

**Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und aus dem
Julius Wolff Institut
Charité - Universitätsmedizin Berlin**

**Einfluss der kombinierten mechanischen und
biologischen Stimulation auf die Defektheilung – eine
mikrocomputertomographische und biomechanische
Untersuchung im Pseudarthrosemodell der Ratte**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Kerstin Hassanein
geb. Schreiber
Tierärztin aus Berlin**

**Berlin 2020
Journal-Nr.: 4036**

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und aus dem
Julius Wolff Institut
Charité - Universitätsmedizin Berlin

Einfluss der kombinierten mechanischen und
biologischen Stimulation auf die Defektheilung – eine
mikrocomputertomographische und biomechanische
Untersuchung im Pseudarthrosemodell der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Kerstin Hassanein
geb. Schreiber
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2020
Journal-Nr.: 4036

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Salah Amasheh
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Georg N. Duda
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Heike Tönhardt

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

rats, animal models, osteotomy (MeSH), fractures, pseudarthrosis (MeSH), X radiation, microradiography, computed tomography

Tag der Promotion: 09.03.2020

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-092-9

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2020

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2021

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
2 Stand des Wissens	3
2.1 Biologie des Knochens	3
2.1.1 Makroskopischer Knochenaufbau	3
2.1.2 Mikroskopische Knochenzusammensetzung	5
2.1.3 Osteogenese und Knochenformen	8
2.2 Physiologischer Ablauf der Knochenheilung	12
2.2.1 Primäre Frakturheilung	12
2.2.2 Sekundäre Frakturheilung	14
2.3 Komplikationen der Frakturheilung	20
2.4 Biologische Stimulation	24
2.4.1 Wachstumsfaktoren.....	24
2.4.2 Bone morphogenetic protein- 2 (BMP-2).....	27
2.5 Mechanische Stimulation	29
2.5.1 Osteosynthesen	29
2.5.2 Fixateur externe	30
2.6. Zielsetzung und Hypothese der Arbeit	32
3 Material und Methoden	34
3.1 Versuchstiere	34
3.1.1 Haltung.....	34
3.1.2 Einteilung der Versuchsgruppen.....	35
3.2 Operation	36
3.2.1 Fixateur externe	36
3.2.2 Osteotomie	37
3.2.3 Nachsorge	41
3.3 Radiologische Untersuchungen	41
3.3.1 Konventionelles Röntgen.....	41
3.3.2 Mikrocomputertomographie (Mikro-CT)	42

3.4 Euthanasie und Probenentnahme.....	45
3.4.1 Euthanasie	45
3.4.2 Probenentnahme und Aufbereitung	45
3.5 Biomechanische <i>in vitro</i> Testung	46
3.6 Auswertung der Rohdaten	50
3.6.1 Deskriptive röntgenologische Auswertung.....	50
3.6.2 Mikrocomputertomographische Auswertung	50
3.6.3 Biomechanische Auswertung.....	53
3.6.4 Statistische Auswertung.....	54
4 Ergebnisse	56
4.1 Konventionelles Röntgen	57
4.2 Mikrocomputertomographie (Mikro-CT).....	58
4.2.1 Flexible Gruppe im Zeitverlauf 10, 21 und 42 Tage postoperativ.....	58
4.2.2 Semi-rigide Gruppe im Zeitverlauf 10, 21 und 42 Tage postoperativ	59
4.2.3 Rigide Gruppe im Zeitverlauf 10, 21 und 42 Tage postoperativ	61
4.2.4 Kontrollgruppe im Zeitverlauf 10, 21 und 42 Tage postoperativ	62
4.2.5 Versuchsgruppen im Vergleich an Tag 10 postoperativ	69
4.2.6 Versuchsgruppen im Vergleich an Tag 21 postoperativ	72
4.3 Biomechanische <i>in vitro</i> -Testung.....	78
4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	81
4.4.1 Konventionelles Röntgen.....	81
4.4.2 Mikrocomputertomographie (Mikro-CT)	81
4.4.3 Biomechanische <i>in vitro</i> -Testung	84
5 Diskussion	85
5.1 Material und Methoden	86
5.1.1 Wahl des Tiermodells	86
5.1.2 Operation.....	88
5.1.3 Fixateur externe	89
5.1.4 Mikrocomputertomographie (Mikro-CT)	89
5.1.5 Biomechanische Testung	91
5.2 Ergebnisse.....	93
6 Zusammenfassung	105
7 Summary	107

8 Literatur	109
9 Publikationen.....	128
10 Danksagung	129
11 Selbständigkeitserklärung	130

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
Art.	Articulatio
BMP	Bone morphogenetic protein
BV	Bone volume
BV/TV	Bone volume fraction
C	Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
d.h.	das heißt
et al.	et alli
FEM	Forschungseinrichtung experimentelle Medizin
g	Gramm
Gr.	Größe
HCL	Chlorwasserstoff
kg	Kilogramm
KGW	Kilogramm Körpergewicht
kV	Kilovolt
l	Liter
mg	Milligramm
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm ³	Kubikmillimeter
Nm	Nanometer
OP	Operation
P1	Pin 1
P2	Pin 2
P3	Pin 3

P4	Pin 4
PBS	Phosphatpufferlösung
PEEK	Polyetheretherketon
PTFE	Polytetrafluorethylen
rhBMP-2	recombinant human bone morphogenetic protein 2
s	Sekunde
Tab.	Tabelle
TMC	Tissue mineral content of bone
TMD	Tissue mineral density of bone
TV	Total volume
USA	United States of America
V	Volt
VOI	Volume of interest
W	Watt
μ A	Mikroampere
μ CT	Mikrocomputertomographie
μ g	Mikrogramm
μ HA	Mikrohydroxylapatit
μ m	Mikrometer
%	Prozent
°	Grad
&	und
Ø	Durchmesser
3D	dreidimensional

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Fixateursystem (Aufsicht)	37
Abb. 2: Kunststoff – Verbindungselemente (Seitenansicht)	37
Abb. 3: Bikortikale Einbringung des distalen Pins (P1)	40
Abb. 4: Einbringen von P2	40
Abb. 5: Setzen der 5 mm Osteotomie	40
Abb. 6: Entnahme des Knochenzylinders.	40
Abb. 7: Darstellung des 5mm Osteotomiespaltes.	40
Abb. 8: Eingebrachtes Kollagenvlies im Osteotomiespalt	40
Abb. 9: Postoperative Röntgenaufnahme	42
Abb. 10: Mikro-CT-Probenbett mit fixierter Ratte.	44
Abb. 11: Abstandshalter	44
Abb. 12: Standardisierte Positionierung von Fixateurbalken zum Probenbett	44
Abb. 13: Haltekonstruktion	48
Abb. 14: Einbettung der distalen Epiphyse	48
Abb. 15: Anbringen des Stegs	48
Abb. 16: Metallschraubstock zur Fixierung der Position	48
Abb. 17: Positionierung der Knochenprobe	49
Abb. 18: Frakturierte Probe (Kontralaterale)	49
Abb. 19: Dreidimensionale Darstellung im <i>in vivo</i> -Mikro-CT (Evaluierungsprogramm), Defektbeginn	52
Abb. 20: Dreidimensionale Darstellung im <i>in vivo</i> -Mikro-CT (Evaluierungsprogramm), Defektende	52
Abb. 21: Dreidimensionale Darstellung im <i>in vivo</i> -Mikro-CT (Evaluierungsprogramm), Global Object „Kortikalis“	52
Abb. 22: Dreidimensionale Darstellung im <i>in vivo</i> -Mikro-CT (Evaluierungsprogramm), fusioniertes Global Objekt	52
Abb. 23: Biomechanische Auswertung von Steifigkeit (lila) und maximalem Drehmoment (blau) im Diagramm.	53
Abb. 24: Boxplot	55
Abb. 25: Dreidimensionale Darstellung der Kallusbildung im <i>in vivo</i> -Mikro-CT, Kontrollgruppe im Zeitverlauf	63
Abb. 26: <i>In vivo</i> -Mikro-CT-Ergebnisse des Gesamtkallusvolumens (TV)	64
Abb. 27: <i>In vivo</i> -Mikro-CT-Ergebnisse des mineralisierten Kallusvolumens (BV)	65

Abb. 28: <i>In vivo</i> -Mikro-CT-Ergebnisse des Anteils an mineralisiertem Kallusvolumens im Gesamtkallusvolumen (BV/TV)	66
Abb. 29: <i>In vivo</i> -Mikro-CT-Ergebnisse der Dichte des mineralisierten Gewebes (TMD).....	67
Abb. 30: <i>In vivo</i> -Mikro-CT-Ergebnisse des Inhaltes des mineralisierten Gewebes (TMC)....	68
Abb. 31: Dreidimensionale Darstellung der Kallusbildung im <i>in vivo</i> -Mikro-CT, Versuchsgruppen im Vergleich an Tag 10	71
Abb. 32: Dreidimensionale Darstellung der Kallusbildung im <i>in vivo</i> -Mikro-CT, Versuchsgruppen im Vergleich an Tag 21	74
Abb. 33: Dreidimensionale Darstellung der Kallusbildung im <i>in vivo</i> -Mikro-CT, Versuchsgruppen im Vergleich an Tag 21	77
Abb. 34: Biomechanische <i>in vitro</i> -Testung der Versuchsgruppen an Tag 42 postoperativ..... Drehmoment.....	79
Abb. 35: Biomechanische <i>in vitro</i> -Testung der Versuchsgruppen an Tag 42 postoperativ..... Steifigkeit	80

Tabellenverzeichnis

Tab.1: Übersicht zur Gruppeneinteilung.....	36
Tab. 2: Übersicht über die Untersuchungsmethoden und finale Anzahl an Versuchstieren....	57
Tab. 3: Quantitative <i>in vivo</i> -Mikro-CT Ergebnisse der flexiblen Gruppe im Zeitverlauf	58
Tab. 4: Quantitative <i>in vivo</i> -Mikro-CT Ergebnisse der semi-rigiden Gruppe im Zeitverlauf .	59
Tab. 5: Quantitative <i>in vivo</i> -Mikro-CT Ergebnisse der rigiden Gruppe im Zeitverlauf	61
Tab. 6: Quantitative <i>in vivo</i> -Mikro-CT Ergebnisse der Kontrollgruppe (1mm-Osteotomie) im Zeitverlauf	62
Tab. 7: Quantitative <i>in vivo</i> -Mikro-CT-Ergebnisse der Versuchsgruppen an Tag 10 postoperativ	69
Tab. 8: Quantitative <i>in vivo</i> -Mikro-CT-Ergebnisse der Versuchsgruppen an Tag 21 postoperativ	72
Tab. 9: Quantitative <i>in vivo</i> -Mikro-CT-Ergebnisse der Versuchsgruppen an Tag 42 postoperativ	75
Tab. 10: Ergebnisse der biomechanischen <i>in vitro</i> -Testung	78

1 Einleitung

Die Frakturheilung stellt einen der bemerkenswertesten Reparaturmechanismen des Körpers dar. Es handelt sich dabei um einen komplexen physiologischen Prozess, der ein koordiniertes Zusammenspiel von zellulären, biochemischen, nutritiven und mechanischen Vorgängen erfordert und dessen Ziel die Wiederherstellung intakten Gewebes darstellt (Voggenreiter, 2009). Im Gegensatz zu vielen anderen Körpergeweben resultiert die Frakturheilung nicht in der Bildung einer Narbe, sondern in dem funktionellen und strukturellen Ausgangszustand des Knochens (McKibbin, 1978). Dennoch ist nicht jede Frakturheilung erfolgreich.

Trotz der Fortschritte in der Medizintechnik und Chirurgie sowie ständig wachsender Erkenntnisse über die Mechanismen der Knochenheilung, stellen verzögerte und ausbleibende Heilungen ein akutes klinisches Problem dar (Voggenreiter, 2009; Garcia et al., 2013). Ungefähr 10% aller Frakturen zeigen keinen physiologischen Heilungsprozess (Einhorn et al., 2015).

Derzeit sind eine Reihe von Störfaktoren bekannt, welche zu einem Ausbleiben der Knochenheilung führen können. Unter anderem ist die mechanische Umgebung entscheidend für den Heilungserfolg einer Fraktur (Lienau et al., 2005; Willie et al., 2009; Schwarz & Ott et al., 2018). Die Osteosynthesetechnik und deren Stabilisationssteifigkeit bestimmen die vorherrschenden biomechanischen Bedingungen im Frakturspalt und können bei Störungen zu Misserfolgen der physiologischen Abläufe in der Frakturheilung führen (Epari et al., 2007; Röntgen et al., 2010; Histings et al., 2010).

Der Fixateur externe stellt, durch seine unkomplizierte Anwendung und multiplen Möglichkeiten der Modifikation des Osteosynthesematerials, in der Forschung ein bedeutendes System zur Evaluierung der mechanischen Einflüsse auf die molekularen Mechanismen der Frakturheilung dar (Röntgen et al., 2010).

Als Goldstandard der Versorgung von erschwert oder nichtheilenden Frakturen (Pseudarthrosen, Non Unions) gilt derzeit die autologe Knochenmarkstransplantation (Hayda et al., 2006; Nauth et al., 2011; Everding et al., 2019). Autologes Knochenmark ist allerdings nur begrenzt verfügbar und mit einer hohen Entnahmemorbidität beim Spender, sowie mit Schmerzen, Hämatomen und Infektionen assoziiert (Laurie et al., 1984; Jäger et al., 2005; Boerckel et al., 2011).

Störungen der Frakturheilungen gehen nicht nur mit anhaltenden Schmerzen und daraus resultierender sinkender Lebensqualität der Betroffenen einher, sondern auch mit hohen ökonomischen Kosten (Victoria et al, 2009).

Daher wird auf Grundlage der gegenwärtig untersuchten Mechanismen der Knochenheilung weiterhin nach effizienten und alternativen Behandlungsansätzen geforscht.

Zum jetzigen Zeitpunkt existieren vielfältige therapeutische Ansätze auf dem Gebiet der Knochenheilungsstörung, darunter biomechanische und physikalische Ansätze sowie Konzepte auf zellulärer und molekularer Ebene (Einhorn et al., 2015). Insbesondere auf dem Feld der knocheninduzierenden Wachstumshormone als Alternative zum autologen Knochenmarkstransplantat hat es in den letzten Jahren zahlreiche Untersuchungen und experimentelle Studien gegeben (Nauth et al., 2011; Schwarz et al., 2012; Khan et al., 2017). Ihr positiver Effekt auf die Knochenheilung konnte in diversen präklinischen und klinischen Studien belegt werden (Wildemann et al., 2011; Faßbender et al., 2014; Jing et al., 2016; Orth et al., 2017; Khan et al., 2017). Allerdings kommt es aufgrund von frühzeitiger Diffusion, Absorption von Einzeldosen und zeitlich ungünstiger Applikation des BMPs derzeit zu unphysiologisch hohen Dosierungen im klinischen Alltag (Faßbender et al., 2014). Hieraus resultiert unter anderem die Bildung ektooper Ossifikationen, die symptomatisch zu Funktionseinschränkungen, Schmerzen und Nervenschädigungen führen und dadurch das Patientenbefinden nachteilig beeinflussen (Kan et al., 2011).

Aktuelle in vitro Studien mit unterschiedlichen Zelltypen zeigen, dass BMPs durch mechanische Stimulation eine Regulation erfahren und dabei die BMP-Signaltransduktion in autokriner oder parakriner Weise beeinflussen (Tenney et al., 2009; Bieler et al., 2009; Huang et al., 2010).

Die Erforschung des Zusammenspiels von biologischen und mechanischen Stimuli ist somit von hohem wissenschaftlichen Interesse.

Das übergreifende Ziel ist dabei die Optimierung der mechanischen Rahmenbedingungen einer Fraktur, um geringere Mengen des biologischen Stimulus BMP für maximale Heilungserfolge zu nutzen und durch diese Kombination die aus derzeit unphysiologisch hohen Dosen resultierenden Risiken für den Patienten deutlich zu reduzieren.

2 Stand des Wissens

2.1 Biologie des Knochens

Knochengewebe zählt mit zu den härtesten Geweben des Körpers und dient als Stützgerüst sowie Schutz gegenüber den inneren Organen im Brust- und Beckenbereich, sowie des Zentralen Nervensystems. Durch die Befestigung von Sehnen und Bändern der Muskeln am Knochen wird die Lokomotion ermöglicht. Das Knochengewebe erfüllt zusätzlich eine Stoffwechselfunktion, indem es ein Reservoir für Kalzium und Phosphor darstellt. Bei Bedarf werden die beiden Mineralien freigesetzt und erfüllen eine regulatorische Aufgabe im Mineralhaushalt des Körpers. Trotz seiner Stabilität und enormen Belastbarkeit unterliegt Knochengewebe zeitlebens adaptiven Umgestaltungsvorgängen und befinden sich wechselweise in einem Auf-, Ab- und Umbauprozess (Remedios, 1999; König & Liebich, 2012). Dieser lebenslange Prozess ist als Remodelling definiert (Noble et al., 2000), welcher einerseits durch metabolische StoffwechsellLeistungen und andererseits durch Änderungen der physiologischen Druck-, Zug- und Scherkräfte gesteuert wird (Trostle et al., 1996; König & Liebich., 2012).

2.1.1 Makroskopischer Knochenaufbau

Innerhalb des Skelettsystems variieren die einzelnen Knochen hinsichtlich ihrer Größe, Form und Breite. Grundsätzlich differenziert man zwischen langen, kurzen, platten und den unregelmäßigen Knochen. Zu den platten Knochen zählen beispielsweise das Schulterblatt und das Brustbein. Die Handwurzelknochen gehören zu den sehr stabilen kurzen Knochen. Die langen Knochen, welche auch als Röhrenknochen bezeichnet werden, finden sich in den Gliedmaßen. Zu den Röhrenknochen zählt man unter anderem den Oberschenkelknochen, das Schien- und das Wadenbein. Diese Knochen besitzen einen charakteristischen Aufbau (König & Liebich, 2012; Buck & Dumanian, 2012). Die Epiphysen stellen die verdickten Enden des Knochens dar. Die auf die Oberfläche der Gelenke wirkende Belastung wird dadurch auf einen größeren Querschnitt verteilt (Trostle et al., 1996). In den Epiphysen befindet sich die *Substantia spongiosa*, ein schwammartiges System aus feinen Knochenbälkchen (Trabekel). Die Hohlräume der *Substantia spongiosa* sind zeitlebens mit rotem Knochenmark ausgefüllt

(König & Liebich, 2012; Baumgärtner, 2015). An die Epiphysen schließt sich die Metaphyse an, welche während der Knochenentwicklung die Epiphysenplatte (Wachstumsfuge) enthält und dem Längenwachstum des Knochens dient (Baumgärtner, 2015). Den Mittelteil des Knochens bildet die Diaphyse (Knochenschaft), welche durch eine starke Knochenwand begrenzt wird. Die permanent einwirkenden Druck-, Zug – und Scherkräfte führen zu einer verstärkten Knochenwand (*Substantia compacta*) der Diaphyse (König & Liebich, 2012). Somit stellt der schmale Knochenschaft das wichtigste Element für die Tragfähigkeit und Steifigkeit des Knochens dar (Schweiberer et al., 1999). Die *Substantia compacta* verzüngt sich im Bereich der Epiphysen und liegt nur noch dünn der vorherrschenden *Substantia spongiosa* auf. Im inneren der Diaphyse ist die Markhöhle beherbergt, ein vom Endost ausgekleideter Hohlraum, der unter anderem Blut- und Lymphgefäße, das rote Knochenmark und hämatopoetische Zellen einschließt (Remedios, 1999). Mit zunehmendem Alter wird das rote Knochenmark durch gelbes Knochenmark ersetzt und auch als Fettmark bezeichnet. Die Markhöhle gilt als das bedeutendste Versorgungskompartiment des Knochens. Gleichzeitig ist sie ein wichtiges biomechanisches Kompartiment, mit einer erstaunlichen Leichtbauweise. Ohne die Markhöhle und die Fähigkeit zur hohen elastischen Verformbarkeit der organischen Knochenmatrix könnte Röhrenknochen den enormen Belastungen nicht standhalten (Schweiberer et al., 1999). Das Periost, die äußere Knochenhaut, besteht aus einer äußeren Faserschicht (*Stratum fibrosum*) und einer inneren zellreichen Kambiumschicht (*Stratum cambium*) und umgibt flächenhaft ausgebreitet die Knochenoberfläche (König & Liebich, 2012). Ausgenommen sind die mit Gelenkknorpel bedeckten Gelenkflächen sowie die Sesambeine (Simon et al., 2003; Nasu et al., 2015). Das *Stratum cambium* schließt sensible Nervenfasern und ein enges Netz von Blut- und Lymphgefäßen zur metabolischen Versorgung des Knochens ein. Darüber hinaus ist sie zeitlebens in der Lage Knochengewebe, Knorpel- und Knochenkallus neu zu bilden, da es sich bei Kambiumzellen um Vorläuferzellen der knochenbildenden Zellen (Osteoblasten) handelt. Über Sharpey-Fasern (Kollagenfasern) ist das Periost straff mit den äußeren Knochenlamellen verbunden (Buck & Dumanian, 2012; Baumgärtner, 2015). Das Endost liegt der gesamten Markhöhle an und umkleidet die Spongiosa-Bälkchen (Webb et al., 2000). Es enthält Bindegewebestammzellen (Mesenchymzellen), die sich zu Fibroblasten und Osteoblasten differenzieren können. Aufgrund dieser osteogenen Potenz ist das Endost, genauso wie das Periost, lebenslang zur Neubildung von Knochengewebe befähigt (König & Liebich, 2012; Junqueira et al., 2002).

2.1.2 Mikroskopische Knochenzusammensetzung

Knochengewebe setzt sich aus Knochenzellen (Osteozyten), die in eine extrazelluläre Knochenmatrix eingebettet sind, sowie Wasser, Mineralien und Kollagen zusammen. Das Gewebe besteht zu 65% aus anorganischem Material, zu 20% aus organischem Material und zu 15% aus Lipiden und Wasser (Clarke, 2008).

Das organische Material beinhaltet osteogene Zellen und eine extrazelluläre, organische Matrix, welche zu 95% aus Kollagen besteht, wobei Kollagenfasern vom Typ I dominieren, und zu 5% aus Proteoglykanen (Wang et al., 2002; Buck & Dumanian, 2012). Sie dient bei der Mineralisation des Knochens als Leitstruktur für die appositionelle Anlage der kristallinen Kalziumphosphatverbindung (Hydroxylapatitbildung) (Romanowski et al., 1990; Li et al., 2006). Das von Osteoblasten gebildete Osteokalzin bindet als Teil der extrazellulären Knochenmatrix an das Hydroxylapatit. Weitere Bestandteile der organischen Matrix bilden Proteoglykane und Glykosaminoglykane, welche gemeinsam die ungeformte Grundsubstanz (Interzellulärsbstanz) des Knochens darstellen (Remedios, 1999). Phospholipide, Phosphoproteine, Osteonektin, welches funktional die Mineralien des Knochens mit dem Kollagen verbindet und das Osteopontin, das wiederum die Knochenmineralien mit den Zellen verbindet, komplettieren die Bestandteile der organischen Matrix (Romanowski et al., 1990).

Die anorganische Matrix besteht hauptsächlich aus Phosphor (50%) und Kalzium (35%) (Webb et al., 2000), die als kristallines Raumgitter, dem sogenannten Hydroxylapatit, den Kollagenfasern von außen anliegen und von proteoglykanreicher Grundsubstanz umgeben werden. Die Verbindung des Hydroxylapatits mit den Kollagenfasern bestimmt die Stabilität des Knochens (Liebich, 2004). Nach Junqueira et al. (2002) besteht der restliche Anteil der anorganischen Matrix aus Zitrat, Karbonat, Natrium, Magnesium, Fluor und weiteren Spurenelementen. Die Knochenmatrix verleiht dem knöchernen Gewebe seine mechanischen Eigenschaften. Sie bindet außerdem die Knochenzellen und beeinflusst deren Proliferation und Differenzierung (Schweiberer et al., 1999). Zu diesen sogenannten gewebspezifischen Knochenzellen gehören Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. Diese sind für den Erhalt und den fortwährend ablaufenden Umbauprozess des Knochens verantwortlich (Radasch, 1999).

Osteoblasten gehen aus mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks, Endosts sowie der Kambiumschicht des Periosts hervor (Yoo et al., 1998; Remedios, 1999; Florencio-Silva et al., 2015), welche sich zunächst in Vorläuferzellen, den teilungsaktiven Präosteoblasten oder Osteoprogenitor-Zellen und später zu Osteoblasten differenzieren (Owen, 1970; König &

Liebich., 2012). Grundsätzlich unterscheidet man zwischen aktiven und inaktiven Osteoblasten. Letztere werden als Deckzellen bzw. „bone lining cells“ bezeichnet und sitzen, nach Abschluss der Knochenbildung, der neugebildeten Knochenoberfläche als eine Art einschichtiges Epithel auf. Diese Zellen stellen sich als spindelartig abgeflachte Zellkörper dar (Barnes et al., 1999; Florencio-Silva et al., 2015). Metabolisch aktive Osteoblasten stellen sich als große (20-30 µm), plumpe, basophile Zellen mit meist rundem Zellkern, sowie zahlreich enthaltenen Organellen im Zytoplasma dar (Webb et al., 2000, Capulli et al., 2014). Die Osteoblasten produzieren u.a. während der desmalen Ossifikation eine unverkalkte Knochenmatrix, das Osteoid. Durch die anschließende Einlagerung von anorganischen Knochenbestandteilen, hauptsächlich Kalziumphosphat, wird der Knochen mineralisiert (König & Liebich, 2012). Lange Zeit wurde die Osteoblasten auf ihre Funktion der Knochenbildung begrenzt. Dabei handelt es sich um sehr vielseitige Zellen, die aktiv an der Regulation der Osteoklastenformation und -funktion beteiligt sind sowie an der Homöostase der blutbildenden Stammzellen. Außerdem stellen sie endokrine Zellen dar, die unter anderem Osteokalzin produzieren (Capulli et al., 2014). Während der fortschreitenden Mineralisation werden zirka 10% der Osteoblasten vollständig von Osteoid umschlossen (Bonewald, 2002; Remedios, 1999) und differenzieren sich zu Osteozyten (Florencio-Silva et al., 2015).

Osteozyten sind hoch spezialisierte Osteoblasten, die in Knochengrundsubstanz eingemauert sind (Noble et al., 2000; Rubinacci et al. 2002). Sie stellen den am häufigsten vorkommenden Zelltyp im Knochen dar (Jilka, 2003; Florencio-Silva et al., 2015). Die Osteozyten spielen eine entscheidende Rolle bei dem Erhalt der knöchernen Matrix. Degenerieren die Osteozyten, geht auch die benachbarte Matrix zugrunde (Junqueira et al., 2002; Florencio-Silva et al., 2015). Sie sind an der Kalzium- und Phosphorhomöostase beteiligt (Webb et al., 2000), aber nicht zur Synthese von Knochengrundsubstanz befähigt (Raggatt et al., 2010). Osteozyten liegen als stark abgeflachte Zellen in linsenförmigen Knochenhöhlen (Lakunen) der mineralisierten Knochenmatrix vor (Noble et al., 2000). Sie verfügen über zahlreiche zytoplasmatische Fortsätze (Dendriten), die sie zur Kommunikation mit anderen Osteozyten, aber auch mit Osteoblasten und Osteoklasten befähigen (Nijweide et al., 1986; Florencio-Silva et al., 2015). Über interzelluläre Signale aktivieren sie die Osteoblasten oder die Osteoklasten und üben damit Einfluss auf das Remodeling aus (Galli et al., 2010). Die Dendriten verlaufen in Kanälchen (*Canaliculi ossei*) innerhalb der Knochenmatrix und transportieren Nährstoffe und Ionen aus der extrazellulären Flüssigkeit in die knöcherne Matrix (Noble et al., 2000). Funktional gelten Osteozyten als Mechanosensoren. Bei einer mechanischen Beanspruchung des Knochens gerät die Flüssigkeit im lakuno-kanalikulären System in Bewegung. Derartige

mechanische Reize werden von den Osteozyten wahrgenommen und in eine biologische Antwort übersetzt (Mechanotransduktion), wie beispielsweise die Synthese von Wirkstoffen, die in den Knochen- oder Mineralhaushalt eingreifen. Das parakrin sezernierte Sclerostin (SOST) wirkt hemmend auf die Knochenbildung, während das endokrin sezernierte FGF23 (fibroblast growth factor 23) die renale Phosphatausscheidung erhöht und dadurch den Mineralhaushalt beeinflusst. Außerdem synthetisieren die Osteozyten einen membrangebundenen Faktor (RANKL), der für die Bildung von Osteoklasten erforderlich ist (Canulli et al., 2014; Lüllmann-Rauch et al., 2015)

Durch Fusion mononukleärer Vorläuferzellen des Knochenmarks entstehen große mehrkernige Riesenzellen, die knochenabbauenden Osteoklasten (Roodman, 1996; Florencio-Silva et al., 2015). Die Osteoklastogenese wird u.a. durch RANKL, ein Mitglied der Tumornekrosefaktor (TNF) Familie, induziert (Crockett et al., 2011; Sigl et al., 2012). Als weiterer Faktor der Osteoklastenentstehung gilt der Monozytenkolonienstimulierende Faktor (M-CSF) (Florencio-Silva et al., 2015). Etwa ein Prozent der gesamten Knochenoberfläche wird mit Osteoklasten bedeckt. Sie stellen damit eine sehr kleine Population unter den Knochenzellen dar. Als terminal differenzierte Zellen beträgt ihre Lebenserwartung nur wenige Tage. Osteoklasten sind für die Knochenresorption verantwortlich (Amling et al., 1996). Aktive Osteoklasten liegen in den Resorptionslakunen, den sogenannten Howship-Lakunen auf der Knochenoberfläche sowie in Resorptionstunneln vor, welche infolge ihrer Abbautätigkeit entstanden sind (Remedios, 1999). Während des Remodellings können vier unterschiedliche Domänen der Osteoklastenmembran beobachtet werden. Die „sealing zone“ und die „ruffled border“ stehen in Kontakt mit der Knochenmatrix (Florencio-Silva et al., 2015). Der Knochenabbau findet an oberflächenvergrößerten Positionen der Osteoklastenmembran statt. Es handelt sich dabei um fingerförmigen Zellausstülpungen (Mikrovilli) der Osteoklasten, die „ruffled border“. Zwischen dieser gefalteten Zellmembran und der Knochenoberfläche erzeugt der Osteoklast ein saures Milieu infolge dessen die Hydroxylapatit-Kristalle aus der kollagenen Matrix gelöst werden (Beck, 2003; Crockett et al., 2011). Kollagenasen und Proteasen bauen anschließend die zurückbleibenden kollagenen Fasern ab (Amling et al., 1996). Im Rahmen des Remodellings baut ein Osteoklast pro Zeitintervall etwa dreimal so viel Knochen ab, wie ein Osteoblast aufbaut (Liebich, 2004; Schell et al., 2006). Nach erfolgter Knochenresorption lösen sich die Osteoklasten von der Knochenoberfläche und heften sich an anderer Stelle wieder an den Knochen an, um erneut mit der Knochenresorption zu beginnen (Liebich, 2004).

2.1.3 Osteogenese und Knochenformen

Grundsätzlich wird zwischen zwei Formen des Knochengewebes unterschieden: dem Geflecht- oder Faserknochen und dem Lamellenknochen (König & Liebich, 2012).

Geflecht- oder Faserknochen stellt entwicklungsgeschichtlich die ältere und einfachere Knochenform dar (Liebich, 2004; Ng et al., 1997). Es handelt sich dabei um ein ungeordnetes Netz verknöcherten Bindegewebes, welches bei jeder Knochenneubildung auftritt (König & Liebich, 2012; Buck et al., 2012). Während der embryonalen Entwicklung angelegter Geflechtknochen wird nach der Geburt sukzessiv durch Lamellenknochen ersetzt. Es bestehen nur wenige Ausnahmen, wo Geflechtknochen zeitlebens persistiert. In Ansatzstellen kräftiger Bänder am kompakten Knochen, an Rändern von Schädelnähten, im Felsenbein um die Strukturen des Innenohrs herum und in Synostosen bleibt diese Form des Knochengewebes auch beim Adulten erhalten (König & Liebich, 2012; Bucher et al., 1997; Buck & Dumanian, 2012). Geflechtknochen wird zudem an Stellen gebildet, wo über längere Zeit mechanische Druck- und Zugkräfte das Bindegewebe beanspruchen (Liebich, 2004; Chao, 2003; Buck & Dumanian, 2012) oder schnell Knochen gebildet werden muss, wie beispielsweise bei der Frakturheilung (Noble et al., 2000). Er ist reich an Osteozyten, die jedoch typischerweise ohne erkennbare Ordnung in der knöchernen Matrix verteilt sind (Liebich, 2004). Die geformte Grundsubstanz wird von einem unregelmäßigen Geflecht von Kollagenfaserbündeln durchzogen, verglichen mit dem Lamellenknochen resultiert hieraus eine geringere biomechanische Stabilität (Ng et al., 1997) und eine höhere Labilität gegenüber einwirkenden Kräften (Webb et al., 2000).

Anfangs gebildeter Geflechtknochen wird im Rahmen der Knochenentwicklung durch permanenten Lamellenknochen ersetzt (König & Liebich, 2012) und stellt somit die am häufigsten auftretende Knochenart im adulten Organismus dar. Im Vergleich zum Geflechtknochen entsteht er deutlich langsamer und ausschließlich im adulten Säugetier (Noble et al., 2000). Während im Geflechtknochen die Kollagenfasern unregelmäßig miteinander verflochten sind, ist die Anordnung der Kollagenfasern des Lamellenknochens geordnet. Die *Substantia spongiosa* des Lamellenknochens besitzt streng parallel zur Trabekeloberfläche angeordnete Kollagenfasern, während die *Substantia compacta* vor allem aus konzentrisch um ein Blutgefäß angeordnete Kollagenfasern besteht. Die Grundstruktur der *Substantia compacta* des Lamellenknochens stellt das Osteon dar, welches nach seinem Entdecker, dem englischen Anatom Clapton Havers, auch Havers-System genannt wird (Liebich, 2004; Buck & Dumanian, 2012). Nach Remedios (1999) verlaufen die Osteone parallel zur longitudinalen Achse des

Knochens. Das Zentrum jedes Osteons bildet der mit lockerem Bindegewebe gefüllte Zentralkanal (Havers-Kanal). Durch ihn ziehen ein zentrales Gefäß, das Havers-Gefäß und vegetative Nerven (König & Liebich, 2012; Buck & Dumanian, 2012). Der Zentralkanal wird von fünf bis 20 konzentrischen Knochenlamellen (Speziallamellen), bestehend aus kollagenen Fasern und mineralisierter Knochenmatrix, umgeben (Bucher et al., 1997; Beck, 2003). Die Kollagenfasern sind spiralförmig und stets gegensinnig angeordnet. Anliegende Lamellensysteme treten untereinander durch quer zu den Lamellen stehenden Volkmann-Kanäle in Verbindung. Es resultiert ein Lamellenverbund (Weyrauch et al., 1998), der mit dem Bauprinzip einer Sperrholzplatte mit unterschiedlich gerichteter Holzmaserung verglichen werden kann (Budras et al., 1996). Dadurch entsteht eine hohe mechanische Festigkeit der Lamellenknochen. Die Knochenzellen (Osteozyten) liegen zwischen den konzentrisch geschichteten Lamellen um den Zentralkanal und stehen durch lange, in Knochenkanälchen verlaufende, Zytoplasmafortsätze in Verbindung. Auf diese Weise wird der Stofftransport aus dem Havers-Gefäß zur Knochenmatrix ermöglicht (König & Liebich, 2012). Osteone ohne funktionelle Aufgaben werden abgebaut. Ihre Reststücke, die sogenannten Schaltlamellen, liegen zwischen den intakten Osteonen und füllen die Zwischenräume aus (Liebich, 2004). Die einzelnen Osteone sind durch Zementlinien voneinander separiert (Buck & Dumanian, 2012). Die Zentralgefäße der Osteone stehen durch die querverlaufenden Volkmann-Gefäße mit der inneren und äußeren Knochenhaut in Kontakt. Direkt unter dem Periost verlaufende Lamellen, die nicht einen Zentralkanal, sondern den ganzen Knochen umgeben, sind plattenartig zu einer äußeren Generallamelle geschichtet. Aus dem *Stratum fibrosum* strahlen Kollagenfasern (Sharpey-Fasern) in die *Substantia compacta* des Knochens ein, die das Periost strafft mit dem Knochen verbinden. Durch die zusätzliche Verbindung zu den darüberliegenden Endabschnitten der Sehnen dienen sie der Kraftübertragung auf den Knochen. Die innere Generallamelle stellt dementsprechend die Oberflächenbegrenzung gegenüber dem Endost dar (König & Liebich, 2012).

Knochengewebe kann auf zwei Arten entstehen. Bei beiden Vorgängen wird zunächst „unreifer“ Geflechtknochen gebildet, der meist durch „reifen“ Lamellenknochen ersetzt wird. Entsteht Knochen ohne knorpelige Zwischenstufe, direkt aus dem mesenchymalen Bindegewebe, spricht man von intramembranöser oder direkter Ossifikation. Ersetzt knöchernen Matrix die zuvor gebildete Knorpelmatrix, handelt es sich um die enchondrale oder indirekte Ossifikation (König & Liebich, 2012).

Intramembranöse Ossifikation beginnt vielfach in punktförmigen Ossifikationszentren, aus denen die Verknöcherungsprozesse gesteuert werden. Aus mesenchymalen Stammzellen

entwickeln sich zunächst die teilungsaktiven Osteoprogenitorzellen (Präosteoblasten). Bevorzugt treten diese in der Kambiumschicht des Periosts und entlang des primären Knochenmarks auf (Liebich, 2004). Die Vorläuferzellen differenzieren sich anschließend zu den knochenbildenden Osteoblasten, die Kollagenfasern, nicht kollagene Proteine und unverkalkte Knochenmatrix (Osteoid) produzieren. Infolge der fortlaufenden Osteoidsynthese mauern sich die Osteoblasten nachfolgend selbst ein (Liebich, 2004; König & Liebich, 2012). Das Osteoid wandelt sich innerhalb weniger Tage durch Mineralisierung in Ossein um. Während der Mineralisation werden anorganische Knochenbestandteile wie Kalziumphosphat, Kalziumcarbonat, Magnesiumphosphat und Kalziumfluorid über das Blutgefäßsystem in das Osteoid eingelagert. Dieser Prozess wird durch Wachstumshormone und Vitamin-D-Metaboliten gefördert. Der Beginn der intramembranösen Ossifikation ist eng mit der Einsprossung von Blutkapillaren in das Bindegewebe geknüpft, welche zusätzliches mesenchymales Bindegewebe mit sich führen (König & Liebich, 2012).

Die enchondrale Ossifikation basiert auf Grundlage des hyalinen Knorpels, welcher als Platzhalter und als Ausgangsmaterial für das Längenwachstum des Knochens dient. Aus dem Mesenchym entwickelt sich ein fetales Knochenmodell aus Knorpel, das Primordialskelett, welches abgebaut und allmählich durch permanentes Knochengewebe ersetzt wird. Neugebildetes Knochengewebe, das auf der Grundlage von hyalinem Knorpel basiert, wird unter chondraler Osteogenese zusammengefasst. Weitergehend unterscheidet man dabei zwischen perichondraler und enchondraler Ossifikation. Während der perichondralen Ossifikation differenzieren sich Osteoprogenitorzellen des Knorpelmantels direkt zu Osteoblasten. Streng genommen entspricht die perichondrale Ossifikation der intramembranösen Ossifikation mit Ausscheidung von Osteoid und anschließender Mineralisation. Die fetale perichondrale Ossifikation beginnt in der Mitte der späteren Diaphyse des Röhrenknochens (primäres Ossifikationszentrum) und bildet eine diaphysäre Knochenmanschette. Aus dem Knorpelmantel (Perichondrium) entwickelt sich das Periost. Die diaphysäre Verknöcherung setzt sich anschließend in Richtung der Epiphysen fort. Postnatal entstehen sekundären Ossifikationszentren in den Epiphysen. Die eigentliche chondrale Ossifikation findet im Knorpel statt und wird als enchondrale Ossifikation bezeichnet, welche für das Längenwachstum verantwortlich ist (König & Liebich., 2012).

Wie vorab erwähnt, setzt die fetale Umwandlung von Knorpel- in Knochengewebe mittig an der späteren Diaphyse des Röhrenknochens ein. Durch perichondrale Ossifikation entsteht um den Knorpel ein Knochenzylinder, die Knochenmanschette. Der neu entstandene Knochenmantel hemmt den Stoffwechsel (Ernährung der Chondrozyten durch Diffusion) des

hyalinen Knorpels, infolgedessen degenerieren die Chondrozyten und die Knorpelmatrix verkalkt. Gleichzeitig sprossen durch den Knochenmantel Blutgefäße in den Knorpel ein und mit ihnen gelangen Chondroklasten in die verkalkte Knorpelmatrix. Nachfolgend bauen die Chondroklasten das Knorpelgewebe ab. In die freigewordenen Räume dringen anschließend Kapillaren mit mesenchymale Stammzellen und Bindegewebe ein und füllen sie aus. Die mesenchymalen Stammzellen differenzieren sich zu Osteoblasten, die sich an den Überresten der verkalkten Knorpelmatrix ansiedeln und unmineralisierte Knochengrundsubstanz (Osteoid) synthetisieren (primäres Ossifikationszentrum). Osteoklasten resorbieren zu einem späteren Zeitpunkt die mineralisierte Matrix. Durch die ständigen Auf- und Abbauvorgänge des Knochengewebe entwickelt sich eine knöcherne, schwammartige Binnenstruktur die primäre Markhöhle. Durch Umwandlung des lockeren Bindegewebes zu hämoretikulärem (blutbildendem) Gewebe differenziert sich die primäre Markhöhle in ein vielgekammertes Hohlraumsystem der sekundären Markhöhle. Dort findet ab einer späteren fetalen Entwicklungsphase die Hämatopoese (Blutbildung) statt.

Die periostale Knochenmanschette wächst entlang der Diaphyse in Richtung der Epiphysen und trägt zum Dickenwachstum des Knochens bei. Daher wird sie zum appositionellen Wachstum gerechnet. (König & Liebich, 2012).

Im Bereich der Epiphysenfuge ist die enchondrale Ossifikation besonders ausgeprägt. Zwischen der Diaphyse und Epiphyse findet die von innen beginnende Verknöcherung des hyalinen Knorpelgewebes statt, welche dem Längenwachstum (interstitielles Wachstum) des Knochens dient. Es entstehen unterschiedliche Zonen der enchondralen Ossifikation. Innerhalb der Proliferationszone werden die Chondrozyten durch die räumliche Begrenzung der perichondralen Knochenmanschette angeregt sich säulenartig anzuordnen, parallel dazu proliferieren die Zellen durch mitotische Teilung. Dadurch verlängert sich der Knorpel und erfüllt eine wesentliche Voraussetzung für das spätere Knochenwachstum. Anschließend degenerieren in der Resorptionszone die Knorpelzellen unter Wasseraufnahme blasenartig. Die Chondrozyten bilden vermehrt Kollagen Typ X, welches die Knorpelmatrix verfestigt und VEGF, das die Blutgefäße in der nachfolgenden Eröffnungszone zur Angiogenese anregt. Die Interzellulärsubstanz beginnt zu verkalken. In der Eröffnungszone werden die hypertrophen Chondrozyten durch Chondroklasten aus ihren Knorpelhöhlen freigesetzt, woraufhin sie zu Grunde gehen. Anschließend wachsen in die Knorpelhöhlen Blutkapillaren und Osteoprogenitorzellen ein, die sich zu knochenbildenden Osteoblasten differenzieren. Auf den verbliebenden Knorpelresten lagern sich Osteoblasten auf, die mit der Bildung von Osteoid beginnen. Innerhalb der Epiphysenfuge entfernt sich die mitotisch aktive Proliferationszone

zunehmend von der Eröffnungszone, was zum interstitiellen Wachstum (Längenwachstum) des Knorpels führt. Den Abschluss des Längenwachstums stellt der Schluss der Epiphysenfuge dar. Die Fähigkeit zum Dickenwachstum bleibt zeitlebens erhalten (König & Liebich, 2012; Buck & Dumanian, 2012).

2.2 Physiologischer Ablauf der Knochenheilung

In Abhängigkeit von der Elastizität und der Biegesteifigkeit eines Knochens, ist Knochengewebe qualifiziert bis zu einem gewissen Maß einwirkende Kräfte zu absorbieren (Rüter et al., 1999). Wird die Elastizität des Materials durch eine belastungsinduzierte Spannung im Knochen überschritten, erfolgt ein Bruch des Knochens (Autefage, 2000).

Die Frakturheilung ist ein komplexer physiologischer Prozess, der einen koordinierten Ablauf unter Beteiligung einer Reihe unterschiedlicher Zellen und biochemischen Vorgängen erfordert und dessen Ziel die Wiederherstellung von intaktem Knochengewebe darstellt, über das mechanische Last wieder ungehindert übertragen werden kann (Voggenreiter, 2009). Im Gegensatz zu vielen anderen Geweben endet die Frakturheilung nicht mit der Bildung einer Narbe, sondern mit einer vollständigen Rekonstruktion des ursprünglichen Gewebes und normaler Funktionstüchtigkeit des Knochens (McKibbin, 1978). Laut Voggenreiter (2009) erfolgt die komplette Wiederherstellung der ursprünglichen Anatomie häufig nur bei Kindern, jedoch tritt beim Adulten, im Rahmen des Remodellings, die Wiederherstellung einer mechanisch stabilen lamellären Knochenstruktur ein. Der Zusammenschluss der Frakturrenden kann direkt oder indirekt erfolgen (Marsell & Einhorn., 2011).

2.2.1 Primäre Frakturheilung

Die primäre, direkte Frakturheilung tritt gewöhnlich nicht während des gewöhnlichen Prozesses der Heilung auf. Sie erfordert vielmehr einen direkten Kontakt der Frakturrenden zur exakten anatomischen Ausrichtung der Frakturrenden, was in der Regel eine stabile Fixierung durch ein geeignetes Osteosyntheseverfahren notwendig macht (Marsell & Einhorn., 2011).

Robert Danis, ein belgischer Chirurg, beschrieb 1949 erstmals die fehlende Kallusbildung zwischen zwei Knochenfragmenten unter rigider Fixation. Bezugnehmend auf die direkte Bildung von Knochen ohne Bildung von mechanisch relevanten periostealen oder endostealen Kallus, benannte er diese Form von Heilung auch primäre Frakturheilung (Griffon, 2005).

Selbst unter optimalen Umständen wird aber nie eine komplette Deckungsgleichheit der Frakturrenden erzielt, sodass immer Spalträumen existieren und den Prozess der Knochenbildung beeinflussen (Schenk et al., 1994). Abhängig von der Nähe der Frakturrenden zueinander, wird bei der direkten Frakturheilung daher nochmals zwischen Kontaktheilung und Spaltheilung unterschieden (Griffon, 2005).

Beträgt der Abstand der Knochenenden weniger als 0,01 mm, wird die Frakturheilung als sogenannte Kontaktheilung bezeichnet (Shapiro, 1988; Marsell & Einhorn, 2011). Unter diesen Umständen verhindert der direkte Flächenkontakt der Kortikalis das Eindringen von Blutgefäßen und Gewebe in den Frakturspalt (Willenegger et al., 1971). Nachfolgend bilden sich an den Osteonen, welche unmittelbar an der Frakturlinie liegen, sogenannte „cutting cones“, an deren Spitze sich kegelförmig formierte Osteoklasten befinden (Marsell & Einhorn, 2011). Die knochenresorbierenden Zellen untertunneln longitudinal von beiden Seiten die Frakturregion und bilden ein neues Havers'sches System (Voggenreiter, 2009). Das wiederhergestellte System erlaubt die Einwanderung von Blutgefäßen, die von Endothelzellen und perivaskulären mesenchymalen Zellen begleitet werden, welche sich zu Osteogeneratorzellen und dann zu Osteoblasten differenzieren. Die Osteoblasten synthetisieren anschließend Osteoid in den Knochenkanal (Griffon, 2005). Die Kontaktheilung resultiert somit aus der direkten Umwandlung der überbrückenden Osteone in Lamellenknochen ohne die Bildung von periostealem Kallusgewebe (Marsell & Einhorn, 2011).

Beträgt der Spalt zwischen den Frakturrenden weniger als 800 µm bis 1 mm, erfolgt eine weitere Form der direkten Frakturheilung, die sogenannte Spaltheilung. Anders als bei der Kontaktheilung, tritt hier der Zusammenschluss der Frakturrenden nicht simultan mit dem Havers-Remodelling auf, sondern vollzieht sich in separat fortlaufenden Schritten (Griffon, 2005). Zunächst sprossen Kapillaren aus dem Endost und Periost in den interfragmentären Spalt der Fraktur ein (Shapiro, 1988). Osteoprogenitorzellen begleiten die transversal einsprossenden Kapillaren und differenzieren sich zu Osteoblasten, welche Geflechtknochen synthetisieren. Dies geschieht zunächst senkrecht zur Längsachse des Knochens. Nach drei bis acht Wochen ist der Frakturspalt vollständig mit Geflechtknochen überbrückt, jedoch aufgrund seiner Architektur mechanisch nicht voll belastbar (Griffon, 2005). Der zweite Schritt der Spaltheilung erfolgt entsprechend der vorab erwähnten Kontaktheilung (Marsell & Einhorn, 2011). Ausgehend von neu entstandenen Osteonen im Frakturspalt und den Osteonen der intakten Knochenenden entstehen erneut cutting cones. Im Rahmen des Havers-Remodelling formen Osteoklasten longitudinale Resorptionsgänge, die durch einwandernde Osteoblasten

mit Lamellenknochen gefüllt werden. Sukzessiv entsteht longitudinal ausgerichteter Lamellenknochen, durch den die anatomische und mechanische Integrität des Knochens wiederhergestellt wird (Griffon, 2005; Shapiro, 1988). Die Spalthheilung verläuft ebenfalls ohne endostale oder periostale Kallusbildung und Resorption der Knochenenden (Stürmer, 1996; Marsell & Einhorn, 2011). Laut Voggenreiter (2009) tritt die direkte Frakturheilung jedoch seltener auf, da es bei der Mehrzahl der Frakturbehandlungen zu mehr oder weniger stark ausgeprägten Bewegungen im Frakturspalt kommt. Folglich heilen die meisten Knochenbrüche durch die indirekte bzw. sekundäre Frakturheilung (Buck & Dumanian, 2012).

2.2.2 Sekundäre Frakturheilung

Die sekundäre, indirekte Frakturheilung stellt eine Kombination aus intramembranöser und enchondraler Knochenneubildung dar (Marsell & Einhorn, 2011). Sie wird charakterisiert durch die Bildung von Ersatzgewebe (Knorpel- und Bindegewebe), welches im weiteren Verlauf durch Gefechtknochen (knöcherner Kallus) und später durch lamelläres Knochengewebe ersetzt wird (Chao et al., 2003; Marsell & Einhorn, 2011). Entscheidend für die indirekte Knochenneubildung ist eine Spaltbreite von mehr als einem Millimeter und Mikrobewegungen im Frakturbereich. Durch konservative Behandlungsmethoden oder flexible Osteosyntheseverfahren, wie der Fixateur externe oder eine Marknagelung, kommt es im Frakturbereich zu Mikrobewegungen, welche die sekundäre Frakturheilung mit Kallusbildung bedingen und somit die häufigste Form der Knochenheilung darstellt (Voggenreiter, 2009). Bis zu einem bestimmten Grad induzieren Mikrobewegungen eine vermehrte Kallusbildung, treten allerdings zu starke Kräfte auf, kommt es zu einer verzögerten Heilung (Marsell & Einhorn, 2011). Je nach Bildungsort wird zwischen periostalem, endostalem und intrakortikalem Kallus unterschieden (Perren, 1992). Periostaler Kallus wird zunächst im Rahmen der intramembranösen Ossifikation ohne knorpelige Zwischenstufe in einiger Entfernung zum Frakturspalt gebildet (McKibbin, 1978). In Richtung der Fraktur an Umfang zunehmend, wird im Zuge der enchondralen Ossifikation Knorpel gebildet, der verkalkt und anschließend durch mineralisiertes Knochengewebe ersetzt wird (Einhorn, 1998). Im Bereich der Markhöhle überbrückt der endostale Kallus die einzelnen Knochenfragmente. Er tritt in einem deutlich geringeren Umfang als der periostale Kallus auf und ist insgesamt instabiler. Der intrakortikale Kallus stellt die kortikale Einheit wieder her (Perren, 1992). Die sekundäre Frakturheilung läuft in mehreren teilweise simultan ablaufenden Phasen ab, die sich gegenseitig beeinflussen und wie folgt zusammengefasst werden:

1. Inflammatorische Reaktion mit Hämatombildung,
2. Phase der Kallusbildung und
3. Remodelling (Marsell & Einhorn, 2011).

Abhängig von den jeweiligen Autoren, wird die Phase der Kallusbildung nochmals untergliedert in eine Phase der weichen Kallusbildung, gefolgt von der Phase der Bildung des harten Kallus.

Kallus bezeichnet das sich verfestigende Gewebe, welches aus Granulationsgewebe sowie vom Periost und Endost gebildet wird (Jerosch et al., 2002). Nicht zuletzt nehmen deshalb das Periost, umliegendes Binde- und Muskelgewebe sowie das Markraumgewebe bei dieser Form der Frakturheilung, eine wichtige Rolle ein (Voggenreiter, 2009).

Inflammatorische Reaktion mit Hämatombildung

Die inflammatorische Phase beginnt unmittelbar nach dem Bruch des Knochens (Griffon, 2005). Sie erreicht ihren Höhepunkt während der ersten 24 Stunden und ist nach sieben Tagen abgeschlossen (Marsell & Einhorn, 2011). Frakturbedingt kommt es zum Zerreißen der Blutgefäße des Knochens, Periosts und umliegenden Weichgewebes, infolge dessen eine Hämatombildung im Knochenspalt resultiert (Webb et al., 2000). Durch Kontraktion der Blutgefäße und beginnende Gerinnung wird der Blutverlust nachfolgend minimiert und führt zu einer Ischämie des Knochengewebes (Griffon, 2005). Die Unterbrechung der Blutversorgung und die hieraus resultierende Schädigung des Knochengewebes haben zur Folge, dass die Frakturrenden nekrotisch werden und die Osteozyten infolge von Thrombosierung entstandenen Sauerstoff- und Nährstoffmangels absterben (Webb et al., 2000). Der initial verminderte Sauerstoffgehalt und der niedrige pH-Wert, das nekrotische Gewebe und die traumatisch bedingten Gewebeteile des Periosts, der Kortikalis, des Endosts und Knochenmarks sowie des umgebenden Weichteilgewebes lösen eine inflammatorische Reaktion aus (Jerosch et al., 2002; Ruschke et al., 2012). Als Folge dessen werden proinflammatorischen Entzündungsmediatoren, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-11 und IL-18 im Frakturgebiet freigesetzt. Sie aktivieren proteolytische Enzymkaskaden, rekrutieren Entzündungszellen und verstärken dadurch die Entzündungsreaktion (Marsell & Einhorn, 2011) und fördern die Koagulation des Blutes (Remedios, 1999). IL-1 und IL-6 sind besonders wichtig in der Frakturheilung. Das von Makrophagen produzierte IL-1 induziert die Bildung von IL-6 in den Osteoblasten, fördert die Produktion des primären knorpeligen Kallus und die Angiogenese. IL-6 stimuliert die

Angiogenese, die Produktion des Endothelwachstumsfaktors VEGF (Vascular endothelial growth factor) und die Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten (Marsell & Einhorn, 2011). IL-6 wirkt sowohl pro- als auch antiinflammatorisch. Innerhalb der ersten Stunden nach der Fraktur induziert IL-6 die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und natürlichen Killerzellen. Zusätzlich induziert IL-6 aber auch lösliche Rezeptoren für IL-1 und TNF- α und hemmt somit diese proinflammatorischen Zytokine (Lenz et al., 2007). Im Zuge der Entzündungsreaktion kommt es zu einer Vasodilatation, welche die Migration weiterer hämatopoetischen Stammzellen aus dem Endothel und den Blutgefäßen fördert (Braun et al., 1996), sowie zu einer verbesserten Sauerstoffversorgung der vorhandenen ortsständigen Zellen führt. Endothelzellen aus den umgebenen Blutgefäßen, in erster Linie aus dem Periost, bilden Kapillarendothel, welches in das Hämatom einsprosst. Dabei wird das Ausmaß der Angiogenese maßgeblich durch Gewebshypoxie, niedrigem pH-Wert und die Wachstumsfaktoren bestimmt (Jerosch et al., 2002). Durch die Unterversorgung der Osteoblasten und Osteozyten mit Sauerstoff aktiviert der Hypoxie-induzierte Faktor (HIF-I) zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren die Expression spezieller Gene, welche die Sauerstoffversorgung regulieren sollen. Unter anderem beeinflusst HIF-I die Bildung neuer Blutgefäße über eine Steigerung der VEGF-Expression in den Osteoblasten (Wang et al., 2007; Song et al., 2017). Die Wiederherstellung der Durchblutung in dieser frühen Phase der Frakturheilung ist essentiell um die Frakturzone optimal mit Zellen, Nährstoffen und Mediatoren zu versorgen (Schmidt-Bleek et al., 2012). Die ersten Zellen, die im Rahmen der Entzündungsreaktion in den Frakturspalt eindringen, sind kurzlebige neutrophile Granulozyten (Chung et al., 2006), die für die Bekämpfung eingedrungener Bakterien verantwortlich sind (Trostle et al., 1996). Die neutrophilen Granulozyten sekretieren verschiedene Chemokine, unter anderem CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL2), welches die Migration von Monozyten induziert (Bastian et al., 2011). Die Monozyten differenzieren sich anschließend zu Makrophagen, die mit den nachfolgend einwandernden Lymphozyten, Gewebereste und Bakterien eliminieren (Trostle et al., 1996). Den Gewebsmakrophagen kommt eine zentrale Rolle in der Frakturheilung zu, indem sie eine Vielzahl biochemisch aktiver Substanzen wie die Wachstumsfaktoren PDGF, TGF- β , FGF und IGF, extrazelluläre Matrixproteine, sowie chemotaktische Faktoren und proteolytische Enzyme sezernieren (Gerstenfeld et al., 2003). Des Weiteren erfolgt die Migration von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark, welche u.a. die Vorläuferzellen der Osteoblasten darstellen (McKibbin, 1978).

Das Frakturhämatom besitzt angiogene und osteogene Eigenschaften, die essentiell für eine erfolgreiche Frakturheilung sind (Schell et al., 2017). Die Revaskularisierung verläuft über

zwei molekulare Signalwege, den Angiopoietin- und VEGF- abhängigen Signalweg. Angiopoietin fördert die Bildung von Blutgefäßen, wohingegen VEGF die Gefäßneubildung und die Proliferation von Endothelzellen stimuliert (Marsell & Einhorn, 2011). In der Endphase der Inflammation wandern, durch Mediatoren angelockte Fibroblasten in das Frakturhämatom ein und beginnen mit der Kollagensynthese, wodurch das Hämatom zügig reorganisiert wird und ein temporärer Kallus aus Granulationsgewebe die Bruchzone ausfüllt (McKibbin, 1978).

Weich- und Hartkallusbildung

Die Phase des weichen Kallus bricht ein paar Tage vor Beendigung der inflammatorischen Phase an und dauert ungefähr drei Wochen (Griffon, 2005). Im Frakturhämatom enthaltene Makrophagen beginnen mit dem Abbau der Fibrinfäden, während die Osteoklasten das nekrotische Knochengewebe der Frakturrenden entfernen (Remedios, 1999). Sukzessive wird das Hämatom durch Granulationsgewebe, welches aus Entzündungszellen, Fibroblasten und Kollagenfasern besteht, ersetzt (Griffon, 2005). Neben der weiterhin verstärkten Vaskularisation stellt die Proliferation und Differenzierung pluripotenter mesenchymaler Zellen zu Fibroblasten, Chondroblasten oder Osteoblasten ein charakteristisches Merkmal der Kallusbildungsphase dar (Sfeir et al., 2005). Man unterscheidet drei Lokalisationen, in denen es zur Kallusbildung kommen kann: der endostale, intrakortikale und periostale Raum. Der endostale Raum befindet im Längsschnitt zwischen der Kortikalis im Markraum, der intrakortikale Raum entsteht durch die Zusammenhangstrennung (Osteotomie) der Kortikalis, wohingegen sich der periostale Raum außerhalb der ursprünglichen Kortikalis befindet. Der endostale und Intrakortikale Raum sind knöchern begrenzt, was die Kallusgröße limitiert. Dadurch fällt der periostale Kallus naturgemäß am größten aus, da das umgebene Muskelgewebe ausweichen kann (Ellinghaus et al., 2011). Die Kallusbildung beginnt in der Peripherie. Im Rahmen der intramembranösen Ossifikation startet in den frakturspaltfernen Regionen die periostale, direkte Knochenbildung (Claes et al., 1999), indem Osteoblasten der Kambiumschicht ein Gerüst aus Geflechtknochen bilden (Webb et al., 2000). Die im Frakturspalt vorherrschenden interfragmentären Bewegungen reduzieren die Einsprossung neu gebildeter Kapillaren in den endostalen Raum, was wiederum zu einer niedrigen Sauerstoffkonzentration führt (Claes et al., 1999). Aus einer niedrigen Sauerstoffspannung resultiert die Bildung von Knorpelgewebe, wohingegen Osteoblasten eine höhere Sauerstoffspannung bevorzugen (Remedios, 1999). Niedrige Sauerstoffspannung, spärliche Vaskularisation, Wachstumsfaktoren und interfragmentäre Bewegung prädestinieren für die Bildung eines knorpeligen Kallus innerhalb des Frakturspaltes (Griffon, 2005). Je flexibler eine

Fraktur fixiert ist, desto größer sind die vorherrschenden interfragmentären Bewegungen, wodurch eine vermehrte Knorpelbildung bedingt ist. Verglichen mit rigideren Osteosyntheseverfahren führt dies zu einer verzögerten Frakturheilung (Epari et al., 2006). In Richtung Frakturrenden herrscht aufgrund intrakortikal einsprossender Blutgefäße des Periosts eine höhere Sauerstoffspannung, weshalb sich hier Granulationsgewebe bildet, welches nachfolgend in den Weichkallus (Knorpel) umgebaut wird (Palmer et al., 1992; Griffon, 2005). Die Phase des weichen Kallus endet, wenn die Frakturrenden über Knorpel verbunden sind. Jedoch hat der weiche Kallus noch keine ausreichende mechanische Stabilität um eine vollständige Stabilisierung der Fraktur zu erreichen. Durch die Einlagerung von Kalksalzen wird das knorpelige Kallusgewebe zunehmend verhärtet. Hierzu muss der hyaline Knorpel jedoch eine kritische Masse aufweisen, bevor er zu kalzifizieren beginnt (Voggenreiter, 2009). Der Beginn der Kalzifikation leitet die Phase des harten Kallus ein.

In der zweiten Woche nach Beginn der Frakturheilung überdeckt ein großer Knorpelkallus den Frakturspalt. Im Rahmen der enchondralen Ossifikation beginnt nun die Kalzifikation des Knorpelgewebes (Sfeir et al., 2005). Beginnend an den Frakturrenden erfolgt die Kalzifikation des weichen Kallus und setzt sich bis in das Zentrum der Fraktur fort (Griffon, 2005). Im Rahmen der fortschreitenden Knochenregeneration wird nachfolgend der primäre weiche Knorpelkallus resorbiert und durch einen harten, knöchernen Kallus (Geflechtknochen) ersetzt (Marsell & Einhorn., 2011). Dieser Prozess geht von den im weichen Kallus verorteten hypertrophen Chondrozyten aus (Webb et al., 2000) und ähnelt stark den Vorgängen an der Epiphysenplatte (Sfeir et al., 2005). In Vorbereitung auf die Matrixkalzifikation sezernieren die hypertrophen Chondrozyten aus ihren interzellulären Vesikeln Proteasen und Phosphatasen in die extrazelluläre Matrix (Voggenreiter, 2009). Die Proteasen degradieren Glykosaminoglykane, da große Mengen dieser sauren Polysaccharide bewiesenermaßen die Mineralisation hemmen (Sfeir et al., 2005). Die Phosphatasen führen zu einer Degradation von Matrixphosphodiestern und somit zur Freisetzung von Phosphationen, welche anschließend mit Kalziumionen präzipitieren (Voggenreiter, 2009). Die Chondrozyten werden nachfolgend von der mineralisierten knorpeligen Matrix eingeschlossen und gehen in Apoptose über (Gerstenfeld et al., 2003). Im Zuge der voranschreitenden Verkalkung erfährt der Kallus eine zunehmende Rigidität, welche eine interne Immobilität der Fraktur bedingt. Osteoklasten bilden Resorptionskanäle in die Kapillaren und Osteoblasten einwandern können. Die von den angrenzenden Knochen ausgehenden Kapillaren dringen in den kalzifizierten Kallus ein, infolgedessen die Sauerstoffspannung anwächst (Sfeir et al., 2005). Zeitgleich erfolgt die Invasion von multinukleären Osteoklasten in das Kallusgewebe. Während die Osteoklasten das

kalzifizierte Gewebe abbauen, senden sie Signalstoffe aus, die weitere Blutgefäße anziehen. Infolgedessen dringen perivaskuläre mesenchymale Stammzellen in den verkalkten Knorpel ein, welche sich nachfolgen in Osteoprogenitorzellen und anschließend in Osteoblasten differenzieren (Voggenreiter, 2009). In Verknöcherungszonen der verkalkten Knorpelmatrix liegen entlang der nutritiven Gefäße Osteoblasten, die Osteoid ablagern, welches nachfolgend mineralisiert und die Bildung von Geflechtknochen bedingen (Jerosch et al., 2002). Mit Fortschreiten der Mineralisation und somit Bildung des Hartkallus erfolgt eine Fusion der Frakturenden. Strukturell unterscheidet sich der neu gebildete Knochen allerdings von der ursprünglichen Form des Knochens (Griffon, 2005), da er sich architektonisch entlang der nutritiven Gefäße ausgerichtet hat und eine mechanisch-belastungsabhängige Orientierung vermissen lässt (Braun et al., 1996). Des Weiteren ist Geflechtknochen vergleichsweise schwach mineralisiert, enthält wenig Hydroxyapatit. Dennoch hat der beschädigte Knochen zu diesem Zeitpunkt genug Festigkeit und Stabilität zurückgewonnen, dass er eine leichte mechanische Belastung toleriert (Griffon, 2005). Der Hartkallusphase schließt sich die Phase des Remodellings an (Sfeir et al., 2005).

Remodelling

Die finale Phase der Frakturheilung ist charakterisiert durch die anatomische und funktionelle Wiederherstellung des Knochens, wodurch er seine optimale Funktion und Festigkeit zurückerlangt. Dieser Prozess verläuft sehr langsam und kann beim Menschen mehrere Jahre in Anspruch nehmen (Griffon, 2005). Während der Remodelling Phase wird der Geflechtknochen durch lamellären Knochen ersetzt und überschüssiger Kallus resorbiert (Sfeir et al., 2005). Im Rahmen des Remodellings wird aus Osteoklasten, Osteoblasten und Blutgefäßen eine temporäre anatomische Struktur, die sogenannte basic multicellular units (BMU), gebildet. Da die Lebensspanne der Osteoklasten zeitlich begrenzt ist, müssen ständig neue Progenitorzellen aus dem Gefäßsystem migrieren um das Fortbestehen der BMUs zu sichern. Die einwandernden Progenitorzellen differenzieren sich u.a. zu Osteoklasten, wovon einige sich zum vorderen Bereich der BMU gruppieren (Jilka, 2003). Strukturell entsprechen sie den bei der direkten Frakturheilung erwähnten cutting cones. Ihre Spitze wird durch eine aus Osteoklasten formierte Gruppe charakterisiert, während eine Reihe von Osteoblasten ihre Nachhut bilden (Hernandez, 1999; Taylor, 2007). Die BMUs koppeln somit die Knochenresorption mit der Knochenformation und ermöglichen daher eine beschleunigte Durchbauung beschädigter Knochenareale. Die BMUs bewegen sich in Tunneln durch den Knochen, entfernen altes Knochenmaterial und ersetzen es durch neuen Knochen und formen dabei ein Osteon. (Jilka,

2003; Taylor, 2007). Die Balance zwischen osteoklastischer Resorption und osteoblastischer Ablagerung wird von Wolffs Transformationsgesetz bestimmt, welches besagt, dass sich die äußere Form und innere Struktur des Knochens ständig an die mechanische Beanspruchung anpasst. Des Weiteren wird der Umbau durch Piezoelektrizität reguliert, ein Phänomen durch das elektrische Polarisieren erzeugt wird, wenn ein Festkörper durch Druckkraft elastisch verformt wird. Eine auf den Knochen einwirkende Axiallast erzeugt einerseits eine elektropositive konvexe Oberfläche, an der osteoklastische Aktivität dominiert. Die entgegengesetzt konkave elektonegative Oberflächen assoziiert man mit einer Steigerung der osteoblastischen Aktivität (Griffon, 2005). Somit bestimmt die mechanische Belastung, aufgrund ihres Einflusses auf die Aktivität der osteogenen Zellen, im Wesentlichen die Form des neu gebildeten Knochens. Das Ziel der Remodelling Phase ist der schrittweise Umbau von Geflecht- in Lamellenknochen sowie die Wiederherstellung der Knochenmarkshöhle (Marsell & Einhorn, 2011), so dass ein optimal an Belastung adaptierter Knochen hervorgeht (Griffin, 2005).

2.3 Komplikationen der Frakturheilung

Das Ziel jeder Knochenbruchbehandlung ist die möglichst schnelle und anatomische exakte Wiederherstellung eines verletzten Abschnittes des Bewegungsapparates (Voggenreiter, 2009). Dies setzt eine komplikationsfreie Knochenheilung voraus, jedoch zeigen etwa 10% aller Frakturen keinen physiologischen Heilungsprozess (Einhorn et al., 2015). Trotz ständig wachsender Erkenntnisse über die Mechanismen der Knochenheilung, stellen verzögerte oder ausbleibende Heilung immer noch ein klinisches Problem dar (Garcia et al., 2013). Es sind eine Reihe von Störfaktoren bekannt, welche zu einem Ausbleiben der Knochenheilung führen können. Man unterscheidet dabei patientenbezogene und frakturbezogene Störfaktoren, sowie mechanische und biologische Faktoren (Voggenreiter, 2009). Der systemische Status des Patienten stellt einen wichtigen Einfluss auf die Knochenheilung dar. Der Ernährungszustand (Voggenreiter, 2009), die Genetik (Mannigrasso et al., 2008), Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus (Garcia et al., 2013), sowie das Alter und Geschlecht des Patienten (Metha et al., 2011; Ode et al., 2014) üben einen wichtigen Einfluss auf die Knochenheilung aus. Die Art der Fraktur (offen vs. geschlossene Fraktur) und die Art und Größe der Krafteinwirkung (Voggenreiter, 2009), Weichteilschäden (Claes et al., 2006), Gefäßverletzungen (Lu et al., 2007), sowie Verletzungen des Periosts und Endosts (Dickson et al., 2008) stellen

frakturbezogene Parameter dar und nehmen ihrerseits Einfluss auf den Heilungsprozess. Infektionen als Folge offener Frakturen oder als Komplikation operativer Frakturbehandlung bedingen ebenfalls eine verzögerte oder ausbleibende Heilung (Audige et al., 2005). Auch pharmakologische Faktoren haben eine negative Auswirkung auf die Knochenbruchheilung. So konnte gezeigt werden, dass durch Heparine, nichtsteroidale Antiphlogistika oder bestimmte Antibiotika die Knochenheilung verzögert wird (Voggenreiter, 2009). Die Osteosynthesetechnik und deren Stabilisationssteifigkeit können ebenfalls zu einer Störung der physiologischen Abläufe der Frakturheilung führen (Histing et al., 2010). Des Weiteren ist die mechanische Umgebung entscheidend für das Heilungsergebnis einer Knochenfraktur (Lienau et al., 2005; Mora et al., 2000; Willie et al., 2009). Für die vorherrschenden biomechanischen Bedingungen im Frakturspalt ist die Fixationssteifigkeit entscheidend (Schell et al., 2005; Epari et al., 2007; Röntgen et al., 2010). Die Fixationssteifigkeit kann in Axial-, Torsions-, Biege- und Schersteifigkeit unterteilt werden (Duda et al., 2000). Die Steifigkeit eines Osteosynthesystems variiert aufgrund unterschiedlicher Parameter. Laut Claes und Mitarbeitern (2000) erhöht eine nah am Knochen angebrachter Fixationsbalken die Steifigkeit des Systems, da die Möglichkeit des Durchbiegens der Schrauben dadurch minimiert wird. Die Steigerung der Anzahl an Schanzschrauben bzw. der Pins und die Erhöhung des Schraubendurchmessers bedingen gleichermaßen eine höhere Steifigkeit der Fixation, wie auch die Materialeigenschaften einzelner Komponenten (Duda et al., 2000). In Studien konnte gezeigt werden, dass Titanium-Pins im Vergleich mit einer Variante aus Edelstahl desselben Designs eine signifikant niedrigere axiale Steifigkeit erzielen (Strube et al., 2008; Willie et al., 2009). Grundsätzlich reduzieren rigide Osteosyntheseverfahren interfragmentäre Bewegungen, während flexiblere Varianten eine größere Bewegung der Fraktarenden zulassen (Goodship, 1992). Klein und Mitarbeiter (2003) brachten den interfragmentären Bewegungsspielraum in der Initialphase der Knochenheilung mit der resultierenden Kallusgröße und dessen Qualität in Zusammenhang. Im Vergleich mit einer rigide fixierten Versuchsgruppe, respektive einem geringen Bewegungsspielraum der Fraktarenden, erzielte die Vergleichsgruppe mit der größeren interfragmentären Bewegung einen Kallus kleineren Durchmessers, aber höherer Stabilität. Große interfragmentäre Bewegung bedingt einen größeren Kallus. Trotz erheblichen Kallusumfangs kann die knöchernen Spaltüberbrückung ausbleiben und der Kallus nicht mechanisch belastbar sein (Claes et al., 2000). Insbesondere Scherkräfte scheinen einen negativen Einfluss auf den Heilungsverlauf auszuüben (Augat et al., 2003). Die Größe des Frakturspalt stellt einen weiteren Parameter dar, der den physiologischen Heilungsprozess beeinflussen kann. Mit zunehmendem Abstand der Fraktarenden zueinander verzögert sich die

Kallusüberbrückung (Claes et al., 2000). Laut Wolf und Mitarbeiter (1989) erzielen Frakturen mit einer Spanne von 0,2 – 1 mm bessere Heilungsergebnisse als Frakturen, deren Defekt größer als 2 mm ist. Beispielsweise im Tiermodell der Ratte führt ein segmentaler 5mm-Femurdefekt bei weiblichen Tieren zu einer ausbleibenden Heilung (Metha et al., 2011). Die Blutversorgung im Kallusgewebe beeinflusst zusätzlich den Heilungsverlauf. Treten in der frühen Phase der Kallusbildung starke interfragmentäre Bewegungen auf, bedingt dies eine Ruptur der kleineren Kapillaren, infolgedessen es zu einer verringerten Sauerstoffkonzentration bzw. Hypoxie und somit zu einer pathologischen Zunahme an fibrinösen Bindegewebe im Frakturspalt kommt (Claes et al., 2002).

Aufgrund dieser multiplen Parameter, welche die Knochenheilung beeinflussen, resultieren verzögerte und ausbleibende Heilung als Störungen der Frakturheilung (Voggenreiter, 2009). Ist ein Knochenbruch nach vier bis sechs Monaten nicht verheilt, spricht Voggenreiter (2009) von einer verzögerten Heilung. Laut Marsch (1998) stellt der Stillstand der periostalen Antwort bevor die Fraktur überbrückt wurde, den Zeitpunkt der verzögerten Heilung dar, während Garcia und Mitarbeitern (2013) die Meinung vertreten, dass eine verzögerte Heilung (delayed healing) nicht einfach zu definieren ist, da die Knochenheilung einen kontinuierlichen Prozess darstellt. Beginnend mit der Formation eines weichen Kallus, gefolgt von der harten Kallusformation, welche zu einer knöchernen Überbrückung der Knochenfragmente führt und durch das Remodelling komplettiert wird, kann jede dieser Phasen durch mehrere Faktoren beeinflusst werden. Aufgrund der multiplen Parameter, die die Knochenheilung beeinflussen, ist die Nennung spezifischer Zeitpunkte nicht geeignet um eine verzögerte Heilung zu definieren. Vielmehr sollte sie als verzögerte knöcherne Spaltüberbrückung im Vergleich mit einer adäquaten Kontrollgruppe definiert werden (Garcia et al., 2013).

Bezüglich der ausbleibenden Heilung existieren in der Fachliteratur ebenfalls verschiedene Angaben hinsichtlich der Definition des Zeitpunktes, ab dem man von einer sogenannten non-union bzw. Pseudarthrose sprechen kann. Laut Voggenreiter (2009) spricht man von einer ausbleibenden Heilung, wenn der Bruch nach mehr als sechs Monaten nicht verheilt ist. In Anlehnung an den sechsmonatigen Zeitraum definieren Garcia und Mitarbeiter (2013) eine fehlende knöcherne Konsolidierung der Fraktur nach mehr als 15 Wochen im Tiermodell der Ratte als non-union. March (1998) definiert die ausbleibende Heilung als Stillstand der periostalen und endostalen Antwort ohne Überbrückung. Mathon et al. kamen 1998 zu der Erkenntnis, dass diaphysäre Defekte, deren Größe den 1,4-fachen Durchmesser überschreiten, nicht heilungsfähig sind. Diese Defekte, die während der Lebenszeit eines Individuums nicht fähig zu einer spontanen Heilung sind, werden auch als critical size defects (CSDs) definiert

(Schmitz et al., 1986). Das Ausbleiben einer Frakturheilung wird auch als Falschgelenkbildung (Pseudarthrose) bezeichnet (Voggenreiter, 2009). Als Ursache für die unzureichende knöcherne Überbrückung des Frakturspalt es gelten die fehlende Gefäßversorgung und die damit einhergehende Knochennekrose, eine inadäquate Stabilität oder zu frühe Instabilität oder der mangelnde Kontakt der Frakturrenden (Stürmer, 1996). Klinisch werden eine schmerzbedingter Nichtgebrauch der betroffenen Gliedmaße und eine dadurch bedingte Muskelatrophie und Gelenksteifigkeit beobachtet (Nunamaker et al., 1985). Radiologisch können zwei verschiedene Formen von Pseudarthrosen unterschieden werden. Während die hypertrophe Pseudarthrose durch einen ausgeprägten Kallus mit persistierendem Frakturspalt und enchondrale Knochenbildung an den Frakturrenden charakterisiert ist, stellt sich die atrophe Pseudarthrose durch eine Sklerosierung des Knochenmarkskanals und spärliche oder ausbleibende Kallusbildung dar (Garcia et al., 2013).

Störungen der Frakturheilungen gehen nicht nur mit anhaltenden Schmerzen und daraus resultierender sinkender Lebensqualität der Betroffenen einher, sondern auch mit hohen ökonomischen Kosten (Victoria et al, 2009). Knochenheilung hat fünf Hauptanforderungen: biomechanische Stabilität, Osteoprogenitorzellen, ein Leitgerüst für neue Knochenformation (osteokonduktive Strukturen), Vaskularisation und einen Wachstumsfaktor, das sogenannte „diamond concept“ (Giannoudis et al., 2007; Giannoudis et al., 2008; Schmidmaier & Moghaddam, 2015). Als Goldstandard der Versorgung von Pseudarthrosen gilt derzeit die autologe Knochenmarkstransplantation aus dem hinteren Beckenkammknochen (Hayda et al., 2006; Nauth et al., 2011). Das Autotransplantat hat osteogene, osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften. Durch die Rekrutierung von mesenchymalen Stammzellen und deren Beeinflussung durch BMPs ist autologes Knochenmark in der Lage die Knochenneubildung anzuregen. Zudem besitzt das Autotransplantat Materialeigenschaften, welche eine Leitstruktur (Matrix) für die Osteoneogenese liefern (Tuchman et al., 2016). Autologes Knochenmark ist allerdings nur begrenzt verfügbar und mit einer hohen Entnahmemorbidität, Schmerzen, Hämatomen und möglichen Infektionen assoziiert (Laurie et al., 1984; Jäger et al., 2005; Boerckel et al., 2011; Moghaddam et al., 2015). Allotransplantate von fremden Spendern erhöhen wiederum das Risiko von Immunreaktionen und Infektionen durch das Einbringen von körperfremdem Material. Allotransplantate dienen als osteokonduktives Gerüst (Griffon, 2005; Moghaddam et al., 2015). Auf Grundlage der gegenwärtig untersuchten Mechanismen der Knochenheilung wird weiterhin nach effizienten und alternativen Behandlungsansätzen geforscht. Zum jetzigen Zeitpunkt existieren vielfältige therapeutische Ansätze auf dem Gebiet der Knochenheilungsstörung, darunter biomechanische

und physikalische Ansätze sowie Konzepte auf zellulärer und molekularer Ebene (Einhorn et al., 2015). Anhand der Eigenschaften zur Unterstützung der Knochenregeneration erfolgt eine grobe Einteilung in drei Klassen: osteogene, osteokonduktive und osteoinduktive Substanzen zur Knochenheilung. Wie vorab erwähnt, verfügt autologes Knochenmark über osteogene Eigenschaften, da es lebende Osteogrogenitorzellen enthält. Gleichzeitig besitzt es aber auch osteoinduktive und osteokonduktive Fähigkeiten. Calciumsulfate, Calciumphosphate, Allo- und Xenotransplantate sowie keramisches Material dienen als Leitgerüst für neue Knochenformation. Osteoinduktive Substanzen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit die Knochenneubildung anzuregen aus und schließen Wnt-Proteine und BMPs ein (Buza & Einhorn, 2016). Insbesondere auf dem Feld der Wachstumshormone als Alternative zum autologen Knochenmarkstransplantat hat es in den letzten Jahren zahlreiche Untersuchungen und experimentelle Studien gegeben (Nauth et al., 2011).

2.4 Biologische Stimulation

2.4.1 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren stellen eine Reihe von Polypeptiden dar, denen eine entscheidende Rolle in der embryonalen Gewebedifferenzierung und der Signalübertragung zwischen verschiedenen Zellen zukommt (Kübler, 2000). Funktionell sind sie an der Regulierung der Zelldifferenzierung, -proliferation und -migration sowie der Koordination der Gewebeanordnung beteiligt (Ruschke et al., 2012).

Mitte der 60er Jahre entdeckte der amerikanische Chirurg Marshall R. Urist, dass muskulär implanterter, demineralisierter, allogener Knochen im Muskelgewebe diverser Tiermodelle zu einer Knochenneubildung führte (Urist, 1965). 1971 gelang es Urist und seiner Arbeitsgruppe aus Knochengewebe ein heterogenes Proteingemisch zu extrahieren, welches aufgrund seiner knochenbildenden Eigenschaften bone morphogenetic protein genannt wurde (Urist & Strates, 1971). Heutzutage werden BMPs aufgrund ihrer multiplen Einflüsse auf den Körper auch gerne als body morphogenetic proteins übersetzt (Wagner et al., 2010). Wozney und Mitarbeitern gelang es 1988 durch weiteren enzymatischen Abbau und nachfolgender Aminosäuresequenzierung die Proteine BMP-1 bis 3 zu klonieren (Wozney et al., 1988). Im Rahmen weiterführender Studien erfolgte die Klonierung weiterer BMPs, so dass mittlerweile

ungefähr 25-30 BMPs aus verschiedenen Gewebearten isoliert und kloniert wurden (Wagner et al., 2010; Ruschke et al., 2012; Schmidt-Bleek et al., 2016).

Strukturell handelt es sich bei den BMPs um Proteine, welche aus zwei identischen Peptidsträngen aufgebaut sind (Mundy et al., 2007). Durch Abspaltung ihrer jeweiligen Propeptidsequenz entsteht das biologisch aktive Protein. Mit Ausnahme von BMP-1, welches mit Prokollagen-C-Proteinase identisch ist, weisen alle BMPs in ihrem C-terminalen Ende sieben konservierte Cysteinreste auf und werden daher zur Proteinfamilie des Wachstumsfaktors transforming growth factor β (TGF- β) gezählt. Zu den weiteren Mitgliedern der TGF- β -Familie gehören unter anderem Activin und Inhibin. Die growth differentiation factors (GDFs) zählen ebenfalls zu der BMP-Familie (Kübler, 2000). Aufgrund ihres molekularen Aufbaus werden die BMPs in drei Unterklassen eingeteilt. BMP-2 und -4 sind Mitglieder der ersten Unterklasse. BMP-5, -6, -7 und -8 gliedern sich in die zweite Unterklasse ein und BMP-3 stellt den Vertreter der dritten Unterklasse dar (Wozney, 2002). Hinsichtlich der Expression, der Rezeptoraffinität, der Gewebeverfügbarkeit und ihrer Funktion bestehen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen BMPs. Bei der embryonalen Differenzierung von Geweben und Organen spielen die BMPs eine entscheidende Rolle (Kübler, 2000). BMP-2, -3, -4, -6 und -7 sind nachweislich an der embryonalen Skelettentwicklung beteiligt, wobei die einzelnen BMPs zum Teil zu unterschiedlichen Zeitpunkten in verschiedenen Skelettabschnitten exprimiert werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass einzelne BMPs unterschiedliche Steuerfunktionen während der Embryogenese besitzen (Wozney et al., 1993). In verschiedenen Studien wurde die Mitwirkung verschiedener BMPs an der Entwicklung von Lunge, Niere, Darm, Auge und des zentralen Nervensystems dargestellt (Vukicevic et al., 1994; Dudley et al., 1995; Wang et al., 2014). Wie bereits erwähnt, besitzen einige BMPs knochenbildende Eigenschaften. Sie sind für die Differenzierung von pluripotenten, perivaskulär lokalisierten Mesenchymalzellen in Knorpel- und Knochenbildende Zellen verantwortlich (Ruschke et al., 2012). Ihre biologische Aktivität entfalten die BMPs durch die Bindung an Oberflächenrezeptoren der Zielzelle, beispielsweise an Mesenchymzellen (Kübler, 2000). Hierbei handelt es sich um membrangebundene Serin/Threonin-Kinase Rezeptoren des Typs I und Typs II (Mundy et al., 2007; Ruschke et al., 2012). Grundsätzlich unterteilt man die beiden Rezeptoren in jeweils drei Untergruppen. Zu den Typ I-Rezeptoren zählen u. a. der Typ I Activin Rezeptor (ActR-I) und die BMP Rezeptoren Typ I A und B (BMPR-IA und BMPR-IB). Der Typ II BMP Rezeptor (BMPR-II) und die Activin Rezeptoren Typ IIA und Typ IIB (ActR-IIA und ActR-IIB) sind Beispiele für Mitglieder der Typ II-Rezeptoren (Ehrlich et al., 2012; García de Vinuesa et al., 2016). Diese Rezeptoren haben

unterschiedliche Bindungsaffinitäten für BMP-Liganden und sind verantwortlich für die einzelnen Funktionen der BMPs (Mundy et al., 2007). Im Detail bindet BMP zunächst an einen Typ II-Rezeptor, der nachfolgend den Typ I-Rezeptor phosphoryliert, woraus die Bildung eines heteromerischer Rezeptorkomplexes resultiert. Dieser Komplex phosphoryliert seinerseits intrazelluläre Proteine, die sogenannten Smad 1/5/8 (de la Peña et al., 1995; Mundy et al., 2007; Ruschke et al., 2012). Nach der Phosphorylierung werden die Smads vom Rezeptorkomplex freigesetzt, rekrutieren einen allgemeinen Mittler (Smad 4) und bilden einen nukleären Translokationskomplex, welcher in den Zellkern transportiert wird. Dort aktiviert er spezifische Smad-Signalwege (Mundy et al., 2007; Ruschke et al., 2012). Die negative Regulation des BMP-Signalwegs durch intrazelluläre Regulatoren, wie beispielsweise Smad 6, beeinflusst die Wirkung von BMP im Skelettsystem ebenso wie die extrazellulären Antagonisten (Yanagita, 2005). Diese extrazellulären Polypeptide binden direkt an das BMP-Molekül und verhindern dadurch die Bindung von BMP an seine Rezeptoren. Sie besitzen die gleiche Cysteinknotenstruktur wie TGF- β und die BMPs. Basierend auf der Größe des Cysteinknotens werden die BMP-Antagonisten in drei Gruppen eingeteilt. Noggin und Chordin bilden die erste Gruppe, Twisted gastrulation (Tsg) die zweite Gruppe. Die DNA Familie, bestehend aus Gremlin, PRDC, Coco, Cer 1, Dan und Sclerostin (SOST), stellt die Vertreter der dritten Gruppe dar (Avsian-Kretchmer et al., 2004). Noggin blockiert die BMP-Aktivität in undifferenzierten und differenzierten Osteoblasten durch Hemmung der Osteoblastogenese (Devlin et al., 2003), während Chordin eine Rolle bei der Osteoblastenfunktion und Chondrozytenreifung spielt (Tardif et al., 2006). Diverse *in vitro* Studien an verschiedenen Zelltypen belegen, dass BMPs durch mechanische Stimulation eine Regulation erfahren und dabei die BMP-Signaltransduktion in autokriner oder parakriner Weise beeinflussen (Tenney et al., 2009; Bieler et al., 2009; Huang et al., 2010; Kopf et al., 2012). Zusätzlich zu der mechanischen Stimulation stellen intrazelluläre Proteine, Antagonisten oder andere Wachstumsfaktoren ein strenges Kontrollsystem über die einzelnen Schritte der BMP-Signalkaskade dar (Sieber et al., 2009). Die in der Knochenmatrix lokalisierten BMP-2, -4 sowie -7 weisen osteoinduktive Eigenschaften auf (Chen et al., 2016). Ihr positiver Effekt auf die Knochenheilung konnte in verschiedenen Versuchstieren und insbesondere auch in der Ratte belegt werden (Wildemann et al., 2011; Faßbender et al., 2014). Die stärksten induktiven Eigenschaften besitzen BMP-2 und BMP-7 (Schmidmaier & Moghaddam, 2015). Die osteoinduktive Wirksamkeit von BMP-4 beträgt nur ungefähr die Hälfte derjenigen von BMP-2 (Kübler, 2000). Wie bereits erwähnt sind BMP-2 und BMP-7 die bisher am besten erforschten Mitglieder der Bone morphogenetic proteins. Aufgrund ihrer hohen Osteoinduktivität sind sie

derzeit die einzigen Wachstumsfaktoren, die für die klinische Anwendung (Orthopädie und Unfallchirurgie) am Stütz- und Bewegungsapparat zugelassen sind (Wildemann et al., 2011). BMP-7 (OP-1; Osigraft®) ist für die Behandlung von traumatisch bedingten Tibiafrakturen mit Pseudarthrosebildung, die seit mindestens 9 Monaten besteht und eine Vorbehandlung mit einem Autotransplantat fehlschlug, zugelassen. Rekombinates, humanes BMP-2 (rhBMP-2; INFUSE®) ist für die Fusion von Wirbelkörpern (Wirbelsäulenversteifung) und die Behandlung von offenen Tibiafrakturen zugelassen (Zhu et al., 2004; Axelrad et al., 2009; Wildemann et al., 2011; Lyon et al., 2013; Schmidmaier & Moghaddam, 2015; Schmidt-Bleek et al., 2016).

2.4.2 Bone morphogenetic protein- 2 (BMP-2)

1988 isolierten und sequenzierten Wozney und Mitarbeiter das BMP-2 Protein. Sein Genlocus ist auf dem Chromosom 20 lokalisiert (Reddi, 2001). Mesenchymale Zellen, Chondroblasten und Osteoblasten stellen u. a. die Expressionszellen von BMP-2 dar (Bostrom et al., 1995). Im Rahmen der intramembranösen Ossifikation sind die osteoblastären Vorläuferzellen für die BMP-Expression verantwortlich, wohingegen den chondralen Vorläuferzellen und den hypertrophen Chondrozyten die stärkste BMP-Expression während der enchondralen Ossifikation zukommt (Bostrom, 1998). BMP-2 nimmt eine herausragende Stellung in der Frakturheilung ein. Unter anderem ist es essentiell für die Initiation der Frakturheilung (Ruschke et al., 2012). Es ist bekannt, dass genetisch veränderten Mäusen, die kein BMP-2 bilden können, die Fähigkeit zur erfolgreichen Frakturheilung fehlt. Obwohl BMP-4 und BMP-7 in den BMP-2 defizienten Mäusen vorhanden waren, konnten die spezifischen Aufgaben des BMP-2 nicht kompensiert werden, da es sich bei BMP-2 um einen notwendigen endogenen Mediator in der Frakturheilung handelt (Tsuji et al., 2006). In der ersten Phase der Frakturheilung, unmittelbar nach dem Trauma, zeigt sich erstmalig ein Peak der BMP-2 Expression und wird anschließend im Rahmen des Umbaus von Knorpel in Geflechtknochen erneut hochreguliert. Erst während der Bildung des Lamellenknochens erfolgt eine Runterregulierung der BMP-Expression, nichtsdestotrotz kann BMP-2 während aller Phasen der Frakturheilung detektiert werden (Cho et al., 2002; Ruschke et al., 2012). So stimuliert BMP-2 beispielsweise die VEGF-Expression und induziert dadurch die Angiogenese (Carano et al., 2003; Ruschke et al., 2012). Während der enchondralen Ossifikation ist BMP-2 für die Rekrutierung von Osteoprogenitorzellen aus dem Periost verantwortlich, sowie für die Aktivierung und Differenzierung der chondrogenen und osteogenen Zelllinie (Ruschke et al.,

2012). BMP-2 induziert die Differenzierung der mesenchymalen Zellen in Osteoblasten, die ihrerseits ebenfalls BMP-2 sezernieren (Schmökel et al., 2004). Des Weiteren stimuliert BMP-2 die Proliferation von Chondrozyten und Osteoblasten (Kloss et al., 2004) und fördert die Chemotaxis der osteoblastären und monozytären Zellen (Cunningham et al., 1992).

Vom Zeitpunkt der Entdeckung der BMPs bis zum Ende der 80er Jahre wurde die BMPs aus Tierknochen und humanen Knochen extrahiert. Jedoch waren bereits für die Gewinnung kleinster Mengen mehrere Kilogramm Knochen nötig (Wang et al., 1988), da die natürliche Gewebekonzentration der BMPs äußerst gering ist (Kübler, 2000). Nachdem Wozney 1988 die Herstellung aktiver, rekombinanter, humaner BMPs (rhBMPs) gelang, besteht die Möglichkeit BMPs in größeren Mengen industriell herzustellen. Im Falle von BMP-2 wird dieses Protein meist in Hamsterovazellen (CHO-Zellen) oder in einem bakteriellen System (*E. coli*) exprimiert und von diesen in reifer, dimerer Form in das Kulturmedium sezerniert (Kübler, 2000). Die lokal wirksamen Wachstumsfaktoren unterliegen im Organismus ohne ein geeignetes Trägermaterial einem schnellen Abbau. In diversen Studien wurden deshalb unterschiedliche Materialien erprobt, die eine gleichmäßige Freisetzung des BMPs am Wirkungsort erlauben und somit einen positiven Effekt auf die Frakturheilung ausüben (Bouxsein et al., 2001; Boerckel & Kolambkar et al., 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein absorbierendes Kollagenvlies (Lysostypt®) verwendet, welches mit dem gelösten rhBMP-2 benetzt und intraoperativ appliziert wurde. Vereinzelt wurde ektope Ossifikation als möglicher Nachteil der BMP-Applikation erwähnt (Wysocki et al., 2007; Axelrad et al., 2008). Diese Komplikation kann symptomatisch zu Funktionseinschränkungen, Schmerzen und Nervenschädigungen führen und dadurch das Patientenbefinden stark beeinträchtigen (Akbar et al., 2007; Kan et al., 2011). Mit Blick auf die Therapie kritischer Knochendefekte sind daher *in vivo* Studien zum Einsatz von BMP-2 fortwährend von besonderem Interesse (Wildemann et al., 2011; Preininger et al., 2012; Bodalia et al., 2016). Ein besonderes Augenmerk liegt derzeit auf der Reduktion unphysiologisch hoher Dosen an BMP-2. Vorherige Studien haben bereits belegt, dass auch geringere Mengen an Wachstumshormonen zu einer erfolgreichen Knochenheilung führen (Boerckel & Kolambkar et al., 2011; Glatt et al., 2016; Schmidt-Bleek et al., 2016). Unterstützend findenden zahlreiche Studien zur Mechanobiologie statt, um den Einfluss mechanischer Stimulation auf Knochenzellen und Wachstumsfaktoren sowie deren biochemischen Reaktionen zu erforschen (Schwarz et al., 2012; Giorgi et al., 2016; Glatt et al., 2017).

2.5 Mechanische Stimulation

Neben der biologischen Stimulation ist die mechanische Umgebung mitentscheidend für den Heilungserfolg einer Knochenfraktur (Lienau et al., 2005; Willie et al., 2009). Die Osteosynthesetechnik und deren Stabilisationssteifigkeit bestimmen die vorherrschenden biomechanischen Bedingungen im Frakturspalt und können bei Störungen zu Misserfolgen der physiologischen Abläufe in der Frakturheilung führen (Epari et al., 2007; Röntgen et al., 2010; Histings et al., 2010).

2.5.1 Osteosynthesen

Unter einer Osteosynthese versteht man die operative Stabilisierung einer Fraktur mithilfe eines Implantats. Ziel der Osteosynthese ist es, die Frakturrenden mit geringstmöglichen Schmerzen und Aufwand zu fixieren und zu stabilisieren, bis die Fraktur zeitnah verheilt ist und somit eine schnellstmögliche Rückkehr zu den Aktivitäten des täglichen Lebens zu ermöglichen. Zur Behandlung von Frakturen stehen folgende Verfahren zur Verfügung.

Die Verschraubung stellt eine häufig verwendete Behandlungsmethode dar, durch die die Knochenfragmente mit einer oder mehreren Schrauben fixiert werden. Die Schraubenosteosynthese wird bei Frakturen angewendet, bei denen eine Kompression auf die Fraktur ausgeübt werden muss, um so das korrekte Repositionsergebnis zu stabilisieren und eine sekundäre Dislokation durch Muskelzug zu vermeiden. In der Literatur werden Nerven-Gefäß- und Sehnenverletzungen nachteilig beschrieben (Illian et al., 2013).

Mittels einer Plattenosteosynthese werden Knochenbrüche durch industriell vorgefertigte Platten unter Zuhilfenahme von Schrauben fixiert. Diese Methode bietet große Stabilität und ist daher bei zahlreichen Frakturtypen einsetzbar. Dennoch ist diese Methode mit Infektionen und Wundheilungsstörungen assoziiert (Vallier et al., 2012).

Die Kirschner-Draht-Stabilisierung wurde bereits 1920 von Dr. Martin Kirschner entwickelt und wird bis heute eingesetzt. Es werden hierbei Drähte aus Edelstahl oder Titan mit einer Stärke von 0,5–3 mm verwendet. Die Drähte werden transkutan eingebracht und erfassen die Knochenfragmente punktuell. Bei diesem Verfahren werden die Knochenfragmente nur adaptiert, aber keine Kompression auf die Fraktur ausgeübt. Insgesamt stellt diese Frakturversorgung ein risikoarmes Verfahren dar, aber die Frakturen sind nicht

belastungsstabil, was eine zusätzliche Ruhigstellung im Gips erforderlich macht (Illian et al., 2013).

Bei der Marknagelung wird ein langer Nagel in den Markraum eingebracht, wodurch eine intramedulläre Frakturstabilisierung erreicht wird. Es bestehen mögliche Risiken bei der Verwendung von Marknägeln. Durch das Aufbohren des Knochenkanals besteht die Gefahr einer Fettembolie. Des Weiteren kann die endostale Durchblutung durch den Marknagel beeinträchtigt werden. Das Hauptrisiko liegt allerdings bei Rotationsfehlstellungen (Puloski et al., 2004; Hiesterman et al., 2011).

Der Fixateur externe stabilisiert Knochenbrüche mittels einer außerhalb des Körpers liegender Stabilisierungsstruktur. Hierbei wird der Bruchspalt lediglich mit einem extrakorporalen Rahmen überbrückt, da im eigentlichen Frakturbereich kein direkt knochenverbindendes Material angewendet wird. (Hirner et al., 2008; Illian et al., 2013) Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Frakturstabilisierung ein Fixateur externe (RatExFix) der RISystem AG verwendet. Auf die Vor- und Nachteile dieses Systems im Tiermodell der Ratte wird nachfolgend näher eingegangen.

2.5.2 Fixateur externe

Die mechanische Umgebung einer Knochenfraktur ist entscheidend für deren Heilung (Huang et al., 2010). Daher hat die klinische Medizin großes Interesse durch veränderbare Fixationsstabilität, eine verbesserte Knochenheilung zu erreichen (Glatt & Matthys, 2014). Durch den Einsatz eines Osteosynthesystems besteht die Möglichkeit die Frakturenden zu reponieren und anschließend zu fixieren. Ziel dessen ist die für die Knochenheilung notwendige Stabilisierung der Fraktur. Der Fixateur externe stellt ein stabiles Fixationssystem dar, welches aber durchaus noch Mikrobewegungen der Knochenfragmente ermöglicht (Griffon, 2005). Die Versorgung von offenen Frakturen stellt eine typische Indikation für einen externen Fixateur dar, da er im Vergleich zum intramedullären Nagel eine gute Rotationsstabilität bietet (Röntgen et al., 2010). Eine weitere Indikation des Fixateurs externe stellt die Stabilisation geschlossener Frakturen mit einer hochgradigen Weichteilverletzung oder ein Kompartmentsyndrom dar (Watson, 2015). Ein Fixateur externe beinhaltet perkutanen transkortikalen Pins, welche die Knochensegmente fixieren. Die aus dem Wundgebiet herausragenden Enden der Pins werden mittels eines äußeren Rahmens verbunden, der die Position der Pins aufrechterhält. Der externe Rahmen kann linear oder zirkulär sein (Lewis et al., 2001; Palmer, 2012). Der Ringfixateur, ein durch den russischen Orthopäden Gawriil Abramowitsch Ilizarov eingeführtes Fixateursystem

findet häufig bei Tibiafrakturen seinen Einsatz, während bei Femurfrakturen häufiger lineare Systeme benutzt werden (Röntgen et al., 2010). Des Weiteren unterscheidet man zwischen der mono- oder bilateralen Positionierung der Pins, respektive Pins die einseitig am Knochen fixiert werden oder die Verwendung von Pins, die auf beiden Seiten der Extremität verankert werden. Hinsichtlich der Rahmenkonfiguration wird zwischen der uni- und biplanarer Montage unterschieden. Bei der uniplanaren Konfiguration befindet sich der Rahmen in nur einer Ebene, während bei der biplanaren Montage der Rahmen in mehr als einer Ebene liegt (Lewis et al., 2001, Palmer, 2012).

Die Wahl des externen Fixationstyps hängt von der Lokalisation und Komplexität der Fraktur ab (Watson, 2015). Die mechanische Charakteristik bzw. die finale Stabilität des externen Fixateurs kann über multiple Einflussmöglichkeiten modifiziert werden. Die Anzahl der Pins, sowie deren Materialeigenschaften und Durchmesser beeinflussen die Rigidität gleichermaßen wie der Abstand der Pins zueinander. Die Einflüsse bezüglich des Verbindungsbalkens inkludieren die Anzahl, Länge, Dicke und das Balkenmaterial, sowie der Abstand der Knochenoberfläche zum Fixateurbalken dem sogenannten Offset (Glatt et al., 2012). Laut Willie und Mitarbeitern (2009) bestimmt die Änderung des Offsets am effektivsten die Fixationssteifigkeit. Mit zunehmendem Abstand der Knochenoberfläche zum Fixateurbalken nimmt die axiale Steifigkeit des Osteosynthesystems ab. Bei einer Verdopplung des Offsets von 7,5 mm auf 15 mm nimmt die axiale Steifigkeit unproportional ab. 7,5 mm bedeuten 243% der axialen Steifigkeit im Vergleich zum höheren Offset von 15 mm (Strube et al., 2008). Dies limitiert den Einsatz dieses Systems bei starker Weichteilabdeckung oder Schwellungen der Gliedmaße (Palmer, 2012). Ein gravierender Nachteil dieser Form von Fixation ist die sogenannte Pintrack-Infektion entlang des Pins. Durch den Eintrag von Bakterien aus dem äußeren Umfeld in den Pinkanal entsteht eine schwerwiegende Osteomyelitis. Infolge dieser möglichen Komplikation kommt es zu einer Lockerung der Pins und einer daraus resultierenden Instabilität der Knochenfragmente, welches einen Revisionseingriff nötig macht. Daher stellen die sorgfältige tägliche Reinigung und Pflege der Pinaustrittsstellen eine essentielle Aufgabe der postoperativen Behandlung dar (Palmer, 2012; Watson, 2015). Nachteilig bleibt auch die von den Patienten empfundene Einschränkung der Lebensqualität (Runkel et al., 1999). Dennoch stellt der Fixateur externe ein zeitgemäßes und gängiges Osteosyntheseverfahren dar. Es kommt besonders bei polytraumatisierten Patienten zum Einsatz (Schmickal et al., 1999; Illian et al., 2013; Poenaru et al., 2015). Vorteilhaft ist die frakturferne Anbringung des Systems, wodurch die Heilungsprozesse nicht beeinflusst werden und die Gefäßversorgung geschont wird (Röntgen et al., 2010). Aufgrund seiner Modulbauweise stellt der Fixateur

externe ein sehr variables biomechanisches System dar (Lewis et al., 2001; Palmer, 2012). Durch seine einfache Handhabung und die vielfältigen Möglichkeiten der Modifikation des Osteosynthesematerials stellt der Fixateur externe in der Forschung ein bedeutendes System zur Evaluierung der mechanischen Einflüsse auf die molekularen Mechanismen der Frakturheilung dar (Röntgen et al., 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein externer Fixateur (RatExFix) der RISystem AG verwendet. Der Vorteil dieses Systems liegt in der Variabilität der unterschiedlichen Verbindungselemente (Balken) aus PEEK, wodurch eine Modulation der mechanischen Stimulation möglich ist (Glatt et al., 2012). Der Fixateur externe wird durch vier Pins mit einer Titaniumlegierung sowie einem Offset von 6mm parallel zum Knochen befestigt. Durch die reduzierte Infektionsinzidenz der verwendeten Materialien, finden Polyetheretherketon und titanlegierte Aluminium-Pins bereits Anwendung in der humane Implantatorthopädie (Glatt & Matthys, 2014). Durch das RatExFix-System kann aufgrund der variierenden Verbindungsbalken, u.a. die Mechanosensitivität der unterschiedlichen Heilungsphasen besser erforscht werden sowie eine standardisierte Stabilisation ermöglicht werden (Glatt et al., 2012).

2.6. Zielsetzung und Hypothese der Arbeit

Trotz des herausragenden Heilungspotentials von Knochengewebe gibt es noch zahlreiche klinische Situationen, in denen es zu einer gestörten Knochenheilung kommt. Der Patient erfährt dabei oft eine erhebliche Einschränkung seiner Lebensqualität.

Verschiedene präklinische und klinische Studien haben die signifikante Rolle von endogenem BMP-2 während der Knochenheilung demonstriert (Wildemann et al., 2011; Faßbender et al., 2014; Jing et al., 2016).

Neben der biologischen Stimulation ist die mechanische Umgebung mitentscheidend für den Heilungserfolg einer Knochenfraktur (Lineau et al., 2005; Willie et al., 2009). Selbst die BMP-Signalkaskade kann direkt, ohne die Sekretion eines autokrinen Liganden, durch Mechanotransduktion reguliert werden (Kopf et al., 2014). Experimentelle *in vivo* Studien zeigen, dass eine flexible Fixation von Frakturrenden in einer verlängerten chondralen Phase und verzögerter Knochenformation resultiert (Mark et al., 2004; Epari et al., 2013), während eine rigidere Fixation einen qualitativ besseren Kallus induziert (Claes et al., 2009a). Jedoch benötigt die erfolgreiche Knochenheilung zusätzlich stimulierende interfragmentäre

Bewegungen (Glatt et al., 2016; Claes, 2017). Der Konsens für einen maximalen Heilungserfolg einer Fraktur scheint somit in einer semi-rigiden Fixation zu liegen.

Das übergreifende Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Erforschung der kombinierten Stimulation unter variierenden mechanischen Rahmenbedingungen und gleichbleibender BMP-2-Menge auf die Defektheilung. Anhand mikrocomputertomographischer und biomechanischer Untersuchungen soll ermittelt werden, inwiefern die Fixationssteifigkeit die biologische Stimulation der Knochenheilung beeinflusst.

Diese Arbeit basiert auf folgender Hypothese:

Die BMP-2- stimulierte Defektheilung ist mechano-sensitiv, weshalb eine Fixation der Defektenden mittels einer semi-rigiden Steifigkeit zu einer qualitativ besseren Knochenheilung (Defektüberbrückung) führt, als eine rigide oder flexible Fixation.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 32 weibliche Sprague Dawley Ratten in einem Alter von 12 Wochen und einem Gewicht von 240 – 320 g verwendet. Die Tiere wurden aus dem Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland bezogen. Während des gesamten Versuchszeitraumes erfolgte die Haltung der am Versuch beteiligten Tiere in der Forschungseinrichtung experimentelle Medizin (FEM) der Charité, Campus Virchow Klinikum, Berlin, Deutschland. Die Genehmigung zur Durchführung der Versuchsreihe wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales, LaGeSo; Berlin (Genehmigungsnummer G 0248/11) erteilt.

3.1.1 Haltung

Nach der Einnistung in der Forschungseinrichtung experimentelle Medizin der Charité, Campus Virchow Klinikum, wurden die Tiere zunächst für mindestens sieben Tage in Gruppen von fünf Ratten pro Makrolonkäfig (Typ IV) mit erhöhtem Deckel und einer Bodenfläche von 1800 cm² sowie einer Höhe von 19 cm gehalten. Dieser Zeitraum diente den Tieren zur Akklimatisierung. Zur Förderung des Wohlbefindens erhielten die Tiere Enrichment in Form einer Plastikhöhle, ungebleichter Zellstoff als Nestmaterial und Nagehölzer für Labortiere aus Espenholz (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Das Raumklima im Versuchstierstall wurde durch eine Klima- und Belüftungsanlage reguliert, so dass eine konstante Temperatur von 20 -22 ° C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 60 -70% vorherrschten. Zusätzlich waren die Tiere einem künstlichen Tag/Nacht Rhythmus von jeweils 12 Stunden unterworfen. Als Nahrung erhielten sie Alleinfuttermittel für Mäuse und Ratten (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) *ad libitum*. Trinkwasser stand den Ratten in Form einer Wasserflasche ebenfalls jederzeit zur Verfügung. Nach dem operativen Eingriff wurden die Tiere zunächst für 24 Stunden einzeln in einem 18 cm hohen Makrolonkäfig (Typ III) mit erhöhtem Deckel und einer Bodenfläche von 810 cm² untergebracht, um ein gegenseitiges Belegen der frischen Operationswunde zu vermeiden und somit das Risiko einer Wundinfektion zu verringern. Am Folgetag wurden jeweils zwei Tiere in einem Typ III Makrolonkäfig mit erhöhtem Deckel vergesellschaftet und bis zum Versuchsende in

Paarhaltung und Sichtkontakt zu den benachbarten Käfigen gehalten. Als Enrichment erhielten sie Nestmaterial und Nagehölzer. In den Käfigen diente Lignocel® Hygienic Animal Bedding (J.Rettenmaier & Söhne GmbH & Co. KG, Rosenberg, Deutschland) als Einstreu. Die Käfige wurden täglich durch die Tierpfleger auf grobe Verschmutzungen kontrolliert und wöchentlich gewechselt.

3.1.2 Einteilung der Versuchsgruppen

Die 32 Versuchstiere wurden randomisiert in vier Gruppen eingeteilt, welche sich hinsichtlich der Steifigkeit des Fixateurs (mechanische Stimulation), dem Einsatz von rhBMP-2 (biologische Stimulation) und der Größe des Osteotomiespalts unterschieden (Tab.1). Die Tieranzahl pro Gruppe betrug acht Ratten. Drei Versuchsgruppen wurde ein 5mm kritischer Defekt gesetzt und intraoperativ ein Kollagenvlies (Lyostypt®, B. Braun, Melsungen, Deutschland) mit einer definierten Menge (5µg) an rhBMP-2 appliziert. Der 5mm breite Defektspace repräsentiert in diesem Versuch ein reproduzierbares atrophes non-union-Modell (Metha et al., 2011). Die Fixierung des 5mm Knochendefekts erfolgte mittels RatExFix™ (RISystem, Davos, Schweiz), wobei verschieden steife Fixateurbalken verwendet wurden. Die Tiere der ersten Gruppe erhielten einen rigiden Fixateurbalken, definiert als 100% Steifigkeit. Die semi-rigide Gruppe wurde mit einem Balken des Fixateurs versorgt, der 40% der rigiden Steifigkeit entsprach. Entsprechend wurde die dritte Gruppe mit der flexiblen Variante von 10% Steifigkeit behandelt. Der vierten Gruppe wurde dagegen eine 1mm Osteotomie zur Stimulation der unkritischen, normalen Heilung gesetzt und mit einem rigiden Fixateurbalken stabilisiert (Kontrollgruppe). Bei alle vier Gruppen wurde an Tag 10, 21 und 42 postoperativ ein *in vivo*-Mikrocomputertomographie-Scan durchgeführt. Nach 42-tägiger Standzeit wurden alle Tiere euthanasiert und der linke, osteotomierte Femur, inklusive des angebrachten Fixateurs externe, entnommen. Zusätzlich wurden randomisiert acht Tieren das rechte, intakte *Os femoris* entnommen, welche die Kontralaterale-Gruppe bildeten. Diese Gruppe bildete die Stabilität eines intakten Knochens ab. Anschließend durchliefen sämtliche Proben eine biomechanische *in vitro* Testung.

Tab.1: Übersicht zur Gruppeneinteilung.

Gruppe	Osteotomie-spalt	Fixateur-steifigkeit	rhBMP-2	Anzahl der Tiere	Methode	Zeitpunkte
Flexibel	5 mm	10%	5µg	8	Mikro-CT	10, 21, 42d
					BMT	42d
Semi-rigide	5mm	40%	5µg	8	Mikro-CT	10, 21, 42d
					BMT	42d
Rigide	5mm	100%	5µg	8	Mikro-CT	10, 21, 42d
					BMT	42d
Kontrolle	1mm	100%	-	8	Mikro-CT	10, 21, 42d
					BMT	42d
Kontralateral	-	-	-	(8)	BMT	42d

3.2 Operation

3.2.1 Fixateur externe

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Fixateursystem RatExFix™ der Firma RISystems (Davos, Schweiz) verwendet (Abb.1).

Das System besteht aus einem Polyetheretherketon (PEEK) Verbindungselement (Balken) und vier Pins mit einer Titaniumlegierung. Der Kunststoffbalken des Fixateurs externe ist 16,5 mm lang, 5,1 mm breit und besitzt eine Höhe von 2,5 mm. Zwischen den inneren Pins variiert die Dicke des Balkens, aufgrund der unterschiedlichen Steifigkeit, die das Material besitzen soll (Abb. 2). Der als rigide (100% Steifigkeit) definierte Balken besitzt eine durchgehende Höhe von 2,5 mm. Die semi-rigide Kunststoffvariante, die 40% der Steifigkeit des rigiden Verbindungselements darstellt, hat eine Höhe von 1,7 mm. Der flexible Balken entspricht mittig einer Höhe von 0,75 mm. Die mittige Aussparung des Fixateurbalkens besitzt eine Länge von 8,1 mm und eine Breite von 1,5 mm. Jedes Verbindungselement besitzt vier runde Aussparungen, in denen die Pins verankert werden. Die Pins haben eine Länge von 12,8 mm

und einen Durchmesser von 1 mm. Der Abstand zwischen den äußeren Pins beträgt 15 mm und zwischen den beiden inneren Pins 10 mm.

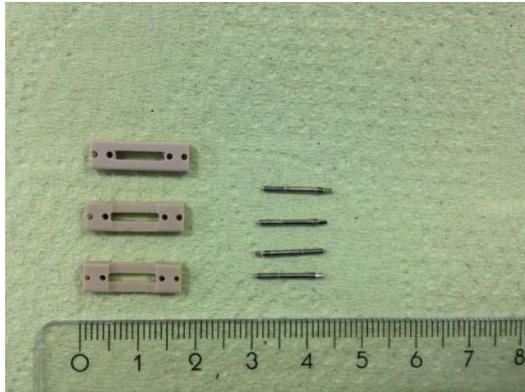


Abb. 1: Fixateursystem (Aufsicht) - Verbindungselement von oben nach unten 100%, 40% und 10% Steifigkeit sowie vier Pins mit Titaniumlegierung.



Abb. 2: Kunststoff – Verbindungselemente (Seitenansicht), von links nach rechts 10%, 40% und 100% Steifigkeit.

3.2.2 Osteotomie

Zur Gewichtserfassung wurden die Tiere zunächst in einer Plastikschüssel auf einer Feinwaage (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland) gewogen. Zu leichte oder zu schwere Tiere, die das Zielgewicht von 240-320 g nicht erreicht oder überschritten hatten, wurden von der Operation ausgeschlossen. Anschließend wurden die Ratten in einen Beutel, welcher aus einem gefalteten Stofflaken bestand, gesetzt. Darin erhielten sie 0,4 ml einer intraperitonealen Injektionsnarkose, welche aus 60 mg/kg KGW Ketaminhydrochlorid (Ketamin®, Actavis Deutschland GmbH & Co. KG, München, Deutschland) und 0,3 mg/kg KGW Medetomidin (Dormitor®, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) bestand. Nach Eintritt der Narkose wurden die Tiere auf einen fahrbaren OP-Beitisch gelegt. Als Schutz der Kornea vor Austrocknung wurde ihnen prophylaktisch Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) auf beide Hornhäute aufgetragen. Anschließend wurden die Tiere am Schwanz mittels eines wasserfesten Stiftes durch Anbringen von Ringen in unterschiedlichen Farben fortlaufend nummeriert. Die Ratten erhielten außerdem ein Antibiotikum zur Infektionsprophylaxe. 60 mg/kg KGW Clindamycin® (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) wurden den Versuchstieren subkutan in den Nacken appliziert. Für eine intra- und postoperative Analgesie erhielten sie, wenige Minuten vor dem Hautschnitt, 20 mg/kg KGW Tramal® (Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) ebenfalls subkutan in den Nackenbereich.

Sämtliche Applikationen und das Gewicht der Tiere wurden mit Angabe der Uhrzeit im OP-Protokoll festgehalten. Zur weiteren präoperativen Versorgung wurden die Ratten auf die rechte Körperseite gelagert und einer großflächigen Rasur mittels einer Schermaschine (Aesculap® Favorita II GT 104, Aesculap Suhl GmbH, Suhl, Deutschland) im Bereich des linken Ober- und Unterschenkels, sowie des Bauches und Rückens bis zum Rippenbogen unterzogen. Der Zwischenzehenreflex zur Feststellung einer vollständigen Analgesie wurde getestet. War dieser nicht mehr vorhanden, wurde das freigeschorene Operationsfeld großflächig mit Braunoderm® (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert und die Tiere in rechter Brust-Seitenlage auf eine Wärmeplatte (37°C) des steril vorbereiteten Operationstischs gelegt. Die Gel-Wärmeplatte (Extraanfertigung der Charité), welche die Tiere vor Unterkühlung während der Operation bewahren sollte, befand sich unter einem sterilen Instrumententischbezug (Shanghai International Trading Corp. GmbH, Hamburg, Deutschland). Anschließend wurden die Ratten mit einem sterilen, selbstklebenden Abdecktuch (Foliodrape®, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland) abgedeckt, sodass sich nur noch die linke Hintergliedmaße im Operationsfeld befand. Mit einem Skalpell (Klinge Nr. 21, Feather Safety Razor Co., LTD., Osaka, Japan) wurde ein lateraler Hautschnitt über die gesamte Länge des Femurs durchgeführt und die subkutane Hautfaszie vorsichtig durchtrennt. Zwischen dem *Musculus gluteus superficialis* und dem *Musculus biceps femoris* wurde mit einer Schere stumpf bis zur Freilegung des Femurs präpariert. Nachfolgend wurde das Weichteilgewebe mit zwei stumpfen Wundhaken zurückgehalten, um Verletzungen der Strukturen während des Bohrens zu verhindern. Mit einem Handbohrer (Ø 0,79 mm, RISystem, Davos, Schweiz) wurde zunächst, im Bereich der Metaphyse das distale (äußere) Bohrloch unikortikal, senkrecht zur Knochenachse gesetzt. Das dabei entstandene Knochenmehl wurde, wie auch bei den folgenden Bohrlöchern, durch einen sterilen, mit isotonischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) benetzten Präpariertupfer (6x6cm, Fuhrmann GmbH, Bövingen, Deutschland) aus dem Operationsfeld entfernt. Es folgte die bikortikale Einbringung des distalen Pins (P1) mittels Handbohrfutters (Abb. 3). Der Fixateurbalken wurde zuvor am Pin befestigt und diente im Folgenden als Bohrführhilfe für die weiteren drei Bohrlöcher. Die Bohrung für P4, dem proximalen (äußeren) Pin wurde unter adspektorischer Kontrolle, parallel zum distalen Pin (P1), sowie senkrecht zur Knochenachse des *Os femoris* vorgenommen und anschließend bikortikal verankert. Die beiden inneren Pins (P2 und P3) wurden ebenfalls parallel und bikortikal versenkt (Abb. 4). Zur Vorbereitung der Osteotomie wurde die Muskulatur im Osteotomiebereich, zwischen P2 und P3, vorsichtig vom *Os femoris* abpräpariert. Im Anschluss wurde eine Sägeschablone (RISystem, Davos, Schweiz) auf dem

Fixateurbalken angebracht, die einen standardisierten, mittigen 5mm Spalt gewährleisten sollte. Die doppelte Durchtrennung der Diaphyse erfolgte unter Verwendung einer oszillierenden Säge (Implantmed SI – 923 Dentalchirurgiegerät mit Sägehandstück S-8 R und Sägeblatt R-20 reziprok, W&H Deutschland GmbH, Laufen, Deutschland) und ständiger Kühlung durch sterile, isotonische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) (Abb. 5). Der entstandene Knochenzylinder (Abb. 6) wurde unter Zuhilfenahme einer sterilen Pinzette geborgen. Knochen- und Gewebedetritus wurde durch erneutes Spülen mit steriler, isotonischer Kochsalzlösung entfernt. Anschließend wurde der 5mm breite Osteotomiespalt (Abb. 7) mit einem resorbierbaren Kollagenvlies (Lyostipt®, B.Braun Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) gefüllt (Abb. 8). Dieses Kollagenvlies diente als Trägermaterial für 5 µg rhBMP-2 (Prof. Walter Sebald, Universität Würzburg, Deutschland gelöst in 4mM HCL), welches mittels einer manuellen Pipette (Eppendorf Research® plus, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling, Deutschland), unmittelbar vor der Implantation auf das Vlies pipettiert wurde. Als Kontrollgruppe, die eine ungestörte, normale Heilung repräsentierte, wurde mithilfe der Sägeschablone ein 1mm Osteotomiespalt gesetzt. Nachdem eventuelle Blutungen gestillt wurden, wurde die Faszie durch eine fortlaufende Naht mit einem resorbierbaren Faden (3-0 Vicryl®, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Für die Einzelknopfhefte des Hautverschlusses wurde ein nicht resorbierbares Nahtmaterial (3-0 Prolene®, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verwendet. Des Weiteren wurde für den Schutz der Operationswunde ein transparenter Sprühverband (OPSITE® Spray, Smith & Nephew Medical Limited, London, England) aufgetragen. Die Dauer des operativen Eingriffs betrug etwa 60 Minuten. Nach dem Wundschluss erfolgte die Anfertigung von Röntgenaufnahmen des osteotomierten *Os femoris* bei einer Strahlendosis von 30 kV und einer Belichtungszeit von 10 s, auf der der korrekte Sitz des Fixateurs externer begutachtet wurde (Abb. 9). Zur Beendigung der Narkose erhielten die operierten Tiere intramuskulär die fünffache Menge der Medetomidin-Dosis Atipamezol (Antisedan®, Orion Corporation, Espoo, Finnland). Anschließend wurden die Tiere in Brust- Bauchlage auf eine Zellstoffunterlage, die dem Aspirationsschutz vor der Einstreu diente, in ihren Käfig gelegt und während der Aufwachphase unter wärmender Infrarotlichtbestrahlung (150 W, 230V, Koninklijke Philips N. V., Amsterdam, Niederlande) gehalten. Nach etwa zwei Stunden postoperativer Überwachung waren die Tiere wach und belasteten das operierte Bein vorsichtig. Zu diesem Zeitpunkt wurden sie zurück in den Versuchstierstall gebracht. Für eine weiterführende Analgesie erhielten die Ratten in den ersten fünf postoperativen Tagen 25mg/l Tramal® Tropfen (Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) über das Trinkwasser.

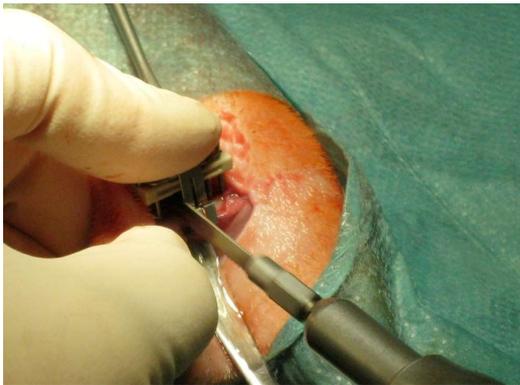


Abb. 3: Bikortikale Einbringung des distalen Pins (P1), mit aufgesetztem Fixateurbalken als Bohrführhilfe für die weiteren Pins.



Abb. 4: Einbringen von P2 mit Handbohrfutter.

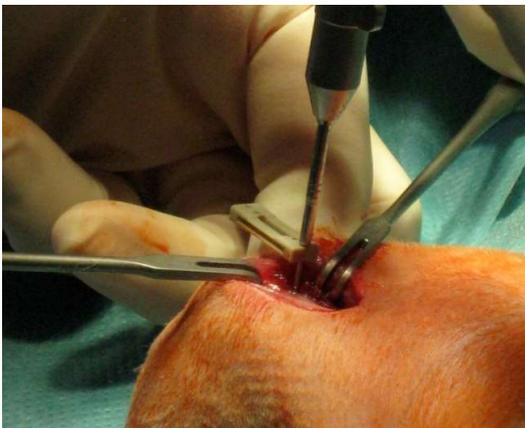


Abb. 5: Setzen der 5 mm Osteotomie mithilfe der Sägeschablone.

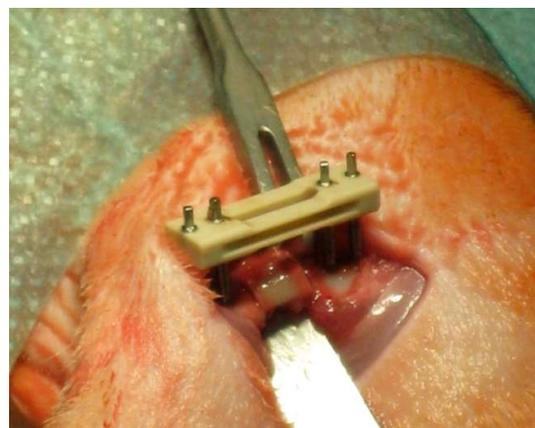


Abb. 6: Entnahme des Knochenzylinders.



Abb. 7: Darstellung des 5mm Osteotomiespaltes.

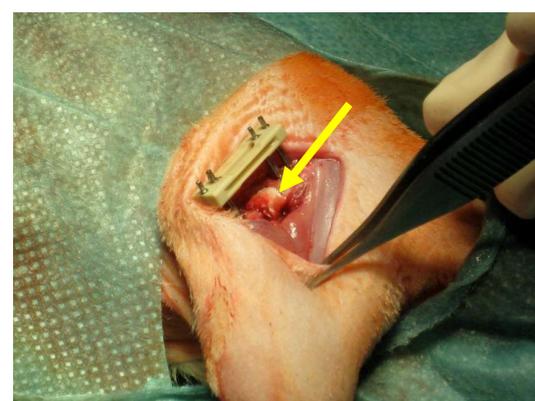


Abb. 8: Eingebrahtes Kollagenvlies im Osteotomiespalt.

3.2.3 Nachsorge

In den ersten beiden Tagen nach der Osteotomie wurden die Tiere zweimal täglich streng nach einem Untersuchungsprotokoll begutachtet. Es wurde speziell auf veränderte Körperhaltung, Augentränen, Isolation, reduziertem Bewegungsdrang, Piloerektion und der Trinkmenge der Ratten geachtet und dokumentiert. Die Beurteilung erfolgte nach einem festgelegten Punktesystem. War keine Veränderung präsent, wurden null Punkte vergeben. War eine moderate Schmerzreaktion beobachtbar, wurde dies mit einem Punkt bewertet. Bei ausgeprägten Symptomen erfolgte eine Vergabe von zwei Punkten. Anschließend wurde ein Gesamtscore ermittelt. War eine Ratte auffällig, erhielt sie intramuskulär zusätzlich 7mg/kg KGW Tramal® (Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland). Die Beurteilung der Wund- und Pinverhältnisse erfolgte täglich. Eventuell vorhandene Verkrustungen wurden mit einer sterilen Pinzette entfernt und die Wunde mit Braunoderm® (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Auf Anzeichen einer lokalen Infektion, vor allem im Bereich der Pins, sowie umgebene Gewebeschwellungen, wurde besonders geachtet. Die Gewichtserfassung erfolgte wöchentlich, wie unter 3.2.2 beschrieben. Alle erhobenen Befunde und Messwerte wurden in einem Projektbuch, sowie einer elektronischen Datenbank erfasst.

3.3 Radiologische Untersuchungen

3.3.1 Konventionelles Röntgen

Die Tiere wurden, wie beschrieben, unmittelbar nach der Osteotomie, sowie 10, 21 und 42 Tage postoperativ zeitgleich im Rahmen der *in vivo*-Mikro-CT Untersuchung geröntgt. Das Röntgen erfolgte am narkotisierten Tier, wie unter 3.2.2 beschrieben, und diente einerseits der Kontrolle des Heilungsverlaufs sowie andererseits der Feststellung eines Ausbrechens der Pins oder starke osteolytische Veränderungen der Knochensubstanz, was zum sofortigen Ausschluss der Tiere aus dem Versuch geführt hätte, um ein unnötiges Leiden zu verhindern. Je Versuchstier entstand eine laterale Aufnahme, wobei die Ratte in Bauchlage positioniert, und das linke, osteotomierte Hinterbein abduziert wurde. Die Aufnahmen entstanden mit Hilfe des

Röntgenapparates (Faxitron®, Faxitron x-Ray Corporation, Illinois, USA) in der Forschungseinrichtung experimentelle Medizin der Charité (Campus Virchow Klinikum, Berlin, Deutschland). Die Röntgenfilme (Kodak Direct View CR Cassette, Carestream Health Inc., New York, USA) wurden bei 30 kV und 10 s belichtet. Zwischen der Strahlungsquelle und der Röntgenplatte bestand ein Abstand von 33 cm.

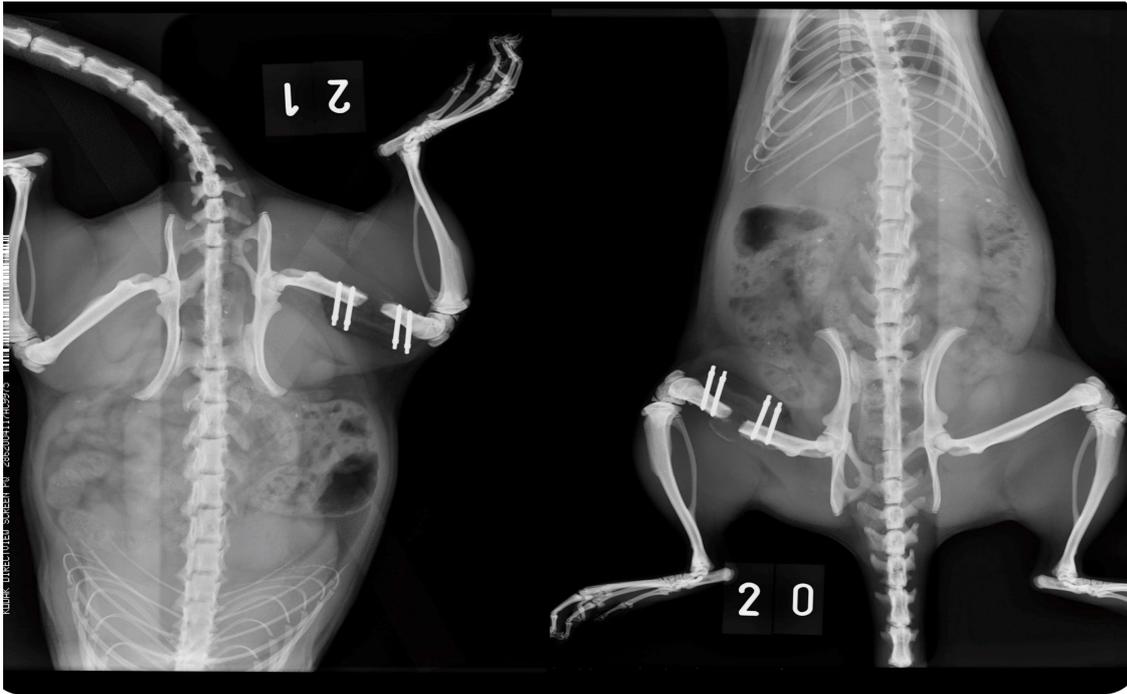


Abb. 9: Postoperative Röntgenaufnahme zur Begutachtung der Osteosynthese (Fixateur externe). Die vier Pins sind bikortikal, parallel zueinander und senkrecht zur Knochenachse des *Os femoris* verankert. Der Leerraum des Defekts (5mm) wird durch glatte Kortikalisenden begrenzt.

3.3.2 Mikrocomputertomographie (Mikro-CT)

Am 10., 21. und 42. Tag postoperativ durchliefen die Versuchstiere eine *in vivo*-Mikro-CT Scan. Dazu wurde der Mikrocomputertomograph viva CT 40 (Scanco Medical AG, Brüttisellen, Schweiz) der FEM der Charité, Campus Virchow Klinikum verwendet, und diente der detaillierten, dreidimensionalen Darstellung der Kallusentwicklung, sowie des Grades der Osteotomiespaltüberbrückung im zeitlichen Verlauf. Als ein invasives, nicht destruktives Verfahren stellt die *in vivo*-Mikro-CT Analyse eine exzellente Untersuchungsmethode dar, welche die Proben für weiterführende Untersuchungen, in diesem Fall die biomechanische Testung, erhält (Bouxsein et al., 2010). Die Scans wurden mit einer Schichtdicke von 35 μm , einer Spannung von 55 kV und einer Stromstärke von 145 μA durchgeführt. Im Rahmen der

Untersuchung wurden die Tiere mittels Injektionsnarkose, bestehend aus 0,3 mg/kg KGW Medetomidin (Dormitor®, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) und 60 mg/kg KGW Ketaminhydrochlorid (Ketamin®, Actavis Deutschland GmbH & Co. KG, München, Deutschland) intraperitoneal narkotisiert (Vorgehen wie in 3.2.2 beschrieben). Als Prophylaxe der Kornea vor Austrocknung, erfolgte die Versorgung beider Hornhäute mit Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland). Anschließend wurde zur aktuellen Befundung der Fixateuranlage ein Röntgenbild, wie in 3.3.1 beschrieben, angefertigt. In schräger Seitenlage wurden die Ratten in ein Probenbett des Mikrocomputertomographen positioniert (Abb. 10). Zum Schutz des Gerätes vor Urinausscheidung der narkotisierten Ratten erfolgte die Bettung der Tiere auf einer Papierunterlage. Anschließend wurde in den Spalt des Fixateurbalkens ein speziell angefertigter Abstandshalter (Abb. 11) eingeführt, dessen anderes Endstück mit dem Probenbett verbunden wurde (Abb. 12). Der Abstand zwischen dem Probenbett und dem Fixateur externe betrug somit standardisiert 1,5 cm. Um die Tiere vor eventuellen Verletzungen während der Untersuchung zu bewahren, wurden der Kopf, Thorax, die Hintergliedmaßen sowie der Schwanz mittels Leukoplast® (BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland) fixiert. Im Anschluss wurden die Ratten, inklusive Probenbett, mit dem Schwanz voran in den Mikrocomputertomographen geschoben und die Ladeluke des Geräts verschlossen. Während der Untersuchung konnten die Tiere durch ein Sichtfenster beobachtet werden, wodurch die Möglichkeit eines Abbruchs des Scanvorgangs, bei einem eventuellen Erwachen oder einer anderen Notfallsituation, jederzeit möglich gewesen wäre. Am Computer wurde zunächst ein Scout-View angefertigt. Dies ist ein Röntgenübersichtsbild, welches zur Bestimmung der Scanregion (VOI, Volume of Interest) dient. Anschließend wurden die Referenzlinien positioniert, sodass sich der gesamte Osteotomiespalt, sowie beide Osteotomieenden des *Os femoris* im Scanbereich befanden. Die VOI umfasste dabei standardisiert 212 Slices (7400 µm). Nach einem Kontrollblick auf die narkotisierten Tiere wurde die Messung gestartet. Die Scannummern der Messungen wurde im Laborbuch, sowie in einer elektronischen Datenbank festgehalten. Nach etwa 15 Minuten war der Scan beendet und die Tiere wurden, mitsamt des Probenbetts, aus dem Mikrocomputertomographen entnommen. Anschließend erfolgte die Bettung der Ratten auf Zellstoff im Käfig. Zur Vermeidung einer Hypothermie erhielten sie bis zum Ende der Aufwachphase eine Infrarotlichtbestrahlung (150 W, 230V, Koninklijke Philips N. V., Amsterdam, Niederlande). Mindestens 45 Minuten nach der Narkoseeinleitung erhielten die Tiere intramuskulär die fünffache Menge der Medetomidin-Dosis Atipamezol (Antisedan®, Orion Corporation, Espoo,

Finnland) als Antidot. Nach einer einstündigen Beobachtungsphase konnten die Tiere aktiv und wach in die Tierhaltung gebracht werden.

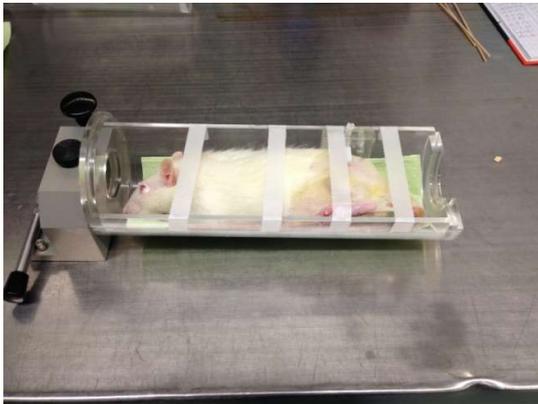


Abb. 10: Mikro-CT-Probenbett mit fixierter Ratte.



Abb. 11: Abstandshalter

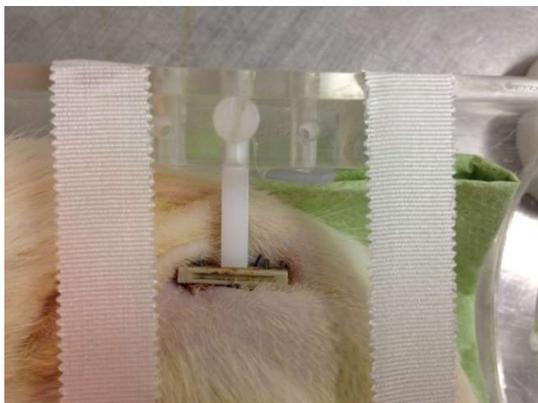


Abb. 12: Standardisierte Positionierung von Fixateurbalken zum Probenbett über einen Abstandshalter.

3.4 Euthanasie und Probenentnahme

3.4.1 Euthanasie

Nach einer 42-tägigen Standzeit erfolgte die Euthanasie der Versuchstiere. Im Anschluss an die planmäßige *in vivo*-Mikro-CT Kontrolle am 42. postoperativen Tag wurden die Ratten in tiefer Narkose durch eine intrakardiale Injektion von 10 ml 7,45% igem Kaliumchlorid (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) euthanasiert. Die Lokalisation des Herzens wurde mittels Daumens und Zeigefingers palpirt und zur Sicherung der kardialen Positionierung der sterilen Einmalkanüle (Sterican® Standardkanüle Nr. 1, Ø 0,90 x 40 mm, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) erfolgte zunächst die Aspiration von Blut und anschließend die vollständige Injektion von Kaliumchlorid. Innerhalb weniger Sekunden *post injectionem* trat der Tod ein. Durch Sichtkontrolle der Atmung, optische Inspektion der Retinadurchblutung und palpatorische Überprüfung des Herzstillstandes wurde die Diagnose gesichert.

3.4.2 Probenentnahme und Aufbereitung

Unmittelbar nach Feststellung des Todes erfolgte die Entnahme der osteotomierten *Ossa femora* der hinteren, linken Gliedmaßen, inklusive der externen Fixateure und des umgebenen Weichteilgewebes (acht Tieren wurden zusätzlich das rechte, intakte *Os femoris* entnommen). Um Beschädigungen des Kallusgewebes vorzubeugen, wurde darauf geachtet, dass nur minimale Zug-, Druck- oder Scherkräfte auf den Femur wirken konnten. Nach Enthäutung der linken Hintergliedmaße erfolgte die Exartikulation des Kniegelenks. Hierzu wurde zunächst das *Ligamentum patellae* und anschließend der intra- und subartikuläre Sehnen- und Bandapparat des Kniegelenks (*Art. genus*) durchtrennt. Es folgte die Präparation Richtung Hüftgelenk (*Art. coxae*), wobei die oberflächliche und tiefe Muskulatur der Beckengliedmaße durchtrennt und anschließend der Femurkopf aus der Beckenpfanne exartikuliert wurde. Im Anschluss wurde, unter Schonung der Kallusregion, das am Femur verbliebene Muskelpaket vorsichtig abpräpariert. Die isolierten Knochen wurden unverzüglich in ein verschlossenes Schraubglas mit Fixierlösung überführt und mit der entsprechenden Tiernummer versehen. Bei der Fixierlösung handelte es sich um 4% ige gepufferte Formaldehyd – Lösung für Laborzwecke (Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland). Sie diente dazu den postmortalen Zerfall zu verlangsamen und die Probe für die späteren Untersuchungen zu erhalten. Um eine

optimale Durchtränkung der Proben mit der Fixierlösung zu gewährleisten, wurden die Schraubgläser (inklusive der darin enthaltenen Knochenpräparate) auf einen Großschüttler (Laboshake®, Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Deutschland) im histologischen Kunststofflabor des Julius Wolff Instituts gestellt. Nach 48 Stunden Fixierzeit wurden die Knochen in ein leeres Glasgefäß überführt und anschließend für 30 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert um die Fixierlösung zu entfernen. Danach wurden die Präparate für weitere 24 Stunden in einem mit PBS (Phosphatpufferlösung pH 7,2, Waldeck GmbH & Co. KG, Division Chroma, Münster, Deutschland und Aqua dest. Im Verhältnis 1:10) gefüllten, verschlossenen Schraubglas zurück auf den Schüttler gestellt. Am Folgetag wurde der Fixateur externe mittels eines Handbohrfutters entfernt. Anschließend wurden die Knochenpräparate einzeln, in einem mit der jeweiligen Tiernummer versehenen, sterilen 15 ml Falcon™ – Tube (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA) bei – 80° C eingelagert.

3.5 Biomechanische *in vitro* Testung

Für die biomechanische Testung wurden die Knochen zunächst aufgetaut. Dafür wurden die Proben für etwa 20 Minuten in einem Falcon™ - Tube in ein Glasgefäß mit warmem Leitungswasser gestellt. Danach erfolgte die Einbettung der aufgetauten Präparate unter dem Laborabzug. Zu Beginn wurden die Knochen am Femurkopf mithilfe von einer Klemme der speziellen Haltekonstruktion (Spezialherstellung der Charité) fixiert (Abb. 13). Drei rotierbare Gelenke der Konstruktion ermöglichten es, die distale Epiphyse lotrecht und zentriert in einem Metalltöpfchen auszurichten. Anschließend wurde die Einbetttiefe justiert. Nachfolgend wurde der Kunststoff angerührt. Hierbei wurde ein Zwei – Komponenten – System verwendet. Nach dem Vorlegen von 1,5 ml der flüssigen Phase (Technovit® Universal Liquid, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) in einen Plastikbehälter wurde die pulverige Komponente (Technovit® 3040, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) mit einem Metallstab eingerührt, bis das Gemisch fadenartig vom Rührstab tropfte. Um ein Aufquellen während der Polymerisation zu vermeiden, musste die Masse möglichst fest und ohne Luftpneinschlüsse sein. Mittels einer 10 ml Spritze (Injekt® solo, B.Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurde anschließend der Kunststoff in das zuvor eingefettete Metalltöpfchen überführt. Das Einfetten der Töpfchen mit PTFE – Paste (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) ermöglichte das spätere Entfernen des ausgehärteten Polymethylacrylats aus dem

Metallgefäß. Während der Aushärtung wurde der Knochen zum Schutz vor Austrocknung mit einer PBS befeuchteten Mullkompressen (Gazin® Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied, Deutschland) umwickelt. Nach etwa 15 Minuten war die Aushärtung des Kunststoffes abgeschlossen (Abb. 14). Im Anschluss wurde die Klemme der Haltekonstruktion gelöst und das Töpfchen für die proximale Epiphyse mittels eines Stegs (Spezialanfertigung der Charité) befestigt. Der Steg wurde hierfür in die dafür vorgesehene Aussparung der Töpfchen eingelassen und mit zwei kleinen Gewindeschrauben an den Metalltöpfchen angebracht (Abb. 15). Die Länge des Stegs betrug 5,2 cm und sicherte einen standardisierten Abstand der beiden Töpfe zueinander von 1,8 cm. Anschließend wurde die Konstruktion in einen Metallschraubstock (Spezialanfertigung der Charité) eingesetzt (Abb. 16). Erneut wurde ein Technovit® - Gemisch, wie vorhergehend beschrieben, angerührt und mittels einer 10 ml Spritze in das zweite, zuvor mit PTFE – Paste eingefettete Töpfchen gegeben. Nach weiteren 15 Minuten wurde der eingebettete Knochen, inklusive Töpfchen – Steg – Konstruktion, aus dem Metallschraubstock entfernt. Die folgende Torsionstestung wurde am ElectroForce® TestBench System (BOSE GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland) des Biomechaniklabors im Julius Wolff Institut (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Nachdem alle Kräfte, die auf die Probe wirken können, manuell am zur Torsionsmaschine dazugehörigen Computer, auf null tariert wurden, erfolgte das Einsetzen der Knochenprobe parallel zur Rotationsachse in die Maschine (Abb. 17) und eine erneute manuelle Entlastung. Die Vorkraft, das Drehmoment und der Winkel wurden im Messprotokoll dokumentiert. Im Anschluss wurde der Steg entfernt und die Messung gestartet. Die Knochenprobe wurde kontinuierlich mit einer axialen Vorlast von 0,3 Newton belastet, um die bei der Torsionstestung auftretenden Zugbelastungen, welche aus der Verkürzung der Probe resultieren, zu minimieren. Nach Erreichen der notwendigen Vorlast startete die eigentliche Messung. Im Verlauf wurde das untere Töpfchen, folglich der untere, distale Bereich des Knochens, kontinuierlich mit 0,54 °/s verdreht. Jede Sekunde erfolgte die Erfassung des Torsionsmoments und des Winkels, welche in einem Diagramm in Relation zur Zeitachse, am Computer graphisch dargestellt wurden. Die Beendigung der Messung erfolgte manuell, wenn anhand eines deutlichen Abfalls des Torsionsmoments und eines akustischen Knacklauts von einer Fraktur des Femurs ausgegangen wurde. Anschließend wurde die getestete Probe aus der Maschine entfernt (Abb. 18). Die gewonnenen Rohdaten wurden zur weiteren Aufbereitung in eine Excel -Tabelle importiert und in einer elektronischen Datenbank gespeichert.



Abb. 13: Haltekonstruktion zur lotrechten und zentrierten Ausrichtung der Probe im Metalltöpfchen.



Abb. 14: Einbettung der distalen Epiphyse im ausgehärteten Kunststoff.

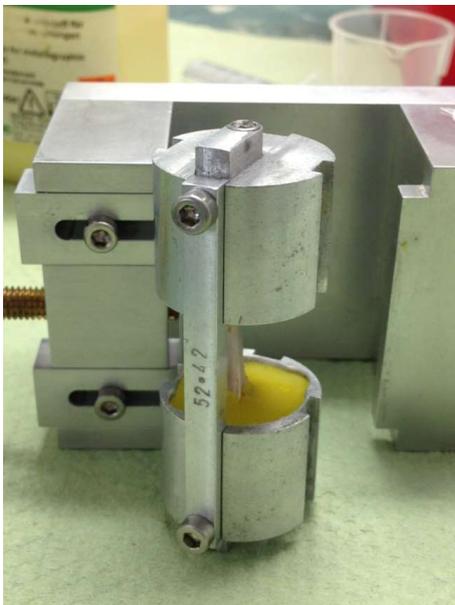


Abb. 15: Anbringen des Stegs zur Sicherung eines standardisierten Abstands (1,8 cm) der Metalltöpfchen zueinander.



Abb. 16: Metallschraubstock zur Fixierung der Position während der Einbettung der proximalen Epiphyse.



Abb. 17: Positionierung der Knochenprobe parallel zur Rotationsachse der Testmaschine.



Abb. 18: Frakturierte Probe (Kontralaterale) nach Beendigung der Torsionstestung.

3.6 Auswertung der Rohdaten

3.6.1 Deskriptive röntgenologische Auswertung

Die Röntgenbilder der Zeitpunkte Osteotomie, sowie nach 10, 21 und 42 postoperativen Tagen wurden zur Auswertung herangezogen. Spezielle Beachtung fanden die Osteotomieenden hinsichtlich einer eventuellen Dislokation der Kortizes, die Entwicklung von endostalem und periostalem Kallus und die Breite des Osteotomiespaltes.

3.6.2 Mikrocomputertomographische Auswertung

Die Auswertung der *in vivo*-Mikro-CT Bilder erfolgte anhand des Evaluierungsprogramms der viva CT 40 Software. Zunächst wurde der gesamte Scan begutachtet, um ihn auf eventuelle Artefakte zu überprüfen. Danach wurde eine standardisierte Volume of Interest (VOI) definiert, in der nachfolgend stets die gleiche Anzahl an Slices ausgewertet werden konnte. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde eine VOI von 212 Slices mit je 35 µm Schichtdicke definiert. Hieraus ergab sich eine VOI von ~ 7400 µm. Die Position der VOI wurde über den Mittelpunkt der Osteotomie berechnet. Zunächst erfolgte die manuelle Bestimmung eines Startpunktes. Definitionsgemäß handelte es sich um das erste Schnittbild in dem die Kortikalis eröffnet erschien und somit den Beginn des Defekts markiert (Abb. 19). Anschließend wurde manuell der Endpunkt ausgewählt, an dem sich die Kortikalis erstmalig als intakt darstellte und das Ende des Defekts abbildet (Abb. 20). Die Ermittlung des Mittelpunktes erfolgte rechnerisch, indem der Startpunkt vom Endpunkt subtrahiert wurde und das Ergebnis anschließend durch 2 dividiert wurde. Zur Bestimmung des absoluten Mittelpunktes wurde der Mittelpunkt zum Startpunkt addiert. Vom absoluten Mittelpunkt ausgehend, wurden standardisiert 106 Schnittbilder in Richtung Scananfang und 105 Slices in Richtung Scanende als VOI deklariert. Die Berechnung der VOI erfolgte mit Microsoft Excel. Im Anschluss wurde das Global Object konturiert. Dabei handelt es sich um die Region der 212 Schnittebenen, die in die Berechnung eingingen. Mittels Freihandbearbeitung wurde zunächst, entgegen des Uhrzeigersinns, die Konturen des kalzifizierten und mineralisierten Kallus eingezeichnet und als Global Object „Kallus“ gespeichert. Danach erfolgte die Konturierung der Kortikalis im Uhrzeigersinn (Abb. 21), welche ebenfalls gespeichert wurde (Global Object „Kortikalis“). Die Zeichenrichtung spielte dabei eine entscheidende Rolle, da alle im Uhrzeigersinn gezeichneten Konturen als

Leerfläche deklariert wurden und somit nicht in die spätere Berechnung eingingen. Allein die entgegen des Uhrzeigersinns gezeichneten Konturen wurden zur nachfolgenden Berechnung herangezogen, wodurch eine ausschließliche Erfassung des Kallus ermöglicht wurde.

Im weiteren Verlauf wurden die beiden Global Objects fusioniert (Abb. 22) und die Evaluierung bei einem Schwellenwert (Threshold) von $318 \mu\text{HA}/\text{cm}^3$ gestartet.

Bei der 1mm Kontrollgruppe wurde eine VOI von 29 Slices definiert ($\sim 1000 \mu\text{m}$).

Folgende vom Computer erhobene Daten wurden ausgewertet:

Total Volume (TV): Totales Kallusvolumen bzw. Gesamtkallusvolumen der gesamten VOI in $[\text{mm}^3]$, dabei beinhaltet TV sowohl BV, als auch Lakunen und das Knochenmarksgewebe

Bone Volume (BV): Mineralisiertes Knochenvolumen und kalzifizierter Knorpel in $[\text{mm}^3]$

Bone Volume Fraction (BV/TV): Anteil an mineralisiertem Knochen im Gesamtkalluvolumen in $[\text{mm}^3/\text{mm}^3]$

Tissue mineral density of bone (TMD): Dichte des mineralisierten Gewebes inklusive kalzifizierten Knorpels in $[\text{mgHA}/\text{cm}^3]$

Tissue mineral content of bone (TMC): Mineralisierter Inhalt, bezogen auf BV in $[\text{mgHA}]$, dieser Wert wird erhoben durch die Multiplikation von BV und TMD, sowie nachfolgender Division durch 1000

Die Ergebnisse wurden tabellarisch in Microsoft Excel festgehalten und zur weiteren Bearbeitung in einer elektronischen Datenbank gespeichert. Zusätzlich wurden, mittels der Mikro-CT Software, 3D- Bilder des Kallus angefertigt, die eine deskriptive Kallusanalyse ermöglichten.

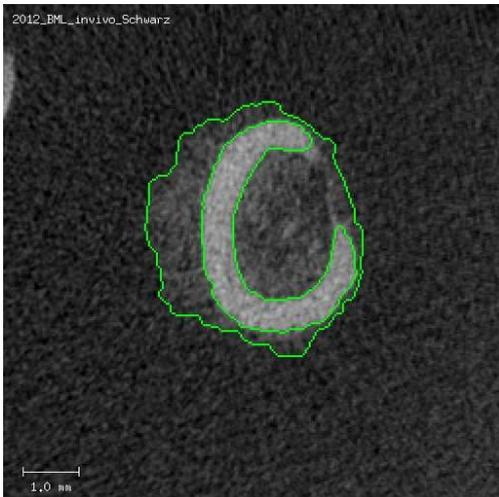


Abb. 19: Dreidimensionale Darstellung im *in vivo*-Mikro-CT (Evaluierungsprogramm), Defektbeginn mit geöffneter Kortikalis (hellgrau).

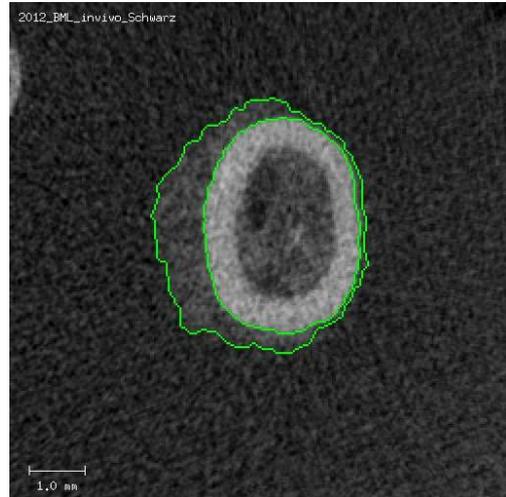


Abb. 20: Dreidimensionale Darstellung im *in vivo*-Mikro-CT (Evaluierungsprogramm), Defektende mit geschlossener Kortikalis (hellgrau).

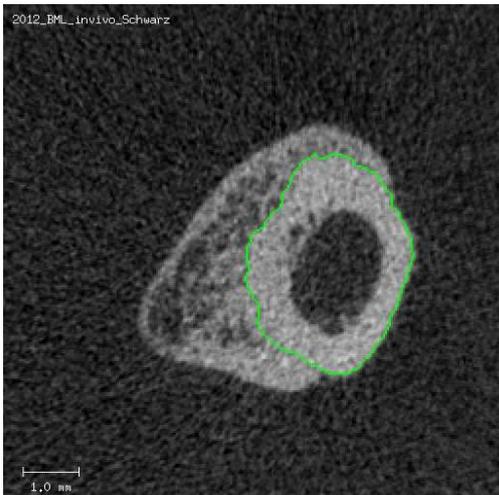


Abb. 21: Dreidimensionale Darstellung im *in vivo*-Mikro-CT (Evaluierungsprogramm), Global Object „Kortikalis“, Konturierung (grün) der Kortikalis im Uhrzeigersinn.

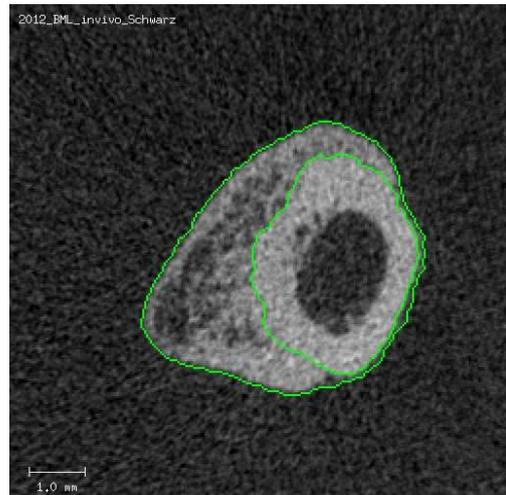


Abb. 22: Dreidimensionale Darstellung im *in vivo*-Mikro-CT (Evaluierungsprogramm), fusioniertes Global Objekt „Kortikalis“ (innere, grüne Konturierung) und „Kallus“ (äußere, grüne Kontur; entgegen des Uhrzeigersinns gezeichnet).

3.6.3 Biomechanische Auswertung

Zu Beginn der biomechanischen Auswertung wurde aus den in Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) tabellarisch dargestellten Rohdaten ein Diagramm erstellt. Erhoben wurde das maximale Drehmoment [Nmm] und die Steifigkeit (Torsionsmoment/Winkeländerung) [Nmm/°]. Auf der Abszisse wurde die Winkeländerung aufgetragen und das Torsionsmoment fand auf der Ordinate Platz. Mit Hilfe einer an den Graphen angelegten Ausgleichsgeraden wurde die Steigung der Kurve bestimmt (Abb. 23). Die Steigung [$m = y_b - y_a / x_b - x_a$] der Kurve gab die Steifigkeit des Knochens an, welche per Definition den Widerstand eines Körpers gegen Verformung durch eine Kraft oder ein Drehmoment darstellt. Das maximale Drehmoment wurde vom höchsten Messwert des Graphen abgeleitet und präsentierte die maximale Kraft, die zum Knochenbruch führte. Die erhobenen Daten wurden in einer elektronischen Datenbank festgehalten.

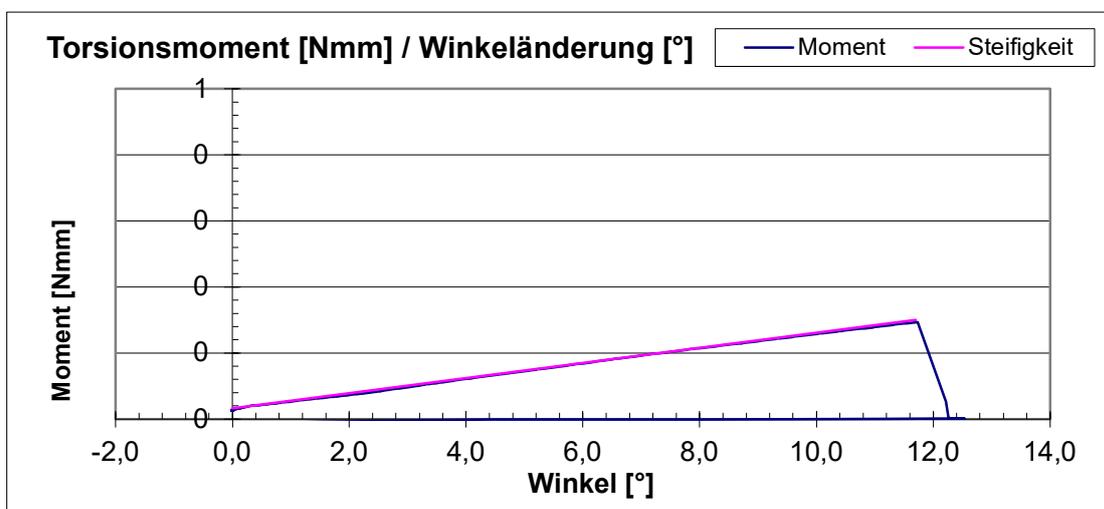


Abb. 23: Biomechanische Auswertung von Steifigkeit (lila) und maximalem Drehmoment (blau) im Diagramm. Anlegen der Ausgleichsgeraden an den Graphen um die Steifigkeit zu ermitteln.

3.6.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Datenverarbeitungsprogrammes SPSS Statistics 22 (IBM Corporation, Armonk, USA). In tabellarischer Form wurden der Median- und der Mittelwert, sowie die Standardabweichung und die Perzentilen als beschreibende Statistik dargestellt und in einer elektronischen Datenbank gesichert. Anschließend wurden die verschiedenen Steifigkeiten des externen Fixateurs (10%, 40%, 100%) an den jeweiligen Zeitpunkten (Tag 10, 21 und 42) für alle zu testenden Parameter mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Zum Vergleich der voneinander unabhängigen Versuchsgruppen hinsichtlich ihrer verschiedenen Parameter wie Steifigkeit des externen Fixateurs, Osteotomiespaltgröße und Einsatzes von rhBMP-2, wurde der Mann-Whitney- U-Test (nichtparametischer Zweistichprobentest) herangezogen, wenn keine Normalverteilung der betrachteten Parameter vorlag. Für die abhängigen Stichproben (Messwerte einer Steifigkeitsgruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten) und fehlender Normalverteilung, wurde der Wilcoxon-Test (nichtparametischer Zweistichprobentest) verwendet. Lag eine Normalverteilung vor wurde der Zweistichproben-t-Test, zum Vergleich der Mittelwerte herangezogen. Bei den unabhängigen Stichproben wurde ein ungepaarter t-Test verwendet, die Auswertung der abhängigen Stichproben erfolgte mittels eines gepaarten t-Tests. Zur Korrektur des Signifikanzniveaus wurde die Benjamini-Hochberg-Prozedur herangezogen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ wurde angenommen, weshalb das Signifikanzniveau bei 5% festgelegt wurde. Die Ergebnisse wurden ebenfalls in Form einer Tabelle festgehalten und in einer elektronischen Datenbank gespeichert. Die graphische Darstellung der biomechanischen Daten erfolgte in Form von Boxplots (Abb. 24), welche als schematische Darstellung einer Häufigkeitsverteilung dienen. Ein Boxplot gibt die Lage und die Verteilung der Werte einer Variablen an. Er besteht aus einer Box und zwei Whiskern, den Strichen außerhalb der Box. Die Box spannt sich von der 25%-Perzentile bis zur 75%-Perzentile auf. Somit stellt die untere Begrenzung der Box das 25% Perzentil dar, die obere Eingrenzung die 75% Perzentile. Innerhalb des durch die Box umgrenzten Bereichs liegen die mittleren 50% der Werte. Der Median kennzeichnet die 50% Perzentile und wird durch eine horizontale, schwarze Linie dargestellt. Die Whisker schließen sich oben und unten an der Box an, bis zum Minimum bzw. Maximum der Datenreihe. Sie umfassen maximal die eineinhalbfache Boxenbreite. Das Ende der Whisker bezeichnet ein kurzer Querstrich, der den kleinsten, respektive den größten Wert repräsentiert, jedoch ohne die Ausreißer und Extremwerte einzuschließen. Ausreißer werden als eine Kreisstruktur dargestellt. Sie kennzeichnen die Werte, die innerhalb einer

Spanne von der eineinhalbfachen bis dreifachen Boxenlänge von der 25% Perzentile bzw. vom 75% Perzentil entfernt liegen. Mehr als die dreifache Boxenlänge oberhalb, respektive unterhalb der Begrenzung der Box entfernte Werte, werden als Extremwerte betitelt, welche in Form eines Sternes dargestellt werden. Die Darstellung der mikrocomputertomographischen Daten erfolgte in Form von Säulendiagrammen inklusive Fehlerbalken. Die Graphiken wurden ebenfalls in einer elektronischen Datenbank hinterlegt.

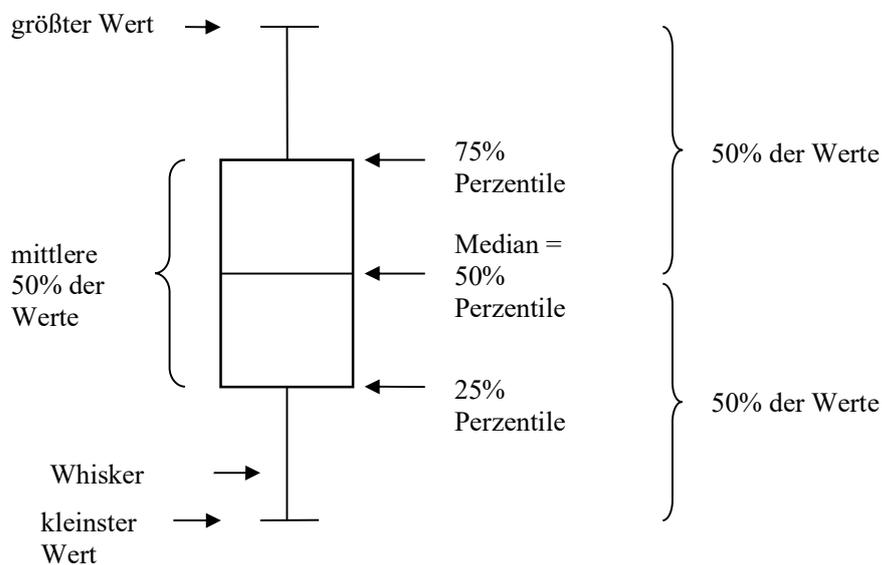


Abb. 24: Boxplot (Modifiziert nach Martens, 2014).

4 Ergebnisse

Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass die mechanische Umgebung, welche aus der Stabilisationssteifigkeit resultiert, entscheidend für den Heilungserfolg einer Knochenfraktur ist (Willie et al., 2009; Histings et al., 2010; Bartnikowski et al., 2017; Claes, 2017). Ebenso ist der stimulierende Effekt von BMP-2 auf die Knochenheilung in verschiedenen Studien belegt worden (Nauth et al., 2011; Wildemann et al., 2011). Die Fragestellung, welchen Einfluss die kombinierte Stimulation (biologisch und mechanisch) auf den Heilungsverlauf eines kritischen Defekts hat, ist dagegen nur wenig untersucht worden (Schwarz & Wulsten et al., 2013; Glatt et al., 2012; Boerkel et al., 2011). Im Rahmen dessen untersuchte die vorliegende Arbeit den Einfluss unterschiedlicher Steifigkeiten in Kombination mit einer niedrigen BMP-2-Dosis auf die Defektheilung im Pseudarthrosemodell der Ratte. Auf Grundlage von *in vivo* mikrocomputertomographischen Untersuchungen und *in vitro* biomechanischen Testungen wurden die nachfolgenden Ergebnisse erhoben.

Von den anfänglich 32 Sprague Dawley Ratten gingen 21 Versuchstiere in die mikrocomputertomographische *in vivo*-Auswertung ein. Aufgrund von postoperativer Hypoventilation, spontanem Versterben, infektiösen Druckstellen, osteolytischer Veränderungen der Knochensubstanz sowie zernagter Kunststoffbalken des Fixationsystems schieden 11 Versuchstiere vorzeitig aus der Studie aus. Entsprechend gingen auch 21 Tiere in die Auswertung der biomechanischen *in vitro*-Testung ein, plus sieben intakte *Ossa femori* der kontralateralen Versuchsgruppe (Tab. 2).

Tab. 2: Übersicht über die Untersuchungsmethoden und finale Anzahl an Versuchstieren.

Gruppe	Untersuchungsmethode / Zeitpunkte			
	<i>in vivo</i> Mikro-CT			BMT
	Tag 10	Tag 21	Tag 42	Tag 42
Flexibel	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5
Semi-rigide	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6
Rigide	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5
Kontrolle	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5
Kontralateral	-	-	-	n = 7

4.1 Konventionelles Röntgen

Zur Kontrolle des Heilungsverlaufs wurden unmittelbar nach dem Setzen der Osteotomien, sowie nach 10, 21 und 42 Tagen, postoperative Röntgenaufnahmen der operierten Gliedmaße angefertigt. Unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit waren postoperativ bei allen Tieren der 5mm breite, respektive der 1mm breite Osteotomiespalt deutlich erkennbar. Der Spalt stellte sich durch eine glatte, scharfkantige Begrenzung der Kortikalisenden und einem dazwischenliegenden Leerraum dar. An Tag 10 waren bei den rhBMP-2 behandelten Gruppen dezente röntgendichte Verschattungen im periostalen und endostalen Defektbereich sichtbar, die auf den Beginn einer Knochenneubildung hinwiesen, jedoch zu keiner knöchernen Überbrückung führten. In der Kontrollgruppe ließ sich der 1mm Spalt nur undeutlich darstellen, sodass kein Einblick in den endostalen Spaltbereich möglich war. Eine moderate, periostale Knochenneubildung war in dieser Gruppe erkennbar. Nach 21 Tagen zeigten alle rhBMP-2-behandelten Versuchstiere periostal und endostal deutliche röntgendichte Verschattungen, die den Defekt komplett ausfüllten und somit eine Defektüberbrückung. Auffällig war zum einen, dass in der flexiblen Gruppe mehrere Versuchstiere deutlich mehr endostale röntgendichte Verschattungen aufwiesen als die rigideren Gruppen. Zum anderen zeigten zwei Versuchstiere in der semi-rigiden Gruppe einen nicht röntgendichten Defektbereich. In der 1 mm Kontrollgruppe waren zu diesem Zeitpunkt deutliche röntgendichte, periostale

Wolkenbildungen beobachtbar. Alle drei Gruppen zeigten nach 42 Tagen eine vollständige knöcherne Überbrückung des 5mm-Spalt, was sich in der flexiblen Gruppe röntgenologisch als umfangreiche, deutlich homogene Verschattung darstellte. Die semi-rigide Gruppe ließ eine schärfer begrenzte Verschattung erkennen, während sich in der rigiden Gruppe endostal die Verschattungen dagegen größtenteils wolzig darstellten. Die Kontrollgruppe präsentierte sich röntgenologisch als überwiegend periostal überbrückt.

4.2 Mikrocomputertomographie (Mikro-CT)

Aus der rigiden (100% Steifigkeit), flexiblen (10% Steifigkeit) und aus der Kontrollgruppe (Modell für die physiologische Heilung, 1mm Spaltgröße) gingen jeweils fünf Tiere und aus der semi-rigiden (40% Steifigkeit) sechs Tiere in die mikrocomputertomographische Auswertung ein. Jede der vier Versuchsgruppen durchlief dreimal im Zeitverlauf von 42 Tagen einen *in vivo*- Mikro-CT-Scan (Tag 10, 21 und 42 postoperativ). Eine statistische Analyse zur Ermittlung potentieller Signifikanzen erfolgte sowohl im Zeitverlauf innerhalb einer Gruppe als auch im Gruppenvergleich zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten.

4.2.1 Flexible Gruppe im Zeitverlauf 10, 21 und 42 Tage postoperativ

Tab. 3: Quantitative *in vivo*-Mikro-CT Ergebnisse der flexiblen Gruppe im Zeitverlauf 10, 21 und 42 Tage; Werte angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Parameter/Zeitpunkt	Tag 10 n = 5	Tag 21 n = 5	Tag 42 n = 5
TV [mm ³]	22,66 \pm 19,52	126,15 \pm 26,53	135,36 \pm 18,07
BV [mm ³]	5,21 \pm 3,47	75,39 \pm 26,87	120,74 \pm 9,78
BV /TV [mm ³ /mm ³]	0,29 \pm 0,10	0,59 \pm 0,12	0,90 \pm 0,07
TMD [mg HA/cm ³]	628,26 \pm 110,28	564,60 \pm 26,26	743,94 \pm 55,13
TMC [mg HA]	3,05 \pm 1,75	42,91 \pm 16,24	89,56 \pm 6,09

Das mineralisierte Kallusvolumen (BV) verzeichnete einen kontinuierlichen Anstieg im gesamten Zeitverlauf, was mit der stetigen Zunahme an periostaler und endostaler Knochenneubildung korrelierte. Am 21. Tag war der kalzifizierte und mineralisierte Kallus

signifikant größer als an Tag 10 ($p = 0,005$). Anhand der deskriptiven Mikro-CT-Analyse stellten sich drei von fünf Versuchstieren komplett periostal überbrückt dar (Abb. 32), während die restlichen zwei Tiere zumindest zapfenartig periostal überbrückt erschienen. Die enorme Zunahme von BV von Tag 10 zu Tag 21 geht einher mit einem signifikanten Anstieg an TMC im selben Zeitfenster ($p = 0,004$) (Abb. 30). An Tag 42 stellte sich das Knochenvolumen signifikant größer als an Tag 10 ($p = 0,003$) und als an Tag 21 ($p = 0,019$) dar. Auch der Inhalt des mineralisierten Gewebes (TMC) in der flexiblen Gruppe nahm stetig während des gesamten Zeitverlaufs zu. Zwischen Tag 21 und 42 bestand ein signifikanter Anstieg ($p = 0,003$), ebenso wie im Vergleich zwischen Tag 10 und 42 ($p = 0,003$). An Tag 42 zeigten alle fünf Versuchstiere der flexiblen Gruppe eine vergleichbare Entwicklung, der Defektspace erschien periostal und endostal vollständig überbrückt (Abb. 33).

In der flexiblen Gruppe nahm das Gesamtvolumen (TV) im Zeitverlauf kontinuierlich zu, sowohl an Tag 21 ($p = 0,002$), als auch an Tag 42 ($p = 0,002$) war es signifikant größer als an Tag 10, allerdings war die Zunahme von Tag 21 zu Tag 42 nicht mehr signifikant (Abb. 26). Des Weiteren ließ sich im Verlauf eine signifikante Zunahme zu allen Zeitpunkten des Anteils von mineralisiertem Kallusvolumen im Gesamtkallusvolumen (BV/TV) feststellen. Zwischen den Untersuchungszeitpunkten Tag 10 und Tag 21 zeigte sich eine signifikante Zunahme ($p = 0,035$), ebenso wie an Tag 10 zu Tag 42 ($p = 0,003$) und Tag 21 zu Tag 42 ($p = 0,008$). Zudem war eine signifikante Zunahme der Dichte des mineralisierten Gewebes (TMD) an Tag 21 zu Tag 42 zu erfassen ($p = 0,003$), während TMD an Tag 10 zu Tag 21 abnahm (Tab. 3).

4.2.2 Semi-rigide Gruppe im Zeitverlauf 10, 21 und 42 Tage postoperativ

Tab. 4: Quantitative *in vivo*-Mikro-CT Ergebnisse der semi-rigiden Gruppe im Zeitverlauf 10, 21 und 42 Tage; Werte angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Parameter/Zeitpunkt	Tag 10 n = 6	Tag 21 n = 6	Tag 42 n = 6
TV [mm ³]	72,81 \pm 54,33	107,09 \pm 26,08	96,85 \pm 18,92
BV [mm ³]	10,26 \pm 7,89	67,00 \pm 29,37	69,15 \pm 22,45
BV/TV [mm ³ /mm ³]	0,24 \pm 0,19	0,61 \pm 0,10	0,70 \pm 0,13
TMD [mg HA/cm ³]	515,44 \pm 36,28	602,46 \pm 39,65	777,42 \pm 47,48
TMC [mg HA]	5,07 \pm 3,72	40,04 \pm 16,91	53,01 \pm 15,06

Das Knochenvolumen (BV) zeigte eine signifikante Zunahme von Tag 10 zu Tag 21 ($p = 0,047$) und Tag 10 zu Tag 42 ($p = 0,003$), aber nicht zwischen Tag 21 und Tag 42 (Abb. 27).

Während des Zeitverlaufs nahm der Inhalt des mineralisierten Gewebes (TMC) kontinuierlich zu. Sowohl an Tag 21 ($p = 0,031$) als auch an Tag 42 ($p = 0,003$), war der Inhalt signifikant größer als an Tag 10. An Tag 42 konnte man zudem einen signifikanten Zuwachs des Inhalts im Vergleich zum 21. Tag feststellen ($p = 0,031$). Alle sechs Versuchstiere zeigten an Tag 10 reichlich periostale Knochenneubildung, wobei drei der Tiere mit einer herausragenden Menge hervorstachen (Abb. 31). Daher überraschte es nicht, dass alle Scans der deskriptiven Mikro-CT-Analyse an Tag 21 periostal überbrückt erschienen. Auffällig war auch die beginnende Markhöhlenneubildung bei zwei Tieren, was sich durch einen spärlich gefüllten endostalen Defektspace darstellte (Abb. 32).

Zwischen dem 10. und dem 21. Tag ließ sich eine Zunahme des Gesamtkallusvolumens (TV) verzeichnen, die jedoch nicht signifikant war. Interessanterweise nahm TV im Verlauf von Tag 21 zu Tag 42 ab (Tab. 4). Hierbei korrelieren die quantitativen Daten mit der deskriptiven Analyse des Mikro-CTs. Drei der sechs Versuchstiere zeigten an Tag 42 eine scharf abgegrenzte Kortikalisneubildung neben einer neugebildeten Markhöhle (Abb. 33). Insgesamt stützt dies die positive Entwicklung der semi-rigiden Gruppe über den gesamten Heilungsverlauf.

Der Anteil an mineralisiertem Kallusvolumen im Gesamtkallusvolumen (BV/TV) zeigte eine signifikante Zunahme an Tag 10 zu Tag 21 ($p = 0,024$) und Tag 42 ($p = 0,047$), aber nicht mehr an Tag 21 zu Tag 42 (Abb. 28).

Die Dichte des mineralisierten Gewebes (TMD) nahm im Zeitverlauf signifikant zu. Die Signifikanz zwischen dem 10. und 21. Tag betrug $p = 0,029$. Am 42. Tag war die Dichte signifikant größer als nach 10 ($p = 0,002$) und nach 21 Tagen ($p = 0,002$).

4.2.3 Rigide Gruppe im Zeitverlauf 10, 21 und 42 Tage postoperativ

Tab. 5: Quantitative *in vivo*-Mikro-CT Ergebnisse der rigiden Gruppe im Zeitverlauf 10, 21 und 42 Tage; Werte angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Parameter/Zeitpunkt	Tag 10 n = 5	Tag 21 n = 5	Tag 42 n = 5
TV [mm ³]	71,04 \pm 46,91	118,07 \pm 10,66	113,25 \pm 18,71
BV [mm ³]	5,74 \pm 3,05	72,70 \pm 12,11	81,34 \pm 16,78
BV/TV [mm ³ /mm ³]	0,16 \pm 0,16	0,61 \pm 0,06	0,72 \pm 0,08
TMD [mg HA/cm ³]	587,09 \pm 158,18	601,76 \pm 27,93	753,79 \pm 28,49
TMC [mg HA]	3,39 \pm 1,97	43,60 \pm 6,26	61,11 \pm 11,84

Im Zeitverlauf der rigiden Gruppe ließ sich ein signifikanter Zuwachs des mineralisierten Kallusvolumens (BV) verzeichnen. Im Vergleich von Tag 10 zu Tag 21 und Tag 42 zeigten beide Zeitpunkte eine deutliche Zunahme an kalzifiziertem und mineralisiertem Kallusgewebe (beide $p = 0,002$). Dies korrespondierte mit der signifikanten Zunahme des Inhalts von mineralisiertem Gewebe (TMC) im gesamten Zeitverlauf und wurde von der offensichtlichen Zunahme an mineralisiertem Kallusvolumen in der deskriptiven Mikro-CT-Analyse gestützt. Von Tag 10 zu Tag 21 sowie zu Tag 42 zeigte TMC ebenfalls eine deutliche Steigerung (beide $p = 0,002$). Von Tag 21 zu Tag 42 ergab sich gleichfalls ein signifikanter Anstieg für TMC ($p = 0,011$).

Ebenso ließ sich von Tag 10 zu Tag 21 eine nicht signifikante Zunahme des Gesamtkallusvolumens (TV) verzeichnen, welches jedoch zu Tag 42 wieder abfiel (Tab. 5). Statistisch signifikante Unterschiede traten hierbei nicht auf. Im Mikro-CT-Scan von Tag 10 war deutlich periostale Kallusbildung in allen Versuchstieren darstellbar, die sich zu Tag 21 noch verstärkte. So erstreckte sich an Tag 21 das Gesamtkallusvolumen der rigiden Gruppe auf den periostalen und endostalen Raum und überbrückte bei allen Tieren den Defektspace. Leichte Tendenzen zur Markhöhlenneubildung waren wiederum bei zwei Tieren erkennbar. Der Abfall der quantitativen Werte von Tag 21 zu Tag 42 geht einher mit der fortschreitenden Neubildung der Markhöhle, welche in der deskriptiven Analyse darstellbar war (Abb. 33).

Der prozentuale Anteil von mineralisiertem Knochengewebe am Gesamtkallusvolumen (BV/TV) der rigiden Gruppe nahm stetig zu. Im Zeitverlauf von Tag 10 zu Tag 21 ($p = 0,006$)

und zu Tag 42 ($p = 0,003$) war eine signifikante Zunahme erkennbar. Analog dazu bestand auch zwischen Tag 21 und Tag 42 eine signifikante Zunahme von BV/TV ($p = 0,021$).

Die Dichte des mineralisierten Gewebes (TMD), ein Marker der Knochenreifung, nahm im Zeitverlauf konstant zu, jedoch zeigte sich hinsichtlich dieses Parameters, ausschließlich im Vergleich zwischen Tag 21 und Tag 42 eine signifikante Zunahme ($p = 0,003$; Abb. 29).

4.2.4 Kontrollgruppe im Zeitverlauf 10, 21 und 42 Tage postoperativ

Tab. 6: Quantitative *in vivo*-Mikro-CT Ergebnisse der Kontrollgruppe (1mm-Osteotomie) im Zeitverlauf 10, 21 und 42 Tage; Werte angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Parameter/Zeitpunkt	Tag 10 n = 5	Tag 21 n = 5	Tag 42 n = 5
TV [mm ³]	7,29 \pm 2,07	15,19 \pm 6,29	22,84 \pm 4,37
BV [mm ³]	3,40 \pm 1,12	6,91 \pm 2,99	18,45 \pm 6,68
BV/TV [mm ³ /mm ³]	0,48 \pm 0,13	0,46 \pm 0,10	0,80 \pm 0,17
TMD [mg HA/cm ³]	649,46 \pm 144,36	592,29 \pm 24,71	745,20 \pm 41,97
TMC [mg HA]	2,29 \pm 1,22	4,11 \pm 1,86	13,88 \pm 5,46

Das mineralisierte Kallusvolumen (BV) nahm gleichermaßen wie TMC im Zeitverlauf zu. Von Tag 10 zu Tag 21 nahm sowohl der mineralisierte Kallus als auch der Inhalt des mineralisierten Gewebes (TMC) zu. Von Tag 21 zu Tag 42 fand erneut eine deutliche Zunahme an Knochenvolumen (BV) und Mineralgehalt des Knochens (TMC) statt. Das Gesamtkallusvolumen (TV) erfuhr ebenfalls eine anfänglich erhebliche Steigerung von Tag 10 auf Tag 21, gefolgt von einer konstanten Zunahme zu Tag 42. Der prozentuale Anteil von mineralisiertem Knochengewebe am Gesamtkallusvolumen (BV/TV) und die Dichte des mineralisierten Gewebes (TMD) waren unverändert von Tag 10 zu Tag 21, erfuhren danach aber eine wesentliche Zunahme zwischen Tag 21 und Tag 42 (Tab. 6). An Tag 10 war bei allen fünf Tieren der Kontrollgruppe eine mäßige endostale Knochenneubildung erkennbar. Zwei Versuchstiere zeigten am folgenden Untersuchungszeitpunkt (Tag 21) eine endostale Überbrückung. An Tag 42 erzielten nur zwei Tiere der Kontrollgruppe eine vollständige knöcherne Überbrückung, während drei weitere endostal, aber nicht periostal vollständig überbrückt waren.

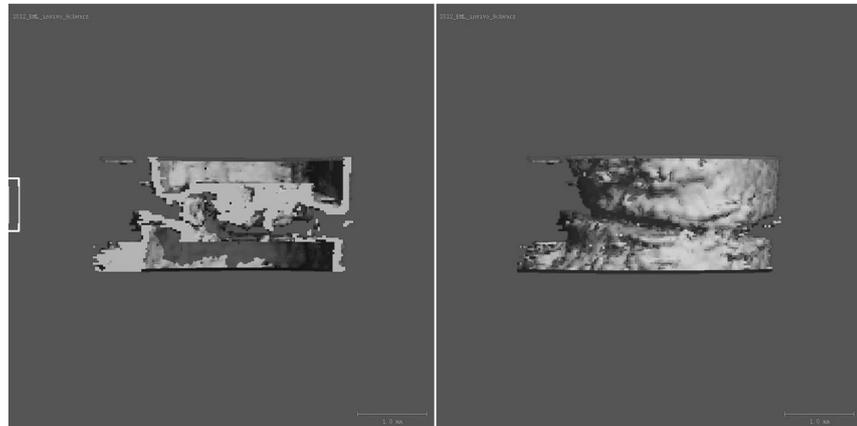
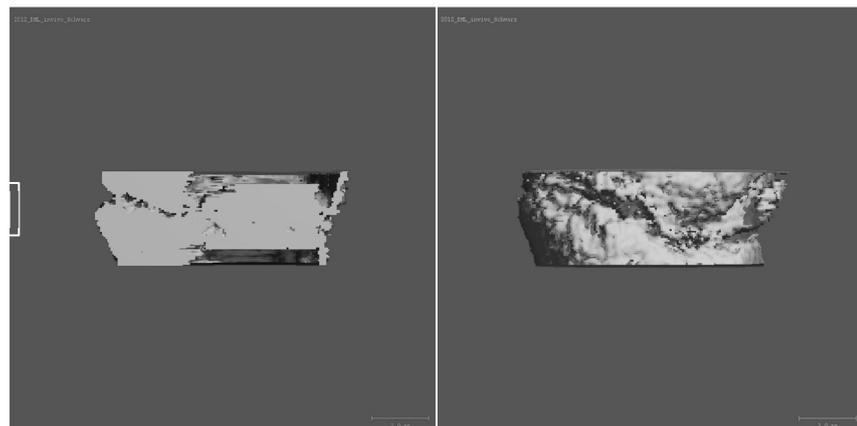
Kontrollgruppe (1mm)**Tag 10****Tag 21****Tag 42**

Abb. 25: Dreidimensionale Darstellung der Kallusbildung im *in vivo*-Mikro-CT, Kontrollgruppe im Zeitverlauf, Tag 10,21 und 42 (von oben nach unten), Frontalansicht (rechts) und Schnittbild (links), Skalamaßstab 1mm. Die Helligkeitsverteilung der Voxel gibt den Mineralisationsgrad des neu gebildeten Knochens im Defektbereich an. Hierbei stellt sich ein niedriger Grad an Mineralisation (Defektspalt) dunkel dar, während sich ein hoher Mineralisationsgrad (kortikaler Knochen) hell darstellt. Der Defekt ist endostal, aber nicht vollständig periostal überbrückt.

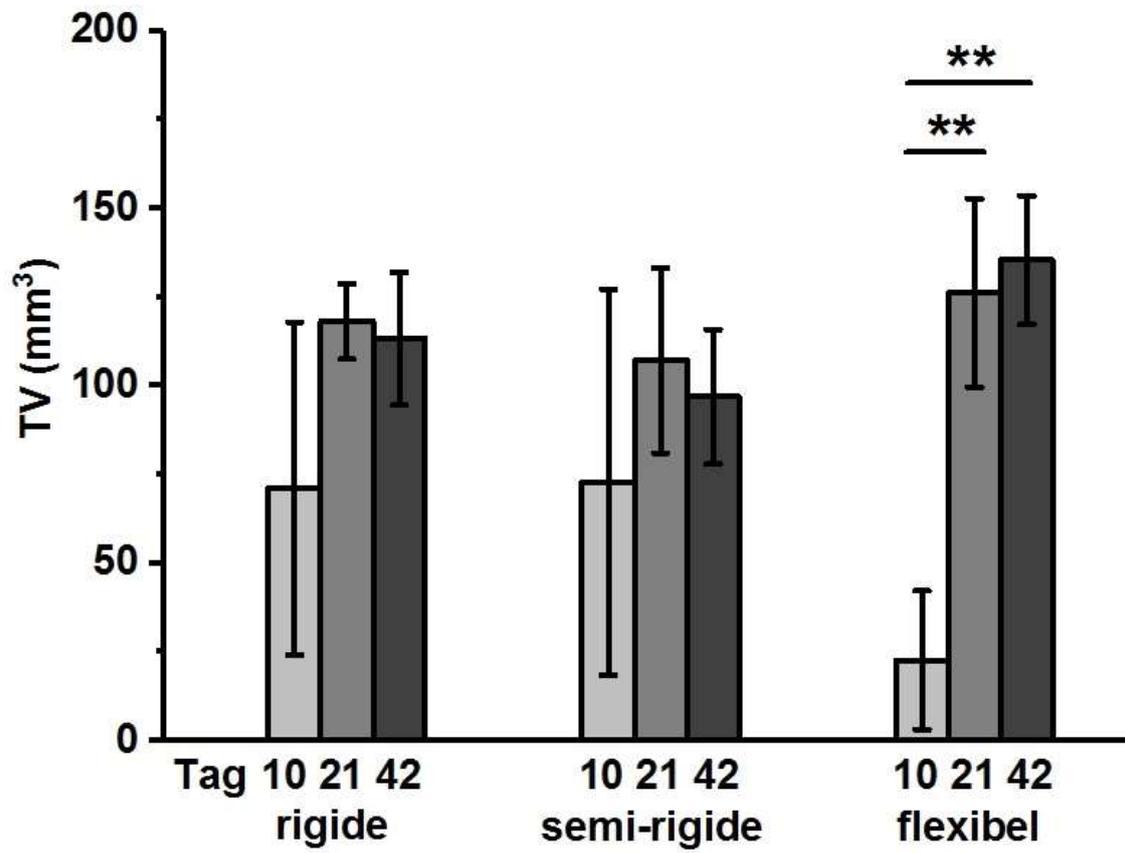


Abb. 26: *In vivo*-Mikro-CT-Ergebnisse des Gesamtkallusvolumens (TV) der Versuchsgruppen an Tag 10, 21 und 42 postoperativ (Signifikanzen im Zeitverlauf, * $p < 0,05$).

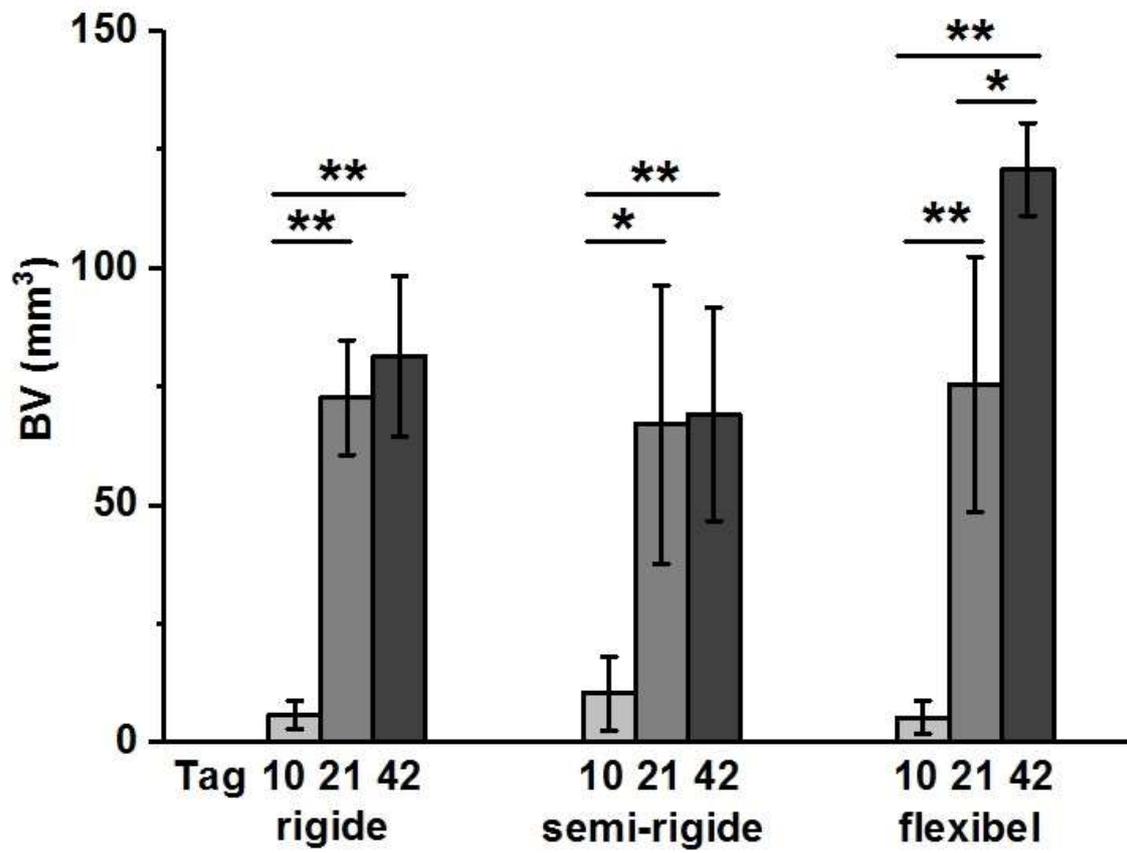


Abb. 27: *In vivo*-Mikro-CT-Ergebnisse des mineralisierten Kallusvolumens (BV) der Versuchsgruppen an Tag 10, 21 und 42 postoperativ (Signifikanzen im Zeitverlauf, * $p < 0,05$).

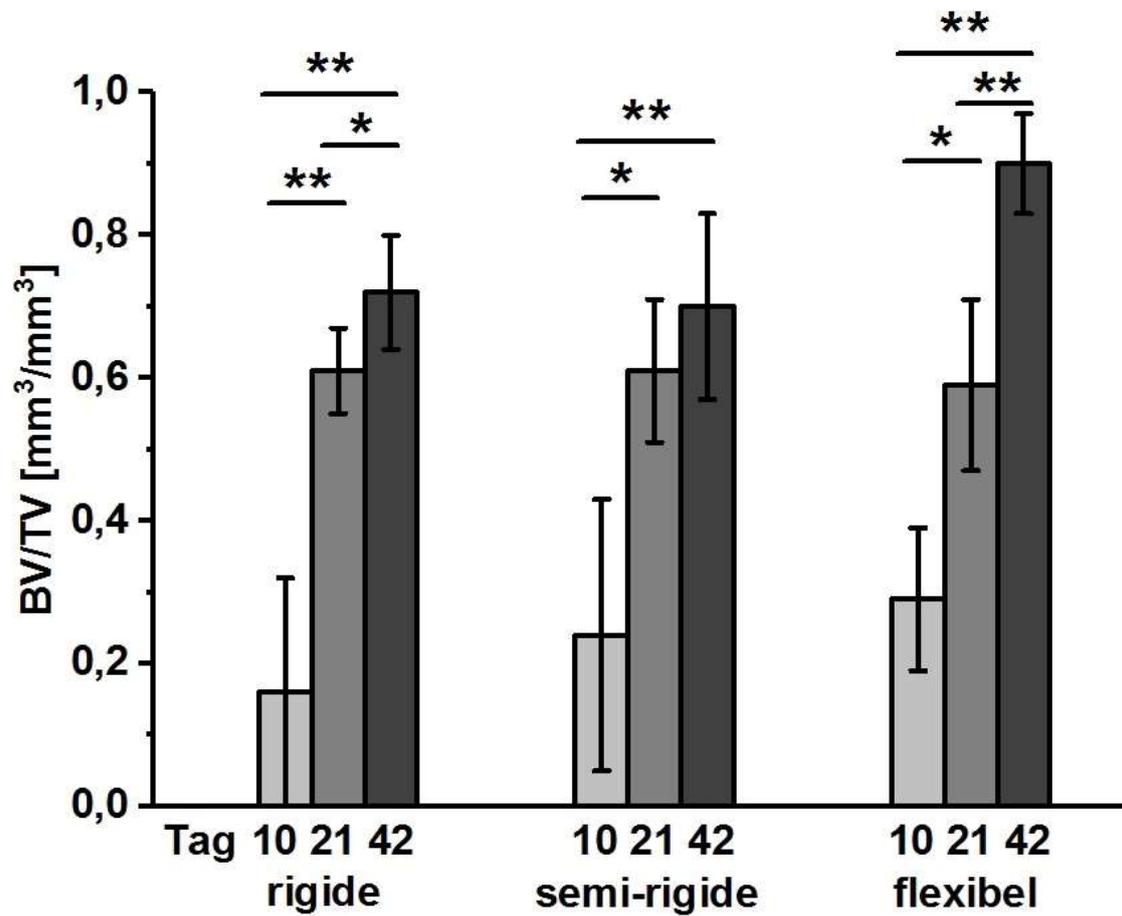


Abb. 28: *In vivo*-Mikro-CT-Ergebnisse des Anteils an mineralisiertem Kallusvolumens im Gesamtkallusvolumen (BV/TV) der Versuchsgruppen an Tag 10, 21 und 42 postoperativ (Signifikanzen im Zeitverlauf, * $p < 0,05$).

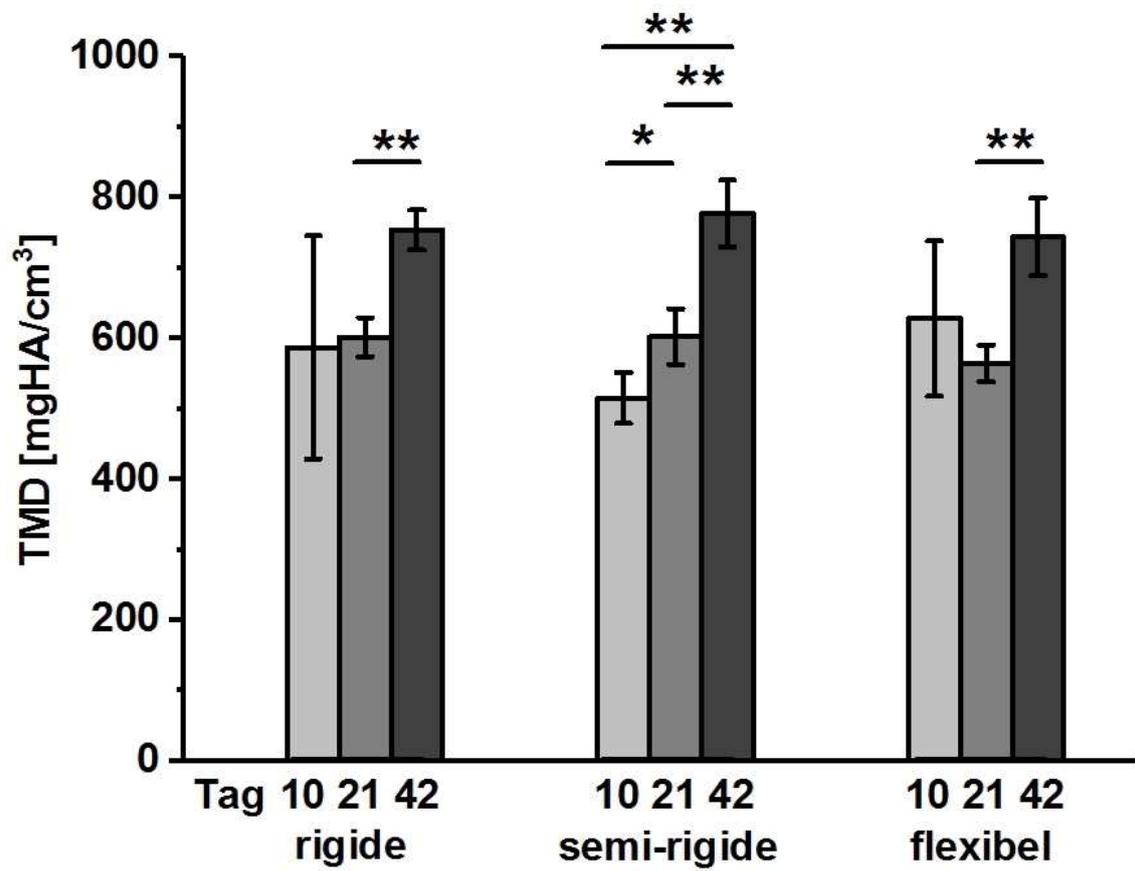


Abb. 29: *In vivo*-Mikro-CT-Ergebnisse der Dichte des mineralisierten Gewebes (TMD) der Versuchsgruppen an Tag 10, 21 und 42 postoperativ (Signifikanzen im Zeitverlauf, * $p < 0,05$).

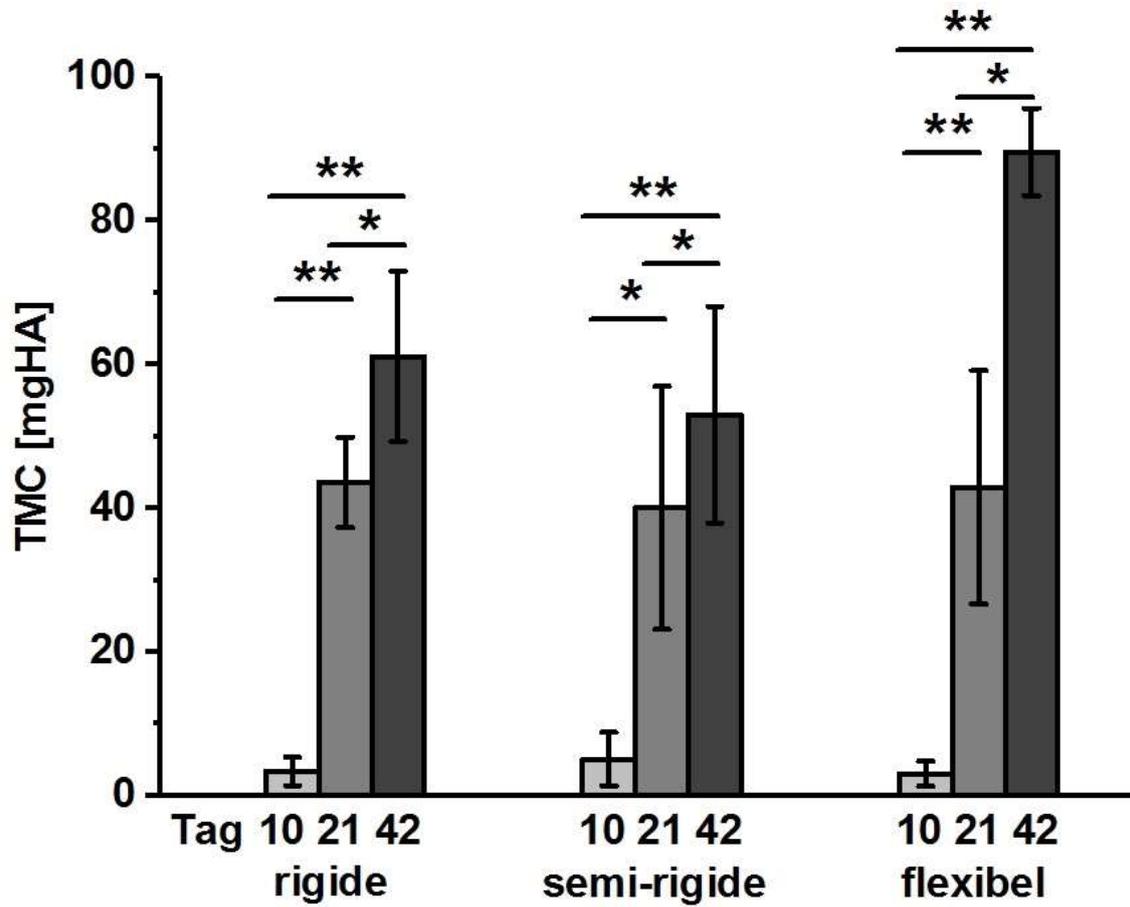


Abb. 30: *In vivo*-Mikro-CT-Ergebnisse des Inhaltes des mineralisierten Gewebes (TMC) der Versuchsgruppen an Tag 10, 21 und 42 postoperativ (Signifikanzen im Zeitverlauf, * $p < 0,05$).

4.2.5 Versuchsgruppen im Vergleich an Tag 10 postoperativ

Tab. 7: Quantitative *in vivo*-Mikro-CT-Ergebnisse der Versuchsgruppen an Tag 10 postoperativ, Flexibel, Semi-rigide, Rigide und Kontrollgruppe; Werte angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Parameter/Gruppe	Flexibel n = 5	Semi-rigide n = 6	Rigide n = 5	Kontrolle n = 5
TV [mm ³]	22,66 \pm 19,52	72,81 \pm 54,33	71,04 \pm 46,91	7,29 \pm 2,07
BV [mm ³]	5,21 \pm 3,47	10,26 \pm 7,89	5,74 \pm 3,05	3,40 \pm 1,12
BV/TV [mm ³ /mm ³]	0,30 \pm 0,10	0,24 \pm 0,20	0,16 \pm 0,16	0,48 \pm 0,13
TMD [mg HA/cm ³]	628,26 \pm 110,28	515,44 \pm 36,28	587,09 \pm 158,18	649,46 \pm 144,36
TMC [mg HA]	3,05 \pm 1,75	5,07 \pm 3,72	3,39 \pm 1,97	2,29 \pm 1,22

An Tag 10 präsentierte die semi-rigide Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen einen deutlich größeren Wert hinsichtlich des mineralisierten Knochengewebes (BV), der jedoch nicht signifikant gegenüber den anderen Gruppen war. Interessanterweise zeigten die flexible und die rigide Gruppe sehr ähnliche Werte (Tab. 7). Dennoch lieferte die dreidimensionale Darstellung des Heilungsverlaufs im kritischen Defekt ein ähnliches Erscheinungsbild in allen drei Versuchsgruppen. Unabhängig von der mechanischen Stimulation (Steifigkeit des Fixateurbalkens), war am 10. postoperativen Tag im Defektbereich hauptsächlich periostales, mineralisiertes Kallusgewebe moderat vorhanden, welches jedoch nicht in einer Defektüberbrückung resultierte. Tendenziell ließ die semi-rigiden Gruppe das höchste Knochenvolumen (BV) erkennen (Abb. 31).

Die semi-rigiden Gruppe zeigte ebenfalls den höchsten TMC-Wert, der jedoch auch hier nicht signifikant war.

Zum selben Zeitpunkt gab es keine signifikanten Unterschiede bzgl. des Gesamtkallusvolumens (TV) in den Versuchsgruppen, wobei die flexible Gruppe den geringsten Wert vorwies.

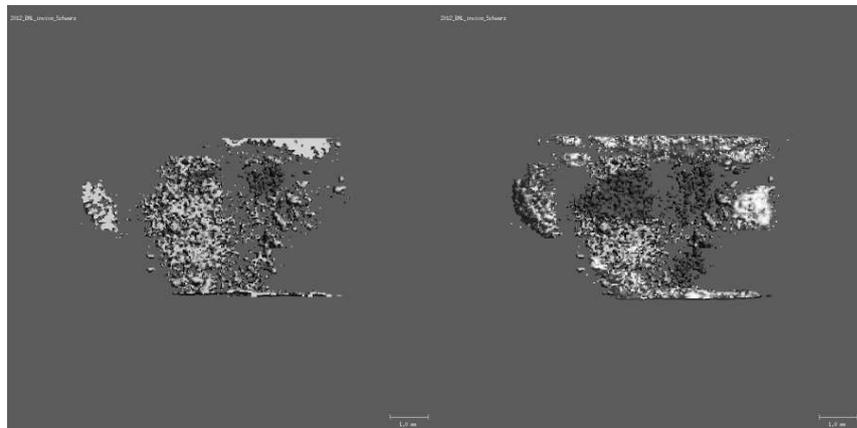
Der prozentuale Anteil von mineralisiertem Kallusgewebe im Gesamtkallusvolumen (BV/TV) nahm in den Versuchsgruppen (5 mm- Defektbereich) mit steigender Steifigkeit des Fixateurs ab. Signifikante Unterschiede konnten nicht verzeichnet werden.

Hinsichtlich der Dichte des mineralisierten Gewebes (TMD) wies die flexible Gruppe einen nicht-signifikant höheren Wert als die semi-rigide und rigide Gruppe auf.

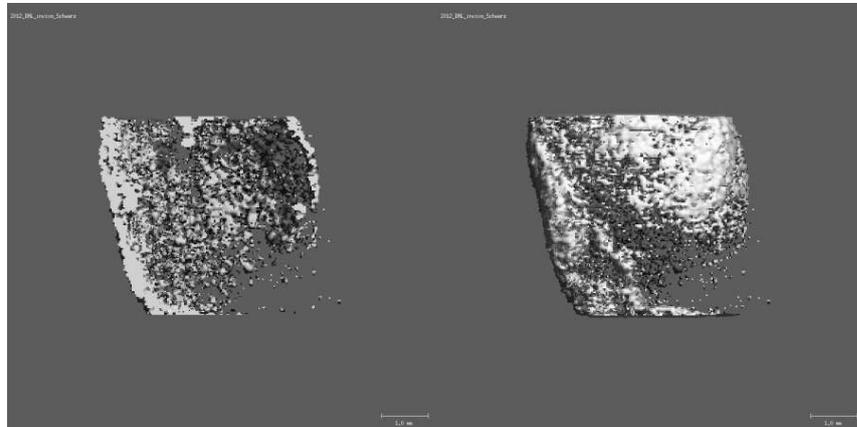
Die Parameterwerte der Kontrollgruppe wurden tabellarisch aufgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Defektbreite und BMP-2-Behandlung war die Gruppe gegenüber den restlichen Versuchsgruppen nicht statistisch vergleichbar, weshalb auch im Folgenden nicht weiter auf die Kontrollgruppe eingegangen wurde.

Tag 10

Flexibel



Semi-rigide



Rigide

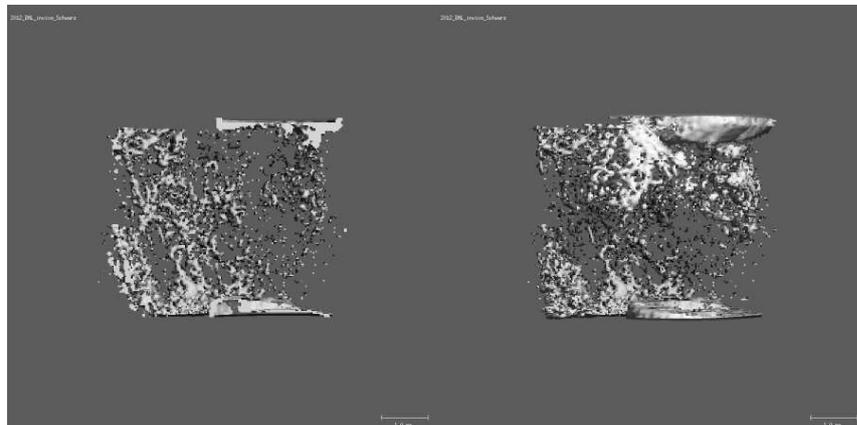


Abb. 31: Dreidimensionale Darstellung der Kallusbildung im *in vivo*-Mikro-CT, Versuchsgruppen im Vergleich an Tag 10, flexible, semi-rigide, rigide Gruppe (von oben nach unten), Frontalansicht (rechts) und Schnittbild (links), Skalamaßstab 1mm. Die Helligkeitsverteilung der Voxel gibt den Mineralisationsgrad des neu gebildeten Knochens im Defektbereich an. Hierbei stellt sich ein niedriger Grad an Mineralisation (Defektspace) dunkel dar, während sich ein hoher Mineralisationsgrad (kortikaler Knochen) hell darstellt. In allen Versuchsgruppen ist mineralisiertes Kallusvolumen vorhanden, aber keine Defektüberbrückung.

Zusammenfassend ließ sich im Vergleich der Versuchsgruppen an Tag 10 noch keine knöcherne Defektüberbrückung darstellen, allerdings zeigten sich bereits hauptsächlich periostale Knochenneubildungen im Defektbereich aller drei Gruppen. Die semi-rigide Gruppe stach mit dem vergleichbar höchsten Grad an Mineralisation im *in vivo*-Mikro-CT hervor (Abb. 31), welches mit den deutlich größeren Werten in BV und TMC korrelierte (Tab. 7). Die flexible Gruppe wies diesbezüglich den geringsten Wert an Gesamtkallusvolumen (TV) auf, was sich in einer minimal geringfügigeren Knochenneubildung im *in vivo*-Mikro-CT unter den drei Gruppen widerspiegelte.

4.2.6 Versuchsgruppen im Vergleich an Tag 21 postoperativ

Tab. 8: Quantitative *in vivo*-Mikro-CT-Ergebnisse der Versuchsgruppen an Tag 21 postoperativ, Flexibel, Semi-rigide, Rigide und Kontrollgruppe; Werte angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Parameter/Gruppe	Flexibel n = 5	Semi-rigide n = 6	Rigide n = 5	Kontrolle n = 5
TV [mm ³]	126,15 \pm 26,53	107,09 \pm 26,08	118,07 \pm 10,66	15,19 \pm 6,29
BV [mm ³]	75,39 \pm 26,87	67,01 \pm 29,37	72,70 \pm 12,11	6,91 \pm 2,99
BV/TV [mm ³ /mm ³]	0,59 \pm 0,12	0,61 \pm 0,10	0,61 \pm 0,07	0,46 \pm 0,10
TMD [mg HA/cm ³]	564,61 \pm 26,26	602,46 \pm 39,65	601,76 \pm 27,93	592,30 \pm 24,71
TMC [mg HA]	42,91 \pm 16,24	40,04 \pm 16,91	43,57 \pm 6,26	4,11 \pm 1,86

An Tag 21 zeigte sich in der dreidimensionalen Darstellung des *in vivo*-Mikro-CTs ein mit Knochengewebe gefüllter Defektspace in allen Versuchsgruppen. Erneut stellten sich die rigide und semi-rigide Gruppe mit einem ähnlichen Erscheinungsbild dar. Im *in vivo*-Mikro-CT erschienen die drei Gruppen als periostal überbrückt (Abb. 32), auch wenn die flexible Gruppe ein deutlich unregelmäßigeres Erscheinungsbild als die beiden anderen Versuchsgruppen präsentierte. Während diese Gruppe im Schnittbild deutlich mehr endostales und intrakortikales Knochengewebe aufwies, zeigten die rigide und semi-rigide Gruppe wesentlich weniger mineralisierten Kallus im endostalen Defektbereich. Bemerkenswerterweise fielen zu diesem Zeitpunkt je zwei Tiere der rigiden und semi-rigiden Gruppe durch beginnende Markhöhlenneubildung auf. Die flexible Gruppe präsentierte einen ähnlichen Wert an

Knochenvolumen (BV) wie die semi-rigide und rigide Gruppe, wobei sie an Tag 10 noch den kleinsten BV-Wert gezeigt hatte.

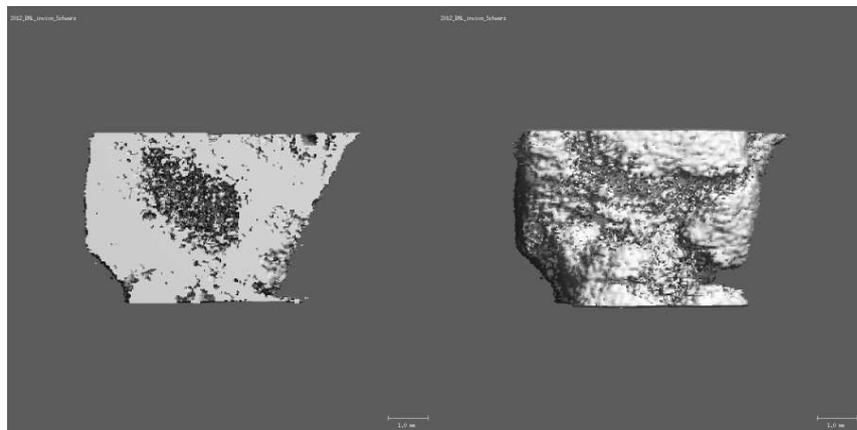
Die drei Versuchsgruppe zeigte an Tag 21 vergleichbare TMC-Werte (Tab. 8). Zum selben Zeitpunkt wiesen alle Gruppe ebenfalls ein ähnliches Gesamtkallusvolumen (TV) auf. Interessanterweise zeigte die semi-rigide Gruppe im *in vivo*-Mikro-CT die deutlichste Markhöhlenneubildung, welche durch wenig endostales Knochengewebe gekennzeichnet war (Abb. 32).

Hinsichtlich des Anteils an mineralisiertem Kallusvolumens bezogen auf das Gesamtkallusvolumen (BV/TV), zeigten die drei Versuchsgruppen erneut gleichwertige Mittelwerte.

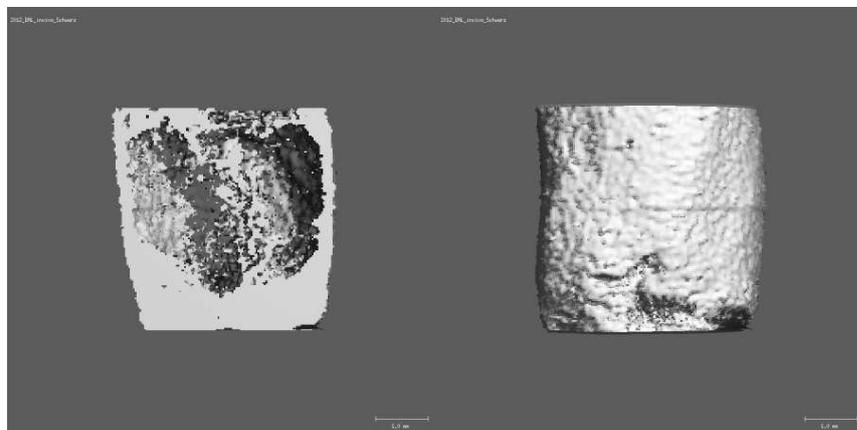
Analog dazu zeigten die semi-rigide und die rigide Gruppe auch ähnliche TMD- Werte, während die flexible Gruppe an Tag 21 einen nicht-signifikant geringeren TMD-Wert vorwies.

Tag 21

Flexibel



Semi-rigide



Rigide

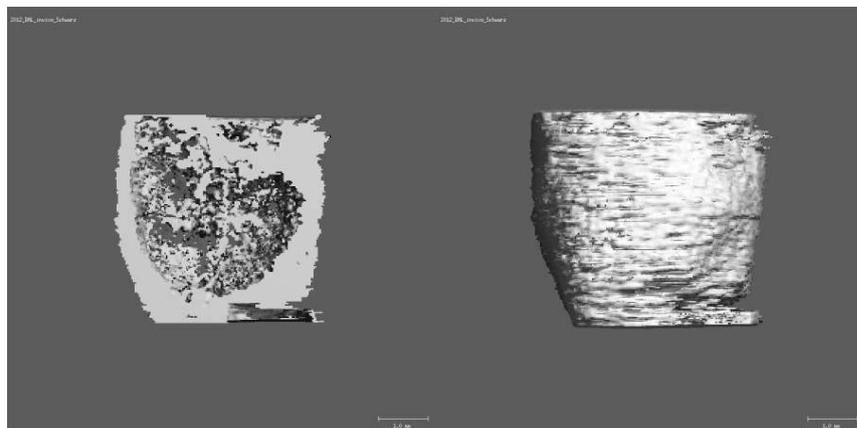


Abb. 32: Dreidimensionale Darstellung der Kallusbildung im *in vivo*-Mikro-CT, Versuchsgruppen im Vergleich an Tag 21, flexible, semi-rigide, rigide Gruppe (von oben nach unten), Frontalansicht (rechts) und Schnittbild (links), Skalamaßstab 1mm. Die Helligkeitsverteilung der Voxel gibt den Mineralisationsgrad des neu gebildeten Knochens im Defektbereich an. Hierbei stellt sich ein niedriger Grad an Mineralisation dunkel dar, während sich ein hoher Mineralisationsgrad (Knochengewebe) hell darstellt. Knöcherner Defektüberbrückung in allen Versuchsgruppen. Die semi-rigide und rigide Gruppe zeigen beginnende Markhöhlenneubildung.

Zusammenfassend zeigte sich an Tag 21 eine knöcherne Defektüberbrückung in allen drei Versuchsgruppen. Unterschiede zwischen der flexiblen Gruppe und den beiden steiferen Gruppen stellten sich vor allem im Erscheinungsbild des Kallus dar. In der flexiblen Gruppe war der Defekt ungleichmäßig mit knöchernen Kallusgewebe ausgefüllt (Abb. 32), während die semi-rigide Gruppe weniger mineralisiertes Gewebe im Defekt vorwies. Die rigide Gruppe zeigte ein ähnliches Erscheinungsbild des Defektkallus wie die semi-rigide Gruppe. Zu diesem Zeitpunkt wiesen alle Versuchsgruppen ähnliche TV-, BV-, BV/TV- und TMC-Werte auf (Tab. 8).

4.2.7 Versuchsgruppen im Vergleich an Tag 42 postoperativ

Tab. 9: Quantitative *in vivo*-Mikro-CT-Ergebnisse der Versuchsgruppen an Tag 42 postoperativ, Flexibel, Semi-rigide, Rigide und Kontrollgruppe; Werte angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Parameter/Gruppe	Flexibel n = 5	Semi-rigide n = 6	Rigide n = 5	Kontrolle n = 5
TV [mm ³]	135,36 \pm 18,07	96,85 \pm 18,92	113,25 \pm 18,72	22,84 \pm 4,37
BV [mm ³]	120,74 \pm 9,78	69,15 \pm 22,45	81,35 \pm 16,78	18,45 \pm 6,68
BV/TV [mm ³ /mm ³]	0,90 \pm 0,07	0,70 \pm 0,13	0,72 \pm 0,08	0,80 \pm 0,17
TMD [mg HA/cm ³]	743,94 \pm 55,13	777,42 \pm 47,48	753,79 \pm 28,49	745,20 \pm 41,97
TMC [mg HA]	89,56 \pm 6,09	53,01 \pm 15,06	61,11 \pm 11,84	13,88 \pm 5,46

Bezüglich des mineralisierten Kallusvolumens (BV), zeigte die flexible Gruppe an Tag 42 signifikant mehr Knochenvolumen als die semi-rigide ($p = 0,003$) und die rigide Gruppe ($p = 0,003$). Des Weiteren wies die rigide Gruppe mehr BV als die semi-rigide Gruppe auf, jedoch ohne Signifikanz. In gleicher Weise zeigte die flexible Gruppe auch signifikant mehr Inhalt mineralisierten Gewebes (TMC) als die semi-rigide ($p = 0,002$) und die rigide Gruppe ($p = 0,002$). Auch hier lag der TMC-Wert der rigiden Gruppe über dem Wert der semi-rigiden Gruppe, erneut ohne statistische Signifikanz.

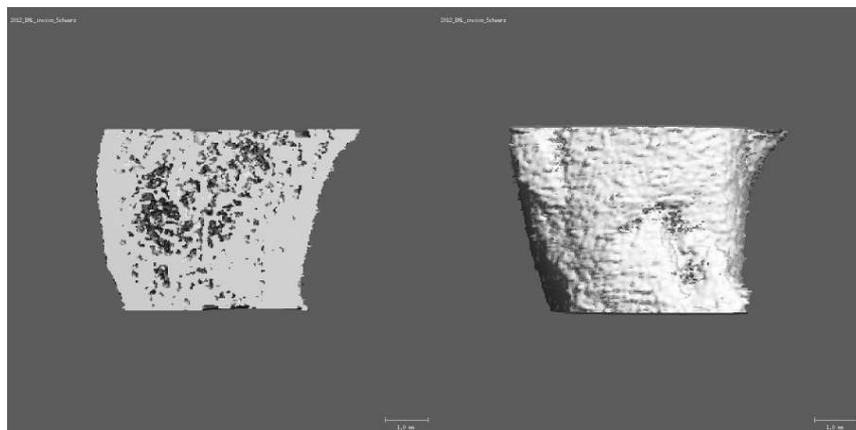
Die flexible Gruppe zeigte an Tag 42 gegenüber der semi-rigiden Gruppe ein signifikant größeres Gesamtkallusvolumen (TV, $p = 0,024$), jedoch nicht gegenüber der rigiden Gruppe.

Hinsichtlich des Anteils an mineralisiertem Kallusvolumen bezogen auf das Gesamtkallusvolumen (BV/TV) lieferte die flexible Gruppe, gegenüber der semi-rigiden ($p = 0,008$) und der rigiden Gruppe ($p = 0,008$) einen signifikant höheren Wert. Im dreidimensionalen Schnittbild an Tag 42 stellte sich die flexible Gruppe auch mit exzessiv mehr endostalem Knochengewebe im Defektspace dar. Dagegen war in den steifer fixierten Gruppen (semi-rigide und rigide) eine kompakte Kortikalis und die Wiederherstellung der Markhöhle darstellbar, jedoch erneut mit einem vergleichbaren Erscheinungsbild. Der Knochendefekt war in allen Versuchsgruppen überbrückt (Abb. 33).

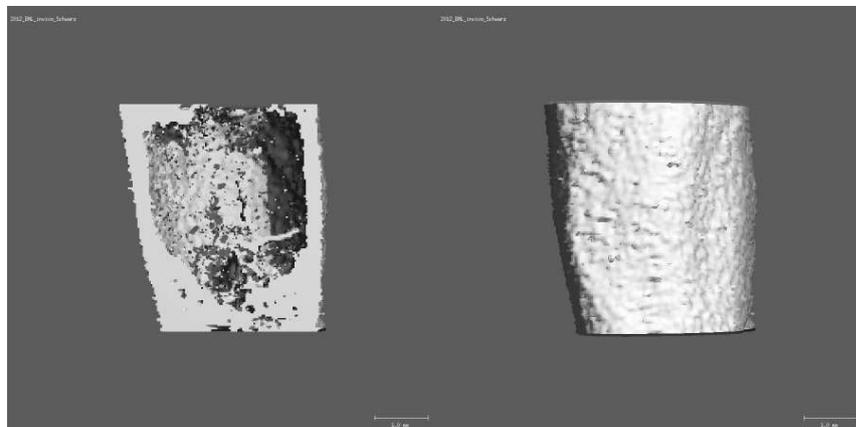
Zu diesem Zeitpunkt lieferte die flexible Gruppe den kleinsten TMD-Wert im Gruppenvergleich. Die semi-rigide Gruppe wies den größten Dichtewert an mineralisiertem Gewebe auf, jedoch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Tab. 9).

Tag 42

Flexibel



Semi-rigide



Rigide

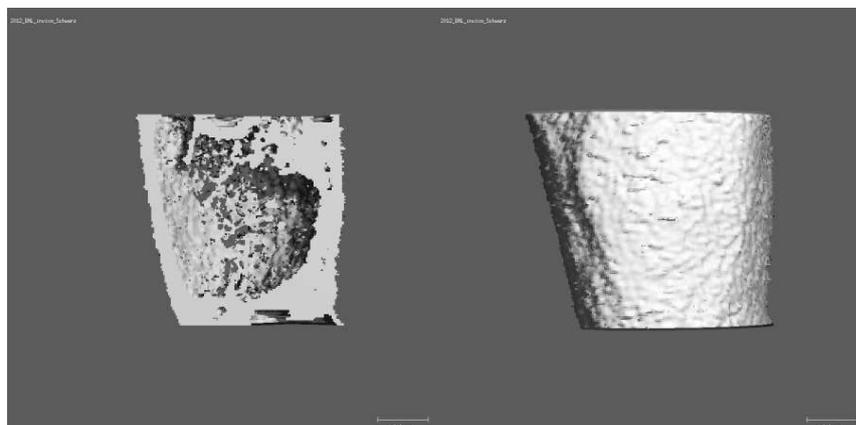


Abb. 33: Dreidimensionale Darstellung der Kallusbildung im *in vivo*-Mikro-CT, Versuchsgruppen im Vergleich an Tag 21, flexible, semi-rigide, rigide Gruppe (von oben nach unten), Frontalansicht (rechts) und Schnittbild (links), Skalamaßstab 1mm. Die Helligkeitsverteilung der Voxel gibt den Mineralisationsgrad des neu gebildeten Knochens im Defektbereich an. Hierbei stellt sich ein niedriger Grad an Mineralisation dunkel dar, während sich ein hoher Mineralisationsgrad hell darstellt. Der Knochendefekt ist in allen Versuchsgruppen überbrückt. Die semi-rigide und rigide Versuchsgruppe zeigen eine kompakte Kortikalis und die Wiederherstellung der Markhöhle, während der Defektspace der flexiblen Versuchsgruppe mit endostalem Knochengewebe gefüllt ist.

Zusammenfassend zeigte an Tag 42 die flexible Gruppe den größten BV-, TV- und TMC-Wert unter den Versuchsgruppen, was sich in einem mit Knochengewebe gefüllten Defekt äußerte. Im Gegensatz dazu ließen die beiden steiferen Gruppen, vor allem die semi-rigide Gruppe, eine Reifung des Knochengewebes erkennen, die mit einer Wiederherstellung des Markraumes, einem kleineren TV- und BV-Wert sowie einem erhöhten TMD-Wert einherging (Tab. 9).

4.3 Biomechanische *in vitro*-Testung

Aus der semi-rigiden Gruppe gingen alle sechs Tiere in die biomechanische *in vitro*-Testung ein. Bei jeweils einem Tier der rigiden und der flexiblen Gruppe war keine Defektüberbrückung erfolgt, weshalb aus diesen Gruppen nur jeweils fünf Tiere in die Auswertung eingingen. Alle fünf Tiere der Kontrollgruppe (1mm Osteotomiespalt, 100% Steifigkeit, ohne BMP-2) konnten biomechanisch ausgewertet werden. Zusätzlich sind sieben intakte *Ossa femora* (Kontralaterale) der operierten Versuchstiere in die Auswertung eingegangen.

Tab. 10: Ergebnisse der biomechanischen *in vitro*-Testung, Flexibel, Semi-rigide, Rigide, Kontrollgruppe und Kontralaterale, Werte werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung, (Mediane) aufgeführt.

Parameter/ Gruppe	Flexibel n = 5	Semi-rigide n = 6	Rigide n = 5	Kontrolle n = 5	Kontralateral n = 7
Maximales Dreh- moment [Nmm]	239,14 \pm 96,04 (263,30)	264,27 \pm 66,29 (250,05)	310,54 \pm 44,55 (295,40)	222,50 \pm 105,53 (218,90)	105,47 \pm 35,93 (111,00)
Steifigkeit [Nmm/°]	38,00 \pm 27,75 (30,00)	43,33 \pm 10,33 (40,00)	40,00 \pm 15,81 (40,00)	34,00 \pm 24,08 (20,00)	17,14 \pm 7,56 (20,00)

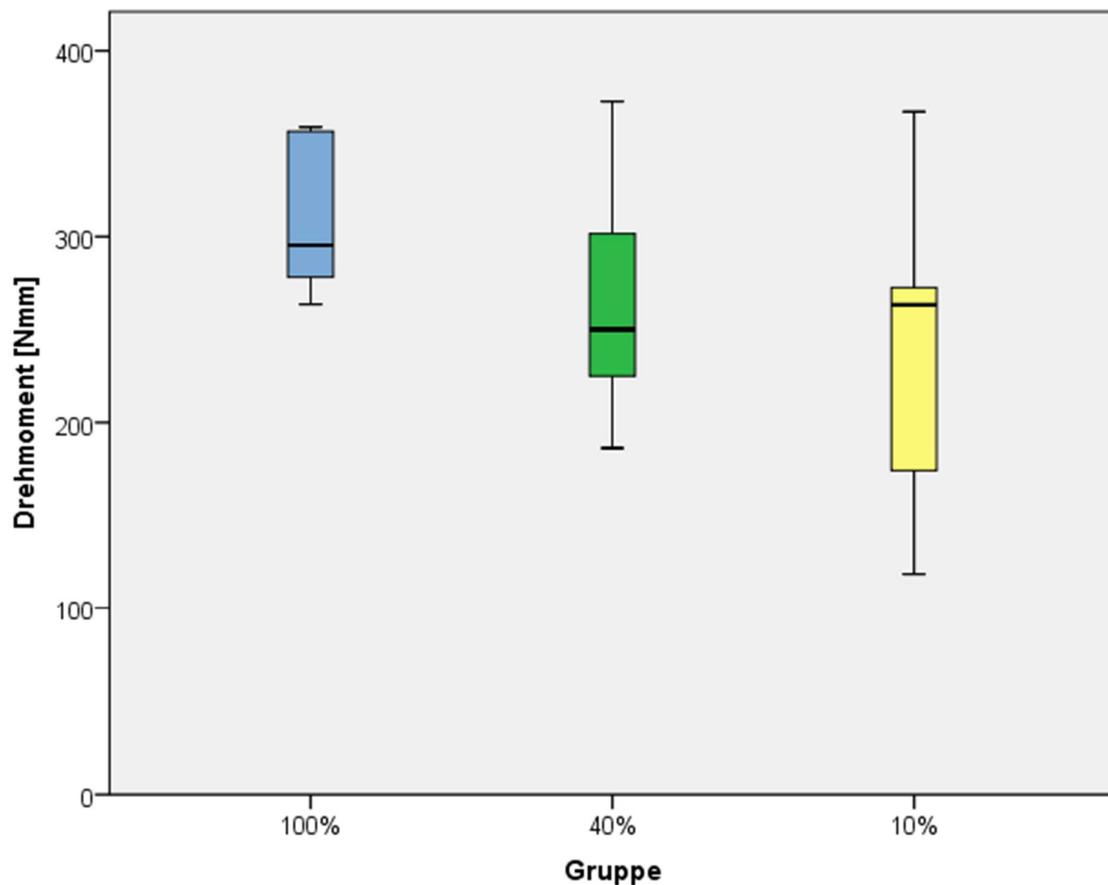


Abb. 34: Biomechanische *in vitro*-Testung der Versuchsgruppen an Tag 42 postoperativ. Im Gruppenvergleich ergaben sich keine Signifikanzen hinsichtlich des Drehmoments.

Hinsichtlich des maximalen Drehmoments wies die rigide Gruppe den größten Wert auf, gefolgt von der semi-rigiden Gruppe. Die flexible Gruppe hatte von allen drei Versuchsgruppen das kleinste Drehmoment (Tab. 10). Es ergaben sich keinerlei Signifikanzen zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 34). Das Drehmoment der Kontrollgruppe zeigte einen geringeren Wert als alle drei Versuchsgruppen. Die Gruppe der Kontralateralen zeigten den kleinsten Wert der Versuchsreihe (Tab. 10).

In Anbetracht der kleinen Gruppenstärke wurden zusätzlich die Medianwerte betrachtet, da diese Werte unempfindlicher gegenüber Extremwerten sind. Die rigide Gruppe wies erneut den größten Wert auf, allerdings zeigte hierbei die flexible Gruppe einen größeren Medianwert als die semi-rigide Gruppe. Die Kontrollgruppe hatte einen deutlich kleineren Mittelwert als die drei Versuchsgruppen, gefolgt von der Gruppe der Kontralateralen, die den kleinsten Medianwert aufwies (Tab. 10).

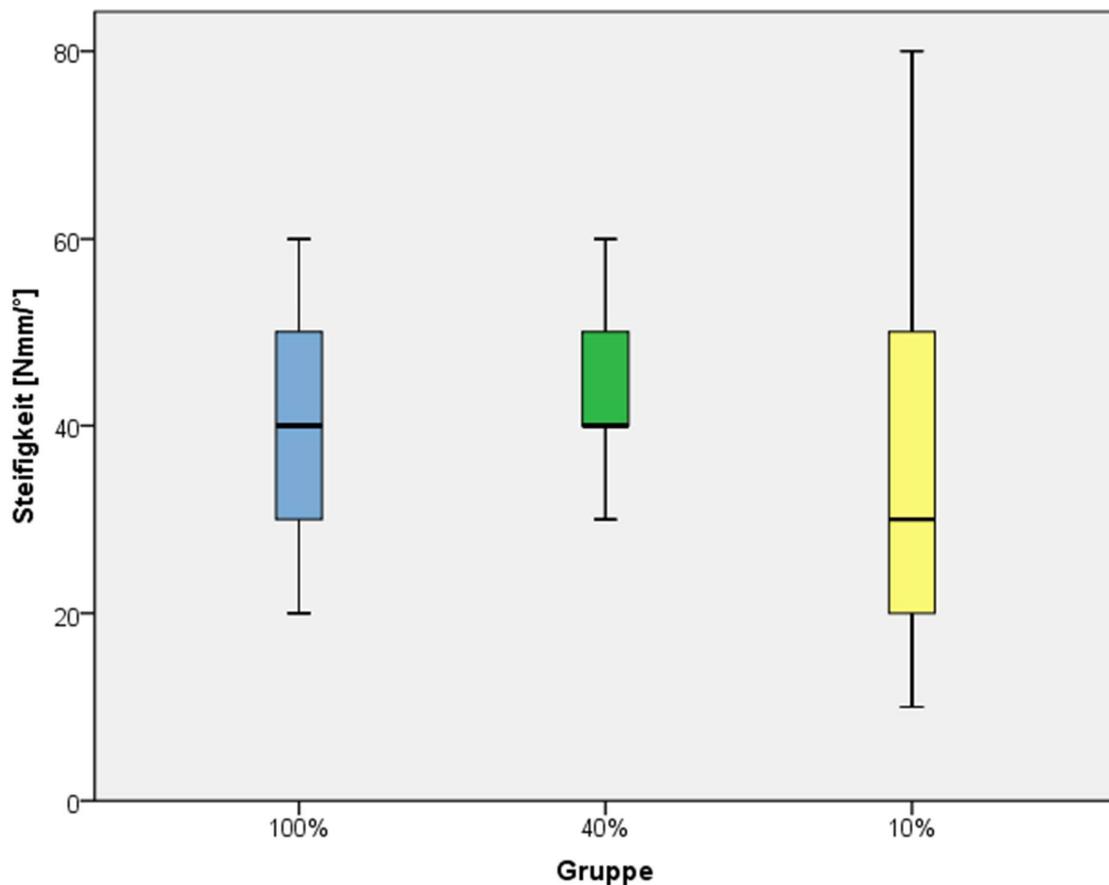


Abb. 35: Biomechanische *in vitro*-Testung der Versuchsgruppen an Tag 42 postoperativ. Bezüglich der Steifigkeit ergeben sich im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede.

Die semi-rigide Gruppe und die rigide Versuchsgruppe wiesen einen vergleichbaren Steifigkeitswert auf. Die flexible Gruppe lieferte einen minimal kleineren Wert der ermittelten Steifigkeit (Tab. 10). Bezüglich der Steifigkeit ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abb. 35). Auch die Kallussteifigkeiten der Kontrollgruppe wies einen geringen Wert auf. Die Gruppe der Kontralateralen lieferten die kleinste Steifigkeit der Versuchsreihe. Bei der Betrachtung der Medianwerte wiesen die rigiden und semi-rigiden Versuchsgruppe einen identischen Wert bezüglich der Steifigkeit auf (Tab. 10; Abb. 35). Die flexible Gruppe zeigte einen deutlich kleineren Steifigkeitswert, gefolgt von der Kontroll- und der Kontralateralen Gruppe, welche einen gleichen Medianwert aufwiesen (Tab. 10).

In der deskriptiven Analyse ließen sich vereinzelt Refrakturen im Bereich der Defektzone unter semi-rigider und rigider Fixation erkennen. Überwiegend war jedoch eine Schrägfraktur, die

auch intakten Knochen einschloss, beobachtbar. Hingegen erfolgte in der flexiblen Gruppe der Bruch beinahe ausschließlich in der Osteotomiezone.

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

4.4.1 Konventionelles Röntgen

Röntgenologisch zeigte sich an Tag 10 in allen Versuchsgruppen beginnende Knochenneubildung, jedoch keine knöcherne Überbrückung des Defektspalts. Nach 21 Tagen waren nun in allen Gruppen ein periostal und endostal ausgefüllter Osteotomiespalt darstellbar (Defektüberbrückung). Bemerkenswert war die enorme Menge an knöchernen Kallusgewebe der flexiblen Gruppe und die beginnende Wiederherstellung der Markhöhle bei zwei Versuchstieren der semi-rigiden Gruppe. Alle drei Versuchsgruppen waren an Tag 42 vollständig knöchern überbrückt. Während die semi-rigide Gruppe zu diesem Zeitpunkt bereits schärfer begrenzte Verschattungen mit Markhöhlenneubildung abbildeten, stellten sich die endostalen Verschattungen größtenteils wolkig dar. Die Kontrollgruppe war an Tag 42 überwiegend periostal überbrückt.

4.4.2 Mikrocomputertomographie (Mikro-CT)

Zeitverlauf

Bei Betrachtung des Zeitverlaufs der flexiblen Gruppe zeigte sich eine signifikante Zunahme des totalen (TV) und des mineralisierten Kallusvolumens (BV) sowie des Mineralgehalts (TMC) von Tag 10 zu Tag 21. Im Verlauf von Tag 21 zu Tag 42 nahmen BV und TMC weiterhin signifikant zu, während TV nur mäßig zunahm und keine Signifikanz mehr zeigte. Der Anstieg an BV, TMC und TV lassen eine stetige Knochenneubildung mit einem damit verbundenen großen Kallus vermuten, der sich in einem Zeitraum von 42 Tagen postoperativ ausbildete. An Tag 10 zeigten alle Versuchstiere der Gruppe eine moderate periostale Knochenneubildung, nachfolgend stellten sich drei von fünf Versuchstieren an Tag 21 als komplett periostal überbrückt dar, während die restlichen zwei Tiere zumindest zapfenartig periostal überbrückt erschienen. An Tag 42 zeigten alle fünf Versuchstiere der flexiblen Gruppe eine vergleichbare Entwicklung des Heilungsverlaufs, wobei sich der Defektspalt periostal und

endostal vollständig überbrückt darstellte (Abb. 33). Analog dazu nahm auch der Anteil von mineralisierten Kallusvolumen im totalen Kallusvolumen (BV/TV) signifikant zu. Die Ausnahme stellte die Dichte des mineralisierten Gewebes (TMD) dar. Hier war an Tag 10 ein größerer Wert als an Tag 21 zu verzeichnen, während TMD an Tag 42 höher als an Tag 10 und 21 war (Tab. 3).

In der semi-rigiden Gruppe zeigte sich an Tag 10 zu Tag 21 ebenfalls eine Zunahme von BV, TMC und TV, die jedoch nur für BV und TMC signifikant ausfiel (Tab. 4). Interessanterweise war die Zunahme von BV zu Tag 42 nur mäßig und nicht mehr signifikant, während TMC und TMD von Tag 21 zu Tag 42 signifikant zunahmen. Des Weiteren nahm das Gesamtkallusvolumen (TV) von Tag 21 zu Tag 42 ab. Alle sechs Versuchstiere zeigte an Tag 10 reichlich periostale Knochenneubildung, wobei drei der Tiere mit einer herausragenden Menge hervorstachen (Abb. 31). Daher überraschte es nicht, dass alle Scans der Mikro-CT-Analyse an Tag 21 periostal überbrückt waren. Auffällig war auch die beginnende Markhöhlenneubildung bei zwei Tieren, was sich durch einen spärlich gefüllten endostalen Defektspace darstellte (Abb. 32). An Tag 42 zeigte noch ein drittes Versuchstier eine neugebildete Markhöhle neben einer scharf abgegrenzte Kortikalisneubildung (Abb. 33), während die restlichen Tiere eine noch mäßig gefüllten endostalen Defektbereich aufwiesen. Insgesamt lassen die mäßige Zunahme an BV, die Abnahme an TV, der signifikante Anstieg an TMD und die Wiederherstellung der Markhöhle an Tag 42 eine Knochenreifung vermuten. Das statistische Analyse der rigiden Gruppe stellte ebenso eine signifikante Zunahme für BV und TMC von Tag 10 zu Tag 21 fest, während die Zunahme des Gesamtkallusvolumens (TV) nicht signifikant ausfiel. Zudem zeigte sich das Gesamtkallusvolumen an Tag 42 kleiner als an Tag 21. Allerdings nahmen BV, TMC und TMD an Tag 21 zu Tag 42 signifikant zu. An Tag 10 war deutlich periostale Knochenneubildung in allen Versuchstieren darstellbar, die sich zu Tag 21 noch verstärkte. So erstreckte sich an Tag 21 das Gesamtkallusvolumen der rigiden Gruppe auf den periostalen und endostalen Raum und überbrückte bei allen Tieren den Defektspace. Leichte Tendenzen zur Markhöhlenneubildung waren wiederum bei zwei Tieren erkennbar. Der Abfall der quantitativen Werte von TV (Tag 21 zu Tag 42) geht einher mit der fortschreitenden Neubildung der Markhöhle, welche in der deskriptiven Analyse an Tag 42 bei zwei Versuchstieren darstellbar war (Abb. 33). Die kombinierten Ergebnisse lassen eine Übergangssituation für die rigide Gruppe vermuten. Die signifikante Zunahme von BV und TMC zwischen Tag 21 und 42 deuten auf eine fortschreitende Knochenneubildung hin, während die signifikante Zunahme von TMD sowie der Abfall von TV auf bereits ablaufende

Remodellingprozesse schließen lassen, ebenso wie die im endostalen Defektbereich erkennbare Resorption (Wiederherstellung des Markraumes).

Die Kontrollgruppe, welche eine physiologische Heilung simulierte, zeigte eine Zunahme des mineralisierten Kallusvolumens (BV), mineralisierten Inhalts (TMC) sowie Gesamtkallusvolumens (TV). Der prozentuale Anteil von mineralisiertem Knochengewebe am Gesamtkallusvolumen (BV/TV) und die Dichte des mineralisierten Gewebes (TMD) nahmen interessanterweise von Tag 10 zu Tag 21 ab, erfuhren danach aber eine deutliche Zunahme zwischen Tag 21 und Tag 42 (Tab. 6). An Tag 10 stellten alle fünf Tiere der Kontrollgruppe mäßige endostale Knochenneubildung dar. Zwei Versuchstiere zeigten am folgenden Untersuchungszeitpunkt (Tag 21) eine endostale Überbrückung. An Tag 42 erzielten nur zwei Tiere der Kontrollgruppe eine vollständige knöcherne Überbrückung, während drei weitere endostal, aber nicht periostal überbrückt waren.

Gruppenvergleich

Zum 10-Tageszeitpunkt zeigte die semi-rigide Gruppe ein größeres Gesamtkallus- (TV) und Knochenvolumen (BV) sowie auch ein größeres TMC im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen, welche jedoch nicht signifikant waren. In der dreidimensionalen Darstellung lieferten daher alle drei Versuchsgruppen ein ähnliches Erscheinungsbild bezüglich der Initialheilung mit moderat periostaler Knochenneubildung, die jedoch in keiner Defektüberbrückung resultierte. Dennoch ließ die semi-rigiden Gruppe tendenziell den höchsten Grad an Mineralisation erkennen (Abb. 31). Auch der geringste Wert der flexiblen Gruppe bezüglich des Gesamtkallusvolumens spiegelte sich in der dreidimensionalen Darstellung des Heilungsverlaufs wider.

An Tag 21 zeigten sich gleichwertige TV-, BV- und TMC-Werte in den drei Versuchsgruppen. Zu diesem Zeitpunkt stellte sich der Kallus der flexiblen Gruppe unregelmäßig dar und war endostal mit verkalktem, mineralisiertem Kallusgewebe angereichert (Abb. 32). Interessanterweise zeigte sich im endostalen Defektbereich der semi-rigiden Gruppe wenig mineralisiertes Gewebe. In der rigiden Gruppe ließ sich ein ausgefüllter Defektbereich darstellen, der in einer endostalen und periostalen Überbrückung resultierte. Tendenzen einer beginnenden Resorption waren vereinzelt zu erkennen. Die semi-rigide und flexible Versuchsgruppen waren zu diesem Zeitpunkt ebenfalls knöchern überbrückt.

An Tag 42 zeigte die flexible Gruppe signifikant größere Werte für TV, BV, BV/TV und TMC, während die semi-rigide Gruppe diesbezüglich die kleinsten Werte aufwies. Dies machte sich durch einen mit mineralisiertem Knochengewebe gefüllten Defekt in der flexiblen Gruppe

deutlich, während die beiden steiferen Gruppen bereits Resorptionsvorgänge mit Wiederherstellung der Markhöhle erkennen ließen (Abb. 33). Bezüglich der Dichte des mineralisierten Gewebes (TMD), als Marker für die Knochenreifung, zeigte die semi-rigide Gruppe den größten Wert und die flexible Gruppe den kleinsten Wert, jedoch ohne Signifikanz. Die rigide Gruppe zeigte wie die semi-rigide Gruppe eine Abnahme des Gesamtkallusvolumens (TV) sowie geringere BV- und TMC-Werte als die flexible Gruppe, jedoch auch einen kleineren TMD-Wert als die semi-rigide Gruppe (Tab. 9).

4.4.3 Biomechanische *in vitro*-Testung

Hinsichtlich der Mittelwerte zeigte die semi-rigide Gruppe die nicht signifikant höchste Steifigkeit, lag aber bezüglich des maximalen Drehmoments zwischen der rigiden und flexiblen Gruppe. Diesbezüglich wies die rigide Gruppe das größte maximal aufgewendete Drehmoment bis zum Torsionsbruch der *Ossa femora* auf. Hingegen zeigte die flexible Gruppe tendenziell die geringste Steifigkeit und das kleinste maximale Drehmoment unter den Steifigkeitsgruppen, jedoch ohne Signifikanzen.

Bei Betrachtung der Medianwerte zeigten die rigide und semi-rigide Versuchsgruppe eine identische Steifigkeit, während die flexible Gruppe den geringsten Medianwert aufwies. Bezüglich des maximalen Drehmoments zeigte die rigide Versuchsgruppe den größten Wert, gefolgt von der flexiblen Gruppe. Die semi-rigide Gruppe zeigte das geringste maximale Drehmoment.

5 Diskussion

Derzeit zeigen ungefähr 10% aller Frakturen keinen physiologischen Heilungsverlauf (Garcia et al., 2013; Einhorn et al., 2015). Dass die mechanische Umgebung, welche durch die Stabilisationssteifigkeit bestimmt wird, entscheidend für den Heilungserfolg einer Knochenfraktur ist und dass BMP-2 einen positiven Effekt auf die Knochenheilung besitzt, sind bekannte Fakten (Willie et al., 2009; Histings et al., 2010; Nauth et al., 2011; Wildemann et al., 2011; Bartnikowski et al., 2017; Claes, 2017). Ebenso ist die Interaktion zwischen BMP- und Mechanotransduktionssignalwegen belegt (Kopf et al., 2012). Allerdings beeinträchtigt der klinische Gebrauch von supraphysiologischen Dosen an BMP-2 den Heilungsverlauf und bedeutet mögliche Nebenwirkungen für die zu behandelnden Patienten (Kan et al., 2011; Faßbender et al., 2014).

Aufgrund dessen untersuchte die vorliegende Arbeit auf Grundlage von mikrocomputertomographischen und biomechanischen Untersuchungen die Interaktion von biologischer (BMP-2) und mechanischen Stimulation (drei unterschiedliche externe Fixationssteifigkeiten) auf die Defektheilung im Pseudarthrosemodell der Ratte.

Um den kombinierten Effekt auf die Knochenheilung zu verstehen, erhielten alle Versuchstiere (Sprague Dawley Ratten) einen kritischen 5 mm-Defekt, welcher durch einen externen Fixateur stabilisiert wurde. Es wurden drei unterschiedliche Fixationssteifigkeiten verwendet (flexibel, semi-rigide und rigide). Additional erfolgte bei allen Versuchstieren die Einbringung eines mit 5 μ g BMP-2 beladenen Kollagenschwamms. Die Knochenheilung der einzelnen Versuchsgruppen wurde zu drei definierten Zeitpunkten (10, 21 und 42 Tage) mikrocomputertomographisch untereinander verglichen. Anschließend erfolgte ein biomechanischer Vergleich. Der Versuch wurde begleitet von einer rigide fixierten 1 mm-Kontrollgruppe, welche die physiologische Heilung darstellte. Aus Gründen des Tierschutzes wurde auf eine zusätzliche Negativkontrolle verzichtet, da anderen *in vivo* Studien bereits belegen, dass ein kritischer 5 mm-Defekt bei weiblichen Tieren in einer ausbleibenden Heilung resultiert (Metha et al., 2011; Schwarz & Wulsten et al., 2013).

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Wahl des Tiermodells

Grundsätzlich ist die Analyse des humanen Heilungsgeschehens anzustreben. Diese ist jedoch aus ethischen Gründen nur sehr eingeschränkt möglich. Zusätzlich schränken nicht einheitliche, beeinflussende Parameter, wie Alter, Geschlecht und eventuell vorhandene Erkrankungen, die Vergleichbarkeit stark ein. (Calori et al., 2011). Daher ist die Verwendung von geeigneten Tiermodellen stark in den Vordergrund der osteologischen Forschung getreten. Klare Vorteile der Tiermodelle liegen in ihrer Standardisierung (Ellinghaus et al., 2011). Jedoch müssen bei der Wahl des Modells speziesbedingte Unterschiede in Knochen und Heilungsprozess kritisch berücksichtigt werden (Reichert et al., 2009). Bezüglich der Knochenzusammensetzung sind der Hund und das Schwein von allen Versuchstieren dem Menschen am ähnlichsten, während die Ratte am stärksten abweicht (Aerssens et al., 1998). Der Hund ist dem Menschen auch in der Knochenstruktur am ähnlichsten. Seine Lamellenknochen bestehen überwiegend aus Sekundärosteonen, wohingegen das Schaf hauptsächlich Primärosteone besitzt und Kleinnager eher plexiforme Knochenstrukturen aufweisen. Jedoch besitzt der Hund eine sehr niedrige ethische Akzeptanz als Versuchstier (Peric et al., 2015). Trotz abweichender Knochenstruktur wird das Schaf häufig für Studien zur Frakturheilung herangezogen, da es eine vergleichbare Knochendimension und Heilungszeit aufweist (Eitel et al., 1981; Claes, 2017). Ihre Popularität in der Forschung verdanken die Kleinnager dem Umstand, dass sie in großer Zahl preiswert verfügbar und problemlos zu halten sind. Ihre Heilungszeit ist sehr kurz, was die Versuchskosten gering hält (Ellinghaus et al., 2011). Des Weiteren verlangt das deutsche Tierschutzgesetz die Wahl der Spezies mit den geringsten sensorischen Funktionen zur Beantwortung der wissenschaftlichen Fragestellung (TierSchG, 2017).

Im Rahmen dieser Studie wurde die Sprague Dawley Ratte als Versuchstier ausgewählt. Als am weitesten verbreitete Tierspezies, die im Forschungsgebiet der Knochenheilung eingesetzt wird (O' Loughlin et al., 2008), stellt das Rattenmodell sicher, dass gewonnene Erkenntnisse nachvollziehbar und in den wissenschaftlichen Kontext einordenbar sind. Das Modell der Ratte ist schon häufig in der Literatur zur Knochenheilung beschrieben worden und birgt damit Potential für bessere Prognosen klinischer Resultate (Peric et al., 2015). Das Rattenmodell besitzt eine hervorragende Aussagekraft über die Medikamentenwirksamkeit und Sicherheit für den Menschen. Die Knochenzellen (Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten) der Ratten

besitzen ähnliche Rezeptoren wie humane Knochenzellen. Daher reagieren diese auch auf eine Medikamentengabe analog zum menschlichen Knochen (Jee & Yao, 2001). Jedoch sollte beachtet werden, dass auch hier unterschiedliche, beeinflussende Parameter zum Tragen kommen können, welche die gewonnenen Erkenntnisse anderer Studien nicht in jeder Hinsicht vergleichbar machen.

Die häufig verwendeten Ratten-Subspezies Sprague Dawley und Wistar weisen eine leicht unterschiedliche Anatomie der Femora auf, was die Vergleichbarkeit von Studien mit andersartigen Subspezies limitiert (Jäger, Sager et al., 2005a).

Ferner wurden weibliche Sprague Dawley Ratten für die vorliegende Arbeit verwendet, da ein kritischer 5mm Defekt bei ihnen in einer ausbleibenden Heilung resultiert, während männliche Sprague Dawley Ratten dagegen eine verzögerte Heilung im gleichen Untersuchungszeitraum zeigten (Metha et al., 2011). Die Weibchen wurden im Rahmen dieser Arbeit für das reproduzierbare atrophische Pseudarthrosemodell verwendet.

Das biologische Alter bestimmt im Allgemeinen wesentliche Charakteristika der Knochenheilung, die bei juvenilen Tieren deutlich schneller abläuft als bei Adulten (Meyer et al., 2001; Histing et al., 2011). Zum Zeitpunkt der Operation waren die Versuchstiere im Durchschnitt 12 Wochen alt und waren ausgewachsen.

Grundsätzlich sollte jedoch beachtet werden, dass Tiere aufgrund anderer Knochenstruktur und -belastung, vielleicht aber auch aufgrund eines anderen postoperativen Verhaltens, bezüglich der Knochenheilung vom Menschen abweichen können (Ellinghaus et al., 2011) und die im Tierexperiment gewonnenen Erkenntnisse nicht gleichwertig auf die humane Situation übertragen werden können.

Die für diese Studie ausgewählten Versuchstiere entsprachen untereinander in Rasse, Alter, Geschlecht und Gewicht. Es erfolgte eine randomisierte Einteilung in die vier Versuchsgruppen (Flexibel, Semi-rigide, Rigide und Kontrollgruppe). Alle Tiere erfuhren dieselben prä- und postoperativen Haltungsbedingungen. Die Operationsmethode und die Standzeit der Tiere waren identisch. Somit konnte eine standardisierte Versuchsdurchführung bestmöglich gewährleistet werden. Lediglich die Steifigkeit des verwendeten Fixationssystems, die Größe des Osteotomiespaltes und die Behandlung mit BMP-2 variierten gemäß des geplanten Versuchsaufbaus (Tab. 1; Kontrollgruppe: 1mm Osteotomie, kein BMP-2).

Von 32 Versuchstieren gingen 21 Tiere in die Auswertung der Studie ein. Diese Ausfallquote wurde durch diverse Komplikationen verursacht. Ein Tier verstarb postoperativ aufgrund einer Hypoventilation. Nach einer Standzeit von einer Woche zeigten drei Versuchstiere infektiöse Druckstellen, welche durch die Ecken des Fixateurbalkens entstanden waren. Zur Vermeidung

unötiger Schmerzen schieden diese drei Tiere vorzeitig aus dem Versuch aus und wurden euthanasiert. Ein Tier verstarb spontan. Sechs weitere Versuchstiere schieden aufgrund zernagter Kunststoffbalken des Fixationssystems vorzeitig aus der Studie aus.

5.1.2 Operation

In Tiermodellen der Knochenheilung wird die Fraktur teilweise durch eine Osteotomie simuliert, da diese kontrollierter und somit auch standardisierter erzeugt werden kann (Ellinghaus et al., 2011). Die Osteotomie unterscheidet sich allerdings in vielerlei Hinsicht von einer Fraktur. Das im Rahmen der Studie durchgeführten Operationsverfahren ist ein etabliertes und vielfach erfolgreich durchgeführtes Verfahren (Metha et al., 2011; Schwarz & Wulsten et al., 2013). Es erfolgte die standardisierte, laterale Freilegung des linken *Os femoris* durch die stumpfe Präparation zwischen dem *Musculus gluteus superficialis* und dem *Musculus biceps femoris*. Selbst unter den schonenden Bedingungen der Operation erfährt das Weichteilgewebe nicht unerhebliche Irritationen, weshalb präventives Spülen mit isotonischer Kochsalzlösung während des Sägens das angrenzende Gewebe vor thermischen Schäden schützen sollte. Wie bereits erwähnt, spielen die Weichteilsituation und die Blutversorgung im Frakturbereich eine wichtige Rolle für die Knochenheilung (Claes et al., 2006; Schmidt-Bleek et al., 2012). Vor der Erzeugung der die Fraktur simulierenden Osteotomie erfolgte die Anbringung des Fixateurs externe. Die vorgefertigten Pinlöcher im Kunststoffbalken gewährleisteten ebenso eine standardisierte Anbringung wie die einheitlichen Pins und das standardisierte Vorgehen der Tierärztin. Mögliche Scherkräfte, die üblicherweise auf eine spontane Fraktur einwirken, wurden somit unterbunden. Nachfolgend wurde ein kritischer Knochendefekt (CSD) von fünf Millimetern Größe erzeugt, welcher aufgrund der Verwendung einer einheitlichen Sägeschablone und Säge als standardisiert gilt. Während die Frakturen nach einer Fraktur in der Regel eine raue Oberfläche aufweisen, stellen sich die gegenüberstehenden Knochenenden nach einer Osteotomie glatt und exakt parallel zueinander dar.

Wie vorab erwähnt, erfolgten die Operationen stets nach einem standardisierten Verfahren und wurden von der selben Tierärztin (Dr. med. vet. Tanja Schmidt) durchgeführt. Die Operationen der Versuchstiere verliefen größtenteils komplikationslos. Ein Versuchstier verstarb während der Aufwachphase aufgrund einer Hypoventilation.

Aufgrund der hohen Standardisierung und damit verbunden Reproduzierbarkeit, sowie der besseren Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext, wurde im Rahmen dieser Studie die Osteotomie einer mechanischen Fraktur vorgezogen.

5.1.3 Fixateur externe

Zur Stabilisierung des Osteotomiemodells wurde in dieser Arbeit ein unilateraler Fixateur externe (RatExFix) der Firma RISystem verwendet. Dieses Osteosynthesystems bietet eine gute biomechanische Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit (Glatt et al., 2014), zudem erlaubt es die Untersuchung der Knochenheilung unter mechanisch kontrollierter flexibler, semi-rigider und rigider Fixation (Claes et al., 2009; Willie et al., 2009). Des Weiteren stellt der Fixateur externe im Bereich der Veterinär- und Humanmedizin eine gebräuchliche Osteosynthesetechnik dar.

Die Verwendung eines externen Fixateurs bietet weitere deutliche Vorteile. Vorrangig im Rahmen dieser Arbeit ist die implantatfreie Defektzone zu nennen, die die Platzierung des mit BMP-2 beladenen Kollagenschwamms ermöglichte, was die Verwendung von Marknägeln grundsätzlich ausschließt. Folglich konnte neben der periostalen zusätzlich die endostale Knochenheilung analysiert werden.

Darüber hinaus wurde durch die Fokussierung auf radiologische Verlaufskontrollen in dieser Arbeit eine Fixierung benötigt, die keine Verfälschungen (Artefakte) durch das verwendete Material auf die ROI zuließ. Durch die Verwendung des Polyetheretherketon (PEEK) Verbindungsbalkens des RatExFix-Systems mit geringer Röntgendichte ließ sich dieses Vorhaben optimal umsetzen. Kritisch anzumerken sei, dass sechs Ratten den Kunststoffbalken zernagten und deshalb vorzeitig aus dem Versuch ausscheiden mussten. Dies war die Hauptursache für die erhebliche Ausfallquote während der Studie. RISystems reagierte auf diese Problematik mit der Entwicklung einer Leichtmetallabdeckung für die Verbindungselemente, die den Kunststoffbalken vor den Nagern während des Versuchs schützte.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Fixationsmodell ermöglichte eine redundante Reproduzierbarkeit bei allen Versuchstieren.

5.1.4 Mikrocomputertomographie (Mikro-CT)

Bei Untersuchungen zur Verlaufskontrolle der Knochenheilung stellt die radiologische Auswertung den aktuellen Goldstandard dar (Rohrbach et al., 2013). Diese Methode ist nicht destruktiv und erhält, im Gegensatz zur Histologie, die Knochenpräparate für weitere Untersuchungen (Bouxsein et al., 2010), hier im Speziellen für die biomechanische Testung.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Mikrocomputertomograph viva CT 40 (Scanco Medical AG, Brüttisellen, Schweiz) verwendet und diente der detaillierten, dreidimensionalen Darstellung der Kallusentwicklung, sowie des Grades der Osteotomieüberbrückung im zeitlichen Verlauf. Die im Rahmen der *in vivo*-Untersuchung angewandte Einzelschnittdicke betrug 35 μm , da eine höhere Auflösung die Narkosedauer der Tiere verlängert hätte.

Als VOI wurden standardisiert 212 Slices ($\sim 7400 \mu\text{m}$) definiert, die den gesamten Defektspace inkludierten. Dies bot die Möglichkeit, die gesamte Kallusstruktur dreidimensional zu erfassen und nach unterschiedlichen Ansätzen zu analysieren.

Mikro-CT-Untersuchungen in experimentellen Kleintiermodellen sind prinzipiell gut etabliert, jedoch gibt es bestimmte Punkte, die einer kritischen Diskussion bedürfen. An erster Stelle steht das nicht einheitliche Verfahren der Grenzwertbestimmung (Thresholding) (Chang et al., 2013). Zur Bestimmung des Grenzwertes sind mehrere Verfahren in der Fachliteratur beschrieben (Müller et al., 1998; Burghardt et al., 2007; Buie et al., 2007; Freeman et al., 2009). Das am Häufigsten genutzte Verfahren stellt die Anwendung eines sogenannten „fixed global threshold“ dar. Hierbei wird ein einziger, zuvor ermittelter Grenzwert für sämtliche Messungen genutzt (Müller et al., 1997). Im Hinblick auf die Vergleichbarkeit mit anderen Studien sollte beachtet werden, dass unterschiedliche Arbeiten individuelle Grenzwerte verwenden, was als nachteilig bezüglich der Übereinstimmung der erhobenen Ergebnisse bewertet werden kann.

Die für die Auswertung notwendige manuelle Konturierung (Freihandbearbeitung) der Kallus- und Kortikalisstrukturen stellt eine zusätzliche mögliche Fehlerquelle und Einschränkung der Vergleichbarkeit dar. Wie unter Material und Methoden beschrieben, wurde zunächst manuell, teilweise computerassistent, für jeden Scan die äußere Kallus- und innere Knochenkontur begrenzt. Die VOI jedes Scans umfasste 212 Schnittbilder. Hierbei sind individuelle Interpretationen der Strukturen und dadurch eventuell abweichend eingezeichnete Konturen nicht auszuschließen. Um subjektive Abweichungen innerhalb des Projekts zu minimieren, wurden die Mikro-CT-Datenerhebung ausschließlich von der Verfasserin der vorliegenden Arbeit vorgenommen.

Zusammenfassend stellt die Mikrocomputertomographanalyse der Knochenheilung im zeitlichen Verlauf die priorisierte Methodik dar. Allerdings sind die erhobenen Ergebnisse stark von der Verfahrenstechnik und der auswertenden Person abhängig, welches beim Vergleich von Studienergebnissen generell berücksichtigt werden sollte.

5.1.5 Biomechanische Testung

Um Aussagen über die Qualität, die mechanischen Eigenschaften sowie die Belastungsgrenzen von Knochen zu erhalten, sind biomechanische Testverfahren seit geraumer Zeit das Mittel der Wahl (Sharir et al., 2008). Die mechanischen Eigenschaften sind abhängig vom verwendeten Material sowie der Morphologie und Geometrie der zu testenden Probe (Radasch, 1999). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine standardisierte Einbettung, wie unter Material und Methoden beschrieben, geachtet. Der angebrachte Steg sicherte die standardisierte Einhaltung der freien Knochenlänge zwischen den Einbettungstöpfchen. Die Fixierung der Knochen mittels Kunststoff (Technovit® Universal Liquid, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) in den Metallstöpfchen gewährleistet eine direkte Kraftübertragung der Prüfmaschine auf die Knochenprobe.

Weitere Einflussfaktoren auf die mechanischen Eigenschaften stellen das Geschlecht und Alter des Tieres, Knochentyp, die anatomische Lage und die Testbedingungen dar (Turner et al., 1993). Alle für diese Arbeit ausgewählten Versuchstiere entsprachen hinsichtlich dieser Parameter gleichwertigen Bedingungen.

Wie bereits erwähnt, wurden in der vorliegenden Arbeit die Knochenproben in Paraformaldehyd (4%) fixiert um eine postmortale Gewebsautolyse zu reduzieren. Dabei handelt es sich um ein gängiges Verfahren um die histologischen Eigenschaften des Knochens zu bewahren. Bereits in einer früheren Studie wurde belegt, dass diese Form der Fixierung keinen signifikanten Einfluss auf die Messwerte hat (Edmondston et al., 1994). Zur längerfristigen Konservierung hat sich das Einfrieren der Präparate als beste Option erwiesen. Mehrere Autoren fanden keine Beeinträchtigung der Torsionsstärke zwischen einer Temperaturspanne von -20 °C bis -196 °C (Komender, 1976; Pelker et al., 1983, 1984; Turner et al., 1993). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Knochen bei -80 °C konserviert.

Laut Turner und Kollegen (1993) sollte die biomechanische Testung der Knochen idealerweise bei 37 °C durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Präparate bei Raumtemperatur getestet. Eventuelle Veränderungen sind allerdings vernachlässigbar (Turner et al., 1993).

Knochen stellt ein erstaunlich stabiles Gewebe dar, welches den physiologischen Belastungen problemlos standhält. In Abhängigkeit der Knochenstärke und der Biegesteifigkeit, ist Knochengewebe befähigt bis zu einem gewissen Maß einwirkende Kräfte zu absorbieren (Rüter et al., 1999). Wird die Festigkeit des Materials durch eine einmalige, belastungsinduzierte Spannung im Knochen überschritten, erfolgt ein Bruch des Knochens. Knochengewebe kann

außerdem unter zyklischer Belastung frequenzabhängig ermüden und brechen (Autefage, 2000). Im Rahmen der vorliegenden Versuchsanordnung wurde durch die Torsionsmaschine eine kontinuierlich steigende Belastung bis zum Knochenbruch ausgeübt. Die Torsionstestung wurde am ElectroForce® TestBench System (BOSE GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland) durchgeführt.

Der Biomechanische Torsionstest eignet sich besonders um die Stärke eines kompletten Nagetierknochens zu eruieren (Turner et al., 1993) und ermöglicht mit hoher Zuverlässigkeit standardisierte biomechanische Belastungen (Fuchs et al., 2000). Die Belastung verteilt sich hierbei auf den gesamten Knochen, sodass der Bruch an der real schwächsten Stelle der Knochenprobe erfolgt. Biegetests führen hingegen bei Kleintierknochen, wie denen der Ratte, häufig zu verfälschten Ergebnissen (Fuchs et al., 2000). Dennoch sollte berücksichtigt werden, dass lange Röhrenknochen gegenüber Torsionskräften weniger widerstandsfähig sind, als gegen Biegekräfte. Während eine Biegefraktur einen höheren Kraftaufwand erfordert, reichen geringere Drehmomente, um einen Torsionsbruch zu induzieren (Miyasaka et al., 1991).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein isolierter Knochen ohne Weichteilgewebe verwendet. Duda und Kollegen (2000) postulierten, dass eine vollständige Entfernung des Weichteilmantels die Steifigkeitswerte um durchschnittlich 20 Prozent reduzieren (Duda et al., 2000), jedoch stellt die Untersuchung isolierter Knochen ohne Weichteilgewebe den gängigen Standard in der biomechanischen Testung dar.

Generell gibt es trotz der großen Anzahl tierexperimenteller Studien zur Frakturheilung nur wenige Studien, die biomechanisch gut charakterisiert sind. Vergleichbare Studien zu finden und allgemeine Schlussfolgerungen aus ihnen zu ziehen gestaltet sich schwierig, da sie sich durch die verwendete Spezies (Schaf, Hund, Kaninchen, Ratte und Maus), die Frakturmodelle (Frakturen, Osteotomien, Quer- und Schrägfrakturen, Frakturspaltbreite, Heilungszeitpunkte, Steifigkeiten der Stabilisierung, applizierte interfragmentäre Bewegung und angewendete Auswerteparameter) unterscheiden (Claes, 2017).

5.2 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, die kombinierte Stimulation durch variierende mechanische Rahmenbedingungen und gleichbleibender BMP-2-Menge auf die Defektheilung zu erforschen, um minimale Mengen des biologischen Stimulus (BMP-2) für maximale Heilungserfolge zu nutzen.

Die eingangs formulierte Hypothese, dass die BMP-2 stimulierte Defektheilung mechano-sensitiv sei, weshalb eine Fixation des Defekts unter einer semi-rigiden Steifigkeit zu einer früheren und qualitativ besseren Knochenheilung (knöcherne Defektüberbrückung) führt als eine rigide oder flexible Fixation, konnte für Tag 10 des Heilungsverlaufs nicht eindeutig bestätigt werden. Zwar zeigte die semi-rigide Gruppe tendenziell einen höheren Grad an Mineralisation, jedoch ergab die deskriptive Mikro-CT-Analyse grundsätzlich ein eher vergleichbares Erscheinungsbild der Initialphase in allen drei Steifigkeitsgruppen mit moderat periostaler Knochenneubildung, die jedoch in keiner Defektüberbrückung resultierte. Die quantitativ größeren BV- und TV-Werte der semi-rigiden Gruppe sowie das kleinste Gesamtkallusvolumen (TV) der flexiblen Gruppe waren ebenfalls nicht signifikant. Dagegen stellten Boerckel und Kollegen (2011b) in einem kritischen Femur-Defektmodell (8 mm) der Ratte unter Anwendung von 2, 5 µg BMP-2 an Tag 14 signifikant weniger Knochenneubildung unter flexibler Fixation fest. Dies korrelierte mit einem ebenfalls signifikant kleineren BV-Wert in der flexiblen Gruppe. Sie brachten die verzögerte Knochenneubildung mit einem reduzierten Blutgefäßvolumen in Zusammenhang, welches aus den frühen interfragmentären Bewegungen (IFM) der flexiblen Fixationsplatte resultierte (Boerckel et al., 2011b). Die Unterschiede lassen sich mit der unterschiedlichen Defektgröße und Osteosyntheseform, respektive mit größeren IFM sowie einer niedrigeren BMP-2-Konzentration begründen.

Auch an Tag 21 ließ sich die Hypothese nicht einwandfrei belegen. Zwar waren zu diesem Zeitpunkt alle Versuchstiere der drei Steifigkeitsgruppen knöchern überbrückt, jedoch zeigten sich erste Unterschiede im Heilungsverlauf. Der endostale Defektraum zweier Versuchstiere der semi-rigiden Gruppe stellte sich mit beginnenden Resorptionsprozessen dar, während die Restlichen sowie die flexible und rigide Versuchsgruppe einen überwiegend gefüllten Defektbereich zeigten. Als Ausdruck der beginnenden Knochenreifung wiesen alle Gruppen eine Zunahme der TV-, BV- und TMC-Werte gegenüber Tag 10 auf. Die Versuchsgruppen erzielten in allen Parametern vergleichbare Ergebnisse, die erneut ohne Signifikanz waren. Deskriptiv zeigte die flexible Gruppe eine verzögert einsetzende Heilung gegenüber den beiden steiferen Gruppen.

Vergleichbare Ergebnisse waren bei Fassbender und Kollegen (2014) darstellbar. Sie verglichen das osteoinduktive Potential zweier demineralisierter Matrices im kritischen Defektmodell (4 mm) der Ratte, ein BMP-2 beladener Kollagenschwamm (5 µg) diente als Kontrollgruppe. Nach 21 Tagen zeigte nur die BMP-2 beladene Gruppe eine vollständige knöcherne Überbrückung (Fassbender et al., 2014).

Ursächlich für die verzögerte Heilung der flexiblen Gruppe sind wohl erneut die verstärkten interfragmentären Bewegungen zu nennen. Auch in anderen experimentellen *in vivo* Studien am Rattenmodell zeigten sich bei den Tieren mit geringerer Rigidität, induziert durch stärkere interfragmentäre Bewegung (IFM), eine ausgeprägte enchondrale Ossifikation und verspätete Knochenbildung und letztendlich eine verzögerte vollständige Überbrückung des Defektspaltes (Mark et al., 2004). Über verzögerte Heilung aufgrund einer verlängerten chondralen Phase wurde auch im mechanisch instabilen Schafmodell berichtet, während rigide Fixationsbedingungen (minimale IFM) einen beschleunigten Heilungsverlauf unter Bildung eines kleinen, aber früh mineralisierten Kallus zeigten, ergo durch eine verkürzte chondrale Phase und geringer Bindegewebsbildung (Lienau et al., 2005; Epari et al., 2006).

An Tag 42 konnte die Heilungsverzögerung der flexiblen Gruppe letztendlich durch signifikant größere Werte für TV, BV, BV/TV und TMC bestätigt werden. Diesbezüglich zeigte sich ein mit mineralisiertem Knochengewebe gefüllter Defekt in der flexiblen Gruppe, während die beiden steiferen Gruppen bereits Remodellingprozesse mit Wiederherstellung der Markhöhle erkennen ließen. Die rigide Gruppe lieferte jedoch einen nicht signifikant kleineren TMD-Wert als die semi-rigide Gruppe, weshalb sich hier ein tendenziell verzögerter Reifungsprozess vermuten lässt. Knochen ist ein sehr dynamisches Gewebe, welches ständigen Auf- und Abbauprozessen unterworfen ist. Remodelling ist daher auch ein Bestandteil der erfolgreichen Knochenheilung unter optimaler Stabilisation. Zu steife Osteosynthesesysteme mit reduzierten oder ausbleibenden interfragmentären Bewegungen resultieren in einer suboptimalen Knochenregeneration (Loi et al., 2016). Daher stellen die reduzierten interfragmentären Bewegungen unter der maximalen Steifigkeit eine denkbare Möglichkeit für die Reifungsverzögerung der rigiden Gruppe dar.

Eine tendenziell frühere Knochenbildung und Reifung des mineralisierten Gewebes in der semi-rigiden Steifigkeitsgruppe lassen einen besseren Heilungsverlauf für die semi-rigide Fixierung eines kritischen Defekts bei BMP-2-Anwendung vermuten. Glatt und Kollegen (2016) erzielten unter Verwendung des gleichen Fixationssystems (RISystems, 100%, 70%, 40%, 10% Steifigkeit) und 5,5 µg BMP-2 im kritischen Defektspalt (5 mm) der Ratte ein besseres Heilungsergebnis unter 70% Steifigkeit (Glatt et al., 2016), während in der

vorliegenden Arbeit die weiblichen Tiere mit 40% Steifigkeit (semi-rigide Gruppe) die besten Resultate erzielten. Mögliche Ursachen für die abweichenden Ergebnisse könnten der späte Untersuchungszeitpunkt von acht Wochen und dem verwendeten Geschlecht der Versuchstiere geschuldet sein, da die männlichen Sprague Dawley-Ratten in der Glatt-Studie ein höheres Gewicht hatten. Zum einen heilen Knochendefekte bei männlichen Ratten besser als bei weiblichen Tieren (Metha et al., 2011) und zum anderen ist das RatExFix-System auf schwerere männliche Tiere ausgelegt (Glatt et al., 2012). Hieraus resultierte wahrscheinlich eine vergleichbare Steifigkeit des Systems und somit eine analoge interfragmentäre Bewegung (IFM) zwischen den Defektenden in den leichten, weiblichen Versuchstieren der vorliegenden Arbeit und den schwereren, männlichen Tieren der Glatt-Studie. Womöglich liegt daher die optimale Fixationssteifigkeit, in Abhängigkeit des Gewichts der Versuchstiere, zwischen den angewandten 40% und 70%, welches in weiteren Studien zu klären wäre.

Solange eine knöcherne Kallusbildung die interfragmentären Bewegungen und Dehnungen nicht ausreichend reduzieren konnte, ist zu vermuten, dass durch die Kombination aus kritischem Defektspalt und flexibler Fixation die stärksten mechanischen Einflüsse in der flexiblen Gruppe herrschten. Hieraus resultierte vermutlich eine anfänglich gestörte Matrixbildung, welche nachfolgend in einer Heilungsverzögerung resultierte. Diese Vermutung korrelierte mit dem größten Expressionsanstieg des Gens Kollagen Typ I zwischen Tag 3 und Tag 7 in der flexiblen Gruppe (Schwarz & Ott et al., 2018). Kollagen I ist das strukturegebende extrazelluläre Protein des Knochengewebes und verhilft der Wunde möglichst schnell an Zugfestigkeit zu gewinnen. Es ist daher anzunehmen, dass die flexible Gruppe sehr viel Kollagen Typ I synthetisieren musste, da es durch die starken interfragmentären Bewegungen zu einer wiederholten Ruptur der Kollagenmatrix kam. Zusätzlich bedingen starke interfragmentären Bewegungen während der frühen Phase der Kallusbildung eine Ruptur von Kapillaren, resultierend in einer erniedrigten Sauerstoffspannung (Claes et al., 2002) sowie einem Mangel an Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und Stammzellen, die sich nachfolgend in knochenbildende Osteoblasten differenzieren (Stegen & van Gastel et al., 2015; Claes, 2017). So bringen auch Boerckel und Kollegen die verzögerte Knochenbildung in Zusammenhang mit der frühen mechanischen Beanspruchung des Gewebes, aufgrund dessen das Einsprießen von Gefäßen verhindert wird. Ein kritischer *Os femoris*-Defekt (8mm) im Modell der Ratte wurde unter Anwendung von BMP-2 (0,5 oder 2,5 µg) mit einer rigiden, flexiblen und gelockerten Fixationsplatte versorgt und per Mikro-CT ausgewertet. Selbst unter der höheren Dosis an BMP-2 resultierten die frühen IFMs in signifikant weniger Blutgefäßvolumen und Konnektivität sowie reduzierter Knochenformation (Boerckel et al., 2011b). Daher erstaunt die

enorme Kallusmenge der flexiblen Steifigkeitsgruppe an Tag 21 und der Umstand, dass diese Gruppe den kritischen Defektspalt überbrücken konnte. Wie vorab erwähnt, beginnt die intramembranöse Knochenheilung nicht im endostalen kortikalen Defektspalt, sondern am Periost in einiger Entfernung zum Spalt. Dieser Reparaturprozess ist weitgehend unabhängig von den interfragmentären Bewegungen. Danach erfolgt die Bildung von hyalinem Knorpel, der an Durchmesser zunimmt und zunehmend verkalkt. Dadurch wird die interfragmentäre Bewegung zunehmend reduziert, da der Kallus deutlich mehr Kräfte aufnehmen kann und zusätzlich die Osteosynthese stabilisiert (Claes, 2017). Zusätzlich sind flexible Fixationssysteme charakterisiert durch die Ausbildung eines sehr großen Kallus (Epari et al., 2013). Vermutlich gelang der flexiblen Gruppe durch die erhöhte Kallusmenge eine periphere knöcherne Überbrückung der Osteotomieenden, somit die Abnahme der interfragmentären Bewegungen und ein verzögerter Start in die fortlaufenden Phasen der Knochenheilung. Es ist zu vermuten, dass dieser Effekt zusätzlich durch die BMP-2-Behandlung gestützt wurde, da BMP-2 als besonders effektiver osteoinduktiver Wachstumsfaktor gilt (Kolambkar et al., 2011; Wildemann et al., 2011), dessen stimulierende Wirkung auf die Knochenheilung in diversen präklinischen und klinischen Studien demonstriert wurden (Einhorn et al., 2003; Jones et al. 2006; Schwarz & Wulsten et al., 2013). Genetisch veränderten Mäusen, die kein BMP-2 bilden können, fehlte die Fähigkeit zur erfolgreichen Frakturheilung, obwohl BMP-4 und BMP-7 in den BMP-2 defizienten Mäusen vorhanden war (Tsuji et al., 2006). Zudem berichteten Schwarz und Kollegen, dass mechanische Stimulierung ohne BMP-2 die Knochenheilung im kritischen Defektmodell (5mm) der Ratte nicht fördert (Schwarz & Wulsten et al., 2013).

Die Hypothese, dass es unter BMP-2-Anwendung und semi-rigiden Steifigkeit zu einer qualitativ besseren Knochenheilung kommt, konnte nicht eindeutig mittels biomechanischer *in vitro* Testung bestätigt werden. Zwar zeigte die semi-rigide Gruppe bei der Torsionstestung die nicht signifikant höchste Steifigkeit, lag aber bezüglich des maximalen Drehmoments zwischen der rigiden und flexiblen Gruppe. Hingegen zeigte die flexible Gruppe tendenziell die geringste Steifigkeit und das kleinste maximale Drehmoment unter den Steifigkeitsgruppen, jedoch ohne Signifikanzen. Dies könnte durch die verzögerte Knochenneubildung erklärt werden, die mittels Mikro-CT detektierbar war. Zur Bestätigung dieser Vermutung wäre eine histologische Untersuchung erforderlich gewesen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht stattfand. Für weitere Studien wäre daher eine stützende Histologie an den späten Untersuchungszeitpunkten empfehlenswert. Recknagel und Kollegen (2011) verglichen die Steifigkeit eines intakten Femurs der Ratte mit der Steifigkeit eines Kallus unter rigider und flexibler Fixation nach 35

Tagen Heilungsdauer. Der unter rigider Fixation mit Geflechtknochen gefüllte Defekt zeigte 100% der Steifigkeit des intakten Knochens, während die flexible Fixation noch Knorpelareale im Frakturspalt auswies und nur 25% der Steifigkeit des intakten Knochens aufwies (Recknagel et al., 2011). Die Vergleichbarkeit der Studie ist limitiert aufgrund der abweichenden Heilungsdauer, unterschiedlicher Defektgröße (1mm vs. 5mm) und des fehlenden Wachstumsfaktors (BMP-2). Dennoch zeigten auch die Recknagel-Studie die Heilungsverzögerung und reduzierte Steifigkeit des Regeneratgewebes von flexiblen Gruppen auf.

Die Steifigkeit gibt die Qualität des gesamten Kallus an, während das maximale Drehmoment die Qualität des schwächsten Punkts beschreibt (Kaspar et al., 2007). Als Messgröße der Materialeigenschaften werden die Torsionssteifigkeit und das maximale Drehmoment in diversen experimentellen Studien zur Knochenheilung herangezogen (Leppänen et al., 2008; Wang et al., 2017). Die bei der biomechanischen Testung entstandene Fraktur lässt je nach Lokalisation Rückschlüsse auf den jeweiligen Heilungsgrad des Knochens zu und wird in vier Stadien eingeteilt. Das erste Stadium ist gekennzeichnet durch das Versagen innerhalb der Defektzone, sowie durch einen Kallus mit geringer Steifigkeit und großer Verformbarkeit. Im zweiten Stadium findet das Versagen ebenfalls in der Zone des Defektpaltes statt, allerdings erhöht sich die Steifigkeit des Kallusgewebes und die Verformbarkeit bis zum Knochenbruch nimmt deutlich ab. Während des dritten Stadiums entspricht die Steifigkeit des Gewebes dem des zweiten Stadiums, jedoch steigt das maximale Drehmoment an. Es tritt ein Knochenversagen auf, das neben der Defektzone auch intakten Knochen einschließt. Das vierte Stadium präsentiert sich mit einer erheblichen Steigerung des Torsionsmoments und der Steifigkeit des Knochens, sowie eines Versagens des Gewebes außerhalb der Defektzone (White et al., 1977).

Unter semi-rigider und rigider Fixation erfolgte die Refraktur vereinzelt im Bereich der Defektzone. Überwiegend war jedoch eine Schrägfraktur, die auch intakten Knochen einschloss, beobachtbar. Die Proben entsprachen demnach vornehmlich dem dritten Stadium der Knochenheilung.

In der flexiblen Gruppe erfolgte der Bruch beinahe ausschließlich in der Osteotomiezone, welches dem zweiten Stadium des Heilungsgrades gleichkam.

In allen BMP-2 behandelten Gruppen hatte noch keine vollständige Mineralisation des Gewebes stattgefunden, die der biomechanischen Krafeinwirkung standhalten können. Eine längere Standzeit hätte womöglich andere Ergebnisse ergeben. Es bleibt jedoch zu

bedenken, dass die Pinlöcher des Fixateurs durchaus den schwächsten Punkt des Knochens darstellen können (Kaspar et al., 2007), woraus die Schrägfrakturen resultieren könnten.

Die quantitativen Daten zeigte in allen drei Versuchsgruppen ein höheres maximales Drehmoment als in der kontralateralen Gruppe. Diese höheren Torsionswerte, gegenüber den intakten Knochen können als ein Indiz für die Ausbildung einer Neo-Kortikalis, respektive für die Erhöhung der Stabilität gewertet werden. Die sogenannte Neo-Kortikalis beschreibt eine Besonderheit der kleinen Nagetiere während der Frakturheilung. Diese wird periostal um die ursprüngliche Kortikalis ausgebildet. Zwischen der Ursprungs- und Neo-Kortikalis befindet sich trabekulärer Knochen mit dazwischenliegendem Knochenmark. Die Neo-Kortikalis ist als Versuch des Knochens zu werten, im Rahmen der Heilung durch die Erhöhung des Knochendurchmessers seine Stabilität zu erhöhen (Ellinghaus et al., 2011).

In Summe konnte aus biomechanischer Sicht die Knochenheilung unter flexibler Fixation annähernd gleichwertig gute Ergebnisse erzielen, wie die Heilung unter semi-rigider und rigider Fixation. Dies war nicht unbedingt erwartungsgemäß, da die mikrocomputertomographische Auswertung, gestützt durch die frühen histologischen Ergebnisse, große qualitative Divergenzen zwischen der Kallusreifung der flexiblen und der beiden rigiden Gruppen ergaben. Dennoch zeigten sich auch in anderen Studien ähnliche Ergebnisse. Sowohl Schell und Kollegen als auch Epari und Mitarbeiter stellten am Schafmodell gleichwertige biomechanische Qualitäten im Vergleich einer rigiden Fixierung zu einer flexibleren Variante fest (Epari et al., 2006; Schell et al., 2006).

Kritisch anzumerken sei die Gruppengröße der vorliegenden Arbeit. Leppänen und Mitarbeiter kamen zu dem Schluss, dass die derzeit durchschnittlich 11 ± 5 Tiere pro Gruppe nicht ausreichen, um statistisch signifikante Ergebnisse einer biomechanischen Testung zu erhalten (Leppänen et al., 2008). In dieser Studie befanden sich zwischen fünf und sieben Tiere in den Gruppen. Es bleibt daher zu klären, ob größere Versuchsgruppen statistisch signifikante Werte erbracht hätten.

In präklinischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass geringere BMP-Dosen vergleichbare Knochenheilungsergebnisse wie die Verwendung von höheren Dosen zeigen (Cook et al., 1994; Wildemann et al., 2011; Cipitria et al., 2013; Faßbender et al., 2014; Schmidt-Bleek & Willie et al., 2016). Diesbezüglich beschrieben Schmidt-Bleek und Kollegen (2016), dass ein mit 5 µg, ebenso wie ein 50 µg rhBMP-2 beladener Kollagenschwamm, in einem Untersuchungszeitraum von sechs Wochen, zu einer kompletten Überbrückung eines kritischen Knochendefekts (5 mm) im Rattenmodell führte (Schmidt-Bleek & Willie et al., 2016). Als Trägermaterial für die lokale Platzierung des Stimulus wurde, wie auch in der

vorliegenden Arbeit, ein absorbierbarer Kollagenschwamm (Lyostypt®, B.Braun Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) verwendet. Dieses Trägersystem findet bereits breite klinische Anwendung bei der Behandlung von offenen Tibiafrakturen und zur Wirbelfusion (Garrison et al., 2010; Govender et al., 2002; Burkus et al., 2002). Dennoch ist das Material allgemein aufgrund allergischer Reaktionen mit Antikörperbildung gegen das Kollagen umstritten (Schmidt-Bleek & Willie et al., 2016). Des Weiteren besitzt der Kollagenschwamm vermutlich eine diskontinuierliche Freisetzungskinetik, die durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird (Sørensen et al., 1990). Aufgrund schneller Proteindegradation, früher Diffusion und Absorption von Einzeldosen benötigt es zusätzlich hohe Dosen an BMP-2, welches ihn eng mit vorab genannten Komplikationen verbindet (Faßbender et al., 2014; Schmidt-Bleek & Willie et al., 2016). Zur Optimierung des Konzentrationsverhältnisses wird seit einiger Zeit Poly(D,L-Lactid-Säure) (PDLLA) standardmäßig zur Beschichtung von Hüftkopfdoprothesen und anderen Osteosynthesematerialien klinisch angewendet (Raschke et al., 2004). PDLLA beschichtete Implantate bewirken eine prolongierte Freisetzungskinetik und erzielen dadurch, trotz niedrigerer BMP-2-Konzentration, gleichwertige Ergebnisse wie eine einmalige höhere Anfangskonzentration an BMP-2 (Faßbender et al., 2014). Faßbender und Kollegen (2014) verglichen hierbei die Ergebnisse ihres Tibia-Defektmodells der Ratte unter anhaltender BMP-2-Freisetzung (42 Tage) mit einer vorangegangenen Studie des gleichen Tiermodells, aber einer initialen Freisetzung von 50% der BMP-2-Gesamtdosis (Wildemann et al., 2011). Während in der Studie von Wildemann und Kollegen (2011) innerhalb von 42 Tagen 40 µg BMP-2 freigesetzt wurden, belief sich die Gesamtdosis von Faßbender und Kollegen (2014) auf nur 1 µg. Dennoch zeigten beide Studien ähnliche Endresultate bezüglich der Knochenheilung (Faßbender et al., 2014). Einen anderen Ansatz verfolgten Betz und Kollegen (2007). Sie arbeiteten mit unterschiedlichen Applikationszeitpunkten von BMP um deren Effekt auf die Knochenheilung eines 5 mm Defekts zu untersuchen. Tiere, die eine adenovirale BMP-2 Vektor-Injektion am fünften und zehnten postoperativen Tag erhielten, erlangten eine höhere Überbrückungsrate mit einer größeren Dichte an mineralisiertem Gewebe. Außerdem erzielten sie eine bessere mechanische Festigkeit des Knochens, als die Versuchstiere, welche intraoperativ oder 24 Stunden postoperativ eine Injektion bekamen (Betz et al., 2007). Trägermaterialien mit einer verzögerten oder prolongierten Freisetzung könnten somit eine weitere Dosisreduktion bewirken.

Dass die BMP-2-Signalkaskade unmittelbar nach dem Trauma einsetzt und anschließend im Rahmen der enchondralen Ossifikation erneut hochreguliert wird, ist allgemein bekannt. Erst

während des Umbaus in Lamellenknochens erfolgt eine Abnahme der BMP-2 exprimierenden Osteoblasten und somit die Downregulierung der BMP-Expression (Bostrom, 1998; Cho et al., 2002; Ruschke & Hiepen et al., 2012). Dies lässt vermuten, dass Trägermaterialien, die eine gleichmäßige und verlängerte Ausschüttung von BMP-2 ermöglichen, effektiver auf die Stadien der enchondralen Knochenheilung einwirken als eine einmalige und schnelle Freisetzung durch den Kollagenschwamm (Schmidt-Bleek et al., 2016). Boerckel und Kollegen (2011a) konnten im Rattenmodell zwar eine 100%ige Überbrückungsrate eines 8mm großen Knochendefekts unter Verwendung eines Nanofaser/Alginat-Geflechts und einer Konzentration von 1 µg rhBMP-2 erzielen, während lediglich 60% der kollagenschwammbehandelten Tiere nach 12 Wochen eine vollständige Überbrückung des Defekts erreichten (Boerckel et al., 2011a). Die Unterschiede lassen sich in der unterschiedlichen Defektgröße und BMP-2-Konzentration darstellen. Zwar scheint die geringere Dosis das osteoinduktive Potential zur Überbrückung eines 8 mm Defekts zu besitzen, dennoch fällt auf, dass dies eng an das Trägersystem geknüpft zu sein scheint. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Wachstumsfaktoren ist eine prologierte und kontrollierte Freisetzung erforderlich um mit einer minimalen Dosis maximale Heilungserfolge zu erzielen (Schmidt-Bleek & Willie et al., 2016).

Neben der biologischen Stimulation ist die mechanische Umgebung mitentscheidend für den Heilungserfolg einer Knochenfraktur (Lienau et al., 2005; Willie et al., 2009). Seit Wolffs Gesetz (1892) ist allgemein bekannt, dass der Knochen stark von der mechanischen Umwelt beeinflusst wird (Wolff, 1892). Selbst die BMP-Signalkaskade kann direkt, ohne die Sekretion eines autokrinen Liganden, durch Mechanotransduktion reguliert werden (Kopf et al., 2014). Aufgrund der Komplexität der Interaktion des Gewebes rund um den Frakturspalt und die der Knochenzellen mit ihrer mechanischen Umwelt, gibt es auch hier zahlreichen Arbeiten auf diesem Gebiet (Epari et al., 2010; Thompson et al., 2012). Um den kombinierten Effekt des biologischen Stimulus (BMP-2) mit der mechanischen Umgebung zu verstehen, behandelten Schwarz und Kollegen (2013) weibliche Sprague Dawley-Ratten mit einem kritischen 5mm Defekt, stabilisiert durch einen Fixateur externe, mit einem Kollagen Typ-I-Schwamm (Lyostypt®), der je nach Gruppeneinteilung mit 50µg BMP-2 oder mit verdünnter HCl (Kontrollgruppe) beladen wurde. Die Hälfte der BMP-2 behandelten Versuchstiere erhielten einmal pro Woche, über einen Gesamtzeitraum von sechs Wochen, eine mechanische Stimulierung. Bereits nach zwei Wochen zeigte sich, dass in der kombinierten Stimulationsgruppe (biologisch und mechanisch) signifikant mehr mineralisiertes

Knochenvolumen sowie ein signifikant größerer Kallus vorhanden war als in der Vergleichsgruppen ohne biomechanische Belastung (nur BMP-2) oder in den Kontrollgruppen ohne BMP-2-Behandlung (Schwarz & Wulsten et al., 2013). Somit konnte gezeigt werden, dass mechanische Stimulation den Effekt einer BMP-2-Anwendung beeinflusst. Über die Möglichkeiten, die mechanische Umwelt zu modulieren um das bestmögliche Heilungsergebnis zu erhalten, herrscht allerdings Uneinigkeit. Boerckel und Kollegen (2011b) zeigten, dass in Kombination mit BMP-2 die späte Dynamisierung (4 Wochen) verglichen mit der frühen (Tag 0) mechanischen Stimulation zu einer gesteigerten Knochenformation führt. Sie vermuteten, dass im Defektmodell des Rattenfemurs die frühe mechanische Instabilität in einer Behinderung der Blutgefäßinvasion resultiert, respektive mit einer Reduzierung der Knochenneubildung (Boerckel et al., 2011b). Auch Claes und Kollegen (2009a) verglichen die frühe Dynamisierung mit einer kontinuierlich flexiblen und einer konstant rigiden Gruppe. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die rigide Gruppe einen kleineren, steiferen und besser mineralisierten Kallus hervorbrachte (Claes et al., 2009a). Dagegen sprechen sich Glatt und Kollegen (2010) explizit für eine frühe mechanische Stimulation mittels variierender Fixateursteifigkeiten unter BMP-2-Behandlung aus. Die Änderung der Steifigkeit soll im kritischen Femur-Defektmodell der Ratte die Knochenheilung unterstützen (Glatt et al., 2010). Währenddessen sehen Bartnikowski und Kollegen (2017) keinen Vorteil in der frühen Dynamisierung. Sie empfehlen zu jedem Zeitpunkt, beginnend mit Tag 3 postoperativ, eine Stabilisierung flexibler Fixationsmodelle um im Rattenmodell eine zeitnahe Knochenheilung zu erreichen (Bartnikowski et al., 2017). Claes und Kollegen (2011) sehen wiederum einen Vorteil in der späten Dynamisierung (4 Wochen postoperativ). Verglichen mit der konstant rigiden Gruppe erzielte die spät dynamisierte Gruppe ein signifikant kleineres Knochenvolumen und eine höhere Elastizität (Claes et al., 2011). Ungeachtet dessen, gilt es grundsätzlich über ein optimales Zusammenspiel von Mechanik und biologische Stimulation eine gesteuerte und gezielte Freisetzung von BMP-2 zu erzielen (Salvay et al., 2010).

Auf Gewebeebene schienen die minimalen, histologischen Unterschiede der Initialphase eine gewisse Unempfindlichkeit gegenüber der mechanischen Umgebung anzudeuten, da sich der Defekt an Tag 7 in den Versuchsgruppen vergleichbar darstellte. Periostal zeigte sich eine Knochenneubildung, während der Defekt endostal mit Rückständen des Kollagenschwamms sowie mit Fibrin und Hämatomresten charakterisiert war. An Tag 14 stellten die steiferen Versuchsgruppen (semi-rigide und rigide) auf der Gewebeebene feinen endostalen Gefechtsknochen im Defektspace dar. Zusätzlich fanden sich Hinweise auf stattgefundene

enchondrale Ossifikation in Form von Knorpelarealen in den histologischen Schnitten. Das histologische Bild der flexiblen Gruppen wurde dominiert von proliferierenden chondrogenen Vorläuferzellen. Es waren vereinzelt winzige Inseln an Knochenneubildung erkennbar (Schwarz & Ott et al., 2018).

Diesbezüglich konnten Mark und Kollegen (2004) in ihrer Studie zeigen, dass das histologische Erscheinungsbild während der Initialphase, beginnend mit Untersuchungstag 4, im Rattenmodell vergleichbar war und somit die Steifigkeit des Fixationsmodells keinen Einfluss auf die Knochenformation während der frühen Knochenheilungsphase ausübt. Hierfür verglichen sie zwei Gruppen mit unterschiedlichen Fixationssteifigkeiten (flexibel vs. rigide) und variierender Osteotomiegröße (0 mm vs. 2mm). Vielmehr hielten sie die Art des Traumas und die daraus resultierenden Modulationsprozesse sowie Differenzierung von Osteoprogenitorzellen durch biologische Signale entscheidend für die initiale Knochenheilung. Jedoch zeigten sie ebenfalls die biomechanischen Einflüsse auf die späteren Heilungsstadien auf. Mit einer geringeren Steifigkeit und zunehmender Spaltgröße verlängerte sich die Zeit für eine vollständige Ossifikation (Mark et al., 2004).

Dies unterstützte auch die Studie von Schell und Kollegen (2005) im Schafsmodell. Tibia-Defekte wurden mittels rigider und semi-rigider externer Fixation stabilisiert und anschließend histologisch und biomechanisch ausgewertet. Auch hier manifestierten sich histologisch keine Unterschiede bezüglich der initialen Heilung trotz unterschiedlicher Fixationsstabilität. Allerdings betrachtete auch diese Arbeitsgruppe hinsichtlich des finalen Ergebnisses nach 9 Wochen die mechanischen Rahmenbedingungen in der frühen Knochenheilung als mitentscheidend für eine erfolgreiche Heilung. Initiale Bewegungen der Knochenenden manifestierten sich im Verlauf der Knochenheilung in reduzierter Kallussteifigkeit und Kallusstabilität (Schell et al., 2005). Auch McKibbin sah die primäre Kallusantwort unabhängig von den biomechanischen Rahmenbedingungen, sondern eher durch das biologische Potential des Frakturhämatoms beeinflusst (McKibbin, 1978). Die Mechanik der Umgebung in der frühen Phase der Frakturheilung stellt sich somit als beeinflussend für den Langzeitverlauf der Heilung dar (Klein et al., 2003, was sich aber in der Initialphase der Gewebeebene noch nicht klar darstellt (Mark et al., 2004; Schell et al., 2005). Dagegen zeigte sich mittels Expressionsanalyse ausgewählter Gene der Knochenheilung bereit ab Tag 3 eine deutliche mechano-senitive Beeinflussung des Heilungsverlaufs. Einige der Chondro- und Osteogenese zugeordneten Gene zeigten an Tag 3 das niedrigste Expressionslevel in der flexiblen Gruppe, während die mit der inflammatorischen Antwort und dem Immunsystem bezogenen Gene unter rigider Fixation am höchsten exprimiert wurden. ID-1 (Inhibitor of differentiation 1) als

Regulator in der BMP-2 induzierten Osteoblastendifferenzierung und Indikator für mechanische Stimulation zeigte an Tag 3 das niedrigste Expressionslevel in der rigiden Gruppe. In der flexiblen Gruppe kam es zu einem gleichmäßigen Anstieg der ID-1-Expression. Trotzdem zeigte sich unter flexibler Fixation zunächst an Tag 7 der niedrigste Wert im Gruppenvergleich, während sich an Tag 14 das höchste Expressionsniveau zeigte. Die Expression von Kollagen Typ I stieg in allen Steifigkeitsgruppen über den gesamten Zeitverlauf an. An Tag 7 verzeichnete die flexible Gruppe den höchsten Expressionswert, welches auf eine vermehrte Syntheserate aufgrund wiederholter Matrixbildung hindeutet. Gleichzeitig verzeichnete die rigide Gruppe von Tag 7 auf Tag 14 einen signifikanten Anstieg hinsichtlich der Genexpression von Kollagen Typ I, welches auf eine Reifung der Osteoblasten durch die BMP-2-Gabe schließen lässt (Schwarz & Ott et al., 2018). Insgesamt zeigte sich in der Genanalyse eine klare Beeinflussung der Initialphase durch die unterschiedlichen Fixateursteifigkeiten, auch wenn dies zunächst nicht auf Gewebeebene zu erfassen ist, sondern dort erst im späteren Verlauf der Heilung ersichtlich wird.

Zusammenfassend zeigte die flexible Gruppe auf allen Auswertungsebenen einen verzögerten Heilungsverlauf. Dies entsprach der allgemeinen Literatur, worin flexible Steifigkeit in einer verlängerten chondralen Phase und verzögerter Knochenformation resultiert (Mark et al., 2004; Epari et al., 2013). Zwar gilt flexible Fixation in der kontrovers diskutierten inversen Dynamisierung auch als Promoter der Knochenheilung, dennoch sind sich auch diese Autoren einig, dass der Zeitraum limitiert ist und eine anschließende stabile Fixation für eine erfolgreiche Heilung unabdinglich ist (Claes et al., 2011; Glatt et al., 2016; Bartnikowski et al., 2017). Denn rigide Fixation induziert einen qualitativ besseren Kallus (Claes et al., 2009a). Jedoch benötigt die erfolgreiche Heilung stimulierende interfragmentäre Bewegungen, welche durch steifere Fixierungen vermindert wird (Glatt et al., 2016; Claes, 2017). Der Konsens für den maximalen Heilungserfolg liegt somit in der semi-rigiden Fixation, welches die beschleunigte Heilung im Rahmen dieser Arbeit nahelegt und auch in weiteren Studien belegt wurde (Glatt et al., 2016).

Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass Knochen ein mechano-sensitives Gewebe darstellt, das aktiv mit seiner mechanischen Umwelt reagiert. Die BMP-2 stimulierte semi-rigide und rigide Versuchsgruppe zeigten eine beschleunigte Heilung gegenüber der flexiblen Fixation, die in einer verzögerten Knochenheilung resultierte. Dies führte zu der Erkenntnis, dass die Modulation der mechanischen Umgebung des kritischen Defekts, trotz BMP-2-Anwesenheit, einen Einfluss auf den Heilungsverlauf ausübt. Die Verknüpfung einer optimalen mechanischen

Umgebung mit einer geringeren BMP-2-Dosis könnte enorme Fortschritte in der klinischen Therapie von Knochendefekten bergen und die bis dato auftretenden Komplikationen für die Patienten minimieren.

6 Zusammenfassung

Dass die mechanische Umgebung (Stabilisationssteifigkeit) entscheiden für den Heilungserfolg einer Fraktur ist, wurde mehrfach demonstriert (Histings et al., 2010; Bartnikowski et al., 2017; Claes, 2017; Glatt et al., 2017). Unter welchen biomechanischen Bedingungen eine möglichst schnelle und effiziente Frakturheilung erreichbar wäre, ist seit geraumer Zeit Gegenstand intensiver Forschung (Claes, 2017).

In diversen Studien ist zudem der positive Effekt von BMP-2 auf die Knochenheilung belegt worden (Nauth et al., 2011; Wildemann et al., 2011). Weitgreifendere Erkenntnisse über die Wirkung der Dosierung des Wachstumsfaktors und inwieweit seine Interaktion mit mechanischer Belastung die Effizienz der Knochenregeneration beeinflusst, eröffnen mögliche Zukunftsstrategien in Fällen wo knöcherne Überbrückung bisher unerreichbar war (Schmidt-Bleek & Willie et al., 2016).

Aufgrund dessen untersuchte die vorliegende Arbeit den Einfluss kombinierter biologischer und mechanischer Stimulation auf die Defektheilung im Pseudarthrosemodell der Ratte. Es sollte untersucht werden, welchen Effekt die variierenden Steifigkeiten eines externen Fixateurs auf die BMP-2-stimulierte Knochendefektheilung ausübte. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, auf Grundlage von mikrocomputertomographischen Untersuchungen und biomechanischer *in vitro* Testung, den Heilungsverlauf eines kritischen Defekts unter semi-rigider Fixation gegenüber rigider und flexibler Steifigkeit aufzuzeigen.

32 weibliche Sprague-Dawley Ratten in einem Alter von 12 Wochen wurden randomisiert in vier Gruppen von je acht Tieren eingeteilt. Die experimentellen Versuchsgruppen erhielten einen standardisierten kritischen 5 mm Defekt (CSD), eine intraoperative Einbringung von 5 μ g rhBMP-2 mittels absorbierbaren Kollagenschwamms und wurden mittels variierenden Verbindungsbalken des externen Fixateurs (flexibel, semi-rigide, rigide) stabilisiert, während die Kontrollgruppe eine 1mm Osteotomie ohne rhBMP-2-Applikation erhielt und als positive Kontrolle bezüglich einer physiologischen Knochenheilung diente. Alle Versuchstiere durchliefen am 10., 21. und 42. postoperativen Tag eine *in vivo*-Mikrocomputertomographuntersuchung. An Tag 42 wurden die Tiere euthanasiert und der linke osteotomierte Femur (inklusive des Fixateurs externe) entnommen. Randomisiert wurden sieben Tieren zusätzlich der intakte rechte Femur entnommen. Sämtliche Proben wurden biomechanisch hinsichtlich Steifigkeit und maximalen Drehmoments getestet.

Die Initialheilung der Steifigkeitsgruppen stellte sich im deskriptiven Mikro-CT mit einer vergleichbaren Gewebezusammensetzung dar. Im Defektspalt war moderat periostale Knochenneubildung erkennbar, die in keiner Defektüberbrückung resultierte. Dennoch ließ die semi-rigide Gruppe tendenziell den höchsten Grad an Mineralisation erkennen, welches mit den größten nicht signifikanten TV-, BV- und TMC-Werten im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen korrelierte, während die flexible Gruppe den kleinsten TV-Wert zeigte.

An Tag 21 stellten sich alle Versuchsgruppen knöchern überbrückt dar. Als Ausdruck der beginnenden Reifung ließen sich im Mikro-CT Resorptionsvorgänge darstellen. Die flexible Gruppe zeigte eine verzögert einsetzende Heilung gegenüber den beiden steiferen Gruppen sowie einen mit verkalktem und mineralisierten Kallusgewebe ausgefüllten Defektspalt.

An Tag 42 zeigte die flexible Gruppe signifikant größere Werte für TV, BV, BV/TV und TMC, während die semi-rigide Gruppe diesbezüglich die kleinsten Werte aufwies. Dies machte sich durch einen mit mineralisiertem Knochengewebe gefüllten Defekt in der flexiblen Gruppe deutlich, während die beiden steiferen Gruppen bereits Resorptionsvorgänge mit Wiederherstellung der Markhöhle erkennen ließen. Bezüglich TMD zeigte die semi-rigide Gruppe den größten Wert und die flexible Gruppe den kleinsten Wert, jedoch ohne Signifikanz. Die rigide Gruppe zeigte wie die semi-rigide Gruppe eine Abnahme des Gesamtkallusvolumens (TV) sowie geringere BV- und TMC-Werte als die flexible Gruppe, jedoch auch einen kleineren TMD-Wert als die semi-rigide Gruppe, weshalb hier ein verzögerter Reifungsprozess vermutet wurde.

Mittels biomechanischer *in vitro* Testung zeigte die semi-rigide Gruppe annähernd gleichwertige Ergebnisse bezüglich der Steifigkeit und des maximalen Drehmoments wie die rigide und flexible Gruppe.

Die Arbeit hat gezeigt, dass die BMP-2- stimulierte Defektheilung mechano-sensitiv ist. Zwar zeigten sich in den biomechanischen und mikrocomputertomographischen Ergebnissen kaum statistisch signifikante Unterschiede, jedoch konnte deskriptiv eine beschleunigte Heilung der semi-rigiden und rigiden Versuchsgruppe gegenüber der flexiblen Fixation demonstriert werden, die in einer verzögerten Knochenheilung resultierte, während die steiferen Gruppen eine Re-Kanalisation der Markhöhle zeigten. Dies führte zu der Erkenntnis, dass die Modulation der mechanischen Umgebung des kritischen Defekts, trotz BMP-2-Anwesenheit, einen Einfluss auf den Heilungsverlauf ausübt.

7 Summary

Influence of combined mechanical and biological stimulation on defect healing – a micro-computed tomographic and biomechanical study of critical-sized bone defects in rats

Generally it is known that the mechanical environment (stiffness of stabilization measures) is significant for the healing success of a fracture (Histings et al., 2010; Bartnikowski et al., 2017; Claes, 2017; Glatt et al., 2017). Under which biomechanical conditions a fast and efficient fracture healing would be achievable has been the subject of intensive research for some time (Claes, 2017).

Additionally, several studies have shown the positive effect of BMP-2 for bone healing (Nauth et al., 2011; Wildemann et al., 2011). Extended knowledge of the impact of the dosing of growth factors and how much their interaction with mechanical stress can influence the efficiency of bone regeneration show possible future strategies for cases in which a bony bridging of the fracture gap has not yet been achieved. (Schmidt-Bleek & Willie et al., 2016).

The aim of this work was to analyze the effects of varying fixation stiffness in combination with BMP-2 treatment in a critical sized defect (CSD) in a rat.

32 female Sprague Dawley rats, 12 weeks old, were randomized in four groups each of eight animals. Three experimental groups received a standardised critical 5 mm defect, 5µg rhBMP-2 was loaded on a absorbable collagen sponge and placed into the defect and stabilized with a flexible, semi-rigid or rigid connecting element of the external fixator. The control group (1 mm osteotomy) mimicked an uncritical healing and was stabilized with the rigid fixator. All groups were analysed by *in vivo* micro-CT, performed at day 10, 21 and 42 post-operation. At day 42 the rats were sacrificed and the osteomised left femora (including external fixator) were harvested. Additionally, the right intact femur of seven animals was harvested randomizedly. In the following, all samples were analysed by biomechanical *in vitro* testing for torsional stiffness and maximal torque value.

The initial healing process of the stiffness groups was found with comparable tissue structure in the descriptive micro-CT. At day 10, in all stiffness groups moderate bone formation was detected along the periosteal defect site that was not sufficient for defect bridging. However, among the other stiffness groups, upon semi-rigid fixation, a tendency towards a higher level of mineralization was still found, which correlates with the largest statistically not significant TV-, BV- und TMC-values. Whereas the flexible group showed the lowest TV-value.

On day 21 defects were bridged with bone tissue in all stiffness groups. As a result of the beginning maturing process, the micro-CT showed reabsorption processes. Delayed healing was found upon flexible fixation towards the other stiffness groups. Also a defect site with calcified and mineralized callus was found.

On day 42, the flexible group showed significantly higher values for TV, BV, BV/TV and TMC, whereas the semi-rigid group showed the smallest of these values. This was seen by a defect site filled with mineralised callus upon flexible fixation, whereas the other stiffness groups had already shown reabsorption processes with rebuilding of the medullary cavity. Regarding TMD, the semi-rigid group showed the highest value, while flexible group showed the lowest value, but without any significance. The rigid group and the semi-rigid group showed a reduction of the total volume (TV) and also lower BV- and TMC-values as the flexible group - but also a lower TMD-value as the semi-rigid group. This leads to the presumption of a delayed maturing process.

By using biomechanical *in vitro* tests, the semi-rigid group showed nearly equivalent results respective the torsional stiffness and the maximal torque at failure between the rigid and the flexible group.

This study has shown that the BMP-2-stimulated defect healing is mechano-sensitive. Although marginal statistically significant differences in biomechanical and micro-CT results have been found, an accelerated healing process has been demonstrated upon semi-rigid and rigid group contrary to the flexible fixation – indicating a delayed boost of bone formation, whereas other stiffness groups had already shown reabsorption processes with rebuilding of the medullary cavity. This leads to the insight that the modulation of the mechanical environment of the critical defect has an impact on the healing process, despite the same BMP-2-treatment.

8 Literatur

- Aerssens, J., Boonen, S., Lowetand, G., Dequeker, J.: Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 139 (2), p. 663–670, 1998.
- Akbar, M., Seyler, T., Abel, R., Gerner, H.: Heterotope Ossifikation bei Querschnittlähmung und Schädel-Hirn-Trauma. *Phys Med Rehab Kuror* 17, p. 156-171, 2007.
- Amling, M., Delling, G.: Cell biology of osteoclasts and molecular mechanisms of bone resorption. *Pathologie* 17, p. 358–367, 1996.
- Audige, L., Griffin, D., Bhandari, M., Kellam, J., Ruedi, T. P.: Path analysis of factors for delayed healing and nonunion in 416 operatively treated tibial shaft fractures. *Clin Orthop Relat Res* 438, p. 221-232, 2005.
- Augat, P., Burger, J., Schorlemmer, S., Henke, T., Peraus, M., Claes, L.: Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model. *Journal of Orthopaedic Research* 21, p. 1011-1017, 2003.
- Autefage, A.: The point of view of the veterinary surgeon: bone and fracture. *Injury* 31(Suppl 3), p. 50-55, 2000.
- Avsian-Krechmer, O., Hsueh, A. J.: Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic antagonist. *Mol Endocrinol* 18, p. 1-12, 2004.
- Axelrad, T. W., Steen, B., Lowenberg, D. W., Creevy, W. R., Einhorn, T.A.: Heterotopic ossification after the use of commercially available recombinant human bone morphogenetic proteins in four patients. *J Bone Joint Surg Br* 90, p. 1617-1622, 2008.
- Axelrad, T. W., Einhorn, T. A.: Bone morphogenetic proteins in orthopaedic surgery. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20, p. 481–488, 2009.
- Barnes G. L., Kostenuik P. J., Gerstenfeld L. C. und Einhorn T. A.: Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 14(11), p. 1805-1815, 1999.
- Bartnikowski, N., Claes, L. E., Koval, L., Glatt, V., Bindl, R., Steck, R., Ignatius, A., Schuetz, M. A., Epari, D. R.: Modulation of fixation stiffness from flexible to stiff in a rat model of bone healing. *Acta Orthop.* 88, p. 217-222, 2017.
- Bastian, O., Pillay, J., Alblas, J., Leenen, L., Koenderman, L., Blokhuis, T.: Systemic inflammation and fracture healing. *J Leukoc Biol* 89, p. 669-673, 2011.
- Baumgärtner, W.: Spezielle Pathologie für die Tiermedizin. Enke, Stuttgart, 2015.
- Beck, T.: Der Knochen – lebendig und stoffwechselaktiv. *Pharm. Ztg* –148. Jahrgang-2769-(PZ), 2003.

Betz, O. B., Betz, V. M., Nazarian, A., Egermann, M., Gerstenfeld, L. C., Einhorn, T. A., Vrahas, M. S., Bouxsein, M. L., Evans, C. H.: Delayed administration of adenoviral BMP-2 vector improves the formation of bone in osseous defects. *Gene Ther.* 14, p. 1039-1044, 2007.

Bieler, F. H., Ott, C. E., Thompson, M. S., Seidel, R., Ahrens, S., Epari, D. R., Wilkening, U., Schaser, K. D., Mundlos, S., Duda, G. N.: Biaxial cell stimulation: A mechanical validation. *J Biomech* 42, p. 1692-1696, 2009.

Bodalia, P. N., Balaji, V., Kaila, R., Wilson, L.: Effectiveness and safety of recombinant human bone morphogenetic protein-2 for adults with lumbar spine pseudarthrosis following spinal fusion surgery: A systematic review. *Bone Joint Res.* 5, p. 145-152, 2016.

Boerckel, J. D., Kolambkar, Y. M., Dupont, K. M., Uhrig, B. A., Phelps, E. A., Stevens, H. Y., Garcia, A. J., Guldberg, R. E.: Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration. *Biomaterials* 32(22), p. 5241-5251, 2011a.

Boerckel, J. D., Uhrig, B. A., Willett, N. J., Huebsch, N., Guldberg, R. E.: Mechanical regulation of vascular growth and tissue regeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, p. 674-680, 2011b.

Bonewald, L. F.: Osteocytes: a proposed multifunctional bone cell. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2, p. 239-241, 2002.

Bostrom, M. P., Lane, J. M., Berberian, W. S., Missri, A. A., Tomin, E., Weiland, A., Doty, S. B., Glaser, D., Rosen, V. M.: Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* 13, p. 357-67, 1995.

Bostrom, M. P.: Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 355, p. 116-123, 1998.

Bouxsein, M. L., Turek, T. J., Blake, C. A., D'Augusta, D., Li, X., Stevens, M., Seeherman, H. J., Wozney, J. M.: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *J Bone Joint Surg Am* 83-A(8), p. 1219-1230, 2001.

Bouxsein, M. L., Boyd, S. K., Christiansen, B. A., Guldberg, R. E., Jepsen, K. J., Müller, R.: Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography. *J Bone Miner Res.* 25, p. 1468-1486, 2010.

Braun, W., Rüter, A.: Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects. *Unfallchirurg* 99, p. 59-67, 1996.

Brighton, C. T.: The biology of fracture repair. *Instr Course Lect* 33, p. 60-82, 1984.

Bucher, O., Wartenberg, H.: Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Huber, Bern, 1997.

Buck, D. W., Dumanian, G. A.: Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plast Reconstr Surg* 129(6), p. 1314-1320, 2012.

Buck, D. W., Dumanian, G. A.: Bone biology and physiology: Part II. Clinical correlates. *Plast Reconstr Surg* 129(6), p. 950e-956e, 2012.

Budras, K., Fricke, W. und Richter, R.: Atlas der Anatomie des Hundes: Lehrbuch für Tierärzte und Studierende. Schlütersche Verlagsanstalt, Hannover, 1996.

Buie, H. R., Campbell, G. M., Klinck, R. J., MacNeil, J. A., Boyd, S. K.: Automatic segmentation of cortical and trabecular compartments based on a dual threshold technique for in vivo micro-CT bone analysis. *Bone* 41, p. 505–515, 2007.

Burghardt, A. J., Kazakia, G. J., Majumdar, S.: A local adaptive threshold strategy for high resolution peripheral quantitative computed tomography of trabecular bone. *Ann. Biomed. Eng.* 35, p. 1678–1686, 2007.

Burkus, J. K., Gornet, M. F., Dickman, C. A., Zdeblick, T. A.: Anterior lumbar interbody fusion using rhBMP-2 with tapered interbody cages. *J Spinal Disord Tech* 15(5), p. 337-349, 2002.

Buza III, J. A., Einhorn, T.: Bone healing in 2016. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 13(2), p. 101-105, 2016.

Calori, G. M., Mazza, E., Colombo, M., Ripamonti, C., Tagliabue, L.: Treatment of long bone non-unions with polytherapy: indications and clinical results. *Injury* 42(6), p. 587-590, 2011.

Capulli, M., Paone, R., Rucci, N.: Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Arch Biochem Biophys* 561, p. 3-12, 2014

Carano, R. A., Filvaroff, E. H.: Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 8, p. 980-989, 2003.

Chang, P.-C., Liang, K., Lim, J. C., Chung, M.-C., Chien, L.-Y.: A comparison of the thresholding strategies of micro-CT for periodontal bone loss: a pilot study. *Dento Maxillo Facial Radiol.* 42, 66925194, 2013.

Chao, E. Y. und Inoue, N.: Biophysical stimulation of bone fracture repair, regeneration and remodelling. *Eur Cell Mater* 6, p. 72-84, 2003.

Chen, R., Wang, J., Liu, C.: Biomaterials Act as Enhancers of Growth Factors in Bone Regeneration. *Advanced Function Materials* 26, p. 8810-8823, 2016.

Cho, T. J., Gerstenfeld, L. C., Einhorn, T. A.: Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 17, p. 513-20, 2002.

Chung, R., Cool, J. C., Scherer, M. A., Foster, B. K., Xian, C. J.: Roles of neutrophil-mediated inflammatory response in the bony repair of injured growth plate cartilage in young rats. *J Leukoc Biol* 80, p. 1272-1280, 2006.

Cipitria, A., Reichert, J. C., Epari, D. R., Saifzadeh, S., Berner, A., Shell, H., Metha, M., Schuetz, M. A., Duda, G. N., Hutmacher, D. W.: Polycaprolactone scaffold and reduced rhBMP-7 dose fort he regeneration of critical-sized defects in sheep tibia. *Biomaterials* 34, p. 9960-9968, 2013.

Claes, L. E., Heigele, C. A.: Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing. *J Biomech* 32, p. 255-266, 1999.

Claes, L., Wolf, S., Augat, P.: Mechanische Einflüsse auf die Callusheilung. *Der Chirurg* 71, p. 989-994, 2000.

Claes, L., Eckert-Hubner, K., Augat, P.: The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J Orthop Res* 20, p.1099- 1105, 2002.

Claes, L., Maurer-Klein, N., Henke, T., Gerngross, H., Melnyk, M., Augat, P.: Moderate soft tissue trauma delays new bone formation only in the early phase of fracture healing. *J Orthop Res* 24, p. 1178-1185, 2006.

Claes, L. E., Cunningham, J. L.: Monitoring the mechanical properties of healing bone. *Clin Orthop Relat Res* 467, p. 1964-1971, 2009.

Claes, L., Blakytyn, R., Melanie, G., 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* 27, p. 22-27, 2009a.

Claes, L., Blakytyn, R., Besse, J., Bausewein, C., Ignatius, A., Willie, B.: Late dynamization by reduced fixation stiffness enhances fracture healing in a rat femoral osteotomy model. *J Orthop Trauma* 25, p. 169-174, 2011.

Claes, L., Recknagel, S., Ignatius, A.: Fracturehealing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol* 8, p. 133–143, 2012.

Claes, L.: *Mechanobiologie der Frakturheilung Teil 1. Grundlagen.* *Unfallchirurg* 120, p. 14-22, 2017.

Clarke, B.: Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 3, p. 131-139, 2008.

Cook, S. D., Baffes, G. C., Wolfe, M. W., Sampath, T. K., Rueger, D. C., Whitecloud, T. S.: The effect of recombinant human osteogenetic protein-1 on healing of large segmental bone defects. *J Bone Jt Surg Am.* 76, p. 827-838, 1994.

Crockett, J. C., Mellis, D. J., Scott, D. I., Helfrich, M. H.: New knowlege on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos Int.* 22, p. 1-20, 2011.

Cunningham, N. S., Paralkar, V., Reddi, A. H.: Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor beta 1 mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, p. 11740-11744, 1992.

- de la Pena, L. S., Billings, P. C., Fiori, J. L., Ahn, J., Kaplan, F. S., Shore, E. M.: Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP), a disorder of ectopic osteogenesis, misregulates cell surface expression and trafficking of BMPRIA. *J Bone Miner Res* 20, p. 1168-76, 2005.
- Deutsch, H.: High-dose bone morphogenetic protein-induced ectopic bone growth. *Spine J* 10(2), e1-4, 2010.
- Devlin, R. D., Du, Z., Pereira, R. C., Kimble, R. B., Economidis, A. N., Jorgetti, V., Canalis, E.: Skeletal overexpression of noggin results in osteopenia and reduced bone formation. *Endocrinology* 144, p. 1972-1978, 2003.
- Dickson, G. R., Geddis, C., Fazzalari, N., Marsh, D., Parkinson, I.: Microcomputed tomography imaging in a rat model of delayed union/non-union fracture. *J Orthop Res* 26, p. 729-736, 2008.
- Duda, G. N., Kassi, J. P., Hoffmann, J. E., Riedt, R., Khodadadyan, C., Raschke, M.: Mechanical behavior of Ilizarov ring fixators. Effect of frame parameters on stiffness and consequences for clinical use. *Unfallchirurg* 103, p. 839-845, 2000.
- Dudley, A. T., Lyons, K. M., Robertson, E. J.: A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Develop* 9, p. 2795-2807, 1995.
- Edmondston, S. J., Singer, K. P., Day, R. E., Breidahl, P. D., Price, R. I.: Formalin fixation effects on vertebral bone density and failure mechanics: an in vitro study of human and sheep vertebrae. *Clin Biomech.* 9, p. 175-179, 1994.
- Ehrlich, M., Gutman, O., Knaus, P., Henis, Y. I.: Oligomeric interactions of TGF- β and BMP receptors. *FEBS Lett* 586, p. 1885-1896, 2012.
- Einhorn, T. A.: The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*, p. 7-21, 1998.
- Einhorn, T. A., Majeska, R. J., Mohaideen, A., Kagel, E. M., Bouxsein, M. L., Turek, T. J., Wozney, J. M.: A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am.* 85-A, 1425-1435, 2003.
- Einhorn, T. A.: The science of fracture healing. *J Orthop Trauma* 19, p. 4-6, 2005.
- Einhorn, T. A., Gerstenfeld, L. C.: Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat. Rev. Rheumatol.* 11, p. 45-54, 2015.
- Eitel, F., Seiler, H., Schweiberer, L.: Morphologic examination of animal-experiment results: comparison with regeneration of the human bone-structure. II. Research results. *Unfallheilkunde* 84 (6), p. 255-264, 1981.
- Ellinghaus, A., Schmidt-Bleek, K., Duda, G. N., Schell, H.: The physiology of fracture healing – a histological outline. *Osteologie* 20, p. 11-16, 2011.

Epari, D. R., Schell, H., Bail, H. J., Duda, G.N.: Instability prolongs the chondral phase during bone healing in sheep. *Bone* 38, p. 864-870, 2006.

Epari, D. R., Kassir, J. P., Schell, H., Duda, G. N.: Timely fracture-healing requires optimization of axial fixation stability. *J Bone Joint Surg Am* 89, p. 1575-1585, 2007.

Epari, D. R., Duda, G. N., Thompson, M. S.: Mechanobiology of bone healing and regeneration: in vivo models. *Proc Inst Mech Eng H* 224(H12), p. 1543-1553, 2010.

Epari, D. R., Wehner, T., Ignatius, A., Schuetz, M. A., Claes, L. E.: A case for optimising fracture healing through inverse dynamisation. *Med Hypotheses* 81, p. 225-227, 2013.

Everding, J., Stolberg-Stolberg, J., Raschke, M. J., Stange, R.: Stimulation der Frakturheilung durch Wachstumsfaktoren und zellbasierte Technologien. *Unfallchirurg* 122, p. 534-542, 2019.

Faßbender, M., Minkwitz, S., Strobel, C., Schmidmaier, G., Wildemann, B.: Stimulation of bone healing by sustained bone morphogenetic protein 2 (BMP- 2) delivery. *Int. J. Mol. Sci.* 15, p. 8539–8552, 2014.

Fassbender, M., Minkwitz, S., Thiele, M., Wildemann, B.: Efficacy of two different demineralised bone matrix grafts to promote bone healing in a critical-size-defect: a radiological, histological and histomorphometric study in rat femurs. *International Orthopaedics* 38, p. 1963-1969, 2014.

Florencio-Silva, R., Sasso, G. R., Sasso-Cerri, E., Simoes, M. J., Cerri, P. S.: *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*. *Biomed Res Int* 2015, p. 421746, 2015.

Freeman, T. A., Patel, P., Parvizi, J., Antoci, V., Shapiro, I. M.: Micro-CT analysis with multiple thresholds allows detection of bone formation and resorption during ultrasound-treated fracture healing. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 27, p. 673–679, 2009.

Fuchs, T., Schmidmaier, G., Hoffmann, J. E., Raschke, M.: Eine Maschine zur standardisierten torsionalen Testung von Kleintierknochen. *Der Unfallchirurg* 282, 2000.

Galli, C., Passeri, G., Macaluso, G. M.: Osteocytes and WNT: the mechanical control of bone formation. *J Dent Res*, 89, p. 331-43, 2010.

Garcia, P., Histing, T., Holstein, J. H., Klein, M., Laschke, M. W., Matthys, R., Ignatius, A., Wildemann, B., Lienau, J., Peters, A., Willie, B., Duda, G., Claes, L., Pohlemann, T., Menger, M. D.: Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review. *European Cells and Materials* Vol. 26, p. 1-14, 2013.

García de Vinuesa, A., Abdelilah-Seyfried, S., Knaus, P., Zwijssen, A., Bailly, S.: BMP signaling in vascular biology and dysfunctions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 27, p. 65-79, 2016.

- Garrison, K. R., Shemilt, I., Donell, S., Ryder, J. J., Mugford, M., Harvey, I., Song, F., Alt, V.: Bone morphogenetic protein (BMP) for Fracture healing in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 16;(6):CD006950, 2010.
- Gerstenfeld, L. C., Cullinane, D. M., Barnes, G. L., Graves, D. T., Einhorn, T.A.: Fracture healing as a postnatal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 88, p. 873-884, 2003.
- Giannoudis, P., Psarakis, S., Kontakis, G.: Can we accelerate fracture healing? A critical analysis of the literature. *Injury* 38 Suppl 1, p. S81-9, 2007.
- Giannoudis, P. V., Einhorn, T. A., Schmidmaier, G., Marsch, D.: The diamond concept – open questions. *Injury* 39 (Suppl. 2), p. S5-S8, 2008.
- Giannoudis, P. V., Calori, G. M., Begue, T., Schmidmaier, G.: Bone regeneration strategies: Current trends but what the future holds? *Injury, Int. J. Care Injured* 44, S1-S2, 2013.
- Giorgi, M., Verbruggen, S. W., Lacroix, D.: In silico bone mechanobiology: modeling a multifaceted biological system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 8(6), p. 485-505, 2016.
- Glatt, V., Miller, M., Matthys, R., Evans, C.: Development of a modulated mechanical environment for enhancing bone healing in a rat segmental defect model. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society p. 392, 2010.
- Glatt, V., Evans, C. H., Matthys, R.: Design, characterisation and in vivo testing of a new, adjustable stiffness, external fixator for the rat femur. *European Cell and Materials* Vol. 23, p. 289-299, 2012.
- Glatt, V., Matthys, R.: Adjustable stiffness, external fixator for the rat femur osteotomy and segmental bone defect models. *J Vis Exp* 92, e51558, 2014.
- Glatt, V., Bartnikowski, N., Quirk, N., Schuetz, M., Evans, C.: Reverse Dynamization. Influence of Fixator Stiffness on the Mode and Efficiency of Large-Bone-Defect Healing at Different Doses of rhBMP-2. *J Bone Joint surg. Am.* 98, p. 677-687, 2016.
- Glatt, V., Evans, C. H., Tetsworth, K.: A Concert between Biology and Biomechanics: The Influence of the Mechanical Environment on Bone Healing. *Front Physiol.* 7:678, 2017.
- Goodship, A. E.: Mechanical stimulus to bone. *Ann Rheum Dis* 51, p. 4-6, 1992.
- Govender, S., Csimma, C., Genant, H. K., et al.: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* 84-A(12), p. 2123- 2134, 2002.
- Griffon, D. J.: Fracture healing.
In: Johnson, A. L., Houlton, J. E. F., Vannini, R.: *AO Principles of Fracture Management in the Dog and Cat.* Thieme, p. 73-97, 2005

Haidar, Z. S., Hamdy, R. C., Tabrizian, M.: Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part A: current challenges in BMP delivery. *Biotechnol Lett* 31 (12), p. 1825-1835, 2009.

Hayda, R. A., Bosse, M. J.: Moderators' summary: management of segmental bone defects. *J Am Acad Orthop Surg* 14, p. 142-144, 2006.

Hernandez, C. J., Hazelwood, S. J., Martin, R. B.: The relationship between basic multicellular unit activation and origination in cancellous bone. *Bone* 25(5), p. 585-587, 1999.

Hiesterman, T. G., Shafiq, B. X., Cole, P. A.: Intramedullary nailing of extra-articular proximal tibia fractures. *J Am Acad Orthop Surg*. 19(11), p. 690-700, 2011.

Hirner, A., Weise, K.: *Chirurgie*. Thieme Verlagsgruppe, Stuttgart, New York, Dehli, Rio, 2008.

Histing, T., Garcia, P., Matthys, R., Leidinger, M., Holstein, J. H., Kristen, A., Pohlemann, T., Menger, M. D.: An internal locking plate to study intramembranous bone healing in a mouse femur fracture model. *J Orthop Res* 28, p. 397-402, 2010.

Histing, T., Garcia, P., Holstein, J. H., Klein, M., Matthys, R., Nuetzi, R., Steck, R., Laschke, M. W., Wehner, T., Bindl, R., Recknagel, S., Stuermer, E. K., Vollmar, B., Wildemann, B., Lienau, J., Willie, B., Peters, A., Ignatius, A., Pohlemann, T., Claes, L., Menger, M. D.: Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 49, p. 591-599, 2011.

Huang, C., Ogawa, R.: Mechanotransduction in bone repair and regeneration. *FASEB J* 24, p. 3625-3632, 2010.

Illian, C., Veigl, B., Chylarecki, C.: *Osteosyntheseverfahren in der Kinder- und Jugendtraumatologie*. OUP 12, p. 578-583, 2013.

Jäger, M., Sager, M., Lensing-Höhn, S., Krauspe, R.: The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (I): Comparative anatomical study on rats' femur. *Biomed. Tech. (Berl)* 50, p. 107-110, 2005a.

Jäger, M., Sager, M., Lensing-Höhn, S., Krauspe, R.: The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (II): implant evolution and surgical technique on a rat's femur. *Biomed Tech (Berl)* 50, p. 137-142, 2005b.

Jäger, M., Westhoff, B., Wild, A., Krauspe, R.: Bone harvesting from the iliac crest. *Orthopade* 34, p. 976-994, 2005.

Jee, W. S., Yao, W.: Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 1, p. 193-207, 2001.

Jerosch, J., Bader, A., Uhr, G.: *Knochen: Curasan-Taschenatlas spezial*. Georg Thieme Verlag, 2002.

Jilka, R. L.: Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediatr Oncol* 41(3), p. 182-185, 2003.

Jing, D., Hao, X., Xu, F., Liu, J., Xu, F., Luo, E., Meng, G.: Effects of local delivery of BMP2, zoledronate and their combination on bone microarchitecture, biomechanics and bone turnover in osteoporotic rabbits. *Sci Rep.* 6, p. 28537, 2016.

Jones, A. L., Bucholz, R. W., Bosse, M. J., Mirza, S. K., Lyon, T. R., Webb, L. X., Pollak, A. N., Golden, J. D., Valentin-Opran, A.: Recombinant human BMP-2, allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects. A randomized, controlled trial. *J Bone Joint Surg Am.* 88, 1431-1441, 2006.

Junqueira, L.C., Carneiro, J.: *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen; unter Berücksichtigung der Histophysiologie; mit 21 Tabellen.* 5. Auflage, Springer, Berlin, 2002.

Kan, L., Kessler, J.A.: Animal models of typical heterotopic ossification. *J Biomed Biotechnol* 2011, 309287, 2011.

Kaspar, D., Seidl, W., Neidlinger-Wilke, C., Ignatius, A., Claes, L.: Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and C1CP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity. *J Biomech* 33, p. 45–51, 2000.

Kaspar, D., Seidl, W., Neidlinger-Wilke, C., Beck, A., Claes, L., Ignatius, A.: Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain. *J Biomech* 35, p. 873–880, 2002.

Kaspar, K., Schell, H., Toben, D., Matziolis, G., Bail, H. J.: An easily reproducible and biomechanically standardized model to investigate bone healing in rats, using external fixation. *Biomed Tech* 52, p. 383-390, 2007.

Khan, T. R., Pearce, K. R., McAnany, S. J., Peters, C. M., Gupta, M. C., Zebala, L. P.: Comparison of transforminal lumbar interbody fusion outcomes in patients receiving rhBMP-2 versus autograft. *Spine J.* 16, pii: S1529-9430(17)30904-X, 2017.

Klein, P., Schell, H., Streitparth, F., Heller, M., Kassi, J. P., Kandziora, F., Bragulla, H., Haas, N. P., Duda, G. N.: The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions. *J Orthop Res*, 21, p. 662-669, 2003.

Kloss, F. R., Schlegel, K. A., Felszeghy, E., Falk, S., Wiltfang, J.: [Applying an osteoinductive protein complex for regeneration of osseous defects]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 8, p. 12-17, 2004.

König, H. E., Liebich, H.-G.: *Anatomie der Haussäugetiere.* Schattauer, p. 8-17, 2012.

Kolambkar, Y. M., Dupont, K. M., Boerckel, J. D., Huebsch, N., Mooney, D. J., Huttmacher, D. W., Guldberg, R. E.: An alginate-based hybrid system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects. *Biomaterials* 32, p. 65-74, 2011.

Komender, A.: Influence of preservation on some mechanical properties of human Haversian bone. *Mater Med Pol* 8, p. 13-17, 1976.

Kopf, J., Petersen, A., Duda, G. N., Knaus, P.: BMP2 and mechanical loading cooperatively regulate immediate early signalling events in the BMP pathway. *BMC Biol.*10:37, 2012.

Kopf, J., Paarmann, P., Hiepen, C., Horbelt, D., Knaus, P.: BMP growth factor signaling in a biomechanical context. *Biofactors.* 40, p. 171-187, 2014.

Krause, C., Guzman, A., Knaus, P.: Noggin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, p. 478-481, 2011.
Kübler, N. R.: Herstellung und Biologie der bone morphogenetic proteins. *BIOMaterialien* 1, p. 12-18, 2000.

Lad, S. P., Bagley, J. H., Karikari, I. O., Babu, R., Ugiliweneza, B., Kong, M., Isaacs, R. E., Bagley, C. A., Gottfried, O. N., Patil, C. G., Boakye, M.: Cancer after spinal fusion: the role of bone morphogenetic protein. *Neurosurgery* 73(3), p. 440-449, 2013.

Laurie, S. W., Kaban, L. B., Mulliken, J. B., Murray, J. E.: Donor-site morbidity after harvesting rib and iliac bone. *Plast Reconstr Surg* 73, p. 933-938, 1984.

Lenz, A., Franklin, G. A., Cheadle, W. G.: Systemic inflammation after trauma. *Injury* 38, p. 1336-1345, 2007.

Leppänen, O. V., Sievänen, H., Järvinen, T. L.: Biomechanical testing in experimental bone interventions--May the power be with you. *J Biomech* 41(8), p. 1623-1631, 2008.

Lewis, D. D., Cross, A. R., Carmichael, S., Anderson, M. A.: Recent advances in external skeletal fixation. *J Small Anim Pract* 42, p.103-112, 2001.

Li, Z., Kong, K., Qi, W.: Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling. *Biochem Biophys Res Commun* 343, p. 345-350, 2006.

Liebich H.-G.: Funktionelle Histologie: Histologie der Haussäugetiere. Schattauer Verlagsgesellschaft, Stuttgart; New York, p. 46-64, 2004.

Lienau, J., Schell, H., Duda, G. N., Seebeck, P., Muchow, S., Bali, H. J.: Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability. *J Orthop Res* 23, p. 639-645, 2005.

Loi, F., Córdova, L. A., Pajarinen, J., Lin, T., Yao, Z., Goodman, S. B.: Inflammation, Fracture and Bone Repair. *Bone* 86, p. 119-130, 2016.

Lu, C., Miclau, T., Hu, D., Marcucio, R. S.: Ischemia leads to delayed union during fracture healing: a mouse model. *J Orthop Res* 25, p. 51-61, 2007.

Lüllmann-Rauch, R., Asan, E.: Taschenlehrbuch der Histologie. Georg Thieme Verlagsgesellschaft, Stuttgart, New York, Dehli, Rio, p.160-162, 2015.

- Lyon, T., Scheele, W., Bhandari, M., Koval, K. J., Sanchez, E. G., Christensen, J., Valentin, A., Huard, F.: Efficacy and safety of recombinant human bone morphogenetic protein-2/calcium phosphate matrix for closed tibial diaphyseal fracture: a double-blind, randomized, controlled phase-II/III trial. *J. Bone Joint Surg. Am.* 95, p. 2088–2096, 2013.
- Manigrasso, M. B., O'Connor, J. P.: Comparison of fracture healing among different mouse strains. *Calcif Tissue Int* 82, p. 465-474, 2008.
- Mark, H., Nilsson, A., Nannmark, U., Rydevik, B.: Effects of fracture fixation stability on ossification in healing fractures. *Clin Orthop Relat Res.* 419, p. 245-250, 2004.
- Marsell, R., Einhorn, T. A.: The biology of fracture healing. *Injury, Int. J. Care Injured* 42, p. 551-555, 2011.
- Marsh, D.: Concepts of fracture union, delayed union, and nonunion. *Clin. Orthop.* p. 22–30, 1998.
- Martens, J.: *Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows*. De Gruyter Oldenbourg Verlag, Reprint, 2014.
- Mathon, D. H., et al.: Development of a Segmental Long-bone Defect Model in Sheep. *Vet Comp Orthop Traumatol* 11, p. 1–7, 1998.
- McKibbin, B.: The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br.*, 60-B(2):150-62, 1978.
- Metha, M., Schell, H., Schwarz, C., Peters, A., Schmidt-Bleek, K., Ellinghaus, A., Bail, H. J., Duda, G. N., Lienau, J.: A 5-mm femoral defect in female but not in male rats leads to a reproducible atrophic non-union. *Arch Orthop Trauma Surg* 131, p. 121-129, 2011.
- Meyer, R. A., Tsahakis, P. J., Martin, D. F., Banks, D. M., Harrow, M. E., Kiebzak, G. M.: Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 19, p. 428–435, 2001.
- Miyasaka, Y., Sakurai, M., Yokobori, A. T. J., Kuroda, S., Ohyama M.: Bending and torsion fractures in long bones (a mechanical and radiologic assessment of clinical cases). *Biomed Mater Eng.* 1, p. 3-10, 1991.
- Moghaddam, A., Zietzschmann, S., Bruckner, T., Schmidmaier, G.: Treatment of atrophic tibia non-unions according to „diamond concept“: Results of one- and two-step treatment. *Injury* 46 (Suppl. 4), p. S39-S50, 2015.
- Mora, G., Forriol, F.: Mechanical analysis of the healing of different osteotomies fixed externally. *International orthopaedics* 24, p. 295-298, 2000.
- Mundy, G. R., Oyajobi, B., Gutierrez, G., Sterling, J., Padalecki, S., Elefteriou, F., Zhao, M.: Cytokines and bone remodeling. In: Marcus, R., Feldman, D., Nelson, D., Rosen, C. J.: *Osteoporosis*. Academic Press, p. 491-528, 2007.

- Müller, R., Rügsegger, P.: Micro-tomographic imaging for the nondestructive evaluation of trabecular bone architecture. *Stud. Health Technol. Inform.* 40, p. 61–79, 1997.
- Müller, R., Van Campenhout, H., Van Damme, B., Van Der Perre, G., Dequeker, J., Hildebrand, T., Rügsegger, P.: Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 23, p. 59–66, 1998.
- Nasu, M., Takayama, S., Umezawa, A.: Enchondral ossification model system: designed cell fate of human epiphyseal chondrocytes during long-term implantation. *J Cell Physiol* 230, p. 1376-1388, 2015.
- Nauth, A., Ristevski, B., Li, R., Schemitsch, E. H.: Growth factors and bone regeneration: How much bone can we expect?. *Injury Int J Care Injured* 42, p. 574-579, 2011.
- Netz, P., Eriksson, K., Stromberg, L.: Torsional strength and geometry of diaphyseal bone. An experimental study on dogs. *Acta Orthop Scand* 49, p. 430-434, 1978.
- Nunamaker, D. M., Rhinelander, F. W., Heppenstall, R. B.: Delayed Union, Nonunion, and Malunion
In: Newton, C. D., Nunamaker, D. M.: Textbook of Small Animals Orthopaedics, J. B. Lippicott Company, Chapter 38, 1985.
- Nunamaker, D. M.: Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* (355 Suppl), p. 56-65, 1998.
- Ng, K. W., Romas, E., Donnan, L. und Findlay, D. M.: Bone biology. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 11(1), p. 1-22, 1997.
- Nijweide, P. J. und Mulder, R. J.: Identification of osteocytes in osteoblast-like cell cultures using a monoclonal antibody specifically directed against osteocytes. *Histochemistry* 84(4-6), p. 342-347, 1986.
- Noble, B. S., Reeve, J.: Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Mol Cell Endocrinol* 159(1-2), p. 7–13, 2000.
- Ode, A., Duda, G. N., Geissler, S., Pauly, S., Ode, J.-E., Perka, C., Strube, P.: Interaction of Age and Mechanical Stability on Bone Defect Healing: An Early Transcriptional Analysis of Fracture Hematoma in Rat. *PLoS One*. 9(9): e106462, 2014.
- O’Loughlin, P. F., Morr, S., Bogunovic, L., Kim, D. A., Park, B., Lane, M. J.: Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J Bone Joint Surg* 90 (Suppl 1), p. 79-84, 2008.
- Orth, M., Kruse, N. J., Braun, B. J., Scheuer, C., Holstein, J. H., Khalil, A., Yu, X., Murphy, W. L., Pohlemann, T., Laschke, M. W., Menger, M. D.: BMP-2-coated microparticles improve bone repair in atrophic non-unions. *Eur Cell Mater* 2;33, p. 1-12, 2017.
- Owen, M.: The origin of bone cells. In *Rev Cytol.*, 28, p. 213-238, 1970.

- Palmer, R. H., Hulse, D. A., Hyman, W. A., Palmer, D. R.: Principles of bone healing and biomechanics of external skeletal fixation. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 22, p. 45–68, 1992.
- Palmer, R. H.: External fixators and minimally invasive osteosynthesis in small animal veterinary medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 42, p. 913-934, 2012.
- Pelker, R. R., Friedlaender, G. E., Markham, T. C.: Biomechanical properties of bone allografts. *Clin Orthop Relat Res* 174, p. 54-57, 1983.
- Pelker, R. R., Friedlaender, G. E., Markham, T. C.: Effects of freeze-drying on the biomechanical properties of rat bone. *J Orthop Res* 1, p. 405-411, 1984.
- Perren, S. M., Cordey, J.: Tissue differences in fracture healing. *Unfallheilkunde* 80, p. 161–164, 1977.
- Perren, S. M.: Biomechanical basis of fracture treatment. *Orthopade* 21(1), p. 3-10, 1992.
- Peric, M., Dumic-Cule, I., Grcevic, D., Matijasic, M., Verbanac, D., Paul, R., Grgurevic, L., Trkulja, V., Bagi, C. M., Vukicevic, S.: The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies. *Bone* 70, p. 73-86, 2015.
- Poenaru, D. V., Popescu, M., Anglitoiu, B., Popa, I., Andrei, D., Birsasteanu, F.: Emergency pelvic stabilization in patients with pelvic posttraumatic instability. *Int Orthop*.39(5), p. 961-965, 2015.
- Preininger, B., Gerigk, H., Bruckner, J., Perka, C., Schell, H., Ellinghaus, A., Schmidt-Bleek, K., Duda, G.: An experimental setup to evaluate innovative therapy options for the enhancement of bone healing using BMP as a benchmark – a pilot study. *European Cells and Materials* Vol. 23, p. 262-272, 2012.
- Puloski, S., Romano, C., Buckley, R., Powell, J.: Rotational malalignment of the tibia following reamed intramedullary nail fixation. *J Orthop Trauma*. 18(7), p. 397-402, 2004.
- Radasch, R. M.: Biomechanics of bone and fractures. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 29, p. 1045-1082, 1999.
- Raggatt, L. J., Partridge, N. C.: Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem*, 285, p. 25103-8, 2010.
- Raschke, M. J., Schmidmaier, G.: [Biological coating of implants--a new key technology?]. *Unfallchirurg* 107(8), p. 651, 2004.
- Recknagel, S., Bindl, R., Kurz, J., Wehner, T., Ehrnthaller, C., Knöpferl, M. W., Gebhard, F., Huber-Lang, M., Claes, L., Ignatius, A.: Experimental blunt chest trauma impairs fracture healing in rats. *J Orthop Res*. 29, p. 734-739, 2011.
- Reddi, A. H.: Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1, p. 1-6, 2001.

- Reichert, J. C., Saifzadeh, S., Wullschleger, M. E., Epari, D. R., Schütz, M. A., Duda, G. N., Schell, H., van Griensven, M., Redl, H., Hutmacher, D. W.: The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials* 30 (12), p. 2149–2163, 2009.
- Remedios, A.: Bone and bone healing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* .29(5), p. 1029–1044, 1999.
- Röntgen, V., Blakytyn, R., Matthys, R., Landauer, M., Wehner, T., Göckelmann, M., Jermendy, P., Amling, M., Schinke, T., Claes, L., Ignatius, A.: Fracture Healing in Mice under Controlled Rigid and Flexible Conditions Using an Adjustable External Fixator. *J Orthop Res* 28, p. 1456-1462, 2010.
- Rohrbach, D., Preininger, B., Hesse, B., Gerigk, H., Perka, C., Raum, K.: The early phases of bone healing can be differentiated in a rat osteotomy model by focused transverse-transmission ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 39, p. 1642– 1653, 2013.
- Romanowski, R., Jundt, G., Termine, J. D., von d. Mark, K., Schulz, A.: Immunoelectron microscopy of osteonectin and Type I collagen in osteoblasts and bone matrix. *Calcif Tissue Int* 46(6), p. 353-360, 1990.
- Roodman, G. D.: Advances in bone biology; the osteoclast. *Edocr Rev*; 17, p. 308-332, 1996.
- Rubinacci, A., Covini, M., Bisogni, C., Villa, I., Galli, M., Palumbo, C., Ferretti, M., Muglia, M. A. und Marotti, G.: Bone as an ion exchange system: evidence for a link between mechanotransduction and metabolic needs. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(4), p. 851-864, 2002.
- Rüter, A., Mayr, E.: Pseudarthrosis. *Chirurg* 70, p. 1239–1245, 1999.
- Runkel, M., Klepsch, M.: Wandel bei der Behandlung der Unterschenkelschaftfraktur. *Trauma Berufskrankh* 1, p. 229-239, 1999.
- Ruschke, K., Hiepen, C., Becker, J., Knaus, P.: BMPs are mediators in tissue crosstalk of the regenerating musculoskeletal system. *Cell Tissue Res* 347, p. 521-544, 2012.
- Salvay, D. M., Zelivyanskaya, M., Shea, L. D.: Gene delivery by surface immobilization of plasmid to tissue-engineering scaffolds. *Gene Ther* 17, p. 1134-1141, 2010.
- Schell, H., Epari, D. R., Kassi, J. P., Bragulla, H., Bali, H. J., Duda, G. N.: The course of bone healing is influenced by the initial shear fixation stability. *J Orthop Res* 23, p. 1022-1028, 2005.
- Schell, H., Lienau, J., Epari, D. R., Seebeck, P., Exner, C., Muchow, S., Bragulla, H., Haas, N. P., Duda, G. N.: Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing. *Bone* 38, p. 547–554, 2006.
- Schell, H., Duda, G. N., Peters, A., Tsitsilonis, S., Johnson, K. A., Schmidt-Bleek, K.: The haematoma and its role in bone healing. *J Exp Orthop.* 4, 2017.

- Schenk, R. K., Hunziker, E. B.: Histologic and ultrastructural features of fracture healing. In: Brighton, C. T., Friedlander, G. E., Lane, J. M.: Bone formation and repair. American Academy of Orthopedic Surgeons, Rosemont, p. 117–145, 1994.
- Schmickal, T., Hochstein, P., Wentzensen, A.: Behandlung von Unterschenkelschaftfrakturen im Fixateur externe. *Trauma Berufskrankh* 1, p.240-246, 1999.
- Schmidmaier, G., Wildemann, B., Melis, B., Krummrey, G., Einhorn, T. A., Haas, N. P., Raschke, M.: Development and characterization of a standard closed tibial fracture model in the rat. *Eur J Trauma* 30, p. 35-42, 2004.
- Schmidmaier, G., Moghaddam, A.: [Long Bone Nonunion]. *Z Orthop Unfall* 153(06), p. 659-676, 2015.
- Schmidt-Bleek, K., Schell, H., Schulz, N., Hoff, P., Perka, C., Buttgereit, F., Volk, H. D., Lienau, J., Duda, G. N.: Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. *Cell Tissue Res*, 2012.
- Schmidt- Bleek, K., Willie, B. M., Schwabe, P., Seemann, P., Duda, G. N.: BMPs in bone regeneration: Less is more effective, a paradigm- shift. *Cytokine Growth Factor Rev* 27, p. 141-148, 2016.
- Schmitz, J. P., Hollinger, J. O.: The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 205, p. 299-308, 1986.
- Schmökel, H. G., Weber, F. E., Seiler, G., von Rechenberg, B., Schense, J. C., Schawalder, P., Hubbell, J.: Treatment of nonunions with nonglycosylated recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered from a fibrin matrix. *Vet Surg* 33, p. 112-118, 2004.
- Schwarz, C., Wulsten, D., Ellinghaus, A., Lienau, J., Willie, B. M., Duda, G. N.: Mechanical load modulates the stimulatory effect of BMP2 in a rat nonunion model. *Tissue Eng Part A* 19, p. 247–254, 2013.
- Schwarz, C., Ott, C.-E., Wulsten, D., Brauer, E., Schreivogel, S., Petersen, A., Hassanein, K., Roewer, L., Schmidt, T., Willie, B. M., Duda, G. N.: The interaction of BMP-2-induced defect healing in rat and fixator stiffness modulates matrix alignment and contraction. *JBMR Plus* 2(3), p. 174-186, 2018.
- Schweiberer, L., Baumgart, R., Deiler, S.: The biological reaction in atrophic and hypertrophic pseudarthrosis of diaphysis of long bone. Causes and forms of appearance. *Chirurg*, 70(11), p. 1193-1201, 1999.
- Sfeir, C., Ho, L., Doll, B. A., Azari, K., Hollinger, J. O.: Fracture Repair. In: Lieberman, J. R., Friedlaender, G. E. (Eds.): Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications. Humana Press Inc., Totowa, NJ, p. 21-44, 2005.
- Shapiro F.: Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canilicular system and intercellular gap junctions to the repair process. *J Bone Joint Surg Am* 70(7), p. 1067- 1081, 1988.

- Sharir, A., Barak, M. M., Shahar, R.: Whole bone mechanics and mechanical testing. *Vet J* 177, p. 8-17, 2008.
- Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C., Knaus, P.: Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 20, p. 343-355, 2009.
- Sigl, V., Schramek, D., Penniger, J. M.: RANK und RANKL – Von Knochen zum Mammakarzinom. *J Miner Stoffwechs* 19, p. 27-32, 2012.
- Simon, T. M., van Sickle, D. C., Kunishima, D. H., Jackson, D. W.: Cambium cell stimulation from surgical release of the periosteum. *J Orthop Res.*, 21(3), p. 470- 480, 2003.
- Sørensen, T. S., Sørensen, I. I., Merser, S.: Rapid release of gentamicin from collagen sponge. In vitro comparison with plastic beads. *Acta Orthop Scand* 61(4), p. 353-356, 1990.
- Song, H. A., Kim, Y. S., Cho, H. J., Kim, S. I., Kang, M. J., Kim, J. H., Min, H. J., Kang, J. W., Yoon, J. H., Kim, C. H.: Hypoxia Modulates Epithelial Permeability via Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor in Airway Epithelial. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 2017.
- Stegen, S., van Gestel, N., Carmeliet, G.: Bringing new life to damage bone: the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone* 70, p. 19-27, 2015.
- Strube, P., Sentürk, U., Riha, T., Kaspar, K., Müller, M., Kasper, G., Matziolis, G., Duda, G., Perka, C.: Influence of age and mechanical stability on bone defect healing: Age reverses mechanical effects. *Bone* 42, p. 758-764, 2008.
- Stürmer, K. M.: Pathophysiology of disrupted bone healing. *Orthopade* 25, p. 386–393, 1996.
- Tardif, G., Pelletier, J.-P., Hum, D., Boileau, C., Duval, N., Martel-Pelletier, J.: Differential regulation of the bone morphogenetic protein antagonist chordin in human normal and osteoarthritic chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 65, p. 261-264, 2006.
- Taylor, D.: Fracture and repair of bone: a multiscale problem. *J Mater Sci* 42, p. 8911-8918, 2007.
- Tenney, R. M., Discher, D. E.: Stem cells, microenvironment mechanics, and growth factor activation. *Current Opinion in Cell Biology* 21, p. 630-635, 2009.
- Thompson, W. R., Rubin, C. T., Rubin, J.: Mechanical regulation of signaling pathways in bone. *Gene* 503, p. 179-193, 2012.
- Trostle, S. S., Markel, M. D.: Fracture biology, biomechanics, and internal fixation. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12(1), p. 19–46, 1996.
- Tsuji, K., Bandyopadhyay, A., Harfe, B. D., Cox, K., Kakar, S., Gerstenfeld, L., Einhorn, T., Tabin, C. J., Rosen, V.: BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet* 38, p. 1424-1429, 2006.
- Tuchman, A., Brodke, D. S., Youssef, J. A., Meisel, H. J., Dettori, J. R., Park, J. B., Yoon, S. T., Wang, J. C.: Iliac Crest Bone Graft versus Local Autograft or Allograft for Lumbar Spinal Fusion: A Systematic Review. *Global Spine J* 6, p. 592-606, 2016.

Turner, C. H., Burr, D. B.: Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 14, p. 595-608, 1993.

Urist, M. R.: Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, p. 893-899, 1965.

Urist, M. R., Strates, B. S.: Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 50, p. 1392-1406, 1971.

Vallier, H. A., Cureton, B. A., Patterson, B. M.: Factors influencing functional outcomes after distal tibia shaft fractures. *J Orthop Trauma* 26(3), p. 178-183, 2012.

Victoria, G., Petrisor, B., Drew, B., Dick D.: Bone stimulation for fracture healing: What's all the fuss?. *Indian J Orthop* 43, p. 117-120, 2009.

Voggenreiter, G.: Knochenheilung. *Periop. Med.* 1, p. 86-96, 2009.

Vukicevic, S., Helder, M., Luyten, F. P.: Developing human lung and kidney are major sites for synthesis of bone morphogenetic protein-3 (osteogenin). *J Histochem Cytochem* 42, p. 869-875, 1994.

Wagner, D. O., Sieber, C., Bhushan, R., Börgermann, J. H., Graf, D., Knaus, P.: BMPs: from bone to body morphogenetic proteins. *Sci Signal.* 3(107):mr1, 2010.

Wang, E. A., Rosen, V., Cordes, P., Hewick, R. M., Kriz, M. J., Luxenberg, D. P., Sibley, B. S., Wozney, J. M.: Purification and characterization of other distinct bone- inducing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(24), p. 9484-988, 1988.

Wang, X., Shen, X., Li, X., Agrawal, C. M.: Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone* 31, p. 1-7, 2002.

Wang, Y., Wan, C., Deng, L., Liu, X., Cao, X., Gilbert, S. R., Bouxsein, M. L., Faugere, M. C., Guldborg, R. E., Gerstenfeld, L. C., Haase, V. H., Johnson, R. S., Schipani, E., Clemens, T. L.: The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest* 117, p. 1616-1626, 2007.

Wang, R. N., Green, J., Wang, Z., Deng, Y., Qiao, M., Peabody, M., Zhang, Q., Ye, J., Yan, Z., Denduluri, S., Idowu, O., Li, M., Shen, C., Hu, A., Haydon, R. C., Kang, R., Mok, J., Lee, M. J., Luu, H. L., Shi, L. L.: Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis.* 1, p. 87-105, 2014.

Wang, X., Huang, J., Huang, F., Zong, J.-C., Tang, X., Liu, Y., Zhang, Q.-F., Wang, Y., Chen, L., Yin, L.-J., He, B.-C., Deng, Z.-L.: Bone morphogenetic protein 9 stimulates callus formation in osteoporotic rats during fracture healing. *Mol Med Rep.* 15(5), p. 2537-2545, 2017.

Watson, J. T.: External Fixation of the Tibia.

In: Wiesel, S. W.: *Operative Techniques in Orthopaedic Surgery (Four Volume Set)*.

Lippincott Williams & Wilkins; Wolters Kluwer, p. 763-779, 2015.

Webb, J. C., Tricker, J.: Bone biology- a review of fracture healing. *Current Orthopaedics* 12, p. 457-463, 2000.

- Weyrauch, K. D., Schmollich, A.: Histologie-Kurs für Veterinärmediziner. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 1998.
- White, A. A. 3rd, Panjabi, M. M., Southwick, W. O.: The four biomechanical stages of fracture repair. *J Bone Joint Surg Am* 59, p. 188-192, 1977.
- Wildemann, B., Lange, K., Strobel, C., Fassbender, M., Willie, B., Schmidmaier, G.: Local BMP-2 application can rescue the delayed osteotomy healing in a rat model. *Injury* 42, p. 746–752, 2011.
- Willenegger, H., Perren, S. M., Schenk, R.: Primary and secondary healing of bone fractures. *Chirurg* 42, p. 241–252, 1971.
- Willie, B., Adkins, K., Zheng, X., Simon, U., Claes, L.: Mechanical Characterization of External Fixator Stiffness for a Rat Femoral Fracture Model. *J Orthop Res* 27, p. 687-693, 2009.
- Willie, B. M., Blakytyn, R., Glöckelmann, M., Ignatius, A., Claes, L.: Temporal variation in fixation stiffness affects healing by differential cartilage formation in a rat osteotomy model. *Clin Orthop Relat Res.* 469, p. 3094-3101, 2011.
- Wolf, S., Janousek, A., Pfeil, J., Veith, W., Haas, F., Duda, G., Claes, L.: The effects of external mechanical stimulation on the healing of diaphyseal osteotomies fixed by flexible external fixation. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 13, p. 359-364, 1998.
- Wolff, J.: Das Gesetz der Transformation der Knochen. Verlag von August Hirschwald, Berlin, 1892.
- Wozney J. M., Rosen V., Celeste A. J., Mitsock L. M., Whitters M. J., Kriz R. W., Hewick R. M., Wang E. A.: Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242, p. 1528-1534, 1988.
- Wozney, J. M., Rosen, V.: Bone morphogenetic proteins.
In: Mundy, G. R., Martin, T. J. (Hrsg.): *Handbook of experimental pharmacology*, vol. 107 - physiology and pharmacology of bone, Springer, Berlin - Heidelberg, p. 725, 1993.
- Wozney, J. M.: Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine* 27, p. 2-8, 2002.
- Wysocki, R. W., Cohen, M. S.: Ectopic ossification of the triceps muscle after application of bone morphogenetic protein-7 to the distal humerus for recalcitrant nonunion: a case report. *J Hand Surg Am* 32, p. 647-650, 2007.
- Yanagita, M.: BMP antagonists: Their roles in development and involvement in pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, p. 309-317, 2005.
- Yoo, J. U., Johnstone, B.: The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair. *Clin Orthop Res*, (355 Suppl), p. 73-81, 1998.

Zhu, W., Rawlins, B. A., Boachie-Adjei, O., Myers, E. R., Arimizu, J., Choi, E., Lieberman, J. R., Crystal, R. G., Hidaka, C.: Combined bone morphogenetic protein-2 and -7 gene transfer enhances osteoblastic differentiation and spine fusion in a rodent model. *J Bone Miner Res* 19, p. 2021-2032, 2004.

9 Publikationen

Publikationen aus dieser Arbeit:

Schwarz, C., **Hassanein, K.**, Schmidt, T., Willie, B. M., Duda, G. N.: Low dose BMP2 is affected by fixation stiffness in a critical size defect in rat. ORS 2014 Annual Meeting, Poster No: 1543

Schwarz, C., Ott, C.-E., Wulsten, D., Brauer, E., Schreivogel, S., Petersen, A., **Hassanein, K.**, Roewer, L., Schmidt, T., Willie, B. M., Duda, G. N.: The interaction of BMP-2-induced defect healing in rat and fixator stiffness modulates matrix alignment and contraction. JBMR Plus 2(3), p. 174-186, 2018.

10 Danksagung

Herrn Professor Dr. Salah Amasheh gilt mein ganz besonderer Dank für die freundliche Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit und für deren Durchsicht als Erstgutachter. Ihre stetige Hilfsbereitschaft und ihr unermüdlicher Optimismus haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen!

Herrn Professor Dr. Georg Duda danke ich sehr für die Aufnahme in sein Institut und die Überlassung des Themas.

Frau Carolin Schwarz sei besonders gedankt für die wissenschaftliche Betreuung sowie die konstruktive Kritik und Anregungen beim Verfassen dieser Dissertation. Danke, dass du dir Zeit für meine Fragen und Anliegen genommen hast!

Frau Dr. Tanja Schmidt danke ich herzlich für die tatkräftige Unterstützung bei der operativen Durchführung der Versuche und die stets lehrreiche und humorvolle Arbeitsatmosphäre.

Herrn Mario Thiele danke ich vielmals für die intensive und geduldige Einführung in den Bereich der Radiologie und die immer freundliche Unterstützung bei der Bildanalyse. Deine Tür stand jederzeit offen für meine Fragen. Danke dafür!

Herrn Jan-Erik Ode gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der biomechanischen Testung und die Lösung diverser Probleme mit der Technik. Ein herzliches Dankeschön auch an meine Mitdotorandin Linda Roewer, die sich mit mir bis zum Ende durchgekämpft hat. Ohne deinen Humor wäre der Weg durch die Dissertation oftmals nicht möglich gewesen.

Meinen Eltern gilt mein besonderer Dank für ihre immerwährende Liebe und Vertrauen. Herzlichen Dank für die Unterstützung und den Rückhalt, mit denen ihr mir die Erstellung dieser Arbeit ermöglicht habt.

Ganz besonders bin ich meinem Mann Tarek dankbar für seine Liebe, Geduld und Zuversicht. Du hast immer an mich geglaubt, selbst wenn ich es schon nicht mehr getan habe. Meinen ewigen Dank!

Meinen wunderbaren Kinder Jonas, Simon und Fiona danke ich von ganzem Herzen für ihre bedingungslose Liebe, ihre Lebensfreude und das Glück welches sie täglich in mein Leben bringen.

11 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 09.03.2020

Kerstin Hassanein



9 783967 290929

mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-092-9