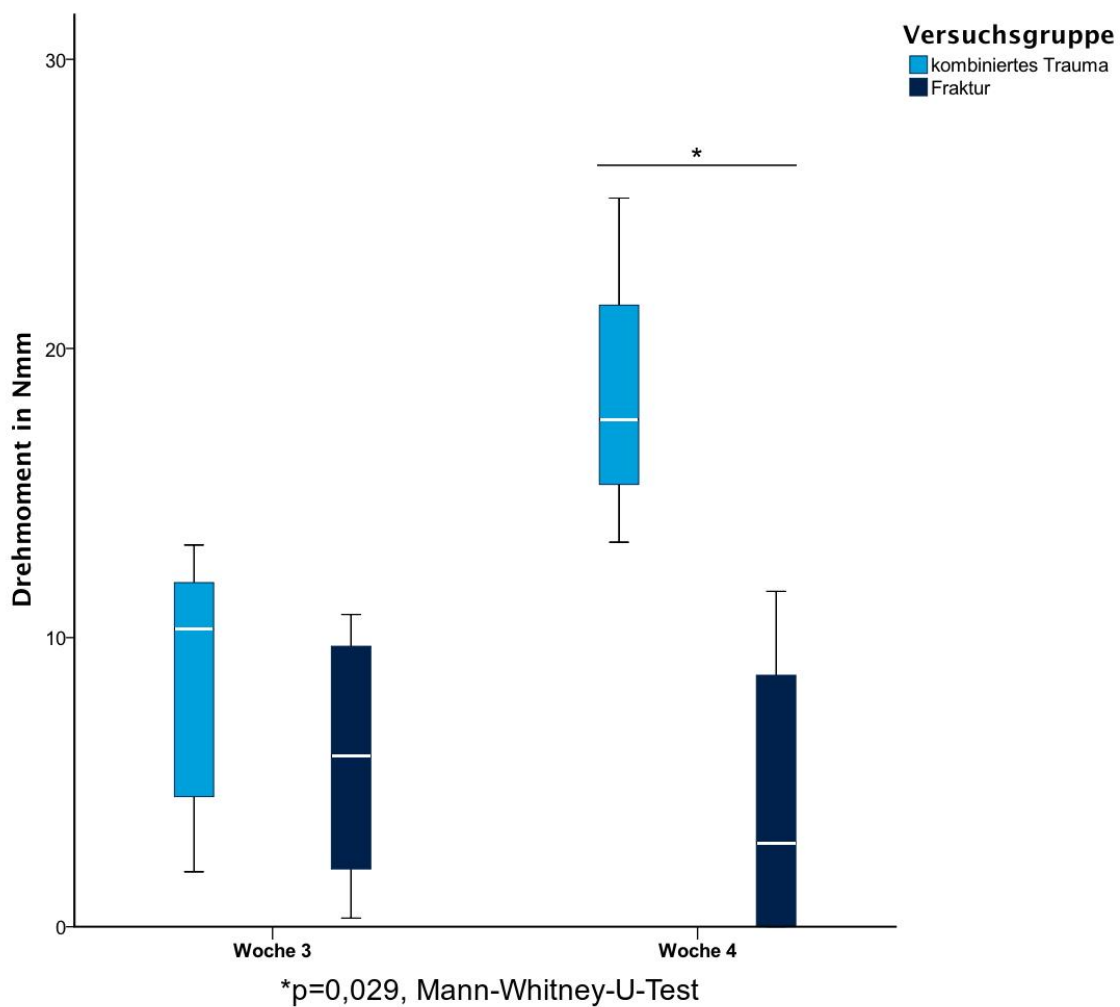


Abbildung 3.4 Biomechanische Testung des maximalen Drehmoments (in Nmm) 3 und 4 Wochen nach Operation
Vergleich von Kombinations-Gruppe (hellblau) und Fraktur-Gruppe (dunkelblau). (*= $p<0,05$).

Ergebnisse

Vergleicht man die SHT-Gruppe mit der Kontroll-Gruppe, so waren die Torsionsfestigkeiten in der SHT-Gruppe 3 Wochen postoperativ signifikant niedriger ($p=0,021$) (Abbildung 3.5). Nach 4 Wochen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Tabelle 7).

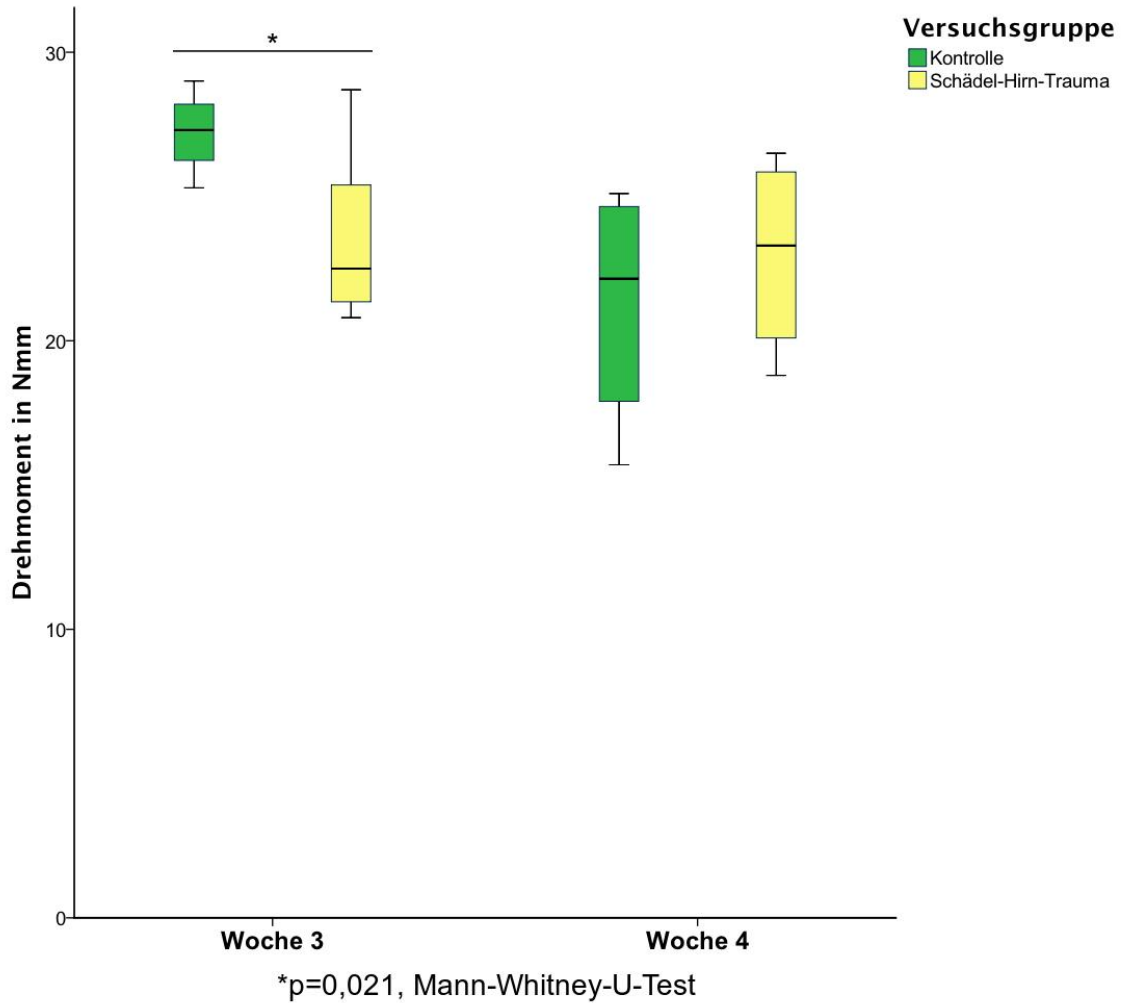


Abbildung 3.5 Biomechanische Testung des maximalen Drehmoments (in Nmm) 3 und 4 Wochen nach Operation

Vergleich von Kontroll-Gruppe (grün) und SHT-Gruppe (gelb). (*= $p<0,05$).

Ergebnisse

Tabelle 7: Ergebnisse der Torsionsfestigkeiten (maximales Drehmoment)

Angegeben sind die Gruppengrößen (N), der Median mit dem 25. und 75. Perzentil (in Nmm) und die p-Werte (Mann-Whitney-U-Test). In fett gedruckt dargestellt: $p < 0,05$.

Zeitpunkt post OP	Versuchsgruppe	N	Torsionsfestigkeit in [Nmm]	
			Median (25.–75. Perzentil)	p-Wert
Woche 3	Kontrolle	7	27,30 (25,90–28,40)	0,021
	Schädel-Hirn-Trauma	8	22,50 (21,32–25,80)	
	kombiniertes Trauma	8	10,30 (03,80–11,95)	0,161
	Fraktur	8	05,90 (01,70–10,05)	
Woche 4	Kontrolle	4	22,15 (16,80–24,87)	0,486
	Schädel-Hirn-Trauma	4	23,30 (19,45–26,18)	
	kombiniertes Trauma	4	17,55 (14,30–23,35)	0,029
	Fraktur	4	02,90 (00,00–10,15)	

3.2.2 Torsionssteifigkeit

Die Kombinations-Gruppe war 3 und 4 Wochen postoperativ tendenziell steifer als die Fraktur-Gruppe (Woche 3 $p=0,083$, Woche 4 $p=0,057$) (Abbildung 3.6).

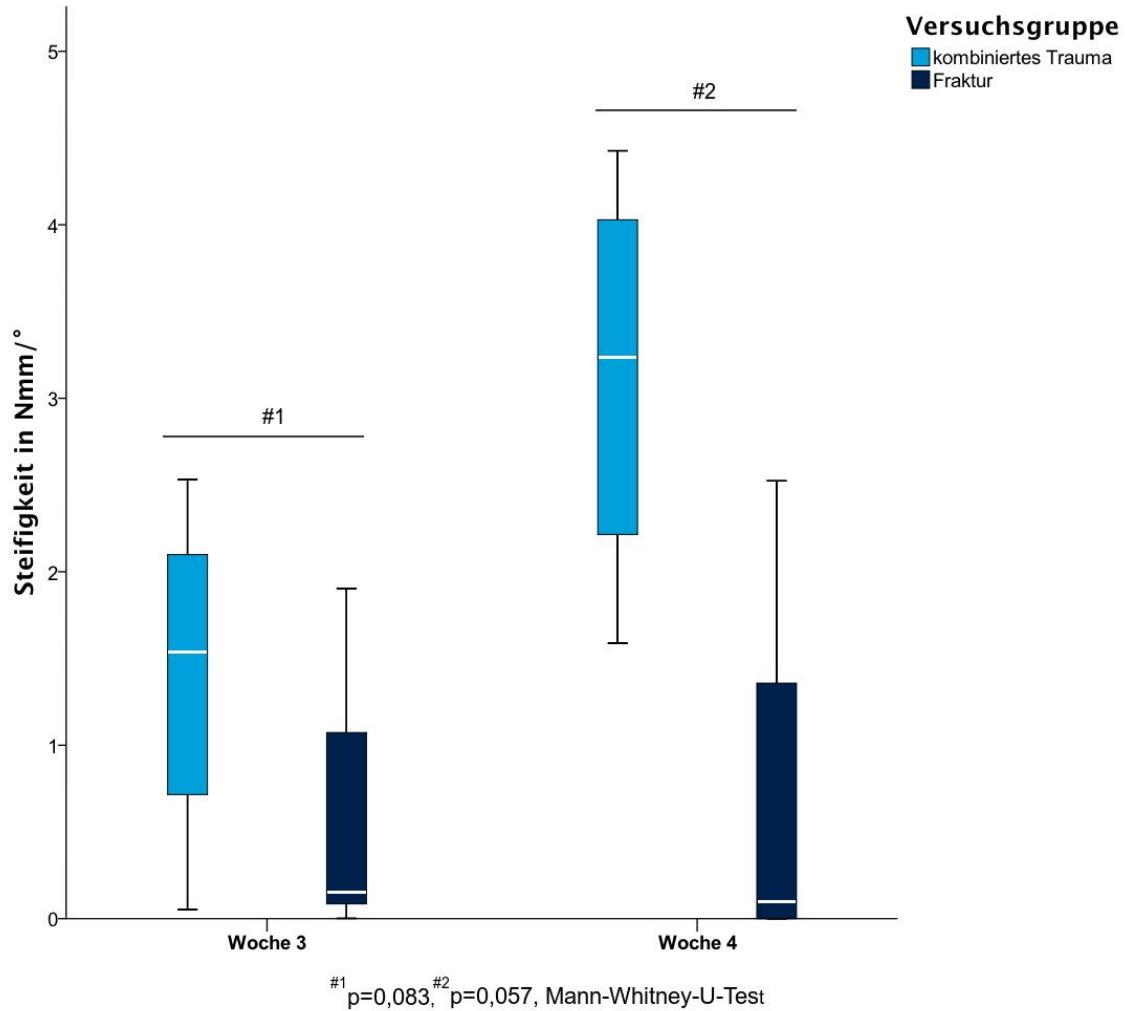


Abbildung 3.6 Biomechanische Testung der Torsionssteifigkeit (in Nm/°) 3 und 4 Wochen nach Operation

Vergleich von Kombinations-Gruppe (hellblau) und Fraktur-Gruppe (dunkelblau).

Ergebnisse

Die linken Femora der Kontroll-Gruppe waren 3 Wochen nach Operation signifikant steifer als die der SHT-Gruppe ($p=0,040$). In der 4. postoperativen Woche gab es zwischen der Kontroll- und der SHT-Gruppe keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 3.7).

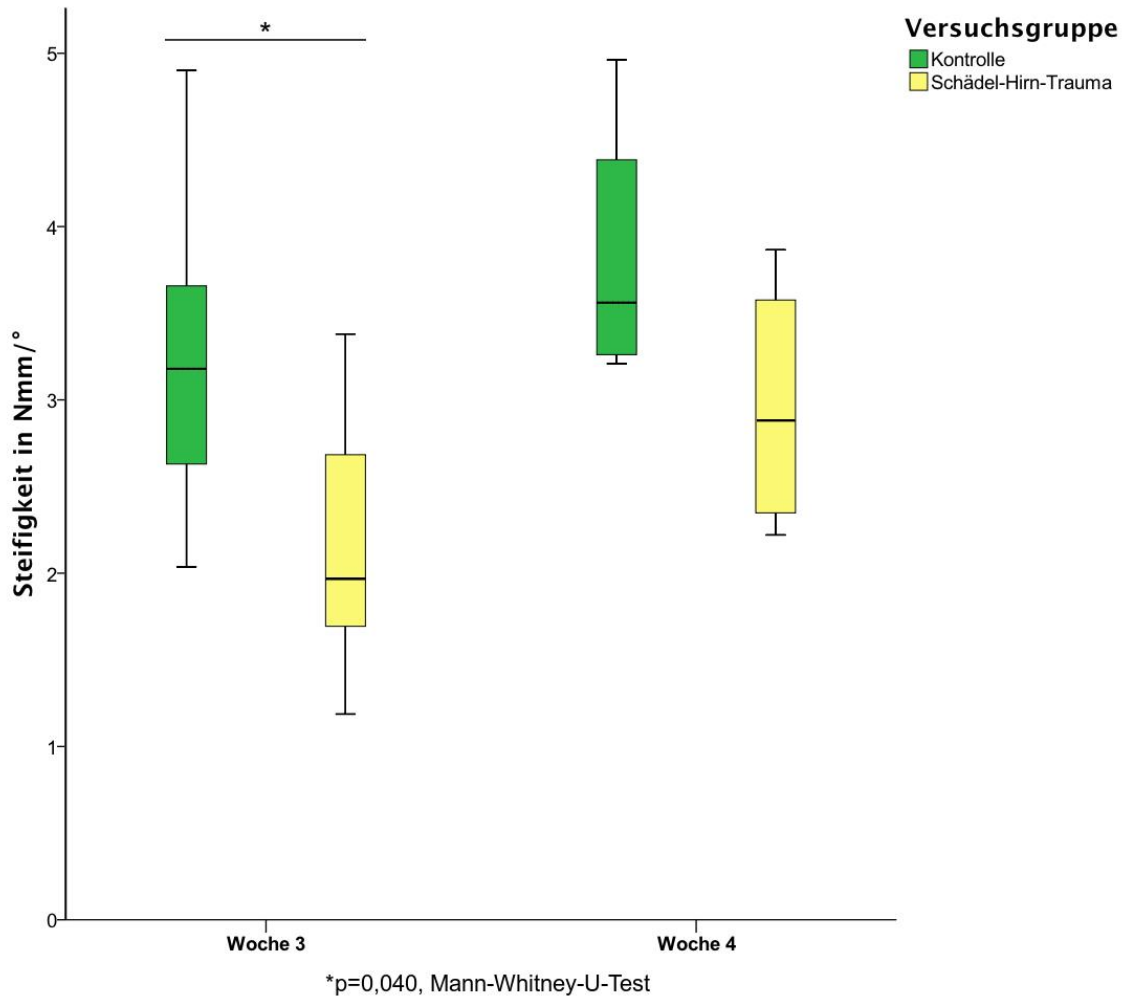


Abbildung 3.7 Biomechanische Testung der Torsionssteifigkeit (in Nm/°) 3 und 4 Wochen nach Operation

Vergleich von Kontroll-Gruppe (grün) und SHT-Gruppe (gelb). (*= $p<0,05$).

Ergebnisse

Tabelle 8: Ergebnisse der Torsionssteifigkeiten

Angegeben sind die Gruppengrößen (N), der Median mit dem 25. und 75. Perzentil (in Nmm/°) und die p-Werte (Mann-Whitney-U-Test). In fett gedruckt dargestellt: $p < 0,05$.

Zeitpunkt post OP	Versuchsgruppe	N	Torsionssteifigkeit in [Nmm/°]	
			Median (25.–75. Perzentil)	p-Wert
Woche 3	Kontrolle	7	3.18 (2.31–4.01)	0,040
	Schädel-Hirn-Trauma	8	1.96 (1.67–2.88)	
	kombiniertes Trauma	8	1.54 (0.43–2.24)	0,083
	Fraktur	8	0.15 (0.07–1.08)	
Woche 4	Kontrolle	4	3.56 (3.24–4.67)	0,343
	Schädel-Hirn-Trauma	4	2.88 (2.28–3.72)	
	kombiniertes Trauma	4	3.24 (1.90–4.23)	0,057
	Fraktur	4	0.10 (0.00–1.94)	

4. Diskussion

Ergebnisdiskussion

Nach Durchsicht der publizierten englischsprachigen Literatur ist die vorliegende Arbeit die erste Studie, die den Einfluss des SHT auf die Knochenheilung zu verschiedenen Zeitpunkten sowohl radiologisch als auch biomechanisch untersucht (Tabelle 9).

Diskussion

Tabelle 9: Übersicht der veröffentlichten experimentellen Studien zum Thema SHT und Frakturheilung mit radiologischer und/oder biomechanischer Auswertung

Studie	Wei et al. ²⁷	Ozan et al. ⁵⁴	Boes et al. ²⁶	Maegele et al. ⁴⁶	In-Lee et al. ⁵⁶	Song et al. ³⁰
Jahr der Publikation	2008	2010	2006	2005	2005	2011
Thema der Studie	Einfluss von Leptin auf den Knochenstoffwechsel	Einfluss von SHT auf die Frakturheilung	Einfluss von SHT auf die Frakturheilung	Interaktion zentraler und peripherer Verletzungen	Einfluss von SHT auf den Knochenstoffwechsel	Einfluss von SHT auf den Knochenstoffwechsel
Versuchstiere	Sprague-Dawley Ratten	Wistar-Albino Ratten	Sprague-Dawley Ratten	Sprague-Dawley Ratten	Sprague-Dawley Ratten	Sprague-Dawley Ratten
Untersuchte Knochen	Femur	Femur	Femur	Tibia	Femur; Tibia; LWK 4 u. 5	Femur
Schädelhirntraumamodell	Schlagbolzen nach Kraniektomie (Anprallgeschwindigkeit 4 m/s, Kontaktdauer 100 ms)	450 g Gewicht aus 1 m Höhe	500 g Gewicht aus 1,5 m Höhe	schnelle Bolus-Injektion von Kochsalzlösung nach Kraniektomie	schnelle Bolus-Injektion von Kochsalzlösung nach Kraniektomie	250 g Gewicht aus 1 m Höhe
Frakturmodell	Femur Osteotomie mit intramedullärer Fixierung 1,5 mm Draht	Femur Osteotomie mit intramedullärer Fixierung 1,14 mm Draht	Femur Osteotomie mit intramedullärer Fixierung	Tibiafraktur ohne Fixierung	nicht untersucht	Femur Osteotomie mit intramedullärer Fixierung 1,2 mm Draht
Biomechanische Testung	nicht untersucht	Vierpunktbiegetest	Torsionstest	nicht untersucht	Dreipunktbiegetest und Kompressionstest	nicht untersucht
Erfassung des Kallusvolumens	anterior-posterior Röntgenaufnahme	nicht untersucht	digitale Messschieber	histomorphometrisch	nicht untersucht	MikroCT
Fallzahl	n=64	n=22	n=43	n=100	n=40	n=36
Gruppenaufteilung	Fraktur+SHT (n=16) Fraktur (n=16) SHT (n=16) nicht operiert (n=16)	Fraktur (n=10) Fraktur+SHT (n=12)	Fraktur (n=20) Fraktur+SHT (n=23)	Fraktur+SHT (n=30) Fraktur (n=30) SHT (n=30) nicht operiert (n=10)	ScheinOP (n=20) SHT (n=20)	Fraktur+SHT (n=12) Fraktur (n=12) SHT (n=6) nicht operiert (n=6)
Untersuchungszeitpunkte	2., 4., 8. und 12. Woche postop.	28. Tag postop.	21. Tag postop.	15. Tag postop.	1., 7. und 21. Tag postop.	4. und 8. Woche postop.
Gruppengröße pro Untersuchungszeitpunkt (Kallusgröße)	Fraktur+SHT (n=4) Fraktur (n=4)	nicht untersucht	Fraktur (n=15) Fraktur+SHT (n=17)	Fraktur+SHT (n=5) Fraktur (n=5) SHT (n=5) nicht operiert (n=5)	nicht untersucht	Fraktur+SHT (n=5) Fraktur (n=5) nicht operiert (n=6)
Gruppengröße pro Untersuchungszeitpunkt (Biomechanik)	nicht untersucht	Fraktur (n=10) Fraktur+SHT (n=10)	Fraktur (n=15) Fraktur+SHT (n=17)	nicht untersucht	Schein-OP (n=15) SHT (n=15)	nicht untersucht

Kallusvolumen und -dichte

Die MikroCT-Untersuchungen zeigten in Woche 2, 3 und 4 ein signifikant größeres Kallusvolumen in der Kombinations-Gruppe. Diese Ergebnisse stimmen mit vorherigen Studien überein. Auch Wei et al.²⁷ konnten in ihrer Studie mit Ratten signifikant höhere Kallusvolumina bei den Tieren mit assoziiertem SHT nachweisen. Die Autoren untersuchten 2, 4, 8 und 12 Wochen postoperativ den Frakturkallus mit konventionellen Röntgenbildern. Das Kallusvolumen wurde hierbei mit der Perkins-Formel berechnet [Perkins-Volumen-Formel: $2\pi \cdot R_1 \cdot (R_2 - R_1) \cdot L$, wobei R_1 =Radius Femur; R_2 =Radius Kallus; L =Länge Kallus] (Tabelle 9). Zwei Wochen nach der Operation war laut den Autoren ein erster Anhalt für Kallusbildung in der Versuchsgruppe zu erkennen, während bei den Tieren ohne SHT fast keine Kallusbildung nachzuweisen war ($p > 0,05$). Während der folgenden Wochen ist die Kallusbildung in der Versuchsgruppe weiter fortgeschritten, sodass die Autoren auch nach 4 und nach 8 Wochen von signifikant größeren Kallusvolumina bei den Tieren mit SHT berichten ($p < 0,01$). Zwölf Wochen nach Operation war laut den Autoren in beiden Gruppen kein Frakturspalt mehr erkennbar.

Wenn das Kallusvolumen wie bei Wei et al. mit Hilfe einer konventionellen Röntgenaufnahme bestimmt wird, sind die Daten kritisch zu bewerten. Denn durch diese Methode ist nur eine grobe Annäherung an die tatsächliche Kallusgröße möglich⁴⁵. Wei et al. haben zudem das Kallusvolumen nicht bei denselben Versuchstieren erfasst, sondern zu jedem Untersuchungszeitpunkt eine andere Kohorte untersucht. Durch diese Aufteilung der Versuchstiere wurde einerseits ein gleicher Knochenheilungsverlauf in den einzelnen Kohorten vorausgesetzt, andererseits entstanden relativ kleine Gruppengrößen mit nur vier Tieren pro Gruppe. Im Vergleich dazu wurden in der vorliegenden Studie die Veränderungen bei denselben Tieren untersucht, mit Gruppengrößen von 28–30 Tieren in den ersten drei und 9 bzw. 10 Tieren in der vierten Woche.

Auch Maegele et al. fanden bei ihrer Untersuchung an einem Rattenmodell mit kombiniertem Trauma ein signifikant größeres Kallusvolumen bei den Tieren mit assoziiertem SHT⁴⁶. Sie kombinierten das *fluid percussion model* (SHT-Modell Kapitel 4) mit einem Tibiafrakturmodell nach Bourque et al.⁴⁷. Sie untersuchten 15

Tage nach dem Eingriff die Kallusgröße histomorphometrisch. Die Tibiafraktur wurde bei diesem Modell weder intern noch extern stabilisiert, womit eine Standardisierung der biomechanischen Einflussfaktoren unmöglich war. Wie in Kapitel 6 (Frakturmodell) erläutert, ist allgemein bekannt, dass biomechanische Faktoren einen dramatischen Einfluss auf die Knochenheilungsprozesse haben und damit das Resultat der Knochenheilung maßgeblich beeinflussen⁴⁵. Zudem stellt aus unserer Sicht eine fehlende Stabilisierung der Fraktur für die Versuchstiere eine unnötige zusätzliche Belastung dar. Eine Standardisierung und Kontrolle der biomechanischen Bedingungen im Frakturbereich ist unserer Meinung nach deshalb dringend erforderlich. Auch die relativ kleinen Fallzahlen der Kallusuntersuchung (5 Tiere pro Gruppe) sind bei der Studie von Maegele et al. zu berücksichtigen.

Zu einem anderen Ergebnis kamen Boes und Mitarbeiter²⁶. In Ihrer Studie untersuchten auch sie den Zusammenhang von SHT und Knochenheilung am Rattenmodell. Die Tiere wurden dabei nach drei Wochen getötet und der Kallusdurchmesser mit digitalen Messschiebern in anteroposteriorer und mediolateraler Richtung gemessen. Die Kallusgröße wurde als Durchschnitt dieser beiden Werte definiert. Ähnlich wie bei Wei et al. wurde auch hier die Kallusgröße in ihrem vollen Umfang nur annäherungsweise beschrieben. Die Ergebnisse ihrer Kallusuntersuchung zeigten einen signifikant kleineren Kallusdurchmesser in der Gruppe mit kombiniertem Trauma. Die Autoren erklären sich diese Werte durch eine stark beschleunigte Frakturheilung in der Gruppe mit assoziiertem SHT. In der dritten Woche sei bei diesen Tieren schon die Phase des *remodelings* erreicht worden, weshalb der Kallus schon wieder vermehrt abgebaut worden wäre. Da im Versuchsaufbau der Kallusdurchmesser nur zu einem Untersuchungszeitpunkt erfasst wurde, lassen die Ergebnisse allerdings keine Schlussfolgerung über den zeitlichen Verlauf der Frakturheilung zu.

Song et al. kamen bei ihren Versuchen zu ähnlichen Schlussfolgerungen wie Boes et al.³⁰. In einem Rattenmodell mit kombiniertem Trauma untersuchten sie die Dichte und den Mineralgehalt des neu gebildeten Kallus mittels MicroCT. In der vierten Woche nach Trauma waren die Kallusdichte und der Kallusmineralgehalt bei den Tieren mit assoziiertem SHT signifikant größer als in der Gruppe mit einfacher Femurfraktur. In der achten Woche hingegen waren die Werte bezüglich Kallusdichte

und Kallusmineralgehalt in der Gruppe mit assoziiertem SHT signifikant kleiner. Song et al. propagieren deshalb ebenfalls die Theorie einer beschleunigten Frakturheilung durch assoziiertes SHT. Die Kallusvolumina wurden in dieser Studie nicht untersucht.

In der vorliegenden Studie ist der Verlauf der Kallusvolumina beider Gruppen durch physiologische Umbauvorgänge erklärbar. Bis zur dritten Woche nahm das Kallusvolumen durch die Produktion von Geflechtknochen kontinuierlich zu. In der dritten Woche war die Knochenheilung bei der Maus in der *Remodeling*-Phase angelangt⁴⁵. In dieser Phase wurde der vorläufige Geflechtknochen durch Lamellenknochen ersetzt und überschüssiger knöcherner Kallus abgebaut²⁶. Durch dieses *remodeling* erhielt der Knochen seine ursprüngliche Form zurück (Kapitel 1.1)^{1,45}. Die Zunahme der Kallusvolumina bis zur dritten Woche könnte also die Produktion von Geflechtknochen widerspiegeln. Die darauf folgende Abnahme bis zur vierten Woche könnte Ausdruck des Abbaus von überflüssigem Kallusgewebe sein.

Die Knochendichte nahm in beiden Gruppen über vier Wochen kontinuierlich zu (Abbildung 3.2). Auch dies stimmt mit den bekannten physiologischen Reparaturprozessen überein¹⁰. Die zunehmende Mineralisierung des weichen Kallus und der anschließende Umbau von weniger dichtem Geflechtknochen hin zu dichtem Lamellenknochen könnte eine Erklärung für die stärkere Dichtezunahme in der vierten Woche sein^{10,48}. Hiltunen et al. z. B. berichten von einer 8-fachen Zunahme der Kallusdichte zwischen Woche 3 und Woche 4¹⁰. Sie untersuchten die Knochenheilung bei dem gleichen wie in dieser Studie verwendeten Mausstamm. Dabei wurde die Tibia mit einem intramedullären Pin versorgt und anschließend geschlossen frakturiert. Durch histologische und chemische Untersuchungen des Kallus konnten sie für die starke Zunahme der Dichte die beginnende Mineralisierung des Kallus verantwortlich machen¹⁰. Die Veränderungen von Kallusvolumen und -dichte traten in beiden Gruppen zeitlich parallel auf.

Qualitative MikroCT Auswertung

In der Kombinations-Gruppe waren zu beiden Untersuchungszeitpunkten deutlich mehr Osteotomien vollständig überbrückt (79 % zu 60 % in Woche 3 und 89 % zu 60 % in Woche 4). Hiermit wird deutlich, dass in der Kombinations-Gruppe nicht einfach nur mehr Kallus im Osteotomiespalt vorhanden war, sondern dass es hier auch zum komplexen Vorgang einer zielgerichteten Durchbauung der Osteotomie gekommen ist. Diese Durchbauung war, wenn auch nicht signifikant, tendenziell effektiver und schneller in der Kombinations-Gruppe. In der dritten postoperativen Woche waren bei 3 Mäusen in der Fraktur-Gruppe die Osteotomien erst teilweise durchbaut. In der Kombinations-Gruppe befand sich drei Wochen postoperativ kein Tier mehr in diesem Übergangsstadium. Obwohl die Veränderungen von Kallusvolumen und -dichte in beiden Gruppen zeitgleich auftraten, könnte die effizientere Durchbauung der Osteotomie auf eine schnellere Knochenheilung in der Kombinations-Gruppe hinweisen.

In beiden Gruppen gab es Tiere, bei denen vier Wochen postoperativ der Osteotomiespalt nicht überbrückt war (Fraktur-Gruppe: 4 von 10 Tieren, Kombinations-Gruppe: 1 von 9 Tieren) (Tabelle 6). Für diese fehlende Durchbauung gibt es eine Reihe von möglichen Ursachen.

Eine gut belegte Ursache ist z. B. ein mangelnder Fragmentkontakt⁸. Über die Interposition von Weichteilen oder allein durch eine zu große Entfernung der Knochenenden kann die Überbrückung durch Kallus erschwert oder gänzlich verhindert werden⁴⁹. In dieser Studie ist der Osteotomiespalt mit 0,7 mm relativ groß gewählt worden. In vergleichbaren Studien wurde in der Regel ein Osteotomiespalt von maximal 0,4 mm verwendet^{45,50}. Der große Osteotomiespalt hat auf der einen Seite den Vorteil, dass er zu einer längeren Heilungsdauer führt, sodass auch kurzfristige Unterschiede zwischen den Gruppen erfasst werden können. Auf der anderen Seite steigt mit der Größe des Frakturspalts auch das Risiko einer unvollständigen Überbrückung⁴⁵.

Zwingenberger et al. untersuchten mit dem gleichen Fixateur-System die optimale Osteotomiespaltbreite für ein Pseudarthrosemodell an der Maus. Sie kamen dabei zu vergleichbaren Ergebnissen⁵⁰. Zur Beurteilung der Knochenheilung wurden 12

Wochen postoperativ MikroCT-Untersuchungen durchgeführt. Bei einer ähnlichen Osteotomiespaltbreite von 1 mm zeigten 3 von 8 Mäusen eine fehlende Durchbauung der Osteotomie. Bei einer Osteotomiespaltbreite von 2 mm war bei 5 von 8 und bei einer Breite von 3 mm bei 8 von 8 Mäusen der Osteotomiespalt nicht durchbaut⁵⁰.

Torsionsfestigkeit und -steifigkeit

Fraktur- und Kombinations-Gruppe

Bezüglich der Steifigkeit konnten wir im Vergleich zur Fraktur-Gruppe tendenziell höhere Werte in der Kombinations-Gruppe nach 3 und nach 4 Wochen nachweisen. Die Torsionsfestigkeiten zeigten nach 3 Wochen keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Eine Woche später jedoch waren die Femora der Kombinations-Gruppe signifikant fester als die Femora der Fraktur-Gruppe. Dabei erreichten einzelne Femora der Kombinations-Gruppe sogar ähnliche Steifig- und Festigkeiten wie die gesunden Femora der Kontroll-Gruppe (Tabelle 7 und Tabelle 8). Bei zwei Mäusen aus der Kombinations-Gruppe brach das Femur während der Testung nicht in Höhe der ursprünglichen Fraktur, sondern an einer anderen Stelle der Femurdiaphyse. Dies zeigt, dass bei diesen Tieren 4 Wochen postoperativ die Knochenheilung bereits bis zur Wiederherstellung der ursprünglichen mechanischen Integrität fortgeschritten war. In der Fraktur-Gruppe brachen alle Knochen im Bereich der ursprünglichen Fraktur.

Im Hinblick auf die Steifigkeit kamen Boes et al. zu teils ähnlichen Ergebnissen²⁶. Drei Wochen nach dem Eingriff ergaben ihre Untersuchungen signifikant höhere Torsionssteifigkeiten bei den Tieren mit kombiniertem SHT. Bezüglich der Torsionsfestigkeit konnten die Autoren aber keine Unterschiede feststellen. In Zusammenschau mit ihren radiologischen Ergebnissen schlussfolgerten die Autoren, dass der synergistische Effekt von SHT und Fraktur eher zu einer beschleunigten Knochenheilung mit besseren lastverteilenden Eigenschaften (Steifigkeit) als zu einer Heilung mit besseren lasttragenden Eigenschaften (Festigkeit) führt²⁶. Obwohl unsere Ergebnisse in Woche 3 ein ähnliches Bild zeigen, spricht der Verlauf von Steifigkeit und Festigkeit zwischen Woche 3 und Woche 4 gegen diese Theorie. Unsere Ergebnisse aus Woche 4 lassen neben der Steifigkeit nun auch einen

signifikanten Unterschied bezüglich der Festigkeit erkennen. Die Festigkeit entwickelt sich während der Frakturheilung generell etwas später als die Steifigkeit. Dies zeigen auch andere Studien an Kaninchen, Hund, Ratte und Maus^{10,51-53}. So lässt sich vermuten, dass die Ergebnisse von Boes et al. 21 Tage nach dem Eingriff ein relativ frühes Stadium der Knochenheilung widerspiegeln, in dem sich ein Unterschied bezüglich der Festigkeit noch nicht ausgebildet hat.

Unsere biomechanischen Ergebnisse aus Woche 4 korrelieren mit den Ergebnissen von Ozan et al.⁵⁴. Bei ihrer Studie an Ratten untersuchten sie den Einfluss des SHT auf die Frakturheilung mittels Vierpunktbiegetests (Tabelle 9). Bei der Kontrollgruppe wurde das Femur frakturiert und anschließend intramedullär stabilisiert. Bei der Versuchsgruppe erfolgte zusätzlich ein geschlossenes stumpfes SHT nach einem Modell von Marmarou et al.⁵⁵(Tabelle 9). Vier Wochen nach Operation hatten die Femora der Versuchsgruppe im Vergleich mit den Kontrollen eine signifikant höhere Biegefestigkeit und eine signifikant höhere Biegesteifigkeit⁵⁴. Auch wir konnten nach einer Versuchsdauer von vier Wochen eine signifikant höhere Festigkeit ($p=0,029$) und eine fast signifikant höhere Steifigkeit ($p=0,057$) bei den Mäusen mit kombiniertem Trauma feststellen. Ähnlich wie in der Studie von Boes et al. liefern auch Ozan und Kollegen nur Ergebnisse von einem Untersuchungszeitpunkt, weshalb auch hier keine Rückschlüsse auf den Heilungsverlauf gezogen werden können.

Die Versuche der vorliegenden Arbeit zeigen ähnliche Ergebnisse wie die angeführten bisherigen biomechanischen Studien^{26,27,54,56}. So konnten wir signifikant höhere Festigkeiten und tendenziell höhere Steifigkeiten bei den Tieren mit kombiniertem Trauma nachweisen. Dabei sind allerdings die hohe Rate an nicht überbrückten Osteotomien in der Fraktur-Gruppe und die relativ kleinen Gruppengrößen von nur 4 Tieren in der vierten Woche zu beachten.

SHT- und Kontroll-Gruppe

Eine interessante Beobachtung war, dass die Tiere der Kontroll-Gruppe in Woche 3 signifikant fester und signifikant steifer als die Tiere der SHT-Gruppe waren. Eine Woche später war dieser Unterschied nicht mehr feststellbar.

Diese Ergebnisse könnte man einerseits durch den operativen Eingriff erklären. Bei der SHT-Gruppe ist es im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe evtl. direkt postoperativ zu einer vermehrten Immobilisation gekommen. Das SHT und die Narkosebelastung könnten dazu geführt haben, dass die Tiere in den ersten Tagen die hintere Extremität weniger belastet haben. Die kurzfristig geringere biomechanische Festigkeit und Steifigkeit in Woche 3 könnte somit ein Ausdruck dieser Immobilisation sein.

Auf der anderen Seite könnte es aber auch durch das SHT zu einer direkten Beeinflussung des Knochenmetabolismus und damit der biomechanischen Eigenschaften gekommen sein.

In Lee et al. konnten z. B. bei ihrer experimentellen Studie von ähnlichen Beobachtungen berichten⁵⁶. Sie untersuchten an Ratten den Zusammenhang von SHT und Knochenmetabolismus ohne eine zusätzliche Fraktur. Dafür wurde bei allen Tieren eine Kraniektomie links parietal zwischen Lambdanaht und Bregmanaht gesetzt. In der Versuchsgruppe wurde im Anschluss durch eine *rapid bolus*-Injektion von Kochsalzwasser durch die eröffnete Schädeldecke ein SHT ausgelöst (siehe Methodendiskussion, *Fluid Percussion-Modell*)⁵⁶. Einen Tag vor Operation sowie eine und drei Wochen postoperativ wurde die Knochendichte von Femur und dem 4. und 5. Lendenwirbelkörper (LWK) gemessen (Tabelle 9). Drei Wochen postoperativ wurden die Tiere euthanasiert. Die Tibia wurde daraufhin mit einem Dreipunktbiegetest, der Femurhals mit einem Kompressionstest biomechanisch untersucht. Gemessen wurde jeweils nur die Biege- bzw. Kompressionsfestigkeit. Die Knochendichte der Lendenwirbelkörper und die der beiden distalen Femora, sowie die Festigkeit des rechten Femurhalses waren bei den Tieren mit SHT signifikant niedriger. Die Veränderung der Knochendichte in den Lendenwirbelkörpern wurde dabei bereits nach der ersten Woche festgestellt. Die Autoren erklären sich diese Ergebnisse durch evtl. aufgetretene motorische Defizite, die durch das SHT verursacht worden seien, was in der Folge zu einer vermehrten Immobilisation bei den Tieren mit SHT geführt habe⁵⁶. Ein konkreter Anhalt für diese Theorie wird von den Autoren jedoch nicht genannt. Unterschiede in den einzelnen Gruppen bzgl. Motorik oder Verhalten konnten in der vorliegenden Studie zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden.

Eine weitere mögliche Ursache für die Abnahme der biomechanischen Eigenschaften und der Knochendichte könnte aber auch in diesem Fall in einem direkten Einfluss des SHT auf den Knochen liegen. Anders als bei der vorliegenden Arbeit wurden die Kontrolltiere in der Studie von In Lee et al. einer Scheinoperation unterzogen. Folglich beruhen die von In Lee und Mitarbeitern festgestellten Veränderungen in Festigkeit und Knochendichte nicht auf der Operationsbelastung, sondern sind alleinige Auswirkungen des SHT. Ob dieser Einfluss über eine verminderte Belastung ausgeübt wurde oder ob auch hier vielleicht eine direktere Beziehung zwischen Gehirn und Knochen die Ursache ist, lässt sich in beiden Fällen nicht klären.

Eine genauere Untersuchung der postoperativen Belastung wäre eventuell eine Möglichkeit gewesen, eine kurzfristige postoperative Immobilisation als Ursache auszuschließen oder zu bestätigen. Auch hätten zusätzliche radiologische Untersuchungen der SHT- und Kontroll-Gruppe eventuell weitere Erkenntnisse liefern können. Dies wäre sicherlich ein spannender Ansatz für zukünftige Studien.

Kombiniert man die Theorie eines direkten (negativen) Einflusses des SHT auf den gesunden Knochen mit den Ergebnissen der Fraktur- und Kombinations-Gruppe, so ließe sich folgern, dass nicht das SHT an sich zu besseren biomechanischen Eigenschaften des Knochens führt (ganz im Gegenteil), sondern dass es erst durch die Verletzung des Knochens zu einer Art Aktion-Reaktion mit gesteigertem Knochenmetabolismus kommt.

Methodendiskussion

Tiermodell

Im Folgenden wird die Wahl von weiblichen C75/Black6-Mäusen begründet:

Für die Erforschung der Knochenheilung steht heutzutage eine große Auswahl an Tiermodellen zur Verfügung⁴⁵. In den letzten Jahren wurden vermehrt größere Tiere wie z. B. das Kaninchen oder das Schaf favorisiert. Grund dafür sind die zum Menschen sehr ähnlichen Knochenheilungsprozesse⁴⁵. Des Weiteren lassen sich für die Stabilisierung von Frakturen oft die gleichen Implantate und Operationsmethoden wie beim Menschen verwenden⁴⁵.

Vorteile von Versuchen mit Kleintieren wie der Ratte und der Maus sind eine hohe Resistenz gegenüber Infektionen, eine günstigere Haltung und Beschaffung sowie ein ökonomischer Einsatz von Pharmaka und teuren Reagenzien aufgrund des kleinen Körpergewichts^{40,45}. Insbesondere bei der Maus stellen die kleinen Dimensionen aber auch eine große Herausforderung bei der Entwicklung von Implantaten und Operationsmethoden dar. Durch die vollständige Entzifferung des Mäusegenoms und die Verfügbarkeit von genveränderten Mäusen und mausspezifischen Antikörpern wurde erstmals die Möglichkeit geschaffen, Mechanismen der Frakturheilung auf molekularer Ebene zu erforschen (*knockout Stämme*). Dies ist bislang mit keinem anderen Tiermodell möglich⁵⁷. Die Kenntnis vieler physiologischer und verhaltensorientierter Normwerte ist ein weiteres Argument für die Wahl der Maus als Versuchstier.

Bei Nagern gibt es bzgl. der Knochenheilung Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Metha et al. beschreiben z. B. eine schnellere Knochenheilung bei ihren männlichen Ratten⁵⁸ und Strube et al. konnten bei ihren weiblichen Tieren im Heilungsverlauf ein reduziertes maximales Drehmoment feststellen⁵⁹. Die längere Frakturheilungsdauer beim weiblichen Geschlecht hat den Vorteil, einzelne Frakturphasen genauer untersuchen zu können. Weibliche Mäuse können zudem in Gruppen von 6 bis 12 Tieren pro Käfig gehalten werden, während ihre männlichen Artgenossen angesichts einer größeren Aggressivität oft in Einzelkäfigen untergebracht werden müssen⁴⁵.

Das Alter der Tiere hat ebenfalls einen wichtigen Einfluss auf die Knochenheilung. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Heilungsfähigkeit mit dem Alter deutlich abnimmt^{58,60,61}. Um die Frakturheilung mit der von erwachsenen Menschen vergleichen zu können, sollten möglichst Tiere mit abgeschlossenem Knochenwachstum verwendet werden⁵⁰. Das Knochenwachstum bei der Maus ist mit ca. 8 Wochen abgeschlossen¹⁰. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit Tiere verwendet, die zum Studienbeginn zwischen 13 und 15 Wochen alt waren.

Für die Operation an Nagern stehen grundsätzlich zwei Narkosemethoden zur Verfügung. Die inhalative Narkose mit volatilen Narkotika und die injizierbare (intraperitoneale) Narkose. Bei dieser Studie erfolgten die Operationen unter inhalativer Narkose mit Isofluran. Diese Narkoseform erfordert eine ständige Überprüfung der Narkosetiefe anhand von Herzfrequenz, Atemfrequenz und Reflexstatus. Dies ist nötig, um die Dosierung ggf. anzupassen und um ein Verrutschen der Maske aufgrund einer versehentlichen Lageänderung des Tieres schnell korrigieren zu können. Die notwendige Applikation der Anästhetika über eine Inhalationsmaske kann zudem das operative Handling erschweren⁴⁵. Weitere Nachteile der Inhalationsnarkose sind die hohen Kosten und der höhere technische Aufwand. Die Vorteile dieser Narkoseform liegen in der kurzen Halbwertszeit der Anästhetika und der damit verbundenen guten Kontrolle und Steuerung der Anästhesie⁴⁵. Für die Tiere bedeutet dies eine geringere Belastung und eine schnellere Erholung postoperativ.

Die verwendeten Schmerzmedikamente können einen Einfluss auf die Frakturheilung haben. Insbesondere die nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID) beeinflussen durch die Hemmung der Cyclooxygenase die Entzündungskaskade⁶². Aus diesem Grund wurden in dieser Studie als Analgetika nur Tramadol-HCl (Tramal[®]-Tropfen) und Buprenorphin (Temgesic[®]) verwendet.

Präoperativ erhielten die Versuchstiere eine Einzelgabe von 0,02 ml Clindamycin. In experimentellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass andere Antibiotika wie Levofloxacin, Trovafloxacin, Ciprofloxacin, Gentamycin und Tetracyclin die Knochenheilung verzögern können⁶³. Clindamycin ist zudem wirksam gegen Staphylokokken und beta-hämolyisierende Streptokokken, die typisch für die infrage kommenden Weichteil- und Knocheninfektionen sind⁴⁵.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Studie an Mäusen mit den Ergebnissen anderer Studien an Ratten verglichen. Dabei ist im Vorfeld zu erwähnen, dass der zeitliche Ablauf der Frakturheilung zwischen diesen beiden Spezies zwar sehr ähnlich ist, allerdings bei der Ratte etwas länger dauert^{45,64}. Die Knochenheilung ist bei Mäusen mit ca. vier Wochen abgeschlossen, während es bei Ratten erst zwischen der 5. und 6. Woche zum Abschluss der Knochenheilung kommt^{65,66}.

Frakturmodell

Aufgrund der schon erwähnten kleinen Dimensionen bei der Maus, stellt die Entwicklung eines Frakturmodells mit standardisierter Stabilisierung eine große Herausforderung dar. Die meisten Studien verwenden einen intramedullären Pin zur Stabilisierung der Osteotomie^{10,67,68}. Dieses Modell wurde zuerst von Bonnarens und Einhorn 1984 am Rattenfemur beschrieben⁶⁷. Der Vorteil dieser Methode liegt in dem wenig invasiven und relativ einfach durchzuführenden chirurgischen Eingriff, dem niedrigen Implantatgewicht und den geringen Materialkosten⁴⁵. Nachteile bei der Verwendung eines derartigen intramedullären Kraftträgers ist die fehlende Rotations- und Axialstabilität der Fraktur⁶⁹. Das Resultat können heterogene Formen und Größen des Frakturspalts sein, die eine Standardisierung erschweren können⁷⁰. Zudem resultiert aus der Lage des Implantats eine Verletzung der Markhöhle und des Knochenmarks, die für eine physiologische Knochenheilung wichtig sind^{69,70}. Die hohe Rate an Dislokationen ist ein weiterer Nachteil dieses Modells⁷¹.

Eine Weiterentwicklung des intramedullären Pins stellt der Verriegelungsmarknagel dar. Durch eine Abflachung am proximalen und distalen Ende wird eine höhere Stabilität erreicht, die jedoch auch bei diesem Implantat keine rigide Stabilisierung der Fraktur ermöglicht⁷¹. Zudem resultiert auch bei diesem Pin eine Verletzung der Markhöhle⁷¹.

Neben diesen häufig verwendeten Implantaten wurden noch eine Reihe anderer Implantate wie die Intramedulläre Kompressionsschraube (*intramedullary compression screw*), das *pin-clip device*, die *interlocking nails* und die Verriegelungsplatte für Maus und Ratte entwickelt⁴⁵. Zusammengefasst besteht bei diesen Implantaten die Gefahr einer negativen Beeinflussung der Frakturzone⁶⁹, die bei den meisten Studien den zu untersuchenden Bereich darstellt.

Bei der Verwendung eines externen Fixateurs kann dagegen sichergestellt werden, dass der Bereich der Osteotomie oder der Fraktur unbeeinflusst bleibt⁴². Der externe Fixateur erlaubt dabei eine hohe Rotations- und Axialstabilität, sodass die Knochenheilung unter rigiden Voraussetzungen stattfinden kann⁷⁰. Es ist allgemein bekannt, dass die Stabilität der Frakturenenden einen großen Einfluss auf die Knochenheilung hat^{70,72}. So kann eine minimale interfragmentäre Bewegung die Knochenheilung fördern, aber eine zu starke Bewegung die Überbrückung des Frakturspalts durch Kallus unmöglich machen (siehe Diskussion der qualitativen MikroCT-Auswertung)⁴⁹. Auch die Möglichkeit der nach Bedarf veränderbaren Frakturstabilität stellt einen weiteren Vorteil dieser Methode dar⁷⁰. Als Nachteile sind die erhöhte Invasivität, das höhere Gewicht und die höheren Kosten des Implantats zu nennen. Die Option, die Knochenheilung weder durch das Implantat noch durch eine vermehrte interfragmentäre Bewegung zu beeinflussen, war der ausschlaggebende Punkt, sich bei dieser Fragestellung für den externen Fixateur zu entscheiden.

Schädel-Hirn-Trauma-Modell

Für die Untersuchung des SHT an Nagetieren wurden mehrere Traumamodelle etabliert. Im Folgenden werden die am häufigsten verwendeten Modelle kurz diskutiert und die Wahl des CCII-Modells begründet.

Die komplexe Verletzungssituation des menschlichen SHT macht eine vollständige Nachahmung durch ein Tiermodell schwierig^{17,73}. Zu den wichtigen Teilaspekten des SHT zählen die fokale Kontusion, die intrakranielle Blutung, die Perfusionsstörung, der mechanische Nervenfaserschaden und das posttraumatische Hirnödem^{17,73}.

Die Anforderungen an ein Tiermodell sind immer abhängig von der Fragestellung. Auf der einen Seite sollte ein Modell alle Teilaspekte des menschlichen SHT imitieren. Auf der anderen Seite sind zum besseren Verständnis des SHT Modelle hilfreich, die es ermöglichen, einen Teilaspekt getrennt vom anderen zu untersuchen⁷³. Aus diesem Grund haben sich im Laufe der Zeit verschiedene Modelle parallel etabliert.

Das Modell der kortikalen Kältenekrose

Bei diesem 1958 von Klatzko et al. entwickelten Modell wird ein Kältestempel auf den freigelegten Kortex gesetzt⁷⁴. Es resultiert eine kortikale Kältenekrose. Der Vorteil dieses Modells liegt in der besonders einfachen Handhabung, wodurch eine gute Reproduzierbarkeit gewährleistet wird⁷³. Der entscheidende Nachteil liegt bei der fehlenden mechanischen Einwirkung, weshalb dieses Traumamodell der klinischen Situation des menschlichen SHT nicht gerecht wird⁷³.

Das Weight Drop-Modell (Marmarou)

Dieses Modell wurde 1994 von Marmarou et al. entwickelt⁵⁵. Durch eine Plexiglasschiene wird ein Gewicht auf den intakten Schädel des Versuchstieres fallen gelassen. Eine auf der Schädeldecke befindliche Stahlplatte verhindert dabei eine Frakturierung der Schädeldecke. Unter dem Kopf des Tieres ist ein Schaumblock mit definierter Konsistenz und Elastizität platziert. Auf diese Weise kann die Stärke des Traumas reguliert werden⁵⁵. Durch das Trauma wird eine diffuse Schädigung des Hirngewebes verursacht. Es resultiert keine fokale Hirnläsion¹⁷. Bei diesem Modell stehen der diffuse Nervenfaserschaden und die Subarachnoidalblutung im Vordergrund⁷³. Weil keine vorherige Trepanation der Schädeldecke notwendig ist, ist dieses Modell eine schnelle und einfache Methode¹⁷.

Das Fluid Percussion-Modell

Dieses Modell wurde 1987 von Dixon und Mitarbeitern etabliert⁷⁵. Bei dieser Methode entsteht das Trauma durch eine schnelle Bolusinjektion von Flüssigkeit auf die zuvor freigelegte Dura mater. Ein Pendel ist dabei für die Beschleunigung der Flüssigkeitssäule ursächlich¹⁷. Die entscheidende Kritik dieser Methode liegt bei der resultierenden Läsion des Hirnstamms. Diese Läsion gilt beim Menschen nicht als typischer Teilaspekt des SHT⁴⁰. Das Modell eignet sich gut, wenn speziell der diffuse neuronale Zelluntergang untersucht werden soll⁷³.

Das Controlled Cortical Impact Injury-Modell

Dieses auch in der vorliegenden Studie verwendete SHT-Modell wurde erstmals von Andersen und Kollegen als Modell des spinalen Traumas beschrieben⁷⁶. Eine modifizierte Version wurde von Lighthall und Kollegen beim Frettchen 1988 vorgestellt⁷⁷. Eine adaptierte Version dieses Modells wurde 1991 von Dixon und Mitarbeitern an der Ratte und später auch an der Maus etabliert^{40,78,79}. In Kapitel 2.2.2 wurden der Aufbau und die Funktionsweise bereits ausführlich beschrieben.

Die Vorteile dieses Modells ergeben sich zum einen aus der guten biomechanischen Kontrolle des Traumas und zum anderen aus der Nachahmung fast aller wichtigen Teilaspekte des menschlichen SHT⁴⁰. Die feste Einstellung von Tischposition, Bolzenschlagwinkel, Schlagbolzengeschwindigkeit, Deformationstiefe und Kontaktzeit gewährleistet die Erhebung von standardisierten Daten mit geringer Streuung^{17,42,73}. Die genaue Einstellung und Präzision der Traumastärke erlaubt zudem eine akkurate Reproduzierbarkeit zwischen den einzelnen Laboratorien¹⁷. Aufgrund des Versuchsaufbaus ist auch eine permanente Überwachung der Tiere möglich⁴².

Damit die schwerer zu objektivierenden Versuchsabläufe eine Standardisierung nicht gefährden, sollte die Lagerung des Kopfes und die Einstellung der Nullposition des Bolzens innerhalb der Studie stets von derselben Person durchgeführt werden⁷³. Mit der Möglichkeit die einzelnen Parameter nach Bedarf einzustellen, erlaubt dieses Modell die Untersuchung einer weiten Spanne an möglichen Traumastärken. Die Methode ist durch ihren Aufbau zwar technisch aufwendig, aber für einen eingearbeiteten Untersucher einfach zu bedienen⁷³.

Mit Ausnahme der diffusen Hirnschädigung werden fast alle Aspekte des menschlichen SHT mit diesem Modell nachgestellt: Eine fokale Kontusion, subdurales Hämatom, Subarachnoidalblutung, intrazerebrales Hämatom, neuronaler Zellschaden, Axonschaden, Blut-Hirn-Schrankenschaden, Hirnödem und Perfusionsstörungen¹⁷.

Zur Beantwortung der vorliegenden Fragestellung war ein SHT-Modell notwendig, das möglichst alle Teilaspekte des menschlichen SHT simuliert und gleichzeitig eine gute Reproduzierbarkeit und höchste Standardisierbarkeit gewährleistet. Das CCII-

Modell erfüllt diese Kriterien und wurde deshalb als SHT-Modell in dieser Studie verwendet.

MikroCT-Untersuchung

Die radiologische Bildgebung erlaubt es, die Knochenheilung *in vivo* zu analysieren. Dies hat den großen Vorteil, dieselben Tiere wiederholt untersuchen zu können und somit eine Tötung der Tiere, wie es z. B. bei der rein histologischen Analyse des Kallus notwendig wäre, zu umgehen. Die Mikrocomputertomographie ist der konventionellen Radiographie bezüglich des Informationsgehaltes der einzelnen Aufnahmen deutlich überlegen⁴⁵. Auch die histologische Analyse von Knochen, die einzigartige Informationen über die zellulären Aspekte der Knochenheilung bietet, hat ihre Limitation, wenn morphologische Parameter untersucht werden sollen. So dienen häufig nur wenige zweidimensionale Schnitte als Grundlage für die Berechnung von komplexen dreidimensionalen Strukturen (z. B. Kallus)⁴³. Zudem ist mit der MikroCT- auch die *in vivo*-Analyse der Gewebemineralisation möglich. Die Mineralisationsdichte des Kallus ist ein guter Prädiktor für den Knochenheilungsprozess⁸⁰. Die Mineralisationsdichte korreliert dabei stark mit histologischen Untersuchungen und gibt eine verlässliche Auskunft über die Menge an kalzifiziertem Gewebe im Osteotomiebereich. Über die Veränderungen der beiden Parameter Kallusvolumen und -dichte kann abgeschätzt werden, welche Phase der Knochenheilung gerade durchlaufen wird (Kapitel 1.1)⁸¹. Zudem korreliert die Mineralisierungsdichte auch stark mit der Steifigkeit des Kallus^{80,81}. Dadurch lassen sich auch schon in den ersten Wochen der Knochenheilung nicht nur Informationen über die Quantität (Kallusvolumen), sondern auch über die Qualität (Stabilität) des Kallus gewinnen.

Bei der Mikrocomputertomographie ist im Vergleich mit anderen Methoden ein eventueller Einfluss von wiederholt applizierter Strahlung auf die Knochenmasse denkbar. Dieser Einfluss ist insbesondere dann möglich, wenn Bereiche mit geringem Knochenvolumen untersucht werden⁸². In der vorliegenden Arbeit wurde die Femurdiaphyse untersucht, ein Bereich mit hohem Knochenvolumen⁴³. Klinck et al. untersuchten an weiblichen C57BL/6J-Mäusen die proximale Tibiametaphyse, ein Bereich mit deutlich niedrigerem Knochenvolumen⁴³. Sie konnten nach Durchführung

von vier MikroCT-Scans mit einer ähnlichen Strahlenbelastung (10,5 μm *isotropic voxel size*, 55 keV, 109 μA , 200 ms *integration time*, vivaCT 40 Scanco Medical AG) keinen signifikanten Unterschied in der Knochendichte (BV/TV) zwischen der bestrahlten und der unbestrahlten Extremität nachweisen⁸².

Biomechanik

Während der biomechanischen Testung erfährt das Frakturgewebe Belastungen, die den Belastungen *in vivo* sehr ähnlich sind⁸³. Dies gibt der biomechanischen Testung im Vergleich mit den meisten anderen Untersuchungsmethoden eine besondere Stellung und ist der Grund für die häufige Anwendung in der Knochenforschung⁸³.

Es gibt viele unterschiedliche biomechanische Testmethoden. Die am häufigsten verwendeten sind der Dreipunktbiegetest, der Vierpunktbiegetest, der Kompressionstest und der Torsionstest.

Biegetests eignen sich generell gut für die Testung von perfekten Zylindern. Doch wenn ein unregelmäßig geformter Körper wie z. B. Knochen oder Frakturkallus untersucht wird, sinkt die Genauigkeit der Testung⁶⁴. Dreipunktbiegetests haben den Nachteil, dass die Belastung nicht gleichmäßig verteilt wird. Der Frakturkallus erfährt dabei in seinem Zentrum Spitzenbelastungen, die zur Distorsion von Kallusstrukturen führen⁶⁴. Der Vierpunktbiegetest eignet sich für viele Tiermodelle. Allerdings muss der zu testende Knochenabschnitt (Messlänge) lang genug sein (in der Regel das 16-fache des Knochendurchmessers), um Messungenauigkeiten zu verhindern⁸⁴. Für das Mausfemur würde dies bei einem durchschnittlichen Durchmesser von 1,86 mm eine Messlänge von fast 30 mm bedeuten⁶⁴. Das Femur einer 30-g-Maus ist aber im Durchschnitt gerade einmal 14,8 mm lang⁶⁴. Standardisierte Vierpunktbiegetests am Mausfemur erweisen sich folglich als schwierig.

Der Torsionstest hat den großen Vorteil, dass die Belastung auf die gesamte Knochendiaphyse gleichmäßig verteilt wird⁸⁵. Hierdurch kann das Femur über seine gesamte Diaphysenlänge getestet werden. Somit ist sichergestellt, dass das Femur auch tatsächlich an seiner schwächsten Stelle bricht. Über die Erfassung der Torsionssteifigkeit und der Torsionsfestigkeit lässt sich die biomechanische Qualität

des neu entstandenen Kallusgewebes überprüfen, weshalb diese Messgrößen häufig in Studien Verwendung finden^{86,87}.

Fazit

In der vorliegenden Studie konnte radiologisch und biomechanisch gezeigt werden, dass die Kombinations-Gruppe (SHT und Femurfraktur) im Vergleich zur Fraktur-Gruppe ein signifikant größeres Kallusvolumen, eine tendenziell höhere Kallusdichte, eine tendenziell bessere Kallusüberbrückung und mit der Limitation einer kleinen Gruppengröße in der vierten Woche auch einen signifikant festeren und tendenziell steiferen Kallus produzierte. Eine beschleunigte Knochenheilung konnte in dieser Studie nicht eindeutig belegt werden. Dennoch sprechen die Ergebnisse der qualitativen MikroCT-Auswertung für eine tendenziell schnellere Durchbauung der Osteotomien in der Kombinations-Gruppe.

Interessanterweise hatten die nicht operierten Femora der SHT-Gruppe in der dritten postoperativen Woche eine signifikant geringere Steifigkeit und Festigkeit im Vergleich mit den Femora der Kontroll-Gruppe. Eine Woche später war dieser Unterschied nicht mehr nachweisbar. Diese Erkenntnisse geben Anlass zu der Vermutung, dass in diesem Fall das SHT einen negativen Einfluss auf den Knochenmetabolismus und damit auf die biomechanischen Eigenschaften ausübt. Übertragen auf die Ergebnisse der Fraktur- und Kombinations-Gruppe könnte dies bedeuten, dass es nicht durch das SHT allein, sondern nur durch die Kombination von SHT und Knochenverletzung zu dem Phänomen einer verbesserten Knochenheilung kommt. Dies würde für eine Art Aktion-Reaktion zwischen Gehirn und verletzten Knochen sprechen.

Rückblickend hätten eine zusätzliche radiologische Untersuchung der gesunden Femora (SHT- und Kontroll-Gruppe) und eine genauere Untersuchung der postoperativen Belastungen eventuell weitere spannende Erkenntnisse erbringen können.

In Zusammenschau aller Ergebnisse scheint das SHT einen Einfluss auf die Reparaturprozesse des Knochens auszuüben. Für die Produktion eines voluminöseren, dichteren und stabileren Kallus ist wahrscheinlich die Kombination von SHT und Knochenverletzung verantwortlich.

Weitere Studien müssen nun klären, über welche Stoffwechselwege ein Einfluss des SHT auf den Knochen vermittelt wird und ob sich die gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen übertragen lassen. Vielleicht könnte in Zukunft ein genaueres Verständnis auf diesem Gebiet zu neuen Therapieansätzen in der Frakturversorgung führen.

5. Zusammenfassung

Zahlreiche klinische Beobachtungen führten zu der weit verbreiteten Hypothese, dass Frakturen langer Röhrenknochen bei Schädel-Hirn-Trauma (SHT)-Patienten unter einer vermehrten Kallusbildung frühzeitig heilen. Bis zum heutigen Tag gibt es keinen detaillierten quantitativen Beweis für diese Hypothese, denn alle bisherigen klinischen und experimentellen Studien zu dieser Fragestellung basieren hauptsächlich auf Untersuchungen von Röntgenbildern und klinischen Symptomen. Ziel dieser Arbeit war es, an einem Mausmodell mikrocomputertomographisch und biomechanisch zu untersuchen, ob das SHT einen Einfluss auf die Kallusbildung während der Frakturheilung hat.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde C57/Black6-Mäuse (n=133, weiblich, 12-15 Wochen alt) in 4 Gruppen randomisiert (Fraktur-Gruppe, Kombinations-Gruppe, SHT-Gruppe, Kontroll-Gruppe). In der Fraktur-Gruppe wurde den Mäusen das linke Femur mit einem externen Fixateur versorgt und im Anschluss eine Osteotomie durchgeführt. In der Kombinations-Gruppe wurde vor der Osteotomie zusätzlich ein SHT mit dem CCII-Modell (Controlled Cortical Impact Injury Modell) gesetzt. Die Mäuse der SHT-Gruppe erhielten nur ein SHT. Eine Gruppe ohne Operation diente als Kontroll-Gruppe. Insgesamt sind die Daten von n=114 in die Auswertung eingegangen. Der Knochenheilungsverlauf der Kombinations-Gruppe (n=29) und Fraktur-Gruppe (n=30) wurde in wöchentlichen Abständen mikrocomputer-tomographisch beobachtet (Kallusvolumen, Kallusdichte, Durchbauung des Osteotomiespaltes). In jeder der 4 Gruppen wurde bei einem Teil der Mäuse (n=47) 3 und 4 Wochen postoperativ auch die biomechanischen Eigenschaften des Kallus im Torsionstest untersucht (Torsionsfestigkeit, Torsionssteifigkeit).

Die MikroCT-Untersuchung zeigte, dass sich ab der 2. Woche signifikant mehr Kallus in der Kombinations-Gruppe als in der Fraktur-Gruppe gebildet hat ($p=0,020$). In der postoperativen 3. Woche blieb dieser signifikante Unterschied bestehen und nahm bis zur 4. Woche noch einmal zu (Woche 3: $p=0,039$; Woche 4: $p<0,001$). Die Kallusdichte stieg während der ersten 3 Wochen in beiden Gruppen auf ähnliche Werte an. In der 4. Woche nahm die Dichte in der Kombinations-Gruppe stärker zu.

Dieser Unterschied erreichte aber keine statistische Signifikanz ($p=0,053$). In der 4. postoperativen Woche war der Kallus in der Kombinations-Gruppe signifikant fester ($p=0,029$) und tendenziell steifer ($p=0,057$). Die Torsionssteifigkeit des Kallus war 3 Wochen postoperativ in der Kombinations-Gruppe tendenziell höher ($p=0,083$). Die biomechanische Testung der Femora in der Kontroll- und SHT-Gruppe ergaben nach 3 Wochen eine signifikant höhere Festigkeit und Steifigkeit in der Kontroll-Gruppe ($p=0,029$ und $p=0,040$). Eine Woche später war dieser Unterschied nicht mehr signifikant.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Versuchstiere mit Femurosteotomie und SHT ab der zweiten postoperativen Woche deutlich mehr Kallus produzierten. Die Hypothese einer durch das SHT vermehrten Kallusbildung konnte hiermit bestätigt werden. Auch hinsichtlich der Kallusdichte wurden in der vierten Woche tendenziell höhere Werte bei den Tieren mit kombiniertem Trauma festgestellt. Die höheren Werte bezüglich der Steifigkeit und Festigkeit sprechen auch für eine Beeinflussung der biomechanischen Eigenschaften des Kallus. Die Hypothese einer schnelleren Knochenheilung konnte nicht eindeutig belegt werden. Obwohl die Osteotomien in der Kombinations-Gruppe tendenziell effizienter und schneller durchbaut waren, zeigten die Veränderungen von Kallusvolumen und Dichte in der Fraktur- und der Kombinations-Gruppe einen gleichen zeitlichen Verlauf. Die biomechanischen Ergebnisse der SHT- und Kontroll-Gruppe geben Anlass zu der Vermutung, dass nur die Kombination von SHT und Verletzung eines langen Röhrenknochens zu dem Phänomen einer verbesserten Knochenheilung führt. Ohne eine assoziierte Knochenverletzung scheint das SHT eine Schwächung der biomechanischen Eigenschaften des Knochens zu bewirken. Dies könnte für eine Art Aktion-Reaktion zwischen Gehirn und Knochen sprechen.

6. Literaturverzeichnis

1. Lippert H. Lehrbuch Anatomie: Elsevier, Urban&FischerVerlag; 2011.
2. Voggenreiter G. Knochenheilung. Perioperative Medizin. 2009;1(2):86-95.
3. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. Injury. 2011;42(6):551-5.
4. Schmidt-Bleek K, Schell H, Schulz N, Hoff P, Perka C, Buttgerit F, Volk H-D, Lienau J, Duda GN. Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. Cell and tissue research. 2012;347(3):567-73.
5. Siewert J-R, Brauer RB. Basiswissen Chirurgie: Springer DE; 2007.
6. Balogh ZJ, Reumann MK, Gruen RL, Mayer-Kuckuk P, Schuetz MA, Harris IA, Gabbe BJ, Bhandari M. Advances and future directions for management of trauma patients with musculoskeletal injuries. The Lancet. 2012;380(9847):1109-19.
7. Wirth CJ, Mutschler W-E, Kohn D, Pohlemann T. Praxis der Orthopädie und Unfallchirurgie: Georg Thieme Verlag; 2013.
8. Runkel M, Rommens P. Pseudarthrosen. Der Unfallchirurg. 2000;103(1):51-63.
9. Nunamaker D. Experimental models of fracture repair. Clinical Orthopaedics and Related Research. 1998;355:S56-S65.
10. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT. A standardized experimental fracture in the mouse tibia. Journal of orthopaedic research. 1993;11(2):305-12.
11. Association IBI. International Brain Injury Association. Brain injury facts. 2013 [cited 2013 18.12.]; Available from: www.internationalbrain.org/content.php?pages.
12. Lehmann U, Rickels E, Krettek C. Polytrauma mit Schädel-Hirn-Trauma Primär definitive operative Versorgung der langen Röhrenknochen? Der Unfallchirurg. 2001;104(3):196-209.
13. Neugebauer E, Hensler T, Rose S, Maier B, Holanda M, Raum M, Rixen D, Marzi I. Das schwere Schädel-Hirn-Trauma bei Mehrfachverletzten Eine Bestandsaufnahme zur Interaktion lokaler und systemischer Mediatorwirkungen. Der Unfallchirurg. 2000;103(2):122-31.
14. Ruchholtz S, Nast-Kolb D. Schädel-Hirn-Trauma. Der Nervenarzt. 2003;74(2):179-94.

15. Meixensberger J, Roosen K. Clinical and pathophysiological significance of severe neurotrauma in polytraumatized patients. *Langenbeck's Archives of Surgery*. 1998;383(3-4):214-9.
16. Regel G, Lobenhoffer P, Grotz M, Pape H, Lehmann U, Tscherne H. Treatment results of patients with multiple trauma: an analysis of 3406 cases treated between 1972 and 1991 at a German Level I Trauma Center. *Journal of Trauma-Injury, Infection, and Critical Care*. 1995;38(1):70-8.
17. Morales D, Marklund N, Lebold D, Thompson H, Pitkanen A, Maxwell W, Longhi L, Laurer H, Maegele M, Neugebauer E. Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better mousetrap? *Neuroscience*. 2005;136(4):971-89.
18. Newman RJ, Stone MH, Mukherjee SK. Accelerated fracture union in association with severe head injury. *Injury*. 1987;18(4):241-6.
19. Morley J, Marsh S, Drakoulakis E, Pape H-C, Giannoudis PV. Does traumatic brain injury result in accelerated fracture healing? *Injury*. 2005;36(3):363-8.
20. Perkins R, Skirving AP. Callus formation and the rate of healing of femoral fractures in patients with head injuries. *J Bone Joint Surg Br*. 1987 Aug;69(4):521-4.
21. Garland DE. Clinical observations on fractures and heterotopic ossification in the spinal cord and traumatic brain injured populations. *Clin Orthop Relat Res*. 1988 Aug(233):86-101.
22. Spencer R. The effect of head injury on fracture healing. A quantitative assessment. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*. 1987;69(4):525-8.
23. Calandriello B. Callus Formation in Severe Brain Injuries. *Bull Hosp Joint Dis*. 1964 Oct;25:170-5.
24. Hofman M, Koopmans G, Kobbe P, Poeze M, Andruszkow H, Brink PR, Pape HC. Improved fracture healing in patients with concomitant traumatic brain injury: proven or not? *Mediators Inflamm*. 2015;2015:204842.
25. Giannoudis P, Mushtaq S, Harwood P, Kambhampati S, Dimoutsos M, Stavrou Z, Pape H. Accelerated bone healing and excessive callus formation in patients with femoral fracture and head injury. *Injury*. 2006;37(3):S18-S24.
26. Boes M, Kain M, Kakar S, Nicholls F, Cullinane D, Gerstenfeld L, Einhorn TA, Tornetta P, 3rd. Osteogenic effects of traumatic brain injury on experimental fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am*. 2006 Apr;88(4):738-43.
27. Wei Y, Wang L, Clark JCM, Dass CR, Choong PFM. Elevated leptin expression in a rat model of fracture and traumatic brain injury. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2008;60(12):1667-72.

28. Gautschi OP, Cadosch D, Frey SP, Skirving AP, Filgueira L, Zellweger R. Serum-mediated osteogenic effect in traumatic brain-injured patients. *ANZ J Surg.* 2009 Jun;79(6):449-55.
29. Cadosch D, Gautschi OP, Thyer M, Song S, Skirving AP, Filgueira L, Zellweger R. Humoral factors enhance fracture-healing and callus formation in patients with traumatic brain injury. *J Bone Joint Surg Am.* 2009 Feb;91(2):282-8.
30. Song Y, Bi L, Zhang Z, Huang Z, Hou W, Lu X, Sun P, Han Y. Increased levels of calcitonin gene-related peptide in serum accelerate fracture healing following traumatic brain injury. *Mol Med Rep.* 2012 Feb;5(2):432-8.
31. Garland DE, Dowling V. Forearm fractures in the head-injured adult. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 1983;176:190-6.
32. Garland DE, Rothi B, Waters RL. Femoral fractures in head-injured adults. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 1982;166:219-25.
33. Garland DE, Toder L. Fractures of the tibial diaphysis in adults with head injuries. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 1980;150:198-202.
34. Garland DE, O'Hollaren RM. Fractures and dislocations about the elbow in the head-injured adult. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 1982;168:38-41.
35. Wildburger R, Zarkovic N, Egger G, Petek W, Zarkovic K, Hofer H. Basic fibroblast growth factor (bFGF) immunoreactivity as a possible link between head injury and impaired bone fracture healing. *Bone and mineral.* 1994;27(3):183-92.
36. Bidner SM, Rubins I, Desjardins J, Zukor D, Goltzman D. Evidence for a humoral mechanism for enhanced osteogenesis after head injury. *Journal of Bone and Joint Surgery(American).* 1990;72(8):1144-9.
37. Bossche LV, Vanderstraeten G. Heterotopic ossification: a review. *J Rehabil Med.* 2005;37(3):129-36.
38. Pape H-C, Lehmann U, Van Griensven M, Gänsslen A, Von Glinski S, Krettek C. Heterotopic ossifications in patients after severe blunt trauma with and without head trauma: incidence and patterns of distribution. *Journal of orthopaedic trauma.* 2001;15(4):229-37.
39. Smith R. Head injury, fracture healing and callus. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume.* 1987 August 1, 1987;69-B(4):518-20.
40. Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA, Hayes RL. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods.* 1991 Oct;39(3):253-62.

41. Kroppenstedt SN, Thomale UW, Griebenow M, Sakowitz OW, Schaser KD, Mayr PS, Unterberg AW, Stover JF. Effects of early and late intravenous norepinephrine infusion on cerebral perfusion, microcirculation, brain-tissue oxygenation, and edema formation in brain-injured rats. *Crit Care Med.* 2003 Aug;31(8):2211-21.
42. Tsitsilonis S, Seemann R, Misch M, Wichlas F, Haas NP, Schmidt-Bleek K, Kleber C, Schaser KD. The effect of traumatic brain injury on bone healing: an experimental study in a novel in vivo animal model. *Injury.* 2015 Apr;46(4):661-5.
43. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010 Jul;25(7):1468-86.
44. Mehta M, Strube P, Peters A, Perka C, Hutmacher D, Fratzl P, Duda G. Influences of age and mechanical stability on volume, microstructure, and mineralization of the fracture callus during bone healing: Is osteoclast activity the key to age-related impaired healing? *Bone.* 2010;47(2):219-28.
45. Histing T, Garcia P, Holstein J, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke M, Wehner T, Bindl R. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone.* 2011;49(4):591-9.
46. Maegele M, Riess P, Sauerland S, Bouillon B, Hess S, McIntosh TK, Mautes A, Brockmann M, Koebeke J, Knifka J. Characterization of a new rat model of experimental combined neurotrauma. *Shock.* 2005;23(5):476-81.
47. Bourque W, Gross M, Hall B. A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Laboratory animal science.* 1992;42(4):369.
48. White 3rd A, Panjabi MM, Southwick WO. The four biomechanical stages of fracture repair. *The Journal of bone and joint surgery American volume.* 1977;59(2):188.
49. Ekkernkamp A, Muhr G, Josten C. Die infizierte Pseudarthrose. *Der Unfallchirurg.* 1996;99(12):914-24.
50. Zwingenberger S, Niederlohmann E, Vater C, Rammelt S, Matthys R, Bernhardt R, Valladares RD, Goodman SB, Stiehler M. Establishment of a femoral critical-size bone defect model in immunodeficient mice. *Journal of Surgical Research.* 2013;181(1):e7-e14.
51. Henry A, Freeman M, Swanson S. Studies on the mechanical properties of healing experimental fractures. *Proceedings of the Royal Society of Medicine.* 1968;61(9):902.
52. Rand J, An KN, Chao E, Kelly P. A comparison of the effect of open intramedullary nailing and compression-plate fixation on fracture-site blood

- flow and fracture union. The Journal of bone and joint surgery American volume. 1981;63(3):427.
53. Aro H, Wippermann B, Hodgson S, Wahner H, Lewallen D, Chao E. Prediction of properties of fracture callus by measurement of mineral density using micro-bone densitometry. J Bone Joint Surg Am. 1989;71(7):1020-30.
54. Ozan F, Yildiz H, Bora OA, Pekedis M, Coskun GA, Gore O. The effect of head trauma on fracture healing: biomechanical testing and finite element analysis. Acta Orthop Traumatol Turc. 2010;44(4):313-21.
55. Marmarou A, Foda MAA-E, Brink Wvd, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats: Part I: Pathophysiology and biomechanics. Journal of neurosurgery. 1994;80(2):291-300.
56. In Lee J, Hyun Kim J, Won Kim H, Suk Choi E, Hoon Lim S, Jin Ko Y, Min Han Y. Changes in bone metabolism in a rat model of traumatic brain injury. Brain Injury. 2005;19(14):1207-11.
57. Jacenko O, Olsen B. Transgenic mouse models in studies of skeletal disorders. The Journal of rheumatology Supplement. 1995;43:39-41.
58. Mehta M, Strube P, Peters A, Perka C, Hutmacher D, Fratzl P, Duda GN. Influences of age and mechanical stability on volume, microstructure, and mineralization of the fracture callus during bone healing: is osteoclast activity the key to age-related impaired healing? Bone. 2010 Aug;47(2):219-28.
59. Strube P, Mehta M, Baerenwaldt A, Trippens J, Wilson CJ, Ode A, Perka C, Duda GN, Kasper G. Sex-specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. Bone. 2009;45(6):1065-72.
60. Meyer RA, Tsahakis PJ, Martin DF, Banks DM, Harrow ME, Kiebzak GM. Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. Journal of orthopaedic research. 2001;19(3):428-35.
61. Lu C, Miclau T, Hu D, Hansen E, Tsui K, Puttlitz C, Marcucio RS. Cellular basis for age-related changes in fracture repair. Journal of orthopaedic research. 2005;23(6):1300-7.
62. Spiro AS, Timo Beil F, Baranowsky A, Barvencik F, Schilling AF, Nguyen K, Khadem S, Seitz S, Rueger JM, Schinke T. BMP-7-induced ectopic bone formation and fracture healing is impaired by systemic NSAID application in C57BL/6-mice. Journal of orthopaedic research. 2010;28(6):785-91.
63. Pountos I, Georgouli T, Blokhuis TJ, Pape HC, Giannoudis PV. Pharmacological agents and impairment of fracture healing: what is the evidence? Injury. 2008;39(4):384-94.

64. Manigrasso MB, O'Connor JP. Characterization of a closed femur fracture model in mice. *Journal of orthopaedic trauma*. 2004;18(10):687-95.
65. Schmidmaier G, Wildemann B, Melis B, Krummrey G, Einhorn TA, Haas NP, Raschke M. Development and characterization of a standard closed tibial fracture model in the rat. *European Journal of trauma*. 2004;30(1):35-42.
66. Claes L, Blakytyn R, Göckelmann M, Schoen M, Ignatius A, Willie B. Early dynamization by reduced fixation stiffness does not improve fracture healing in a rat femoral osteotomy model. *Journal of orthopaedic research*. 2009;27(1):22-7.
67. Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *Journal of orthopaedic research*. 1984;2(1):97-101.
68. Holstein JH, Matthys R, Histing T, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Meier C, Pohlemann T, Menger MD. Development of a stable closed femoral fracture model in mice. *Journal of Surgical Research*. 2009;153(1):71-5.
69. Histing T, Holstein JH, Garcia P, Matthys R, Kristen A, Claes L, Menger MD, Pohlemann T. Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture. *Journal of orthopaedic research*. 2009;27(9):1152-6.
70. Röntgen V, Blakytyn R, Matthys R, Landauer M, Wehner T, Göckelmann M, Jermendy P, Amling M, Schinke T, Claes L. Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator. *Journal of orthopaedic research*. 2010;28(11):1456-62.
71. Holstein J, Menger M, Culemann U, Meier C, Pohlemann T. Development of a locking femur nail for mice. *Journal of biomechanics*. 2007;40(1):215-9.
72. Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D, Seidl W, Margevicius KJ, Augat P. Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1998;355:S132-S47.
73. Thomale U-WN. Evaluation des tierexperimentellen Modells einer traumatischen kortikalen Kontusion (Controlled Cortical Impact Injury) für Therapiestudien: Humboldt-Univ.; 2001.
74. Klatzo I, Piraun A, Laskowski EJ. The relationship between edema, blood-brain-barrier and tissue elements in a local brain injury. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 1958;17(4):548-64.
75. Dixon CE, Lyeth BG, Povlishock JT, Findling RL, Hamm RJ, Marmarou A, Young HF, Hayes RL. A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *Journal of neurosurgery*. 1987;67(1):110-9.
76. Anderson TE. A controlled pneumatic technique for experimental spinal cord contusion. *Journal of neuroscience methods*. 1982;6(4):327-33.

77. Lighthall JW. Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *Journal of neurotrauma*. 1988;5(1):1-15.
78. Smith DH, Soares HD, Pierce JS, Perlman KG, Saatman KE, Meaney DF, Dixon CE, McINTOSH TK. A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *Journal of neurotrauma*. 1995;12(2):169-78.
79. Hannay HJ, Feldman Z, Phan P, Keyani A, Panwar N, Goodman JC, Robertson CS. Validation of a controlled cortical impact model of head injury in mice. *Journal of neurotrauma*. 1999;16(11):1103-14.
80. Shefelbine SJ, Simon U, Claes L, Gold A, Gabet Y, Bab I, Müller R, Augat P. Prediction of fracture callus mechanical properties using micro-CT images and voxel-based finite element analysis. *Bone*. 2005;36(3):480-8.
81. Augat P, Merk J, Genant H, Claes L. Quantitative assessment of experimental fracture repair by peripheral computed tomography. *Calcified tissue international*. 1997;60(2):194-9.
82. Klinck RJ, Campbell GM, Boyd SK. Radiation effects on bone architecture in mice and rats resulting from in vivo micro-computed tomography scanning. *Medical engineering & physics*. 2008;30(7):888-95.
83. Ekeland A, Engesæter LB, Langeland N. Influence of age on mechanical properties of healing fractures and intact bones in rats. *Acta Orthopaedica*. 1982;53(4):527-34.
84. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*. 1993;14(4):595-608.
85. Burstein A, Frankel V. A standard test for laboratory animal bone. *Journal of biomechanics*. 1971;4(2):155-8.
86. Turner C. Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. *Osteoporosis International*. 2002;13(2):97-104.
87. Netz P, Eriksson K, Strömberg L. Torsional Strength and Geometry of Diaphyseal Bone: An Experimental Study on Dogs. *Acta Orthopaedica*. 1978;49(5):430-4.

7. Anhang

7.1 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7.2 Publikationsliste

Locher RJ, **Lünnemann T**, Garbe A, Schaser K, Schmidt-Bleek K, Duda G, Tsitsilonis S. Traumatic brain injury and bone healing: radiographic and biomechanical analyses of bone formation and stability in a combined murine trauma model. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2015 Dec;15(4):309-15.

7.3 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Tim Lünemann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Der Einfluss des Schädel-Hirn-Trauma auf die Eigenschaften des Kallus während der Knochenheilung“

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

7.4 Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Tim Lünemann hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Locher RJ, **Lünemann T**, Garbe A, Schaser K, Schmidt-Bleek K, Duda G, Tsitsilonis S. Traumatic brain injury and bone healing: radiographic and biomechanical analyses of bone formation and stability in a combined murine trauma model. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2015 Dec;15(4):309-15.

Beitrag im Einzelnen:

- Assistenz bei den Operationen, tägliche Käfigvisiten und Pflege der Tiere
- Durchführung der Biomechanik- und Mikro-CT-Untersuchungen
- Datenauswertung und –interpretation
- Erstellung sämtlicher Grafiken

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

7.5 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Klaus-Dieter Schaser für die Überlassung des Themas der Forschungsarbeit und der konstruktiven Arbeitsgruppen-Treffen.

Insbesondere bedanken möchte ich mich bei Dr. med. Serafim Tsitsilonis für die großartige Betreuung. Die unermüdliche Motivation sowie schnelle und kompetente Hilfsbereitschaft haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein herzlicher Dank geht auch an die restliche Arbeitsgruppe: Dr. med. Ricarda Locher, Anja Garbe und Frank Graef, mit denen ich so viele heitere und kalte Stunden im Labor und MikroCT verbringen durfte.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des Julius-Wolff-Instituts und der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité-Universitätsmedizin Berlin Campus Virchow-Klinikum welche stets für jegliche Fragen als Ansprechpartner zur Verfügung waren und alles möglich gemacht haben, damit ich die Messungen durchführen konnte.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester für die vielseitige Unterstützung und vielen lieben Worte, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.