

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie

des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

und dem

Julius Wolff Institut, Charité - Universitätsmedizin Berlin

**Zusammenspiel von biologischen und mechanischen  
Stimuli in der Knochendefektheilung - eine  
Expressionsanalyse ausgewählter Gene der  
Knochenheilung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Linda Roewer**

Tierärztin aus Berlin

Berlin 2019

Journal-Nr.: 4035

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): bone fractures, healing, gene expression,  
stimulation, drugs, chemistry, fracture fixation,  
therapy, polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 06.09.2019

Meinen Eltern,  
die unentwegt versuchen, jede Hürde auf meinem Weg zu beseitigen.

In Gedenken an meinen Opa Harry Roewer.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Stand des Wissens.....	3
2.1	Biologie des Knochens.....	3
2.1.1	Aufbau des Knochens .....	3
2.1.2	Zusammensetzung des Knochengewebes .....	5
2.1.3	Osteogenese.....	7
2.1.4	Frakturheilung .....	11
2.2	Biologische Stimulation .....	23
2.2.1	Knochentransplantate .....	23
2.2.2	Rekombinante Wachstumsfaktoren.....	24
2.3	Mechanische Stimulierung .....	30
2.3.1	Osteosynthese .....	31
2.3.2	Fixationsmodelle .....	32
2.4	Ziel der Arbeit.....	36
3	Material und Methoden .....	39
3.1	Geräte .....	39
3.2	Verbrauchsmaterialien .....	40
3.3	Medikamente/ Lösungen .....	41
3.4	Chemikalien / Reagenzien.....	41
3.5	Software.....	42
3.6	Versuchstiere .....	43
3.6.1	Gruppeneinteilung.....	43
3.7	Operatives Vorgehen .....	44
3.8	Postoperatives Vorgehen .....	47
3.8.1	Tötung und Probengewinnung .....	48
3.9	RNA Extraktion.....	49
3.10	Umschreiben von RNA in cDNA .....	51
3.11	Testung der Primer .....	52
3.12	Probenanalyse .....	54
3.13	Statistische Auswertung .....	55
4.	Ergebnisse.....	56
4.1	BMPR II.....	58
4.2	BMPR IA .....	60

4.3	BMPR IB .....	62
4.4	Kollagen Typ I .....	64
4.5	Noggin .....	66
4.6	c-Fos .....	68
4.7	ID-1 .....	70
4.8	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	72
5.	Diskussion.....	74
5.1	Material und Methoden.....	74
5.1.1	Tiermodell .....	74
5.2	Expressionsergebnisse .....	77
6.	Zusammenfassung .....	87
7.	Summary.....	90
8.	Literatur .....	92
9.	Publikationen .....	110
10.	Danksagung .....	111
11.	Selbstständigkeitserklärung.....	112

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Stresstoleranz der verschiedenen Zelltypen im Frakturkallus (Piermattei 2006, Shapiro 2008).....	14
<b>Tabelle 2:</b> Gruppeneinteilung .....	43
<b>Tabelle 3:</b> Protokoll für das Umschreiben von RNA in cDNA nach Dr. Ing. Susann Minkwitz (Julius Wolff Institut, Campus Virchow-Klinikum, Berlin, Deutschland). .....	51
<b>Tabelle 4:</b> Protokoll für die qRT-PCR nach Dr. Ing. Susann Minkwitz (Julius Wolff Institut, Berlin, Campus Virchow-Klinikum, Berlin, Deutschland). .....	53
<b>Tabelle 5:</b> Sequenzen der für die qRT-PCR verwendeten Primer. ....	53
<b>Tabelle 6:</b> Zielgene der Expressionsanalyse.....	57

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Mikroskopische Anatomie des Knochens: (Abb. aus Yavropoulou und Yovos 2016).....	11
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung des Remodelling-Prozesses des Knochens. (Abb. aus Rucci 2008). .....	17
<b>Abbildung 3:</b> Klassifikation der Pseudarthrosen nach Weber (Abb. aus Jorge et al. 2006). 22	
<b>Abbildung 4:</b> Allgemeine Zusammenfassung der Smad-abhängigen und Smad-unabhängigen Signalwege von BMP. (Abb. aus Sanchez-Duffhues et al. 2015). .....	29
<b>Abbildung 5:</b> Stabilisierung mit dem Fixateur externe RatExFix von RISystem AG (Abb. aus <a href="http://www.risystem.com">http://www.risystem.com</a> 11.07.2017).....	35
<b>Abbildung 6:</b> Interaktion zwischen den Signalwegen von BMP und der Mechanotransduktion auf mehreren Ebenen. (Abb. aus Kopf et al. 2014).....	38
<b>Abbildung 7:</b> Operationsablauf .....	46
<b>Abbildung 8:</b> Röntgenkontrolle direkt nach der Operation. ....	48
<b>Abbildung 9:</b> Expression des Gens BMPR II in den jeweiligen Versuchs- und Kontrollgruppen an Tag 3, 7, 14 post-OP; Signifikanz $p < 0,05$ . ....	58
<b>Abbildung 10:</b> Expression des Gens BMPR IA in den jeweiligen Versuchs- und Kontrollgruppen an Tag 3, 7, 14 post-OP, Signifikanz $p < 0,05$ . ....	60
<b>Abbildung 11:</b> Genexpression von BMPR IB in den jeweiligen Versuchs- und Kontrollgruppen an Tag 3, 7, 14 post-OP. ....	62
<b>Abbildung 12:</b> Expression des Gens Kollagen Typ I in den jeweiligen Versuchs- und Kontrollgruppen an Tag 3, 7, 14 post-OP, Signifikanz $p < 0,05$ . ....	64
<b>Abbildung 13:</b> Expression des Gens Noggin in den jeweiligen Versuchs- und Kontrollgruppen an Tag 3, 7, 14 post-OP. ....	66
<b>Abbildung 14:</b> Expression des Gens c-Fos in den jeweiligen Versuchs- und Kontrollgruppen an Tag 3, 7, 14 post-OP. ....	68
<b>Abbildung 15:</b> Expression des Gens ID-1 in den jeweiligen Versuchs- und Kontrollgruppen an Tag 3, 7, 14 post-OP, Signifikanz $p < 0,05$ . ....	70

## Abkürzungsverzeichnis

ACTR	Activin Rezeptor
AP-1	Aktivierendes Protein 1
aFGF	acidic Fibroblast Growth Factor
AP-1	Aktivierendes Protein-1
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata
BDGF	Brain-Derived Growth Factor
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPR	Bone Morphogenetic Protein Rezeptor
BRAM 1	Bone morphogenetic protein Receptor Associated Molecule 1
Cox-2	Cyclooxygenase-2
EGF	Epidermal Growth Factor
egr-1	early growth response gene-1
ERK 1/2	Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2
FE	Fixateure externe
FP	Forward Primer
ID-1	Inhibitor of Differentiation-1
IGF-1	Insulin like growth factor 1
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
i.p.	intraperitoneal
JNK	C-jun N-terminal Kinase
K	Kontrolle
KGW	Kilogramm Körpergewicht
Konz.	Konzentration
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
με	Microstrain
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
n	Anzahl
NK	Negativkontrolle
NTC	Non Template Control
OP	Operation
qRT-PCR	quantitative realtime Polymerasekettenreaktion
p38 MAPK	p38 Mitogen-Activated Protein Kinase



PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor
PI3K	Phosphoinositide-3-Kinase
PK	Positivkontrolle
RANK	Receptor Activator of Nuklear $\kappa$ B
RANKL	Receptor Activator of Nuklear $\kappa$ B Ligand
RP	Reverse Primer
RNA	Ribonukleinsäure
RÖ	Röntgen
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
Runx2	Runt Related Transcription Factor 2
s	Sekunde
s.c.	subkutan
T	Zeit
TAB 1	TAK-bindendes Protein 1
TAK 1	Transforming-growth-factor- $\beta$ -Activated Kinase 1
TGF- $\beta$	Transforming growth factor-beta
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor-alpha
TNF- $\beta$	Tumor Nekrose Faktor-beta
Tab.	Tabelle
UK	United Kingdom/Großbritannien
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vs.	versus
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

## 1 Einleitung

Im Unterschied zu anderen Körpergeweben ist Knochengewebe charakterisiert durch ein hohes Regenerationspotential, was einerseits durch den Knochen selbst und andererseits durch ein Zusammenspiel von Faktoren des Immun- und Gefäßsystems kontrolliert wird (Ruschke et al. 2012). Trotz des umfangreichen Wissens über die Prozesse der Knochenheilung und fortlaufende Weiterentwicklung der Operationstechniken sind 5-10 % der Frakturen der langen Röhrenknochen verbunden mit verzögerter oder ausbleibender Heilung (Non-Unions) (Panteli et al. 2015, Claes 2017), oft verursacht durch Durchblutungsstörungen (Ruschke et al. 2012). Die Behandlung erstreckt sich über externe/interne Fixation, Knochen- oder Knochenersatztransplantation, Stimulation der Heilung durch Ultraschall, elektromagnetische Stimulation oder Zusatz von Wachstumsfaktoren wie das rhBMP-2 (rekombinante humane Bone morphogenetic Protein 2) (Ruschke et al. 2012).

BMPs wurden durch ihre Fähigkeit entdeckt, im Muskelgewebe ektopes Knochengewebe zu induzieren (Urist 1965). Dennoch blieben die Proteine, die für die Knocheninduktion zuständig waren, eine lange Zeit unbekannt, bis Wozney und Kollegen 1988 diese identifizierten (Wozney et al. 1988). Dabei steht mittlerweile fest, dass BMPs nicht nur für die Knochenbildung eine entscheidende Rolle einnehmen, sondern u.a. auch wichtig für die Nerven-, Herz-, Knorpel- und Embryonalentwicklung sind (Chen et al. 2004), sodass es sinnvoll erscheint, seinen Namen in „body morphogenetic protein“ umzuwandeln (Wagner et al. 2010).

BMP-2 findet bereits vielversprechende Anwendung in der Orthopädie und Unfallchirurgie. Um zufriedenstellende Effekte auf die Knochenheilung zu erreichen, müssen, bedingt durch frühzeitige BMP-2-Diffusion und -Absorption von Einzeldosierungen oder ungünstige Applikation große Mengen eingesetzt werden (Wagner et al. 2010, Fassbender et al. 2014a, Fassbender et al. 2014b). Um die damit verbundenen Nebenwirkungen von BMP-2 zu vermeiden, ist der Bedarf nach weiterer Forschung hoch, sodass geeignete Dosierungen, Applikationsformen oder der kombinierte Einsatz mit anderen Stimuli geklärt werden können.

Entscheidende weitere Stimuli in der Knochenheilung sind die um den Frakturspalt bestehenden mechanischen Bedingungen. Bereits 1960 stellte Pauwels die Hypothese auf, dass die mechanischen Einflüsse entscheidend für die Art der Gewebsausbildung sind (Pauwels 1960, Glatt et al. 2016a). Später bestätigten weitere Forscher, dass die herrschenden mechanischen Bedingungen den Heilungsverlauf einer Fraktur bestimmen

(Glatt et al. 2016a). So können sowohl zu steife als auch zu flexible Fixationen in einer ausbleibenden Heilung münden und ein gewisses Maß an Instabilität die Knorpelbildung begünstigen, wodurch die Frakturheilung über enchondrale Ossifikation erfolgt (Augat et al. 2005, Glatt et al. 2016a). Mit diesem Hintergrund verfolgt diese Arbeit das Ziel, den Effekt einer kombinierten Behandlung von BMP-2 und mechanischer Stimulation auf die Expression ausgewählter Gene der Knochenheilung zu untersuchen. Dazu wurde im Rattenfemur ein 5 mm Osteotomiespalt erzeugt, mit einem mit rhBMP-2 beladenen Kollagenschwamm gefüllt und mit einem Fixateur externe stabilisiert. Die Gruppen unterschieden sich in der Fixationssteifigkeit des Fixateurs. Nach 3, 7 und 14 Tagen *post operationem* erfolgte die Expressionsanalyse ausgewählter Gene.

## 2 Stand des Wissens

### 2.1 Biologie des Knochens

Knochen sind der Hauptbestandteil des Skelettsystems und bilden den passiven Bewegungsapparat (König 2001). Als Ansatz und Ursprung des aktiven Bewegungsapparates, der Muskulatur, sind Knochen essentiell für die Fortbewegung und durch ihren formgebenden und stabilisierenden Einfluss wichtig für die Entwicklung massereicher Lebewesen (Deetjen 1999). Des Weiteren übernehmen sie als knöcherne Grundlage der Brust- und Beckenhöhle entscheidende Schutzfunktionen für Organe und Weichgewebe. Schließlich ist der Knochen als blutbildendes Organ und Mineralspeicher von Kalzium und Phosphor an Stoffwechselprozessen des gesamten Körpers beteiligt (Engelhardt 2005, Datta et al. 2008).

Es werden lange Röhrenknochen (z.B. Humerus), kurze Knochen (z.B. Handwurzelknochen), irreguläre Knochen (z.B. Wirbel), platte Knochen (z.B. Schädeldecke und Rippen) und Sesambeine voneinander unterschieden (Budras 2004, Buck und Dumanian 2012a).

Es finden zeitlebens adaptive Umgestaltungsvorgänge statt, da jede Änderung der Druck-, Zug-, und Scherkräfte einen Knochenumbau (Remodelling) zur Folge hat (Liebich 2004, Sims und Gooi 2008). Ganz nach dem Wolff'schen Gesetz, nimmt Knochen an Festigkeit zu, wenn er belastet wird und baut sich ab, wenn er nicht beansprucht wird (Clarke 2008). Führt eine Belastung zu einer Verformung von 0,15 %, löst diese Dehnung eine vermehrte Knochenbildung aus. Belastungen unter 0,05 % initiieren einen Knochenabbau. Verändert sich die Länge belasteter Abschnitte um mehr als 1,5 % ( $> 15000 \mu\epsilon$ ), kommt es zum Knochenbruch (Deetjen 1999, Engelhardt 2005, Yavropoulou und Yovos 2016). Ein Ungleichgewicht zwischen Knochenresorption und Knochenbildung führt zu verschiedenen Knochenerkrankungen, wie Osteoporose und Osteopetrose (Florencio-Silva et al. 2015).

#### 2.1.1 Aufbau des Knochens

Makroskopisch wird der lange Röhrenknochen in drei Bereiche unterteilt. Die Epiphysen- die Knochenenden- begrenzen die Diaphyse, den Knochenschaft. Die Metaphyse befindet sich mit der Epiphysenfuge zwischen Dia- und Epiphyse und stellt bis zum Beenden der Pubertät die Knochenwachstumszone dar (Clarke 2008, Baumgärtner 2015).

Die verbreiterten Knochenenden verringern den Stress auf die knorpelbedeckten Gelenkoberflächen, indem sie die Kräfte über ein größeres Gebiet verteilen (Trostle und Markel 1996). Das *Stratum corticale (Substantia compacta)* bildet mit 80 % den größten Anteil des Röhrenknochens und umgibt das *Stratum spongiosum*, welches zwar nur einen Knochenanteil von 20 % hat, aber eine höhere Stoffwechselaktivität vorweist (Engelhardt 2005, Clarke 2008). Die Spongiosa ist ein schwammartiges Gerüst von Knochenbälkchen (Trabekeln) und findet sich an den Enden von langen Knochen, in der Nähe von Gelenken oder innerhalb von Wirbelkörpern. Das *Stratum Spongiosum* beinhaltet das Knochenmark (*Medulla ossium rubra* bzw. *Medulla ossium flava*) (König 2001, Jepsen 2009, Baumgärtner 2015). Der funktionelle Umbau ist im Bereich der Spongiosa am intensivsten. Die Bälkchen richten sich immer trajektorieell (entsprechend den mechanischen Belastungen) aus (Rohen und Lütjen-Drecoll 2000), wohingegen ständig wirkende Druck- und Zugkräfte bei der *Substantia compacta* zu einer ausgeprägten Verstärkung der Knochenwand, v.a. in dem extrem belasteten mittleren Abschnitt des Knochens, der Diaphyse, führen (Liebich 2004). Dadurch ist die Kortikalis sehr dicht und hart (Jepsen 2009). Die *Substantia compacta* schließt sensible Nerven, Blut- und Lymphgefäße zur metabolischen Knochenversorgung ein (Liebich 2004). Sie wird außen und innen durch dicke Lagen kompakter Lamellen abgeschlossen (äußere und innere Generallamellen), die außen an das Periost (äußere Knochenhaut) und innen an das Endost (innere Knochenhaut) grenzen.

Das Endost ist die Auskleidung der inneren Knochenoberfläche und besteht aus einer Lamelle abgeflachter, inaktiver osteogener Mesenchymzellen, die sich bei Bedarf zu Osteoblasten und Fibroblasten differenzieren können. Das Endost geht ohne scharfe Grenzen in das retikuläre Knochenmark über (Rohen und Lütjen-Drecoll 2000, Clarke 2008). Das Periost umgibt als Knochenhaut den Knochen mit Ausnahme der Gelenkknorpel und Muskelansätze vollständig (Trostle 1996, Liebich 2004, Nasu et al. 2015). Es hat Schutz- und Stützfunktion und mit seiner zell- und gefäßreichen inneren Schicht, dem *Stratum osteogenicum*, ist es mit Ruhestadien potenter Bindegewebszellen an der Knochenneubildung und -regeneration, sowie der vaskulären und nervösen Knochenversorgung beteiligt (Buck und Dumanian 2012a, Baumgärtner 2015). Beim juvenilen Skelett ist das Periost hochaktiv, stark durchblutet und dick. Mit zunehmendem Alter sinken die Aktivität und Dicke (Remedios 1999). Die starke Innervation macht Verletzungen sehr schmerzhaft (Rohen und Lütjen-Drecoll 2000; Weyrauch und Smollich 1998). Die faserreiche äußere Schicht, das *Stratum fibrosum*, strahlt mit seinen kollagenen Sharpey-Fasern in den Knochen ein und ist in ihm verankert (Clarke 2008, Baumgärtner, 2015).

Die Sharpey-Fasern stellen gleichzeitig die Endabschnitte der Sehnen dar und sorgen für die Kraftübertragung auf den Knochen (König 2001). Das Periost übernimmt im gesunden Knochen nur die Blutversorgung des äußeren Drittels der Kompakta (Clarke 2008). Die inneren zwei Drittel der Kompakta werden von der *Arteria nutritia* versorgt. Kommt es zu einer Fraktur, ändern sich die intravaskulären Druckverhältnisse der *Arteria nutritia* der Markhöhle und das Periost übernimmt zusammen mit dem umgebenden Gewebe zeitweilig den Großteil der Versorgung im Frakturgebiet, bis sich in dem Granulationsgewebe neue Gefäße gebildet haben (Bonath und Prieur 1998, Remedios 1999, Buck und Dumanian 2012a).

### **2.1.2 Zusammensetzung des Knochengewebes**

Knochengewebe besteht zu 10 % aus Zellen und zu 90 % aus extrazellulärer Matrix. Letztgenannte enthält 8 % Wasser und die Trockensubstanz teilt sich mit 35 % in organische Matrix und 65 % in Mineralien (v.a. Kalzium und Phosphor in Form von Hydroxylapatit) auf. 90 % der organischen Matrix, die von Osteoblasten gebildet wird, ist Kollagen Typ I. Die restlichen 10 % sind andere Syntheseprodukte wie Osteokalzin, Osteonektin, Bone Morphogenetic Proteine, Interleukin-1, Interleukin-6, Proteoglykane und Glykoproteine (Engelhardt 2005, Clarke 2008, Buck und Dumanian 2012a). Die kollagenen Fasern sind für die Zugfestigkeit und Elastizität des Knochens verantwortlich und dienen bei der Mineralisierung als Leitstruktur für die Anlagerung des kristallinen Kalziumphosphates, welches für die Kompressionsfestigkeit des Knochens sorgt (Remedios 1999). Die Speicherung von Kalzium und Phosphor dient der Aufrechterhaltung der lebenswichtigen Kalziumkonzentration im Blut. So verfügt die *Substantia spongiosa* über ein mobiles Kalziumdepot, was bei Bedarf durch endogene und exogene Regulationsmechanismen freigesetzt werden kann (Liebich 2004).

Neben der extrazellulären Matrix wird das Knochengewebe von seinen Zellen charakterisiert. Die teilungsaktiven Osteoprogenitorzellen gehen aus mesenchymalen Stammzellen hervor. Sie befinden sich hauptsächlich im End- und Periost und sind die Vorläuferzellen der Osteoblasten. Die reifen teilungsunfähigen Osteoblasten sind die knochenbildenden Zellen. Sie produzieren Kollagen Typ I und Osteoid (nichtmineralisierte Knochengrundsubstanz), das u.a. die nicht-kollagenen-Proteine wie Osteokalzin, Osteopontin und das „Bone Sialoprotein“ enthält (Jimi et al. 2010, Florencio-Silva et al. 2015). Mit den letztgenannten Proteinen sind die Osteoblasten an der Mineralisation des Knochengewebes beteiligt, da sie

mit hoher Affinität Kalziumionen und Hydroxylapatit binden. Indem sie durch neutrale Proteasen und Kollagenasen nichtmineralisierte Knochenbestandteile für die Resorption durch die Osteoklasten freilegen, spielen Osteoblasten eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Knochenformation, was durch kalzitrope Hormone (Parathormon, Kalzitinin), Steroidhormone und Zytokine (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , BDGF, EGF) gesteuert wird. Aktive Osteoblasten bilden einen epithelartigen Verband auf der Knochenoberfläche und sind über Zellfortsätze miteinander verbunden (Florencio-Silva et al. 2015). Inaktive Osteoblasten werden als Knochendeckzellen oder „bone lining cells“ bezeichnet. Sie bedecken Knochenoberflächen, wo weder Knochenresorption noch -bildung stattfindet. Knochendeckzellen haben osteogenes und proliferatives Potential. Auch sie stehen mit anderen Knochendeckzellen und peripheren Osteozyten über Knochenkanäle in Kontakt. Darüber hinaus erfüllen sie Barrierefunktionen und sind in der Lage eine direkte Interaktion zwischen Osteoklasten und der Knochenmatrix zu verhindern, wenn Knochenresorption nicht stattfinden soll (Miller et al. 1989, Liebich 2004, Florencio-Silva et al. 2015).

90-95 % aller Knochenzellen sind Osteozyten. Der Osteozyt ist die reife Knochenzelle, die sich aus dem reifen Osteoblasten differenziert. Er ist von verkalkter Knochengrundsubstanz umgeben und ein entscheidender Faktor bei der Erhaltung des Knochens. Degenerieren die Osteozyten, geht auch die Matrix zugrunde. Der Osteozyt steht mit seinen langen Zellfortsätzen (Dendriten) nicht nur in Kontakt mit weiteren Osteozyten, sondern auch mit Osteoblasten auf der Knochenoberfläche und stimuliert diese zu ihrer Differenzierung (Liebich 2004, Florencio-Silva et al. 2015). So besteht ein dichtes Netz und damit eine funktionelle Einheit von Blutgefäßen, Interzellularflüssigkeit, Osteoblasten und Osteozyten. Sie sind in der Lage, bei Änderungen der mechanischen Krafteinwirkungen auf den Knochen strukturelle Anpassungen durch dieses kommunizierende Netz durchzuführen, indem die Zellen ihre metabolische Aktivität ändern (Liebich 2004, Iniguez-Ariza und Clarke 2015). Osteozyten dienen als Mechanosensoren, die den Grad der Verformung messen (Messung erfolgt in Microstrain  $\mu\epsilon$ ) und bis zu gewissen Grenzen die Reparatur von Mikroschäden initiieren können (Engelhardt 2005, Rochefort et al. 2010). Ist die Verformung größer, als das Knochengewebe durch Anpassung kompensieren kann, kommt es zur plastischen Verformung durch Mikrofrakturen und der Knochen wird bleibend beschädigt. Verformungen über 15000  $\mu\epsilon$  führen in der Regel zur Fraktur, wobei die Belastungen für den Knochen bei Kompression am höchsten sind, gefolgt von Zugkräften und Scherbewegungen (Engelhardt 2005).

Die knochenabbauenden Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die durch Verschmelzung mononukleärer Vorläuferzellen entstanden sind. Dieser Vorgang wird u.a. von dem Monozytenkolonien-stimulierender Faktor (M-CSF) und dem „Receptor Activator of

NF- $\kappa$ B Liganden“ (RANKL) induziert (Florencio-Silva et al. 2015). M-CSF bindet an seinen Rezeptor (cFMS), der sich auf Osteoklastenvorläuferzellen befindet und stimuliert deren Proliferation und inhibiert ihre Apoptose (Yavropoulou und Yovos 2008, Florencio-Silva et al. 2015). RANKL ist essentiell für die Osteoklastenbildung und wird von Osteoblasten, Osteozyten und mesenchymalen Stammzellen exprimiert. Durch Bindung von RANKL an seinen Rezeptor RANK in den Osteoklastenvorläuferzellen wird die Osteoklastenbildung induziert (Sodek und McKee 2000, Florencio-Silva et al. 2015). Osteoklasten bilden proteolytische Enzyme und Lysosomen, um die Knochengrundsubstanz zu zersetzen und mit ihren zahlreichen Zellausstülpungen („ruffled border“) das zersetzte Material zu resorbieren (Iniguez-Ariza and Clarke 2015). Osteoklasten sind stoffwechselaktive und mobile Zellen. Nach der Knochenresorption lösen sie sich von der Knochenoberfläche, hinterlassen die Howship-Lakune und wandern zu einer anderen Oberfläche, wo sie erneut mit dem Knochenabbau beginnen. Dabei baut ein Osteoklast pro Zeiteinheit bis zu drei Mal mehr Matrix ab, als von Osteoblasten aufgebaut wird (Liebich 2004, Florencio-Silva et al. 2015).

### **2.1.3 Osteogenese**

Knochenbildung erfolgt über zwei Mechanismen: Die intramembranöse und die enchondrale Knochenbildung. In beiden Prozessen ist die Knochensynthese durch die Osteoblasten identisch. Osteoblasten beginnen die Synthese der Knochenmatrix mit Bildung von Kollagen Typ I, was den Hauptanteil in der Knochenmatrix darstellt. Dabei folgt die Knochenheilung den gleichen Mustern wie die embryonale Knochenentwicklung, nur dass die Art der Heilung (enchondral oder intramembranös) durch das biomechanische Umfeld bestimmt wird (Shapiro 2008, Shahi et al. 2017).

Die intramembranöse Knochenbildung wird durch die innere periostale osteogene Zellschicht mediiert. Mesenchymale Stammzellen proliferieren und bilden Zellhaufen, innerhalb derer sich die Knochenzellen direkt über Präosteoblasten zu Osteoblasten ohne Knorpelvorstufen differenzieren (Baron 2000, Shapiro 2008). „Bone Morphogenetic Proteins“ (BMPs) scheinen für den Prozess der mesenchymalen Stammzellkondensation essentiell zu sein. Die Osteoblasten produzieren Geflechtknochen, welcher anschließend im Remodellingprozess resorbiert und durch Lamellenknochen ersetzt wird (Baron 2000).

Bei der enchondralen Osteogenese bildet sich Lamellenknochen über Hyalinknorpelmodelle. Es entsteht zunächst Geflechtknochen, der dann zu Lamellenknochen umgebaut wird



(Weyrauch und Smollich 1998, Shapiro 2008). Während der fetalen Entwicklungsphase wird das Primordialskelett, ein knorpeliges Stützskelett, angelegt. Dieses prägt als Platzhalter die Gestalt des gesamten Körpers, bis er später vom knöchernen Skelett ersetzt wird. Diese Umwandlung geht von den primären und sekundären punktförmigen Ossifikationszentren aus. Sie beginnt während der mittleren Fetalperiode und findet ihren Abschluss mit Verwachsen der Wachstumsfuge oft erst im Erwachsenenalter (König 2001, Houston et al. 2016).

Bei den langen Röhrenknochen beginnt die chondrale Osteogenese zuerst in der Diaphyse mit der perichondralen Ossifikation. Osteoprogenitorzellen aus dem Stratum osteogenicum des Perichondrium vermehren und differenzieren sich zu Osteoblasten. Diese produzieren die Interzellulärsubstanz des Knochengewebes, das Osteoid. Durch Austausch von Wasser gegen anorganische Knochenbestandteile, wie Kalziumphosphat (85-90 %) erfolgt die Mineralisierung des unverkalkten Osteoids. Die perichondrale (später periostale) Knochenmanschette hat sich gebildet und aus dem Perichondrium wird das Periost. Durch die zunehmende Verdickung der Manschette kommt es zu gewebsmechanischen Veränderungen und der Stoffwechsel wird gehemmt, sodass der diaphysäre Knorpel hypertrophiert. Es entsteht der Blasenknorpel. Dieser gibt den Reiz für umgebendes mesenchymales, gefäßreiches Bindegewebe in das Innere der Diaphyse einzudringen und den verkalkten Blasenknorpel mit Chondroklasten abzubauen. In die freiwerdenden Räume dringen Bindegewebe und Kapillaren für die Versorgung des neuzubildenden Gewebes ein. Der Knorpel wird nicht vollständig resorbiert und hinterlässt ein Netz aus Knorpelbälkchen, auf denen sich die mit dem Blut angeschwemmten Osteoblasten ansiedeln und schichtweise Osteoid absondern- der Beginn der enchondralen Ossifikation. Es bildet sich die primäre Markhöhle. Das darin befindliche lockere Bindegewebe wird zu blutbildendem Gewebe umgewandelt und es entsteht die sekundäre Markhöhle. Das rote Knochenmark wandelt sich in der Diaphyse mit zunehmendem Alter in gelbes Fettmark und in hohem Alter oder nach Erkrankungen in Gallertmark um (König 2001, Houston et al. 2016).

Durch die zuvor gebildete perichondrale Knochenmanschette geraten die Knorpelzellen unter Zugspannung und die Chondrozyten werden angeregt, sich unter Vermehrung in säulenartigen Reihen anzuordnen. Der Säulenknorpel degeneriert dann zum Blasenknorpel. Die Zellen schwellen wegen der Akkumulation von Glykogen und der durch ihr Abwandern von ihrer vaskulären Versorgung entstandenen Hypoxie an (Denny und Butterworth 2000). Dieses Längenwachstum des Knorpels ist die Grundlage für das spätere Knochenwachstum. So entstehen verschiedene übereinanderliegende Zonen:

Die Proliferationszone wird geprägt durch die starke Wachstumsaktivität des Säulenknorpels. In der Verkalkungszone vergrößern sich die Chondrozyten durch Wasseraufnahme zu Blasenknorpel und die Grundsubstanz verkalkt. In der Resorptionszone wird das Knorpelgewebe durch Chondroklasten aufgelöst. Dadurch entstehen in der Ossifikationszone verzweigte Knochenbälkchen mit Osteoblastensäumen, die die enchondrale Spongiosa prägen. Der zunächst gebildete Geflechtknochen wird anschließend durch Lammellenknochen ersetzt. Durch den Abbau des primären Knochens durch Osteoklasten entstehen Einbuchtungen- die Howship- Lakunen. Dort produzieren Osteoblasten konzentrisch um das eingewachsene Blutgefäß (Havers Gefäß) die typischen Knochenlamellen (Weatherholt et al. 2012, Weyrauch und Smollich 1998). Auch in die Epiphysen dringen mesenchymale Gewebssprossen ein und lösen den Knorpel auf, sodass ein epiphysärer Knochenkern entsteht. Lediglich ein Knorpelbereich zwischen Diaphyse und Epiphyse bleibt als Epiphysenfuge für das weitere Längenwachstum erhalten, bis dieser schließlich auch ossifiziert und nur noch der Gelenkknorpel übrig ist.

Das Dickenwachstum erfolgt über die periostale Knochenmanschette. Dabei kommt es außen zum Anbau von Knochengewebe durch Osteoblastenaktivität bei gleichzeitiger Resorptionsaktivität durch Osteoklasten auf der Innenseite (Rohen und Lütjen-Drecoll 2000, Buck und Dumanian 2012a).

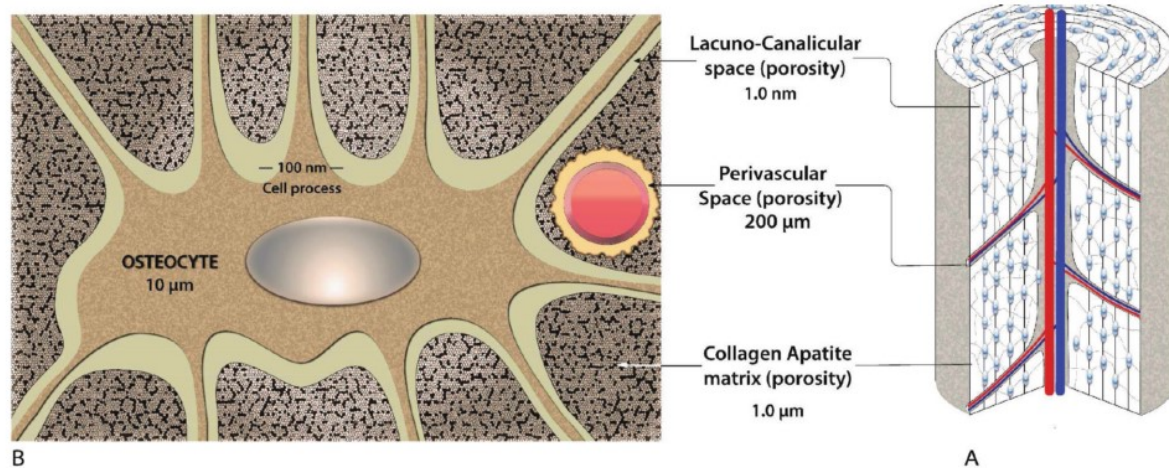
### **2.1.3.1 Geflechtknochen**

Es wird Geflechtknochen von Lamellenknochen unterschieden. Der Geflechtknochen besteht aus einem ungeordneten Netz aus verknöchertem Bindegewebe (Sommerfeldt und Rubin 2001, Buck und Dumanian 2012a). Mesenchymale Stammzellen differenzieren sich zu Osteoblasten, welche direkt Knochensubstanz abscheiden. Kollagenfasern ordnen sich darin in Richtung der Hauptspannungslinien an und werden hauptsächlich durch den Einbau von Hydroxylapatit versteift. Dieses bildet nadelförmige Kristalle, die von einem Hydratmantel, der für die Mobilisierung von Kalziumionen aus dem Knochen wichtig ist, umgeben sind. Durch die Mineralisierung sind die Kollagenfasern nicht mehr gegeneinander verschieblich und es entsteht eine große Festigkeit (Rohen und Lütjen-Drecoll 2000). Die Osteoblasten liegen meist in epithelartiger Anordnung reihenweise nebeneinander. Nach der Mineralisierung der Grundsubstanz wandeln sie sich in Osteozyten um. Die Lakunen, in die sie im späteren Lamellenknochen eingebettet sind, stellen eine große Oberfläche dar, aus der sie viel Kalzium ohne große Knochenveränderungen mobilisieren können (Denny und Butterworth 2000). Geflechtknochen wird während der embryonalen Entwicklung angelegt

und später durch Lamellenknochen ersetzt (Buck und Dumanian 2012a). Die Kollagenfasern werden ungeordnet in dem Knochengewebe abgelagert, was die biomechanische Festigkeit deutlich verringert. Dadurch tritt Geflechtknochen postpartal hauptsächlich während der Frakturheilung, am Schädelknochen, der Clavicula, in den Zahnalveolen und dem knöchernen Labyrinth des Ohres auf und dort, wo Bindegewebe über längere Zeit, gleichzeitig auf Zug- und Druckbelastungen beansprucht wird (Rohen und Lütjen-Drecoll 2000, Engelhardt 2005, Buck und Dumanian 2012a). So sind das beispielsweise Knochenvorsprünge, an denen sich Bänder oder Sehnen verankern (Sommerfeldt und Rubin 2001).

### **2.1.3.2 Lamellenknochen**

Lamelläre Knochen ersetzt den Geflechtknochen und wird ausschließlich in adulten Säugetieren produziert. Er besteht aus konzentrischen Schichten von dicht gepackten, parallel angeordneten Kollagenfibrillen. Dabei ändert sich von Lamelle zu Lamelle regelmäßig die Verlaufsrichtung der Kollagenfasern, sodass sich kreuzende Gitter entstehen. Dadurch entsteht eine hohe mechanische Festigkeit bei gleichzeitig geringem Gewicht (Engelhardt 2005, Shapiro 2008). Die Osteozyten befinden sich zwischen den Lamellen. Diese strukturelle Grundlage ist das Osteon, welches mittig das Havers-Gefäß und Nerven im Havers-Kanal enthält. Die Gefäße stehen miteinander über quer zu den Lamellen verlaufenden Volkmann-Kanälen in Verbindung (Havers-System) (Weyrauch und Smollich 1998, Buck und Dumanian 2012a). Lamellenknochen ist somit ein außerordentlich gut durchblutetes Gewebe, das intensiv am Stoffwechsel des Gesamtorganismus teilnimmt (Rohen und Lütjen-Drecoll 2000). Durch die Fähigkeit der funktionellen Adaptation der Knochenbinnenstruktur entstehen Osteone, die ihre Aufgaben verloren haben- sogenannte Schaltlamellen. Die einzelnen Osteone sind durch Zementlinien voneinander getrennt (Remedios 1999, Buck und Dumanian 2012a). Diese können nicht von anderen Strukturelementen des Knochens durchdrungen werden, was Verschiebungen zwischen einzelnen Knochenabschnitten ermöglicht. Dadurch verleiht das Havers System dem Knochen trotz großer mechanischer Belastbarkeit eine gesteigerte Flexibilität und schränkt die Ausbreitung von Mikrofrakturen im Knochen ein (McGavin und Zachary 2009).



**Abbildung 1: Mikroskopische Anatomie des Knochens:** A) Schematische Darstellung eines Osteozyten. B) Schematische Darstellung eines Osteons mit zentralem Havers-Kanal und davon abgehenden Volkmann-Kanälen. Das Osteon besteht aus konzentrischen Knochenlamellen. Dazwischen befinden sich die Howship-Lakunen- darin eingebettet die Osteozyten (Abb. aus Yavropoulou und Yovos 2016).

#### 2.1.4 Frakturheilung

Bei einer Fraktur kommt es zu einer vollständigen oder unvollständigen Kontinuitätsunterbrechung von Knorpel und/oder Knochen. Diese entsteht, wenn eine von außen wirkende direkte oder indirekte Kraft die Elastizität des Knochengewebes übersteigt. Mindestens 75-80 % aller Frakturen werden durch direkte Gewalteinwirkung bei Unfällen im Straßenverkehr verursacht. Knochenbrüche können nach mehreren Gesichtspunkten eingeteilt werden:

Nach der Anzahl der Fragmente wird zwischen einfachen Frakturen, Mehrfachfrakturen und Trümmerfrakturen unterschieden. Frakturen können mit oder ohne Gelenkbeteiligung, geschlossen oder offen, durch Wunden mit direkter Verbindung zur Umwelt, sein. Heilen die Bruchenden bei korrekter Apposition ohne fixierenden chirurgischen Eingriff, spricht man von stabiler Fraktur bzw. Frakturheilung. Knochenerkrankungen, wie Neoplasien, Osteomalazie, Osteomyelitis zerstören oder schwächen den Knochen, sodass es schon bei physiologischen Krafteinwirkungen zu pathologischen Frakturen kommt. Anhaltende Belastungen, die die Reparaturfähigkeit des Knochens übersteigen, führen zu Ermüdungsfrakturen. Mikrofrakturen sind nur histologisch sichtbar. Je nach Verlauf der Bruchlinie lassen sich Schrägfrakturen, Querfrakturen, Spiralfrakturen, Mehretagenbrüche und Infraktionen voneinander differenzieren. Bei einer Abrissfraktur kommt es durch übermäßigen Zug an einem Bandansatz zum Ausriss eines Knochenfragmentes. Eine Fissur stellt einen kleinen Haarriss in der Kortikalis dar. Dabei bleibt das darüber liegende Periost erhalten. Eine

Grünholzfraktur stellt eine partielle Fraktur der Kortikalis eines unreifen Knochens mit Zerreißung des Periosts auf der Zugseite des Knochens dar, wobei die dem Druck ausgesetzte Seite intakt bleibt. Auch ist die Geschwindigkeit der ausgeübten Kraft bedeutend für Art und Ausmaß der Verletzung. Langsame Kraftausübung führt zu einfachen Frakturen mit geringem Weichteilschaden, wohingegen hohe Geschwindigkeiten Splitterfrakturen mit hohem Weichteilschaden verursachen (Brinker et al. 1993, Trostle und Markel 1996, Fossum 2009, McGavin und Zachary 2009, Niemand und Suter 2012, Baumgärtner 2015).

Bei juvenilen, noch nicht ausgewachsenen Menschen ist der Knochen noch elastischer und lässt sich stärker verformen, bevor es zu einem Bruch kommt. Die Matrix ist reicher an Kollagen und Wasser und hat einen geringeren Kalziumapatitgehalt. Das Periost ist dick und gefäßreich, was das veränderte biomechanische Verhalten begründet (Bonath und Prieur 1998). Daher treten bei Heranwachsenden häufiger inkomplette Frakturen, wie Grnholzfrakturen auf. Die Frakturheilung läuft aber wesentlich schneller ab (Bonath und Prieur 1998, Augat et al. 2005). Frakturen können hier jedoch auch die Wachstumsfuge betreffen, die das weitere Knochenwachstum drastisch einschränken und zu Fehlstellungen führen können (Denny und Butterworth 2000, Niemand und Suter 2012).

Die Quelle der Zellen für die Knochenheilung können das Periost, das Endost, Osteoprogenitorzellen aus den Blutgefäßen und undifferenzierte mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark und umgebendem Weichteilgewebe sein (Shapiro 2008).

#### **2.1.4.1 Primäre Knochenheilung**

Bei der Knochenheilung unterscheidet man die primäre von der sekundären Knochenheilung. Die primäre bzw. direkte Frakturheilung kann bei vorhandener Vaskularitt erfolgen und wenn die Knochenenden, z.B. durch chirurgische Fixierung, anatomisch exakt reponiert sind und eine Bewegung im Frakturspalt stark dezimiert wird (Phillips 2005, Marsell und Einhorn 2011). Die direkte Frakturheilung unterteilt sich in Abhängigkeit der Spaltgröße in Kontakt- und Spaltheilung. Bei der Kontaktheilung bilden sich direkte Osteonenbrcken über dem maximal 0,01 mm breiten Frakturspalt (Shapiro 1988, Marsell und Einhorn 2011). Ist der Frakturspalt weniger als 0,8-1 mm groß, erfolgt die Spaltheilung (Kaderly 1991, Marsell und Einhorn 2011). Zunächst wird dieser mit einem Geflecht aus fibrösem Knochen gefüllt, der mechanisch jedoch noch nicht belastbar ist. Nach sieben bis acht Wochen erfolgt der Haverssche Umbau in longitudinaler Ausrichtung. Osteoklasten formen Kanäle für die

neuen Osteone, die die Knochenenden ohne Bildung eines Kallus zapfenartig miteinander verzahnen. Der Unterschied zur Kontaktheilung ist, dass Knochenvereinigung und Haversscher Umbau nicht simultan erfolgen. Es erfolgt keine Resorption der Frakturenenden, wie bei der sekundären Heilung (Marsell und Einhorn 2011).

#### **2.1.4.2 Sekundäre Knochenheilung**

Die meisten Frakturen heilen über die sekundäre bzw. indirekte Knochenheilung, die sowohl aus enchondraler als auch aus intramembranöser Ossifikation besteht (Marsell und Einhorn 2011, Buck und Dumanian 2012b). Überschreitet der Frakturspalt die Breite von 1 mm, erfolgt die Heilung über die Bildung von Geflechtknochen (McGavin und Zachary 2009). Bei der sekundären Frakturheilung fördern Bewegungen im Frakturspalt die Bildung von periostalem, endostalem und kortikalem Kallus (McKibbin 1978), wobei das Ausmaß der Kallusbildung proportional zur interfragmentären Bewegung ist. Die sekundäre Frakturheilung basiert auf folgender sich überlappenden Regenerationskaskade:

1. Phase: Entzündungsreaktion mit Bildung eines Frakturhämatoms; einwachsendes Granulationsgewebe bildet einen Bindegewebskallus; 0-5 Tage
2. Phase: dieser wird zunehmend vom knorpeligen „weichen“ Kallus ersetzt; 4-40 Tage
3. Phase: über die Geflechtknochenbildung entsteht der knöcherne Kallus; 4-40 Tage
4. Phase: schließlich langsames Remodelling in reifen Lamellenknochen, Kallusabbau und funktioneller Umbau nach den vorherrschenden Druck und Zugbelastungen, 6-9 Jahre (Simmons 1985, Shapiro 2008, McGavin und Zachary 2009).

Die zunehmende Bildung von festerem Gewebe im Frakturspalt ist eine biologische Methode zur schrittweisen Verringerung der Bewegung und damit des Stresses auf das sich regenerierende Gewebe (Augat et al. 2005, Fossum 2009). Denn kein Gewebe entsteht unter Bedingungen, bei denen seine Existenz nicht möglich ist. Es besteht unter den verschiedenen Zelltypen eine große Differenz in der Toleranz gegenüber den einwirkenden Kräften.

**Tabelle 1: Stresstoleranz der verschiedenen Zelltypen im Frakturkallus** (Piermattei 2006, Shapiro 2008).

Zelltyp	Dehnungstoleranz in Prozent	Biegungstoleranz in Grad
Granulationsgewebe	100 %	40°
Knorpel	15 %	5°
Knochen	2 %	0,5°

So hat das erste Gewebe- das Granulationsgewebe eine Dehnungstoleranz von 100 %. Es kann auf seine doppelte Länge gedehnt werden, bevor es zur Gewebsruptur kommt. Die Dehnungsfähigkeit des Frakturspaltens sinkt und Faserknorpel kann sich bilden. Dieser besitzt nur noch ein Zehntel der Dehnungsfähigkeit des Granulationsgewebes. Zudem verbessert sich unter Kompression die Steifigkeit des Faserknorpels. Sinkt die Dehnungsfähigkeit auf unter 2 %, kann Knochengewebe gebildet werden (Trostle und Markel 1996, Bonath und Prieur 1998, Shapiro 2008).

#### 2.1.4.2.1 1. Phase : Entzündungsreaktion und Hämatombildung

Durch ein initiales Trauma zerreißen Blutgefäße im Markraum und Periost. Es kommt zu Blutungen mit anschließender Hämatombildung, sodass die Blutversorgung abnimmt und es zu Nekrosen an den Fraktarenden kommt. Osteozyten sterben durch die Gewebsschädigung und den infolge von Thrombosierung entstandenen Sauerstoff- und Nährstoffmangel ab. Die Nekrose und die Hämatombildung sind entscheidende Reize für die Kallusbildung. In der inflammatorischen Phase befinden sich innerhalb von 24–48 Stunden nach der Fraktur Entzündungsmediatoren, angiogenetische Substanzen sowie Wachstumsfaktoren im Hämatom, die vom Blut, lokalen Makrophagen, Thrombozyten, verletzten Gewebszellen und dem proliferierendem, osteogenem Gewebe des Periosts freigesetzt werden und die spätere Bildung von Geflechtknochen stimulieren (Bonath und Prieur 1998, Augat et al. 2005, Ruschke et al. 2012). Dazu zählen hauptsächlich Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und der Tumornekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) (Kon, Cho et al. 2001). Diese zeigen ebenfalls erhöhte Expressionsmuster in der späteren Phase des Remodelling (Dimitriou et al. 2005). Auch Platelet derived growth factors (PDGF) und Transforming growth factors- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (darunter Bone morphogenetic Protein 2), beteiligen sich an der Einleitung der Heilungskaskade (Bolander 1992, Dimitriou et al. 2005, Marsell und Einhorn 2009). Die

Hyaluronsäure im Kallus fördert die Migration und Proliferation von Mesenchym- und Endothelzellen. Nach 24-48 Stunden befinden sich bereits erste Gefäßsprossen im Hämatom und umgeben die Fragmentenden. Makrophagen begünstigen das Wachstum von Fibroblasten und mit ihrem Interleukin-1 (IL-1) wird die Angiogenese und Produktion des primären knorpeligen Kallus initiiert (Lee and Lorenzo 2006). Dagegen schütten Osteoblasten in der akuten Phase, durch IL-1 angeregt, IL-6 aus und stimulieren somit die Angiogenese, VEGF (Vascular endothelial growth factor)–Produktion und die Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten (Yang et al. 2007). Im Allgemeinen konnte nachgewiesen werden, dass Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Kallusgewebe spielen und durch sie die verschiedenen Stadien der Frakturheilung unterschieden werden können (Bonath und Prieur 1998, Remedios 1999, Bragdon et al. 2015).

#### 2.1.4.2.2 2. Phase: Bildung des knorpeligen Kallus

Das entstandene Fibringerüst wird durch Granulationsgewebe ersetzt. Dieses besteht aus Entzündungszellen, Fibroblasten, Kollagen und Kapillaren. Phagozytierende Zellen wandern ein und resorbieren das abgestorbene Material, sodass der Frakturspalt erweitert wird und die interfragmentären Dehnungsbelastungen auf das neue Gewebe verringert werden (Denny und Butterworth 2000, Perren 2001). Osteoprogenitorzellen differenzieren sich zu Chondrozyten. Diese produzieren die extrazelluläre Matrix und bilden den knorpeligen Kallus, der reich an Kollagen Typ II und Proteoglykanen ist (Marsell und Einhorn 2011, Bragdon et al. 2015). Nach sieben bis neun Tagen hat der stabilere Faserknorpel den bindegewebigen Kallus ersetzt (Dimitriou et al. 2005, Marsell und Einhorn 2011). Der weiche Kallus beginnt an den proximalen und distalen Rändern der Fraktur und wandert einwärts (Bragdon et al. 2015), da u.a. die Proliferation von den sich dann differenzierenden mesenchymalen Stammzellen vom Peri- und Endost ausgeht. Außerdem ist dort die Dehnung am geringsten, weil die Zugkräfte sich auf eine größere Fläche verteilen (Bonath und Prieur 1998). Anzumerken sei, dass die mesenchymalen Stammzellen sich in Abhängigkeit von ihrer lokalen Umwelt zu Fibroblasten, Chondroblasten oder Osteoblasten differenzieren. Unter idealen Bedingungen von Kompression und optimaler Sauerstoffversorgung, entwickeln sich Osteoblasten und es kommt zu einer schnellen Heilung in Form von Geflechtknochen. Bei geringer Stabilität und Sauerstoffversorgung überleben keine Osteoblasten. Es entstehen Chondroblasten, die hyalinen Knorpel bilden und die Mineralisierung über enchondrale Ossifikation erfolgt. Steht das Gewebe unter



Zugspannung, differenzieren sich Fibroblasten. Das gebildete Bindegewebe gibt weder Stabilität, noch können Zellen einwandern, sodass die Fraktur nicht mineralisieren und folglich auch nicht heilen kann (Denny und Butterworth 2000, Shapiro 2008).

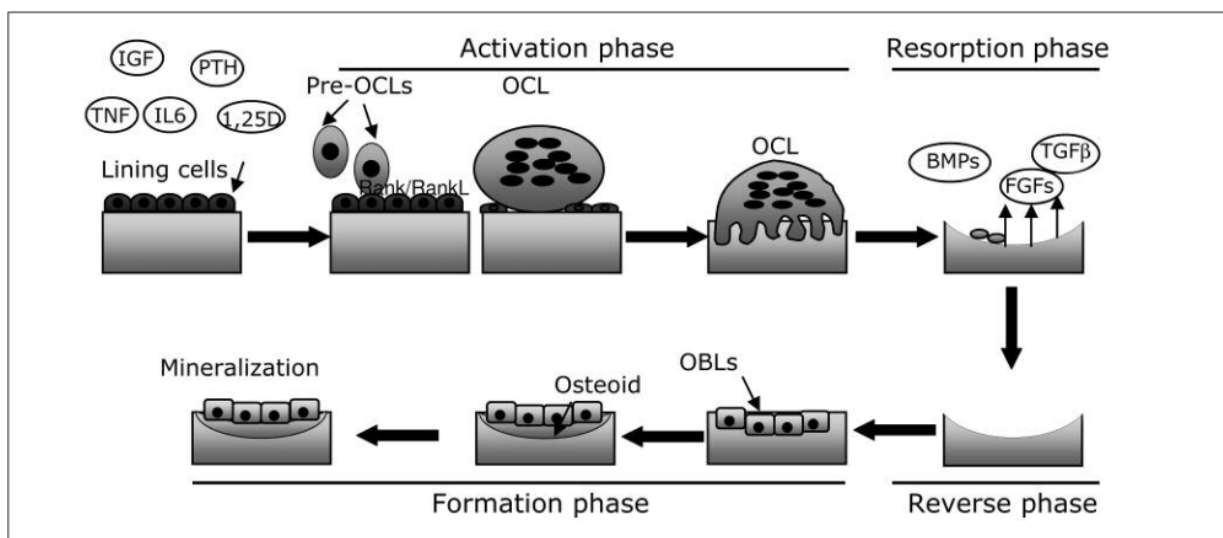
#### **2.1.4.2.3 3. Phase: Bildung des harten Kallus**

Chondrozyten proliferieren, reifen und hypertrophieren, was zu erhöhter Kollagen Typ X Produktion und Matrixmineralisierung führt (Bragdon et al. 2015). Die Kalzifizierung geht von den Chondrozyten aus. In ihren Mitochondrien akkumulieren sie Kalziumionen, welche die Zelle in die extrazelluläre Matrix ausschüttet. Außerdem sezernieren die Chondrozyten Phosphatasen, die die Phosphationen aus der Matrix freisetzen. Die Kalziumionen verbinden sich mit den Phosphationen und bilden Apatitkristalle (Ketenjian und Arsenis 1975, Voggenreiter 2009). Dabei induziert TNF- $\alpha$  die Apoptose von den hypertrophierten Chondrozyten (Dimitriou et al. 2005, Ai-Aql et al. 2008). Nach vier bis fünf Wochen wird der Kallus durch hauptsächlich kalzifizierten Knorpel geprägt, welcher nun durch Knochen ersetzt wird (Voggenreiter 2009). Es besteht eine erhöhte Expression von M-CSF, RANKL und Osteoprotegerin, was Osteoklasten rekrutiert und deren Differenzierung reguliert (Marsell und Einhorn 2011, Bragdon et al. 2015). Osteoklasten bilden Resorptionskanäle und neue Kapillaren und Osteoblasten können einwandern, sodass der Knorpel durch Knochen ersetzt wird. Wenn die knöcherne Überbrückung des Frakturspaltes stattgefunden hat, sind die Fragmentenden nicht mehr verschieblich. Die knöcherne Kallusmanschette vergrößert den Durchmesser des Knochens und trägt somit weiter zur Stabilisierung bei. Dieser harte Kallus ist ein mechanischer Schutz für einwachsende Gefäße und die Regeneration kann im Inneren des Frakturspaltes fortgesetzt werden (Bonath und Prieur 1998). Die TGF- $\beta$ -Superfamilie (Transforming growth factor-beta) hat dabei entscheidenden Einfluss auf die Knorpel- und Knochenbildung. Hervorgehoben sei das BMP-2 (Bone morphogenetic Protein 2), welches essentiell für den Beginn der Heilungskaskade ist, sodass Mäuse mit inaktivierenden Mutationen bei BMP-2 nicht fähig sind, Kalli auszubilden (Tsuji et al. 2006).

#### **2.1.4.2.4 4. Phase: Remodelling**

Nach etwa sechs Wochen ist die vollständige Mineralisierung in Form des primären Kallus erfolgt, wobei neben dem neuen Geflechtknochen weiterhin noch kalzifizierter Knorpel vorliegt (Voggenreiter 2009). Das langwierige Remodelling beginnt. Geflechtknochen wird

durch Lamellenknochen ersetzt (Bonath und Prieur 1998, Gerstenfeld et al. 2003b). Diese Phase wird von TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 geleitet (Gerstenfeld et al. 2003a), wobei auch hier BMP-2 hohe Expressionslevel aufweist (Marsell und Einhorn 2009, Bragdon et al 2015). Durch axiale Belastung der langen Röhrenknochen werden konvexe Knochenoberflächen elektropositiv und konkave Oberflächen elektronegativ. Es entsteht ein elektrisches Feld, wodurch Osteoklasten und Osteoblasten aktiviert werden. Osteoklasten und Osteoblasten sind Teil der „Basic Multicellular Units“ (BMUs), die verantwortlich für den Remodellingprozess sind. Durch sie wird der Geflechtknochen durch Lamellenknochen ersetzt und überschüssiger Kallus abgebaut, wodurch die Markhöhle wiederhergestellt wird (Andrew und Bassett 1971, Trostle und Markel 1996, Knothe Tate 2003). In Abhängigkeit von der Belastung wird der Kallus durch Osteoklasten der physiologischen Struktur angepasst oder permanent erhalten bleiben (McGavin und Zachary 2009). Dabei bauen die Osteoklasten den Knochen in Form einer zylinderförmigen Kuppel, „cutting cone“, ab, woraufhin die Osteoblasten den Raum mit konzentrisch geschichtetem neuem Knochengewebe, den sekundären Osteonen, auffüllt (Harrison und Cooper 2015). Dies kann sechs bis neun Jahre dauern (Remedios 1999).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Remodelling-Prozesses des Knochens.** Aktivierungsphase: Knochendeckzellen werden durch verschiedene Reize aktiviert und erhöhen die Oberflächenexpression des Liganden RANKL. RANKL interagiert mit seinem Rezeptor RANK (Rezeptor Aktivator von Nuklear  $\kappa$ B) und triggert somit die Osteoklasten-Differenzierung. Resorptionsphase: Osteoklasten resorbieren Knochen, sodass Mediatoren (u.a. BMPs, TGF $\beta$ ) aus der abgebauten Knochenmatrix freigelassen werden, die Osteoblasten anlocken. Bildungsphase: Diese Osteoblasten produzieren neue Knochenmatrix und initiieren dessen Mineralisierung. (Pre-OCLs- Osteoklastenvorläuferzellen, OCL- Osteoklasten, OBLs- Osteoblasten) (Abb. aus Rucci 2008).

### **2.1.4.3 Heilungsrate**

Ob ein Knochenbruch nach den oben genannten Vorgängen ohne weitere Komplikationen heilt, ist abhängig von vielen Faktoren. Unter anderem beeinflussen die Heilungsrate der Knochentyp, der Frakturtyp, das Alter des Patienten, die Behandlungsmethode, die Belastung durch den Patienten oder das Vorliegen von Infektionen oder systemischen Erkrankungen (z.B. Morbus Cushing, Diabetes mellitus, chronisches Nierenversagen, sekundärer Hyperparathyreoidismus) (Denny und Butterworth 2000, Pountos et al. 2013).

So hat Spongiosaknochen eine größere Blutversorgung und Zellaktivität als kortikaler Knochen, sodass Defekte an der Epi- und Metaphyse schneller regenerieren als an der Diaphyse (Denny und Butterworth 2000). Brüche bei Juvenilen, die sich durch eine höhere Teilungsaktivität ihrer Zellen sowie höhere Elastizität und Festigkeit der Knochen auszeichnen oder Fragmente, die eng beieinander liegen, heilen schneller als Trümmerfrakturen, bei denen man Instabilität und zerstörte Blutgefäße nachweisen kann. Andererseits kommt es bei einfachen Brüchen mit quer verlaufenden Frakturlinien trotz geringer Zerstörung von Blutgefäßen auch zur Verzögerung (Denny und Butterworth 2000, Augat et al. 2005). Auch die Größe des Knochenspaltes beeinflusst die Heilungsrate. Studien zeigen, dass größere Spaltbreiten (> 2 mm) eine Verzögerung in der Knochenheilung hervorrufen (Augat et al. 1998).

### **2.1.4.4 Komplikationen in der Knochenheilung**

Konnte nach einer adäquaten Zeit von ca. sechs bis zwölf Wochen keine knöcherne Überbrückung erreicht und somit die Heilung abgeschlossen werden, spricht man von verzögerter oder laut der Food and Drug Administration (FDA) nach neun Monaten sogar von ausbleibender Heilung, wenn seit drei Monaten keine weiteren Prozesse mehr stattgefunden haben (Pountos et al. 2013). Es entstehen sogenannte Non-Unions (Megas 2005, Grünbaum 2007). Dies geschieht, wenn der Frakturspalt und somit das sich neu zu bildende Gewebe ungünstigen Bedingungen ausgesetzt ist.

Im Allgemeinen sind gestörte Vaskularität und Instabilität der Frakturrenden die Hauptfaktoren, die zu einer gestörten Heilung führen (Megas 2005, Matuszewski und Mehta 2011). Eine mangelhafte Blutversorgung führt zu Ischämie und Nekrosen. Liegt eine unzureichende Stabilisation oder eine zu frühe oder zu starke Belastung der frakturierten

Gliedmaße und somit große Unruhe im Frakturspalt vor, kommt es zur Bildung von nicht stabilisierendem, fibrösem Bindegewebe, welches sich nicht in Knochen umwandeln kann und die Ausbildung einer Non-Union begünstigt (Claes et al. 2002, Claes et al. 2003). Unsachgemäße Immobilisation kann zu Inaktivitätsatrophie führen. Es kommt durch zu starke Kompression der Implantate zu Mikrofrakturen und Nekrosen der Osteone.

Fehlerhaft durchgeführte Osteosynthesen u.a. können Fremdkörperreaktionen auf das Implantat auslösen, was in chronischen Entzündungen mündet. Mögliche Folgen der Entzündungen wären eine Fehlstellung oder der Verlust des Implantats. Ein übermäßiger Einsatz von Implantaten beeinträchtigt die Blutversorgung, sodass zu viel Metall und eine erhöhte operative Manipulation die Gefäße schädigen und deren Neubildung verhindert. Werden inadäquate Materialien verwendet, entstehen Intoxikationen und Nekrosen. Bei z.B. gleichzeitigem Einsatz nicht miteinander kompatibler Metalle, entstehen durch die Elektrolyse galvanische Ströme, die Osteolyse und Implantatlockerung zur Folge haben (Bonath und Prieur 1998, Remedios 1999, Grünbaum 2007, McGavin und Zachary 2009). Auch Osteomyelitiden stellen Komplikationen in der Frakturheilung dar, denn 58 % der Infektionen sind bedingt durch die Operation. Auf den Oberflächen von Implantaten bilden sich Biofilme, die die Adhäsion von Mikroorganismen fördern (Denny und Butterworth 2000). Zusätzlich produzieren Bakterien eine Glykokalix, die ebenfalls das Anheften an das Implantat unterstützt. Diese Biofilme machen es Antibiotika und den wirtsspezifischen Abwehrmechanismen unmöglich, die Infektion zu bekämpfen (Fossum 2009, Kiedrowski und Horswill 2011).

Vorliegende Allgemeinerkrankungen, fehlerhafte Ernährung, Infektionen und hormonelle Störungen beeinflussen die Heilung negativ. So bedeuten offene Frakturen mit Zerreißen, Quetschung von Geweben und Fremdköperleinlagerung eine direkte Verbindung zur Umwelt, was Eiterung und verzögerte oder ausbleibende Heilung mit sich führen kann. Ist die Diastase der Fragmente zu ausgeprägt, kann der Kallus den Defekt nicht mehr überbrücken. Handelt es sich bei der Fraktur um eine pathologische, ist die primäre Ursache der krankhaft veränderte Knochen (z.B. Metastasen bei Lungen- und Mammakarzinom, Knochensarkom, angeborene oder erworbene Osteopathien), sodass eine Heilung oft schwierig bis nicht möglich ist. Eine frühzeitige Tumorentfernung und Ersatz durch xenogene, allogene oder autogene Materialien führen manchmal zum Erfolg.

Zusammengefasst können eine unsachgemäße und fehlerhafte Frakturbehandlung (u.a. schlechte Entscheidungen vor der OP und technische Fehler während der OP) und schwerwiegende Weichteilschäden die häufigsten Ursachen für Heilungsstörungen sein (Bonath und Prieur 1998, Remedios 1999, Grünbaum 2007, McGavin und Zachary 2009).

#### 2.1.4.4.1 Einteilung der Non-Unions

Röntgenologisch stellt sich eine verzögerte Heilung durch eine persistierende Frakturlinie mit mineralisiertem Kallusgewebe dar. Der Markraum ist offen, die Frakturoberfläche uneben und Sklerose hat nicht stattgefunden. Im Gegensatz dazu, erkennt man eine ausbleibende Heilung an dem persistierenden Spalt zwischen den Frakturenden mit vorangeschrittener Sklerose und Hypertrophie bzw. Atrophie der Knochenenden (Megas 2005). Die Markhöhle ist geschlossen und die Frakturoberfläche ist glatt. Der Zustand der ausbleibenden Heilung von Frakturen, sogenannte „Non-Unions“ wurde 1976 durch Weber und Čech das erste Mal klassifiziert. Dieses System teilt die Non-Unions in zwei Gruppen- die biologisch aktiven und die biologisch inaktiven Non-Unions, welche dann weiter nach ihrer röntgenologischen Erscheinung unterteilt werden (Weber und Čech 1976). Da aber dieses System nicht zufriedenstellend alle Faktoren, die an der Bildung von Non-Unions beteiligt sind, berücksichtigt, besteht der Bedarf, die Klassifizierung weiter zu verfeinern (Calori et al. 2008).

Bei den biologisch aktiven, vaskularisierten Formen sind proliferative Knochenreaktionen mit Knorpel- und Bindegewebsbildung nachweisbar:

Der hypertrophe „Elefantenfuß“ hat einen breiten überbrückenden Kallus, der durch die interfragmentären Bewegungen noch nicht ossifiziert ist (Megas 2005).

Bei der „Pferdefuß-Form“ kommt es durch Rotation lediglich zu einer geringen Kallusbildung ohne Überbrückung.

Bei Abrissfrakturen oder systemischen Erkrankungen kann eine „oligotrophe Non-Union“ entstehen, die keinen oder nur einen gering gradigen Kallus ausbildet und die Überbrückung erfolgt durch Bindegewebe (Denny und Butterworth 2000, Frolke und Patka 2007). Ausschlaggebend ist hier die interfragmentäre Bewegung. Wird diese behoben, kann Frakturheilung stattfinden (Frolke und Patka 2007).

Die nicht-reaktiven, nicht-vaskularisierten, atropen Non-Unions weisen keine Kallusbildung, sondern lediglich eine bindegewebige Verbindung der Frakturenden auf. Ursachen sind neben der Instabilität meist durch primäre Infektionen entstandene Durchblutungsstörungen (Megas 2005, Iwakura et al. 2009). Auch hier können die unterschiedlichen Formen in Untergruppen eingeteilt werden:

Bei der „dystrophen Form“ findet ein zwischenliegendes Fragment zu einem der Hauptfragmente Anschluss, aber durch ungenügende Bewegung nicht zu dem anderen. Es kommt zur Devitalisierung.

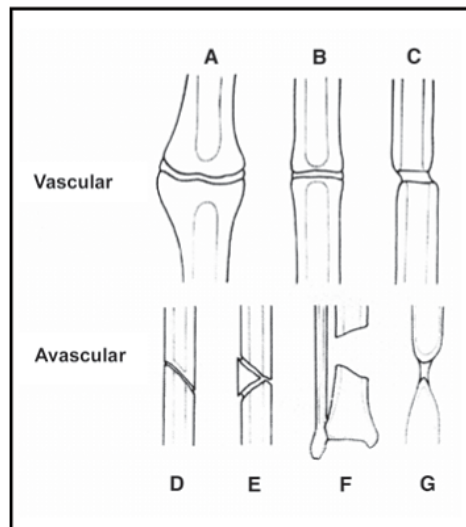
Die „nekrotische Form“ entsteht häufig bei Trümmerfrakturen. Durch zu viel Bewegung und zusätzliche Infektionen werden Fragmente nicht mit in den Kallus eingebettet und durchblutet. Dadurch nekrotisieren sie, was die weitere Heilung behindert.

Sind die Knochenverluste zu hoch und der Frakturspalt größer als das 1,5-Fache des Knochendurchmessers, ist das osteogenetische Potential nicht ausreichend, um diesen Defekt zu überbrücken. Dabei spielt es keine Rolle mehr, wie gut die Fraktur stabilisiert ist.

Bei der „atropen Non-Union“ kommt es zur Resorption und Abrundung der Frakturenden. Osteogene Aktivität liegt nicht vor (Denny und Butterworth 2000).

Bildet sich eine gelenkähnliche Fläche an den sklerotischen Knochenenden, die eine mit Serum gefüllte fibröse „Gelenkkapsel“ aufweist, spricht man von einer Neoarthrose- die eigentliche synoviale Pseudarthrose. Diese Struktur stellt das Endstadium der ausbleibenden Heilung dar und ersetzt teilweise die Funktion benachbarter Gelenke, die zunehmend versteifen (Bonath und Prieur 1998, Piermattei 2006, Frolke und Patka 2007).

Ist die Immobilisation nicht länger als sechs Wochen her, ist eine Wiederherstellung der Gliedmaßenfunktion möglich. Um derartige Komplikation zu vermeiden, sollte die betroffene Gliedmaße aktiv bewegt, die Frakturstelle jedoch so stabilisiert werden, dass keine Lageänderung der Frakturenden hervorgerufen wird (Denny und Butterworth 2000, Grünbaum 2007).



**Abbildung 3: Klassifikation der Pseudarthrosen nach Weber: vaskularisierte Formen-** A) hypertropher „Elefantenfuß“ B) „Pferdefuß“ C) oligotrophe Form. Nicht-vaskularisierte Formen- D) Drehkeilpseudarthrose E) dystrophe Form F) defektbedingte Form G) atrophe Form (Abb.: aus Jorge et al. 2006).

Grundlage der Therapie aller Fälle ist die Fragmentstabilisierung, Entfernung von störendem und totem Gewebe in Verbindung mit Antibiotikagabe, einem fallbedingtem Auffrischen der Knochenenden und gegebenenfalls Aktivierung der Knochenbildung über Knochentransplantation oder induktiven Substanzen, wie das Bone morphogenetic Protein (BMP) (Megas 2005, Piermattei 2006, Iwakura et al. 2009). Ziel ist es, die Integrität des betroffenen Knochens wiederherzustellen und eine Funktionalität wiederzuerlangen. Um die richtige Behandlung gewährleisten zu können, sollte eine eingehende Beurteilung des Patienten, seiner Fraktur und der mechanischen, biologischen und klinischen Faktoren erfolgen. Anhand eines Klassifikationssystems entsteht ein Fraktur-Bewertungsindex, der entscheidend für die Operationstechnik und Implantatwahl ist. Dabei gilt, je niedriger der Index ist, umso länger muss die Fixation erhalten bleiben und umso stabiler muss sie sein. Faktoren wie das Alter, Gewicht, allgemeiner Gesundheitszustand, Aktivitätsgrad, Fähigkeit zur postoperativen Nachsorge spielen eine wichtige Rolle (Fossum 2009, Schmidmaier und Moghaddam 2015).

Regelmäßig sollte das Voranschreiten der Frakturheilung röntgenologisch und klinisch kontrolliert werden, um bei Bedarf frühzeitig eingreifen zu können. Dabei ist darauf zu achten, ob sich der Kallus als Fixationskallus strukturiert und klar abgrenzt. Der Reizkallus stellt sich wolkig und unscharf dar. Zeichen wie Erweiterung des Frakturspalt und Aufhellungen sind Indikatoren von Instabilität mit Lockerung von Implantaten, Infektionen und Abbauvorgängen. Eine zunehmende Belastung und Schmerzfreiheit deuten klinisch auf eine protrahierte Heilung hin. Rötung, Schwellung, Schmerzen, Deformation oder Bruch der

Implantate weisen auf eine zu frühe und starke Belastung und einer damit einhergehenden Unruhe am Fragment hin (Grünbaum 2007).

## **2.2 Biologische Stimulation**

### **2.2.1 Knochentransplantate**

Knochentransplantate werden eingesetzt, um die Knochenheilung zu unterstützen, dessen Funktion zu verbessern oder generell zu induzieren. Sie können körpereigenen (autogenen), körperfremden (allogenen oder xenogenen) oder synthetischen Ursprung haben.

Der Goldstandard für die Behandlung von großen Knochendefekten ist das Autotransplantat. Dabei wird körpereigenes Knochenmaterial aus dem Beckenknochen in den Defekt transplantiert, wobei diese Behandlung durch geringes verfügbares Knochenvolumen und erhöhte Spendermorbidity, wie Schmerzen, Hämatome und Infektionen, begrenzt ist (Rihn et al. 2010, Boerckel et al. 2011a, Faßbender et al. 2014b).

Das Autotransplantat dient als Leitgerüst für neues Knochenwachstum und hat durch die Rekrutierung von mesenchymalen Stammzellen osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften. Des Weiteren kann es neuen Knochen selbst produzieren und sich somit selbst regenerieren, weshalb es ebenso osteogene Eigenschaften besitzt (Faßbender et al. 2014b, Tuchman et al. 2016).

Im Gegensatz dazu haben Allotransplantate und synthetische Transplantate keine lebenden Zellen und dienen einerseits als osteokonduktives Gerüst für das Einwachsen von neuem Knochen (Sheikh et al. 2017, Zhang et al. 2008). Andererseits enthalten Allotransplantate osteoinduktive Proteine, wie Kollagene, nicht-kollagene Proteine und Wachstumsfaktoren, die die Neubildung von Knochengewebe induzieren können (Sen und Miclau 2007, Sheikh et al. 2017).

Allotransplantate stammen von verstorbenen genetisch nicht-identischen Spendern derselben Art ab und reduzieren somit die mit einer Autotransplantation verbundenen Patientenmorbidity. Da Allotransplantate keine Zellen besitzen, die für die Stimulation der Knochenneubildung benötigt werden, kann die Knochenbildung verzögert werden (Zhang et al. 2008, Tuchman et al. 2016). Außerdem besteht das Risiko von Immunreaktionen und Infektionen durch das körperfremde Material, wobei die Inzidenz sehr gering ist (Mroz et al. 2008, Tuchman et al. 2016). Trotz der Unterschiede zwischen Auto- und Allotransplantaten, haben beide ähnliche Effekte in Bezug auf die Knochenbildungsrate, Schmerzzustände und



Funktionsfähigkeit (Tuchman et al. 2016). Xenogene Transplantate werden von Tieren gewonnen und sind in der Regel osteokonduktiv (Sheikh et al. 2017).

Werden in Allotransplantaten Proteine durch Säureextraktion isoliert, entsteht demineralisierte Knochenmatrix. Die osteoinduktiven Wachstumsfaktoren, u.a. BMPs, die die Knochenbildung stimulieren, sind nach der Entfernung der Knochenminerale besser verfügbar als bei mineralisierten allogenen Transplantaten. Demineralisierte Knochenmatrix existiert in verschiedenen Formulierungen, welche sich in ihren biologischen Eigenschaften und Konzentrationen an osteogenen Wachstumsfaktoren unterscheiden. Bislang wird es als Füllstoff oder Zusatz zum eigenen Knochen eingesetzt, da die alleinige Effizienz der Defektheilung nicht ausreichend ist (Rihn et al. 2010, Faßbender et al. 2014b).

Einige kalziumbasierte synthetische Produkte, wie Hydroxylapatite, bioaktive Gläser oder Kalziumphosphatzemente, werden als Füllstoff genutzt, an dessen Oberfläche Knochenbildung stattfinden kann und der mit der Zeit abgebaut und durch körpereigenen Knochen ersetzt wird. Es dient aber nur als osteokonduktives Gerüst, das mit osteogenem Material, wie Knochenmark, kombiniert werden muss (Rihn et al. 2010, Sheikh et al. 2017).

## **2.2.2 Rekombinante Wachstumsfaktoren**

### **2.2.2.1 *Bone morphogenetic Protein 2***

BMPs sind multifunktionale Wachstumsfaktoren, die eine entscheidende Funktion als Mediatoren beim Zusammenspiel der verschiedensten Gewebe während der Entwicklung von Wirbeltieren ausüben. Sie sind beteiligt an der Koordination der Gewebsanordnung, Zellproliferation, Zellmigration, sowie der Zelldifferenzierung und -reifung (Ruschke et al. 2012). Dazu üben sie pleiotrope Effekte nicht nur in Knochen sondern auch in anderen Geweben aus (Wagner et al. 2010). Bisher sind etwa 25 verschiedene BMPs bekannt, die alle Teil der Transforming growth factor  $\beta$ -Superfamilie sind (Schmidt-Bleek et al. 2016). Sie unterscheiden sich u.a. in ihrer Funktion, Expression, Rezeptoraffinität und Gewebeverfügbarkeit. Dabei sind die BMPs abhängig von der Präsenz von Rezeptoren und Antagonisten. Aktive BMPs binden an membrangebundene Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren, die heteromere Komplexe aus BMPR I und BMPR II (Bone morphogenetic protein receptor I/II) formen. Typ I Rezeptoren lassen sich in Activin Rezeptor Typ IA (ACTR IA), BMPR IA und BMPR IB untergliedern. BMPR IA und BMPR-IB sind u.a. essentiell für die Chondrogenese (Marcus 1994). BMPR II, Activin Rezeptor Typ IIA (ACTR IIA) und ACTR IIB gehören zu der Gruppe der Typ II Rezeptoren. Innerhalb der BMP-Familie werden BMP-2

und BMP-7 klinisch in der Orthopädie eingesetzt (Axelrad und Einhorn 2009). Sie sind bekannt für ihre Fähigkeit Knochen- und Knorpelbildung zu induzieren. BMP-2 spielt eine herausragende Rolle in der Frakturheilung. Während der enchondralen Ossifikation reguliert BMP-2 die Rekrutierung von Osteoprogenitorzellen aus dem Periost und die Aktivierung der Differenzierung in die chondrogene und osteogene Zelllinie (Wang et al. 1990, Ruschke et al. 2012). Obwohl andere BMPs ein Fehlen von BMP-2 kompensieren können, ist keines der restlichen in der Lage, BMP-2 im Bereich der Knochenheilung zu ersetzen (Tsuji et al. 2006). Für die Gewinnung wurden bisher verschiedene Strategien entwickelt, wie die direkte Extraktion aus dem Knochen, die heterologe Produktion in Säugetierzellkulturen, Insektenzellkulturen, Tabakpflanzen oder Mikroorganismen sowie die rekombinante Produktion von BMP-2 in *Escherichia coli* und Zellkulturen von chinesischen Hamsterovarien (Gieseler et al. 2017).

BMP-2 ist essentiell für die Initiation der Frakturheilung. BMPs koordinieren anabolische und katabolische Prozesse durch Beeinflussung der Differenzierung und Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten, welche die hauptverantwortlichen Zellen für Knochenbildung und -resorption sind. BMPs werden u.a. von Endothelzellen, Osteoblasten und Chondrozyten produziert und von der aufgeschlossenen Knochenmatrix und Osteoklasten-ähnlichen Zellen freigesetzt, um die Osteogenese zu aktivieren. Dadurch werden mesenchymale Osteoblastenvorläuferzellen rekrutiert, welche sich in Chondrozyten und aktive Osteoblasten differenzieren und die organische Knochenmatrix produzieren. Schließlich werden die reifen Osteoblasten in die mineralisierte Knochenmatrix eingebettet und differenzieren entweder in ruhende Osteozyten oder werden der Apoptose unterzogen (Sims und Martin 2014, Sánchez-Duffhues et al. 2015). BMP-2 wird bereits direkt nach der Verletzung exprimiert und ist während der gesamten Frakturheilung hochreguliert. Zudem triggert BMP-2 initial die VEGF-Expression (Vascular endothelial growth factor), welche in Vaskulo- und Angiogenese mündet. Ebenfalls ist es während des Umbaus von Knorpel in Geflechtknochen im Gewebe detektierbar (Ruschke et al. 2012).

Die Aufschlüsselung der genetischen Sequenz von BMP-2 durch Wozney und Kollegen, ermöglichte die Herstellung von BMP-2, was den Weg für den Einsatz in der klinischen Therapie ebnete (Wozney et al. 1988, Boerckel et al. 2011a). Die osteoinduktive Fähigkeit von BMP-2 kritische Knochendefekte in langen Röhrenknochen zu heilen, wurde bereits in diversen Tiermodellen, wie Ratte, Kaninchen, Hund, Schaf und Affe gezeigt (Gautschi et al. 2007). In der Klinik wird rhBMP-2 z.B. in der Spondylodese eingesetzt und zur Reparatur komplizierter Knochendefekte verwendet (Boerckel et al. 2011a). Auch zur Behandlung der Osteoporose findet BMP-2 Anwendung. Turgeman und Kollegen (2002) erkannten, dass eine systemische Applikation von rhBMP-2 die Aktivität von mesenchymalen Stammzellen

erhöht und den Ovariectomie-induzierten und altersbedingten Knochenverlust reduziert (Turgeman et al. 2002). Außerdem kann BMP-2 in der Zahn- bzw. Kieferplastik effizient zur Induktion der Knochenbildung eingesetzt werden (Chen et al. 2004). Studien zeigten gleiche bis höhere Fusionsraten im Vergleich zu Autotransplantation (Rihn et al. 2010).

### **2.2.2.2 Signalwege von BMP-2**

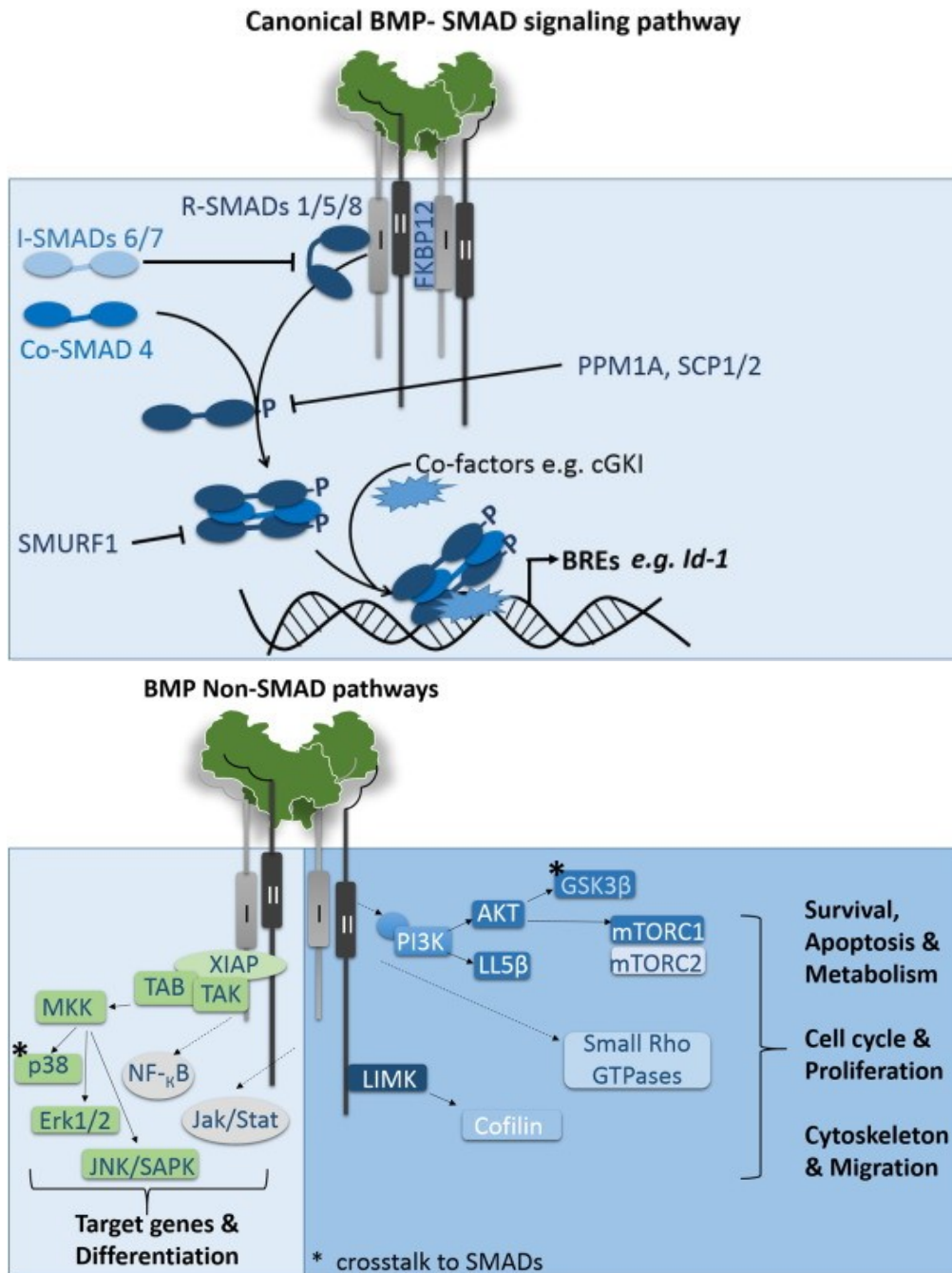
BMP-Liganden werden als große Dimere mit einer Prodomäne am N-Terminus und einem Cystein-Knoten im C-Terminus synthetisiert. Sie werden vor Sekretion durch zelluläre Serin-Endoproteasen gespalten und aktiviert. Weitere posttranslationale Modifikationen, wie N- und O-Glykosylierung, um die Halbwertszeit zu verlängern und die Rezeptorbindung zu modulieren sind möglich (Sánchez-Duffhues et al. 2015). Die Wirkungsweise von BMP erfolgt über einen Smad-abhängigen und einige Smad-unabhängige Signalwege. BMP-2 bindet als Dimer an einen vorgeformten heterotetrameren BMPR I-BMPR II-Rezeptorkomplex, wobei die Rezeptorbeschaffenheit und Signalintensität durch heterodimere Liganden, wie BMP 2/7 reguliert werden kann (Guo und Wu 2012, Kopf et al. 2014). Daraufhin transphosphoryliert der grundlegend aktive BMPR II die intrazelluläre GS-Domäne (Glycin-Serin-Domäne) des Typ I-Rezeptors und aktiviert diesen. Die nun aktivierte Typ I-Rezeptor-Serin/Threonin-Kinase phosphoryliert wiederum die rezeptorgebundenen BMP-spezifischen R-Smads 1/5/8, was zu einer Konformationsänderung und Freigabe ins Zytoplasma ihrerseits führt. Der Smad-Komplex verbindet sich mit Smad 4 (Co-Smad) und kann durch diese Komplexbildung erst in den Zellkern transportiert werden, wo die Transkription bestimmter Zielgene erfolgt (Ruschke et al. 2012, Yadin et al. 2016). Smad-Proteine sind an der Osteoblasten-Differenzierung beteiligt und werden in drei Untergruppen eingeteilt: die Rezeptor-regulierten R-Smads (Smad 1/5/8-BMP-spezifisch); ein common-mediator Smad (Co-Smad 4) und inhibitorische Smads (I-Smads-Smad 6/7) (Jimi et al. 2010). Nach der Sekretion wird die Verfügbarkeit von BMPs über Liganden-bindende Proteine im extrazellulären Raum moduliert (Sánchez-Duffhues et al. 2015). Extrazelluläre Antagonisten wie Noggin, Chordin und Follistatin, die unterschiedlich an die BMPs binden und so die Verbindung mit den Rezeptoren verhindern, nehmen Einfluss auf die BMP-Modulation (Jimi et al. 2010). Noggin bindet an BMP und behindert damit den Wachstumsfaktor mit seiner Oberfläche an die BMP-Rezeptoren zu binden (Krause et al 2011). Dadurch blockiert der Antagonist die BMP-Aktivität in Osteoblasten und inhibiert somit die Osteoblastogenese (Marcus 1994). Noggin ist ein pleiotroper Faktor, der sowohl in der frühen embryonalen Entwicklung als auch in späteren Stadien exprimiert wird. So ist Noggin essentiell für die Entwicklung des Neuralrohrs, der Haarfollikel, der Zähne und der

Augenentwicklung (McMahon et al. 1998, Krause et al. 2011). Auch in der embryonalen Chondrogenese, Osteogenese und Gelenkbildung spielt Noggin durch seine antagonistische Wirkung u.a. auf BMP-2 eine entscheidende Rolle (Tylzanowski et al. 2006, Krause et al. 2011). Transkriptionsfaktoren wie Runx2 (Runt Related Transcription Factor 2) und ID-1 (Inhibitor of Differentiation) sind Zielgene des Smad-Signalweges (Ruschke et al. 2012). Runx2 wiederum induziert direkt die Expression von Kollagen Typ I, was entscheidend für die Knochenbildung ist (Franceschi und Xiao 2003). ID-1 ist eines der ersten Zielgene von BMP, da phosphorylierte Smads direkt an den ID-1 Promoter binden (Ruzinova and Benezra 2003). Es wird aber auch durch mechanischen Stress induziert und BMP-2 und mechanische Belastung regulieren synergistisch die ID-1 Transkription (Morawietz et al. 1999, Kopf et al. 2012). ID-1 fördert die osteogene Differenzierung durch Inhibition der Differenzierung von Myoblasten (Nojima et al. 2010). Durch Antagonisten, Co-Rezeptoren, Intrazelluläre Proteine, BMP-Rezeptorbewegung, -lokalisation und -endozytose, andere Wachstumsfaktoren und sogar Proteine der extrazellulären Matrix besteht folglich eine strenge Kontrolle über jeden Schritt in der BMP-Signalkaskade (Sieber et al. 2009, Kopf et al. 2014).

BMPs regulieren außerdem u.a. die Zelldifferenzierung über Signalwege, die unabhängig von den Smad-Proteinen erfolgen (Jimi et al. 2010). Bindet BMP-2 zunächst an den für ihn hochaffinen BMPR I, woraufhin erst der BMPR II zur Komplexbildung rekrutiert wird, ist dieser Komplex in der Lage, die p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (p38 MAPK), die Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 (ERK 1/2), die C-jun N-terminal Kinase (JNK) oder den Nuclear Factor kappa beta (NFkB) zu aktivieren und initiiert damit den „non-Smad-Signalweg“ (Bragdon et al. 2011, Mu et al. 2012, Yadin et al. 2016). Es wird vermutet, dass dieser Signalweg über Protein-Protein-Interaktionen von BRAM 1 (Bone morphogenetic protein Receptor Associated Molecule 1) oder XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) mit den Signalmolekülen TAK 1 (Transforming-growth-factor- $\beta$ -Activated Kinase 1) und TAB 1 (TAK-bindendes Protein 1) in Verbindung mit dem BMPR IA erfolgt. XIAP bindet an den BMPR IA, rekrutiert die TAK 1 und das TAB 1 zu einem Komplex und initiiert den BMP-induzierten Mitogen-Aktivierte Protein Kinase-Signalweg (MAPK) (Bragdon et al. 2011, Ruschke et al. 2012). Aktivierte MAPK induzieren sowohl Migration als auch transkriptionelle Antworten. Außerdem findet über die MAPK auch eine Interaktion („crosstalk“) mit dem Smad-Signalweg statt (Ruschke et al. 2012). Andere non-Smad-Signalwege spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der pleiotropen Effekte von BMPs, wie Migration, Differenzierung und Neuordnung des Aktin-Zytoskeletts. So reguliert die durch BMPs aktivierte Phosphoinositide-3-Kinase (PI3K) die Aktivität der Akt-Kinase und kleinen Rho GTPasen, welche Mediatoren der Aktinfilamentbildung (f-Aktin) sind. Die LIM Domain

Kinase verbindet sich mit dem BMPR II und reguliert die Aktivität von Cofilin, einem Aktin-bindenden Protein (Ruschke et al. 2012).

Daraus wird ersichtlich, dass der BMP-Signalweg stark kontrolliert ist und viele Zellantworten induziert. Durch seine autokrine und parakrine Aktivität besteht eine enge Kommunikation mit anderen Geweben und Zellen und ist somit ebenfalls in der Knochenheilung von großer Bedeutung (Ruschke et al. 2012).



**Abbildung 4: Allgemeine Zusammenfassung der Smad-abhängigen und Smad-unabhängigen Signalwege von BMP.** (A) BMPs binden an BMPRI und BMPRII, um den Smad-Signalweg zu aktivieren. BMPRII phosphoryliert und aktiviert BMPRI, welcher wiederum Smad 1/5/8 phosphoryliert, die mit Co-Smad 4 einen Komplex bilden, in den Nukleus translozieren und die Expression von BMP-reagierenden Genen regulieren. (B) Die Aktivierung des BMPRII kann über den TAB1 und TAK1-Komplex die NF $\kappa$ B-, p38-, Smad 1/5/8-, ERK- und JNK-Signalwege initiieren. BMP aktiviert weitere Smad-unabhängige Signalwege, wie LIMK, PI3K, Rho GTPasen und Jak/Stat. Diese Signalkaskaden erhöhen die Genanzahl und dementsprechend die Zellantworten, deren Expression durch BMPs reguliert wird. Weiterhin sollen p38, JNK und GSK3 $\beta$ -Kinasen einen negativen Feedbackmechanismus auf die BMP-Signalwege ausüben, was eine enge Regulation der durch BMPs aktivierten Genexpression hervorruft. BRE: BMP response element, cGKI: cGMP-abhängige Protein Kinase, Co-Smad: common mediator Smad, FKBP12: FK506 bindendes Protein 12, Id-1: Inhibitor of differentiation 1, I-Smad: inhibitory Smad, R-Smad: Rezeptor-reguliertes Smad. (Abb. aus Sanchez-Duffhues et al. 2015).

## 2.3 Mechanische Stimulierung

Neben dem biologischen beeinflusst auch das mechanische Umfeld elementar die Knochenbildung und -heilung. Im Gegenteil zu einer starren Fixierung mit starker Kompression, wirkt sich eine moderate mechanische Stimulierung nachgewiesenermaßen positiv auf die Kallusbildung aus, über die die meisten Frakturen heilen (Smith-Adaline et al. 2004, Augat et al. 2005). Unterschiedlich starke mechanische Einflüsse können unterschiedliche Gewebisdifferenzierungen initiieren (Cullinane et al. 2003). Der Prozess der Mechanotransduktion beinhaltet folgende drei Hauptschritte: Sensorische Wahrnehmung der mechanischen Einflüsse, Umwandlung von mechanischen Stimuli in biochemische Signale und folglich die Signalweiterleitung (Hoffman et al. 2011, Kopf et al. 2014). Dabei sind es die Osteoblasten und Osteozyten, die die mechanischen Signale aufnehmen und als Antwort biologische Marker, wie TGF- $\beta$ 1 und BMPs, produzieren, die den Regenerationsprozess beeinflussen (Augat et al. 2005, Kopf et al. 2014). Osteozyten sind von extrazellulärer Flüssigkeit umgeben, die bei mechanischer Belastung in Schwingungen versetzt wird. Diese Druckänderungen werden von den mechanosensitiven Strukturen der Osteozyten, wie Zilien, Ionen-Kanäle, Gap Junctions, Lipid-Rafts, Integrine und weiteren Rezeptoren wahrgenommen und durch Konformationsänderung der mechanosensitiven Zellmembranstrukturen und direkte Freigabe von Stickstoffmonoxid, ATP und Prostaglandin in biochemische Signale umgewandelt, die dann die Knochenbildung induzieren (Bonewald 2011, Haffner-Luntzer et al. 2015, Yavropoulou und Yovos 2016). Mechanische Signale aktivieren dann knochenbildungsbezogene Gene wie c-Fos, „early growth response gene-1“ (egr-1), Osteopontin, Cyclooxygenase-2 (Cox-2) oder „extracellular signal-regulated kinase“ (ERK), welche dann die Proliferation und Aktivierung von Osteoblasten einleiten (Kamkin 2011). C-Fos ist das Hauptzielgen der Mechanotransduktion (Peake und El Haj 2003, Kopf et al. 2014), welches das Aktivierende Protein-1 (AP-1) moduliert (Lai und Cheng 2002, Kopf et al. 2014). AP-1 spielt eine entscheidende Rolle in der Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten und in der Initiation der Knochenheilung (Kamkin 2011). AP-1 reguliert wichtige Knochenmatrixproteine, wie Kollagen Typ I, Osteokalzin, Osteopontin und Fibronectin (Lai und Cheng 2002). Hohe interfragmentäre Beweglichkeit bewirkt die Differenzierung von Chondro- und Fibroblasten statt Osteoblasten (Kraus et al. 2003). Mechanische Stabilität dagegen fördert die Revaskularisierung, die entscheidend für die Knochenneubildung ist (Claes et al. 2002). So ist anfangs für eine gute Vaskularisierung und frühe Knochenbildung eine starre Fixation empfehlenswert. Nach einiger Zeit sollte die Dynamisierung der Fraktur erfolgen (Claes et al. 2011). Das mechanische Umfeld wird bei einem Knochenbruch, der durch einen Fixateur externe stabilisiert ist, durch die Steifheit des Fixators vorgegeben.

Diese ist ausschlaggebend für die interfragmentäre Bewegung, die die Gewebendifferenzierung lenkt. Flexible Fixation verzögert dabei deutlich die Heilung (Rontgen et al. 2010). Je nach Ausmaß der interfragmentären Bewegung bei einer flexiblen Fixierung, wird die enchondrale Knochenbildung über Induktion der Differenzierung zu Chondroblasten eingeleitet oder die Vaskularisierung wird so sehr gestört, dass es zur Bindegewebsbildung führt, die in einer verzögerten Heilung oder Pseudarthrose resultiert (Claes et al. 2002). Trotzdem wird eine adäquate Belastung für die Angio- und Osteogenese benötigt, da Mikrobewegungen die Durchblutung im Frakturspalt erhöhen (Kirchen et al. 1995).

### **2.3.1 Osteosynthese**

Mit Hilfe der Osteosynthese wird der Frakturspalt stabilisiert, sodass eine Heilung unter gleichzeitiger frühzeitiger Belastung der betroffenen Gliedmaße möglich ist. Die Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese und Association for the Study of Internal Fixation (AO/ ASIF) (gegründet von Schweizer Chirurgen 1958) definierte biomechanische Prinzipien für die erfolgreiche Behandlung von Frakturen durch (interne) Fixation. Das Ziel ist es, die volle Funktionsfähigkeit der verletzten Gliedmaße so schnell wie möglich wiederzuerlangen, um Heilungsstörungen und Spätfolgen durch die Fraktur zu vermeiden. Dies soll durch eine atraumatische Operationstechnik, eine durch steife interne Fixation hergestellte Kompression und durch Verhindern von Weichteilschäden und Knochenheilungsstörungen erreicht werden (Denny und Butterworth 2000, Perren 2003). Während dieses Ziel der präzisen Reposition in den 1970ern und 80ern höchstes Gebot war, ist heute die minimale Irritation und Weichteilschonung während der Operation wichtiger. Dislokationen von Splintern und geringe Stabilitätsverluste werden zugunsten einer optimalen biologischen Reaktion in Kauf genommen. Bei dieser sogenannten biologischen Osteosynthese wird keine Primärheilung mehr über axiale oder interfragmentäre Kompression angestrebt. Die Frakturenden werden mit Fixateur externe, Überbrückungsplatte oder Verriegelungsnagel stabilisiert, ohne großes Eingreifen in das Frakturgebiet mit den sich neu bildenden Geweben, Gefäßen und enthaltenen Mediatoren (Bonath und Prieur 1998, Perren 2003). Auf diese Weise wird unter Weichteilschonung die Knochenstabilität über Kallusbildung schnell wiederhergestellt, während der Knochen belastet werden kann. Dies senkt die Wahrscheinlichkeit von Knochenheilungsstörungen (Perren 2003). Denn bei exakter Reposition traten starke Durchblutungsstörungen - auch präparationsbedingt - auf, was zu verzögerter Heilung führte (Bonath und Prieur 1998, Remedios 1999, Perren 2002). Der Vorteil der primären Knochenheilung durch Kompression ist zwar, dass die Fragmente extrem stabil und damit schnell belastbar sind, aber der Remodellingprozess dauert lange und die stabilisierenden



Implantate müssen dementsprechend lange getragen werden, sodass u.a. Materialermüdung und Infektionen zu Problemen führen könnten (Denny und Butterworth 2000, Perren 2003). Da es durch den direkten Kontakt zwischen Implantat und Knochen zu lokalen Nekrosen kommt, wird ein minimaler Knochenkontakt bei den Implantaten angestrebt (Baumgaertel et al. 1994, Perren 2003). Außerdem sind kleine Mengen an interfragmentärer Bewegung erwünscht (Piermattei 2006). Es kommt zu einer mechanischen Stimulation der Differenzierung von mesenchymalen Gewebe zu Knochen (Goodman und Aspenberg 1993). Diese Dynamisierung birgt aber auch die Gefahr der Bildung von Pseudarthrosen und ist nicht für alle Frakturtypen geeignet (Bonath und Prieur 1998, Perren 2002).

### **2.3.2 Fixationsmodelle**

Drahtosteosynthesen erfolgen z.B. mit Kirschnerdrähten oder in Form von Drahtcerclagen. Mit einer Drahtcerclage können Knochenfragmente umschlungen und miteinander verbunden werden. Kirschnerdrähte fungieren wie kleine intramedulläre Pins und fixieren Bruchstücke an ihrem vorgesehenen Ort.

Die Schraubenosteosynthese fixiert Knochenfragmente durch Schrauben. Es wird eine interfragmentäre Kompression erzeugt. Zum Schutz vor Rotation und Kompression wird oft eine Kombination mit Kirschnerdrähten oder Neutralisationsplatten angewendet.

Bei einer Plattenosteosynthese werden Frakturen mit Metallplatten versorgt. Sie ist bei zahlreichen Frakturtypen einsetzbar und bietet große Stabilität. Je nach Indikation werden unterschiedliche Platten, wie die Neutralisations- oder Kompressionsplatte angewendet.

Die Marknagelosteosynthese eignet sich für stabile Frakturen. Dabei wird ein intramedullärer Pin in die Markhöhle von langen Röhrenknochen eingeführt. Um Rotation und Längenänderungen zu vermeiden, kann der Marknagel z.B. mit einem Fixateur externe, einer Cerclage, mit Schrauben oder mit Verriegelungsbolzen kombiniert werden.

Der Fixateur externe stabilisiert Knochenbrüche, wie Trümmerfrakturen oder offene Frakturen, über ein von außen angebrachtes Gerüst (Denny und Butterworth 2000, Illian et al. 2013, Gangavalli und Nwachuku 2016, von Keudell et al. 2016).

### **2.3.2.1 Fixateur externe**

Ganz im Sinne der biologischen Osteosynthese, die physiologischen Vorgänge bei der Frakturheilung mit minimalen operativen Maßnahmen optimal zu unterstützen und die Heilung nur wenig zu stören, findet der Fixateur externe eine breite Anwendung. Denn er bietet ausreichende Stabilität bei moderater Belastung, sodass es durch ausgeprägte Kallusbildung zu sekundärer Knochenheilung kommen kann (Grünbaum 2007, Palmer 2012). Beim Menschen wurde er erstmals 1897 angewendet. Für Tiere entwickelte Ehmer in den 1940ern auf Grundlage eines humanen Designs ein Tiermodell.

Der Fixateur externe verursacht geringe Weichteilverletzungen und ermöglicht die Behandlung von offenen Wunden. Die extraossäre Blutversorgung, die die zerstörte medulläre Blutversorgung ersetzt, bis diese wiederhergestellt ist, wird geschont (Fossum 2009). Zudem ist er anpassungsfähig, sodass man z.B. korrektive Osteotomien ausführen oder den heilenden Knochen dosierte Belastungen aussetzen kann (Palmer 2012). Über diese dynamische Destabilisierung erfolgt eine Stimulation der Knochenheilung durch zunehmende Eigenbelastung der Fraktur. Mit seinem geringen Instrumentenaufwand ist der Fixateur externe relativ günstig (Bonath und Prieur 1998, Denny und Butterworth 2000).

Proximal und distal der Fraktur werden Pins in den Knochen eingebracht, die dann über der Haut durch eine Schiene miteinander verbunden werden. Die auf den Knochen wirkenden Kräfte werden so teilweise oder sogar völlig über die Fixation umgeleitet. Die freie Beweglichkeit angrenzender Gelenke bleibt erhalten und durch den schnellen Wiedereinsatz der Gliedmaße kann eine Inaktivitätsatrophie der Muskulatur verhindert werden (Bonath und Prieur 1998, Palmer 2012). Eingesetzt wird der Fixateur externe bei Mandibularfrakturen, als Hilfsfixation für den intramedullären Pin, zur temporären Gelenkimmobilisation oder zur Ruhigstellung von geschlossenen, offenen und infizierten Diaphysen-, Quer-, Schräg- und Mehrfragmentfrakturen (Denny und Butterworth 2000, Grünbaum 2007, Horst et al. 2015). Da Pseudarthrosen oft mit Infektionen, Deformationen der Gliedmaßen, Knochendefekten und Weichteilproblemen assoziiert sind, stellt die externe Fixation eine optimale Option für die Stabilisierung, sowohl von hypertrophen als auch von atrophischen Non-Unions, dar (Megas 2005).

Die Systeme für den externen Fixator beinhalten drei Basiseinheiten: die Pins, die durch den Knochen geführt werden, die externe Verbindung der Pins und die Verbindungsstücke, die die beiden erstgenannten Elemente zusammenhalten (Fossum 2009, Palmer 2012). Die Operation erfordert viel Erfahrung und es sollten einige Dinge beachtet werden, um Komplikationen vorzubeugen. So führt z.B. zu schnelles maschinelles Bohren zu lokaler

Hitzeentwicklung, gefolgt von Knochennekrose und frühzeitiger Pin-Lockerung (Bonath und Prieur 1998, Piermattei 2006, Palmer 2012). Die Stabilität des Fixateurs wird erhöht, wenn die Pins in einem Winkel von 70° zur Knochenachse angebracht, die äußeren Nägel möglichst gelenknah und die inneren Nägel fraktur nah eingebracht werden. Die Pin-Knochenoberfläche ist hoher mechanischer Belastung ausgesetzt, was zu Resorption und Pinlockerung führen kann. Werden pro Fragment drei bis vier Pins verwendet, wird die Pin-Knochenoberfläche vergrößert und senkt damit dieses Risiko. Mehr als vier Pins pro Fragment dagegen haben keine besseren Effekte mehr erzielen können, während die Gefahr von bakterieller Kontamination und Schädigung des umgebenden Gewebes steigt (Piermattei 2006, Palmer 2012). Wird die Verbindungsbrücke zu nah über der Haut angebracht und es bleibt somit kein Platz für Weichteilschwellung *post operationem*, sind Drucknekrosen die Folge (Grünbaum 2007, Palmer 2012). Auch sind lokale Infektionen möglich, wenn die Pinpflege nicht täglich erfolgt. Implantate können sich lockern und das Pseudarthrosrisiko steigt (Bonath und Prieur 1998, Horst et al. 2015). Haut- und Muskelbewegungen gegen den Pin verlängern die Wundheilung. Durch vermehrte Exsudation kann es entlang der Pins zur bakteriellen Kontamination kommen (Piermattei 2006, Palmer 2012).

Wird folglich ein hoher Wert auf die richtige Operationstechnik gelegt und findet eine intensive Nachsorge, regelmäßige Kontrolle der Kallusbildung und Belastungsfähigkeit der Gliedmaße durch den Patienten statt, wird mit dem externen Fixator eine schnelle Heilungsrate erreicht. Das Periost als primäre Quelle für die Stammzellen der Knochenheilung sowie die Weichteile als extraossäre Blutversorgung werden weitestgehend geschont. Das Gestell kann ohne großen Aufwand entfernt werden und die für die Knochenheilung wichtige mechanische Stimulierung kann mit Hilfe des Fixateurs realisiert werden (Kraus et al. 2003, Palmer 2012).

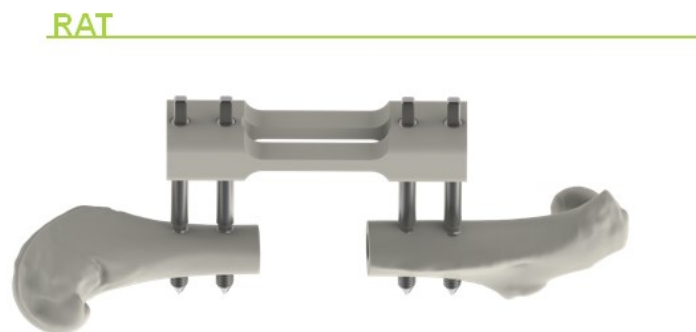
#### 2.3.2.1.1 Fixateur externe von RISystem

Zwar steht bereits fest, dass Knochenheilung positiv auf ein adäquates mechanisches Umfeld reagiert; dennoch ist noch nicht ausreichend über den Einfluss des mechanischen Umfeldes auf die Heilung von großen Knochendefekten bekannt (Haffner-Luntzer et al. 2015).

Dies beruht mitunter auf einem Fehlen von standardisierten Verfahren und einer fehlenden experimentellen Kontrolle über die mechanischen Bedingungen innerhalb des

Frakturgebietes während der Heilung. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Fixateur externe der Firma RISystem („RatExFix“) verwendet, der es erlaubt, die mechanischen Bedingungen in den unterschiedlichen Heilungsstufen zu beeinflussen. Dies ermöglicht es, die Mechanosensitivität im Heilungsverlauf zu erforschen (Glatt et al. 2012a).

Der Fixateur ist in der Lage, einen 5 mm femoralen Defekt in der Ratte über acht Wochen zu stabilisieren. Der Balken besteht aus Polyethylethylen und wird mit vier titanlegierten Pins, in einem Abstand von sechs Millimetern, parallel zum Knochen angebracht. Die Steifigkeit des Fixateurs kann durch austauschbare Verbindungselemente unterschiedlicher Dicke variiert werden (Abb.5; Glatt et al. 2012a). Der Fixateurbalken wurde so konzipiert, dass er 800 Gramm Gewicht ohne Fragmentdislokation aushalten kann. Dieser Wert entspricht etwa dem vierfachen Gewicht einer durchschnittlichen zehn Wochen alten Ratte zu Versuchszwecken. Dem so konzipierten Fixateurbalken wurde die Steifigkeit von 100% zugewiesen (Glatt und Matthys 2014).



**Abbildung 5:** Stabilisierung mit dem Fixateur externe RatExFix von RISystem AG. Abgebildet ist ein Fixateur mit einem Steifigkeitsgrad von 10%. Der Fixateur befindet sich lateral am linken Rattenfemur und ist durch vier Pins mit diesem mit einem Knochen-Balken-Abstand von sechs Millimetern verbunden. (Abb. aus <http://www.risystem.com> 11.07.2017)

## 2.4 Ziel der Arbeit

### **Eine Genexpressionsanalyse des Zusammenspiels der biologischen und mechanischen Stimulation in einem kritischen Knochendefekt der Ratte**

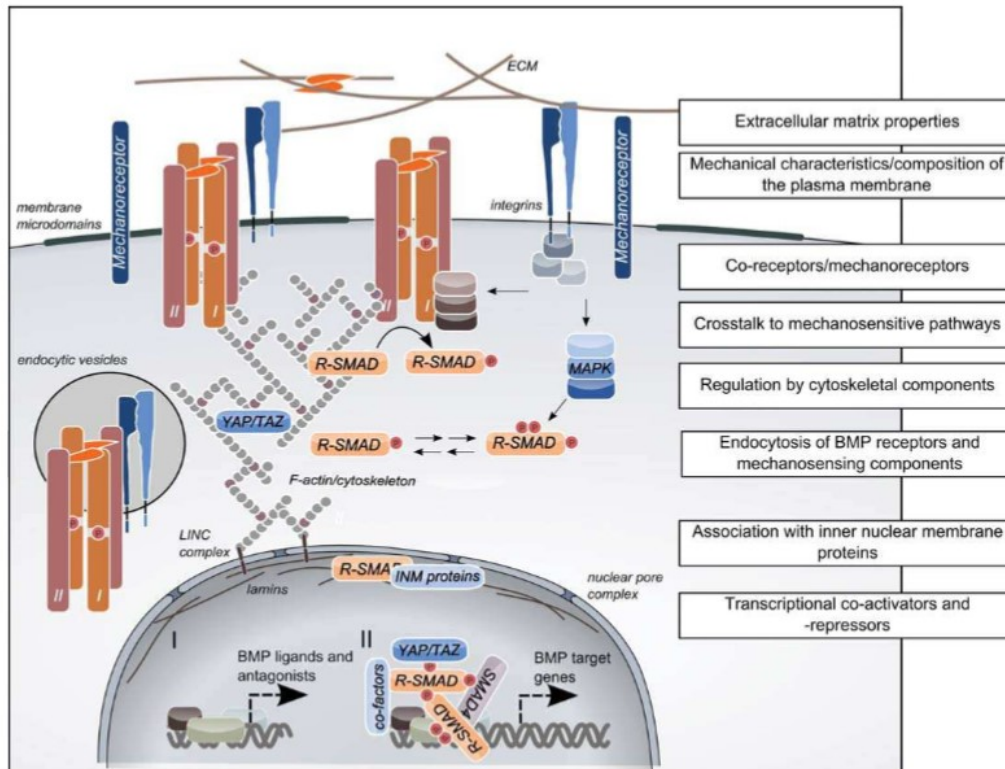
Ähnlich wie BMPs sind die mechanischen Rahmenbedingungen essentiell für die Knochenentwicklung, -homöostase und -heilung (Chen et al., 2010). Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass die vorherrschenden mechanischen Kräfte zum einen darüber entscheiden, ob eine Fraktur heilt oder nicht und zum anderen, ob die intramembranöse oder enchondrale Knochenheilung abläuft (Augat et al. 2005, Rontgen et al. 2010). Moderat axialer interfragmentärer Bewegung wird nachgesagt, die Knochenheilung durch Stimulation der Kallusbildung zu beschleunigen. Der Effekt von Kompression dagegen ist stark abhängig von der Belastungsrate und -stärke und variiert während der unterschiedlichen Heilungsphasen (Claes und Heigele 1999, Wolf et al. 2001, Kopf et al. 2014). Auch ein direktes Zusammenspiel von BMP-Signalen und Signalwegen der Mechanotransduktion auf verschiedenen subzellulären Ebenen wurde identifiziert (Kopf et al. 2014). Eine Aufschlüsselung dieser Interaktion bietet neue Ansätze, mit Hilfe der Mechanik die BMP-2-Dosis und die damit verbundenen Nebenwirkungen in der Behandlung großer Knochendefekte zu reduzieren. Bisher werden für die klinisch angewandten rhBMP-2 und rhBMP-7 etwa 1000 Mal höhere Dosierungen als die physiologischen Konzentrationen appliziert und in vielen Fällen ist das BMP nicht besser als das Autotransplantat (Axelrad und Einhorn 2009, Kopf et al. 2012). Eine Erklärung für die geringe Kapazität für externe BMPs könnte der Überfluss an antagonistischen Faktoren, wie zum Beispiel ungünstige mechanische Rahmenbedingungen sein (Gautschi et al. 2007, Kopf et al. 2014). Kopf und Kollegen (2012) konnten zeigen, dass BMP-Signale durch mechanische Kräfte stark potenziert werden und eine Interaktion zwischen BMP- und Mechanotransduktionssignalwegen besteht (Abb. 6, Kopf et al. 2012). Trotzdem sind weitere Studien erforderlich, um herauszufinden, wie und unter welchen Bedingungen die mechanische Stimulation eine BMP-2-Behandlung *in vivo* beeinflusst.

Ziel dieser Arbeit ist die Stimulation der Heilung eines nicht-heilenden Knochendefekts, basierend auf der im Osteotomiespalt wirkenden Mechanik, sowie der BMP-2-induzierten Signalkaskade. Anhand der Expression ausgewählter Gene der Knochenheilung soll ermittelt werden, inwiefern eine flexible, semi-rigide und rigide Fixation die BMP-2 Stimulation der Knochenheilung beeinflusst.

Dazu wurde folgende Hypothese aufgestellt:

Die BMP-2-stimulierte Heilung eines kritischen Defekts ist mechanosensitiv und führt mit einer semi-rigiden (40 %) Defektstabilisierung zu einer qualitativ besseren Heilung als eine rigide (100 %) sowie flexible (10 %) Fixation.

Dazu wurde allen Versuchstieren (Ratte) ein kritischer 5 mm Defekt durch einen Fixateur externe (ExFix) stabilisiert. Dieser hat je nach Gruppenzugehörigkeit einen Querbalken unterschiedlicher Dicke, der jeweils eine Steifigkeit von 100 %, 40 % oder 10 % gewährleistet. Zudem wurde in jeden Defekt ein mit 5 µg rhBMP-2-Lösung beladenes Kollagenvlies eingebracht. Die Versuchsgruppen wurden von Kontrolltieren (1 mm Osteotomie mit 100 % ExFix, 5 mm Osteotomie mit 100 % ExFix; alle Tiere jeweils ohne BMP-2) begleitet. Nach 3, 7 und 14 Tagen *post operationem* wurde Kallusgewebe aus dem Defektbereich entnommen, die RNA extrahiert und anschließend eine qRT-PCR durchgeführt, mit der ausgewählte Gene der Knochenheilung auf ihre Expression im Verlauf der frühen Heilungsphase untersucht wurden.



**Abbildung 6: Interaktion zwischen den Signalwegen von BMP und der Mechanotransduktion auf mehreren Ebenen.** Die BMP-Signalgabe kann direkt über Mechanotransduktionssignalwege reguliert werden, ohne das Einbinden von autokriner Ligandensekretion. Die Signalregulation erfolgt durch die extrazelluläre Matrix, die mechanischen Eigenschaften und die Zusammensetzung der Plasmamembran. Zusätzlich regulieren mechanische Kräfte die Verbindung der BMP-Rezeptoren mit Integrinen und höchstwahrscheinlich beeinflussen sie die Zusammensetzung der Rezeptorinteraktionen, die Lokalisierung zu den verschiedenen Membran-Mikrodomänen und die Verbindung mit anderen mechanosensorischen Komponenten. Die Rezeptorendozytose und weitere Signaldynamik wird über Bestandteile des Zytoskeletts und die Endozytose von anderen mechanosensorischen Proteinen kontrolliert. Signalwege der Mechanotransduktion (z.B. über MAPK) interagieren auf der Ebene der Smadphosphorylierung aber auch auf der Ebene der Transkription. Auch mechanisch induzierte Signalkaskaden regulieren die BMP-Liganden und ihre Antagonisten. Mechanoresponsive Transkriptionsfaktoren dienen als transkriptionelle Co-Regulatoren für BMP-Zielgene. Abkürzungen: ECM- Extrazelluläre Matrix, LINC- „linker of the nucleoskeleton cytoskeleton“; INM- Innere Nuklearmembran. (Abb. aus Kopf et al. 2014)

### 3 Material und Methoden

Folgende Geräte, Materialien und Software wurden in dieser Arbeit verwendet.

#### 3.1 Geräte

Geräte	Firma
Abzug-Werkbank	Captair®, Erlab, Val de Reuil, F
Bohrer (Ø 0,79 mm)	RISystem AG, Davos, Schweiz
Combi-Röhrchengestell	neoLab® GmbH, Heidelberg, D
Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Eppendorf Pipetten Research Plus	Eppendorf AG, Hamburg, D
Flüssigstickstoffbehälter	KGW Isotherm, Karlsruhe, D
Gel-Heizplatte	Charité, Berlin, D
Hammer	Joh. Herrmann Picard GmbH & Co.KG, Wuppertal, D
Handbohrer RIS.390.130	RISystem AG, Davos, Schweiz
Heraeus Fresco 17 Centrifuge	Thermo Electron GmbH, Osterode, D
Implantmed Typ SI-923	W&H Deutschland GmbH, Laufen, D
iQ™ 5 Cyclor	Boi-Rad, München, D
Knochen-„Crush-Set“	Charité, Berlin, D
Kodak PQ Directview CR Cassette	Carestream Health Inc., Ney York, USA
Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg, D
Mörserschale und Stößel	Eigenanfertigung
NanoDrop	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Nanophotometer	Implen, München, D
PCR-Cooler	Eppendorf AG, Hamburg, D
RatExFix Fixateure	RISystem AG, Davos, Schweiz
Röntgengerät Faxitron	x-ray Corporation, Illinois, USA
Rotlichtlampe 150 Watt, 230 Volt	Philips GmbH, Hamburg, D
Säge Typ R-20S	W&H Deutschland GmbH, Laufen, D
Spatellöffel	
Schermaschine Favorita 2	Aesculap® Suhl GmbH, Suhl, D
Spectrafuge™ Mini Laboratory Centrifuge	Labnet International Inc., New Jersey, USA



Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, D
Tiegelzange	
Vortex-Schüttler VV3	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Waage	Kern&Sohn GmbH, Balingen, D

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma
BD Falcon™ (50 ml)	BD Biosciences, North Carolina, USA
Eppendorfggefäße (0,2 ml; 1,5 ml ; 2 ml pcr clean )	Eppendorf AG, Hamburg, D
ep Dualfilter T.I.P.S.® (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Feather® Skalpellklingen (No.21)	pfm medical AG, Köln, D
Foliodrape® selbstklebendes Abdecktuch	Paul Hartmann AG, Heidenheim, D
Gammex® PF Handschuhe (unsteril)	Ansell Healthcare, Brüssel, B
Instrumententischbezug(80x145cm)	Shanghai International Trading Corp. GmbH, Hamburg, D
Kanülen	B. Braun, Melsungen, D
LLG-Vernichtungsbeutel	LLG Labware, Meckenheim, D
Lysotrypt®	B. Braun, Melsungen, D
Microseal `B` Adhesive Seals für PCR Platten	Bio Rad Laboratories GmbH, München, D
Nahtmaterial (Vicryl 3-0, Prolene 3-0)	Ethicon Deutschland, Norderstedt, D
OP-Masken	Motex Healthcare, Liège, B
OP-Hauben	Farstar® medical GmbH, Barsbüttel, D
PCR Platten (0,2 ml, 96-well)	Thermo Scientific, UK
Präpariertupfer (6x6cm)	Fuhrmann GmbH, Much, D
Spritzen ( 1 ml ; 10 ml )	B. Braun, Melsungen, D
Semper care® Handschuhe (steril)	Sempermed Satra Technology Centre, Northamptonshire, UK

### 3.3 Medikamente/ Lösungen

Medikamente/ Lösungen	Firma
Antisedan	Pfizer, Karlsruhe, D
Braunoderm® (Povidon Iod)	B. Braun, Melsungen, D
Bepanthen Augen- & Nasensalbe	Bayer AG, Leverkusen, D
Clindamycin	Ratiopharm, Ulm, D
Domitor® (Medetomidin)	Pfizer, Karlsruhe, D
Glucose 5 % G-5	B. Braun, Melsungen, D
Kaliumchlorid	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, D
Ketamin 50 mg	Actavis®, München-Riem, D
Natrium-Chloridlösung 0,9 %	B. Braun, Melsungen, D
Opsite Sprühverband	Smith & Nephew GmbH, Hamburg, D
Tramadolhydrochlorid	Grünenthal, Aachen, D
Tramadolhydrochlorid-Tropfen	Grünenthal, Aachen, D

### 3.4 Chemikalien / Reagenzien

Chemikalien/ Reagenzien	Firma
Chloroform für die Molekularbiologie	Sigma® Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Descosept Flächendesinfektion	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld, D
Ethanol für die Molekularbiologie	Merck KGaA, Darmstadt, D
Flüssig Stickstoff	
RNase ZAP™	Sigma® Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Sterilium® classic pure	Bode Chemie GmbH, Hamburg, D
TRIZOL® Reagent	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Wasser (Nuclease frei)	Qiagen GmbH, Hilden, D

Reagenzsysteme/ Kits	Firma
DNase	Qiagen GmbH, Hilden, D
Primer	TIB® MOLBIOL, Berlin, D
Perfecta SYBR Green SuperMix for iQ	Quanta Biosciences, Gaithersburg, USA
qScript™ cDNA Super Mix	Quanta Biosciences, Gaithersburg, USA
RNeasy®-Mini-Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D

### 3.5 Software

Software	Firma
Bio-Rad iQ5	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
EndNote X7.5	Thomson Reuters, New York, USA
iQ5 Emulation Mode	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
NanoDrop 1000 UV/VIS	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Spektrophotometer	
SPSS Statistics	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, D

### 3.6 Versuchstiere

Für die Durchführung der Studie wurden 60 weibliche, 12 Wochen alte Sprague-Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland), mit einem durchschnittlichen Gewicht von 280 g operiert. Der Tierversuch erfolgte unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes, der Tierschutzrichtlinien sowie der Vorgaben des NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals mit Genehmigung des Landesamtes für Gesundheit und Soziales (Berlin LaGeSo G0248/11) in der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow Klinikum, Berlin. Nach ihrer Ankunft in der Charité wurden die Ratten zur Akklimatisierung vor der Operation für mindestens sieben Tage in Gruppen von fünf Tieren in Makrolonkäfigen Typ IV mit erhöhten Deckeln und Lignocel® Einstreu (J. Rettenmaier & Söhne GmbH+ Co. KG, Rosenberg, Deutschland) gehalten. Wasser und Futter (sniff Alleinfuttermittel für Ratten & Mäuse, sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) standen ihnen ad libitum zur Verfügung. Ein regelmäßiger Wechsel von Futter, Wasser (nach Bedarf) sowie das Umsetzen in einen sauberen Käfig (wöchentlich) wurden gewährleistet. Zur Beschäftigung und zum Nestbau bekamen alle Tiere Nagehölzer (sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Papiertücher in den Käfig gelegt

#### 3.6.1 Gruppeneinteilung

Um herauszufinden, welchen Effekt eine kombinierte Behandlung mit biologischer (BMP-2) und mechanischer Stimulation (via unterschiedlicher Fixationssteifigkeiten (RatExFix™, RISystem, Davos, Schweiz)) auf die Expression ausgewählter Gene der Knochendefektheilung hat, wurden 60 Ratten randomisiert in folgende Gruppen eingeteilt:

**Tabelle 2: Gruppeneinteilung**

Balkensteifigkeit/Gruppe	Osteotomiegröße	Zeitpunkt der Probenentnahme/Anzahl der Tiere		
		3d	7d	14d
100 % + rhBMP-2	5 mm	n=4	n=4	n=4
40 % + rhBMP-2	5 mm	n=4	n=4	n=4
10 % + rhBMP-2	5 mm	n=4	n=4	n=4
Positivkontrolle 100 %	1 mm	n=4	n=4	n=4
Negativkontrolle 100 % + NaCl	5 mm	n=4	n=4	n=4

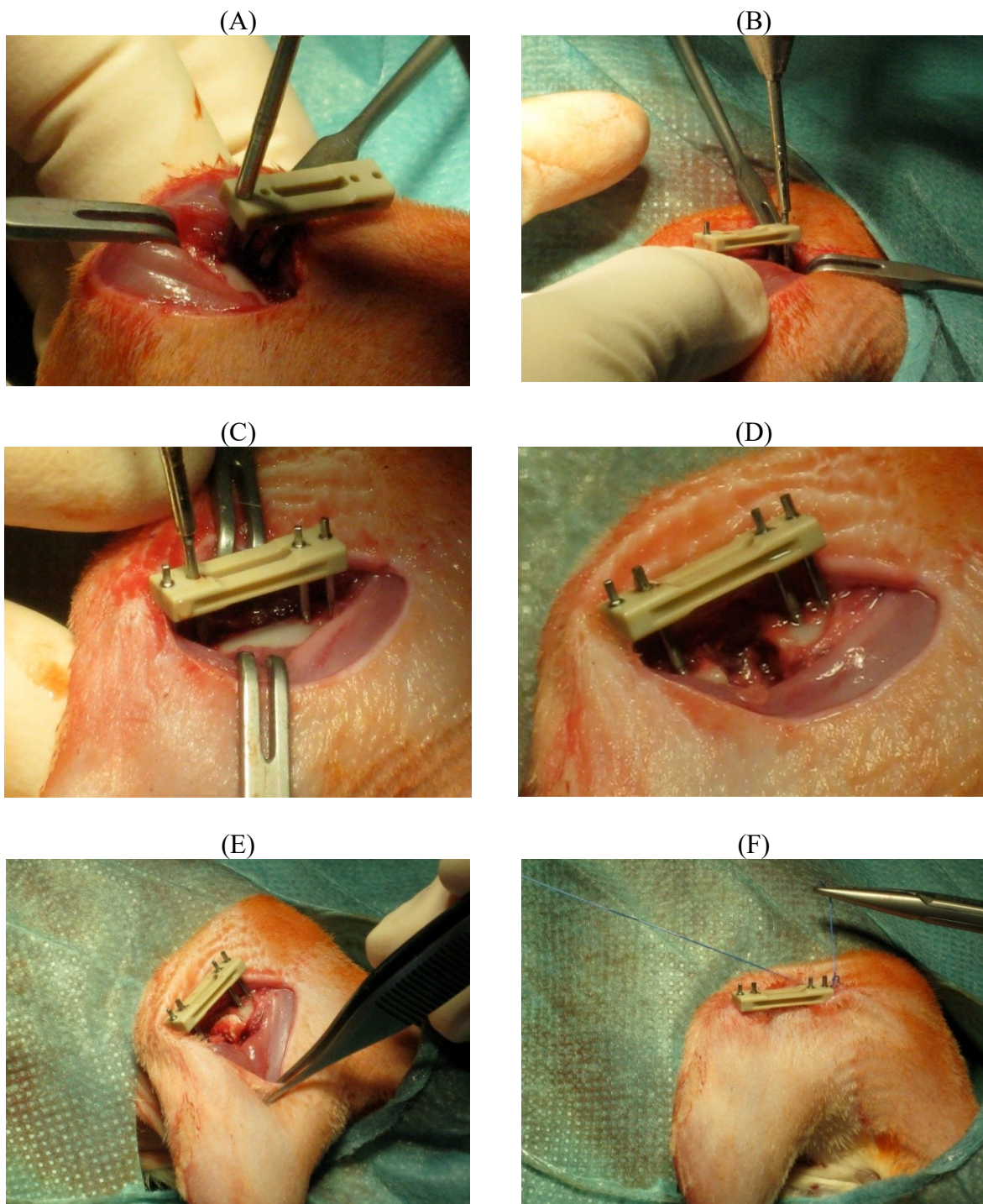
Der Versuchsaufbau setzte sich aus fünf Gruppen zusammen, den drei Steifigkeitsgruppen (Balkensteifigkeit von 100 %= rigide, 40 %= semi-rigide, 10 %= flexibel), sowie den beiden Kontrollgruppen. Die Tiere aus der rigiden Gruppe erhielten den Fixateur externe mit der Steifigkeit von 100 %; Tiere aus der semi-rigiden Gruppe wurde der Balken mit einer Steifigkeit von 40 % eingesetzt, und die Tieren aus der flexiblen Gruppe bekamen den Balken mit einer Steifigkeit von 10 %, abgeleitet vom 100 %-Balken. Alle drei Steifigkeitsgruppen beinhalteten einen kritischen 5 mm Defekt. Das Defektmodell ist am Julius Wolff Institut etabliert (Mehta et al. 2011a). Der Defekt wurde mit einem klinisch-eingesetzten Kollagenvlies (Lyostypt®, B.Braun, Melsungen, Deutschland) gefüllt, der mit 5 µg rhBMP-2 beladen wurde. Beide Kontrollgruppen wurden durch den rigiden Balken stabilisiert. Die Positivkontrolle simulierte eine nicht kritische bzw. physiologische Heilung, die durch eine 1 mm Osteotomie induziert wurde. Die Negativkontrolle simulierte die ausbleibende Defektheilung, deren 5 mm Osteotomie ein Kollagenschwamm mit 5 µg NaCl benetzt, implantiert wurde. Nach 3, 7 und 14 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und die Proben, der Osteotomiekallus mit angrenzenden Kortizes, entnommen. Dabei entspricht der Zeitpunkt der Probenentnahme dem Untersuchungszeitpunkt.

### 3.7 Operatives Vorgehen

Präoperativ wurden die Ratten gewogen (Waage, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland). Befanden sie sich nicht in dem für die Studie vorgesehenen Gewicht von 240-320 g, wurden sie aus dem Versuch ausgeschlossen. Anschließend wurden die Tiere mit 0,3 mg/kg Medetomidin (Domitor®, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) und 60 mg/kg Ketaminhydrochlorid (Ketamin Actavis®, München-Riem, Deutschland) intraperitoneal in Narkose gelegt. Außerdem wurden sie antibiotisch mit 45 mg/kg s.c. Clindamycin (Ratiopharm, Ulm, Germany) und zur Analgesie mit 20 mg/kg s.c. Tramadolhydrochlorid (Tramal®, Grünenthal, Aachen, Deutschland) behandelt. Anschließend wurde das gesamte linke Bein rasiert (Rasierer Favorita 2, Aesculap® Suhl GmbH, Suhl, Deutschland) und mit Polyvidon Jod (Braunoderm®, B. Braun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Um die Augen vor Hornhautschäden während der Narkose zu schützen, wurde ihnen Bepanthen Augen- & Nasensalbe (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) aufgetragen. Danach wurden die Tiere auf eine Gel-Heizplatte (Spezialanfertigung der Charité, Berlin, Deutschland); eingestellt auf 37 °C; gelegt und mit einem sterilen Tuch (Foliodrape®, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland) abgedeckt, wobei das linke Bein freigelegt wurde. Zunächst wurde durch einen longitudinalen Schnitt (Skalpelli No.21 Feather®, pfm medical AG, Köln, Deutschland) entlang des Oberschenkels die Haut und Faszie eröffnet, um

anschließend das Femur zwischen dem Musculus gluteus superficialis und dem Musculus biceps femoris stumpf frei zu präparieren.

Der erste Pin wurde gemeinsam mit dem Balken (RatExFix, RISystem AG, Davos, Schweiz) im Winkel von 90° in der Nähe der distalen Femurepiphyse angebracht. Dazu wurde zunächst ein Bohrloch durch die obere Kortikalis gesetzt (Handbohrer RIS.390.130 RISystem AG, Davos, Schweiz). Danach folgte eine bikortikale Bohrung für den proximalsten Pin. Nun hatte der Balken als Schablone für die folgenden Pins eine ausreichende Stabilität und die Bohrung der zwei verbleibenden mittleren Pins erfolgte ebenfalls bikortikal durch die dafür vorgesehenen Löcher des Balkens und die Pins wurden schließlich eingedreht. Letztendlich befand sich der Fixateur externe in einem Abstand von 6 mm vom Femur. Auch die Muskulatur auf der Innenseite des Femurs wurde nun schonend freipräpariert und mit einem Wundhaken vom Knochen ferngehalten. Daraufhin wurde eine 5 mm Sägeschablone an den Fixateur externe und das Femur angebracht, sodass mit einer oszillierenden Säge (Säge Typ R20S, W&H Deutschland GmbH, Laufen, D) ein 5 mm Segment aus der Diaphysenmitte entnommen werden konnte. Während der Osteotomie wurde mit steriler Kochsalzlösung 0,9 % (B.Braun, Melsungen, Deutschland) gespült, um Schädigungen des Knochengewebes durch Überhitzung zu unterbinden. Das Knochenfragment wurde sofort in flüssigem Stickstoff konserviert und anschließend bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Nun wurde ein Kollagenvlies (Lyostypt®, B. Braun, Melsungen, Deutschland) mit 5 µg rhBMP-2 (Walter Sebal, Universität Würzburg, Deutschland, gelöst in 4 mM Salzsäure) bzw. mit dem gleichen Volumen an NaCl 0,9 % (Negativkontrolle, B.Braun, Melsungen, Deutschland) beladen und in den 5 mm Defekt eingesetzt. Die Positivkontrolle erhielt lediglich eine 1 mm Osteotomie. Die Faszie wurde mit Vicryl 3-0 und die Haut mit Prolene 3-0 (Ethicon Inc., Somerville, New Jersey, USA) mittels Einzelknopfheften verschlossen.

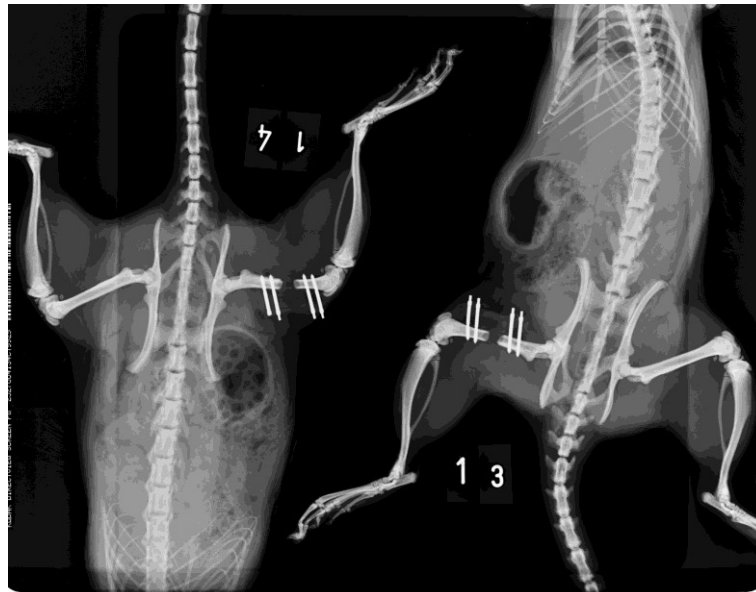


**Abbildung 7: Operationsablauf** (A) Eindrehen des ersten Pins in der Nähe der distalen Femurepiphyse, (B) Eindrehen des dem Hüftgelenk proximalsten Pins, (C) Eindrehen des vierten und letzten Pins, (D) OP-Zustand nach 5 mm-Osteotomie, (E) Einfügen des mit rhBMP-2 bzw. NaCl benetzten Kollagenvlies, (F) Abschluss der OP mit Hautnaht.

### 3.8 Postoperatives Vorgehen

Nach der Operation erhielten die Tiere Atipamezolhydrochlorid s.c. (Antisedan®, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland, Dosierung nach Herstellerempfehlung: fünf Mal höhere Dosis als Medetomedin). Die Wunde wurde mit Sprühpflaster (Opsite Sprühverband, Smith & Nephew GmbH, Hamburg, Deutschland) abgedeckt. Die radiologische Kontrolle über den korrekten Sitz des Fixateurs externe erfolgte im Anschluss. Dazu wurde das Tier in Bauchlage auf der Kassette (Kodak PQ Directview CR Cassette, Carestream Health Inc, New York, USA), im Abstand von 33 cm vom Auslöser, im Röntgengerät (Faxitron x-ray Corporation, Illinois, USA) gelagert und für 10 s mit 30 kV latero-medial bestrahlt. Die Tiere wurden bis zum Erwachen mit Rotlicht (Philips GmbH, Hamburg, Deutschland) bestrahlt und standen unter ständiger Kontrolle. Anschließend wurden die Tiere die ersten zwei Tage für eine intensive postoperative Betreuung inklusive Painscoring (Erfassung des allgemeinen Wohlbefindens sowie Ermitteln von Schmerzzuständen anhand von Körpersignalen wie Körperhaltung, Fellzustand, Aktivität) sowie zur Detektion der Trinkwassermenge zunächst einzeln in Makrolonkäfigen Typ III mit erhöhtem Deckel gehalten. Später, wenn der Patient sich weitestgehend von der OP erholt hatte, wurden zwei Ratten vergesellschaftet (in Typ III Käfigen mit erhöhtem Deckel). Des Weiteren erhielten die Tiere die ersten fünf Tage post OP 25 mg/l Tramadolhydrochloridtropfen (Tramal®, Grünenthal, Aachen, Deutschland) über das Trinkwasser. Die postoperative Versorgung beinhaltete außerdem die wöchentliche Gewichtsdocumentation und Pinpflege. Dabei wurden mindestens alle zwei Tage, wenn nötig auch täglich die Wunden kontrolliert, von Verunreinigungen und Verklebungen vorsichtig mit einem Wattestäbchen befreit und bei Bedarf mit Braunoderm® (B. Braun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert.





**Abbildung 8: Röntgenkontrolle direkt nach der Operation.**

### **3.8.1 Tötung und Probengewinnung**

Die Tiere wurden ihrer Gruppe entsprechend nach 3, 7 bzw. 14 Tagen erneut mit 0,3 mg/kg i.p. Medetomidin (Dormitor®, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) und 60 mg/kg i.p. Ketaminhydrochlorid (Ketamin Actavis®, München-Riem, Deutschland) narkotisiert und anschließend mit 10 ml Kaliumchlorid 7,45 % (B.Braun, Melsungen, Deutschland) durch eine intrakardiale Injektion getötet. Das linke Femur wurde mit Polyvidonjod (Braunoderm®, B. Braun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert.

Im unmittelbaren Anschluss wurde unter sterilen Bedingungen erst das Hüft-, anschließend das Kniegelenk des linken Femur freipräpariert, exartikuliert und vom Corpus getrennt. Die dem Femur anliegenden Muskeln wurden unter Schonung des Kallusgewebes vorsichtig entfernt, um Verunreinigungen des zu untersuchenden Probenmaterials mit Proteinen zu vermeiden. Mit einer Knochenzange wurde an den jeweiligen Enden des Kallus proximal sowie distal vom Frakturspalt die Diaphyse durchtrennt und sämtliches Gewebe aus dem Osteotomiespalt entnommen und unmittelbar in flüssigem Stickstoff konserviert, um weitere Denaturierung des Gewebes zu vermeiden. Es folgte die Freilegung des rechten Femurs und die Entnahme und Einfrierung eines ca. 5 mm Fragmentes der intakten, kontralateralen Diaphyse in flüssigem Stickstoff. Der Prozess der Tötung bis zur Probenentnahme dauerte maximal neun Minuten beim Kallusgewebe bzw. elf Minuten beim kontralateralen

Femurfragment. Bis zur Aufarbeitung erfolgte die Lagerung der Proben in Gefrierschränken bei -80 °C.

### 3.9 RNA Extraktion

Um herauszufinden, welchen Einfluss eine unterschiedlich starke mechanische Belastung eines kritischen Defektes in Kombination mit rhBMP-2 auf die Genexpression und somit auf die Knochenheilung hat, muss zunächst die RNA im Probenmaterial isoliert, anschließend in cDNA umgeschrieben und schließlich mittels PCR vervielfältigt werden.

Folgende Arbeitsschritte der RNA-Isolierung wurden dabei durchlaufen (Protokoll nach Tobias Thiele, Julius Wolff Institut, Charité, Universitätsmedizin Berlin, Deutschland):

- Mörsern des Probenmaterials
- RNA-Isolierung mit Trizol
- Phasentrennung mit Chloroform
- Präzipitation der RNA mit Ethanol
- DNase Verdau
- Herstellung der RNA-Elution mit RNase freiem Wasser
- Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA.

Für die Isolierung der RNA wurde das RNeasy®-Mini-Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet. Bei der Gewinnung von RNA muss bedacht werden, dass sie sehr anfällig für Kontamination mit RNasen aus der Umgebung ist und spätere Ergebnisse dadurch womöglich verfälscht werden können. Daher fand die Isolierung in einem speziellen, nur für RNA-Extraktion vorgesehenen Raum statt. Die Arbeitsflächen und Gerätschaften wurden vor Beginn des Aufarbeitens mit RNase ZAP™ (Sigma®, Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), welches RNasen deaktiviert, gereinigt. Handschuhe wurden getragen und es wurde darauf geachtet, dass Reagenzien und Gefäße frei von RNase sind.

Die Proben wurden bis zur Verarbeitung erneut in flüssigem Stickstoff gelagert, da ein Auftauen zur Degeneration der RNA führt. Aus diesem Grund wurden auch die Metallgeräte, wie Stößel (Spezialanfertigung der Charité, Berlin, Deutschland) und Spatel, in flüssigem Stickstoff eingelegt, um sie auf die gleiche Temperatur wie die Proben zu bringen. Die Knochenprobe wurde in das vorgekühlte Metallgefäß gefüllt, kleingemörsert und mit einem Spatellöffel in ein Probenröhrchen gekratzt. Anschließend wurde die Probe mit 1 ml

gekühltem Trizol homogenisiert. Trizol löst die Zellen auf und inaktiviert durch das enthaltene Guanidiniumthiocyanat RNasen und weitere Enzyme. In dem Phenol lösen sich DNA und Proteine.

Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurden 200 µl Chloroform hinzugemischt, wodurch eine Phasentrennung erfolgt. Das Gemisch wurde bei RT 10 min inkubiert und für 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert (Heraeus Fresco 17 Centrifuge, Thermo Electron GmbH, Osterode, Deutschland). Es entsteht eine obere wässrige Phase, welche die RNA enthält. Die mittlere Phase enthält die DNA und die untere Phase beinhaltet Proteine und Lipide, die durch das Phenol gebunden werden. Die oberste Phase wurde in ein neues Tube gegeben, der Rest verworfen.

Nachdem die Probe mit 500 µl 75 % Ethanol gemischt und die RNeasy-Säule (in einem 2 ml Collection-Tube) mit maximal 700 µl Probe beladen worden war, wurde das Collection-Tube bei  $\geq 10.000$  rpm und 4 °C für 30 Sekunden zentrifugiert (Zentrifuge siehe oben). Durch das Ethanol wurde die Hydrathülle des Zellkerns zerstört und die Nucleinsäuren fielen aus. Die RNA konnte somit präzipitiert und durch das Zentrifugieren an die Membran der Säule gebunden werden. Der Durchlauf wurde verworfen, die Säule mit dem restlichen Probenmaterial beladen und das Tube erneut bei  $\geq 10.000$  rpm und 4 °C für 30 Sekunden zentrifugiert (Zentrifuge siehe oben). Erneut wurde der Durchlauf verworfen, 350 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und bei  $\geq 10.000$  rpm und 4 °C für 30 Sekunden (Zentrifuge siehe oben) zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchlaufs, wurden nun 10 µl DNase und 70 µl RDD-Puffer gemischt und auf die Säule aufgetragen. Nach 15 min Einwirkzeit bei RT kamen 350 µl RW1-Puffer hinzu. Das Zentrifugieren erfolgte wieder bei  $\geq 10.000$  rpm und 4 °C für 30 Sekunden (Zentrifuge siehe oben). Es folgten 500 µl RPE-Puffer sowie das Zentrifugieren bei  $\geq 10.000$  rpm und 4 °C für 30 Sekunden (Zentrifuge siehe oben), nachdem der Durchlauf verworfen worden war. Ein zweiter Durchgang mit 500 µl RPE folgte und dieses Mal wurde die Säule durch zweiminütige Zentrifugation bei  $\geq 10.000$  rpm und 4 °C getrocknet. Dann wurde sie in einem frischen Collection-Tube 1 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Die erste RNA-Elution erhielt man, indem die Säule auf ein RNase-freies 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt, mit 30 µl RNase-freiem, 95 °C heißem Wasser (Nuclease frei, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) für 5 min bei RT inkubiert und anschließend bei  $\geq 10.000$  rpm und 4 °C für 2 min zentrifugiert wurde. Für die zweite Elution wurde dieser Schritt mit einem neuen RNase-freien Eppendorfgefäß und 20 µl 95 °C heißem RNase-freiem Wasser (Nuclease frei, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) wiederholt.

Zum Schluss erfolgte die photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der soeben extrahierten RNA (NanoDrop 1000 UV/VIS Spektrophotometer, Thermo Scientific,

Wilmington, USA) für die Ermittlung der RNA-Konzentration in der späteren rt-PCR. Die Probe wurde dann bis zum Umschreiben in cDNA bei -80 °C gekühlt.

Um eine Kontamination mit Proteinen zu ermitteln, wurde der Quotient der optischen Dichte bei 260 und 280 nm genutzt. Dieser Wert sollte zwischen ca. 1,8-2,0 liegen. Niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin, sodass die Probe aufgereinigt werden müsste.

Der Quotient der Extinktionswerte bei 260 und 230 nm gibt Aussagen über eine Verunreinigung mit Kohlenhydraten, Salzen oder organischen Lösungsmitteln. Ist der Wert kleiner als 2,0, sollte eine Reinigung der Probe erfolgen.

### 3.10 Umschreiben von RNA in cDNA

Für das Umschreiben von 1 µg RNA in komplementäre DNA (cDNA) werden 4 µl vom qScript™cDNA Super Mix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, USA) eingesetzt. Dieser Mix liefert alle benötigten Zusätze für die Herstellung von cDNA. Enthalten sind Puffer, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Random- und Oligoprimers, RNase Inhibitorprotein, qScript reverse Transcriptase und Stabilisatoren. Dieser Mischung wird eine 1 µg entsprechende µl Menge RNA hinzugefügt und mit RNase- und DNase-freiem Wasser (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) auf 20 µl aufgefüllt. Verwendet werden 0,2 ml Tubes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Um einer Denaturierung vorzubeugen, ist es wichtig, dass die Reagenzien sowie RNA bei -20 °C gekühlt sind. Die Komponenten werden vorsichtig gemischt und kurz auf den Boden des 0,2 ml Tubes abzentrifugiert (Spectrafuge™ Mini Laboratory Centrifuge, Labnet International Inc., New Jersey, USA). Das Umschreiben erfolgt im Mastercycler gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei einer Inkubation von 5 min bei 25 °C zur Denaturierung der RNA, 30 min bei 42 °C für die Reverse Transkription, 5 min bei 85 °C zur Deaktivierung der Reversen Transkriptase und Halten bei 4 °C. Die fertige cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 3: Protokoll für das Umschreiben von RNA in cDNA nach Dr. Ing. Susann Minkwitz** (Julius Wolff Institut, Charité Universitätsmedizin, Berlin, Deutschland).

Reaktionsmix		Programm	
cDNA SuperMix	4 µl	5 min	25 °C
RNA (1µg)	x µl	30 min	42 °C
Rnase-/Dnase-freies Wasser	x µl	5 min	85 °C
Gesamtvolumen	20 µl	halten	4 °C

### 3.11 Testung der Primer

Zunächst wurden die ausgewählten Primer (TIB® MOLBIOL, Berlin, Deutschland) der zu untersuchenden Zielgene, inklusive Housekeeping-Gen (Cyclophyllin A), mit einem dreier Probenpool im dreifach Ansatz auf ihre Funktion bzw. ihre Detektierbarkeit in den Proben getestet. Dafür wurden die lyophilisierten Primer zunächst mit Wasser auf eine 100 µM Stammlösung gebracht und 1:10 verdünnt, um eine Arbeitslösung von 10 µM zu erhalten.

Für die qRT-PCR wurde die cDNA des Probenpools 1:30 mit Wasser (Nuclease frei, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) verdünnt. Zur Kontrolle einer Kontamination wurden pro Gen jeweils 2 Wells als Non Template Control (NTC) mit PCR-reinem Wasser bestückt. Alle Analysen erfolgten in 96 Well-Platten mit dem Perfecta Sybr Green Supermix for iQ im iQ5 Cycler (Bio-Rad, München, Deutschland). Pro Well wurden 12,5 µl PerfeCta® SYBR® Green SuperMix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, USA), 6,5 µl PCR Wasser (Nuclease frei, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) und jeweils 0,5 µl Forward Primer und Reverse Primer des entsprechenden Gens pipettiert. Im Anschluss wurden 5 µl/Well cDNA bzw. PCR Wasser (NTC) hinzugefügt. Die Platten wurden mit einer Klebefolie (Microseal 'B' Adhesive Seals für PCR Platten, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) versiegelt und herunterzentrifugiert. Das real-time (rt)-PCR-Programm startete mit einer initialen Denaturierungsphase von 3 min bei 95 °C. Es folgten 40 Zyklen Denaturierung (15 s, 95 °C), Anlagerung der genspezifischen Primer (45 s, 60 °C) und Verlängerung des komplementären Stranges über die Taq-DNA-Polymerase (30 s, 72 °C). Im Anschluss wurde die Schmelzkurve aufgenommen, wobei die Temperatur schrittweise von 55 °C um 5 °C auf 95 °C erhöht wurde. Die Primer wurden dann auf ihre Effizienz hin untersucht.

Für den Effizienztest wurde ein Pool aus zwei Proben genommen mit 5 µl cDNA pro Well. Es erfolgte eine fünfstufige Verdünnungsreihe der cDNA (1:5; 1:10; 1:50; 1:100; 1:200) im Zweifachansatz der Primer. Zwei Wells als Non Template Control wurden mit Wasser (PCR clean) besetzt. Der Reaktionsmix/ Gen und das rt-PCR-Programm liefen nach dem unten genannten Protokoll (Tab.4). Die ct-Werte wurden gegen den (dekadischen) Logarithmus der Verdünnungsstufen aufgetragen, sodass eine lineare Gerade entstand, aus deren Steigung mit Hilfe der Formel-  $\text{Effizienz} = 10^{(-1/\text{Steigung})}$  die PCR-Effizienz ermittelt wurde. Die Effizienz ist dann 100 %, wenn sich die Anzahl der PCR-Produkte in jedem Zyklus verdoppelt-  $E=2$ . Eine Abweichung von +/- 10 % gilt als akzeptabel.

**Tabelle 4: Protokoll für die qRT-PCR nach Dr. Ing. Susann Minkwitz** (Julius Wolff Institut, Charité Universitätsmedizin, Berlin, Deutschland).

Reaktionsmix			RT-PCR Programm		
Mastermix	SYBR Green SuperMix	12,5 µl/Well	3 min		95 °C
	PCR Wasser	6,5 µl/Well	15 s	40 Zyklen	95 °C
PrimerMasterMix	Mastermix	19 µl/Well	45 s		60 °C
	Forward Primer (10 µM)	0,5 µl/Well	30 s		72 °C
	Reverse Primer (10 µM)	0,5 µl/Well	15 s		95 °C
Template	cDNA/ Wasser	5 µl/Well	alle 30 s 0,5 °C Erhöhung		55 °C-95 °C
			Haltend		15 °C

**Tabelle 5: Sequenzen der für die qRT-PCR verwendeten Primer.**

Gen		Sequenz
ID-1	FP	actctgagtctgaagtcgcg
	RP	cggtagtgtctttccccgg
c-Fos	FP	ggggcaaagtagagcagcta
	RP	tgggctgccaaaataaactc
Noggin	FP	aagaagctgaggaggaagttacag
	RP	gcacagactggatggcttac
BMPR II	FP	ccagaagcctggaaagaaaatag
	RP	gaggaagaggaataatctgggtaag
BMPR IA	FP	ggaggaatcgaggaggaata
	RP	tgtgagtctggatgctggatta
BMPR IB	FP	ggagatgtgttctggaggatag
	RP	gccagcactctgtcataag
Col1 IA	FP	gcaacagtcgattcacctacag
	RP	tgggatggagggagttaca
Cycl A	FP	gcatggtggcaagtccatct
	RP	tgctcatgccttcttcaccttc

### 3.12 Probenanalyse

Im Anschluss erfolgte die quantitative real-time PCR (iQ™ 5 Cyler, Bio-Rad, München, Deutschland) der Proben nach in 3.11 beschriebenem Protokoll (Tab.4). Die extrahierte RNA wurde zuvor in 3.10 in cDNA umgeschrieben. Diese wurde im dreifach-Ansatz pro Gen auf die Platte aufgetragen. Pro Gen und Tier liefen 2 NTC mit Wasser (Nuclease frei, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) mit. Die PCR und die Umschreibung von RNA in cDNA fanden in einem separaten von RNA-Isolierung getrennten Raum statt. Alle Geräte und Arbeitsflächen wurden vor und nach der Arbeit mit Desinfektionsmittel (Descosept Flächendesinfektion, Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld, Deutschland) gereinigt und Handschuhe stets bei Kontakt mit verunreinigten Flächen sowie nach Verlassen und erneutem Betreten des Raumes gewechselt. Jede PCR aller Proben lief nach dem gleichen Protokoll (siehe 3.11) ab, um eine Standardisierung zu ermöglichen und Fehler zu vermeiden. Zunächst wurde der Mastermix für eine ganze Platte angesetzt und dann auf die Primer-Mastermixe der verschiedenen Gene verteilt. Anschließend wurde die PCR-Platte (0,2 ml, 96-well, Thermo Scientific, UK) mit den Primer-Mastermixen bestückt und darauf folgend die Wells mit dem vorgesehenen Template beladen. Dabei wurden die restlichen Wells abgedeckt und nach jedem Well die Pipettenspitze (ep Dualfilter T.I.P.S.®, 10 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gewechselt, um Kontamination zu verhindern.

Die Eppendorfgefäße (1,5 ml, PCR clean, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) wurden nur bei Gebrauch geöffnet und unmittelbar danach verschlossen, um eine Verunreinigung zu vermeiden. Das Pipettieren erfolgte auf einem Plattenkühler (PCR-Cooler, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Die fertige PCR-Platte wurde mit Klebefolie (Microseal 'B' Adhesive Seals für PCR Platten, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) sorgfältig zugeklebt, das Material durch kurzes Zentrifugieren (500 rpm, 1 min bei RT) auf den Plattenboden befördert und schließlich die rt-PCR (iQ™ 5 Cyler, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Die Daten wurden mit der Bio-Rad iQ5 Software (Bio-Rad, München, Deutschland) generiert und weiter mit Microsoft Excel ausgewertet. Es folgte die Normalisierung auf ein nicht reguliertes Housekeeping Gen- Cyclophilin A-in Form einer relativen Quantifizierung. Dabei wird von einer Effizienz = 2 ausgegangen, sodass sich die DNA-Menge pro Zyklus verdoppelt. Folgende Berechnungen wurden dabei nacheinander angewendet:

- 1)  $\Delta CT^{\text{Behandlung}} = CT^{\text{Zielgen}} - CT^{\text{Referenzgen}}$
- 2)  $\Delta CT^{\text{Kontrolle}} = CT^{\text{Zielgen Kontrolle}} - CT^{\text{Referenzgen Kontrolle}}$
- 3)  $\Delta\Delta CT = \Delta CT^{\text{Behandlung}} - \Delta CT^{\text{Kontrolle}}$
- 4)  $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$

### 3.13 Statistische Auswertung

Zum Schluss fand die statistische Auswertung (PASW Statistics 20.0, SPSS Inc., IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland) statt. Da man bei einer Gruppengröße von  $n=4$  nicht von einer Normalverteilung ausgehen kann und es durch die unterschiedlichen Gewichtungen des Kolmogorow-Smirnow- und Shapiro-Wilk-Tests unterschiedliche Beurteilungen der Normalverteilung gab, erfolgte die Auswertung anhand des nichtparametrischen Zwei-Stichproben-Tests, des sogenannten Mann-Whitney-U-Tests. Das Signifikanzniveau wurde bei 5 % festgelegt ( $p \leq 0,05$ ). Eine Korrektur wurde nach Benjamini-Hochberg durchgeführt. Die graphische Darstellung der Werte erfolgte in Form von Boxplots mit Median, 25 %- und 75 %-Quantil sowie Minimal- und Maximalwert.



## 4. Ergebnisse

Dass sowohl mechanische Einflüsse als auch BMP stimulierende Effekte auf die Knochenheilung haben, konnte mehrfach nachgewiesen werden (Claes et al. 2011, Rui et al. 2011). Diese Studie befasste sich nun mit der Fragestellung, welchen Einfluss eine kombinierte Behandlung mit mechanischer Stimulation und BMP-2-Applikation auf die Expression ausgewählter Gene in der Knochendefektheilung haben. Alle 60 operierten Tiere erholten sich von der Operation ohne Komplikationen und belasteten die betroffene Gliedmaße innerhalb kurzer Zeit wieder voll.

Die Tiere wurden in folgende Gruppen eingeteilt:

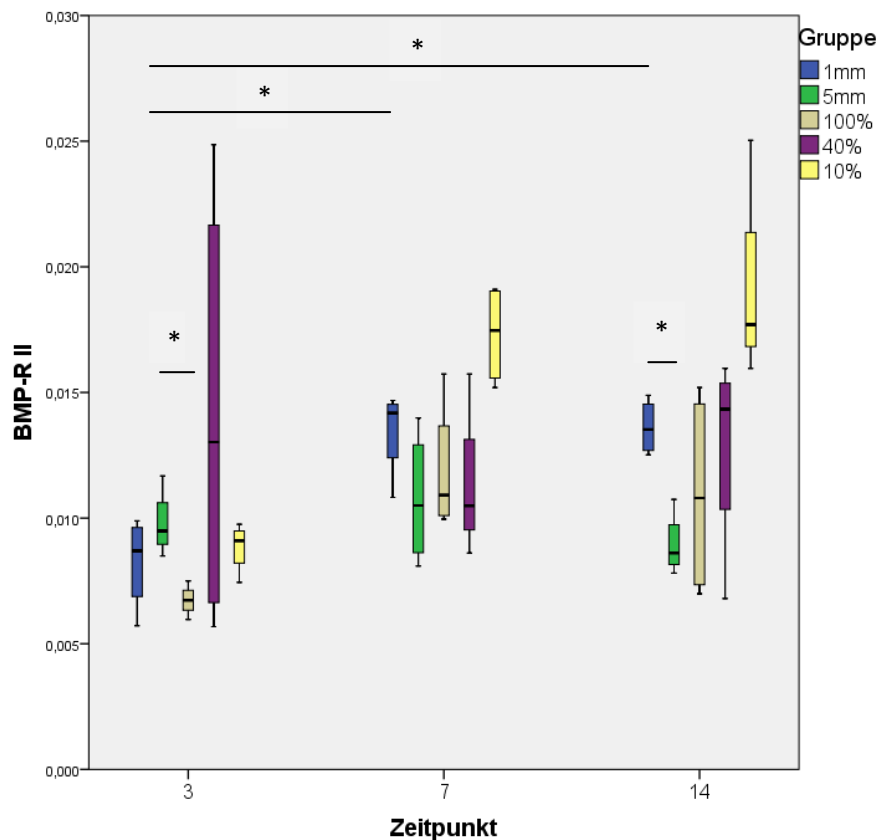
- die Positivkontrolle: - sie spiegelt mit einem 1 mm großen Osteotomiespalt die physiologische Knochenheilung wider
  - der Fixateur externe hat eine Steifigkeit von 100 %
- die Negativkontrolle: - sie stellt den Zustand einer ausbleibenden Knochenheilung dar,
  - dafür wurde ein 5 mm großer Osteotomiespalt mit einem NaCl-beladenen Kollagenvlies behandelt
  - der Fixateur externe hat eine Steifigkeit von 100 %
- die rigide BMP-2 Gruppe: - der Fixateur externe hat eine Steifigkeit von 100 %
  - der 5 mm große Osteotomiespalt wurde mit einem mit 5 µg rhBMP-2 beladenen Kollagenvlies gefüllt
- die semi-rigide BMP-2 Gruppe: - die Fixateursteifigkeit beträgt 40 %
  - der 5 mm große Osteotomiespalt wurde mit einem mit 5 µg rhBMP-2 beladenen Kollagenvlies gefüllt
- die flexible BMP-2 Gruppe: - mit einer Steifigkeit von 10 %
  - der 5 mm große Osteotomiespalt wurde mit einem mit 5 µg rhBMP-2 beladenen Kollagenvlies gefüllt.

An den Tagen 3, 7 und 14 nach der Operation wurde die Genexpression von ausgewählten Genen, die an der Knochenheilung und Mechanotransduktion beteiligt sind, über die quantitative real-time PCR im entstandenen Kallusgewebe analysiert.

Tabelle 6: Ausgewählte Zielgene der Expressionsanalyse.

Zielgene	Funktion
<b>Membranrezeptoren</b>	
BMPR II	Heterodimere des BMP-Rezeptors
BMPR IA	
BMPR IB	
<b>Zell-, Matrix- und Ossifikationsfaktoren</b>	
Coll 1A (Kollagen Typ I)	Indikator für Knochenbildung
Noggin	BMP-Antagonist
<b>Transkriptionsfaktoren</b>	
c-Fos	Indikatoren für mechanische Stimulation
ID-1 (Inhibitor of Differentiation 1)	
Cyclophilin A	Housekeeping Gen

## 4.1 BMPR II



**Abbildung 9: Expression des Gens BMPR II in den jeweiligen Versuchs- und Kontrollgruppen an Tag 3, 7, 14 post-OP.** Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) im Expressionsvergleich zwischen folgenden Gruppen: PK-3d vs. 7d, 3d vs. 14d; 3d-rigide Gruppe vs. NK; 14d-PK vs. NK.

Die rigide Gruppe zeigte eine Erhöhung der BMPR II-Expression von Tag 3 auf Tag 7 ( $p = 0,029$  vor Korrektur,  $p = 0,085$  nach Korrektur). Es erfolgte kein weiterer Expressionsanstieg von Tag 7 auf Tag 14.

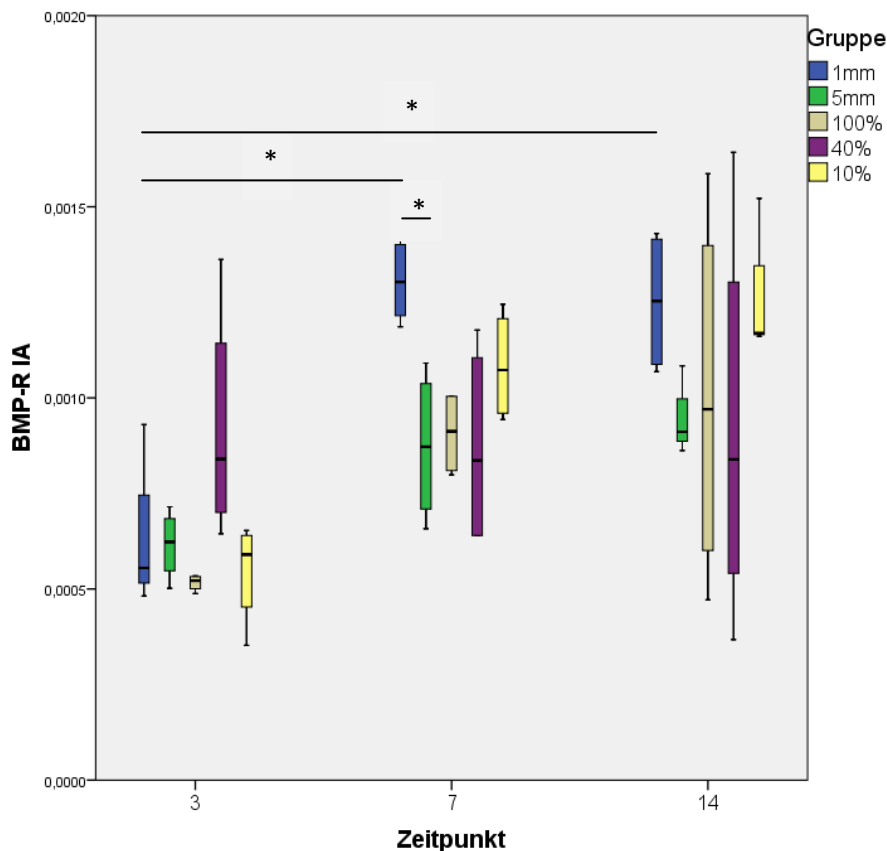
Die semi-rigide Gruppe wies eine große Streuung auf und schwankte in ihrem zeitlichen Verlauf gering. Interessanterweise war die Expression im Vergleich zu den anderen BMP-2-behandelten Versuchsgruppen bereits an Tag 3 am stärksten (nicht signifikant). An Tag 7 und 14 zeigten die rigide und semi-rigide Gruppe ein ähnliches Expressionsniveau.

Die flexible Gruppe ließ einen deutlichen Expressionsanstieg von Tag 3 auf Tag 7 erkennen ( $p = 0,029$  vor Korrektur,  $p = 0,085$  nach Korrektur von Tag 3 auf Tag 7), der im weiteren Verlauf nicht mehr zunahm (Tag 14). Insgesamt zeigte die flexible Gruppe an Tag 7 und 14 ein höheres Expressionsniveau als die rigide und semi-rigide Gruppe (nicht signifikant).

Im Zeitverlauf unterschieden sich die Kontrollgruppen in ihrem Expressionsmuster. Bei der Positivkontrolle (PK) kam es zu einem signifikanten Expressionsanstieg von BMPR II ( $p=0,043$  von Tag 3 auf Tag 7 sowie von Tag 3 auf Tag 14). Von Tag 7 auf Tag 14 erfolgte kein weiterer Anstieg. Im Gegensatz dazu zeigte die Negativkontrolle (NK) keine deutlichen Änderungen in ihrer Expressionsaktivität. Außerdem wies die PK im Zeitverlauf eine stärkere BMPR II-Expression auf, die an Tag 14 signifikant höher war als die der NK ( $p=0,029$ ).

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Negativkontrolle zwar an Tag 3 ein stärkeres Expressionsniveau als die rigide Gruppe ( $p=0,029$ ) zeigte, die BMP-2-Gabe (100 % Gruppe) im weiteren Zeitverlauf im Vergleich zur Negativkontrolle aber keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von BMPR II hatte. In Kombination mit einer stärkeren mechanischen Stimulation durch eine geringere Balkensteifigkeit im Fixateur externe wies die semi-rigide Gruppe frühzeitig an Tag 3 eine erhöhte Expression auf, wohingegen besonders die flexible Gruppe eine gesteigerte BMPR II-Expression an Tag 7 und Tag 14 zeigte. Während die NK und die PK an Tag 3 auf einem ähnlichen Niveau exprimierten, lag die Expression der PK an Tag 14 signifikant ( $p=0,029$ ) über der der NK.

## 4.2 BMPR IA



**Abbildung 10: Expression des Gens BMPR IA in den jeweiligen Versuchsgruppen an Tag 3, 7, 14 post-OP.** Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) im Expressionsvergleich zwischen folgenden Gruppen: PK-3d vs. 7d; 3d vs. 14d; 7d- PK vs. NK.

Das Expressionsmuster für das Gen BMPR IA der rigiden Gruppe zeigte einen Expressionsanstieg von Tag 3 zu Tag 7, mit ähnlichem Niveau an Tag 14 ( $p = 0,029$  von Tag 3 auf Tag 7 vor Korrektur,  $p = 0,087$  nach Korrektur). Dabei wies die rigide Gruppe an Tag 14 eine große Streuung auf.

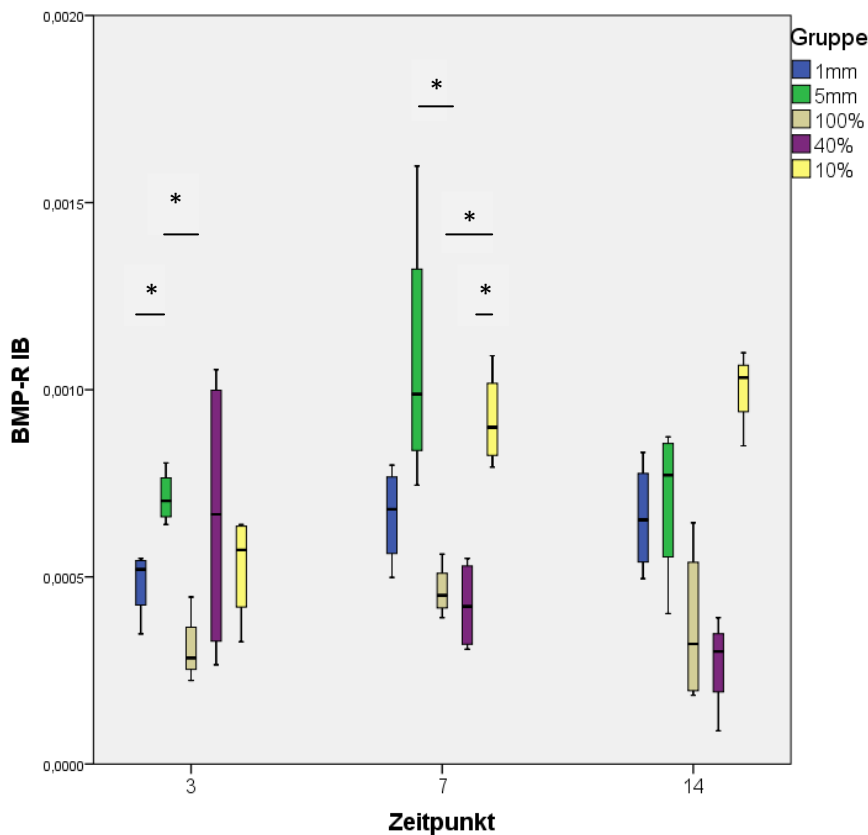
Die semi-rigide Gruppe zeigte an Tag 3 von allen Versuchsgruppen die höchste Rezeptor-Expression (keine Signifikanz). Diese änderte sich allerdings im weiteren Zeitverlauf unwesentlich. Weiterhin streute sie stark innerhalb der Gruppen. An Tag 7 und 14 näherten sich die übrigen Vergleichsgruppen einem ähnlichen Expressionslevel an.

Bei der flexiblen Gruppe war ein deutlicher Expressionsanstieg des Gens BMPR IA von Tag 3 zu Tag 7 erkennbar ( $p = 0,029$  vor Korrektur,  $p = 0,085$  nach Korrektur).

Die PK wies erneut einen signifikanten ( $p= 0,043$  von Tag 3 auf Tag 7 sowie auf Tag 14) Anstieg der Expression von BMPR IA auf. Die Expression von Tag 7 auf Tag 14 blieb weitgehend gleich. Auch bei der NK stiegen die Expressionswerte im Verlauf an ( $p= 0,029$  von Tag 3 auf Tag 14 vor Korrektur,  $p= 0,085$  nach Korrektur). Beide Kontrollgruppen zeigten eine ähnliche Expressionsstärke an Tag 3, die allerdings an Tag 7 in der Positivkontrolle signifikant höher ( $p= 0,029$ ) verglichen mit der NK vorlag.

Zwar war an Tag 3 die Expression von BMPR IA bei der Leerkontrolle im Vergleich zur rigiden Gruppe geringfügig höher, aber dennoch exprimierten die rigide Gruppe und die NK im Zeitverlauf auf einem ähnlichen Niveau. Interessanterweise schien in der semi-rigiden Gruppe im Vergleich zur rigiden und flexiblen Gruppe bereits an Tag 3 eine erhöhte BMPR IA-Expression stattzufinden, welche von der flexiblen und rigiden Gruppe erst ab Tag 7 erreicht wurde. Der stete Expressionsanstieg der flexiblen Gruppe von Tag 3 zu Tag 14 lässt eine Stimulation der Rezeptor-Expression durch das erhöhte mechanische Umfeld vermuten. Während die Kontrollgruppen an Tag 3 BMPR IA ähnlich exprimierten, lag trotz fehlender Signifikanz die Expression der Positivkontrolle zu den übrigen Zeitpunkten über der Expression der Negativkontrolle.

### 4.3 BMPR IB



**Abbildung 11: Genexpression von BMPR IB in den jeweiligen Versuchsgruppen an Tag 3, 7, 14 post-OP.** Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) im Expressionsvergleich zwischen folgenden Gruppen: 3d- PK vs. NK; rigide Gruppe vs. NK; 7d- flexible Gruppe vs. rigide Gruppe; flexible Gruppe vs. semi-rigide Gruppe; rigide Gruppe vs. NK.

Die rigide Gruppe zeigte an Tag 3 das niedrigste Expressionsniveau im Vergleich zur semi-rigiden und flexiblen Gruppe (ohne Signifikanz). Im Verlauf stiegen die Werte geringfügig an (Tag 7). Die Expression erreichte an Tag 14 aber wieder das Niveau von Tag 3. Dabei blieb sie besonders an Tag 3 und 7 signifikant ( $p=0,029$ ) unter der NK.

Die semi-rigide Gruppe zeigte im gesamten Untersuchungszeitraum einen Expressionsabfall von Tag 3 zu Tag 7 und weiter zu Tag 14 (ohne Signifikanz), wobei das Expressionsniveau an Tag 7 und Tag 14 mit dem der rigiden Gruppe vergleichbar war. An Tag 3 lag eine große Streuung vor aber die Werte befanden sich erneut tendenziell über den Werten der rigiden und flexiblen Gruppe.

Im Gegensatz dazu zeigte die flexible Gruppe im Zeitverlauf eine Hochregulierung des Gens BMPR IB ( $p= 0,029$  von Tag 3 auf Tag 7 vor Korrektur,  $p= 0,085$  nach Korrektur). Die

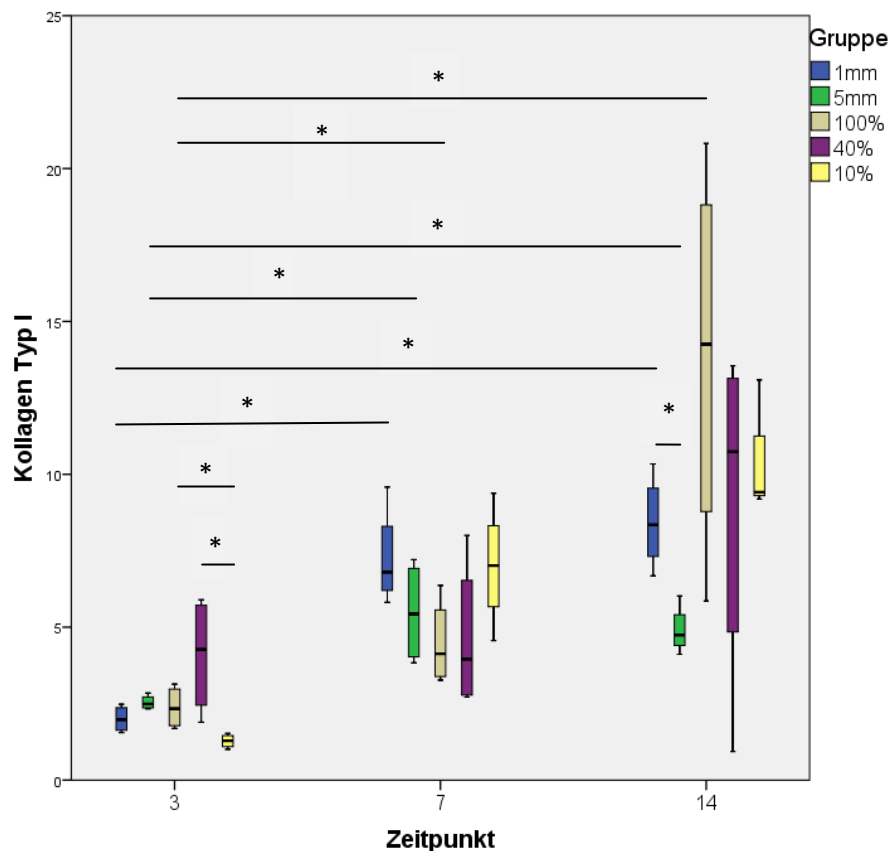
Expression lag dabei signifikant an Tag 7 ( $p= 0,043$ ) und auch an Tag 14 über den Werten der rigiden und semi-rigiden Gruppe.

Die Positivkontrolle zeigte einen geringfügigen Anstieg von Tag 3 zu Tag 7. Die Expression blieb zu Tag 14 auf dem gleichen Niveau. An Tag 3 lag die Expression von BMPR IB bei der NK über denen der übrigen Gruppen, was sich in der Signifikanz ( $p= 0,029$ ) zur PK und rigiden Gruppe verdeutlichte. An Tag 7 wurde BMPR IB von der Negativkontrolle am stärksten exprimiert. Verglichen mit der PK, zeigte sich besonders an Tag 3 ( $p= 0,029$ ) eine stärkere Hochregulierung in der NK.

Zusammenfassend zeigte die NK eine signifikant höhere Expression an Tag 3 und Tag 7 gegenüber der rigiden Gruppe. Die rigide und semi-rigide Gruppe hatten an Tag 7 und Tag 14 ein ähnliches Expressionsniveau, während BMPR IB in der flexiblen Gruppe trotz fehlender Signifikanz an Tag 14 am stärksten hochreguliert war. Dies deutet auf eine mechanische Regulation des Rezeptors hin. In der NK lag gegenüber der PK eine signifikant ( $p= 0,029$ ) höhere Expression an Tag 3 vor, was sich an Tag 14 anglich und somit eine Regulierung des Rezeptors vor allem zu Beginn der Heilung vermuten lässt.



#### 4.4 Kollagen Typ I



**Abbildung 12: Expression des Gens Kollagen Typ I in den jeweiligen Versuchsgruppen an Tag 3, 7, 14 post-OP.** Signifikanz ( $p < 0,05$ ) im Expressionsvergleich zwischen folgenden Gruppen: PK- 3d vs. 7d, 3d vs. 14d; NK- 3d vs. 7d, 3d vs. 14d; rigide Gruppe- 3d vs. 7d, 3d vs. 14d; 3d- flexible Gruppe vs. rigide Gruppe, flexible Gruppe vs. semi-rigide Gruppe; 14d- PK vs. NK.

Die rigide Gruppe zeigte im Zeitverlauf eine signifikante Steigerung in der Kollagen Typ I-Expression ( $p=0,043$  von Tag 3 zu Tag 7 und von Tag 3 zu Tag 14). An Tag 14 lag eine große Streuung vor. Die Expression war an Tag 3 auf einem Niveau mit der Negativkontrolle. An Tag 14 hatte die rigide Gruppe eine höhere Expression als die NK (ohne Signifikanz).

Die semi-rigide Gruppe erreichte an Tag 3 ein höheres Expressionsniveau als die anderen Versuchsgruppen und wies von Tag 7 auf Tag 14 eine weitere Hochregulierung des Gens Kollagen Typ I (mit großer Streuung) vor (ohne Signifikanz).

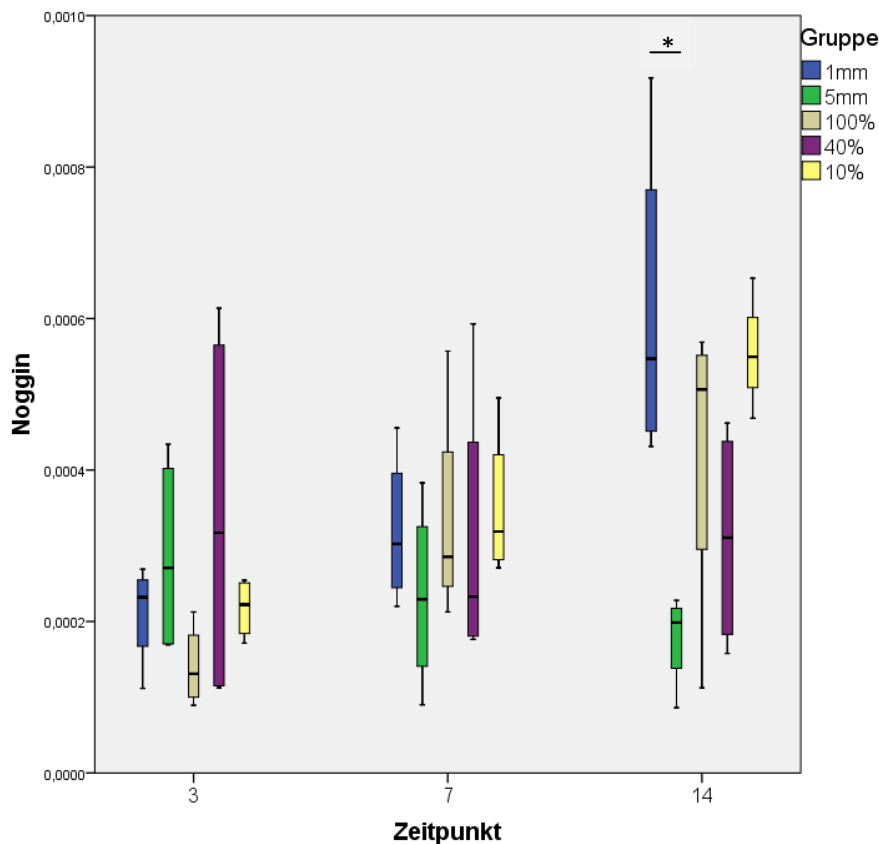
Die flexible Gruppe hatte an Tag 3 die signifikant niedrigste Expression unter den Versuchsgruppen ( $p=0,043$ ). Die Expression stieg im Zeitverlauf aber an (von Tag 3 auf Tag 7  $p=0,029$  vor Korrektur,  $p=0,085$  nach Korrektur). Ab Tag 7 exprimierten die Vergleichsgruppen (rigide vs. semi-rigide vs. flexible Gruppe) auf einem ähnlichen Niveau,

wobei an Tag 7 die flexible Gruppe und an Tag 14 die rigide Gruppe tendenziell höhere Expressionswerte aufwiesen.

Bei der Positivkontrolle kam es zu einem signifikanten Anstieg der Kollagen Typ I-Expression (Signifikanz von Tag 3 auf 7 sowie auf Tag 14,  $p=0,043$ ). Auch die Negativkontrolle erfuhr einen deutlichen Expressionsanstieg von Tag 3 auf Tag 7 und Tag 3 auf Tag 14 ( $p=0,043$ ). Während die NK und PK an Tag 3 noch auf einem Niveau exprimierten, zeigte die PK im Vergleich zur NK an Tag 14 eine signifikant ( $p=0,029$ ) höhere Expression.

Zusammenfassend betrachtet, erkennt man im Vergleich der rigiden Gruppe mit der Negativkontrolle einen stimulierenden Effekt von BMP-2 bei gleicher Steifigkeit auf das Gen Kollagen Typ I. Im Verlauf zeigte die rigide Gruppe einen signifikanten Anstieg der Genexpression mit einem Höchstwert an Tag 14 ( $p=0,043$  von Tag 3 auf 7 und 14). Auffälliger Weise wies an Tag 3 die semi-rigide Gruppe das höchste und die flexible Gruppe das niedrigste Expressionsniveau unter den Versuchsgruppen auf, was sich bis Tag 14 auf einem ähnlichen Niveau einpendelte. Bei den Kontrollgruppen ist an Tag 14 ein signifikanter Unterschied in der Expression der Positivkontrolle im Vergleich zur Negativkontrolle zu erkennen ( $p=0,029$ ).

## 4.5 Noggin



**Abbildung 13: Expression des Gens Noggin in den jeweiligen Versuchsgruppen an Tag 3, 7, 14 post-OP.** Signifikanz ( $p < 0,05$ ) im Expressionsvergleich zwischen folgenden Gruppen: 14d- PK vs. NK.

Noggin, als regulatorischer Gegenspieler von BMP-2, wurde in der rigiden Gruppe deutlich hochreguliert ( $p = 0,029$  von Tag 3 auf Tag 7 vor Korrektur,  $p = 0,087$  nach Korrektur). Während die rigide Gruppe an Tag 3 noch eine niedrige Expression im Gruppenvergleich vorwies (ohne Signifikanz), exprimierte sie an Tag 14 annäherungsweise auf dem hohen Niveau von der flexiblen Gruppe. Ab Tag 14 zeigte die rigide Gruppe höhere Expressionswerte als die NK (ohne Signifikanz).

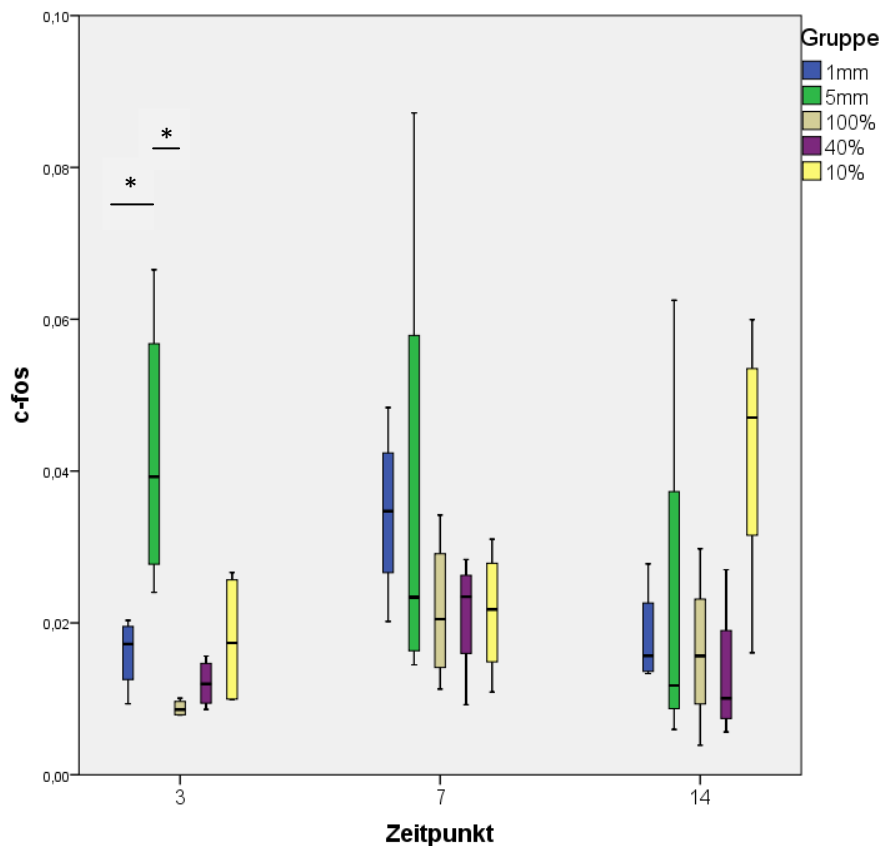
Dahingegen wurde in der semi-rigiden Gruppe das Gen für Noggin im Zeitverlauf verhältnismäßig konstant exprimiert. Zu allen Zeitpunkten lag eine große Streuung vor.

In der flexiblen Gruppe erfuhr Noggin im Zeitverlauf einen Anstieg in der Expression ( $p = 0,029$  von Tag 3 auf Tag 7 vor Korrektur,  $p = 0,085$  nach Korrektur). Interessanterweise blieb die flexible Gruppe dabei immer auf einem ähnlichen Level mit der Positivkontrolle und wies an Tag 14 mit dieser die höchste Expression auf.

In den beiden Kontrollgruppen zeigte sich an Tag 3 und Tag 7 ein ähnliches Expressionsniveau, wohingegen die Positivkontrolle an Tag 14 eine signifikant höhere ( $p=0,029$ ) Expression gegenüber der Negativkontrolle zeigte.

Zusammenfassend erfolgte im Vergleich der rigiden Gruppe mit der Negativkontrolle die Noggin-Expression auf einem relativ einheitlichen Niveau. Wobei die rigide Gruppe ab Tag 14 sich mit höheren Expressionswerten von dem Expressionsniveau der Negativkontrolle entfernte. Im weiteren Vergleich variierender Steifigkeit bei gleicher BMP-2-Gabe zeigten die rigide und die flexible Gruppe trotz fehlender Signifikanz einen Expressionsanstieg im Zeitverlauf. Bei der semi-rigiden Gruppe war jedoch ein auffallend gleichbleibendes Expressionsniveau erkennbar, welches an Tag 7 und Tag 14 unter dem der anderen beiden Versuchsgruppen blieb. Während die Positivkontrolle einen Anstieg der Expression verzeichnete und an Tag 14 eine deutlich höhere Expression als die Negativkontrolle vorwies, änderte sich die Genexpression bei der Negativkontrolle unwesentlich.

## 4.6 c-Fos



**Abbildung 14: Expression des Gens c-Fos in den jeweiligen Versuchsgruppen an Tag 3, 7, 14 post-OP.** Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) im Expressionsvergleich zwischen folgenden Gruppen: 3d- PK vs. NK, rigide Gruppe vs. NK.

In der rigiden und semi-rigiden Gruppe kam es an Tag 7 zu einem Anstieg der c-Fos Expression (bei der rigiden Gruppe  $p = 0,029$  vor Korrektur,  $p = 0,087$  nach Korrektur), die im weiteren Verlauf tendenziell abnahm. Insgesamt zeigten die beiden Gruppen ein ähnliches Expressionsniveau.

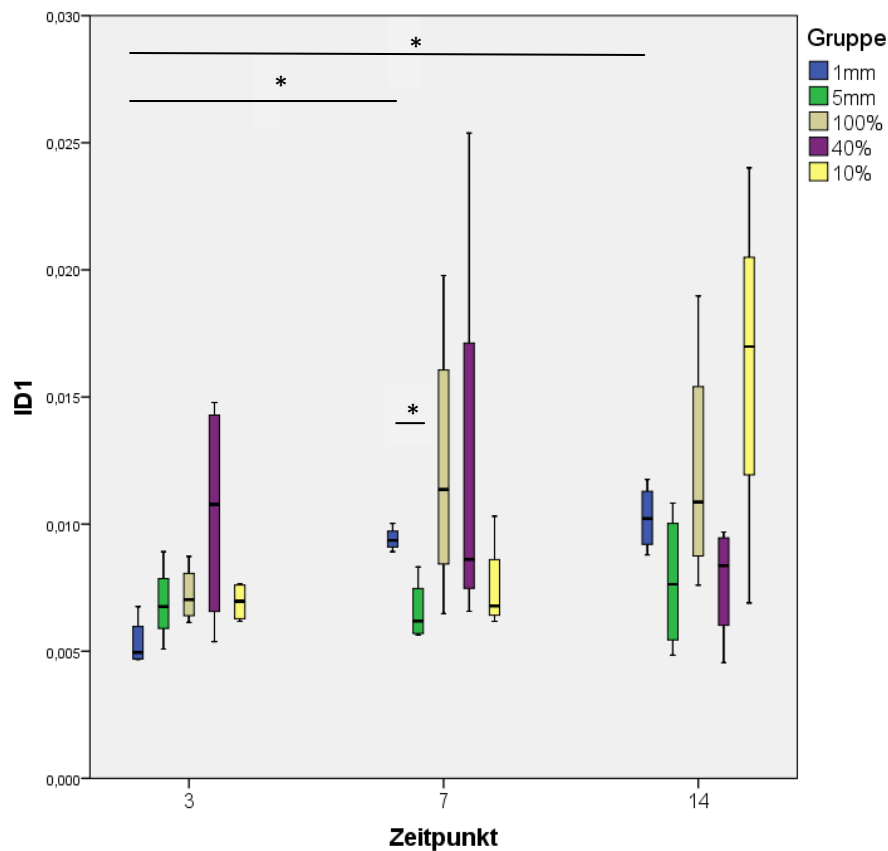
c-Fos, ein Indikator für mechanische Stimulierung, wurde in der flexiblen Gruppe an Tag 3 und Tag 7 ähnlich exprimiert. Dabei wies c-Fos in der flexiblen Gruppe an Tag 14 die stärkste Hochregulierung und das höchste Expressionsniveau gegenüber den anderen Versuchsgruppen vor (ohne Signifikanz).

Die Positivkontrolle steigerte ihre Expression von Tag 3 zu Tag 7 und zeigte an Tag 7 das höchste Expressionsniveau (ohne Signifikanz), wobei an Tag 14 die Expression wieder auf ein ähnliches Niveau von Tag 3 sank. Im Gegensatz dazu zeigte die Negativkontrolle im

Untersuchungszeitraum eine tendenzielle Abnahme der c-Fos Expression, wobei sie an Tag 3 am stärksten exprimierte (Signifikanz zur PK und rigiden Gruppe,  $p=0,029$ ).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die rigide Gruppe gegenüber der NK an Tag 3 eine signifikant ( $p= 0,029$ ) geringere c-Fos-Expression zeigte, die sich danach jedoch anglich. Die rigide und die semi-rigide Gruppe wiesen ein ähnliches Expressionsmuster von c-Fos auf. Die flexible Gruppe hob sich an Tag 14 in der c-Fos-Expression von den übrigen Versuchsgruppen mit der Tendenz nach oben ab. Die Negativkontrolle wies an Tag 3 auch gegenüber der PK eine stärkere c-Fos-Expression auf. Ab Tag 7 war eine Abnahme der Expression in beiden Kontrollgruppen zu erkennen.

## 4.7 ID-1



**Abbildung 15: Expression des Gens ID-1 in den jeweiligen Versuchsgruppen an Tag 3, 7, 14 post-OP.** Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) im Expressionsvergleich zwischen folgenden Gruppen: PK- 3d vs. 7d, 3d vs. 14d; 7d- PK vs. NK.

ID-1, als Regulator in der BMP-induzierten Osteoblasten-Differenzierung, zeigte in der rigiden Gruppe an Tag 7 eine geringgradige Hochregulierung der Genexpression. Von Tag 7 auf Tag 14 behielt die rigide Gruppe ihr Expressionsniveau bei.

Die semi-rigide Gruppe begann an Tag 3 auf dem höchsten Niveau mit ihrer Expression im Vergleich zur rigiden und flexiblen Gruppe (ohne Signifikanz). Im Zeitverlauf wies die semi-rigide Gruppe jedoch keine deutliche Expressionsänderung auf. Die Gruppe zeigte besonders an Tag 3 und Tag 7 eine erhöhte Streuung.

Die flexible Gruppe veränderte bis Tag 7 ihre Expression unwesentlich. An Tag 14 fand eine starke Hochregulierung statt und es war die stärkste Expression im Gruppenvergleich erkennbar (ohne Signifikanz).

In den Kontrollgruppen gab es einen signifikanten Anstieg in der Positivkontrolle ( $p = 0,043$  von Tag 3 auf Tag 7 und von Tag 3 auf Tag 14), während der Zeitverlauf der

Negativkontrolle von einem verhältnismäßig gleichbleibenden Expressionsniveau geprägt war. Zu Beginn wurde ID-1 an Tag 3 in der Negativkontrolle und Positivkontrolle auf einem ähnlichen Niveau exprimiert, wohingegen an Tag 7 die PK eine signifikant höhere Expression aufwies (Tag 7  $p=0,029$ ).

Zusammenfassend wies die rigide Gruppe gegenüber der NK einen Anstieg der Expression von ID-1 erst ab Tag 7 auf. Der Einfluss variierender Fixationssteifigkeit bei gleicher BMP-2-Menge zeigte für die rigide Gruppe einen Expressionsanstieg an Tag 7, für die semi-rigide Gruppe an Tag 3 und für die flexible Gruppe an Tag 14. Des Weiteren ließ der Expressionsverlauf der Kontrollgruppen eine Regulation der ID-1-Expression in Abhängigkeit der Osteotomiegröße vermuten (1 mm versus 5 mm), da die Positivkontrolle eine signifikante Hochregulierung zeigte und die Negativkontrolle dagegen weitestgehend unverändert in ihrer ID-1-Expression blieb.



## 4.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Expression der BMP-Rezeptoren BMPR II, BMPR IA und BMPR IB war in der flexiblen Gruppe im Zeitverlauf am stärksten hochreguliert. Zwar erfolgte auch in der rigiden Gruppe ein Anstieg in der Genexpression der Rezeptoren im Zeitverlauf, jedoch nur für BMPR II und BMPR IA. Die Werte blieben weiterhin unter dem Expressionsniveau der flexiblen Gruppe. Die semi-rigide Gruppe dagegen exprimierte an Tag 3 stets auf einem höheren Expressionsniveau als die rigide und flexible Gruppe. Im Zeitverlauf der semi-rigiden Gruppe war dann aber keine weitere signifikante Zunahme der Expression ersichtlich. Im Vergleich der Negativkontrolle mit der BMP-2-behandelten rigiden Gruppe ließ sich keine eindeutige Stimulation der Rezeptorgene durch BMP-2 feststellen. Für BMPR IA zeigten beide Gruppen ein ähnliches Expressionsmuster. Bei BMPR IB lag das Expressionsniveau in der BMP-2-behandelten rigiden Gruppe sogar unter dem der Negativkontrolle. Auffällig war eine höhere Expression in der NK an Tag 3 für alle drei Rezeptoren im Vergleich zur rigiden Gruppe. Der Vergleich der Positivkontrolle mit der Negativkontrolle zeigte, dass besonders die Rezeptoren BMPR II und BMPR IA in der Positivkontrolle eine signifikante Hochregulierung erfuhren. In der Negativkontrolle war lediglich bei BMPR IA eine Hochregulierung der Expression im Zeitverlauf erkennbar. Interessanterweise wurde BMPR IB an Tag 3 in der Negativkontrolle signifikant stärker exprimiert als in der Positivkontrolle.

Die Expression des Osteosynthesemarkers Kollagen Typ I wurde in allen drei Steifigkeitsgruppen über den Untersuchungszeitraum hochreguliert. Während an Tag 3 die semi-rigide gefolgt von der rigiden Gruppe bereits signifikant stärker Kollagen Typ I exprimierten als die flexible Gruppe, erfuhr das Gen in der flexiblen Gruppe erst ab Tag 7 eine Hochregulierung. An Tag 3 zeigte die flexible Gruppe das niedrigste Expressionsniveau und lag an Tag 7 auf einem ähnlichen Expressionsniveau wie die rigide und semi-rigide Gruppe. Eine BMP-2-induzierte Expression des Kollagens I an Tag 14 bei rigider Fixation zeigte sich durch den Vergleich der NK mit der BMP-2-behandelten rigiden Gruppe. Zudem war eine signifikant geringere Expression in der Negativkontrolle im Vergleich zur Positivkontrolle erkennbar.

Noggin, ein regulatorischer BMP-2-Antagonist, zeigte im Zeitverlauf einen steten Anstieg in der Genexpression in der rigiden und flexiblen Gruppe. Die semi-rigide Gruppe wies an Tag 3 das höchste Expressionsniveau auf. Während es bei der rigiden und flexiblen Gruppe an Tag 7 und 14 zu einem Anstieg der Expression kam, blieb in der semi-rigiden Gruppe die Noggin-Expression über den Zeitverlauf konstant. Ab Tag 7 wurde eine Stimulation der Expression von Noggin durch BMP-2 in der rigiden Gruppe erkennbar. Auch die

Positivkontrolle zeigte einen Anstieg im Zeitverlauf und eine signifikant höhere Expression im Vergleich zur Negativkontrolle.

Der Mechanosensor c-Fos erfuhr an Tag 14 in der flexiblen Gruppe, mit der geringsten Stabilisierung des Defektes, die stärkste Stimulierung der Genexpression. Die rigide Gruppe zeigte verglichen mit der semi-rigiden Gruppe ein ähnliches Expressionsmuster für c-Fos. Auffällig war, dass die Negativkontrolle an Tag 3, verglichen zur Positivkontrolle aber auch zur rigiden Gruppe, signifikant höhere Expressionswerte für Noggin aufwies. Im Verlauf näherten sich die Expressionswerte der Negativkontrolle den Werten der Vergleichsgruppen an.

ID-1 als Regulator der BMP-induzierten Osteoblastendifferenzierung zeigte in der rigiden und flexiblen Gruppe eine Hochregulierung der Expression. ID-1 war in der semi-rigiden Gruppe bereits an Tag 3 im Gruppenvergleich höher exprimiert und blieb über den Zeitverlauf gleich. Während die semi-rigide Gruppe bereits eine frühzeitige Hochregulierung zeigte, wies die flexible Gruppe einen verzögerten Anstieg der ID-1-Expression an Tag 14 auf. Eine erhöhte Expression unter BMP-2-Anwesenheit wurde ab Tag 7 in der rigiden Gruppe im Vergleich zur NK sichtbar. In der Positivkontrolle zeigte sich ab Tag 7 eine signifikant höhere Expression im Vergleich zur Negativkontrolle, während die NK durch ein gleichbleibendes Expressionsniveau gekennzeichnet war.

## 5. Diskussion

Dass BMP-2 entscheidend für die Knochenheilung ist, steht außer Frage (Bostrom und Camacho 1998), aber es werden zurzeit noch supraphysiologische Dosierungen eingesetzt, um eine erfolgreiche Knochenbildung zu induzieren (Haidar et al. 2009). Darüber hinaus kann das mechanische Umfeld einer Fraktur den Knochenheilungsprozess und sogar die endogene BMP-2-Expression beeinflussen (Claes et al. 2011, Rui et al. 2011). Jedoch wurden bisher nur wenige Studien über ein Zusammenspiel zwischen biologischen und mechanischen Stimuli veröffentlicht (Kopf et al. 2012, Glatt et al. 2016b).

Aufgrund dessen untersuchte die vorliegende Arbeit, welchen Effekt unterschiedliche Fixateur externe-Steifigkeiten in Kombination mit BMP-2 auf die Genexpression während der Knochenheilung in einem Knochendefektmodell der Ratte haben. Im linken Femur der Ratte wurde ein 5 mm Osteotomiespalt erzeugt. Dieser Defekt wurde mit einem mit 5 µg rhBMP-2 beladenen Kollagenvlies gefüllt und mit externen Fixateuren unterschiedlicher Steifigkeiten stabilisiert. Die Steifigkeit wurde unterteilt in rigide, semi-rigide und flexibel. Diese Steifigkeitsgruppen wurden von einer Positivkontrolle und einer Negativkontrolle begleitet. Die Positivkontrolle mit einem 1 mm Osteotomiespalt stellte den Zustand einer physiologischen Knochenheilung dar. Die Negativkontrolle mit einem mit NaCl behandelten 5 mm Leerdefekt zeigte einen Knochendefekt, der in einer atrophischen Pseudarthrose münden würde. Nach 3, 7 und 14 Tagen wurden die Tiere euthanasiert, das Kallusgewebe entnommen und das Expressionsmuster ausgewählter Gene, die an der Knochenheilung beteiligt sind, analysiert.

### 5.1 Material und Methoden

#### 5.1.1 Tiermodell

Nach dem Tierschutzgesetz sind Tiere mit möglichst niedrigen sensorischen Funktionen im experimentellen Tiermodell zu bevorzugen, wobei Handling, Haltung und Kosten die Auswahl der Tierart weiter einschränken. Die Ratte ist die am weitesten verbreitete Tierspezies, die im Forschungsgebiet der Knochenheilung eingesetzt wird (O'Loughlin et al. 2008). Es gibt jedoch einerseits zwischen dem Menschen und der Ratte große Unterschiede im Knochenaufbau und -stoffwechsel, was die direkte Projektion der gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen verhindert, andererseits unterscheiden sich die

Rattenrassen untereinander. Dabei weist beispielsweise die Femur-Anatomie der Wistar Ratte mehr Ähnlichkeiten zur humanen Anatomie auf als die der Sprague Dawley Ratte (Aerssens et al. 1998, Jager et al. 2005).

Studien am menschlichen Knochen würden den größten Aufschluss über den untersuchten Effekt in der Knochenheilung geben. Diese unterliegen jedoch starken Einschränkungen, da die Anzahl der Proben gering ist und die uneinheitlichen Parameter wie Alter, Geschlecht und vorhandene Erkrankungen die Vorgänge beeinflussen (Calori et al. 2011). Für diese Pilotstudie wurden daher weibliche Sprague Dawley Ratten ausgewählt, um einen allgemeinen Trend in der kombinierten Stimulation der Knochenheilung herauszufiltern. Mehta und Kollegen (2011) führten eine 1 mm- bzw. 5 mm-Osteotomie am linken Femur von 12 Wochen alten männlichen sowie weiblichen Sprague-Dawley Ratten durch und stabilisierten diese mit einem externen Fixator. Nach sechs und acht Wochen wurde die Knochenheilung mittels Röntgen, biomechanischer Testung und histologischer Untersuchung analysiert. Es stellte sich heraus, dass Männchen bessere Heilungseigenschaften aufwiesen als Weibchen (Mehta et al. 2011a). Zwar wurden deshalb bewusst weibliche Ratten für die Studie ausgewählt, um ein reproduzierbares, klinisch repräsentatives Tiermodell für atrophe Pseudarthrosen zu gewährleisten, aber dennoch hat auch das Geschlecht einen Einfluss auf den Verlauf der Knochenheilung und es gilt zu klären, ob die Männchen das gleiche Expressionsmuster aufweisen.

Die Genexpression wurde über einen Verlauf von 14 Tagen beobachtet, was die frühen Stadien der Knochenheilung erfasst. Einige Studien postulieren, dass die mechanischen Bedingungen vor allem während der Anfangsphase der Knochenheilung entscheidend für den Heilungsweg und den Heilungsausgang sind (Le et al. 2001, Klein et al. 2003, Bartnikowski et al. 2017). Bartnikowski und Kollegen (2017) beispielsweise stabilisierten an männlichen Wistar-Ratten eine 1 mm-Femur-Osteotomie mit einem unilateral rigiden und flexiblen Fixateur externe (Kontrollgruppen). Zusätzlich führten sie eine inverse Dynamisierung durch, indem sie den flexiblen Fixateur nachträglich zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 3, 7, 14 und 21 post-OP) versteiften. Fünf Wochen nach der Operation wurden die invers dynamisierten Gruppen mit den Kontrollgruppen verglichen. Die Femora wurden entnommen und einer biomechanischen Testung, einer mikrocomputertomografischen Analyse, einer histologischen und histomorphometrischen Untersuchung unterzogen. Es stellte sich heraus, dass bereits eine Versteifung einer ursprünglich flexiblen Fixation an Tag 3 post-OP die Heilung verbesserte (Bartnikowski et al. 2017), statt in einer verzögerten oder ausbleibenden Heilung zu resultieren.

Im Gegensatz dazu untersuchten Claes und Kollegen (2011) den Effekt der reversen Dynamisierung in einer 1 mm-Femur-Osteotomie männlicher Wistar-Ratten. Nach drei bzw. vier Wochen wurden die rigiden externen Fixateure durch Entnahme des inneren Fixationsbalkens destabilisiert. Nach fünf Wochen verglich man die dynamisierten Gruppen mit Kontrollgruppen konstanter Steifigkeit (rigide/flexibel) mittels biomechanischer Testung und Mikrocomputertomografie. Es konnte eine verbesserte Knochenheilung in beiden dynamisierten Gruppen (Woche 3 und 4) im Vergleich zu der konstant rigiden und konstant flexiblen Kontrollgruppe festgestellt werden (Claes et al. 2011). Daraus wird ersichtlich, dass das mechanische Umfeld sowohl zu frühen Zeitpunkten in der Knochenheilungskaskade als auch im späteren Heilungsverlauf ein entscheidender Faktor ist.

Die Möglichkeit, die Fixationssteifigkeit zu modulieren, ermöglicht es, die für jede einzelne Heilungsphase benötigte mechanische Umwelt individuell einzustellen, wobei über den Bedarf noch nicht viel bekannt ist. Trotzdem stellen Epari und Kollegen (2013) die These auf, dass die günstigste Art der Fixierung die inverse Dynamisierung ist. Die flexible Fixierung während der Anfangsstadien der Heilung stimuliert eine stärkere Kallusbildung, während die steife Fixierung in der späteren Phase Stress reduziert und somit die Kallusreifung und die Überbrückung des Knochenspaltes ermöglicht (Epari et al. 2013). Auch Bartnikowski und Kollegen (2017) untersuchten den Einfluss der inversen Dynamisierung auf die Kallussteifigkeit und –morphologie und konnten den angekündigten Vorteil eines großen robusten Kallus, der durch frühe flexible Fixation entstehen sollte, jedoch nicht nachweisen (Bartnikowski et al. 2017).

Es besteht großes klinisches Interesse daran, die Knochenheilung durch Veränderung des mechanischen Umfeldes über die Fixationsstabilität zu verbessern. Jedoch fehlte während des Heilungsverlaufs bislang die Kontrolle über das lokale mechanische Umfeld innerhalb großer Knochendefekte in tierexperimentellen Versuchen (Glatt und Matthys 2014). Der externe Fixateur „RatExFix“ von RISystem AG (Davos, Schweiz) ermöglicht eine reproduzierbare und standardisierte Stabilisierung und eine Justierung der mechanischen Bedingungen während des Heilungsprozesses durch Änderung der Fixateur-Steifigkeit *in vivo*. Dadurch ist er für präklinische Studien im Bereich der Knochenheilung und -regeneration geeignet. Allgemein bringt der externe Fixateur einige Nachteile mit sich, wie Irritation des umliegenden Weichteilgewebes, Infektionen oder Pinbrüche. Der externe Fixateur von RISystem wird mit Pins mit Gewinde eingesetzt, welche nachgezogen werden können, um den Folgen einer Pinlockerung und dem Verlust der vorgesehenen Steifigkeit vorzubeugen. Die verwendeten Materialien (Polyethylethylenketon und titanlegierte Aluminium-Pins) werden bereits für orthopädische Implantate beim Menschen benutzt und zeigten eine reduzierte Infektionsinzidenz (Glatt und Matthys 2014). Der Knochen-Balken-Abstand (Off-

Set) beträgt unabhängig von der Steifigkeit sechs Millimeter. Der Fixateur hat ein Gewicht von 0,32 g und der Haut-Balken-Abstand beträgt zwei Millimeter. Diese Faktoren sollen eine standardisierte, reproduzierbare Defekt-Stabilisierung ermöglichen und unkontrollierte Belastungen vermeiden (Glatt und Matthys 2014).

Das Projekt wurde limitiert durch einige Faktoren. Die Zahl der Tiere pro Gruppe war relativ klein, was gehäuft zu großen Streuungen führte und es zu keiner Normalverteilung innerhalb der Gruppen kam. Nichtsdestotrotz ist bei einer Expressionsanalyse eine Gruppengröße von vier Tieren pro Gruppe nicht unüblich. Unter anderem untersuchten Niikura und Kollegen (2006) sowie Degenkolbe und Kollegen (2015) verschiedene Expressionsmuster in unterschiedlichen Non-Union-Modellen am Femur der Ratte. Beide besetzten ihre Gruppen mit vier Tieren (Niikura et al. 2006, Degenkolbe et al. 2015). Außerdem sei bei Betrachtung des Materials des Fixateurs externe kritisch anzumerken, dass die Ratten in der Lage waren, den Balken anzunagen. Dieses Risiko konnte durch Halskragen und Metallklammern, welche man auf den Balken setzte, die aber die Steifigkeit nicht beeinflussten, verringert werden (Glatt und Matthys 2014).

## 5.2 Expressionsergebnisse

Die BMP-Rezeptoren BMPR II, BMPR IA und BMPR IB wurden im Vergleich der Fixateursteifigkeit am stärksten in der flexiblen Gruppe hochreguliert. In der rigiden Gruppe kam es im Zeitverlauf für BMPR II und BMPR IA ebenfalls zu einem Expressionsanstieg. Die semi-rigide Gruppe exprimierte an Tag 3 bei allen drei Rezeptoren auf einem höheren Expressionsniveau als die rigide und flexible Gruppe. Im weiteren Verlauf kam es dann aber zu keinem weiteren Anstieg der Expression. Es besteht eine Interaktion zwischen Integrinen und BMP-Signalwegen (Lai und Cheng 2005, Kopf et al. 2012). Integrine sind Mechanorezeptoren, die mechanische Signale aufnehmen. Kopf und Kollegen (2012) vermuten, dass die Integrinaktivierung durch mechanische Belastung zu Konformationsänderungen der BMP-Rezeptoren führen könnte, was deren Signaleigenschaften ändern würde (Kopf et al. 2012). Des Weiteren ist die Integrin-Endozytose abhängig von der Steifigkeit der extrazellulären Matrix (Du et al. 2011, Kopf et al. 2012). Du und Kollegen haben ermittelt, dass in weichen Geweben der BMP-Smad-Signalweg durch Integrin-regulierte BMP-Rezeptor-Endozytose unterdrückt wurde (Du et al. 2011). Unsere Ergebnisse deuten eher auf einen Expressionsanstieg der BMP-Rezeptoren besonders in der flexiblen Gruppe hin. Dies könnte vielleicht auf einen Feedback-Mechanismus oder die Stimulation der BMPR-Expression durch das extern zugeführte BMP-

2 zurückzuführen sein. Die Positivkontrolle unserer Studie, als Beispiel einer physiologischen Heilung, unterschied sich in ihrer Rezeptorexpression deutlich von der Negativkontrolle, die eine gestörte Heilung darstellt. Die Expression von BMPR II (an Tag 14) und BMPR IA (an Tag 7) war in der Positivkontrolle signifikant höher als in der Negativkontrolle. Dagegen wurde BMPR IB an Tag 3 signifikant höher von der Negativkontrolle exprimiert. Fajardo und Kollegen (2009) untersuchten 15 Patienten mit hypertrophen Non-Unions in unterschiedlichen Knochen der Extremitäten sowie der Clavicula. Zum Zeitpunkt der Operation zur Korrektur der Non-Union wurde den Patienten sowohl fibröses Gewebe aus dem nicht-heilenden Frakturspalt als auch Gewebe aus dem umliegenden knöchernen Kallus entnommen. Anschließend erfolgte die Analyse der Genexpression von ausgewählten BMPs, den BMP-Rezeptoren Typ IA, IB und II und vier Antagonisten, darunter Noggin. Die BMP-Rezeptoren wurden vermehrt im fibrösem Gewebe exprimiert, was jedoch nicht signifikant war (Fajardo et al. 2009). Diese Beobachtung konnte zumindest für BMPR IB auch in unserer Negativkontrolle gemacht werden. Wohingegen BMPR IA (an Tag 7) und BMPR II (an Tag 14) in der Positivkontrolle deutlich höher exprimiert wurde. Mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse könnten der abweichende Entnahmezeitpunkt sein, aber auch der Umstand, dass es sich bei Fajardo um humanes Gewebe handelte und dieser Versuch auf Basis eines Rattenmodells erfolgte. Außerdem untersuchten Fajardo und Kollegen hypertrophe Non-Unions, wobei es sich bei dem Pseudarthrose-Modell der Ratte um ein atrophes Modell mit einer sich von der humanen Studie differierenden externen Fixation handelte.

Noggin, ein BMP-2-Regulator, zeigte einen steten Expressionsanstieg in der rigiden und flexiblen Gruppe, während die semi-rigide Gruppe zwar an Tag 3 das tendenziell höchste Expressionsniveau aufwies, aber eine zusätzliche Hochregulierung der Noggin-Expression im weiteren Verlauf ausblieb, was vermuten lässt, dass Noggin in dieser Gruppe ausreichend exprimiert wurde, um regulatorisch wirken zu können. Ab Tag 14 wurde der stimulierende Effekt von BMP-2 im Vergleich der rigiden Gruppe zur Negativkontrolle erkennbar. Auch im Vergleich zur Positivkontrolle zeigte die Negativkontrolle in unserer Studie als Beispiel einer ausbleibenden Heilung bzw. gestörten Heilung an Tag 14 eine deutlich geringere Noggin-Expression. Des Weiteren unterschieden sich die beiden Kontrollgruppen im Zeitverlauf voneinander. Während es in der Positivkontrolle zu einem tendenziellen Expressionsanstieg kam, blieb die Expression in der Negativkontrolle unverändert. Es könnte angenommen werden, dass die Heilung in der Positivkontrolle bereits so weit fortgeschritten war, dass Noggin die Wirkung des endogenen BMP-2 antagonisierte, um eine überschießende Kallusbildung zu verhindern bzw. ein physiologisches Remodelling zu ermöglichen. Eine antagonistische Regulation durch Noggin erscheint dagegen für die Defektheilung in der

Negativkontrolle nicht sinnvoll. In einer *in vitro* Studie stimulierten Kopf und Kollegen (2012) humane, fetale Osteoblasten (hFOBs) mit BMP-2, mechanischer Belastung oder einer Kombination aus beidem und erhielten ähnliche Expressionsmuster wie die unserer drei Gruppen mit unterschiedlichen Steifigkeiten. U.a. wurde die Noggin-Expression durch BMP-2 stimuliert, jedoch signifikant stärker in Kombination mit mechanischer Stimulierung, was ein direktes Zusammenspiel von Mechanotransduktion und BMP-Signalgebung vermuten lässt (Kopf et al. 2012) und die erhöhte Expression in unserer flexiblen Gruppe erklären würde. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die BMP-2-Expression durch BMP-2-Gabe stimuliert werden konnte, eine zusätzliche mechanische Stimulierung jedoch wieder zu einem Abfall der Expression führte (Kopf et al. 2012), was im direkten Zusammenhang mit dem Expressionsanstieg von Noggin bei mechanischer Belastung stehen könnte. In der *in vivo* Studie von Fajardo und Kollegen (2009) wurden neben den BMP-Rezeptoren auch der BMP-Antagonist Noggin analysiert. Im Vergleich des fibrösen Non-Union-Gewebes mit dem umliegenden knöchernen Kallusgewebe zeigte sich, dass Noggin im fibrösen Gewebe ein signifikant erhöhtes Expressionslevel vorwies als im Kallusgewebe (Fajardo et al. 2009). Im Vergleich dazu exprimierte unsere Negativkontrolle, die eine Non-Union darstellen soll, an Tag 14 signifikant weniger Noggin als die Positivkontrolle. Auch für Noggin könnte der Expressionsunterschied im Vergleich zu unserer Studie darin liegen, dass Fajardo menschliche hypertrophe Non-Unions untersuchte und unsere Analysen am atrophen Non-Union-Tiermodell stattfanden. Niikura und Kollegen (2006) dagegen untersuchten am rechten Femur der 12 Wochen alten Long-Evans Ratte in einem atrophen Pseudarthrosemodell die Genexpression diverser BMPs und Antagonisten, darunter BMP-2 und Noggin. Dabei stellten sie fest, dass die Noggin-Expression an Tag 7 und Tag 10 in Non-Unions signifikant niedriger im Vergleich zur physiologischen Heilung war, was mit unseren Ergebnissen an Tag 14 gleichkommen würde. Auch konnte Niikura zeigen, dass die Genexpression von BMP-2 in Non-Unions niedriger ausfällt als in normal heilenden Frakturen, was wiederum die geringere Noggin-Expression erklären könnte. Durch die geringere BMP-2-Expression in Non-Unions nehmen Niikura und Kollegen an, dass eine BMP-2 Applikation eine passende Behandlungsstrategie für Frakturen mit gestörter Heilung ist (Niikura et al. 2006). Das optimale Verhältnis von BMPs und ihren Antagonisten scheint ein kritischer Faktor in der normalen Knochenheilung zu sein (Niikura et al. 2006). Es wurde beobachtet, dass exogene BMP-Applikation im Zielgewebe eine negative Feedback-Regulation aktiviert (Niikura et al. 2006, Song et al. 2010, Krause et al. 2011, Schmidt-Bleek et al. 2016). Dabei kommt es erst verzögert (ab Tag 14 in unserer Studie- Vergleich rigide Gruppe mit der NK- sowie ab Tag 7 in der von Niikura und Kollegen) zu einem Anstieg von BMP-Antagonisten, um vermutlich die normale Knochenheilung nicht zu behindern aber die BMP-Aktivitäten zu begrenzen (Niikura et al. 2006), was die Tendenzen dieser Studie



untermauert. Die negative Feedback-Regulation durch Noggin steht unter Verdacht, ein Grund für die hohen BMP-Dosierungen in der klinischen Anwendung zu sein und stellt somit einen weiteren Ansatzpunkt für die Optimierung der BMP-Therapie dar. So gibt es zum Beispiel Ansätze, Noggin-unempfindliche BMPs, wie BMP-6 oder BMP-9, einzusetzen oder BMP-2 zu Noggin-resistenten Wachstumsfaktoren zu modifizieren (Niikura et al. 2006, Song et al. 2010, Krause et al. 2011, Schmidt-Bleek et al. 2016).

Die Expression des Osteosynthesemarkers Kollagen Typ I lässt in allen drei Steifigkeitsgruppen, besonders aber in der rigiden Gruppe, eine Hochregulierung erkennen. Die signifikante Hochregulierung der Genexpression in der rigiden Gruppe könnte dadurch erklärt werden, dass auch der rigide Fixateur interfragmentäre Bewegungen zulässt. Während an Tag 3 die semi-rigide gefolgt von der rigiden Gruppe bereits signifikant stärker Kollagen Typ I exprimierten als die flexible Gruppe, erfuhr das Gen in der flexiblen Gruppe erst ab Tag 7 eine Hochregulierung. Die erhöhte interfragmentäre Bewegung in der flexiblen Gruppe scheint trotz BMP-2-Anwesenheit initial eher nachteilig für die Kollagensynthese im Vergleich zu den eher steiferen Gruppen (semi-rigide und rigide) zu sein. Eine mögliche Ursache ist, dass die Zellen sich aufgrund der anhaltenden Bewegung und der daraus resultierenden permanenten Gewebszerreißung im Osteotomiespalt nicht in die Matrix einbetten und Gewebe produzieren können. Bei den steiferen Gruppen schienen optimalere Bedingungen zu herrschen, sodass bereits frühzeitig die Kollagen Typ I-Synthese stattfinden konnte, wohingegen in der flexiblen Gruppe die Kollagensynthese erst später hochreguliert wurde. Eine Stimulierung der Kollagen Typ I-Expression durch BMP-2 wurde an Tag 14 in der rigiden Gruppe im Vergleich zur Negativkontrolle sichtbar. Zudem war eine signifikant geringere Expression in der gestörten Heilung im Vergleich zur physiologischen Heilung erkennbar, was eine verringerte Knochenneubildung in der Negativkontrolle vermuten lässt. *In vitro* zeigte sich, dass zyklische Dehnung die BMP-2-induzierte Expression von ALP und Runx2 (Marker der Osteoblasten-Differenzierung und direkter Aktivierer von Kollagen Typ I) erhöhte (Zeng et al. 2015). In Osteoblastenkulturen wurde erkannt, dass zyklische Dehnungen bis zu 4 % die Zellproliferation und Kollagen Typ I-Expression erhöhten, jedoch weit darüber hinausgehende Belastungen diese Stimulation wieder absenkten (Kaspar et al. 2002, Claes 2017). Mehta und Kollegen (2012) zeigten durch Vergleich (Mikrocomputertomografie und Finite-Element-Analyse) der Kalluseigenschaften einer 1 mm-Femurosteotomie mit einem kritischen 5 mm-Defekt der Ratte, einen starken Einfluss der mechanischen Stimulation, bedingt durch die Defektgröße, auf die Kallusbildung (Mehta et al. 2012). Demnach würde unsere Negativkontrolle mit einem 5 mm- Osteotomiespalt eine geringere Steifigkeit aufweisen als die Positivkontrolle (Mehta et al. 2012). Möglicherweise fiel deshalb die Kollagen Typ I-Produktion in der Negativkontrolle geringer aus. Die

Erkenntnis des mechanischen Einflusses auf die Kollagen Typ I-Expression und der Umstand, dass die rigide Gruppe an Tag 14 im Gegensatz zur Negativkontrolle eine knöcherne Überbrückung des Knochenspaltes (Schwarz et al. 2018, Glatt und Matthys 2014) und höhere Kollagen-Expressionslevel erreichte, deuten darauf hin, dass BMP-2 den negativen Effekt der mechanischen Belastung durch die Defektgröße (5 mm im Vergleich zur PK 1 mm) kompensiert haben könnte. Der mechanische Einfluss auf die Kollagenexpression wäre eine Erklärung dafür, dass die Kollagenproduktion und damit verbundene Osteosynthese in der rigiden und semi-rigiden bereits ab Tag 3 und in der flexiblen Gruppe erst später (ab Tag 7) begonnen hat.

Die verstärkte Stimulierung von c-Fos in der flexiblen Gruppe an Tag 14 gegenüber den steiferen Gruppen lässt eine Regulation der c-Fos-Expression durch das mechanische Umfeld der Osteotomie vermuten, wohingegen die rigide und semi-rigide Gruppe eine niedrigere Expression zeigten. Des Weiteren ließ die Negativkontrolle an Tag 3 eine signifikant höhere Expression als die rigide BMP-2-Vergleichsgruppe und auch als die Positivkontrolle erkennen. Kopf und Kollegen (2012) ermittelten in humanen fetalen Osteoblasten, dass c-Fos durch mechanische Belastung sowie durch die Kombination aus mechanischer Belastung und BMP-2 hochreguliert wurde, während BMP-2 allein keinen prägenden Effekt auf die Expression ausübte (Kopf et al. 2012). Obwohl es sich bei Kopf und Kollegen um eine *in vitro* Studie und bei uns um eine *in vivo* Studie handelte und sich daraus Abweichungen ergeben, stimmen die Kernaussagen überein. Zum einen hatte die Mechanik mit BMP-2 (Vergleich rigide BMP-2 Gruppe versus flexible BMP-2 Gruppe) und ohne Kombination mit BMP-2 (Vergleich Positivkontrolle versus Negativkontrolle) einen stimulierenden Effekt und zum anderen hatte die BMP-2-Gabe alleine (Vergleich rigide BMP-2 Gruppe versus Negativkontrolle) keinen stimulierenden Effekt auf die c-Fos-Expression.

ID-1 als Regulator der BMP-induzierten Osteoblastendifferenzierung wurde bereits in der rigiden Gruppe an Tag 7 und 14 höher als die Negativkontrolle exprimiert. Erfolgte zudem eine stärkere mechanische Belastung am Beispiel mit dem flexiblen Fixateur, kam es zu einem erhöhten Anstieg der ID-1 Expression an Tag 14. Die semi-rigide Gruppe zeigte allerdings bereits an Tag 3 eine höhere Expression gegenüber der rigiden und flexiblen Gruppe. Kopf und Kollegen (2012) konnten in oben genannter Studie mit humanen fetalen Osteoblasten für das Zielgen ID-1 (Inhibitor of differentiation) feststellen, dass mit BMP-2 allein eine leichte und in Kombination mit mechanischer Belastung eine signifikante Stimulierung der Expression erfolgte (Kopf et al. 2012). Es könnte die Annahme folgen, dass zunächst die reine exogene BMP-2-Gabe die ID-1-Expression und somit die Osteoblastendifferenzierung und folglich Kollagen- respektive Knochensynthese stimulierte, wie im Vergleich der Negativkontrolle mit der rigiden Gruppe ersichtlich. Eine erhöhte

mechanische Belastung rief jedoch den Bedarf nach mehr stabilisierendem Kallusgewebe hervor, was zu einem weiteren Expressionsanstieg führte. Der verzögerte Expressionsanstieg in der flexiblen Gruppe an Tag 14 könnte durch die zunächst ungünstigen mechanischen Bedingungen begründet sein, sodass vor der Einbettung der Osteoblasten in die extrazelluläre Matrix erst ausreichend stabilisierendes weiches Kallusgewebe gebildet werden musste, wohingegen die steiferen Gruppen an Tag 14 keine weitere Hochregulierung der ID-1-Expression benötigten.

Es stellt sich die Frage, ob unter Berücksichtigung der verschiedenen Heilungsstadien in der sekundären Knochenheilung eine verzögerte, mehrfache oder verlängerte Ausschüttung von BMP-2 effektiver ist als die derzeitige einmalige schnelle Freisetzung von BMP-2 über den Kollagenschwamm (Schmidt-Bleek et al. 2016). Denn es steht fest, dass die BMP-2-Signalkaskade zwar in der ersten Phase der Knochenheilung beginnt, BMP-2 aber auch ein wichtiger Trigger während der späteren Phasen der Chondro- und Osteogenese ist (Cho et al. 2002, Lienau et al. 2010). Der derzeit klinisch angewandte BMP-2-Träger ist ein resorbierbarer Kollagenschwamm. Die auf schnelle Proteindegradation und Diffusion beruhenden hohen BMP-2-Dosierungen, die für die Wirksamkeit benötigt werden, werden mit Komplikationen, wie Entzündungen und ektoper Knochenbildung und erhöhter Krebsinzidenz verbunden und verursachen hohe Kosten (Bessa et al. 2008, Boerckel et al. 2011a, Schmidt-Bleek et al. 2016). Das angewandte Kollagen wird aus tierischem Gewebe gewonnen, was das Risiko der Transfektion von infektiösen Material und Immunreaktionen in den Raum stellte. Weiterhin konnte bereits Antikörperbildung gegen gewisse Kollagen-Trägermaterialien festgestellt werden. (Bessa et al. 2008, Schmidt-Bleek et al. 2016). Boerckel und Kollegen (2011) waren auf der Suche nach einem besseren Trägermaterial, welches die Proteine gleichmäßig über einen ausreichenden Zeitraum freisetzt, wodurch eine niedrigere Dosis eingesetzt werden kann. Ein Nanofaser/Alginate-Geflecht wies nach 12 Wochen in einem 8 mm großen kritischen Knochendefekt im Femur einer Ratte mit 1 µg rhBMP-2 eine Überbrückungsrate von 100 % auf, während der Kollagenschwamm lediglich zu 60 % eine Überbrückung der Knochendefekte erreichte (Boerckel et al. 2011a). Eine Studie über eine fortlaufende BMP-2-Freigabe von einem Poly(D,L-Lactid-Säure) (PDLLA)-beschichteten Implantat (intramedullärer Nagel) konnte mit einer freigegebenen Menge von 1 µg BMP-2 (bis Tag 42) ähnlich positive Ergebnisse bei der Verbesserung der Knochenheilung erzielen wie eine vorangegangene Studie mit einer anfänglich starken BMP-2-Freigabe von etwa 40 µg (bis Tag 42) (Fassbender et al. 2014a, Schmidmaier et al. 2001). Der PDLLA-Anteil wurde erhöht, wodurch eine verlängerte BMP-2-Freigabe erzielt werden konnte (Fassbender et al. 2014a).

Es konnte bereits die Möglichkeit der rhBMP-2-Dosisreduktion zur Behandlung eines kritischen 5 mm Defekts gezeigt werden (Schmidt-Bleek et al. 2016). Ein mit rhBMP-2 beladener Kollagenschwamm wurde in einen 5 mm großen Knochendefekt eines Rattenfemurs eingesetzt. Dabei führte sowohl eine Dosierung von 50 µg für eine 300 g schwere Ratte- in Anlehnung an die klinische Dosierung von 12 mg rhBMP-2 für einen 75 kg schweren Patienten- als auch eine niedrigere Dosierung von 5 µg nach 7-14 Tagen zu einer kompletten Überbrückung des kritischen Knochendefektes (Wulsten et al. 2011, Schwarz et al. 2013, Schmidt-Bleek et al. 2016). Auch die verlängerte BMP-2-Expression, allerdings mit geringerer Konzentration über Virustransfektionsmodelle, scheint eine weitere Möglichkeit die Dosis zu reduzieren (Virk et al. 2008).

Weiterhin steht fest, dass eine kombinierte Zellstimulation aus BMP-2 und Mechanik synergistisch frühe Vorgänge in der BMP-Signalkaskade regulieren. Kopf und Kollegen (2012) vermuten, dass die mechanischen Signale die frühen BMP-Signale direkt beeinflussen, ohne die Beteiligung von autokriner Ligandensekretion (Kopf et al. 2012). Ein Verständnis über das Zusammenspiel von Mechanik und BMP-2 bedeutet neue klinische Behandlungsmöglichkeiten, wie beispielsweise die Reduktion der BMP-2-Dosierung in Abhängigkeit der Frakturstabilisierung. Somit könnten Nebenwirkungen minimiert werden, die auf die supraphysiologischen Konzentrationen zurückzuführen sind (Haidar et al. 2009). Denn BMP-2 steht im Verdacht u.a. Krebs auszulösen (Lad et al. 2013) sowie Infektionen, Osteolyse (Carragee et al. 2011) und heterotope Knochenbildung hervorzurufen (Axelrad et al. 2008). Schwarz und Kollegen (2013) bestätigten die Hypothese, dass mechanische Stimulation die Effizienz der BMP-2-Behandlung von Knochendefekten beeinflussen kann. Im Pseudarthrose-Rattenmodell wurde ein 5 mm-Defekt mit 50 µg BMP-2 behandelt und mit einem Fixateur externe stabilisiert. Die mechanische Stimulierung über einen Zeitraum von sechs Wochen einmal pro Woche führte zu einem signifikant höheren Volumen an mineralisiertem Gewebe sowie einer signifikant größeren Kallusbildung im Vergleich zur BMP-2-Gruppe ohne mechanische Stimulation (Schwarz et al. 2013). Dieser Effekt der kombinierten mechanischen und BMP-2-Stimulierung wurde dadurch erklärt, dass es durch die mechanische Stimulierung womöglich zu einer verstärkten Migration und Proliferation der mesenchymalen Stammzellen kam, deren Differenzierung im Anschluss durch BMP-2 induziert wurde. Nach zwei Wochen konnte in beiden BMP-2-Gruppen (mit/ohne mechanische Belastung) eine knöcherne Überbrückung des 5 mm-Defekts festgestellt werden. Jedoch blieb bis zur sechsten Woche das Kallusvolumen in der mechanisch stimulierten Gruppe signifikant größer als das der reinen BMP-2-Gruppe. Das führte zu der Annahme, dass mechanische Stimulierung die Knochenbildung nicht weiter fördert und den Remodelling-Prozess sogar behindert, sobald die knöcherne Überbrückung einmal erreicht

worden war (Schwarz et al. 2013). Auch Glatt und Kollegen vermuteten, dass eine frühe mechanische Stimulierung von BMP-2-behandelten, kritischen Knochendefekten des Rattenfemurs erhöhte Heilungsraten zur Folge hat, wenn die Fixateursteifigkeit geändert wird (Glatt et al. 2012b). Die Ergebnisse von Boerckel und Kollegen (2011) zeigten jedoch, dass eher eine späte mechanische Stimulation nach vier Wochen, im Vergleich zur frühen an Tag 0, in Kombination mit exogenem BMP-2 zu einer gesteigerten Knochenbildung im Femur-Defekt-Model der Ratte führt. Sie nahmen an, dass eine frühe Belastung die Invasion von Gefäßsprossen verhindert, was in reduzierter Knochenbildung mündet (Boerckel et al. 2011b).

Bereits 2012 stellten sich Glatt und Kollegen die Frage, welche Fixationssteifigkeit (RatExFix 100 %, 70 %, 40 %) den Knochenheilungsprozess am besten unterstützen kann. Auch sie erzeugten in einem Rattenmodell einen 5 mm-Knochendefekt, welcher mit 11 µg rhBMP-2 beladen und mit dem gleichen Fixateur externe-System wie in unserer Studie stabilisiert wurde. Dabei betrug die Steifigkeit der Fixateure 100 % (entspricht der 100 %-Steifigkeit aus unserer Studie), 70 % oder 40 %. Nach acht Wochen erzeugte der Fixateur mit einer Steifigkeit von 40 % die besten Heilungseffekte (Glatt et al. 2012b). Später erweiterten sie den Versuch um eine zusätzliche Steifigkeit (10 %) und reduzierten die rhBMP-2-Dosis auf 5,5 µg. Nach acht Wochen heilten alle Defekte bei den männlichen Sprague-Dawley-Ratten, aber mit unterschiedlichen kinetischen Merkmalen. Die knöcherne Überbrückung trat bei der flexiblen Fixation erst ab Woche drei bis vier ein und war damit verzögert, wohingegen die Defekte, die mit höheren Fixationssteifigkeiten stabilisiert wurden, bereits nach zwei bis drei Wochen eine Überbrückung röntgenologisch aufwiesen. In dieser Studie lieferte der Fixateur mit einer Steifigkeit von 70% die beste Heilung (Glatt et al. 2016b). Prominente Unterschiede zu unserer Studie liegen im Entnahmepunkt und dem Geschlecht der Ratte. Zum einen heilen bei männlichen Sprague-Dawley-Ratten Knochendefekte besser (Mehta et al. 2011a), zum anderen sind männliche Ratten in der Regel schwerer als die Weibchen. Das könnte zu einer veränderten Fixationsflexibilität geführt haben, wodurch sich die interfragmentären Bedingungen bei einer 40-prozentigen und 70-prozentigen Fixation angenähert haben könnten.

Diese Arbeit befasste sich mit dem Expressionsmuster bestimmter Gene in einem BMP-2-behandelten kritischen Defekt der Ratte mit rigider, semi-rigider und flexibler Fixation. Darüber hinaus wurde das Kallusgewebe histologisch, mittels Mikrocomputertomografie, biomechanischer Testung und einer MicroArray-Analyse untersucht. Histologisch zeigten die drei Steifigkeitsgruppen sieben Tage nach der Operation ähnliche Gewebzusammensetzungen mit Resten des Kollagenvlieses im Defekt. An Tag 14 war bei der rigiden und semi-rigiden Gruppe der 5 mm-Defekt mit Geflechtknochen ausgefüllt und

Areale mit enchondraler Ossifikation waren zu erkennen. Dagegen wies der Defekt der flexiblen Gruppe proliferierendes Gewebe und kleine Areale auf, in denen Knorpelgewebe verkalkte. Dies deutet bereits an Tag 14 auf eine verzögerte Knochenneubildung hin (Schwarz et al. 2018). Es besteht die Annahme, dass durch die flexible Fixation bestehende interfragmentäre Bewegung es fortlaufend zu Gefäßzerreißen kam. Dadurch konnten Zellen nicht einwandern, sich in die extrazelluläre Matrix einbetten und das für die Knochenheilung benötigte Gewebe produzieren, während dies eine steifere Fixierung (rigide, semi-rigide) in Kombination mit BMP-2 begünstigte. In der Mikrocomputertomografie war bereits an Tag 10 *post operationem* in allen Gruppen mineralisiertes Kallusgewebe erkennbar. Dabei zeigte die semi-rigide Gruppe tendenziell den größten Anteil an mineralisiertem Gewebe. An Tag 21 zeigten alle drei Gruppen einen knöchern überbrückten Defekt. An Tag 42 hatte in der rigiden und semi-rigiden Gruppe bereits das Remodelling eingesetzt. Dabei machte die semi-rigide Gruppe den Anschein in diesem Prozess schon weiter vorangeschritten zu sein - erkennbar durch ein signifikant geringeres Kallusvolumen im Vergleich zur flexiblen Gruppe. In der flexiblen Gruppe trat dagegen eine signifikante Knochenneubildung auf, was wiederum für eine verzögerte Knochenheilung spricht. Die biomechanische Testung des Kallusgewebe ergab trotz fehlender Signifikanz, dass das maximale Drehmoment bei dem rigiden Fixateur (310 +/- 44,5 Nmm) am höchsten war, gefolgt vom semi-rigiden (264,3 +/- 66,3 Nmm) und flexiblen Fixateur (239,1 +/- 96,0 Nmm), was für eine Beeinflussung der Knochenqualität durch die Fixationssteifigkeit, trotz einheitlicher BMP-2-Behandlung spricht. Außerdem zeigte der semi-rigide Fixateur, obwohl statistisch nicht signifikant, die höchste Torsionssteifigkeit (43,3 +/- 10,3 Nmm/°), gefolgt von der rigiden (40,0 +/- 15,8 Nmm/°) und flexiblen Fixation (38,0 +/- 27,8 Nmm/°), was einen unterschiedlichen Knochenheilungszustand annehmen lässt. Die MicroArray-Analyse deutet darauf hin, dass die Expression von Marker-Genen der Knochenheilungskaskade, Angiogenese, Chondrogenese, Osteogenese und der kontraktilen Fasern durch die Fixationssteifigkeit beeinflusst wird. So zeigten viele Gene der Chondro- und Osteogenese die niedrigsten Expressionslevel in der flexiblen Gruppe, was die histologischen und mikrocomputertomografischen Beobachtungen der verzögerten Knochenheilung bestätigte. Weiterhin wurden Gene bezogen auf die Entzündungsreaktion und das Immunsystem höher in der rigiden Gruppe exprimiert und stimulierten somit die enchondrale Ossifikation. Ferner wurden Gene bezogen auf das Remodelling der extrazellulären Matrix viel höher und Gene der kontraktilen Fasern viel niedriger in der rigiden Gruppe im Vergleich zur flexiblen Gruppe exprimiert. Das Expressionsmuster der semi-rigiden Gruppe deutet darauf hin, dass mit der semi-rigiden Fixation die Mineralisation des Kallusgewebes früher einsetzte und ein geringerer Bedarf an Matrix-Remodelling bestand als in den anderen Steifigkeitsgruppen. Mit Hilfe der SHG(Frequenzverdopplung)-Mikroskopie zeigte sich in der flexiblen Gruppe eine

Sanduhr-förmige Faseranordnung, die von großen Knorpelarealen umgeben war, während die semi-rigide Gruppe eine gitterähnliche Faseranordnung aufwies, was die Zellanordnung entsprechend der mechanischen Belastung und somit die Mineralisation vereinfacht haben könnte (Schwarz et al. 2018).

Werden die Ergebnisse aller Methoden der Studie zusammen betrachtet, hebt sich die flexible Gruppe deutlich von den übrigen Steifigkeitsgruppen ab. Der große Bewegungsspielraum der Osteotomieenden im Defekt führte zu einer Anregung der Genexpression in der flexiblen Gruppe. Jedoch konnte es ihr, vermutlich durch die ständigen Gewebszerreißen und die damit verlangsamte Revaskularisierung (Simon et al. 2011), nur verzögert gelingen, Knochengewebe zu produzieren und erklärt den noch an Tag 14 hohen Expressionsspiegel der untersuchten Gene. Mechanische Stimulation ist wichtig für die Zelldifferenzierung zu Fibroblasten, Osteoblasten und Chondrozyten, die für die Knochenregeneration essentiell sind (Claes et al. 2012). Dies kann aber nur geschehen, wenn die für die Versorgung des Frakturgebietes notwendige Revaskularisierung erfolgt. Der Vorgang der Revaskularisierung ist abhängig vom Gewebetrauma, der Stärke der interfragmentären Bewegung und der Größe des Frakturspalt (Claes 2017). In einem Osteotomiemodell beim Schaf führte eine interfragmentäre Bewegung zwischen 0,2 und 1 mm zu einer Stimulation der Kallusbildung und einer darauffolgenden schnellen Knochenheilung. Bewegungen über 2 mm riefen starke Kallusformationen minderer Gewebsqualität hervor, die mit verzögerter Heilung und hypertropher Pseudarthrose einhergingen (Kenwright und Goodship 1989, Schell et al. 2008, Claes 2017, Wilson et al. 2017). Moderat geringe mechanische Stimuli sollen die Knochenheilung begünstigen (Simon et al. 2011, Wilson et al. 2017). Der rigide Fixateur in unserer Studie, der ebenfalls gewisse interfragmentäre Bewegungen zulässt, zeigte bei allen Genen ein ähnliches Expressionsmuster wie die semi-rigide Gruppe. Nur an Tag 3 schien die semi-rigide Gruppe oftmals bereits höher zu exprimieren. Auch in der Histologie und Mikrocomputertomografie zeigte der Fixateur externe mit einer Steifigkeit von 40 % den Trend, die Heilung des Defektes zu begünstigen (Schwarz et al. 2018). Dadurch könnten fortführende Vergleichsstudien zu der rigiden und semi-rigiden Gruppe in Kombination mit BMP-2 vielversprechende Ergebnisse für die spätere klinische Anwendung ergeben, mit der Aussicht auf Dosisreduktion, frühzeitige Aktivierung der Knochenheilung und schnellere Wiedererlangung der Funktionsfähigkeit.

## 6. Zusammenfassung

### Zusammenspiel von biologischen und mechanischen Stimuli in der Knochendefektheilung - eine Expressionsanalyse ausgewählter Gene der Knochenheilung

Verzögerte Knochenheilung, aber besonders die ausbleibende Heilung, die in einer Pseudarthrose enden kann, bedeuten für den Patienten nicht nur große Schmerzen und Funktionsverlust der betroffenen Gliedmaße, sondern auch starke Einschränkung der Lebensqualität (Victoria et al. 2009, Garcia et al. 2013). Knochenheilung ist ein komplexer Vorgang, an dem viele Faktoren beteiligt sind. Neben einer guten vaskulären Versorgung entscheiden systemische Regulationsfaktoren, mechanische Einflüsse und deren Zusammenspiel über Erfolg oder Misserfolg der Heilung (Augat et al. 2005). Dabei heilen etwa 5-10 % der Frakturen nicht vollständig und gehen in eine verzögerte oder ausbleibende Heilung über (Kloen et al. 2002, Claes 2017). Es gibt viele Ansätze Pseudarthrosen bzw. Non-Unions zu behandeln. Nichtsdestotrotz sind alle Strategien bisher noch mit Nachteilen behaftet, darunter der bisherige Goldstandard, das Autotransplantat. Es ist verbunden mit geringem verfügbarem Knochenvolumen und erhöhter Spendermorbidity (Rihn et al. 2010, Boerckel et al. 2011a). Auch der viel versprechende Wachstumsfaktor BMP-2, der ähnliche Effekte auf die Knochenheilung wie das Autotransplantat erzielt (Jones et al. 2006, Axelrad und Einhorn 2009), ist durch seine hohen Dosierungen mit Nebenwirkungen wie Tumorbildung (Lad et al. 2013), Infektionen, Osteolyse (Carragee et al. 2011) und heterotoper Knochenbildung (Axelrad et al. 2008) verbunden. Dadurch besteht weiterhin die Notwendigkeit, neue Behandlungsstrategien zu entwickeln.

Diese Promotion untersucht das Zusammenspiel von mechanischer und biologischer Stimulation in einem etablierten Pseudarthrose-Rattenmodell (Mehta et al. 2011a) anhand der Expressionsanalyse ausgewählter Gene, die an der Knochenheilung beteiligt sind. Ein kritischer 5 mm Defekt wurde dazu mit 5 µg rhBMP-2 (beladen auf einem Kollagenvlies) behandelt und einem Fixateur externe unterschiedlicher Steifigkeit stabilisiert. Anhand der Fixateur–Steifigkeiten: 1) rigide (100 %), 2) semi-rigide (40 %) und 3) flexibel (10 %), wurden die Ratten in drei Versuchsgruppen eingeteilt und auf ihre Unterschiede in der Genexpression mittels quantitativer real-time PCR an Tag 3, 7, und 14 nach der Operation analysiert. Begleitet wurden diese Gruppen von einer Positivkontrolle (1 mm Osteotomie), die eine physiologische Heilung darstellen soll, und einer Negativkontrolle (unbehandelte 5 mm Osteotomie), die eine Knochendefektheilung widerspiegelt.



Zum einen wurden Expressionsunterschiede zwischen der physiologischen Heilung und der gestörten Heilung deutlich. Zum anderen konnte festgestellt werden, dass die Knochenheilungskaskade durch BMP-2 alleine und in Kombination mit der Steifigkeit des Fixators beeinflusst wird. In den Steifigkeitsgruppen zeigte sich vor allem für die flexible Gruppe eine erhöhte Expression an Tag 14 für alle untersuchten Gene. Wohingegen die Expressionswerte der semi-rigiden Gruppe darauf hindeuteten, dass sie bereits an Tag 3 alle Gene (außer c-Fos und Noggin) höher exprimierte als die rigide und flexible Gruppe. Der Einfluss von BMP-2 auf die Expression der ausgewählten Gene wurde durch den Vergleich der rigiden Gruppe mit der Negativkontrolle untersucht. Die BMP-2-Gabe bewirkte bei BMPR II, BMPR IB und c-Fos an Tag 3 (BMPR IB auch Tag 7) ein signifikant niedrigeres Expressionsniveau als in der Negativkontrolle, wohingegen die rigide Gruppe an Tag 14 Kollagen Typ I verglichen mit der NK höher exprimierte. Noggin und c-Fos wiesen an Tag 14 in der rigiden Gruppe und NK eine ähnliche Expression auf. Weiterhin zeigte die flexible Gruppe bei allen Genen eine starke Tendenz der Expressionshochregulierung. Die BMP-Rezeptoren BMPR II und BMPR 1A, Kollagen Typ I, Noggin und ID-1 wurden in der Positivkontrolle signifikant höher als in der Negativkontrolle exprimiert. C-Fos und BMPR 1B wurden dagegen an Tag 3 von der Negativkontrolle deutlich stärker hochreguliert. An Tag 14 erreichten die beiden Kontrollgruppen für c-Fos und BMPR 1B ein ähnliches Expressionsniveau.

Zwar wurden die Wirkung von BMP-2 und der Einfluss des vorherrschenden interfragmentären mechanischen Milieus in der Literatur schon analysiert, aber bisher gibt es noch keine Studie, die sich mit den Auswirkungen des Zusammenspiels von biologischen und mechanischen Stimuli in Form von BMP-2 und unterschiedlichen Fixationssteifigkeiten im Knochendefektmodell auf die Expression ausgewählter Gene auseinandergesetzt hat.

Diese Dissertation ist Teil einer umfangreichen Studie, welche mit nachfolgenden Methoden den Heilungsverlauf in den Steifigkeitsgruppen bzw. Kontrollgruppen untersucht hat:

- I) die hier vorgestellte Expressionsanalyse mittels quantitativer real-time PCR,
- II) MicroArray- Analyse,
- III) Histologie
- IV) Mikrocomputertomografie und
- V) biomechanische *in vitro*-Testung.

Im Gesamtbild der angewandten Methoden in der Studie (Schwarz et al. 2018) zeigte der semi-rigide Fixateur externe in Kombination mit BMP-2 tendenziell eine bessere Knochenheilung in einem 5 mm Defekt der Ratte im Vergleich zu einer rigiden und flexiblen

Fixation. Für die klinische Anwendung könnte dies eine vielversprechende Tendenz in Bezug auf eine schnellere Aktivierung der Heilungskaskade und damit verbundene kürzere Regenerationsphase, durch frühzeitige Hochregulation der an der Knochenheilung beteiligten Gene bedeuten. Weitere Untersuchungen hinsichtlich kombinierter Behandlung mit einem moderat mechanischen Stimulus und BMP-2, stellen die Möglichkeit in den Raum, die BMP-2 Dosierung, die damit verbundene Patientenmorbidity, die Behandlungskosten sowie -zeit zu minimieren.

## 7. Summary

### Interaction of biological and mechanical stimuli during bone defect healing – a gene expression analysis of selected genes playing part in bone healing.

Delayed unions and especially non-unions, which may lead to Pseudarthrosis, cause not only pain and loss of limb function, but also significantly limited quality of life (Victoria et al. 2009, Garcia et al. 2013). Bone healing is a complex process, in which many factors are involved: a sufficient vascular supply, systemic regulatory factors, the mechanical environment and interaction between these factors are crucial for a positive healing outcome (Augat, Simon et al. 2005). Between 5-10 % of fractures fail to heal properly and end in delayed union or a non-union (Kloen et al. 2002, Claes 2017). There are numerous approaches in the treatment of non-unions, but all strategies to date are associated with side-effects. For example, the Autograft (known as the Gold Standard for defect treatment) is associated with a small availability of bone mass and increased donor site morbidity (Rihn et al. 2010, Boerckel et al. 2011a). Even the promising growth factor BMP-2, which in relation to bone healing achieves similar effects to Autografts (Jones et al. 2006, Axelrad und Einhorn 2009) may, as a consequence of required high dosages also be accompanied by adverse effects, including cancer (Lad et al. 2013), infections, osteolysis (Carragee et al. 2011) and heterotopic bone formation (Axelrad et al. 2008). The need for further research into new treatment strategies therefore continues.

The specific aim of this work was to investigate the interplay of mechanical and biological stimulation in an established non-union rat model (Mehta et al. 2011a) on the basis of gene expression analysis. A 5 mm critical-sized defect was treated with 5 µg rhBMP-2 loaded on an absorbable collagen sponge and stabilised with three different external fixator stiffness. Rats were randomly divided into three groups: 1) rigid (100 %), 2) semi-rigid (40 %) and 3) flexible (10 %). An additional positive control group (1 mm osteotomy) was created evidencing physiological bone healing alongside a negative control (untreated 5 mm defect) group representing a case of a non-union. Analysis of the differences in the expression of several genes playing a part in bone healing was undertaken with quantitative real-time PCR.

There were significant differences in the expression of genes between the positive and the negative control group. It could also be seen that the bone healing cascade is influenced by BMP-2-administration as well as by the combination with differential fixation stiffness. Especially the flexible group showed at day 14 a increased expression of all genes. Whilst there was a noticeable trend that at day 3, the semi-rigid group already expressed all genes

(except c-Fos and Noggin) higher than the rigid and flexible group. The influence of BMP-2 on gene expression was analysed by the comparison of the rigid group and the negative control group. BMPR II, BMPR IB and c-Fos showed with BMP-2-treatment at day 3 (BMPR IB also at day 7) significant lower levels of expression than the negative control group, while Collagen Type 1 was higher expressed in the rigid group at day 14. The rigid group expressed Noggin and c-Fos similar to the negative control group at day 14. The flexible group showed the trend to a strong upregulation of all genes. The positive control group expressed BMPR II, BMPR IA, Collagen Type 1, Noggin, ID-1 significantly higher than the negative control group. At day 3 the negative control showed a higher expression of c-Fos and BMPR 1B than the positive control. Until day 14 both reached a similar level of expression for C-fos and BMPR IB.

Research to date has not dealt with the effect of the specific interaction of biological and mechanical stimuli in bone healing in the form of BMP-2 and differential fixation stiffness on gene expression, despite the existence of considerable research literature in relation to the influence of BMP-2 and the interfragmentary environment.

This work is part of an extensive study comprising following methods:

- I) quantitative real-time PCR analysis of the expression pattern of specific genes influencing the process of bone healing,
- II) MicroArray analysis
- III) histological examination
- IV) micro-computed tomography and
- V) biomechanical *in vitro* testing.

In consideration of all findings, the use of the semi-rigid fixateur externe in combination with BMP-2 tended to result in a better bone healing in a 5 mm critical-sized-defect in rats compared to the rigid and flexible fixation (Schwarz et al. 2018). These trends are promising indications for future clinical use. These are related to a faster activation of the bone healing cascade and therefore a shorter time required for regeneration due to earlier upregulation of involved genes specific to the process. Further research in relation to a combination of a moderate mechanical stimulation and BMP-2 could lead to reduction of BMP-2 dosages with implications both for reduced donor site morbidity alongside a concomitant reduction in both time and costs for the treatment of fractures.

## 8. Literatur

Aerssens, J., Boonen, S., Lowet, G., Dequeker, J. (1998). Interspecies differences in bone composition, density and quality: potential implications for in vivo bone research. Endocrinology **139**: 663-670.

Ai-Aql, Z.S., Alagl, A.S., Graves, D.T., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T.A. (2008). Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. J Dent Res **87** (2): 107-118.

Andrew, C. and Bassett, L. (1971). CHAPTER 1-Biophysical Principles Affecting Bone Structure\* A2-BOURNE, GEOFFREY H. Development and Growth (Second Edition), Academic Press: 1-76.

Augat, P., Margevicius, K., Simon, J., Wolf, S., Suger G., Claes, L. (1998). Local tissue properties in bone healing: influence of size and stability of the osteotomy gap. J Orthop Res **16** (4): 475-481.

Augat, P., Simon, U., Liedert A., Claes, L. (2005). Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. Osteoporos Int **16 Suppl 2**: S36-43.

Axelrad, T.W., Steen, B., Lowenberg, D.W., Creevy, W.R., Einhorn, T.A. (2008). Heterotopic ossification after the use of commercially available recombinant human bone morphogenetic proteins in four patients. J. Bone Joint Surg Br. **90** (12): 1617-1622.

Axelrad, T. W. and Einhorn, T. A. (2009). Bone morphogenetic proteins in orthopaedic surgery. Cytokine Growth Factor Rev **20** (5-6): 481-488.

Baron, R. (2000). Anatomy and Ultrastructure of Bone-Histogenesis, Growth and Remodeling. Endotext South Dartmouth(MA).

Bartnikowski, N., Claes, L.E., Koval, L., Glatt, V., Bindl, R., Steck, R., Ignatius, A., Schuetz, M.A., Epari, D.R. (2017). Modulation of fixation stiffness from flexible to stiff in a rat model of bone healing. Acta Orthop **88** (2):217-222.

Baumgärtner, W. (Hrsg.) (2015). Spezielle Pathologie für die Tiermedizin. Stuttgart, Enke.- ISBN: 978-3-8304-1172-7.

Baumgaertel, F., Perren, S.M., Rahn, B. (1994). Animal experiment studies of "biological" plate osteosynthesis of multi-fragment fractures of the femur. Unfallchirurg **97** (1): 19-27.

Bessa, P. C., Casal, M., Reis, R. L. (2008). Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). J Tissue Eng Regen Med **2** (2-3): 81-96.

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

Boerckel, J.D., Uhrig, B.A., Willett, N.J., Huebsch, N., Guldberg, R.E. (2011b). Mechanical regulation of vascular growth and tissue regeneration in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A **108**(37): 674-680.

Bolander, M.E. (1992). Regulation of fracture repair by growth factors. Proc Soc Exp Biol Med **200** (2): 165-170.

Bonath, K. H. and Prieur, W.D. (1998). Orthopädische Chirurgie und Traumatologie. Stuttgart, Ulmer. ISBN: 3-8252-8157-4.

Bonewald, L.F. (2011). The amazing osteocyte. J Bone Miner Res **26** (2):229-238.

Bostrom, M.P. and Camacho, N.P. (1998). Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing. Clin Orthop Relat Res **355 Suppl**: 274-282.

Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J., Nohe, A. (2011). Bone morphogenetic proteins: a critical review. Cell Signal **23** (4): 609-620.

Bragdon, B., Lybrand, K., Gerstenfeld, L. (2015). Overview of biological mechanisms and applications of three murine models of bone repair: closed fracture with intramedullary fixation, distraction osteogenesis, and marrow ablation by reaming. Curr Protoc Mouse Biol **5** (1): 21-34.

---

Brinker, W. O., Piermattei D. L.; Flo, G. L. (1993). Orthopädie und Frakturbehandlung beim Kleintier. Stuttgart [u.a.], Schattauer. ISBN: 3-7945-1043-7.

Buck, D. W., 2nd and G. A. Dumanian (2012a). Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. Plast Reconstr Surg **129** (6): 1314-1320.

Buck, D. W., 2nd and G. A. Dumanian (2012b). Bone biology and physiology: Part II. Clinical correlates. Plast Reconstr Surg **129** (6): 950e-956e.

Budras, K.-D.(Hrsg.) (2004), Atlas der Anatomie des Hundes. 7. Auflage. Hannover, Schlütersche. ISBN: 3-89993-012-6.

Calori, G. M., Phillips, M., Jeetle, S., Tagliabue, L., Giannoudis, P. V. (2008). Classification of non-union: need for a new scoring system? Injury **39 Suppl 2**: S59-63.

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

Carragee, E.J., Hurwitz, E.L., Weiner, B.K. (2011). A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned.Spine J. **11**: 471-491.

Chen, D., Zhao, M., Mundy, G. R. (2004). Bone morphogenetic proteins. Growth Factors **22** (4): 233-241.

Cho, T.J., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T.A. (2002). Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. J.Bone Miner. Res **17** (3):513-520.

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

Claes, L., Eckert-Hubner, K., Augat, P. (2002). The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. J Orthop Res **20** (5): 1099-1105.

- Claes, L., Eckert-Hubner, K., Augat, P. (2003). The fracture gap size influences the local vascularization and tissue differentiation in callus healing. Langenbecks Arch Surg **388** (5): 316-322.
- Claes, L., Blakytyn, R., Besse, J., Bausewein, C., Ignatius, A., Willie, B. (2011). Late dynamization by reduced fixation stiffness enhances fracture healing in a rat femoral osteotomy model. J Orthop Trauma **25** (3): 169-174.
- Claes, L., Recknagel, S., Ignatius, A. (2012). Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. Nat Rev Rheumatol **8**:133–143.
- Claes, L. (2017). Mechanobiology of fracture healing part 1:Principles. Unfallchirurg **120** (1): 14-22.
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. Clin J Am Soc Nephrol **3 Suppl 3**: S131-139.
- Cullinane, D. M., Salisbury, K. T., Alkhiary, Y., Eisenberg, S., Gerstenfeld, L., Einhorn, T. A. (2003). Effects of the local mechanical environment on vertebrate tissue differentiation during repair: does repair recapitulate development? J Exp Biol **206** (Pt 14): 2459-2471.
- Datta, H. K., Ng, W. F., Walker, J. A., Tuck, S. P., Varanasi, S.S. (2008). The cell biology of bone metabolism. J Clin Pathol **61** (5): 577-587.
- Deetjen, P. (Hrsg.) (1999). Physiologie. 3.Auflage München [u.a.], Urban & Fischer. ISBN: 3-437-41316-3.
- Degenkolbe, E., Schwarz, C., Ott, C. E., Konig, J., Schmidt-Bleek, K., Ellinghaus, A., Schmidt, T., Lienau, J., Ploger, F., Mundlos, S., Duda, G. N., Willie, B. M., Seemann, P. (2015). Improved bone defect healing by a superagonistic GDF5 variant derived from a patient with multiple synostoses syndrome. Bone **73**: 111-119.
- Denny, H. R.; Butterworth, S.J. (2000). A guide to canine and feline orthopaedic surgery. S. J. 4.ed. Oxford, Blackwell Science. ISBN: 0632051035.
- Dimitriou, R., Tsiridis, E., Giannoudis, P.V. (2005). Current concepts of molecular aspects of bone healing. Injury **36** (12): 1392-1404.



- Du, J., Chen, X., Liang, X., Zhang, G., Xu, J., He, L., Zhan, Q., Feng, X. Q., Chien, S., Yang, C. (2011). Integrin activation and internalization on soft ECM as a mechanism of induction of stem cell differentiation by ECM elasticity. Proc Natl Acad Sci U S A **108** (23):9466-9471.
- Engelhardt, W.v. (Hrsg.) (2005). Physiologie der Haustiere. 2.Auflage. Stuttgart, Enke. - ISBN: 3-8304-1039-5.
- Epari, D.R., Wehner, T., Ignatius, A., Schuetz, M.A., Claes, L.E. (2013). A case for optimising fracture healing through inverse dynamisation. Med Hypotheses **81** (2): 225-227.
- Fajardo, M., Liu, C. J., Egol, K. (2009). Levels of expression for BMP-7 and several BMP antagonists may play an integral role in a fracture nonunion: a pilot study. Clin Orthop Relat Res **467** (12): 3071-3078.
- Fassbender, M., Minkwitz, S., Strobel, C., Schmidmaier, G., Wildemann, B. (2014a). Stimulation of bone healing by sustained bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) delivery. Int J Mol Sci **15** (5): 8539-8552.
- Fassbender, M., Minkwitz, S., Thiele, M., Wildemann, B. (2014b). 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. Int Orthop **38** (9): 1963-1969.
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R., Sasso-Cerri, E., Simoes, M. J. Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. Biomed Res Int **2015**: 421746.
- Fossum, T. W. (2009). Chirurgie der Kleintiere. 2.Auflage. München [u.a.], Urban & Fischer Elsevier. ISBN: 3-437-57091-9.
- Franceschi, R. T. and Xiao, G. (2003). Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. J Cell Biochem **88** (3): 446-454.
- Frolke, J. P. and Patka, P. (2007). Definition and classification of fracture non-unions. Injury **38 Suppl 2**: S19-22.

Gangavalli, A.K., Nwachuku, C.O. (2016). Management of distal femur fractures in adults: An overview of options. Orthopaedic Clinics of North America **47** (1): 85-96.

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 (2013). Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review. Eur Cell Mater **26**: 1-12.

Gautschi, O. P., Frey, S. P., Zellweger, R. (2007). Bone morphogenetic proteins in clinical applications. ANZ J. Surg **77**: 626–631.

Gerstenfeld, L. C., Cho, T. J., Kon, T., Aizawa, T., Tsay, A., Fitch, J., Barnes, G. L., Graves, D. T., Einhorn, T. A. (2003a). Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. J Bone Miner Res **18** (9): 1584-1592.

Gerstenfeld, L. C., Cullinane, D. M., Barnes, G. L., Graves, D. T., Einhorn, T. A. (2003b). Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. J Cell Biochem **88** (5): 873-884.

Gieseler, G., Pepelanova, I., Stuckenberg, L., Villain, L., Nölle, V., Odenthal, U., Beutel, S., Rinas, U., Scheper, T. (2017). Purification of bone morphogenetic protein-2 from refolding mixtures using mixed-mode membrane chromatography. Applied Microbiology and Biotechnology **101** (1): 123-130.

Glatt, V., Evans, C. H., Matthys, R. (2012a). Design, characterisation and in vivo testing of a new, adjustable stiffness, external fixator for the rat femur. Eur Cell Mater **23**: 289-299.

Glatt, V., Miller, M., Ivkovic, A., Liu, F., Parry, N., Griffin, D., Vrahas, M. Evans, C. (2012b). Improved Healing of Large Segmental Defects in the Rat Femur by Reverse Dynamization in the Presence of Bone Morphogenetic Protein-2. The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume, **94** (22), 2063–2073.

Glatt, V. and Matthys, R. (2014). Adjustable stiffness, external fixator for the rat femur osteotomy and segmental bone defect models. J Vis Exp **92**: e51558.

Glatt, V., Evans, C. H., Tetsworth, K. (2016a). A Concert between Biology and Biomechanics: The Influence of the Mechanical Environment on Bone Healing. Front Physiol **7**:678.

Glatt, V., Bartnikowski, N., Quirk, N., Schuetz, M., Evans, C. (2016b). Reverse Dynamization: Influence of Fixator Stiffness on the Mode and Efficiency of Large-Bone-Defect Healing at Different Doses of rhBMP-2. The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume, **98** (8), 677–687.

Goodman, S. and Aspenberg, P. (1993). Effects of mechanical stimulation on the differentiation of hard tissues. Biomaterials **14** (8): 563-569.

Guo, J. and Wu, G. (2012). The signaling and function of heterodimeric bone morphogenetic proteins. Cytokine Growth Factor Rev. **23**: 61-67.

Grünbaum, E. G. (Hrsg) (2007). Klinik der Hundekrankheiten. 3. Auflage. Stuttgart, Enke. ISBN: 3-8304-1021-2.

Haffner-Luntzer, M., Liedert, A., Ignatius, A. (2015). Mechanobiology and bone metabolism: Clinical relevance for fracture treatment. Unfallchirurg **118** (12):1000-1006.

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

Harrison, K. D. and Cooper, D. M. (2015). Modalities for Visualization of Cortical Bone Remodeling: The Past, Present, and Future. Front Endocrinol (Lausanne) **6**:12.

Hoffman, B. D., Grashoff, C., Schwartz, M. A. (2011). Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. Nature **475**: 316–323.

Horst, K., Andruszkow, H., Weber, C., Dienstknecht, T., Hildebrand, F., Tarkin, I., Pape, H. C. (2015). Standards of external fixation in prolonged applications to allow safe conversion to definitive extremity surgery: the Aachen algorithm for acute ex fix conversion. Injury **46** **Suppl 3**: S13-18.

Houston, D.A., Staines, K.A., MacRae, V.E., Farquharson, C. (2016). Culture of Murine Embryonic Metatarsals: A Physiological Model of Endochondral Ossification. J Vis Exp (118).

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

Iniguez-Ariza, N. M. and Clarke, B. L. (2015). Bone biology, signaling pathways, and therapeutic targets for osteoporosis. Maturitas **82** (2): 245-255.

Iwakura, T., Miwa, M., Sakai, Y., Niikura, T., Lee, S. Y., Oe, K., Hasegawa, T., Kuroda, R., Fujioka, H., Doita, M., Kurosaka, M. (2009). Human hypertrophic nonunion tissue contains mesenchymal progenitor cells with multilineage capacity in vitro. J Orthop Res **27** (2): 208-215.

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

Jepsen, K. J. (2009). Systems analysis of bone. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med **1** (1): 73-88.

Jimi, E., Hirata, S., Shin, M., Yamazaki, M., Fukushima, H. (2010). Molecular mechanisms of BMP-induced bone formation: Cross-talk between BMP and NF- $\kappa$ B signaling pathways in osteoblastogenesis. Japanese Dental Science Review **46** (1): 33-42.

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. (2006). Recombinant human BMP-2 and 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** (7): 1431-1441.

Jorge, S.R.N., Cocco, L.F., Kawano, C., Fernandes, H.J.A., Reis, F.B.d. (2006). Uso da placa onda no tratamento das fraturas diafisárias do fêmur não consolidadas. Acta Ortopédica Brasileira **14**:17-21.

Kamkin, A. (2011). Mechanosensitivity and mechanotransduction. Springer Netherlands, Dordrecht **4** DOI: 10.1007/978-90-481-9881-8 ISBN: 978-90-481-9880-1 .

Kaspar, D., Seidl, W., Neidlinger-Wilke, C. et al (2002). Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain. J Biomech **35**:873–880.

- Kaderly, R. E. (1991). Primary bone healing. Semin Vet Med Surg (Small Anim) **6** (1): 21-25.
- Kenwright, J., Goodship, A.E. (1989). Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures. Clin Orthop **241** (241):36–47.
- Ketenjian, A. Y. and Arsenis, C. (1975). Morphological and biochemical studies during differentiation and calcification of fracture callus cartilage. Clin Orthop Relat Res (107): 266-273.
- Kiedrowski, M. R. and Horswill, A. R. (2011). New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. Ann N Y Acad Sci **1241**: 104-121.
- Kirchen, M. E., O'Connor, K. M., Gruber, H. E., Sweeney, J. R., Fras, I. A., Stover, S. J., Sarmiento, A., Marshall, G. J. (1995). Effects of microgravity on bone healing in a rat fibular osteotomy model. Clin Orthop Relat Res (318): 231-242.
- Klein, P., Schell, H., Streitparth, F., Heller, M., Kassi, J. P., Kandziora, F., Bragulla, H., Haas, N. P., Duda, G. N. (2003). The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions. J Orthop Res **21** (4): 662-669.
- Kloen, P., Doty, S. B., Gordon, E., Rubel, I. F., Goumans, M. J., Helfet, D. L. (2002). Expression and activation of the BMP-signaling components in human fracture nonunions. J Bone Joint Surg Am **84-A** (11):1909-1918.
- Knothe Tate, M.L. (2003). Whither flows the fluid in bone? An osteocyte's perspective. J Biomech **36** (10): 1409-1424.
- König, H.E. (Hrsg.) (2001). Anatomie der Haussäugetiere. 2. Auflage. Stuttgart [u.a.], Schattauer. ISBN: 3-7945-2153-6.
- Kopf, J., Peterson, A., Duda, G. N., Knaus, P. (2012). BMP2 and mechanical loading cooperatively regulate immediate early signalling events in the BMP pathway. BMC Biol **10**:37.
- Kopf, J., Paarmann, P., Hiepen, C., Horbelt, D., Knaus, P. (2014). BMP growth factor signaling in a biochemical context. Biofactors **40** (2):171-187.

Kon, T., Cho, T. J., Aizawa, T., Yamazaki, M., Nooh, N., Graves, D.L., Gerstenfeld C. and Einhorn, T. A. (2001). Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. J Bone Miner Res **16** (6): 1004-1014.

Kraus, K. H., Toombs, J. P., Ness, Malcolm G. (2003). External fixation in small animal practice. Oxford [u.a.], Blackwell Science. ISBN: 0632059893.

Krause, C., Guzman, A., Knaus, P. (2011). Noggin Int. J. Biochem. Cell Biol. **43**: 478-481.

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. (2013). Cancer after spinal fusion: the role of bone morphogenetic protein. Neurosurgery **73** (3): 440-449.

Lai, C. F. and Cheng, S. L. (2002). Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in normal human osteoblastic cells. J Biol Chem **277** (18):15514-15522.

Lai, C. F. and Cheng, S. L. (2005). Alphasbeta integrins play an essential role in BMP-2 induction of osteoblast differentiation. J Bone Miner Res **20** (2):330-340.

Le, A. X., Miclau, T., Hu, D., Helms, J. A. (2001). Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures. J Orthop Res **19** (1):78-84.

Lee, S. K. and Lorenzo, J. (2006). Cytokines regulating osteoclast formation and function. Curr Opin Rheumatol **18** (4): 411-418.

Liebich, H-G.(2004). Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. 4. Auflage. Stuttgart [u.a.], Schattauer. -ISBN: 3-7945-2311-3.

Lienau, J., Schmidt-Bleek, K., Peters, A., Weber, H., Bail, H.J., Duda, G., Perka, C., Schell, H. (2010). Insight into the molecular patho-physiology of delayed bone healing in a sheep model. Tissue Eng. Part A **16** (1): 191-199.

McMahon, J.A., Takada, S., Zimmerman, L.B., Fan, C.M., Harland, R.M., McMahon, A.P. (1998). Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. Genes Dev **12**:1438-1452.

- Marcus, e. b. R. (1994). Osteoporosis. Boston [u.a.], Blackwell Scientific Publ.
- Marsell, R. and Einhorn, T. A. (2009). The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. Injury **40 Suppl 3**: S4-7.
- Marsell, R. and Einhorn, T. A. (2011). The biology of fracture healing. Injury **42** (6): 551-555.
- Matuszewski, P. E. and Mehta, S. (2011). Fracture consolidation in a tibial nonunion after revascularization: a case report. J Orthop Trauma **25** (2): e15-20.
- McGavin, D. M. and Zachary, J. F. (2009). Pathologie der Haustiere. München, Urban & Fischer Elsevier.
- McKibbin, B. (1978). The biology of fracture healing in long bones. J Bone Joint Surg Br **60-B** (2): 150-162.
- Megas, P. (2005). Classification of non-union. Injury **36 Suppl 4**: S30-37.
- Mehta, M., Schell, H., Schwarz, C., Peters, A., Schmidt-Bleek, K., Ellinghaus, A., Bail, H. J., Duda, G. N., Lienau, J. (2011a). A 5-mm femoral defect in female but not in male rats leads to a reproducible atrophic non-union. Arch Orthop Trauma Surg **131**(1):121-129.
- Mehta, M., Checa, S., Lienau, J., Hutmacher, D., Duda, G. N. (2012). In vivo tracking of segmental bone defect healing reveals that callus patterning is related to early mechanical stimuli. Eur Cell Mater **24**: 358-371.
- Miller, S. C., de Saint-Georges, L., Bowman, B. M., Jee, W. S. (1989). Bone lining cells: structure and function. Scanning Microsc **3** (3): 953-960; discussion 960-951.
- Morawietz, H., Ma, Y. H., Vives, F., Wilson, E., Sukhatme, V. P., et al. (1999). Rapid induction and translocation of Egr-1 in response to mechanical strain in vascular smooth muscle cells. Circ. Res. **84**: 678–687.
- Mroz, T. E., Joyce, M. J., Steinmetz, M. P., Lieberman, I. H., Wang, J. C. (2008). Musculoskeletal allograft risks and recalls in the United States. J Am Acad Orthop Surg **16** (10): 559-565.

- Mu, Y., Gudey, S. K., Landstrom, M. (2012). Non-Smad signaling pathways. Cell Tissue Res **347** (1): 11-20.
- Nasu, M., Takayama, S., Umezawa, A. (2015). Endochondral ossification model system: designed cell fate of human epiphyseal chondrocytes during long-term implantation. J Cell Physiol **230** (6): 1376-1388.
- Niemand, H.G. (Begr.); Suter, P.F. (Hrsg.) (2012). Praktikum der Hundeklinik. 11. Auflage. Stuttgart, Enke. ISBN: 978-3-8304-1125-3 / 3-8304-1125-1.
- Niikura, T., Hak, D. J., Reddi, A. H. (2006). Global gene profiling reveals a downregulation of BMP gene expression in experimental atrophic nonunions compared to standard healing fractures. J Orthop Res **24** (7): 1463-1471.
- Nojima, J., Kanomata, K., Takada, Y., Fukuda, T., Kokabu, S., Ohte, S., Takada, T., Tsukui, T., Yamamoto, T. S., Sasanuma, H., Yoneyama, K., Ueno, N., Okazaki, Y., Kamijo, R., Yoda, T., Katagiri, T. (2010). Dual roles of smad proteins in the conversion from myoblasts to osteoblastic cells by bone morphogenetic proteins. J Biol Chem **285** (20): 15577-15586.
- O'Loughlin, P.F., Morr, S., Bogunovic, L., Kim, D.A., Park, B., Lane, M.J. (2008). Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. J Bone Joint Surg **90** (Suppl 1): 79-84.
- Palmer, R. H. (2012). External fixators and minimally invasive osteosynthesis in small animal veterinary medicine. Vet Clin North Am Small Anim Pract **42** (5): 913-934, v-vi.
- Panteli, M., Pountos, I., Jones, E., Giannoudis, P. V. (2015). Biological and molecular profile of fracture non-union tissue: current insights. J Cell Mol Med **19** (4): 685-713.
- Pauwels, F. (1960). A new theory on the influence of mechanical stimuli on the differentiation of supporting tissue. The tenth contribution to the functional anatomy and causal morphology of the supporting structure. Z Anat Entwicklungsgesch **121**: 478-515.
- Peake, M. A. and El Haj, A. J. (2003). Preliminary characterisation of mechanoresponsive regions of the c-fos promoter in bone cells. FEBS Lett **537** (1-3): 117-120.



Perren, S. M. (2001). Evolution and rationale of locked internal fixator technology. Introductory remarks. Injury **32 Suppl 2**: B3-9.

Perren, S. M. (2002). Evolution of the internal fixation of long bone fractures. The scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology. J Bone Joint Surg Br **84** (8): 1093-1110.

Perren, S. M. (2003). Backgrounds of the technology of internal fixators. Injury **34 Suppl 2**: B1-3.

Phillips, A. M. (2005). Overview of the fracture healing cascade. Injury **36 Suppl 3**: S5-7.

Piermattei, D. L. (2006). Brinker, Piermattei, and Flo&apos;s handbook of small animal orthopedics and fracture repair. 4.ed. St. Louis, Mo., Saunders/Elsevier. ISBN: 978-0-7216-9214-2.

Pountos, I., Georgouli, T., Pneumaticos, S., Giannoudis, P. V. (2013). Fracture non-union: Can biomarkers predict outcome? Injury **44** (12): 1725-1732.

Remedios, A. (1999). Bone and Bone Healing. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice **29** (5): 1029-1044.

Rihn, J. A., Kirkpatrick, K., Albert, T. J. (2010). Graft options in posterolateral and posterior interbody lumbar fusion. Spine (Phila Pa 1976) **35**(17): 1629-1639.

Rochefort, G. Y., Pallu, S., Benhamou, C. L. (2010). Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. Osteoporos Int **21** (9): 1457-1469.

Rohn, J. W.; Lütjen-Drecoll, E. (2000). Funktionelle Histologie. 4.Auflage. Stuttgart [u.a.], Schattauer. ISBN: 3-7945-2044-0.

Rontgen, V., Blakytyn, R., Matthys, R., Landauer, M., Wehner, T., Gockelmann, M., Jermendy, P., Amling, M., Schinke, T., Claes, L., Ignatius, A. (2010). Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator. J Orthop Res **28** (11): 1456-1462.

Rucci, N. (2008). Molecular biology of bone remodelling. Clin Cases Miner Bone Metab **5** (1): 49-56.

Rui, Y.F., Lui,P.P., Ni, M., Chan, L.S., Lee, Y.W., Chan, K.M. (2011). Mechanical loading increased BMP-2 expression which promoted osteogenic differentiation of tendon-derived stem cells. J Orthop Res **29** (3): 390-406.

Ruschke, K., Hiepen, C., Becker, J., Knaus, P. (2012). BMPs are mediators in tissue crosstalk of the regenerating musculoskeletal system. Cell Tissue Res **347** (3): 521-544.

Ruzinova, M. B., Benezra, R. (2003). Id proteins in development, cell cycle and cancer. Trends Cell Biol **13** (8): 410-418.

Sánchez-Duffhues, G., Hiepen, C., Knaus, P.,ten Dijke, P. (2015). Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis. Bone **80**:43-59.

Schell, H., Thompson, M.S., Bail, H.J. et al. (2008). Mechanical induction of critically delayed bone healing in sheep: radiological and biomechanical results. J Biomech **41**:3066–3072.

Schmidmaier, G., Wildemann, B., Stemberger, A., Haas, N.P., Raschke, M. (2001). Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. J. Biomed. Mater. Res. **58** (4): 449–455.

Schmidmaier, G. and Moghaddam, A. (2015). [Long Bone Nonunion]. Z Orthop Unfall **153** (6): 659-674; quiz 675-656.

Schmidt-Bleek, K., Willie, B.M., Schwabe, P., Seemann, P., Duda, G.N. (2016). BMPs in bone regeneration: Less is more effective, a paradigm-shift. Cytokine Growth Factor Rev **27**: 141-148.

Schwarz, C., Wulsten, D., Ellinghaus, A., Lienau, J., Willie, B.M., Duda, G.N. (2013). Mechanical load modulates the stimulatory effect of BMP2 in a rat nonunion model. Tissue Eng Part A **19** (1-2): 247-254.

---

Schwarz, C., Ott, C.-E., Wulsten, D., Brauer, E., Schreivogel, S., Petersen, A., Hassanein, K., Roewer, L., Schmidt, T., Willie, B.M., Duda, G. (2018). The interaction of BMP2-induced defect healing in rat ans fixator stiffness modulates matrix alignment and contraction. J of Bone and Mineral Res Plus **2** (3):174-186.

Sen, M. K. and Miclau, T. (2007). Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? Injury **38 Suppl 1**:S75-80.

Shahi, M.,Peymani, A.,Sahmani, M. (2017). Regulation of Bone Metabolism. Rep Biochem Mol Biol **5** (2): 73-82.

Shapiro, F. (1988). Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. J Bone Joint Surg Am **70** (7): 1067-1081.

Shapiro, F. (2008). Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. Eur Cell Mater **15**: 53-76.

Sheikh, Z., Hamdan, N., Ikeda, Y., Grynvas, M., Ganss, B., Glogauer, M (2017). Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. Biomater Res **21**:9.

Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C., Knaus, P. (2009). Recent advances in BMP receptor signaling. Cytokine Growth Factor Rev **20**: 343-355.

Simmons, D. J. (1985). Fracture healing perspectives. Clin Orthop Relat Res(200): 100-113.

Simon, U.,Augat, P.,Utz, M.,Claes, L (2011). A numerical model of the fracture healing process that describes tissue development and revascularisation. Comput Methods Biomech Biomed Engin **14** (1):79-93.

Sims, N. A. and Gooi, J. H. (2008). Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. Semin Cell Dev Biol **19** (5): 444-451.

Sims, N. A.,Martin, T. J. (2014). Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. Bonekey Rep **3**:481.

Smith-Adaline, E. A., Volkman, S. K., Ignelzi, M. A., Slade, Jr., J., Platte, S., Goldstein, S. A. (2004). Mechanical environment alters tissue formation patterns during fracture repair. J Orthop Res **22** (5): 1079-1085.

Sodek, J. and McKee, M.D. (2000), Molecular and cellular biology of alveolar bone. Periodontology 2000 **24** (1): 99–126.

Sommerfeldt, D. W. and Rubin, C. T. (2001). Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. Eur Spine J **10 Suppl 2**: S86-95.

Song, K., Krause, C., Shi, S., Patterson, M., Suto, R., Grgurevic, L., Vukicevic, S., van Dinther, M., Falb, D., Ten Dijke, P., Alaoui-Ismaili, M. H. (2010). Identification of a key residue mediating bone morphogenetic protein (BMP)-6 resistance to noggin inhibition allows for engineered BMPs with superior agonist activity. J Biol Chem **285** (16):12169-12180.

Trostle, S. S. and Markel, M. D. (1996). Fracture biology, biomechanics, and internal fixation. Vet Clin North Am Food Anim Pract **12** (1): 19-46.

Tsuji, K., Bandyopadhyay, A., Harfe, B. D., Cox, K., Kakar, S., Gerstenfeld, L., Einhorn, T., Tabin, C. J. and Rosen, V. (2006). BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. Nat Genet **38** (12): 1424-1429.

Tuchman, A., Brodke, D. S., Youssef, J. A., Meisel, H. J., Dettori, J. R., Park, J. B., Yoon, S. T., Wang, J. C. (2016). Iliac Crest Bone Graft versus Local Autograft or Allograft for Lumbar Spinal Fusion: A Systematic Review. Global Spine J **6** (6): 592-606.

Turgeman, G., Zilberman, Y., Zhou, S., Kelly, P., Moutsatsos, I. K., Kharode, Y. P., Borella, L. E., Bex, F. J., Komm, B. S., Bodine, P. V., Gazit, D. (2002). Systemically administered rhBMP-2 promotes MSC activity and reverses bone and cartilage loss in osteopenic mice. J Cell Biochem **86** (3): 461-474.

Tylzanowski, P., Mebis, L., Luyten F.P.(2006). The Noggin null mouse phenotype is strain dependent and haploinsufficiency leads to skeletal defects. Dev Dyn **235**:1599–15607.

Urist, M. R. (1965). Bone: formation by autoinduction. Science **150** (3698): 893-899.

Victoria G, Petrisor B, Drew B, Dick D (2009). Bone stimulation for fracture healing: What's all the fuss? Indian J Orthop **43** (2): 117-120.

Virk, M.S.; Conduah, A.; Park, S.H.; Liu, N.; Sugiyama, O.; Cuomo, A.; Kang, C.; Lieberman, J.R. (2008). Influence of short-term adenoviral vector and prolonged lentiviral vector mediated bone morphogenetic protein-2 expression on the quality of bone repair in a rat femoral defect model. Bone **42** (5): 921–931.

Voggenreiter, G. (2009). Knochenheilung. Perioperative Medizin **1** (2): 86-95.

von Keudell, A., Shoji, K., Nasr, M., Lucas, R., Dolan, R., Weaver, M. J. (2016). Treatment Options for Distal Femur Fractures. J Orthop Trauma **30 Suppl 2** : 25-27.

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

Wang, E. A., Rosen, V., D'Alessandro, J. S., Bauduy, M., Cordes, P., Harada, T., Israel, D. I., Hewick, R. M., Kerns, K. M., LaPan, P. and et al. (1990). Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. Proc Natl Acad Sci U S A **87** (6): 2220-2224.

Weber, B. G. and Čech. (1976). Pseudarthrosis. Bern, Stuttgart, Vienna [Wien], Huber.

Weatherholt, A.M., Fuchs, R.K., Warden, S.J. (2012). Specialized connective tissue: bone, the structural framework of the upper extremity. Journal of Hand Therapy **25** (2): 123-132.

Weyrauch, K. D. and Smollich, A. (1998). Histologie-Kurs für Veterinärmediziner. Stuttgart, Enke. ISBN: 3-432-29501-4.

Wilson, C. J., Schutz, M. A., Epari, D. R. (2017). Computational simulation of bone fracture healing under inverse dynamisation. Biomech Model Mechanobiol **16** (1):5-14.

Wolf, S., Augat, P., Eckert-Hubner, K., Laule, A., Krischak, G. D., et al. (2001). Effects of high-frequency, low-magnitude mechanical stimulus on bone healing. Clin. Orthop. Relat. Res 192–198.

Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitscock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W, Hewick, R. M., Wang, E. A. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science **242** (4885): 1528-1534.

Wulsten, D., Glatt, V., Ellinghaus, A., Schmidt-Bleek, K., Petersen, A., Schell, H., Lienau, J., Sebald, W., Ploger, F., Seemann, P., Duda, G. N. (2011). Time kinetics of bone defect healing in response to BMP-2 and GDF-5 characterised by in vivo biomechanics. Eur Cell Mater **21**: 177-92.

Yadin, D.,Knaus, P.,Mueller, T. D. (2016). Structural insights into BMP receptors: Specificity, activation and inhibition. Cytokine & Growth Factor Reviews **27**:13-34.

Yang, X., Ricciardi, B. F., Hernandez-Soria, A., Shi, Y., Pleshko Camacho, N., Bostrom, M. P. (2007). Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. Bone **41** (6): 928-936.

Yavropoulou, M.P. and Yovos, J.G. (2008). Osteoclastogenesis-current knowledge and future perspectives. Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions **8** (3): 204-216.

Yavropoulou, M.P. and Yovos, J.G. (2016). The molecular basis of bone mechanotransduction. J Musculoskelet Neuronal Interact **16** (3): 221-236.

Zeng, Z.,Yin, X., Zhang, X., Jing, D., Feng, X. (2015). Cyclic stretch enhances bone morphogenetic protein-2-induced osteoblastic differentiation through the inhibition of Hey1. Int J Mol Med **36** (5): 1273-1281.

Zhang, X., Awad, H. A., O'Keefe, R. J., Guldberg, R. E., Schwarz, E. M. (2008). A perspective: engineering periosteum for structural bone graft healing. Clin Orthop Relat Res **466** (8): 1777-1787.

## 9. Publikationen

### Publikation:

Schwarz, C., Ott, C.-E., Wulsten, D., Brauer, E., Schreivogel, S., Petersen, A., Hassanein, K., Roewer, L., Schmidt, T., Willie, B.M., Duda, G. (2018). The interaction of BMP2-induced defect healing in rat ans fixator stiffness modulates matrix alignment and contraction. J of Bone and Mineral Res Plus **2** (3):174-186.

## 10. Danksagung

Zuerst möchte ich Prof. Dr. Salah Amasheh für die Durchsicht und Betreuung meiner Dissertation als Erstgutachter und Doktorvater danken. Sie hatten immer ein offenes Ohr und ich habe mich stets gut aufgehoben gefühlt.

Prof. Dr.-Ing. G.N. Duda erlaubte mir die Durchführung der Arbeit am Julius Wolff Institut. Dafür danke ich.

Vielen Dank an Carolin Schwarz und Dr. Tanja Schmidt für die Aufgabenstellung, die Betreuung und geduldige Begleitung am Institut.

Ganz besonders möchte ich Tobias Thiele und Dr. Susann Minkwitz danken. Ihr habt mich mit viel Geduld in die Laborarbeit eingeführt und eure Tür stand jederzeit offen für meine Fragen.

Kerstin Hassanein, du hast mich herzlich in das Team aufgenommen. Danke für die gemeinsame Zeit und intensiven Gespräche.

Außerdem möchte ich Prof. Dr. Sandra Blome danken. Du hast mir den Einstieg in die Forschung ermöglicht und meine Freude am wissenschaftlichen Arbeiten geweckt. Ohne dich hätte ich das Ziel der Erstellung einer Doktorarbeit nicht weiter verfolgt.

Ohne die große Unterstützung der Omas meiner Kinder wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank für die vielen Stunden, die ihr mir durch eure Kinderbetreuung verschafft habt.

Meinen Eltern danke ich für ihre lebenslange, tägliche Unterstützung. Mit eurem Vertrauen und eurer bedingungslosen Liebe habt ihr mir die Erstellung dieser Arbeit ermöglicht.



## 11. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Linda Roewer, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Außerdem versichere ich, dass diese Arbeit noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat.

Berlin, 06.09.2019

Linda Roewer