

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
des Klinikums rechts der Isar  
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff)

**„Einfluss verschiedener Medikamente  
auf die Frakturheilung am Femurschaft –  
eine tierexperimentelle Studie“**

Dr. med. Marc Oliver Bissinger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Zahnheilkunde  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff  
2. Univ.-Prof. Dr. T. Tischer, Universität Rostock

Die Dissertation wurde am 09.07.2013 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin  
am 16.10.2013 angenommen.

Meinen Eltern

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Problem, Fragestellung und Ziel der Arbeit</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methode</b>	<b>15</b>
<b>3.1</b>	<b>Tiermodell</b>	<b>15</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Tierhaltung</b>	<b>15</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Präoperatives Management</b>	<b>16</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Narkose</b>	<b>16</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Operationstechnik</b>	<b>17</b>
<b>3.1.5</b>	<b>Postoperative Nachsorge/Applikation von Medikamenten</b>	<b>18</b>
<b>3.1.6</b>	<b>Opferung und Probenentnahme</b>	<b>19</b>
<b>3.2</b>	<b>Auswertung</b>	<b>20</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Serum-Medikamenten-Spiegel</b>	<b>20</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Radiologische Analyse (Röntgen, Mikro-CT)</b>	<b>20</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Histologie</b>	<b>30</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Biomechanik</b>	<b>32</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Ein- und Ausschlüsse</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Serumspiegel</b>	<b>35</b>
<b>4.3</b>	<b><math>\mu</math>CT</b>	<b>36</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Volumen</b>	<b>36</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Dichte</b>	<b>37</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Masse</b>	<b>39</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Strukturparameter</b>	<b>40</b>
<b>4.4</b>	<b>Histometrie</b>	<b>45</b>
<b>4.5</b>	<b>Biomechanik</b>	<b>49</b>
<b>4.5.1</b>	<b>Fmax</b>	<b>49</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Stiffness</b>	<b>51</b>
<b>4.6</b>	<b>Zusammenschau der Modalitäten</b>	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
<b>5.1</b>	<b>Tiermodell</b>	<b>56</b>

<b>5.2</b>	<b>Frakturheilungsmodell</b>	<b>57</b>
<b>5.3</b>	<b>Versuchsdauer</b>	<b>58</b>
<b>5.4</b>	<b>µCT</b>	<b>60</b>
<b>5.5</b>	<b>Histometrie</b>	<b>64</b>
<b>5.6</b>	<b>Biomechanik</b>	<b>66</b>
<b>5.7</b>	<b>Medikamente</b>	<b>69</b>
<b>5.8</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>97</b>
<b>8.1</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>8.2</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>100</b>
<b>10</b>	<b>Curriculum vitae</b>	<b>101</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung(en)
AG	Aktiengesellschaft
Aqua dest.	Aqua destillata
B	Breite
BMC	Bone Mineral Content
BMD	Bone Mineral Density
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BS	Bone Surface
BV	Bone Volume
bzw.	beziehungsweise
C	Cephalosporin
CCD	Charge-coupled Device
ccm	Kubikzentimeter
CI	Konfidenzintervall
cm	Centimeter
COX	Cyclooxygenase
CrI	Charles River Laboratories
CT	Computertomographie
D	Diclofenac
DA	Degree of Anisotropy
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
ETOH	Ethanol
EU	Europäische Union
Fa	Firma
Fmax	Versagenslast
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
H	Höhe
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HA	Hydroxylapatit
i.m.	intramuskulär
IPL	Image Processing Language
K	Kontrolle
K-Draht	Kirschner-Draht
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht

---

KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
l	Liter
LMU	Ludwig-Maximilian-Universität
mg	Milligramm
MIL	Mean Intercept Length
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
MMA	Methylmetacrylat
ms	Millisekunde
MTF	Modulationstransferfunktion
MW	Mittelwert
N	Newton
ng	Nanogramm
Nm	Newtonmeter
nm	Nanometer
NSAR	Nicht-Steroidale-Anti-Rheumatika
OP	Operation
P	Prednisolon
PTHrP	Parathormon related Protein
PV	Partialvolumeneffekt
ROI	Region of Interest
s.c.	subkutan
SD	Standard Deviation
SMI	Structure Model Index
T	Tiefe
Tab.	Tabelle
Tb. Th.	Trabecular Thickness
TMD	Tissue Mineral Density
TU(M)	Technische Universität (München)
TV	Totalvolumen
u.a.	unter anderem
VOI	Volume of Interest
vs	versus
WI	Wistar
z.B.	zum Beispiel
ZPF	Zentrum für Präklinische Forschung
μCT	Mikrocomputertomographie
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer

# 1 Einleitung

Im klinischen Alltag werden nach Knochenbrüchen bzw. nach einem operativen Eingriff verschiedene Medikamente zur Schmerzstillung, Entzündungshemmung, Abschwellung und Infektionsprophylaxe verabreicht, ohne dass eine eventuelle negative Wirkung auf die Knochenheilung ausreichend untersucht ist. Nicht-Steroidale-Anti-Rheumatika (NSAR) stehen dabei seit geraumer Zeit im Verdacht, die Knochenbruchheilung negativ zu beeinflussen [Akman 2002, Bergenstock 2005, Brown 2004, Gerstenfeld 2003, Geusens 2013, Krischak 2007a, Krischak 2007c, Matziolis 2002, Sell 1999, Simon 2007, Spiro 2010]. Über einen ähnlichen, weiter reichenden Wirkmechanismus greifen Glukokortikoide an, deren womöglich schwerwiegendere Auswirkungen in diesem Zusammenhang keineswegs hinreichend untersucht sind. Nachgewiesenermaßen beeinträchtigen sie das Knochenremodelling [Ishida 1998, Luppen 2002, Weinstein 1998, Weinstein 2000] und die Frakturheilung in Tiermodellen [Blunt 1950, Clein 1962, Doyon 2010, Gilley 2009, Kostenszky 1974, Kowalewski 1958, Kowalewski 1959, Murakami 1966, Sissons 1951, Wiancko 1961]. Eine neuere Studie wies zudem auf einen möglichen hemmenden Einfluss von Cephalosporinen auf Osteoblasten im Zellkulturmodell hin [Salzmann 2007].

Die frühe Phase der Knochenheilung ist durch eine Entzündungsreaktion des Körpers gekennzeichnet, welche die für den Heilungsprozess notwendigen Entzündungs- und Vorläuferzellen durch chemische Botenstoffe, u.a. Wachstumsfaktoren, zur Frakturstelle bringt und zur Proliferation anregt [Klaushofer 1994, Probst 1997]. Neuere molekularbiologische Studien deuten darauf hin, dass gerade die frühe Heilungsphase möglicherweise für den endgültigen Erfolg und die Stabilität des Knochens entscheidend ist [Dimitriou 2005].

## *NSAR*

Prostaglandine sind unter anderem solche Botenstoffe mit proinflammatorischem Effekt, welche in der Knochenheilung eine funktionelle Rolle spielen. Dabei wird durch die Enzyme Cyclooxygenase 1 (COX-1) und 2 (COX-2) die Biosynthese der Prostaglandine gesteuert [Smith 2000], wobei COX-2 spezifisch an der Entzündungsreaktion beteiligt ist, wohingegen COX-1 eher universell an verschiedenen physiologischen Prozessen, wie z.B. der Thrombozytenaggregation, Zytoprotektion im Ga-

strointestinaltrakt, Vasodilatation/-konstriktion und viele mehr, involviert ist [Radi 2009]. NSAR inhibieren im Allgemeinen (unspezifisch) die Aktivität beider bisher identifizierten Cyclooxygenasen, wie beispielsweise Ibuprofen und Diclofenac. Aufgrund der Annahme, dass die therapeutischen Effekte der NSAR vornehmlich durch COX-2-Hemmung, und die Nebenwirkungen durch Inhibition der COX-1 verursacht werden, wurden COX-2-selektive NSAR entwickelt [FitzGerald 2001, Hawkey 1999], z.B. Rofecoxib (erster selektiver COX-2 Hemmer, inzwischen wegen kardiovaskulärer Nebenwirkungen außer Handel [Villalba 2004]), Celecoxib und neuerdings Etoricoxib [Back 2011].

Zur Schmerz- und Schwellungsreduktion werden NSAR im Allgemeinen nach Frakturen in breiter Indikationsstellung eingesetzt [Steinmeyer 2000], scheinbar ohne dass dabei an eine mögliche Einflussnahme auf die Frakturheilung gedacht wird. Zahlreiche tierexperimentelle Studien weisen auf diese Problematik hin [Bergenstock 2005, Brown 2004, Chikazu 2011, Gerstenfeld 2003, Simon 2007], legen jedoch hauptsächlich röntgenologische, histologische und biomechanische Ergebnisse vor. Sie zeigen unter anderem, dass auch COX-2-selektive NSAR in den frühen Stadien der Frakturheilung die mechanischen Eigenschaften des Kallus signifikant vermindern und die Knochenbruchheilung verzögern können. Darüber hinaus kann die endgültige Stabilität des Knochens vermindert sein. Somit scheint COX-2 für die Frakturheilung eine wichtige Rolle zu spielen [Chikazu 2011]. Des Weiteren werden sowohl COX-1-selektive NSAR als auch COX-2-selektive NSAR zur Prophylaxe heterotoper Ossifikationen eingesetzt [Vasileiadis 2011].

### *Glukokortikoide*

Im Gegensatz zu Cyclooxygenase-Hemmern, die erst bei der Konversion von Arachidonsäure zu Prostaglandinen in die Biosynthese eingreifen, unterbinden Glukokortikoide die Herstellung der Arachidonsäure und greifen so bereits früher als NSAR in den zur Prostaglandinsynthese führenden Prozess ein [Spies 2011]. Arachidonsäure bildet die Grundlage für die Produktion sowohl von Prostaglandinen als auch Leukotrienen [Spies 2011]. Letztere spielen neben den Prostaglandinen ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Entzündungsregulation des Körpers. Folglich könnten Glukokortikoide eine schwerwiegende(re) Beeinträchtigung der Knochenheilung nach sich ziehen [Ho 1995, Luppen 2002, Waters 2000].



### *Antibiotika*

Perioperative Antibiotikaprophylaxe reduziert erwiesenermaßen das Risiko von Infektionen [Boxma 1996, Espehaug 1997, Salzmann 2007, Wolff 1998]. Die publizierten Raten von Knochen- und Gelenkinfektionen nach Reposition und Osteosynthese geschlossener Frakturen liegen im Bereich von 0,5 bis 3,5% [Boxma 1996, Espehaug 1997, Salzmann 2007] und steigen nach Behandlung von offenen Frakturen und in der Revisionsendoprothetik an [Ketterl 1993, Peersman 2001, Salzmann 2007]. Eine große Variabilität zeigt sich in Bezug auf die prophylaktische Therapie. Heute wird die perioperative Antibiotikaprophylaxe in der orthopädischen Chirurgie in der Regel für 24 h durchgeführt, wobei mit einer intravenösen Einzeldosisverabreichung von Antibiotika zum Zeitpunkt des Narkosebeginns gestartet wird [Glenny 1999, Salzmann 2007, Southwell-Keely 2004].

Das Cephalosporin der zweiten Gruppe, Cefuroxim, bietet ein antimikrobielles Spektrum gegen die bedeutendsten Erreger von Knocheninfektionen [Gold 1983, Salzmann 2007]. Es ist stabil gegenüber  $\beta$ -Laktamasen und zeigt eine gute Knochenpenetration [Gold 1983, Katzer 1997, Leigh 1986, Lovering 1997, Nungu 1995, Salzmann 2007]. Daher ist Cefuroxim eines der am häufigsten verwendeten Antibiotika zur perioperativen Prophylaxe in der orthopädischen Chirurgie [de Lalla 2001, Lovering 1997, McQueen 1990, Salzmann 2007]. Mehrere Studien haben die Wirksamkeit von Cefuroxim-imprägniertem Knochenzement zur Prophylaxe bei Gelenkersatz untersucht [Chiu 2002, Chiu 2001, Hughes 1979, Liu 2003, McQueen 1987, McQueen 1990, Salzmann 2007]. Der Vorteil in einer lokalen Anwendung, die zuerst von Buchholz und Engelbrecht 1970 beschrieben wurde [Buchholz 1970], ist, dass deutlich höhere lokale Antibiotika-Konzentrationen erreicht werden können, ohne dass systemisch toxische Spiegel erreicht werden [Mader 1999, Zalavras 2004]. Allerdings haben jüngste Untersuchungen hemmende und toxische Auswirkungen hoher Antibiotika-Konzentrationen auf osteoblastische Zellen in vitro ergeben [Edin 1996, Holtom 2000, Isefuku 2001, 2003, Miclau 1995, 1998, Salzmann 2007]. Aufgrund der kontinuierlichen Arzneimittelfreisetzung aus dem Zement kann die Verwendung von Antibiotika-imprägniertem Knochenzement zur Prophylaxe zusätzlich zu einer längeren Antibiotika-Wirkung auf Knochenzellen führen. So zeigte eine neuere Studie, dass höhere Dosen von Cefuroxim die Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten in vitro stark beeinträchtigt haben [Salzmann 2007], wobei der

Wirkmechanismus noch nicht näher identifiziert werden konnte. Da auch dieses Medikament breit eingesetzt wird, wäre es für den klinischen Alltag von großer Bedeutung, die bisher noch nicht erforschte in vivo-Wirkung genauer zu untersuchen.

### *Tiermodelle*

Isolierte Versuche an Zellkulturen können nur eingeschränkt Aussagen zum Heilungsverlauf nach Frakturen beziehungsweise der Beeinflussung desselben durch Medikamente geben. Die komplexen (patho-)physiologischen Heilungsvorgänge nach einer Knochenfraktur, mit der für sie notwendigen Entzündungsreaktion des Körpers – wie oben beschrieben – erfordern den lebenden Organismus [Dumont 2009, Gerstenfeld 2009, O'Loughlin 2008]. Somit sind Tierversuche eine *conditio sine qua non*, Frakturheilungsstörungen unter Einnahme von NSAR, Glukokortikoiden und Cephalosporinen zu untersuchen und im Hinblick auf das Wohl der Patienten gegebenenfalls die Verabreichung jener Substanzen zu modifizieren.

Unterschiedliche Tierarten und Geschlechter metabolisieren (altersabhängig) verschiedene Wirkstoffe anders, was zu anderen Wirkungen/Nebenwirkungen der Medikamente auf den Organismus der jeweiligen Spezies führen kann und somit eine Anpassung der Dosis erfordert [Beck 2003, Chen 2006, Huddleston 2000, Luppen 2002, Newman 1987, Simon 2007, Waters 2000]. Daher ist die unterschiedliche Reaktion verschiedener Tiere auf Medikamente ein wichtiges Kriterium in der Auswahl eines entsprechenden Tiermodells. Hierbei bieten sich verschiedene Modelle an:

Während anfangs Frakturheilungsmodelle (heute vor allem Biomaterialtestung für Knochenersatz) aufgrund leichter Durchführbarkeit und Ähnlichkeit zum Menschen hauptsächlich bei Großtieren wie Schafen [Bensaid 2005, Kon 2000, Nuss 2006, Petite 2000, Petrizzi 2007, Viateau 2007, von Rechenberg 2006], Ziegen [Kruyt 2006, Zhu 2006], Hunden [Bruder 1998, He 2007, Yamada 2004], Schweinen [Zhou 2006] durchgeführt wurden, sind in jüngerer Zeit Nagetiere wie Ratte [Betz 2006, Bonnarens 1984, Drosse 2008, Jager 2007, Jager 2005a, b, Vogelín 2005] und Maus [Schieker 2004, Seitz 2007, Zhang 2005] in den Fokus der Forschung gerückt [Einhorn 1998, Hiltunen 1993a]. Diese weisen im Gegensatz zu Schafen, Hunden oder Schweinen keine Havers'schen Kanäle auf [Martiniakova 2006, Nunamaker 1998] und sind nur von kleiner Größe. Dadurch sind sie als Versuchstier aber perioperativ einfacher und günstiger zu handhaben, was große Untersuchungsgruppen

realisieren lässt. Letztere erhöhen die Chance, statistisch relevante Aussagen treffen zu können. Gerade für die Maus sind eine große Anzahl an Antikörpern für biochemische und immunhistologische Untersuchungen erhältlich, und es existieren (wie bei Ratten) teils genetisch modifizierte Stämme, die beispielsweise eine Frakturheilungsstudie unter Berücksichtigung spezieller Fragen ermöglicht. Der große Vorteil der Ratte gegenüber der Maus liegt in ihrer Körpergröße, was vor allem das operative Handling, aber auch die biomechanische Knochentestung deutlich erleichtert. Grundsätzlich sind Tibia- und Femur-Frakturmodelle an der Ratte mit denen an der Maus vergleichbar.

### *Frakturheilungsmodelle*

Hier kann man zwischen Fraktur- und Defektmodellen differenzieren: Erstere dienen beispielsweise der Analyse des Einflusses verschiedener Medikamente auf den Ablauf der Frakturheilung. Letztere hingegen dienen der Evaluation des Einflusses von Knochenersatz auf den Heilungsverlauf durch Implantation verschiedener Trägermaterialien („scaffolds“) [Histing 2011].

Man kann bei Tibia- und Femurfrakturmodellen an Ratte und Maus zwischen geschlossener und offener Frakturierung sowie zwischen intra- und extramedullären Verfahren unterscheiden [Histing 2011]. Die geschlossenen Modelle lassen sich im Wesentlichen auf das von Bonnarens und Einhorn 1984 an der Ratte beschriebene intramedulläre Modell zurückführen – der Kirschner-Draht-Osteosynthese (Marknagel) [Beck 2003, Bonnarens 1984, Histing 2011, Histing 2009b, Holstein 2007, Krischak 2007a, Krischak 2007c, Simon 2007]. Um nur einen geringen Weichteilschaden zu generieren, wird hierbei durch eine stumpfe Guillotine eine standardisierte quere Schaftfraktur gesetzt. Entsprechende Mausmodelle an Tibia [Hiltunen 1993b] und Femur [Manigrasso 2004] wurden publiziert.

Die offenen Modelle werden gewählt, um den Knochen unter Sicht zu frakturieren oder zu osteotomieren (in der Regel im Rahmen eines Defektmodells), wobei meist ein lateraler Zugang gewählt wird [Cheung 2003]. Das sogenannte Pin-clip device für die Maus stellt einen Marknagel dar, welcher mit einem Bügel verbunden ist (intra-, extramedullär) [Histing 2011]. Hierdurch ergibt sich eine hohe mechanische Stabilität, welche jedoch mit einem komplexem Eingriff und großer Weichteil- und Marktraumatisierung verbunden ist [Garcia 2008a, Garcia 2008b]. Des Weiteren gibt es einen

Verriegelungsnagel (interlocking nail) für Ratte und Maus, dessen Anbringen jedoch einen komplexen und invasiven Eingriff erfordert, dafür aber eine extrem hohe Stabilität bietet [Garcia 2010, Histing 2011, Schoen 2008].

Als weiteres extramedulläres Verfahren gibt es die Verriegelungsplatte, welche durch Verriegelungsschrauben fixiert wird und für Diaphysen- und Metaphysen-Defektfrakturen benutzt werden kann. Diese Platte weist ein geringes Gewicht auf und befähigt zur intramembranösen Frakturheilung ohne Kallus [Heiner 2006, Histing 2009a, Matthys 2009, Stuermer 2008, Wingerter 2007].

Die Osteosynthese mittels Fixateur externe als extramedulläres, rotations- und achsenstabiles Verfahren kann je nach Rigidität eine mehr chondrale oder mehr intramembranöse Frakturheilung bewirken [Claes 2009b, Histing 2011, Rontgen 2010, Thompson 2002]. Der Hauptvorteil dieses Systems ist, dass die Frakturzone einschließlich des Periosts nicht tingiert wird. Zudem kann die Rigidität der Stabilisierung während der Frakturheilung ohne weitere Operation modifiziert werden [Claes 2009a]. Die Nachteile dieses Verfahrens liegen allerdings in einem hohen Implantatgewicht mit folglich Behinderung des Bewegungsablaufs des Tieres sowie in der Gefahr, sich im Käfig zu verhaken, in der Invasivität sowie in einer komplexen Operationstechnik.

Im Anschluss wurden rotationsstabile, geschlossene Osteosyntheseverfahren wie der geschlossene Verriegelungsmarknagel für den Oberschenkel (locking femur nail) [Histing 2011, Holstein 2007] beschrieben. Dabei konnte die Rotationsstabilität verbessert werden, jedoch keine axiale Stabilität erreicht werden. Gesteigert werden konnte sowohl die Rotations- als auch die axiale Stabilität durch eine intramedulläre Kompressionsschraube (Mouse-/RatScrew) [Claes 2009b, Histing 2011, Holstein 2009] (Tab. 1-1).

	Pin	Locking nail	Pin-Clip	Intramedulläre Kompressions-schraube	Verriegelungs-platte	Verriegelungs-nagel	Fixateur externe
Tierart	Ratte/Maus	Maus	Maus	Ratte/Maus	Ratte/Maus	Ratte/Maus	Ratte/Maus
Frakturheilung	enchondral	enchondral	enchondral	enchondral	intramembranös	enchondral	enchondral/ intramembranös
Modellart	geschlossen	geschlossen	offen	geschlossen	offen	offen	offen
intramedullär	ja	ja	ja	ja	nein	ja	nein
Invasivität	niedrig	niedrig	hoch	niedrig	hoch	hoch	hoch
Komplexität chirurgischer Zugang	niedrig	niedrig	hoch	niedrig	hoch	hoch	hoch
Bruchform	Fraktur	Fraktur	Osteotomie	Fraktur	Osteotomie	Osteotomie	Osteotomie
Defektmodell	nein	nein	ja	nein	ja	ja	ja
Material	Stahl/Titan	Stahl	Stahl	Edelstahl	Titan/Polyether-etherketon (PEEK)	Edelstahl	Titan/Polyether-etherketon (PEEK)
Gewicht	0,0125 g Maus	0,0125 g Maus	0,025 g Maus	0,02 g Maus	0,04 g Maus	0,06 g Maus	0,20 g Maus
	0,20 g Ratte			0,28 g Ratte	0,20 g Ratte	0,57 g Ratte	0,32 g Ratte
Kosten	niedrig	niedrig	niedrig	hoch	hoch	hoch	hoch

**Tab. 1-1 Implantate zur Frakturstabilisation von Mäusen und Ratten [nach Histing 2011]**

## 2 Problem, Fragestellung und Ziel der Arbeit

Zur Schmerz- und Schwellungsreduktion werden Nicht-Steroidale-Anti-Rheumatika (NSAR) im Allgemeinen nach Traumata/Frakturen und Operationen in breiter Indikationsstellung eingesetzt – scheinbar ohne dass dabei an eine mögliche Einflussnahme auf die Frakturheilung gedacht wird. Aufgrund zahlreicher tierexperimenteller Studien stehen NSAR und Glukokortikoide seit geraumer Zeit im Verdacht, die Knochenbruchheilung negativ zu beeinflussen. Nachgewiesenermaßen beeinträchtigen sie das Remodelling. Eine neuere Studie wies zudem auf einen möglichen hemmenden Einfluss von Cephalosporinen auf Osteoblasten im Zellkulturmodell hin.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, anhand eines Tiermodells an der Ratte die Beeinträchtigung der Frakturheilung durch Gabe von NSAR, Glukokortikoiden und Cephalosporin-Antibiotika detailliert in vivo zu untersuchen. Dazu sollte den Versuchstieren in etablierter, standardisierter Weise nach Marknagelung eine Femurschaftfraktur unter Vollnarkose gesetzt, und anschließend im postoperativen Verlauf oben genannte Medikamente (Diclofenac, Prednisolon, Cefuroxim) verabreicht werden.

Durch Anwendung radiologischer, histomorphometrischer und biomechanischer Untersuchungen sowie der spektralen Bildanalyse (Schwerpunkt einer anderen Promotion) sollten konsekutiv die Effekte dieser Substanzen auf die Frakturheilung dargestellt werden. Zielgrößen sollten die qualitative und quantitative Zusammensetzung des Kallus sowie dessen Belastbarkeit sein. Die Erkenntnisse könnten – gegebenenfalls nach weiterführenden Studien – weitreichende Auswirkungen auf die postoperative/posttraumatische Verabreichung oben genannter Pharmaka nach sich ziehen.

Nebenziel der Arbeit war es, ein vollautomatisches Zweiswellenwertverfahren/Skript für die  $\mu$ CT-Untersuchungen zu etablieren, welches vollautomatisch den Knochen detektieren und gleichzeitig Kallus von ortsständigem Knochen trennen sollte, ohne für jede Struktur einzelne regions of interest (ROI) zeichnen zu müssen. Dieses Verfahren hätte insbesondere neben der großen Zeitersparnis den Vorteil, dass das teilweise nahezu unmögliche Trennen des Knochens durch viele ROIs innerhalb des Frakturbereiches entfielen, und damit die Präzision steigen würde.

### 3 Material und Methode

#### 3.1 Tiermodell

Die Versuche wurden an männlichen Wistar-Ratten (CrI: WI, Gewicht: 500 g +/- 50 g, Alter: 16 Wochen) durchgeführt. Hierbei sollte der Einfluss verschiedener typischer postoperativer Medikamente nach Marknagelung und Frakturierung des Femurs (mittlere Diaphyse) auf die Frakturheilung untersucht werden. Die insgesamt 64 Versuchstiere wurden randomisiert in 2 Gruppen aufgeteilt. Gruppe A bestand aus 25 Tieren und wurde der Auswertung mittels  $\mu$ CT und Histomorphometrie zugeführt. Die biomechanische Auswertung erfolgte an den restlichen 39 Tieren der Gruppe B.

Entsprechend der von uns untersuchten Substanzen wurden 4 Untergruppen gebildet: Cephalosporin, NSAR, Glukocortikoid und Kontrolle. Daraus ergab sich innerhalb der Gruppe A eine Gruppengröße von 6 - 7 Tieren und innerhalb der Gruppe B von 8 - 11 Tieren pro Versuchsarm. Tab. 3-1 zeigt die Einteilung der verschiedenen Gruppen und deren Probenanzahl.

Gruppe	Cephalosporin	Diclofenac	Prednisolon	Kontrolle
A (Histologie/ $\mu$ CT)	6	7	6	6
B (Biomechanik)	9	8	11	11

**Tab. 3-1 Übersicht über die verschiedenen therapeutischen Gruppen**

##### 3.1.1 Tierhaltung

Die Haltung der Tiere erfolgte in Standardkäfigen aus Makrolon [für bis zu 2 Ratten Typ III (H: 20 cm, B: 22 cm, T: 37 cm); für bis zu 4 Ratten Typ IV (H: 20 cm, B: 35 cm, T: 55 cm)]. Futter (Rattenpellets Fa. Altromin) und Wasser erhielten die Tiere ad libitum (Trinkwasser bei Wechsel der Flaschen 2- bis 3-mal pro Woche). Den Tieren standen neben dem normalen Holzgranulateinstreu Kriechröhren aus Pappe und Zellstoff als Nestbaumaterial zur Verfügung. Die Räume sind speziell als Tierhaltungsräume konzipiert (personenlimitierte Zutrittskontrolle, Pflege durch ausgebildete Versuchstierpfleger, Klimatisierung, Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden mit Dämmerungsphase). Die Haltung der Tiere erfolgte in Umsetzung der in der EU-Richtlinie 86/609 festgelegten Bedingungen.

### 3.1.2 Präoperatives Management

Die männlichen Sprague-Dawley-Ratten wurden im Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München operiert und während der gesamten Versuchsphase betreut. Vor dem operativen Eingriff und vor der Fluorochromgabe wurde das Körpergewicht der Tiere zur korrekten Dosierung der Narkotika, Fluorochrome und Medikamente ermittelt. Auch die Tiere der Gruppe B, bei denen die Fluorochromgabe entfiel, wurden an diesen Tagen gewogen. So erfolgte gleichzeitig eine Verlaufskontrolle des Körpergewichts der Tiere. Wäre bei einem Tier das Körpergewicht um 15% abgefallen, so wäre dieses Tier entsprechend den Abbruchkriterien aus dem Versuch genommen, euthanasiert, und die Ursache hierfür abgeklärt worden. Da die Tiere einen hohen Stoffwechselgrundumsatz besitzen, wurde auf eine präoperative Nahrungskarenz verzichtet.

### 3.1.3 Narkose

Zur Marknagelung und Frakturierung des Femurs war eine Vollnarkose notwendig. Als Narkose wurde eine Kombination von Medetomidin (150 µg/kg KG), Midazolam (2 µg/kg KG) und Fentanyl (5 µg/kg KG) verwendet. Diese wurde in einer Mischspritze intramuskulär (i.m.) appliziert. Vorteile dieser Narkose waren, dass die Tiere spontan atmen konnten, eine Nachdosierung und Verlängerung bei Bedarf möglich war, sie eine ausreichend analgetische Komponente beinhaltete und komplett antagonisierbar war. Anschließend wurde das Tier auf dem OP-Tisch positioniert, mit Sauerstoff (1 l/min) versorgt und zur Überwachung mit Hilfe einer Sonde an der Hinterpfote an ein Pulsoxymeter angeschlossen. Nach Einleiten der Narkose wurde das OP-Feld rasiert und desinfiziert. Die Operationen erfolgten unter aseptischen Bedingungen in speziellen Tieroperationsräumen. Um einen möglichst hohen Grad an Reproduzierbarkeit des operativen Ergebnisses zu erhalten, wurde die linke Seite als OP-Seite definiert. Am Ende der Eingriffe wurde die Narkose mit Atipamezol (0,75 mg/kg KG), Flumazenil (0,2 mg/kg KG) und Naloxon (0,12 mg/kg KG) antagonisiert. Diese wurden ebenfalls in einer Mischspritze, jedoch subkutan (s.c.), appliziert. Dies war von Vorteil, da die Tiere schnell aus der Narkose aufwachten und somit die Kreislaufbelastung der Narkose wie auch der Nachschlaf, in dem kleine Tiere oft auskühlen, entfiel. Um eine Auskühlung zu verhindern, wurden die Tiere durch ein digitales Heizkissen gewärmt. Die Kontrolle der Körpertemperatur erfolgte mittels Fieberthermometer rektal.



### 3.1.4 Operationstechnik

Die Femurfraktur sowie ihre Versorgung liefen standardisiert ab [Beck 2003, Bonnarens 1984, Histing 2011, Histing 2009b, Holstein 2007, Huo 1991, Krischak 2007a, Krischak 2007c, Simon 2007]. Allen Versuchstieren wurde durch eine Drei-Punkt-Biegung nach vorangegangener Marknagelung (Durchmesser des Kirschner-Drahtes: 1 mm [Hao 2007]) eine standardisierte Femurfraktur im Bereich der Diaphyse des Knochens gesetzt. Es erfolgten konventionell radiologische Kontrollen nach der Marknagelung, nach der Fraktur (beide intraoperativ) sowie post mortem. Im Detail erfolgte ein gerader glutealer Zugang, welcher über den Trochanter major des linken Femurs erweitert wurde. Nach scharfer Durchtrennung von Kutis und Subkutis sowie der Muskelfaszie der Abduktorenmuskulatur wurden der Trochanter major und der Oberschenkelhals stumpf dargestellt. Anschließend erfolgte das Einbringen eines K-Drahtes orthograd (Durchmesser 1 mm) aus rostfreiem Stahl über die Fossa trochanterica bis zur Innenkortikalis des Femurkondylus zur intramedullären Schienung des Femurs. Im Bereich der Fossa trochanterica wurde der Draht auf Knochenniveau gekürzt. Nach Naht der Faszie und oberflächlichem Wundverschluss (Nahtmaterial Vicryl 4-0) erfolgte anschließend das standardisierte Setzen der Femurfraktur mittels 3-Punkt-Biegung im Bereich der mittleren Diaphyse.

Dies geschah durch eine eigens hierfür gestaltete Apparatur (modifiziert nach Bonnarens [Bonnarens 1984]), die einer Guillotine gleicht, jedoch stumpf ist (Abb. 3-1). Sie besteht im Wesentlichen aus zwei horizontal verstellbaren Auflagen (Anvil), auf welche der Oberschenkel des Tieres so abgelegt wurde, dass ein schmales und stumpfes Fallbeil den Femur genau im mittleren Drittel traf. So wurde eine einfache Querfraktur ohne Zertrümmerung des Knochens und ohne nennenswertes Weichteiltrauma verursacht. Ansonsten musste das Tier entsprechend der Publikation von Morgan ausgeschlossen werden [Morgan 2009]. Das Fallbeil selbst bewegte sich dabei in der Höhe nur um 3 mm (Travel distance), was weniger als der Hälfte des Durchmessers der Mitte des Femurs entsprach, um ein komplettes Abtrennen der Extremität zu verhindern. Die entscheidende Krafteinwirkung entstand durch ein von oben aus 35 cm Höhe auf das Fallbeil eintreffendes Gewicht von 500 Gramm (Abb. 3-2). Postoperativ war keine Entlastung der operierten Extremität notwendig. Die Tiere konnten nach Marknagelung das Bein sofort belasten.

Die radiologische Kontrolle wurde mittels C-Bogen (Siemens, Deutschland) durchgeführt (Abb. 3-3). Anschließend erfolgte die randomisierte Einteilung der Tiere in eine der 6 Behandlungs- beziehungsweise 2 Kontrollgruppen.



Abb. 3-1 Guillotineartige Apparatur

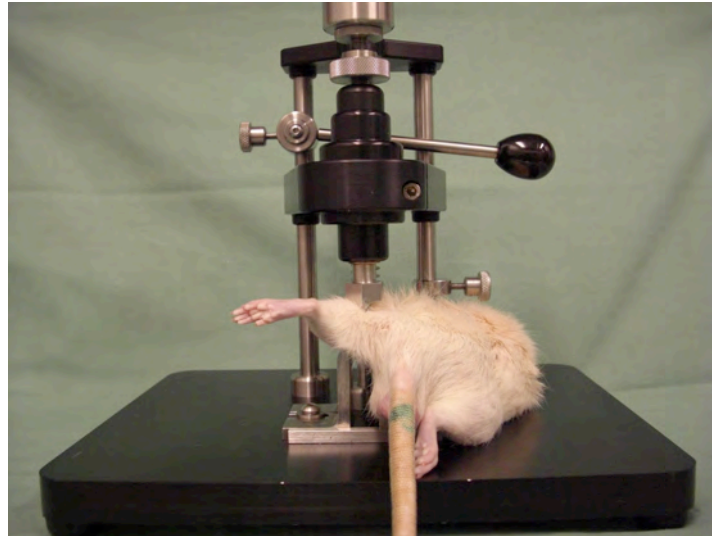


Abb. 3-2 Femurfraktur durch Drei-Punkt-Biegung

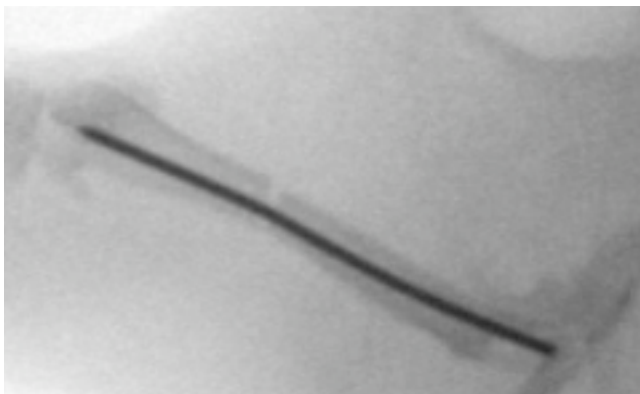


Abb. 3-3 Radiologische C-Bogen-Kontrolle

### 3.1.5 Postoperative Nachsorge/Applikation von Medikamenten

Nach dem Eingriff vor Erwachen aus der Narkose erhielten die Tiere alle 12 Stunden für 3 Tage Buprenorphin (0,075 mg/kg KG) subkutan. Freie Bewegung in den Käfigen war direkt nach der Fraktursetzung beziehungsweise Erwachen aus der Narkose erlaubt. Je nach Gruppeneinteilung erfolgte täglich die subkutane Applikation der entsprechenden Medikamente aus der Gruppe der NSAR, Glukokortikoide oder Cephalosporin-Antibiotika. Die Kontrolltiere erhielten lediglich NaCl-Lösung subkutan.

Im Detail erfolgte die Medikamentengabe in folgenden Dosierungen:

Diclofenac (Voltaren-Resinat, Novartis GmbH): 5 mg/kg KG pro Tag subkutan [Beck 2003, Krischak 2007b, Simon 2007]

Prednisolon (Solu-Decortin H, Merck KGaA): 0,5 mg/kg KG pro Tag subkutan [Newman 1987]

Cefuroxim (Cefuroxim Fresenius, Fresenius Kabi AG): 30 mg/kg KG pro Tag subkutan [Chen 2006, Huddleston 2000]

Bei allen Tieren wurde an Tag 5 des Versuchsablaufs in Vollnarkose Blut aus dem Venenwinkel gewonnen, um die Serumspiegel der täglich eingenommenen Medikamente zu überprüfen. Die Überlebenszeit betrug für alle Tiere 21 Tage.

Um eine histologische Auswertung der Knochenwachstums- und Knochenumbauvorgänge zu ermöglichen, wurde eine polychrome Sequenzmarkierung durchgeführt, welche Schwerpunkt einer anderen Promotion ist. Für alle Tiere der Gruppe A beginnt die Verabreichung des ersten Fluorochromes an Tag 1 nach Fraktur. Die einzelne Gabe der übrigen Fluorochrome erfolgt jeweils im Abstand von 5 Tagen bis 5 Tage vor Euthanasie (Tag 21) in einem Volumen von 1 ml subkutan in folgenden Dosierungen [Pautke 2005]:

Tag 1 Calcein Blau: 30 mg/kg KG subkutan

Tag 6 Calcein Grün: 15 mg/kg KG subkutan

Tag 11 Xylenolorange: 90 mg/kg KG subkutan

Tag 16 Rolitetracyclin: 25 mg/kg KG subkutan

### **3.1.6 Opferung und Probenentnahme**

Am Ende des Versuchs wurde allen Tieren in Isofluran-Narkose durch Punktion des Herzens nochmals Blut entnommen, um den Serumspiegel des jeweiligen Medikaments erneut zu bestimmen. Hiernach wurden die Tiere gemäß EU-Empfehlung durch eine dreifache Überdosis Pentobarbital (90 mg/kg KG) in Narkose euthanasiert. Das frakturierte Femur wurde erneut durch Röntgen wie beschrieben (Abb. 3-3) radiologisch dargestellt. Die Entnahme der Femura erfolgte durch Exartikulation im Knie- und Hüftgelenk (Abb. 3-4). Abbruchkriterien, welche zu einem Versuchsabbruch geführt hätten, waren: Gewichtsverlust  $\geq 15\%$ , Infektion und/oder Lahmheit abhängig von Schwere und Dauer.



**Abb. 3-4 Makroskopische Ansicht**

Die Knochen wurden dabei genau auf alle Auffälligkeiten wie zum Beispiel Fehlstellungen und Kallusbildung untersucht.

## **3.2 Auswertung**

### **3.2.1 Serum-Medikamenten-Spiegel**

Das gewonnene Blut von ca. 1 ml wurde zentrifugiert, so dass mindestens 0,5 ml Serum entstanden. Dieses wurde bei  $-20^{\circ}$  Celsius eingefroren und anschließend in gefrorenem Zustand an ein Labor für klinische Chemie (Medizinisches Versorgungszentrum Dr. Eberhard & Partner Dortmund) geschickt, wo es auf die Substanzen Cefuroxim, Diclofenac und Prednisolon bzw. deren Stoffwechselprodukte untersucht wurde.

### **3.2.2 Radiologische Analyse (Röntgen, Mikro-CT)**

Post mortem wurden anhand von konventionellen Röntgenbildern knöcherne Durchbauung, Achsenstellung, Kallusbildung, Qualität und Lokalisation der Frakturen beurteilt (Abb. 3-3).

Zur detaillierten, dreidimensionalen Darstellung und Bestimmung verschiedener morphometrischer Knochenparameter diente in dieser Arbeit der Mikrocomputertomograph  $\mu$ CT 40 der Fa. Scanco Medical® AG, (Brüttisellen, Schweiz) (Abb. 3-5).



**Abb. 3-5 Mikrocomputertomograph  $\mu$ CT 40**

Die  $\mu$ CT-Analyse stellt ein invasives, nicht destruktives Verfahren dar, welches eine Untersuchung des Hartgewebes bis auf eine Pixelgröße von  $0,5\ \mu\text{m}$  ( $\mu\text{CT 50} = \text{nanoCT}$ ) zulässt, ohne dass die Proben speziell vorbereitet werden müssen. Dank der isotropen Auflösung ist die Schichtdicke immer gleich wie die Pixelgröße innerhalb einer Schicht. Die technische Basisentwicklung der  $\mu\text{CT}$  geht auf die Vorarbeiten von Rüeegsegger und Mitarbeitern zurück [Ruegsegger 1996]. Bei dem  $\mu\text{CT 40}$  handelt es sich um eine Kegelstrahl-Mikrofokusröhre mit einer Fokusgröße von  $5\ \mu\text{m}$  als Quelle und einem CCD-Sensor als Detektor, womit eine maximale Auflösung von  $6\ \mu\text{m}$  nominal (Pixelgröße) bzw.  $9\ \mu\text{m}$  (10% MTF) generiert werden kann. Aus dem gewonnenen Datensatz können 3D-stereologische Indizes berechnet werden, die den Definitionen der Standardhistomorphometrie entsprechen. Die Validität und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu anderen histomorphometrischen Methoden zur Bewertung der Knochenarchitektur wurden in verschiedenen Arbeiten belegt [Barbier 1999, David 2003, Engelke 1999, Ito 1998, Kuhn 1990, Muller 1998, Thomsen 2005, Uchiyama 1997].

Vor den Messungen wurden die Kirschner-Drähte vorsichtig entfernt [Chu 2007]. Die Proben wurden innerhalb des transparenten Messröhrchens (Innendurchmesser:  $18,5\ \text{mm}$ ) in paralleler Anordnung zu diesem ausgerichtet und mittels eines sie umgebenden Schwammes befestigt (Abb. 3-6) [Zhou 2009]. Zur Fixierung dieser Präparate und zur Vermeidung des Austrocknens durch Temperaturerhöhungen während der  $61,9$  Minuten dauernden Messung wurde der Probenhalter mit 100% Methanol gefüllt (Abb. 3-6).

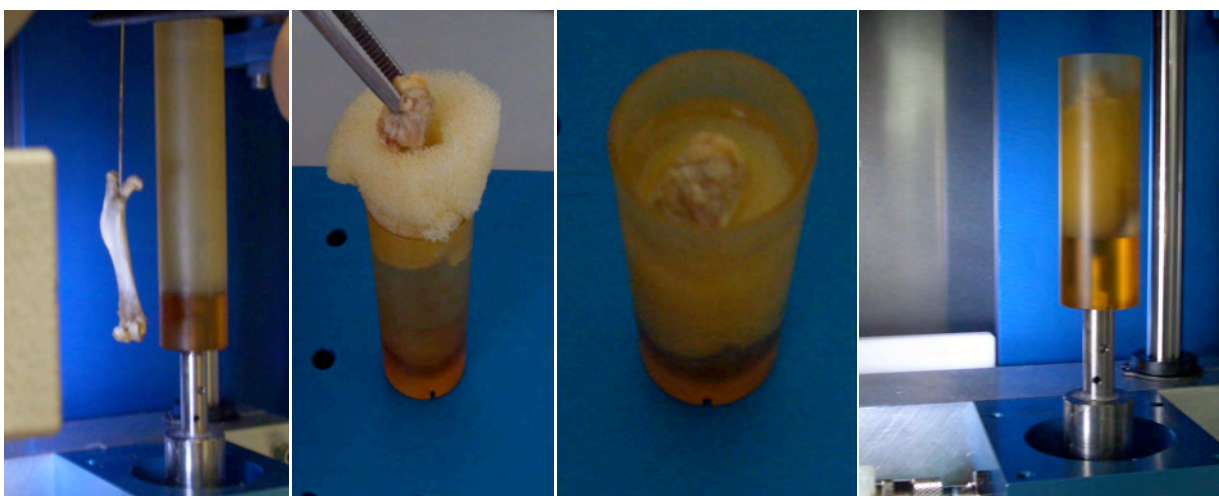


Abb. 3-6 Probe und Probenhalter

Als Vorbereitung jeder  $\mu$ CT-Aufnahme muss zunächst in der SCOUT VIEW-Darstellung (Abb. 3-7), die etwa einem herkömmlichen Röntgenbild entspricht, die Messregion durch sorgfältige Bestimmung des zu scannenden Bereichs der Probe festgelegt werden (Abb. 3-8). In unserem Fall umfasste diese in der Z-Achse 6,2 mm und damit sowohl proximal als auch distal des Frakturspaltes (nach Zentrierung auf diesen) 3,1 mm [Gabet 2004, Hao 2007, Morgan 2009, Shefelbine 2005b].



Abb. 3-7 Scout view

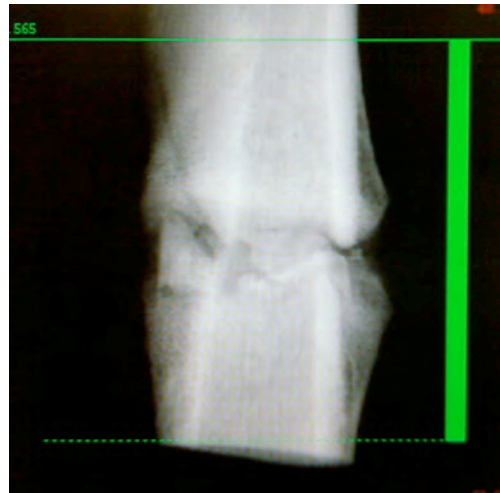


Abb. 3-8 Messregion: 6,2 mm

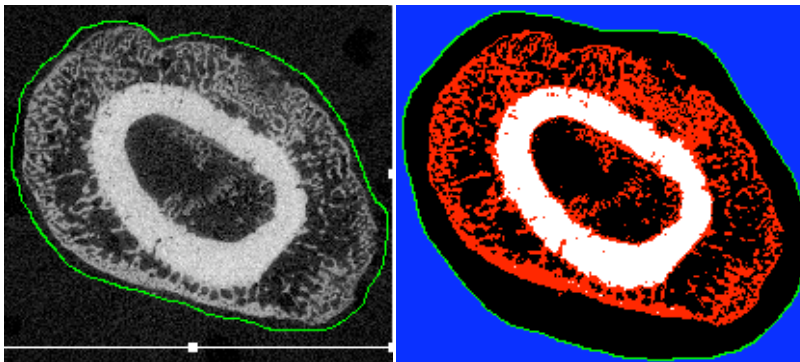
Die Scans mit einer Schichtdicke von 0,01 mm erfolgten mit „High resolution Scan Mode“ und einer Integrationszeit von 200 ms, entsprechend 1000 Projektionen pro Schicht mit jeweils 2048 Messpunkten pro Schicht über einen Winkel von  $180^\circ$  [Nazarian 2008]. Die Integrationszeit bezieht sich hier auf die Zeit, die der Detektor der eintreffenden Röntgenstrahlung pro Projektion ausgesetzt ist. Gescannt wurden immer 620 Schichten. Aufgrund der beam hardening-Effekte wurde ein Korrekturalgorithmus basierend auf einem 1200 mg HA/ccm Phantom angewendet, welches dem früher angewandten 200 mg HA/ccm Phantom überlegen sein soll [Fajardo 2009, Kazakia 2008].

Nach Rekonstruktion der Daten erfolgte die Analyse der mikrostrukturellen Parameter anhand des gewählten volume of interest (VOI), um die 3D-Auswertung zu erhalten. Dies erfolgte mit der speziellen Software IPL (Image processing language) (Scanco Medical® AG, Brüttisellen).

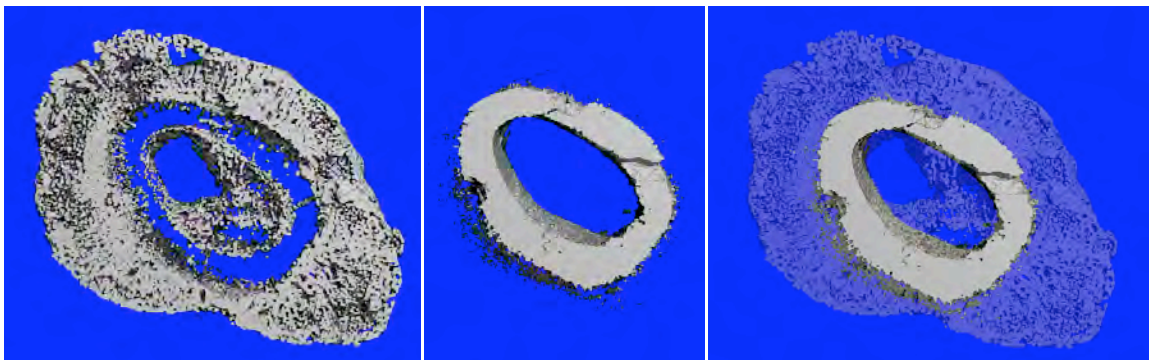
Dieses Verfahren benötigt zur Berechnung von Messungen Schwellenwerte und spezielle Filter (Sigma und Gauß – spezielle programmspezifische Rechenfunktionen zur Rauschunterdrückung), die vom Benutzer definiert werden müssen [Ding 1999,



Feldkamp 1989, Muller 1998, Ruegsegger 1996]. Wir ermittelten den optimalen Schwellenwert visuell durch zwei unabhängige Untersucher an allen Proben, um ortsständigen Knochen von Kallus (und Mark) zu trennen. Hierbei war der Unterschied in der Helligkeit der Pixel klar gegeben (Abb. 3-9). Unser unterer Schwellenwert für den Kallus lag bei 150 (pro Mille vom maximalen Grauwert), der Gauß Sigma bei 0,8 und der Gauß Support bei 1, der untere Schwellenwert für den ortsständigen Knochen bei 370, der Gauß Sigma bei 1,5 und der Gauß Support bei 3 (Abb. 3-10).



**Abb. 3-9** Ermittlung des Schwellenwertes, 2D-Bild  
 Links: Kallus und ortsständiger Knochen, Grauwertbild  
 Rechts: Kallus und ortsständiger Knochen (Kallus: rot) vollautomatisch segmentiert



**Abb. 3-10** 2-Schwellenwertverfahren, 3D-Bild  
 Links: peri- und endostaler Kallus (Schwellenwert: 150)  
 Mitte: ortsständiger Knochen (Schwellenwert: 370)  
 Rechts: Kallus und ortsständiger Knochen (Kallus: semitransparent)

Die Zugehörigkeit eines Pixels zu einem Segment wird durch den Vergleich des Grauwertes/Dichtewertes mit einem Schwellenwert bestimmt. Der Grauwert eines Pixels stellt hierbei seinen reinen Helligkeitswert dar.

Hilfreich war dabei das zugehörige Histogramm (Abb. 3-11 und Abb. 3-12 rechte Spalte), in welchem die Häufigkeit jedes Grauwertes/Dichtewertes durch eine entsprechend hohe Linie abgebildet ist. Unterhalb sind die verschiedenen Dichtewerte (mg HA/ccm) bzw. Grauwerte (dimensionslos) abgebildet, wobei oberhalb durch die

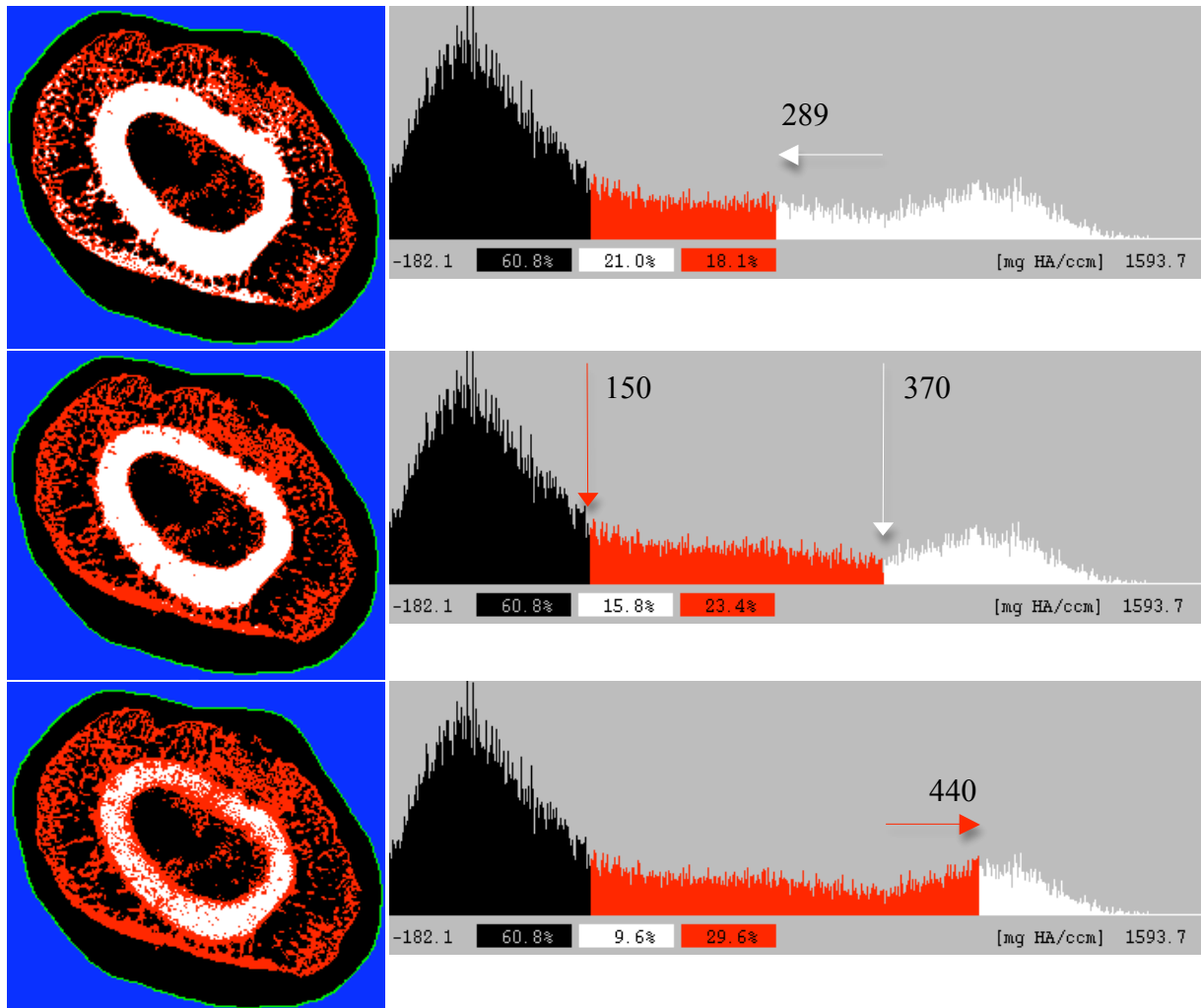
Höhe der Linie die relative Häufigkeit des jeweiligen Dichtewertes/Grauwertes dargestellt ist.

Im Histogramm sind deutlich drei Bereiche zu erkennen: Der dunkle Bereich (linkes Maximum), welcher Luft bzw. Mark repräsentiert, der rote Bereich (mittleres Plateau), welcher Kallusknochen verkörpert, und der helle Bereich (rechtes Maximum), welcher den ortsständigen Femurknochen darstellt. Lokale Maxima weisen auf Grauwertbereiche hin, die von (größeren) Objekten oder vom Hintergrund erzeugt werden. Jeder Grauwert kommt im Bild vor, d.h. die Pixel nehmen schrittweise die verschiedenen Graustufen von Weiß bis Schwarz an. Bei der bildlichen Darstellung wurden alle Pixel mit Grauwerten größer als der Schwellwert eingefärbt, d.h. alle Pixel mit Grauwerten größer oder gleich 150 rot, größer oder gleich 370 weiß und unter 150 schwarz.

Zur Darstellung des Verfahrens wurden sowohl ortsständiger Knochen (Abb. 3-11) als auch Kallus (Abb. 3-12) für drei verschiedene Schwellenwerte segmentiert. In den resultierenden Bildern mit je drei Segmentgruppen wurde wiederum jeder Pixel entsprechend seiner Zuordnung (1.) zum ortsständigen Knochen (weiß), (2.) zum Kallus (rot) oder (3.) zum Mark/Luft (schwarz) eingefärbt.

In der ersten Zeile der Abb. 3-11 wurde der Schwellenwert für das Segment des ortsständigen Knochens zu niedrig gewählt (289). Daraus resultierend vergrößert sich der Bereich der Pixel, welche (falsch positiv) zum ortsständigen Knochen segmentiert werden. Diese werden dem roten Segment Kallus entnommen, welches zu klein erscheint. Dies ist deutlich in der oberen Zeile links zu erkennen, in der sich im Bereich des roten Kallus (fälschlicherweise) weiße Kortikalisnester befinden. In der mittleren Zeile ist der Schwellenwert dargestellt, in der sich Kallus optimal von ortsständigem Knochen und Luft abgrenzt (vgl. Abb. 3-9). In der unteren Zeile haben wir den Schwellenwert zu hoch (440) gewählt. Dadurch werden dem ortsständigen Knochen zugehörige Pixel rot eingefärbt, also fälschlicherweise zum Kallus segmentiert (rote Inseln im Bereich der Kortikalis, welche das Kallusvolumen erhöhen).





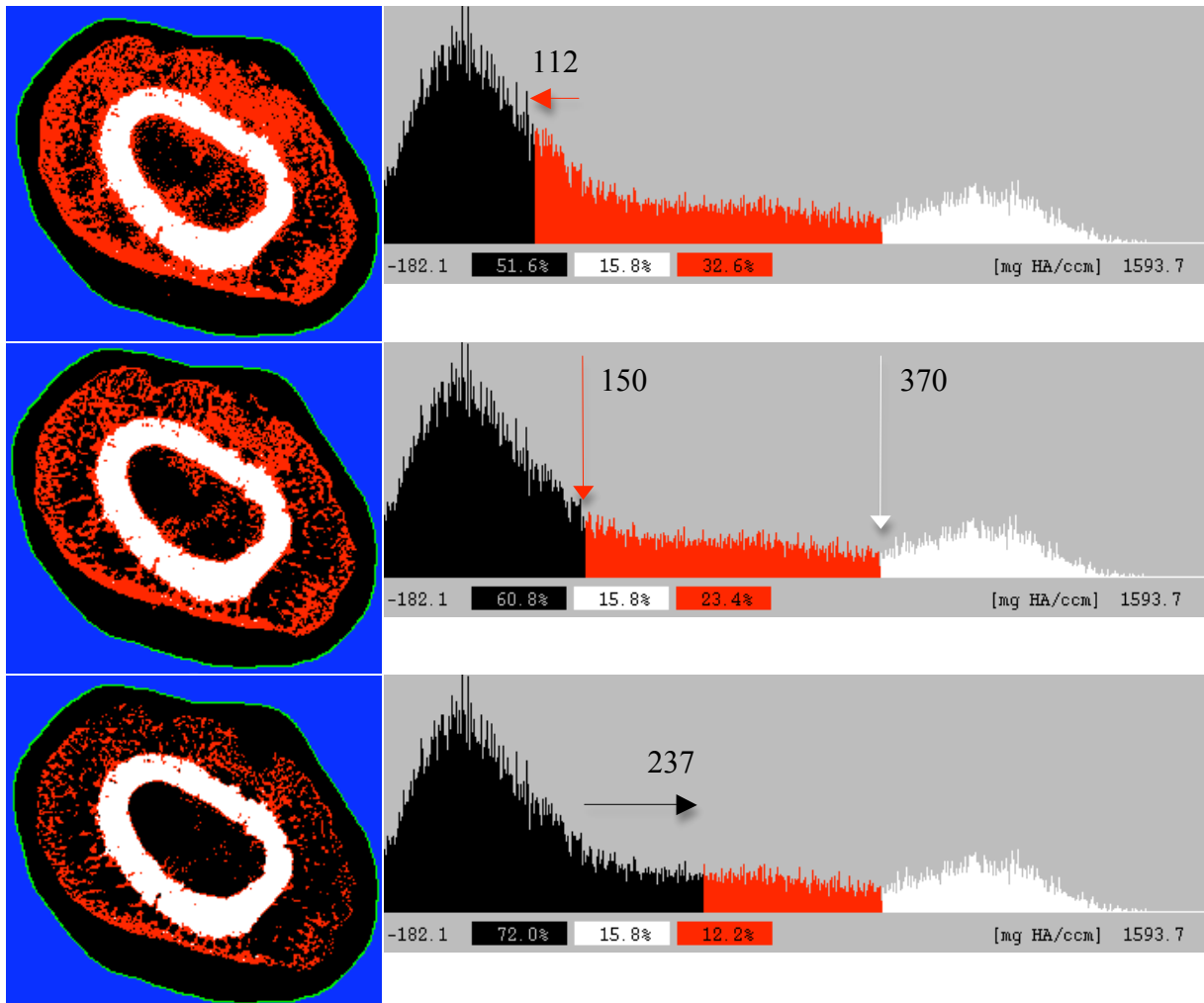
**Abb. 3-11 Ermittlung des Schwellenwertes für den ortständigen Knochen**

**Oben: Schwellenwert: 289 > zu niedrig**

**Mitte: Schwellenwert Kallus: 370 > korrekt**

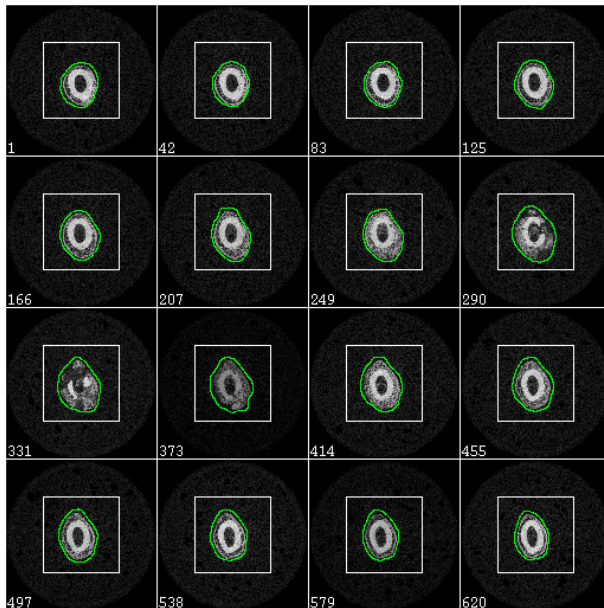
**Unten: Schwellenwert: 440 > zu hoch**

In der ersten Zeile der Abb. 3-12 wurde der Schwellenwert für den Kallusbereich zu niedrig gewählt (112). Daraus resultierend vergrößert sich die Anzahl der Pixel, welche (falsch positiv) zum Kallus segmentiert werden. Diese werden dem schwarzen Segment Mark/Luft entnommen, welches zu klein erscheint. Dies ist deutlich in der oberen Zeile links zu erkennen, in welcher der Kallusbereich (fälschlicherweise) röter erscheint, wodurch der Mark-, Luftraum kleiner wird. In der mittleren Zeile ist als Vergleich der optimale Schwellenwert (150) dargestellt (vgl. Abb. 3-9). In der unteren Zeile haben wir einen Schwellenwert von 237 gewählt, wodurch dem Kallus zugehörige Pixel schwarz gefärbt werden, also teilweise zum Luft-, Markraum segmentiert. Dadurch würde sich das Kallusvolumen erniedrigen („luftiger“ Kallus). Der Schwellenwert wurde also zu hoch gewählt.



**Abb. 3-12** Ermittlung des Schwellenwertes für den Kallus  
 Oben: Schwellenwert: 112 > zu niedrig  
 Mitte: Schwellenwert Kallus: 150 > korrekt  
 Unten: Schwellenwert: 237 > zu hoch

Somit haben wir ein Skript zur Verfügung, welches vollautomatisch den Knochen detektiert und gleichzeitig Kallus von ortsständigem Knochen trennt, ohne für jede Struktur getrennte regions of interest (ROIs) zeichnen zu müssen (vollautomatisches Zweiswellenwertverfahren) (Abb. 5-3). Innerhalb der 620 Schichten mussten dabei nur etwa 16 äußere ROIs gezeichnet werden, dazwischen wurde interpoliert (Abb. 3-13).



**Abb. 3-13 ROIs**

Folgende nicht volumenabhängige Parameter (als metrische Merkmale) wurden bestimmt:

Bone volume (BV); tissue mineral density (TMD) = material density = bone tissue density = degree of mineralisation; bone mineral content (BMC), definiert als  $BV \times TMD$ ; trabecular thickness (Tb. Th.); degree of anisotropy (DA); bone surface (BS); structure model index (SMI);

#### **Bone Volume Fraction (BV/TV):**

BV = bone volume (hier: Kallusvolumen) in  $\text{mm}^3$ , abhängig vom Schwellenwert (Helligkeit der Voxel); BV/TV = Verhältnis des Volumens des Knochens (BV) zum gesamten Volumen (TV) innerhalb der untersuchten Probe = Knochenvolumenanteil in % [Goulet 1994]. Von der American Society of Bone and Mineral Research anerkannte Definition [Amling 1996, Parfitt 1987].

#### **Tissue Mineral Density (TMD):**

Die TMD stellt den Grauwert nur vom Segmentierten (schwellenwertabhängig), also nur vom Material (Knochen) dar.

Die Knochendichtemessung wurde mittels eines 5-stufigen Hydroxylapatit-Phantoms in aufsteigender Konzentration (0,0/99,4/199,3/399,9/802,0  $\text{mg HA/cm}^3$ ) kalibriert, wobei die Umrechnung in den Knochendichtewert ( $\text{g/cm}^3$ ) anhand des jeweiligen

Hounsfield-Unit-Wertes erfolgte (Abb. 3-14). Das Ziel war hierbei die Bestimmung der Knochendichte.

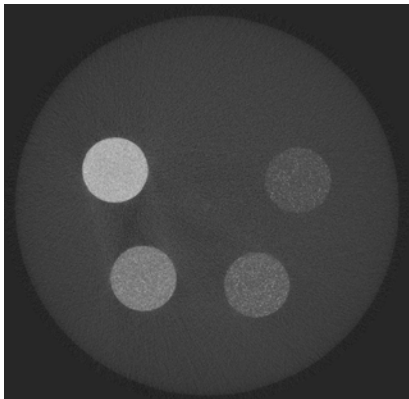


Abb. 3-14 Hydroxylapatitprüfkörper

### **Bone Mineral Content (BMC):**

Wird definiert als  $BV \times TMD$  in mg, wobei für die von jeder Oberfläche ausgeschlossenen zwei Pixel die gleiche Dichte angenommen wird [Morgan 2009].

### **Trabecular Thickness (Tb. Th.):**

Messung der durchschnittlichen Trabekeldicke, bzw. der Voxel innerhalb der Probe, welche dem Knochen zugeordnet werden. Hierbei wird für jeden Punkt der Durchmesser eines maximalen Kreises, der noch innerhalb der Struktur liegt und den Punkt einschließt, ermittelt (Abb. 3-15) [Tamada 2005]. Der Durchmesser stellt die lokale Dicke an diesem Punkt dar. Dieser nicht volumenabhängige Parameter wird in mm angegeben [Goulet 1994].

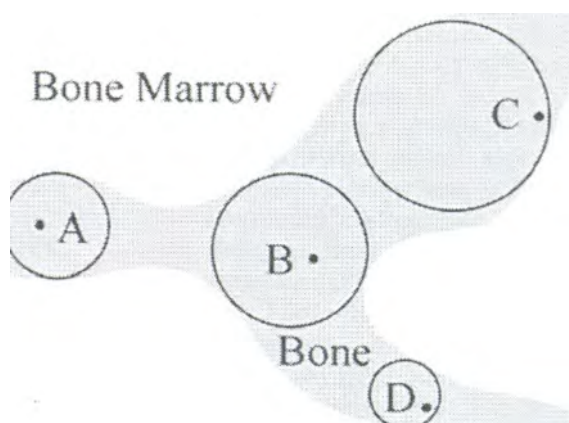


Abb. 3-15 Bestimmung der lokalen Trabekeldicke

### **Degree of Anisotropy (DA):**

Der nicht volumenabhängige, rein dreidimensionale Parameter Anisotropie be-

schreibt die vorherrschende räumliche Ausrichtung der Trabekel innerhalb des Knochens dimensionslos. Der Grad der Anisotropie ist umso höher, je stärker die Ausrichtung der Trabekel in eine bestimmte Richtung ist. 1 = isotrop, d.h., es liegt keine Vorzugsrichtung vor. Je höher der Wert, desto mehr liegt eine Orientierung in eine bestimmte Richtung vor. Quantifiziert wird dieser Parameter mit Hilfe der Mean Intercept Length für trabekulären Knochen (MIL-Methode) nach Whitehouse [Whitehouse 1974] und Odgaard [Odgaard 1997].

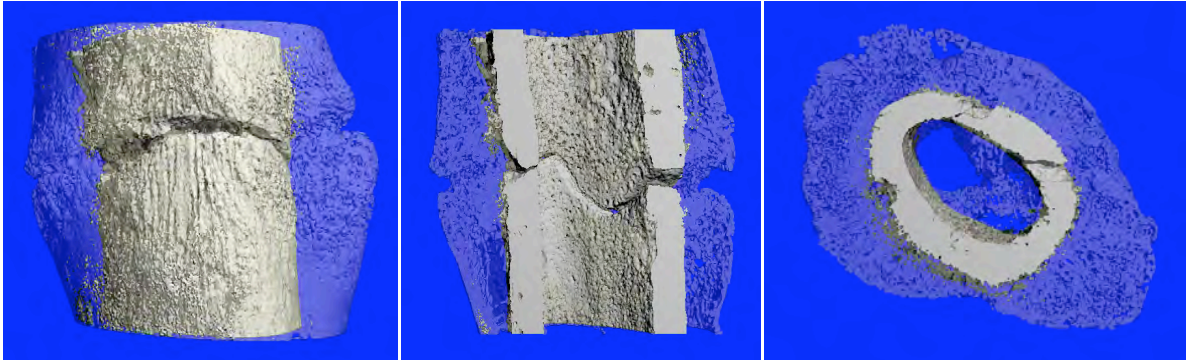
### **Bone Surface to Volume Ratio of Bone (BS/BV):**

Der Parameter BS/BV gibt das Verhältnis der Oberfläche des Knochens (BS) zum Volumen des Knochens (BV) mit der Einheit  $\text{mm}^{-1}$  wieder [Goulet 1994]. Als Bone surface (BS) in  $\text{mm}^2$  stellt er die unabhängige/nicht volumenabhängige Knochenoberfläche dar.

### **Structure Model Index (SMI):**

Der SMI ist dimensionslos, nicht volumenabhängig und wurde von Hildebrand und Rüegsegger 1997 vorgestellt. Er besagt, ob in einer Probe die stabförmigen oder die plattenförmigen Trabekel überwiegen. Dieser Parameter liegt bei 0 für eine ideale Plattenstruktur, für eine ideale Stabstruktur beträgt der Wert 3 und bei einem realen Trabekelnetzwerk mit Übergangsformen befindet er sich inmitten beider Werte. Bei Proben gleicher Knochendichte kann demnach trotzdem eine unterschiedliche Trabekelstruktur vorherrschen, was durch den SMI dargestellt werden kann. Er ist unabhängig von der Dicke der Trabekel [Hildebrand 1997], wobei eine plättchenförmige Struktur stabiler als die stäbchenförmige gilt [Bevill 2006], so dass man hier auch auf die Belastungssituation rückschließen kann. Er kann auch negative Werte bis -1 annehmen, was für eine extrem dichte, konkave plattenförmige Struktur spricht. Zudem korreliert er mit BV/TV (Platte = hohes BV/TV, Stab = niedriges BV/TV).

In der anschließenden optischen Wiedergabe der Messungen wurde zur Differenzierung des Kallus vom ortsständigen Knochen eine farbkodierte 3D-Dichtedarstellung gewählt, welche auf der Helligkeitsverteilung der Voxel basiert. Dabei stellt sich ortsständiger, höher mineralisierter Knochen hell/weiß dar, während sich neu gebildeter, wenig mineralisierter Kallus mit erhöhter Transluzenz blau darstellt (Abb. 3-16).



**Abb. 3-16**  $\mu$ Ct, 3D-Rekonstruktion, semitransparente Darstellung des Kallus

Links: Übersicht

Mitte: coronar median

Rechts: axial

Die VOI-Daten wurden auf Harddisk/Magnetband gespeichert und können mit den Messdaten erneut geladen werden.

### 3.2.3 Histologie

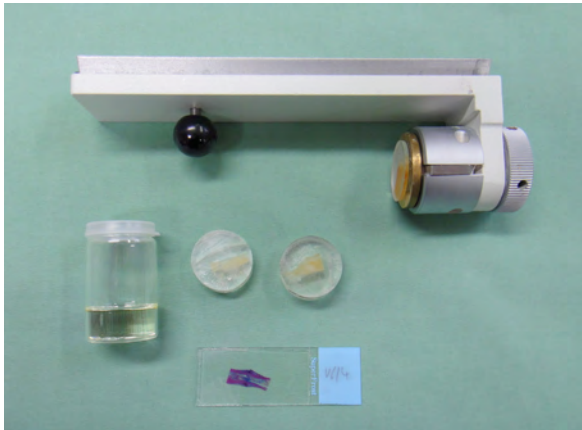
Zur Vorbereitung der Einbettung wurden die explantierten Femora proximal und distal um den ehemaligen Defektbereich herum mit einer Mikrosäge verkleinert, so dass sie liegend in Rollrandgläser/Einbettgläschen mit den Maßen 50 x 30 x 1 mm passten (Abb. 3-17).

In den zuvor genannten Gläsern wurden die Knochen für 48 Stunden in 100% Methanol bei 4 Grad fixiert, mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe vollständig entwässert und über Aceton in MMA-Monomer und MMA-Einbettgemisch überführt. Das Einbettgemisch wurde 1 Mal gewechselt, und die Proben bei 27 Grad im Wasserbad polymerisiert (Tab. 3-2).

Tag	Medien
1-2.	100% Methanol.
3.	70% ETOH, abends 80% ETOH
4.	90% ETOH
5-6.	100% ETOH
7-8.	Aceton (reinst)
9-12.	Einlegen in MMA (Vakuum)
12-15.	Wechsel des MMA (Vakuum)
15-22.	Einbettgemisch (Vakuum): 100 ml MMA, 25 ml Plastoid, 3,5 g Benzoylperoxid
22.	Erneuerung des Einbettgemisches (Vakuum) Wasserbad
ab 23.- 24.	Polymerisation im Wärmeschrank
25.	Aushärten im Brutschrank (37 Grad Celsius)
ab 27.	Anfertigung der Schliifpräparate
<b>Tab. 3-2 MMA-Einbettverfahren</b>	



Nach Aushärtung wurde das Glasgefäß zerschlagen, die MMA-Blöcke freigelegt, gesäubert und anschließend mit einer Bandsäge zugeschnitten (Abb. 3-17). Dabei wurde entsprechend der vorher aufgezeichneten Hilfslinien darauf geachtet, parallel zum Schaft des eingebetteten Knochens zu schneiden. Dann wurden die Zylinder mit Cyanolit-Kleber auf die Probenhalter des Leica® SP 1600 Sägemikrotoms (=Innenlochsäge) (Abb. 3-18) geklebt.



**Abb. 3-17 Ablauf Histologie**  
Einbettgläschen, zugeschnittene Zylinder, aufgeklebte Probe in Halterung der Innenlochsäge, eingedeckte Probe



**Abb. 3-18 Innenlochsäge Leica® SP1600**

Mit Hilfe der Innenlochsäge wurden  $100 \pm 20 \mu\text{m}$  dicke sagittale Schnitte der jeweiligen unentkalkten Femora angefertigt [Donath 1982]. Zur Differenzierung des neu gebildeten Kallus vom ortständigen Knochen wurden diese Schnitte mit der Färbung nach Lazcko-Levai flotierend gefärbt, welche es erlaubt, verschiedene Mineralisationsgrade des Knochens voneinander zu unterscheiden [Fritsch 1989, Jenó 1975] (Tab. 3-3).

Folgende zwei Lösungen wurden vorab auf 500 ml Gesamtmenge angesetzt und vor jedem Gebrauch neu filtriert:

**Farblösung A:**

0,25 g Azur II (Fa. Merck) und 0,25 g Methylenblau (Fa. Merck) in 100 ml 0,5% Soda

**Farblösung B:**

0,5 g basisches Fuchsin (Fa. Serva) in 100 ml Aqua dest.

Schritt	Medien/Ablauf
1.	Abwischen der Schnitte mit 100% Ethanol
2.	Anätzen mit 0,1% Ameisensäure (2-5 Minuten)
3.	Abspülen mit H <sub>2</sub> O
4.	Lösung "A" (doppelt filtrieren) 3-5 Minuten
5.	Spülen in 0,5% Natriumcarbonat
6.	Farblösung "B" 2-5 Minuten
7.	Differenzieren in 0,5% Natriumcarbonat (60 Minuten)
8.	Schliff trocknen und differenzieren mit 96%igem Alkohol (CAVE! Je nach Farbtintensität wird Farbe ausgewaschen). Kurz abtupfen!
9.	Schnitte circa 5 Tage pressen, Deckglaseindeckung
<b>Tab. 3-3 Protokoll Laczko-Levai-Färbung</b>	

Im Anschluss wurden die Schnitte auf Glasobjektträger aufgebracht und mittels Deckgläsern und Eukitt eingedeckt (Abb. 3-17). Für die Übersichtsaufnahmen wurde ein Wild® Makroskop M3Z (Fa. Wild, Heerbrugg, Schweiz) in Lupenfunktion verwendet. Die detaillierten Aufnahmen wurden mit dem Mikroskop Nikon Eclipse 50i (Fa. Nikon, Düsseldorf, Deutschland) und der Videokamera AxioCam HRc (Fa. Carl Zeiss®, Jena, Deutschland) digitalisiert (Vergrößerung 10x). Die histomorphometrische Auswertung der Proben, d.h. der einzelnen 100 µm-Schnitte, erfolgte mit Hilfe des computergestützten Bildanalyse systems Axiovision 4.8 (Fa. Carl Zeiss, Jena, Deutschland). Getrennt berücksichtigt wurden dabei die Bereiche periostaler Kallus, endostaler Kallus sowie der Frakturspalt. Untersucht wurde semiquantitativ, ob sich in den jeweiligen Bereichen Knorpel, Bindegewebe oder neugebildeter Knochen zeigte. Des Weiteren wurde untersucht, ob der Frakturspalt beidseits knöchern überbrückt war oder nicht. Hierbei musste nicht die ganze Kortikalbreite (beider Seiten) überbrückt sein, was zu diesem Zeitpunkt noch nicht zu erwarten war. Dafür wurden die beiden zentralsten Schnitte herangezogen.

### 3.2.4 Biomechanik

Die Femora der Tiere der Gruppe B wurden der biomechanischen Untersuchung zugeführt. Um sicherzustellen, dass die Knochen ihre biomechanischen Eigenschaften nach der Entnahme nicht mehr veränderten, erfolgte post explantationem die sofortige Überführung der Proben in ein Tube und ihre Lagerung bei -20°C auf Trockeneis. Die Kühlkette wurde bis unmittelbar vor Durchführung des 3-Punkt-Biegeversuchs nicht unterbrochen. Nach dem Auftauen konnten visuell keine sichtbaren Schäden ausgemacht werden. Haaren et al. wiesen nach, dass Tiefgefrieren die biomechanischen Eigenschaften des Knochens nicht negativ beeinflusst [van Haaren 2008], so dass angenommen werden konnte, dass die gewonnenen Daten denen eines vitalen



Knochens entsprachen. Die Proben wurden während der Testungen ab dem Auftauen feucht gehalten, und der Kirschner-Draht vor den Testungen sorgfältig entfernt [Chu 2007].

Der 3-Punkt-Biegeversuch wurde in der Abteilung für Biomechanik der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie des Klinikums Rechts der Isar mittels der Materialprüfmaschine Wolpert TZZ 707/386 (Istron Wolpert GmbH, Darmstadt, Deutschland, Abb. 3-19) mit dem Prüfmittel KM-08, 50kN, durchgeführt [Turner 1993]. Die Ausrichtung der Femora erfolgte mit Krafteinwirkung auf Höhe des Frakturspaltes [Schmidhammer 2006], wobei die Auflagen immer 15 mm Abstand hatten (Abb. 3-20).



Abb. 3-19 Wolpert TZZ 707/386

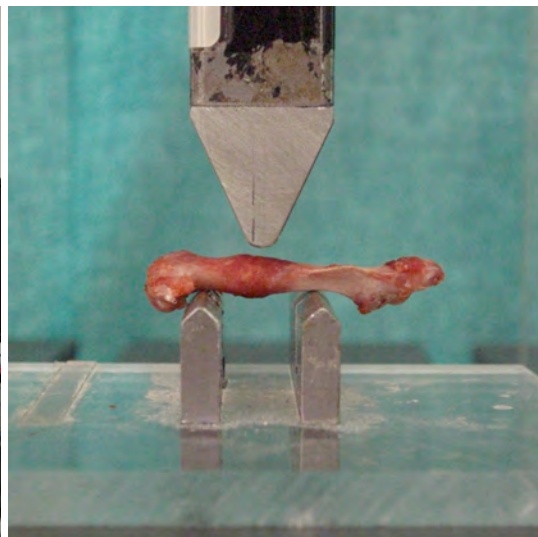


Abb. 3-20 Biegeversuch

Der Biegeversuch wurde unter konstantem Vorschub von 5 mm/min bei kontinuierlicher Kraftmessung [N] durchgeführt. Als Abbruchkriterium wurde ein Kraftabfall von  $>50$  N definiert. Bruchkriterium war ein Kraftabfall von 80%. Während dieses Vorganges wurde über einen Computer ein Kraft-Weg-Diagramm aufgezeichnet, welches typischerweise einen ansteigenden Graph mit Spitze und plötzlichem Kraft-/Wegabfall darstellt (Abb. 3-21). Aus den aufgezeichneten Daten können die maximale Kraft, welche auf den Knochen gewirkt hat ( $F_{max}$  in N; bei spröden Materialien wie der Kortikalis entspricht die  $F_{max}$  auch der Versagenslast) sowie die Steifigkeit (in N/mm) abgelesen oder berechnet werden. Letztere ließ sich aus der Steigung des Kraft-Weg-Diagramms ermitteln [Zhou 2009].

Um individuelle Unterschiede in den biomechanischen Eigenschaften auszuschließen, wurden die Daten zusätzlich als Prozentwert ( $F_{max}$  relativ bzw. Steifness relativ)

zur gegenüberliegenden, nicht frakturierten Femurseite (Fmax Kontrolle bzw. Stiffness Kontrolle) angegeben [Schmidmaier 2004].

Die Messdaten wurden mit dem Programm Test&Motion (DOLI Elektronik GmbH, München, Deutschland) erhoben. Gemessen wurden alle Femora der Versuchsseite aller 4 Gruppen, sowie zur Überprüfung der Knochenqualität die Femora der Gegenseite.

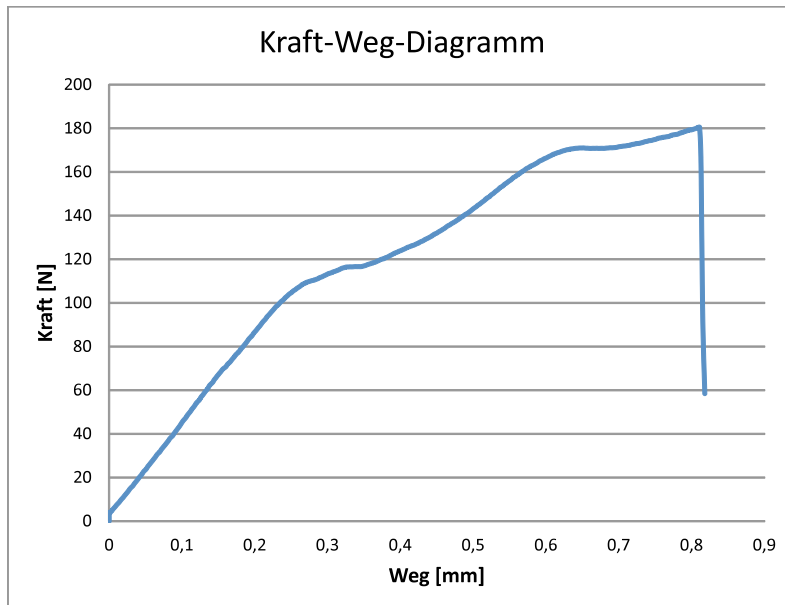


Abb. 3-21 Kraft-Weg-Diagramm

### 3.2.5 Statistische Auswertung

Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (MW  $\pm$  SD) wurden als deskriptive Statistiken zur Beschreibung der Verteilung stetiger Daten verwendet. Vergleiche zwischen den Studiengruppen hinsichtlich der mittleren Datenlage wurden mit Hilfe von zweiseitigen t-Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt. Alle Tests erfolgten explorativ auf einem Signifikanzniveau von 5%.

Zur Speicherung und Archivierung der ermittelten Daten sowie einfacher Berechnungen wurde das Programm Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) verwendet. Die statistische Auswertung und Erstellung der Graphen erfolgte mittels der Statistikprogramme SPSS (Version 19.0, SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) und GraphPad Prism Version 4.00 (GraphPad Prism Software® San Diego, USA). Letzteres diente insbesondere der graphischen Darstellung.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ein- und Ausschlüsse

71% (n = 64) der Tiere konnten in die Studie einbezogen werden. Es zeigten sich keine Infektion, Gewichtsabnahme  $\geq 5\%$  oder beeinträchtigende Schwellung. 29% (n = 26) mussten aufgrund verschiedener Komplikationen ausgeschlossen werden (keine Fraktur, Trümmerfraktur, Schrägfraktur, intraoperative Komplikation bzw. falsche Lokalisation der Fraktur) (Abb. 4-1).

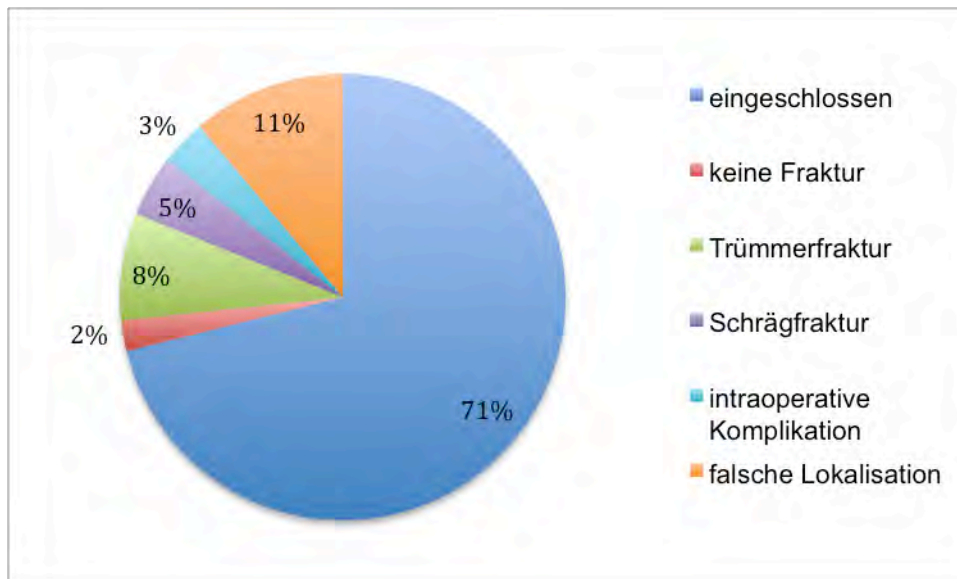


Abb. 4-1 Anzahl der Ein- und Ausschlüsse [%]

### 4.2 Serumspiegel

In der Cephalosporin-, Diclofenac- und Prednisolongruppe waren die Medikamente im jeweiligen Zielbereich nachweisbar (Durchschnittswerte) (Tab. 4-1).

Gruppe	Norm	1. Abnahme	2. Abnahme
Cephalosporin [ $\mu\text{g/ml}$ ]	2 - 20	3,07	5,65
Diclofenac [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0,1 - 2,5	1,34	2,33
Prednisolon [ $\text{ng/ml}$ ]	30 - 400	94,05	40,01

Tab. 4-1 Medikamentenspiegel

### 4.3 $\mu$ CT

Durch die vollautomatische Zweisehwellenwertmethode haben wir ein Skript zur Verfügung, welches vollautomatisch den Knochen detektiert und gleichzeitig Kallus von ortsständigem Knochen trennt, ohne für jede Struktur getrennte regions of interest (ROIs) zeichnen zu müssen (vollautomatisches Zweisehwellenwertverfahren) (Abb. 5-3). Es mussten dabei nur etwa 16 äußere ROIs gezeichnet werden, dazwischen wurde interpoliert (Abb. 3-13). Somit ergab sich eine enorme Zeitersparnis und Minimierung der Fehlerquote.

#### 4.3.1 Volumen

Die Bestimmung des Knochenvolumens (BV) stellt die initiale Basisuntersuchung jeder  $\mu$ CT-Untersuchung dar. BV ist der objektivste Parameter zur Bestimmung des tatsächlichen, d.h. absoluten Kallusvolumens (peri- und endostal) abzüglich umliegender Luft und Weichgewebe und ermöglicht damit den objektiven Vergleich zwischen den einzelnen Therapie- und Kontrollgruppen (Tab. 4-2 und Abb. 4-2).

Mittels T-Test für unverbundene Stichproben unterschieden sich die Werte der Kontrollgruppe (K) nur zur Diclofenacgruppe (D) signifikant. Die Prednisolongruppe (P) zeigte das höchste Kallusvolumen (73,79), welches signifikant höher war als das der Cephalosporin- (C) und Diclofenacgruppe (Tab. 4-2). In der Diclofenac- und der Prednisolongruppe zeigten sich Ausreißer, welche Mittelwert (Mean = MW) und Standardabweichung (SD) der jeweiligen Gruppe stark beeinflussten (dennoch lag Normalverteilung vor). Die Cephalosporingruppe zeigte die geringste Standardabweichung (Abb. 4-2).

		Mean $\pm$ SD		Mean difference (95%-CI)	p-value
BV	C	55,35 $\pm$ 6,74	C vs D	8,30 (-6,63 – 23,24)	0,238
	D	47,05 $\pm$ 15,67	C vs P	-18,44 (-36,58 – -0,30)	0,047*
	P	73,79 $\pm$ 17,23	C vs K	-11,84 (-27,64 – 3,97)	0,120
	K	67,19 $\pm$ 14,90	D vs P	-26,74 (-47,15 – -6,33)	0,015*
			D vs K	-20,14 (-38,86 – -1,42)	0,037*
			P vs K	6,60 (-14,17 – 27,38)	0,494

Tab. 4-2  $\mu$ Ct, Volumen: MW, SD, mittlere Differenz, 95%-CI der Differenz und Signifikanz

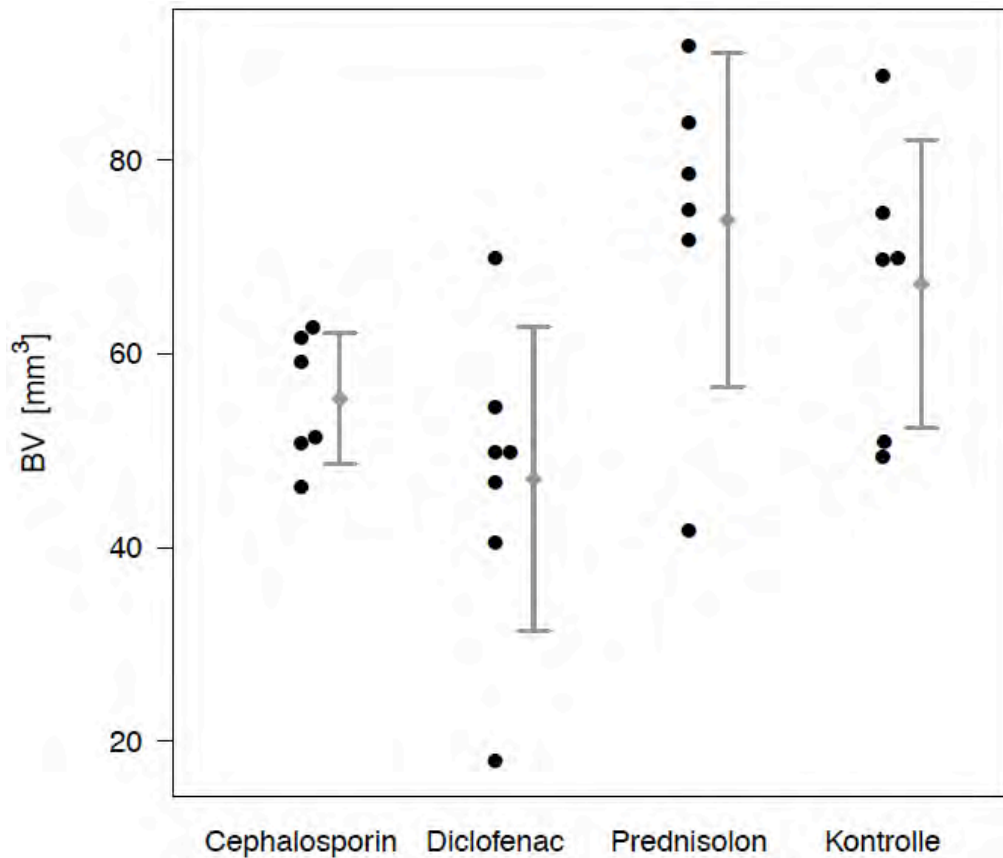


Abb. 4-2  $\mu$ Ct, Volumen: Einzelwertverteilung, MW und SD

#### 4.3.2 Dichte

Wir bestimmten zusätzlich die Knochendichte (TMD) des Kallus als ein Kriterium für die Stabilität und somit Qualität des neu gebildeten Knochens. Dieser schwellenwertabhängige Parameter berücksichtigt weder umliegende Luft noch Weichgewebe. Es zeigten sich in Bezug auf MW und SD mit Ausnahme der SD von Diclofenac (wieder ein Ausreißer) sehr homogene Gruppen, welche sich nicht signifikant unterschieden (Tab. 4-3 und Abb. 4-3).

		Mean $\pm$ SD		Mean difference (95%-CI)	p-value
TMD	C	647,87 $\pm$ 13,01	C vs D	-0,24 (-49,41 – 48,93)	0,991
	D	648,10 $\pm$ 52,91	C vs P	5,80 (-9,25 – 20,86)	0,408
	P	642,06 $\pm$ 9,99	C vs K	12,38 (-5,59 – 30,35)	0,155
	K	635,48 $\pm$ 14,81	D vs P	6,04 (-42,99 – 55,08)	0,776
			D vs K	12,62 (-36,68 – 61,92)	0,565
			P vs K	6,58 (-9,98 – 23,14)	0,391

Tab. 4-3  $\mu$ Ct, Dichte: MW, SD, mittlere Differenz, 95%-CI der Differenz und Signifikanz

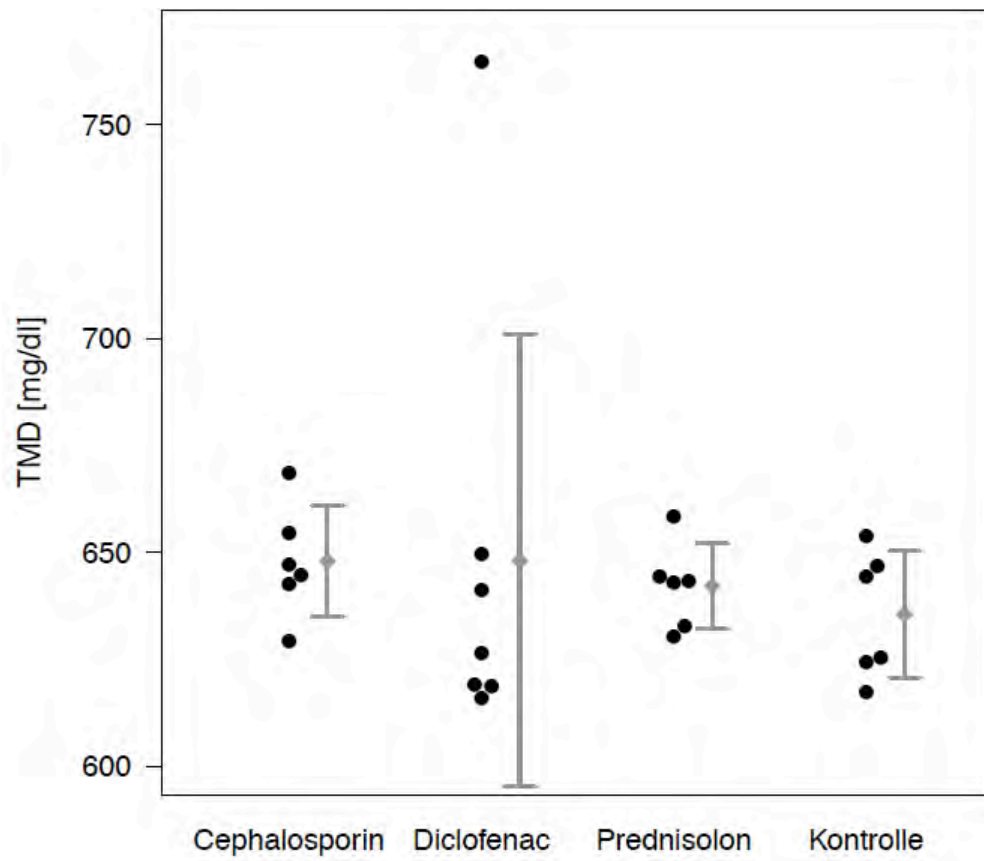


Abb. 4-3  $\mu$ Ct, Dichte: Einzelwertverteilung, MW und SD

### 4.3.3 Masse

Die Masse (BMC: Bone mineral content) setzt sich aus Dichte x Volumen zusammen.

BMC zeigte zu BV analoge Signifikanzen und ‚Trends‘ (Tab. 4-4 und Abb. 4-4).

		Mean $\pm$ SD		Mean difference (95%-CI)	p-value
BMC	C	35,84 $\pm$ 4,20	C vs D	5,82 (-3,33 – 14,97)	0,182
	D	30,01 $\pm$ 9,58	C vs P	-11,45 (-22,78 – -0,11)	0,048*
	P	47,28 $\pm$ 10,76	C vs K	-6,70 (-15,88 – 2,48)	0,129
	K	42,54 $\pm$ 8,61	D vs P	-17,27 (-29,92 – -4,61)	0,012*
			D vs K	-12,52 (-23,63 – -1,41)	0,031*
			P vs K	4,75 (-7,87 – 17,36)	0,420

Tab. 4-4  $\mu$ Ct, Masse: MW, SD, mittlere Differenz, 95%-CI der Differenz und Signifikanz

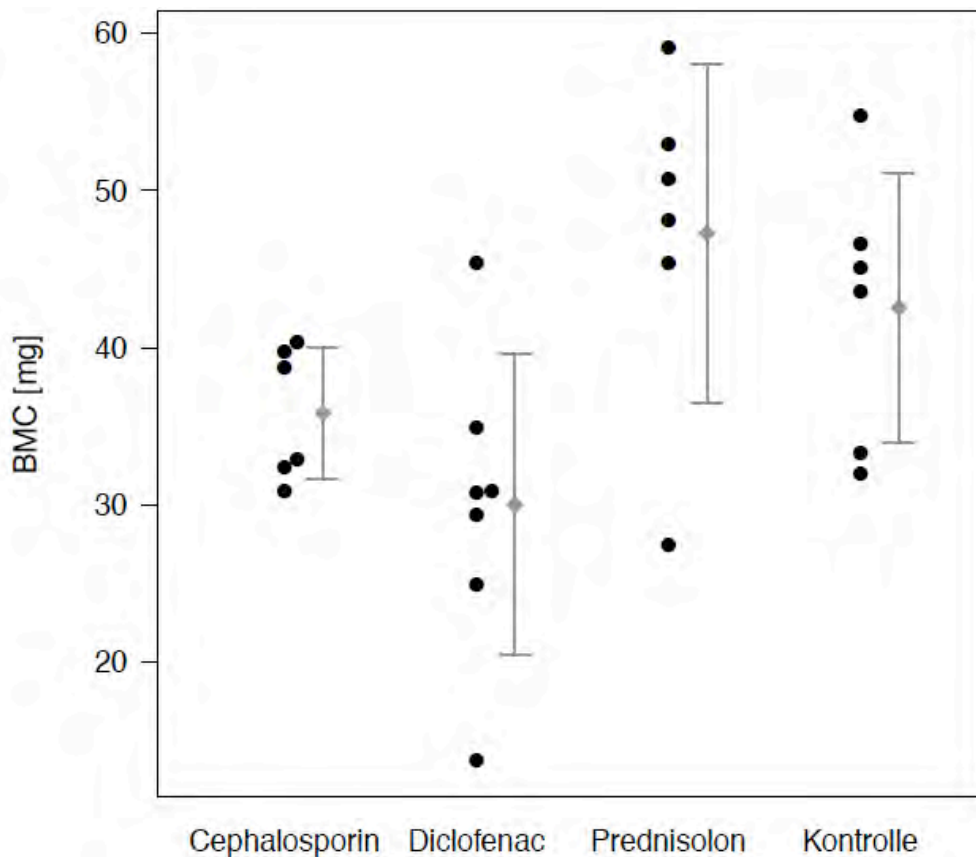


Abb. 4-4  $\mu$ Ct, Masse: Einzelwertverteilung, MW und SD

#### 4.3.4 Strukturparameter

Strukturparameter dienen der einheitlichen Beschreibung und Quantifizierung der Mikroarchitektur untersuchter Objekte (Tab. 4-5).

		Mean $\pm$ SD		Mean difference (95%-CI)	p-value
SMI	C	-0,24 $\pm$ 0,46	C vs D	-0,32 (-1,06 – 0,41)	0,352
	D	0,08 $\pm$ 0,72	C vs P	1,06 (0,26 – 1,86)	0,015*
	P	-1,30 $\pm$ 0,72	C vs K	1,06 (0,26 – 1,86)	0,969
	K	-0,22 $\pm$ 1,01	D vs P	1,38 (0,50 – 2,27)	0,006*
			D vs K	0,30 (-0,81 – 1,42)	0,553
			P vs K	-1,08 (-2,22 – 0,06)	0,062
	DA	C	1,17 $\pm$ 0,04	C vs D	0,02 (-0,03 – 0,07)
D		1,15 $\pm$ 0,03	C vs P	0,00 (-0,06 – 0,05)	0,841
P		1,17 $\pm$ 0,04	C vs K	-0,01 (-0,07 – 0,05)	0,743
K		1,18 $\pm$ 0,05	D vs P	-0,02 (-0,07 – 0,02)	0,258
			D vs K	-0,03 (-0,08 – 0,02)	0,258
			P vs K	0,00 (-0,06 – 0,05)	0,877
BS	C	1369,01 $\pm$ 163,86	C vs D	86,83 (-199,08 – 372,75)	0,513
	D	1282,18 $\pm$ 288,17	C vs P	-249,79 (-670,52 – 170,94)	0,201
	P	1618,80 $\pm$ 398,72	C vs K	-267,82 (-630,86 – 95,21)	0,125
	K	1636,83 $\pm$ 340,78	D vs P	-336,62 (-779,83 – 106,59)	0,120
			D vs K	-354,66 (-748,85 – 39,54)	0,073
			P vs K	-18,04 (-496,72 – 460,65)	0,935
Tb. Th.	C	0,095 $\pm$ 0,004	C vs D	0,001 (-0,003 – 0,006)	0,521
	D	0,094 $\pm$ 0,003	C vs P	-0,004 (-0,010 – 0,003)	0,238
	P	0,099 $\pm$ 0,006	C vs K	-0,003 (-0,007 – 0,001)	0,116
	K	0,098 $\pm$ 0,003	D vs P	-0,005 (-0,011 – 0,001)	0,114
			D vs K	-0,005 (-0,008 – -0,001)	0,023*
			P vs K	0,000 (-0,006 – 0,007)	0,878

Tab. 4-5  $\mu$ Ct, Strukturparameter: MW, SD, mittlere Differenz, 95%-CI der Differenz und Signifikanz



Der **Structure Model Index (SMI)** als dimensionsloser Parameter beschreibt die Struktur der Trabekel unabhängig von der Knochendichte und der Trabekeldicke. Der SMI der Kontrollgruppe zeigte keine signifikanten Unterschiede zu den anderen Gruppen. Die Prednisolongruppe wies den kleinsten MW (-1,30) auf. Dieser war signifikant erniedrigt gegenüber der Cephalosporin- und Diclofenacgruppe. Die Cephalosporingruppe zeigte wieder die geringste SD, während hingegen die Kontrollgruppe wegen zweier Ausreißer die größte SD aufwies (Tab. 4-5 und Abb. 4-5).

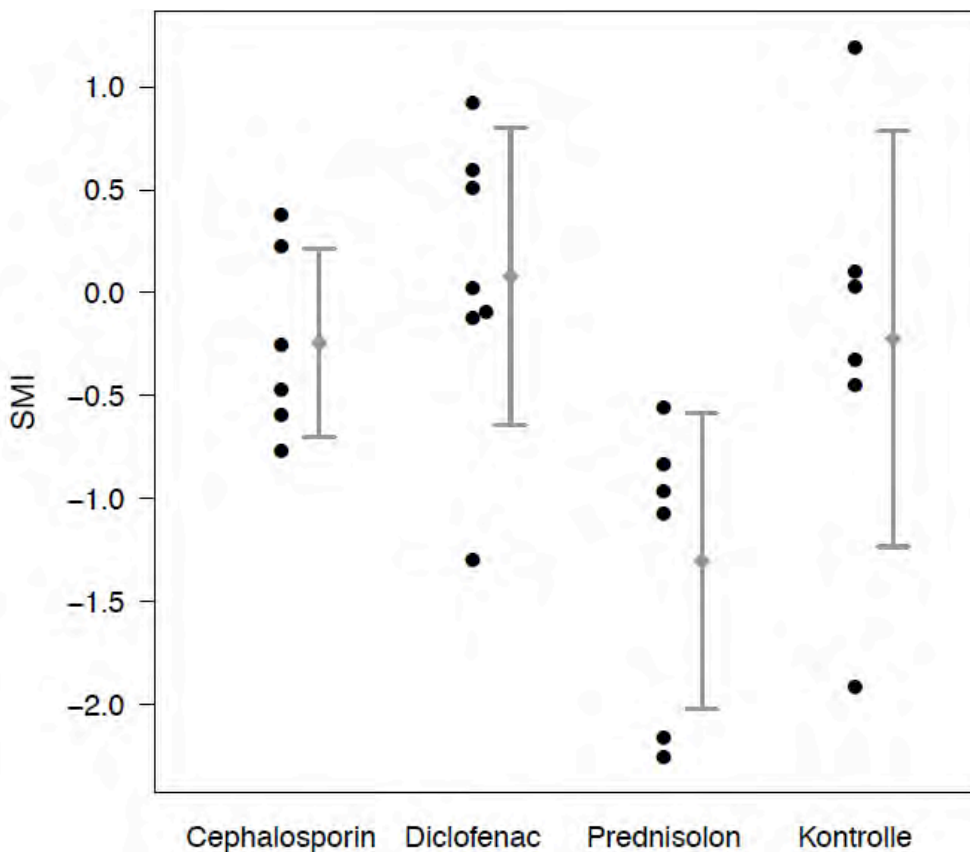


Abb. 4-5  $\mu$ Ct, SMI: Einzelwertverteilung, MW und SD

Der **Anisotropiegrad = Degree Of Anisotropy (DA)** als dimensionsloser, rein dreidimensionaler Parameter beschreibt die vorherrschende räumliche Ausrichtung der Trabekel innerhalb des Knochens.

Alle vier Gruppen zeigten sich hier sehr homogen bezüglich MW und SD ohne signifikante Unterschiede. Die Cephalosporin- und die Prednisolongruppe enthielten je einen Ausreißer nach oben (Tab. 4-5 und Abb. 4-6).

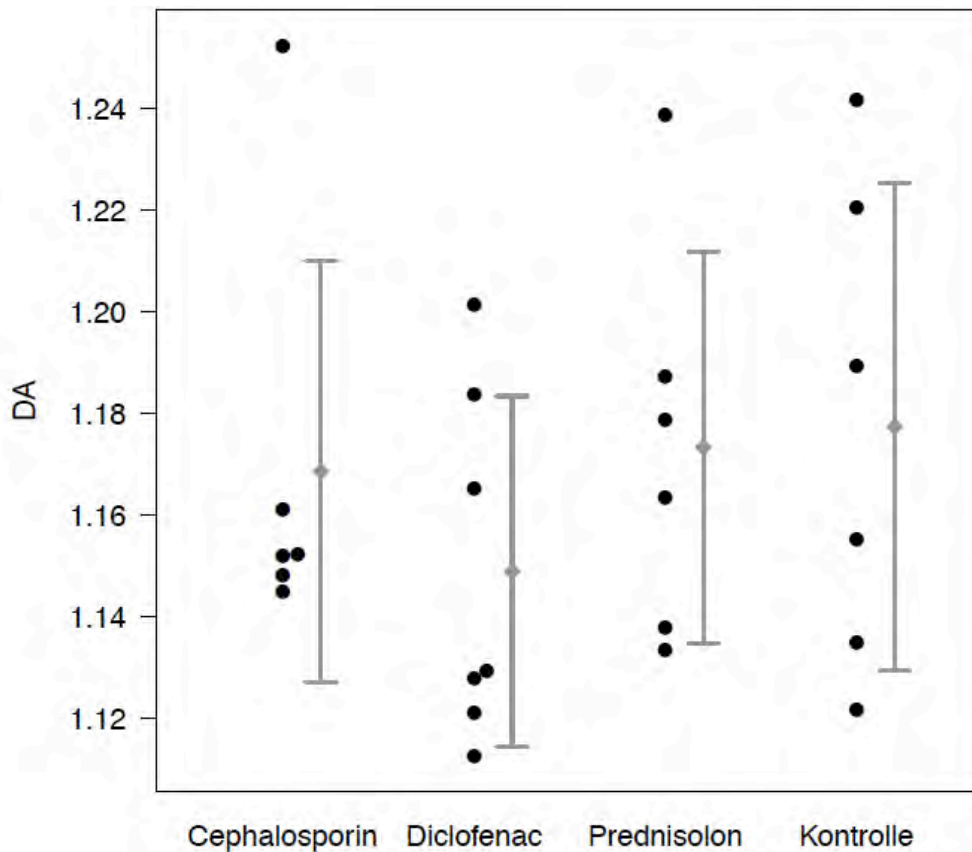


Abb. 4-6  $\mu$ Ct, DA: Einzelwertverteilung, MW und SD

**Bone surface (BS)** in  $\text{mm}^2$  stellt die unabhängige Knochenoberfläche dar.

Die Werte ähnelten sich in der Tendenz denen des BV, ohne sich jedoch signifikant zu unterscheiden. Man konnte einen ‚Trend‘ ( $p = 0,07$ ) zwischen dem MW (1636,83) der Kontrollgruppe und dem MW (1369,01) der Diclofenacgruppe erkennen. Im Gegensatz zum BV war der MW der Kontrollgruppe hier gering höher als jener der Prednisolongruppe (Tab. 4-5 und Abb. 4-7).

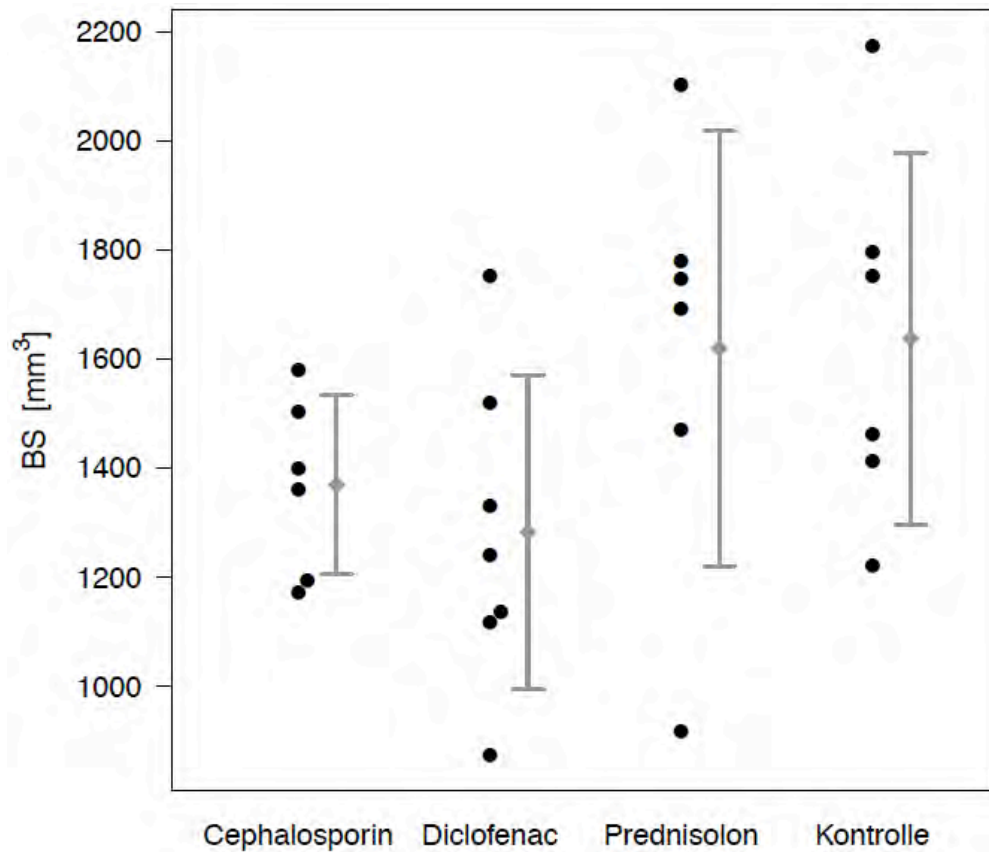


Abb. 4-7  $\mu\text{Ct}$ , BS: Einzelwertverteilung, MW und SD

Die **trabekuläre Dicke, Trabecular Thickness (Tb. Th.)**, stellt die lokale Knochen(-trabekel-)dicke in mm dar.

Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,05$ ) zwischen der Kontrollgruppe (MW = 0,0983) und der Diclofenacgruppe (MW = 0,0937) (Tab. 4-5 und Abb. 4-8).

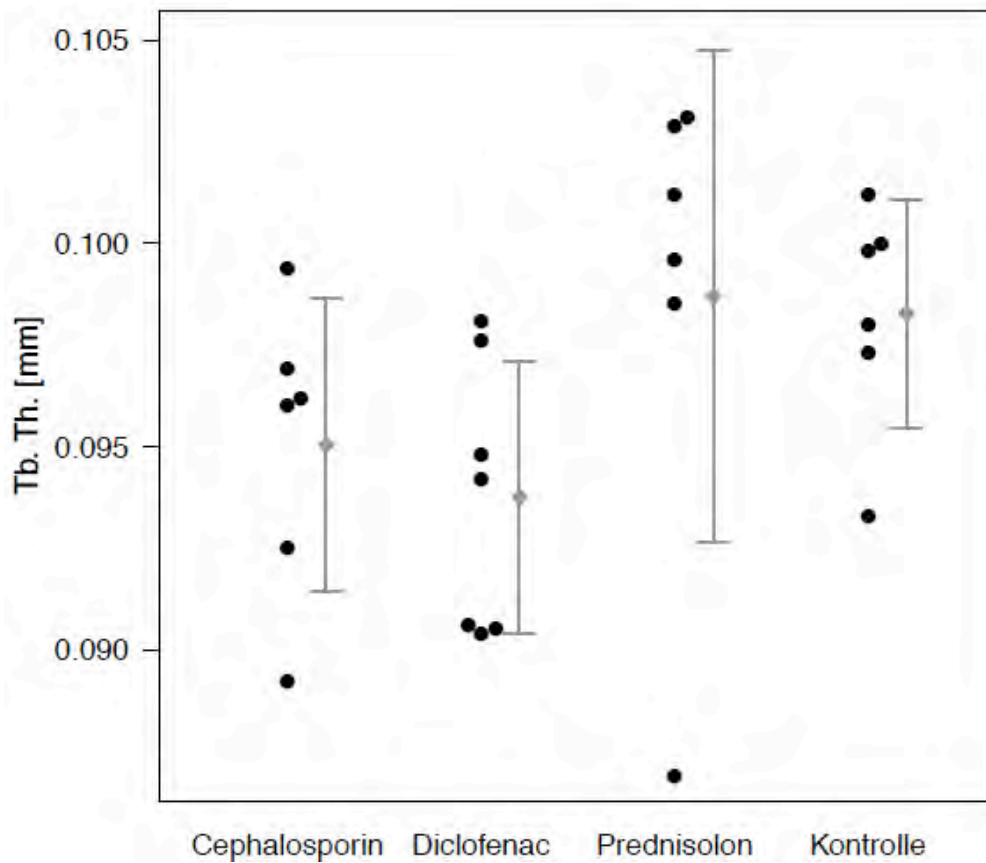
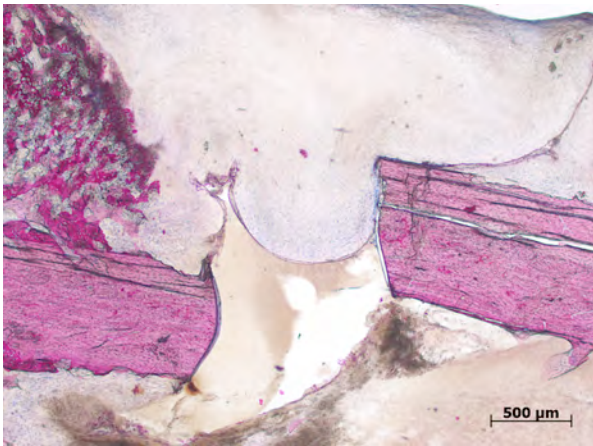


Abb. 4-8  $\mu$ Ct, Tb. Th.: Einzelwertverteilung, MW und SD

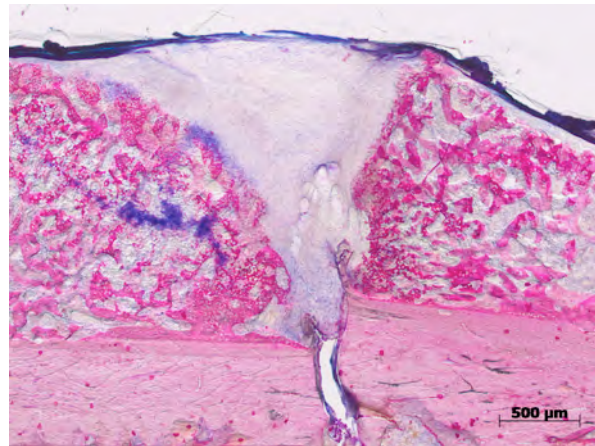
#### 4.4 Histometrie

Die Kontrollgruppe zeigte analog der Cephalosporin- und Prednisolongruppe ( $\mu$ CT: Kallus-BV hoch) in 67% der Proben im Bereich des Frakturspaltes knöchernen Kallus. Bei der Diclofenacgruppe zeigte sich in nur 29% der Proben knöcherner Kallus im Bereich des Frakturspaltes. Von den weichgewebigen Vorstufen untersuchten wir Knorpel und Bindegewebe. Knorpel zeigte sich bei der Cephalosporin- und Prednisolongruppe am seltensten. Bei der Kontroll- und Diclofenacgruppe zeigte sich verhältnismäßig gesehen mehr Knorpel als Knochen (Abb. 4-9c, Abb. 4-9d und Abb. 4-10). Bindegewebe als qualitativ minderwertigstes Gewebe war in der Kontroll- und Cephalosporingruppe innerhalb des Frakturspaltes am seltensten nachzuweisen (33%). In der Diclofenacgruppe, in der es gelegentlich auch zu Diastasen des Frakturspaltes (Abb. 4-9a, Abb. 4-9b, Abb. 4-10 und Tab. 4-6) kam, war mit 57% mit Abstand am häufigsten Bindegewebe nachzuweisen (gefolgt von Prednisolon: 50%). In dieser Gruppe fiel vor allem das (negative) Verhältnis von Knochen/Knorpel/Bindegewebe auf (29%/57%/57%) (Abb. 4-10 und Tab. 4-6).

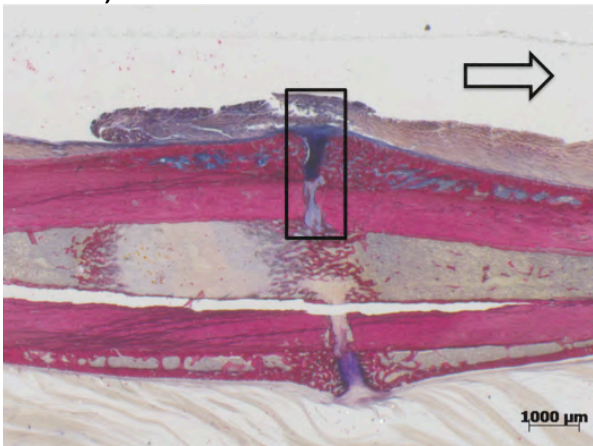
Betrachtet man die knöcherne Frakturspaltüberbrückung, so ließ sich diese in der Kontrollgruppe zu 33% und in der Cephalosporingruppe zu 50% nachweisen (Abb. 4-9e, Abb. 4-9f und Abb. 4-11), während diese in der Prednisolon [trotz hohem Kallus-BV, (Abb. 4-9e und Abb. 4-11)]- bzw. Diclofenacgruppe 17% bzw. 14% betrug (Abb. 4-9e, Abb. 4-11 und Tab. 4-6).



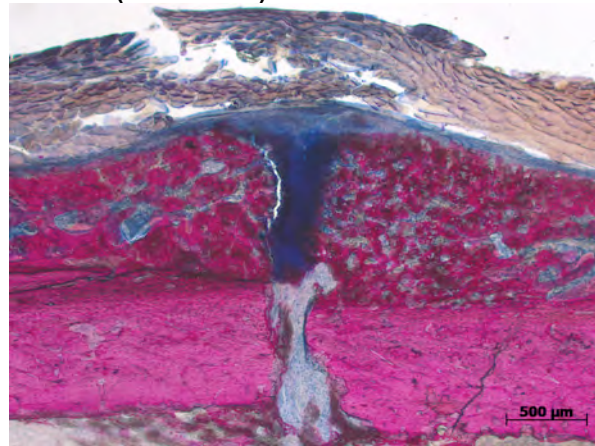
a) keine knöcherne Durchbauung, Spalt (Diclofenac)



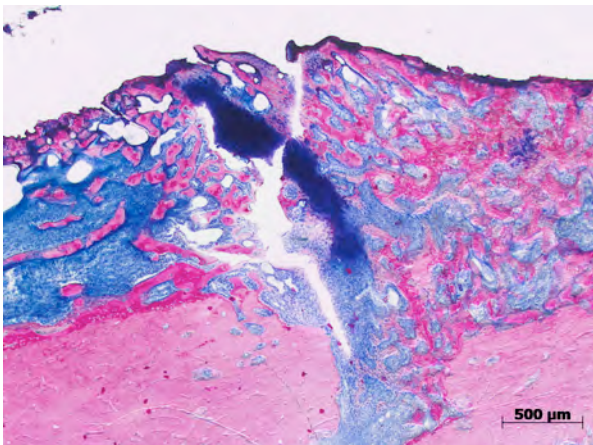
b) keine knöcherne Durchbauung, Bindegewebe (Diclofenac)



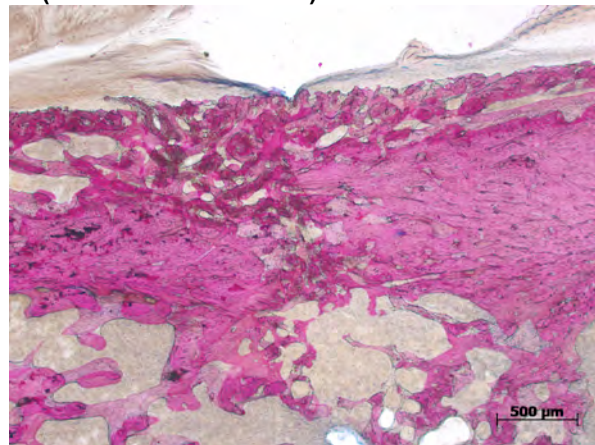
c) Übersichtsaufnahme



d) keine knöcherne Durchbauung, Knorpel (Kontrolle/Diclofenac)



e) (initiale) knöcherne Durchbauung (Kontrolle/Cephalosporin) mit Knorpel, viel Kallus (Prednisolon)



f) knöcherne Durchbauung ohne Knorpel, wenig Kallus (Kontrolle/Cephalosporin)

Abb. 4-9 Histologische Darstellung der Frakturheilung



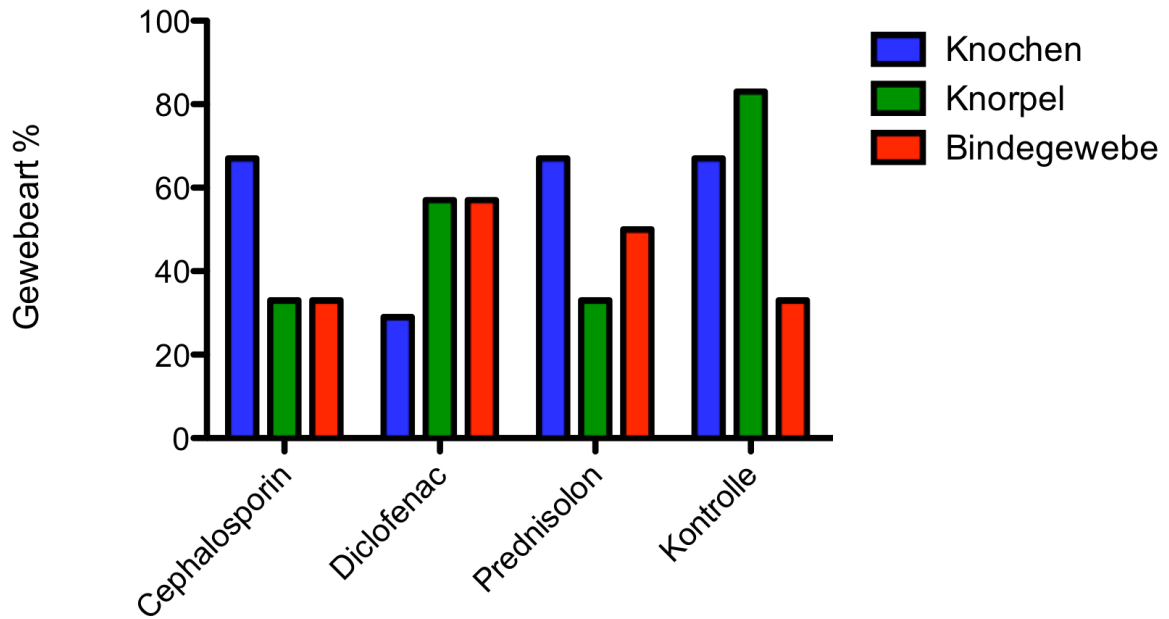


Abb. 4-10 Histometrie, Gewebeart der einzelnen Therapien im Bereich des Frakturspaltes

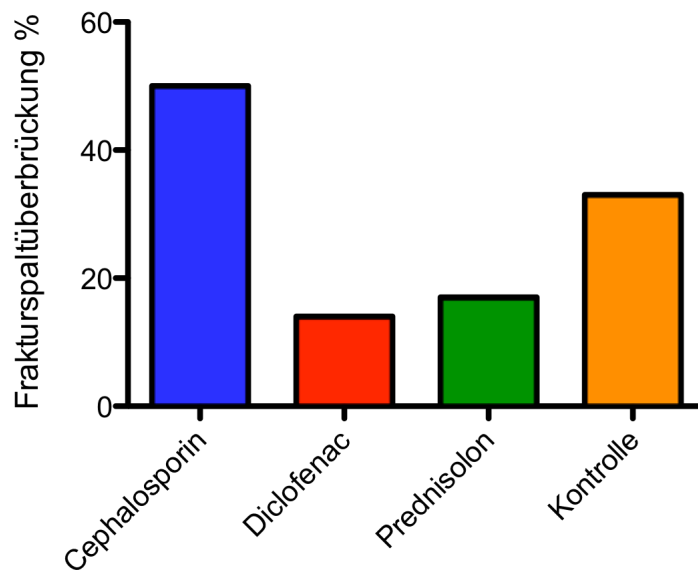


Abb. 4-11 Histometrie, Frakturspaltüberbrückung der einzelnen Therapien

<b>Gruppe</b>	<b>Kallus periostal</b>	<b>Kallus endostal</b>	<b>Frakturspalt</b>	<b>Frakturspalt-überbrückung</b>
Cephalosporin	Geflechtknochen	Geflechtknochen	Knorpel Bindegewebe	keine
Cephalosporin	Geflechtknochen Knorpel	Geflechtknochen	Bindegewebe	keine/ Diastase
Cephalosporin	Geflechtknochen	Geflechtknochen	Geflechtknochen Knorpel	keine
Cephalosporin	Geflechtknochen	Geflechtknochen	Geflechtknochen	Geflechtknochen
Cephalosporin	Geflechtknochen	Geflechtknochen	Geflechtknochen	Geflechtknochen
Cephalosporin	Geflechtknochen	Geflechtknochen	Geflechtknochen	Geflechtknochen
Diclofenac	Geflechtknochen Knorpel	Geflechtknochen	Knorpel	keine
Diclofenac	Geflechtknochen	keiner	Knorpel Bindegewebe	keine/ Diastase
Diclofenac	Geflechtknochen	Geflechtknochen Bindegewebe	Bindegewebe	keine/ Diastase
Diclofenac	Geflechtknochen	Nekrose	Knorpel Nekrose	keine
Diclofenac	Geflechtknochen	Geflechtknochen	Geflechtknochen	Geflechtknochen
Diclofenac	Geflechtknochen Knorpel	Geflechtknochen	Knorpel Bindegewebe	keine
Diclofenac	Geflechtknochen	Geflechtknochen	Geflechtknochen Bindegewebe	keine
Prednisolon	Geflechtknochen Knorpel	Geflechtknochen	Geflechtknochen Knorpel	keine
Prednisolon	Geflechtknochen Knorpel	Geflechtknochen	Bindegewebe	keine/ Diastase
Prednisolon	Geflechtknochen	Geflechtknochen	Geflechtknochen	keine
Prednisolon	Geflechtknochen	Geflechtknochen	Geflechtknochen	Geflechtknochen
Prednisolon	Geflechtknochen	Geflechtknochen	Knorpel Bindegewebe	keine
Prednisolon	Geflechtknochen	Geflechtknochen	Geflechtknochen Bindegewebe	keine
Kontrolle	Geflechtknochen	Geflechtknochen	Geflechtknochen Knorpel	keine
Kontrolle	Geflechtknochen Knorpel	Geflechtknochen	Knorpel Bindegewebe	keine
Kontrolle	Geflechtknochen	Geflechtknochen	Geflechtknochen Knorpel	Geflechtknochen
Kontrolle	Geflechtknochen Knorpel	Geflechtknochen	Knorpel Bindegewebe	keine
Kontrolle	Geflechtknochen	Geflechtknochen	Geflechtknochen Knorpel	keine
Kontrolle	Geflechtknochen	Geflechtknochen	Geflechtknochen	Geflechtknochen

**Tab. 4-6 Histometrie, Einzelbewertung der Proben**



## 4.5 Biomechanik

### 4.5.1 Fmax

Die Versagenslast Fmax [N] als maximale Kraft, welche auf den Knochen gewirkt hat und zusätzlich als Prozentwert (Fmax relativ) zur gegenüberliegenden, nicht frakturierten Femurseite (Fmax Kontrolle) angegeben ist, zeigte folgende Werte (Tab. 4-7, Abb. 4-12 und Abb. 4-13):

	Fmax	Fmax Kontrolle	Fmax relativ
Cephalosporin	78,54 ± 20,52	185,55 ± 35,60	0,44 ± 0,17
Diclofenac	61,97 ± 24,91	211,54 ± 26,99	0,30 ± 0,12
Prednisolon	54,30 ± 28,68	182,78 ± 20,01	0,29 ± 0,14
Kontrolle	77,65 ± 41,82	209,78 ± 36,86	0,36 ± 0,16

**Tab. 4-7 Biomechanik, Fmax: MW und SD der einzelnen Therapien**

Mittels T-Test für unverbundene Stichproben zeigten sich signifikante Unterschiede sowohl der Fmax als auch der Fmax relativ zwischen Cephalosporin und Prednisolon. Ein ‚Trend‘ ließ sich erkennen zwischen Cephalosporin und Diclofenac. Zwischen Cephalosporin und Kontrolle zeigten sich nahezu identische Werte ( $p = 0,95$ ). Die Kontrollgruppe verhielt sich ähnlich der Cephalosporingruppe, sie ließ jedoch gegenüber der Prednisolongruppe nur einen ‚Trend‘ erkennen (Tab. 4-8).

		Mean ± SD		Mean difference (95%-CI)	p-value
Fmax	C	78,54 ± 20,52	C vs D	16,57 (-7,41 – 40,54)	0,160
	D	61,97 ± 24,91	C vs P	24,24 (1,05 – 47,43)	0,041*
	P	54,30 ± 28,68	C vs K	0,89 (-29,67 – 31,44)	0,951
	K	77,65 ± 41,82	D vs P	7,67 (-18,45 – 33,79)	0,543
			D vs K	-15,68 (-48,20 – 16,84)	0,323
			P vs K	23,35 (-8,81 – 55,51)	0,144
Fmax relativ	C	0,44 ± 0,17	C vs D	0,14 (-0,01 – 0,29)	0,058
	D	0,30 ± 0,12	C vs P	0,15 (0,00 – 0,30)	0,046*
	P	0,29 ± 0,14	C vs K	0,08 (-0,07 – 0,24)	0,279
	K	0,36 ± 0,16	D vs P	0,01 (-0,12 – 0,13)	0,934
			D vs K	-0,06 (-0,20 – 0,07)	0,345
			P vs K	0,07 (-0,06 – 0,20)	0,297

**Tab. 4-8 Biomechanik, Fmax: MW, SD, mittlere Differenz, 95%-CI der Differenz und Signifikanz**

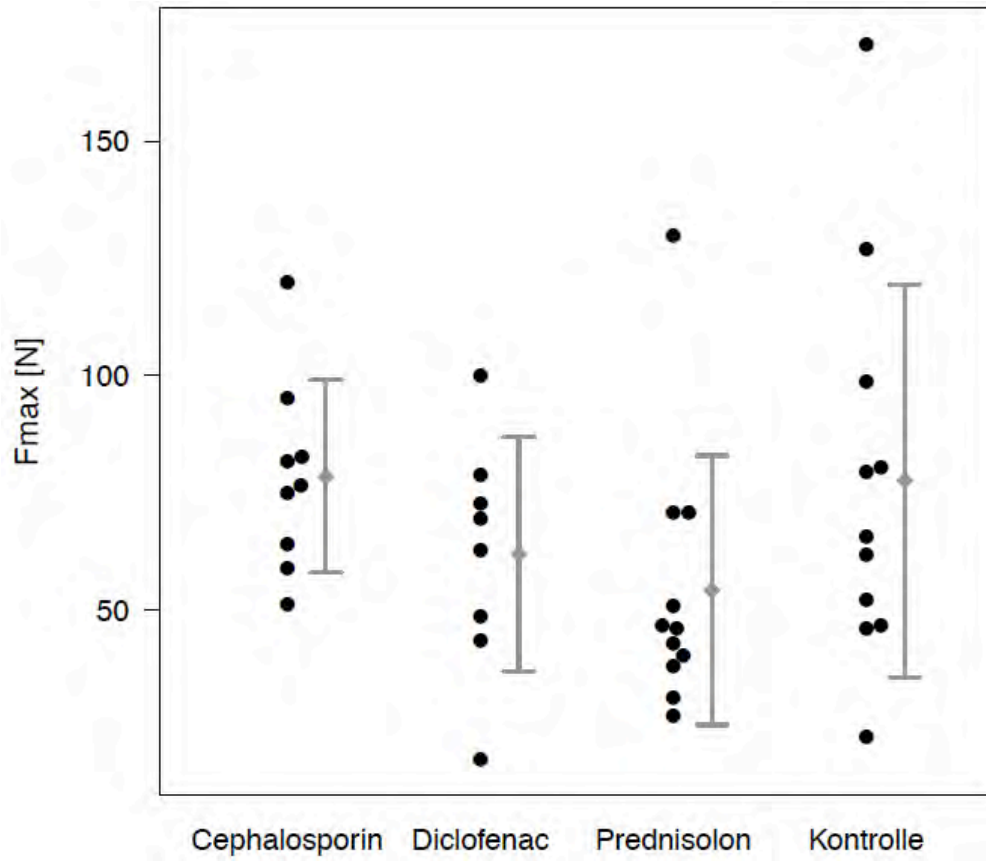


Abb. 4-12 Biomechanik, Fmax: Einzelwertverteilung, MW und SD

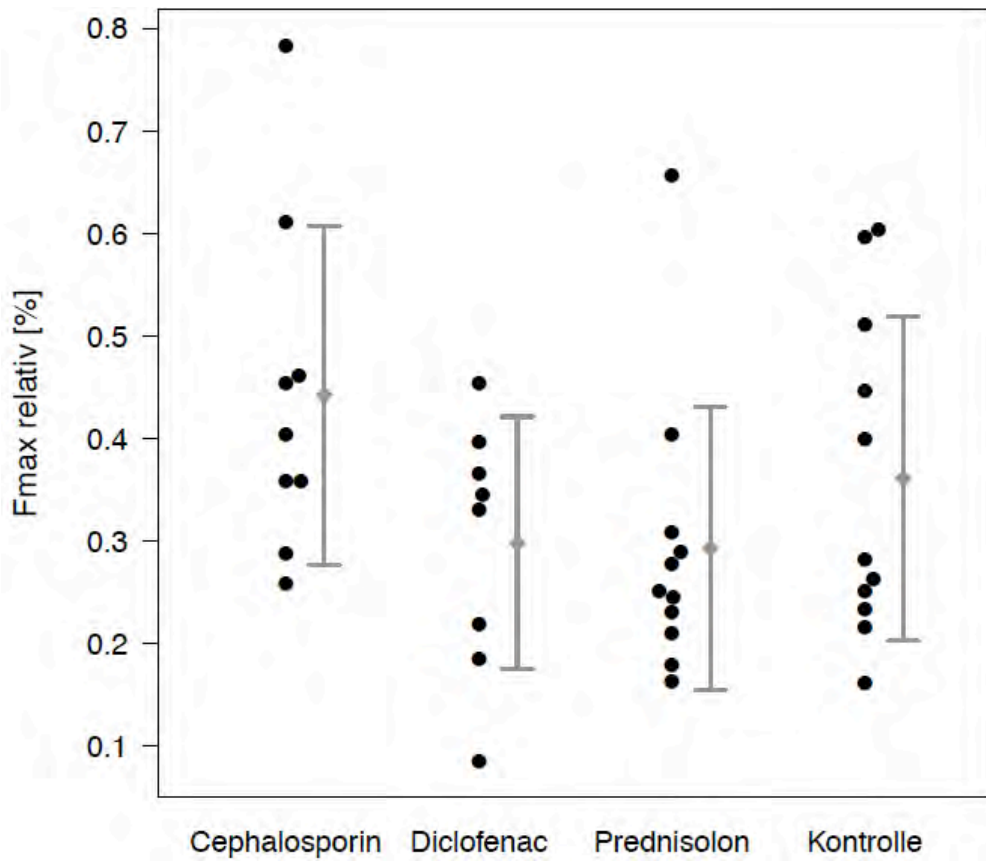


Abb. 4-13 Biomechanik, Fmax relativ: Einzelwertverteilung, MW und SD

#### 4.5.2 Stiffness

Die Steifigkeit [N/mm], welche den linearen Verlauf des Kraft-Weg-Diagramms darstellt, wurde ebenfalls als Prozentwert (Stiffness relativ) zur nicht frakturierten Gegenseite (Stiffness Kontrolle) ermittelt (Tab. 4-9, Abb. 4-14 und Abb. 4-15):

	Stiffness	Stiffness Kontrolle	Stiffness relativ
Cephalosporin	123,74 ± 60,08	444,01 ± 101,09	0,31 ± 0,21
Diclofenac	57,31 ± 31,11	489,76 ± 143,98	0,13 ± 0,10
Prednisolon	86,63 ± 60,45	460,76 ± 64,38	0,19 ± 0,14
Kontrolle	122,44 ± 81,16	512,44 ± 127,87	0,24 ± 0,16

**Tab. 4-9 Biomechanik, Stiffness: MW und SD der einzelnen Therapien**

Mittels T-Test für unverbundene Stichproben zeigten sich signifikante Unterschiede sowohl der Stiffness als auch der Stiffness relativ zwischen Cephalosporin und Diclofenac. Ein ‚Trend‘ ließ sich erkennen zwischen Cephalosporin und Prednisolon. Zwischen Cephalosporin und Kontrolle zeigten sich nahezu identische Werte ( $p = 0,97$ ). Die Kontrollgruppe verhielt sich ähnlich der Cephalosporingruppe, wobei sich hier die Stiffness signifikant zur Diclofenacgruppe unterschied, während sich bei der Stiffness relativ ein ‚Trend‘ abzeichnete (Tab. 4-10).

		Mean ± SD		Mean difference (95%-CI)	p-value
Stiffness	C	123,74 ± 60,08	C vs D	66,43 (16,76 – 116,09)	0,013*
	D	57,31 ± 31,11	C vs P	37,10 (-19,96 – 94,17)	0,188
	P	86,63 ± 60,45	C vs K	1,30 (-65,18 – 67,77)	0,968
	K	122,44 ± 81,16	D vs P	-29,32 (-74,53 – 15,89)	0,188
			D vs K	-65,13 (-122,81 – -7,45)	0,030*
			P vs K	35,81 (-28,18 – 99,79)	0,256
Stiffness relativ	C	0,31 ± 0,21	C vs D	0,17 (0,00 – 0,34)	0,046*
	D	0,13 ± 0,10	C vs P	0,12 (-0,06 – 0,29)	0,172
	P	0,19 ± 0,14	C vs K	0,07 (-0,11 – 0,25)	0,417
	K	0,24 ± 0,16	D vs P	-0,06 (-0,18 – 0,06)	0,321
			D vs K	-0,10 (-0,23 – 0,03)	0,107
			P vs K	0,05 (-0,09 – 0,18)	0,481

**Tab. 4-10 Biomechanik, Stiffness: MW, SD, mittlere Differenz, 95%-CI der Differenz und Signifikanz**

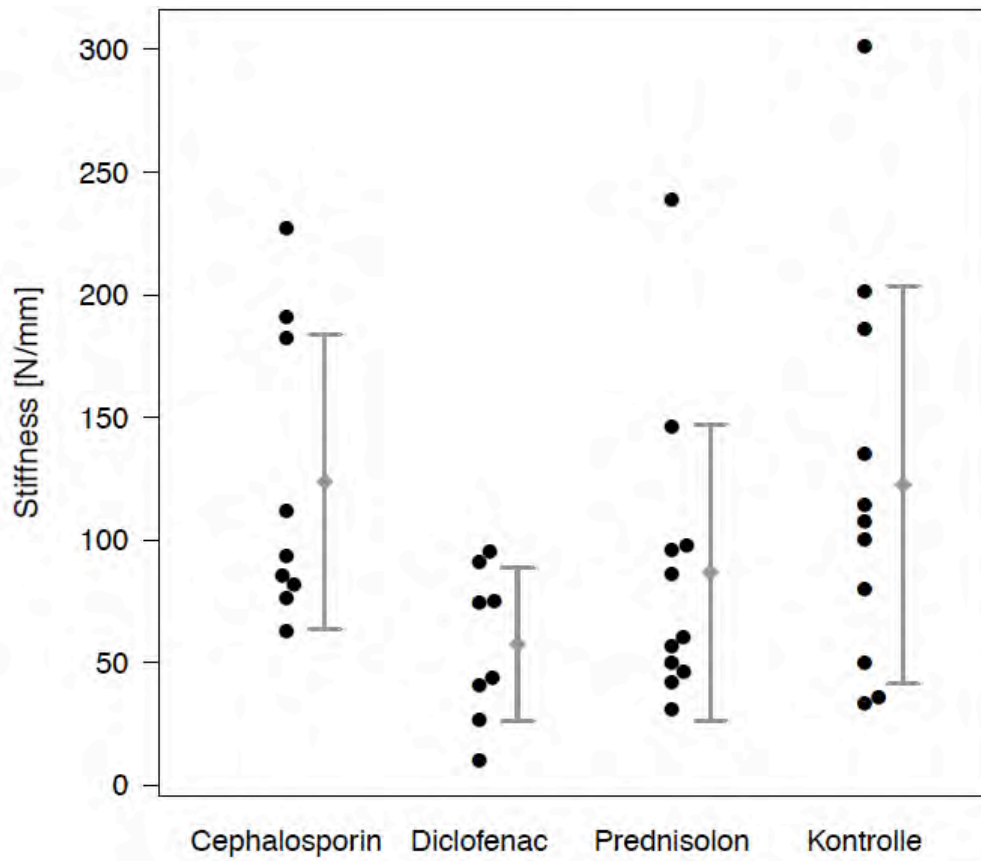


Abb. 4-14 Biomechanik, Stiffness: Einzelwertverteilung, MW und SD

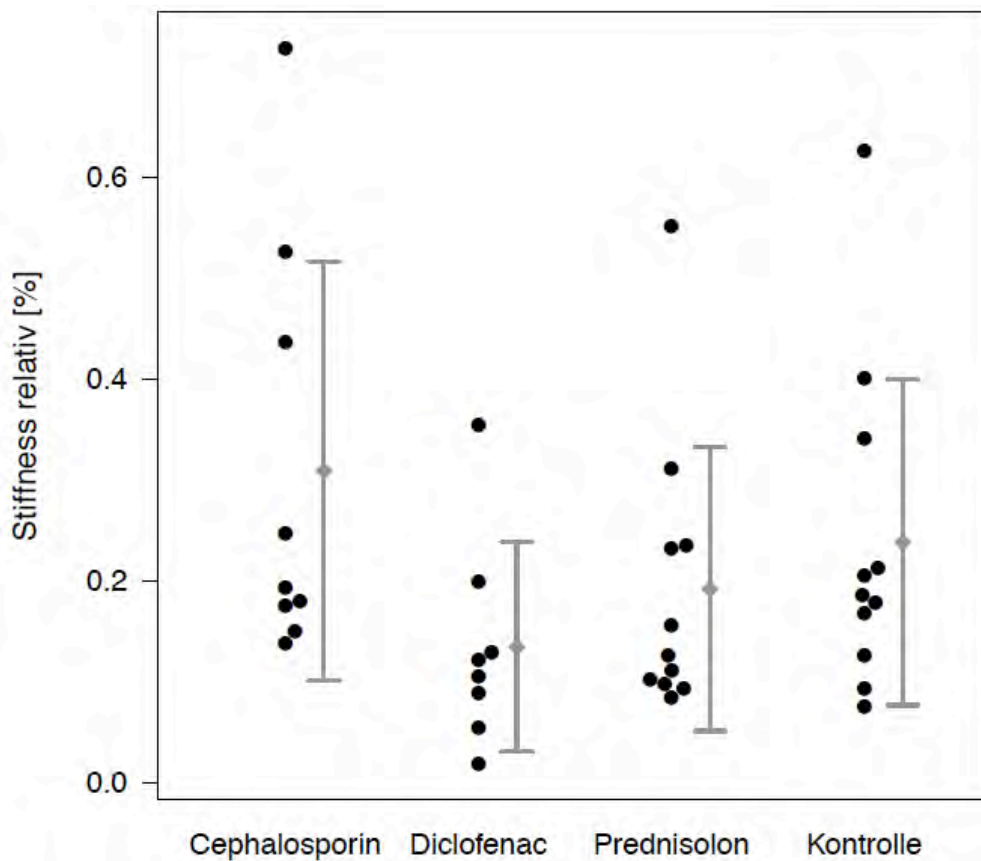
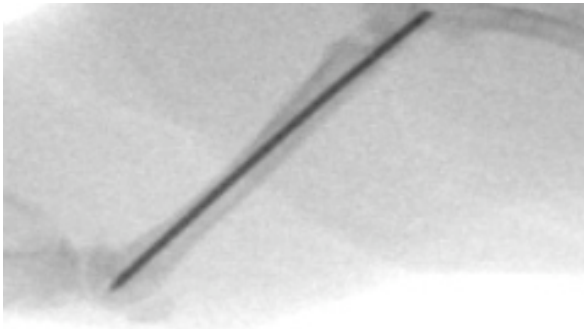


Abb. 4-15 Biomechanik, Stiffness relativ: Einzelwertverteilung, MW und SD

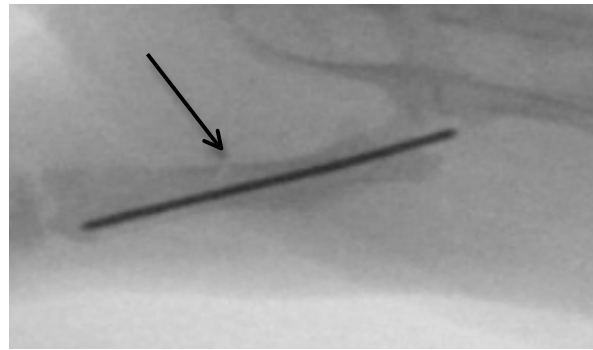
## 4.6 Zusammenschau der Modalitäten

In Abb. 4-16 und Abb. 4-17 ist der typische Versuchsablauf der  $\mu$ CT-/Histologie-Gruppe samt Auswertungsmethoden aufgezeigt. In Abb. 4-16a und Abb. 4-17a sieht man ein konventionelles Röntgen (C-Bogen) eines Femurs nach Setzen des Kirschner-Drahtes, in Abb. 4-16b und Abb. 4-17b nach Fraktur. Die Abb. 4-16c/d und die Abb. 4-17c/d zeigen jeweils eine makroskopische Aufnahme von ventral und dorsal. Rechts davon (Abb. 4-16e und Abb. 4-17e) ist eine Scout View-Darstellung des  $\mu$ CT zu erkennen. Die Abb. 4-16f/g und die Abb. 4-17f/g stellen eine 3D- $\mu$ CT-Darstellung mit Farbkodierung dar. Ortsständiger Knochen stellt sich grau dar, während sich neu gebildeter Kallusknochen in semitransparentem blau darstellt (links: Übersicht, rechts: coronar median/mittig geschnitten). Darunter (Abb. 4-16h und Abb. 4-17h) ist eine histologische Übersichtsaufnahme erstellt. Hier erkennt man zusätzlich zu der  $\mu$ CT-Darstellung in den dort ‚leeren‘ (knochenfreien) Arealen Bindegewebe/Knorpel. Im Markraum ist der Platz des ehemaligen K-Drahtes (partiell) zu erkennen.

In Abb. 4-16 ist die für die Kontroll-/Cephalosporin-Tiere charakteristische Frakturheilung exemplarisch dargestellt. Makroskopisch (Abb. 4-16c/d und Abb. 4-17c/d) ist noch klar der Bereich der queren Schafffraktur ersichtlich, wobei bereits in den Abb. 4-16c/d sichtlich eine knöcherne Annäherung vermutet werden kann. In Abb. 4-17, charakteristisch für ein Diclofenac-Tier, ist makroskopisch ebenfalls keine Diastase des Frakturspaltes zu erkennen, allerdings kann der Gewebetyp nur vermutet werden (Abb. 4-17c/d). Korrespondierende radiologische Aufnahmen in Abb. 4-16e (Scout View) zeigen deutlich die korrekte anatomische Stellung sowie die sich im Ablauf befindliche Frakturheilung. Im Gegensatz sehen wir hierzu in Abb. 4-17e eine Diastase des Frakturspaltes sowie eine geringe Dislocatio ad latum. In den Abb. 4-16f/g erkennt man deutlich Zeichen eines durchgehenden Kallus, während in den Abb. 4-17f/g kein durchgehender Kallus zu detektieren ist, sondern keilförmige Defekte. In der histologischen Übersichtsaufnahme (Abb. 4-16h) zeigt sich eine partielle knöcherne Durchbauung, wobei an den noch nicht vollständig konsolidierten Stellen Zeichen der sekundären/enchondralen Frakturheilung (Knorpelinseln) zu sehen sind. Die entsprechende Histologie aus der Diclofenacgruppe (Abb. 4-17h) zeigt eine bindegewebige, fast knorpelfreie Auskleidung des Spaltes.



a) Konventionelles Röntgen vor Fraktur



b) Konventionelles Röntgen nach Fraktur



c) dorsal

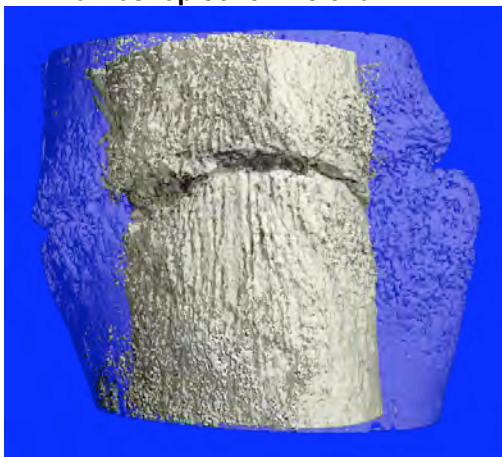


d) ventral

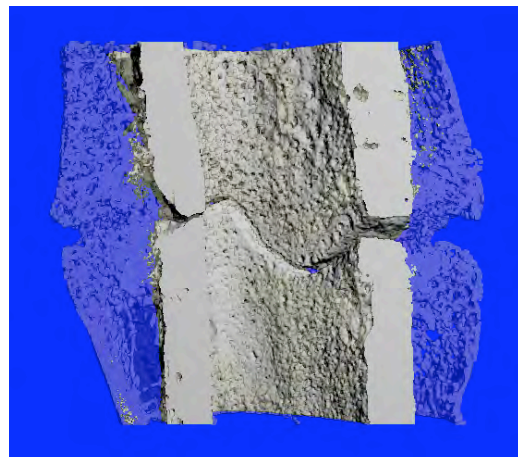
Makroskopische Ansicht



e)  $\mu$ CT-scout view

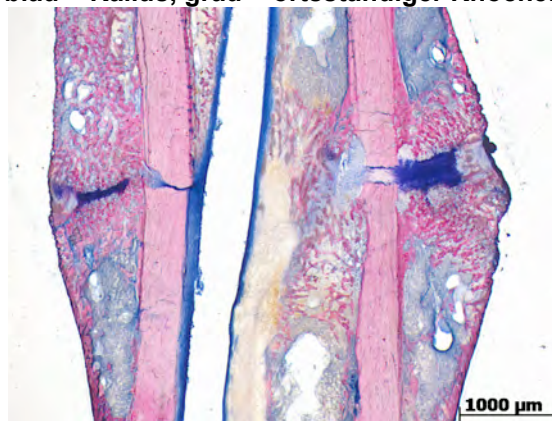


f) Übersicht



g) Coronar

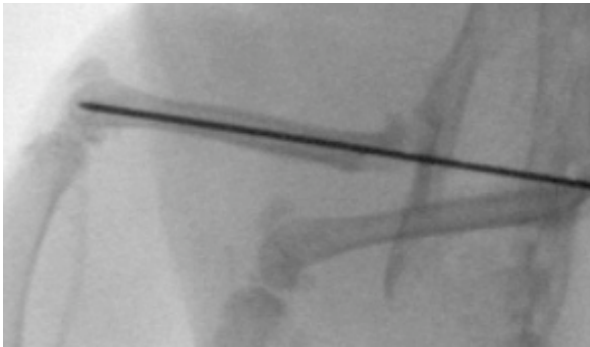
$\mu$ CT, 3D, farbcodierte semitransparente Dichtedarstellung:  
blau = Kallus, grau = ortständiger Knochen



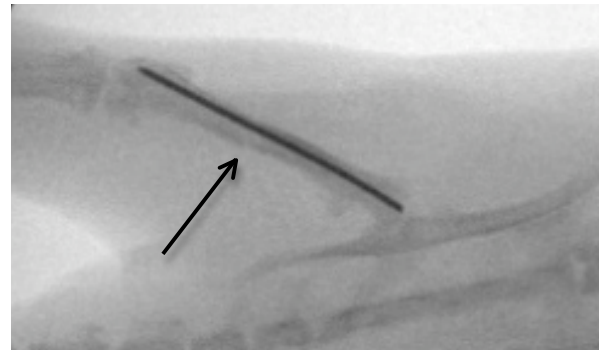
h) Histologie, Laczko-Levai-Färbung, coronar/median

Abb. 4-16 Modalitätengegenüberstellung (Kontrolle/Cephalosporin)





a) Konventionelles Röntgen vor Fraktur



b) Konventionelles Röntgen nach Fraktur



c) dorsal

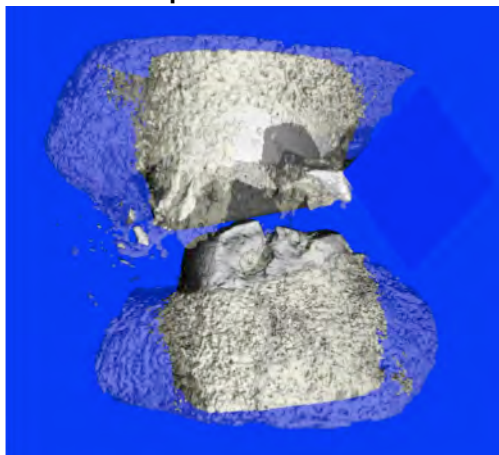


d) ventral

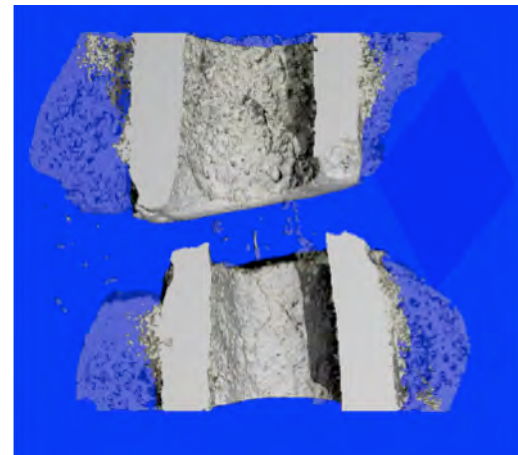
Makroskopische Ansicht



e) µCT-scout view

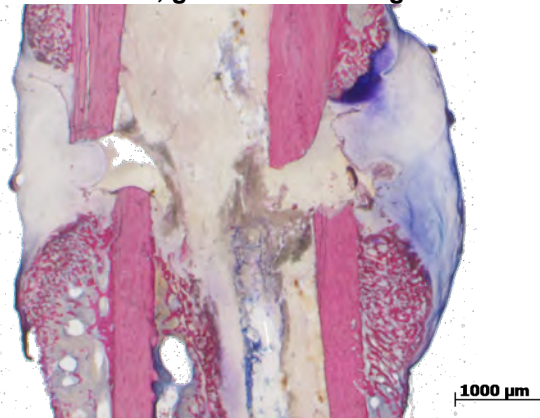


f) Übersicht



g) Coronar

µCT, 3D, farbcodierte semitransparente Dichtedarstellung:  
blau = Kallus, grau = ortständiger Knochen



h) Histologie, Laczko-Levai-Färbung, coronar/median

Abb. 4-17 Modalitätengegenüberstellung (Diclofenac)

## 5 Diskussion

### 5.1 Tiermodell

Die komplexen (patho-)physiologischen Heilungsvorgänge nach einer Knochenfraktur, mit der für sie notwendigen Entzündungsreaktion des Körpers sind in einem Zellkulturmodell nicht hinreichend zu simulieren und erfordern den lebenden Organismus [Dumont 2009, Gerstenfeld 2009, O'Loughlin 2008]. Somit ist ein Tiermodell unerlässlich, da bei einem Menschen sowohl Bruchform als auch Begleitumstände (z.B. Nebenerkrankungen) zu verschieden wären, um den Einfluss von Medikamenten statistisch haltbar darzustellen. Die Auswertemethoden wären zudem nicht anwendbar.

Während anfangs Frakturheilungsmodelle (heute vor allem Biomaterialtestung für Knochenersatz) aufgrund leichter Durchführbarkeit und Ähnlichkeit zum Menschen hauptsächlich bei Großtieren wie Schafen durchgeführt wurden [Bensaid 2005, Kon 2000, Nuss 2006, Petite 2000, Petrizzi 2007, Viateau 2007, von Rechenberg 2006], hat sich das in den letzten Jahrzehnten grundsätzlich geändert [Histing 2011]. Bei Nagetieren ist die unkomplizierte, günstige Haltung von Vorteil. Eine große Tieranzahl kann auf kleinem Raum gehalten werden, so dass eine höhere Wahrscheinlichkeit besteht, statistisch relevante Aussagen treffen zu können. Wegen der häufigen Wahl der Ratte als Versuchstier ist dadurch auch eine sehr gute Vergleichbarkeit zu anderen Studien gegeben [O'Loughlin 2008]. Ökonomisch gesehen vorteilhaft ist, dass die einzelnen Phasen der Frakturheilung ungefähr doppelt so schnell ablaufen wie beim Menschen [Phillips 2005].

Im Gegensatz zu Großtieren geschieht das Remodelling über Resorptionslakunen, da Nager kein Haver'sches System besitzen. Dennoch sind die Mechanismen der Frakturheilung ähnlich, weshalb dies kein Grund gegen ein Nagetier sein sollte [Histing 2011, Nunamaker 1998]. Der große Vorteil der Ratte gegenüber der Maus liegt in ihrer Körpergröße, was vor allem das operative Handling, aber auch die biomechanische Knochentestung deutlich erleichtert.

Weibliche Tiere haben den Vorteil, dass man sie in größerer Anzahl als männliche Ratten (aggressiveres Verhalten) in den Käfigen halten kann. Wir entschieden uns dennoch für das männliche Geschlecht, da hiermit der Östrogeneinfluss auf die Frakturheilung ausgeschlossen werden konnte [Histing 2011, McCann 2008, Meyer 2001].



Die Tiere hatten zum Zeitpunkt der OP ein Alter von 16 Wochen (geschlossene Epiphysenfugen). Die Geschwindigkeit der Frakturheilung unterscheidet sich hier deutlich von Tieren mit einem Alter von 6 oder 52 Wochen (schneller bzw. langsamer) [Histing 2011, Mehta 2010, Meyer 2001]. Somit ist die Vergleichbarkeit bei Tieren mit abgeschlossenem Knochenwachstum gegeben.

## 5.2 Frakturheilungsmodell

Lange Röhrenknochen wie Femur und Tibia eignen sich gleichermaßen für Frakturheilungsstudien. Aufgrund des dünnen Weichteilmantels, welcher die Tibia umgibt, eignet sie sich sehr für ein geschlossenes Frakturheilungsmodell. Hier kann sehr einfach eine reproduzierbare quere Schaftfraktur produziert werden [Bonnarens 1984]. Die Gefahr einer zusätzlichen Fibulafraktur ist jedoch hoch und betrug im Rahmen einer Studie 43% [Beck 2003]. Dadurch wird bei Tieren ohne Fibulafraktur ein stabiles (ohne Rotations- bzw. minimale Scherbewegungen) in ein instabiles Frakturmodell überführt [Shefelbine 2005a]. Daher ist eine laterale Röntgenübersichtsaufnahme des Unterschenkels nach Opferung obligat.

Im Gegensatz dazu ist das Femur mit seinem konstanten und größeren Durchmesser als die Fibula von einer dickeren Muskel-/Weichteilschicht umgeben, was eine standardisierte Fraktur wiederum schwieriger macht. Es können schräge Frakturen, Trümmerfrakturen und Frakturen mit Biegungskeil mit gegebenenfalls nicht immer einheitlichem Weichteilschaden entstehen. Aus diesem Grund hatten wir entsprechend Simon (25,7% [Simon 2007]) eine Ausschlussquote von 27%, da wir alle abweichenden Frakturen konsequent ausgeschlossen haben. Das Femurmodell erlaubt aber die Verwendung größerer Implantate und kann vorgezogen werden, wenn die Frakturheilung langer Röhrenknochen untersucht werden soll [Histing 2011]. Wir bevorzugten für die Kirschner-Draht-Marknagelung den anterograden Zugang via fossa intertrochanterica [Huo 1991, Wingerter 2007], da wir ihn für weniger invasiv halten als die retrograde Marknagelung nach Kniegelenkeröffnung über den medianen parapatellaren Zugang. Zudem ist das Kürzen des Drahtes leichter und ein minimales Überstehen desselben in der fossa intertrochanterica im Gegensatz zum Kniegelenk unproblematisch. Dieses Modell erlaubt weder axiale Stabilität noch Rotationsstabilität und stellt daher ein instabiles Modell dar, welches für Defektmodelle nicht geeignet ist [Wingerter 2007]. Gesteigert werden könnte sowohl die Rotations- als auch die axiale Stabilität durch eine intramedulläre Kompressionsschraube (Mouse-

/RatScrew) [Claes 2009b, Histing 2011, Holstein 2009]. Diese kann ebenfalls minimal-invasiv technisch einfach eingebracht werden, ist jedoch erheblich teurer. Offene Frakturmodelle werden gewählt, um den Knochen unter Sicht zu frakturieren oder zu osteotomieren (in der Regel im Rahmen eines Defektmodells), wobei meist ein lateraler Zugang gewählt wird [Cheung 2003]. Gegenüber der geschlossenen Femurfraktur bietet eine quere Osteotomie am Femur den Vorteil, dass vergleichbare und standardisierte Bedingungen bezüglich der Frakturheilung gewährleistet werden können. Allerdings kommt es bei offenen Modellen verglichen zur geschlossenen Fraktur immer zu einer erheblichen Traumatisierung des Periosts und des umgebenden Weichgewebes und zu möglichen Hitzeschäden am Osteotomiespalt, woraus gegenüber der geschlossenen Fraktur eine Heilungsverzögerung resultieren könnte. Vor allem aber ist der Einfluss der anderen Gewebe auf die Frakturheilung nicht abzugrenzen. Daher ist ihre Anwendung eher für Defektmodelle empfohlen [Histing 2011].

### **5.3 Versuchsdauer**

Die frühe Phase der Knochenheilung ist durch eine Entzündungsreaktion des Körpers gekennzeichnet, welche die für den Heilungsprozess notwendigen Entzündungs- und Vorläuferzellen durch chemische Botenstoffe, u.a. Wachstumsfaktoren, zur Frakturstelle bringt und zur Proliferation anregt [Klaushofer 1994, Probst 1997]. Neuere molekularbiologische Studien deuten darauf hin, dass die frühe Heilungsphase möglicherweise entscheidend für den endgültigen Erfolg und die Stabilität des Knochens ist [Dimitriou 2005].

Der frühe Kallus eignet sich eher für ein Frakturmodell, während sich der späte Kallus für ein Defektmodell besser eignet. Ein früher Zeitpunkt (1 - 2 Wochen) mit noch sehr weichem Kallus bei maximalem Kallusvolumen und einem Knorpelanteil von 10 - 15% erschwert histologische Auswertungen des Kallus sicherlich und ist für eine biomechanische Testung wenig probat [Gerstenfeld 2006, Histing 2011]. Ein später Zeitpunkt (5 Wochen), bei dem bei einem Knorpelanteil von nur noch 2% der Frakturspalt stabil mit Geflechtknochen überbrückt ist [Gerstenfeld 2006, Phillips 2005] und nur noch Umbauvorgänge zum Lamellenknochen stattfinden, birgt die Gefahr, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede mehr zwischen den Gruppen zu detektieren sind. Abgeschlossen sei die Heilung mit 6 bis 10 Wochen [Meyer 2001],

zu welchem Zeitpunkt die biomechanischen Werte die Werte unfrakturierter Femora erreichten [Meyer 2001].

An unbehandelten Kontrollgruppen wurde eine Kallusüberbrückung am 21. [Gerstenfeld 2006, Phillips 2005] bzw. 24. [Ro 1976] Tag – noch nicht komplett und stabil – beschrieben. Auch an anderen Knochen (Ulna/Radius [Allen 1980] und Tibia [Tornkvist 1980]) konnten diese Zeitpunkte beschrieben werden, so dass nach 21 Tagen (unser Zeitpunkt) zu erwarten war, dass signifikante Unterschiede (sofern vorhanden) nachzuweisen wären. So liegt der optimale Zeitpunkt, um die frühe Phase der Frakturheilung bei Ratten zu untersuchen, bei 2 - 3 Wochen, während jener für die späte Phase bei 4 - 6 Wochen liegt [Histing 2011]:

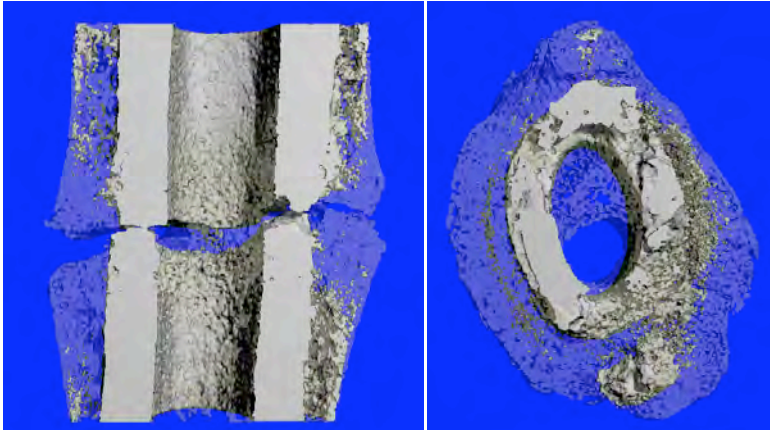
Die Frakturheilung am Femur der Maus ist 1 Woche schneller als an der Ratte abgeschlossen [Manigrasso 2004].

## 5.4 $\mu$ CT

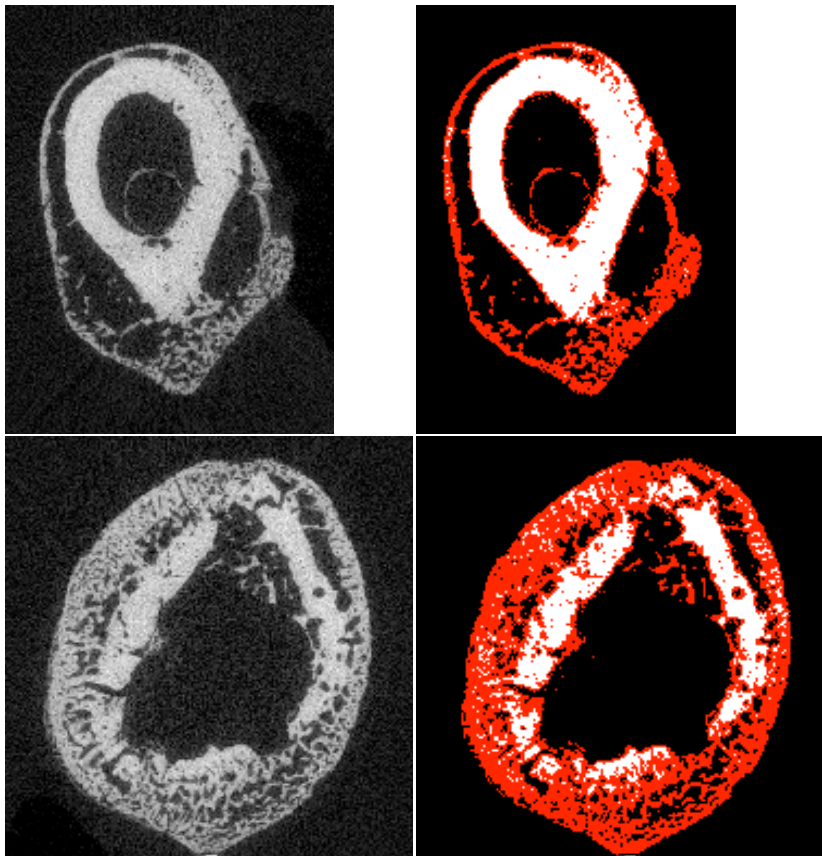
Die  $\mu$ CT-Analyse stellt ein invasives, nicht destruktives Verfahren dar, das eine Untersuchung des Hartgewebes bis auf eine Pixelgröße von 0,5  $\mu$ m ( $\mu$ CT 50 = nanoCT) zulässt, ohne dass die Proben speziell vorbereitet werden müssen. Im Gegensatz zur Histologie entfällt eine aufwendige Probenpräparation, und es können direkt 3D-Daten der Knochenarchitektur erhoben werden. Die  $\mu$ CT stellt in der Beurteilung des Knochens über der zellulären Ebene den Goldstandard dar [Hedberg 2005, Jiang 2000, Link 2002, Marechal 2005, Muller 1998, Yeom 2008]. Von Nachteil bei den  $\mu$ CT-Messungen stellten sich die langen Scannzeiten, das relativ eingeschränkte VOI (und damit der Probendurchmesser), die Invasivität und Kostenintensität dar.

Für die Auswertung wurde ein Skript erstellt, welches vollautomatisch Knochen detektiert und gleichzeitig Kallus von ortsständigem Knochen trennt, ohne für jede Struktur getrennte regions of interest (ROIs) zeichnen zu müssen. Wir ermittelten den Schwellenwert visuell durch zwei unabhängige Untersucher, um ortsständigen Knochen von Kallus zu trennen. Hierbei war der Unterschied in der Helligkeit der Pixel klar gegeben, und der Schwellenwert wurde anhand einer großen Anzahl von Proben festgelegt, so dass es sich um ein reproduzierbares Verfahren handelte (vgl. Abb. 3-9).

Der Schwellenwert des ortsständigen Knochens mit 370 stellte einen Kompromiss dar. Frakturfern – wo die Heilung beginnt – hätte er etwas höher gewählt werden können, da hier die Unterschiede in der Helligkeit des ortsständigen Knochens (gegenüber dem Kallus) geringer als im Frakturbereich waren. Damit würden die (proximal und distal vereinzelt) dichteren Kallusstrukturen nicht dem ortsständigen Knochen zugerechnet werden (sondern korrekterweise als zum Kallus zugehörig segmentiert). Im Frakturbereich hätte er vice versa ggf. eher niedriger sein sollen (vgl. Abb. 3-11 und Abb. 3-12). Abb. 5-1 zeigt ein relativ ausgeprägtes Beispiel in der 3D-Darstellung, während zwei andere Proben in der axialen 3D-Ansicht in Abb. 5-2 dargestellt sind.



**Abb. 5-1**  $\mu$ Ct, 3D: proximaler und distaler Kallus  
vereinzelte Kallusbereiche werden zum ortsständigen Knochen zugehörig segmentiert (grauer Kallus)



**Abb. 5-2**  $\mu$ Ct, 2D: proximaler und distaler Kallus  
vereinzelte Kallusbereiche werden zum ortsständigen Knochen zugehörig segmentiert, da die Unterschiede in der Helligkeit der Pixel (Dichte) zwischen sehr reifem Kallus und ortsständigem Knochen sehr gering sind

Der ‚Fehler‘ war aber immer gleich (systematischer Fehler), da durch die automatische Methode menschliche Segmentierungsfehler ausgeschlossen werden konnten und nur ein einzelner unterer Schwellenwert (jeweils für Kallus und ortsständigen Knochen) angewendet wurde.

Dadurch, dass die ROIs dem Knochen nicht exakt anliegen mussten und nicht jedes Stück ortsständigen Knochens und Kallus einzeln manuell segmentiert werden musste, ergab sich eine enorme Zeitersparnis und Minimierung der Fehlerquote.

Da wir aber immer nur eine äußere Kontur/ROI gezeichnet haben, konnten wir die volumenabhängigen Parameter BV/TV und BMD nicht bestimmen, da es hierzu erforderlich ist, den zu untersuchenden Knochen/jedes Segment mittels einer ROI zu umfahren und nicht wie von uns praktiziert, lediglich ein einzelnes äußeres ROI zu verwenden. Wir entschlossen uns dennoch für Letzteres, da es unser Ziel war, die vollautomatische Auswertung anzuwenden.

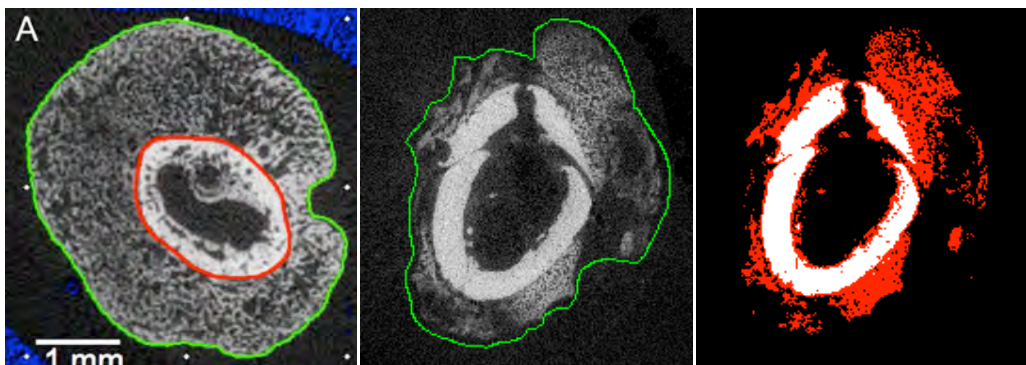
Die BMD stellt den mittleren Grauwert innerhalb der Konturen dar, also den Grauwert (Dichte) von Knochen und Mark. Dafür müssen die äußeren Konturen eng gezeichnet sein. Allerdings würde man bei nur einer Kontur keine getrennten Dichtewerte für Kallus und ortsständigen Knochen erhalten. Um dennoch einen aussagekräftigen Wert zu generieren, haben wir analog Morgan [Morgan 2009] die TMD bevorzugt. Diese stellt nur den Grauwert vom Knochenmaterial dar, also von dem, was segmentiert wurde.

Die Nachteile der TMD im Vergleich zur volumenabhängigen bone mineral density (BMD) bestehen in der Abhängigkeit vom Schwellenwert und den Partialvolumeneffekten (PV), welche ausgeglichen werden sollen, indem zwei Pixel von jeder Seite der Oberfläche abgezogen werden. Daher muss das Objekt mindestens fünf Pixel umfassen, was bei allen Proben der Fall war [Burghardt 2008, Kazakia 2008, Morgan 2009].

Die Masse, BMC, wird definiert als  $BMD \times TV$ . Da wir nicht die volumenabhängige BMD verwenden konnten, verwendeten wir  $TMD \times BV$  in mg, wobei für die von jeder Oberfläche ausgeschlossenen zwei Pixel die gleiche Dichte angenommen wurde [Morgan 2009].

Hätten wir BV/TV und BMD in die Statistik miteinbezogen, so wäre das TV zu groß gewesen (Abb. 5-3 Mitte). Die ganze Luft (in der Abbildung hypodens > 'schwarz'), die man eingeschlossen hätte, hätte den Wert verfälscht. Des Weiteren wäre die Kortikalis/der ortsständige Knochen mit eingeschlossen. Würde man – wie bisher üblich [Morgan 2009] – für jeden zu untersuchenden Knochenabschnitt immer zwei Konturen zeichnen, d.h. auch innen herum (im Uhrzeigersinn, negativ), so könnte man die volumenabhängigen Parameter verwenden (Abb. 5-3 links). Meist ist aber (anders

als in der Veröffentlichung von Morgan [Morgan 2009], Abb. 5-3 links) kein komplett zusammenhängender Kallus zu finden (und der endostale Kallus nicht mit dem periostalen Kallus verbunden). Finden sich also – und das ist die Regel – viele nicht zusammenhängende Knocheninseln mit Luft/Bindegewebe dazwischen (Abb. 5-3 Mitte/rechts), müsste man jedoch oftmals eine große Menge solcher Konturen zeichnen, was eine erhebliche Fehlerquelle und Zeitaufwand bedeutete und zudem teilweise nahezu unmöglich wäre. Daher haben wir einen Algorithmus entwickelt, mit welchem man mit einer ROI den gesamten Kallus erfassen und vom ortsständigen Knochen trennen kann (Abb. 5-3 Mitte/rechts). In Abb. 5-3 Mitte/rechts erkennt man 2 - 3 Knocheninseln ortsständigen Knochens und etwa 5 im Bereich des Kallus. Nach der bisher publizierten Methode hätte man also in dieser einen (!) Schicht etwa 5 ROIs für den Kallus zeichnen müssen, deren Abgrenzbarkeit manuell darüber hinaus noch sehr schwierig und ungenau gewesen wäre.



**Abb. 5-3** Vollautomatische 2-Schwellenwertauswertung zur Abgrenzung des Kallus vom ortsständigen Knochen  
 Links: einzelne Segmentierung des periostalen Kallus [aus Morgan 2009]  
 Mitte: 1 ROI trotz vieler einzelner Knocheninseln  
 Rechts: Kallus und ortsständiger Knochen (Kallus: rot) vollautomatisch segmentiert

Somit kann dieses vollautomatische Verfahren sicherlich als ein exakteres Verfahren bezeichnet werden.

Als weitere Parameter wurden Strukturparameter ermittelt. Diese dienen der einheitlichen Beschreibung und Quantifizierung der Mikroarchitektur untersuchter Objekte [Parfitt 1987, Underwood 1969]. Die 3D-stereologischen Indizes entsprechen den Definitionen der Standardhistomorphometrie, und deren Validität und Vergleichbarkeit zu anderen histomorphometrischen Methoden zur Analyse der Knochenarchitektur wurden in verschiedenen Arbeiten belegt [Barbier 1999, David 2003, Engelke 1999, Ito 1998, Kuhn 1990, Muller 1998, Thomsen 2005, Uchiyama 1997].

Tb. Th., DA und SMI konnten als nicht volumenabhängige Parameter uneingeschränkt verwendet werden. Die Strukturparameter, welche automatisch mittels der Software bestimmt werden, sind ursprünglich für den trabekulären Knochen definiert worden [Singh 1978]. In unserer Regenerationsstudie findet sich jedoch hauptsächlich Kallus, welcher sich zwischen den verschiedenen Therapieformen unterschiedlich stark ausgeprägt zeigt. Dies erschwert die Interpretation der Strukturparameter.

## 5.5 Histometrie

Trotz Weiterentwicklung der  $\mu$ CT-Technologie mit Pixelgrößen von bis zu einem halben  $\mu\text{m}$ , stellt die Histologie auf zellulärer Ebene den Goldstandard dar. Des Weiteren bietet sie die Möglichkeit, verschiedene Gewebe (z.B. Knorpel/Bindegewebe), welche bei der Stabilitätsbeurteilung des Kallus ebenfalls eine Rolle spielen können, darzustellen und zu differenzieren. Jedoch sind zeitlicher und personeller Aufwand trotz automatisierter Techniken hoch. Darüber hinaus fallen nicht unerhebliche Kosten an, und man hat das weiterhin ungelöste Problem, dass man 2D-Bilder von dreidimensionalen Strukturen erhält.

Im Sinne einer qualitativen/deskriptiven Auswertung wurden die Präparate visuell gescannt, um einen Überblick über das Vorhandensein/Verhältnis zwischen mineralisiertem und nicht mineralisiertem Gewebe zu gewinnen. Im Gegensatz dazu stehen die quantitativen Auswertungen (Punktezahlverfahren/Knochenflächenmessung), welche jederzeit reproduzierbar über modernste (automatisierte) Mikroskopie-Auswertungssysteme durchgeführt werden können [Gerstenfeld 2007].

Es existiert bis dato für die semiquantitative oder quantitative histologische Auswertung der Frakturheilung kein empfohlenes Standardmodell. Dies bezieht sich auch auf die standardisierte Detektion einer potentiellen Beschleunigung oder Verzögerung der Heilung. Bislang wurde eine subjektive Einteilung in verschiedene Heilungsstadien vorgenommen. Entweder wurde das histologische Bild im Sinne einer qualitativen Auswertung beschrieben [Hao 2007, Ro 1976, Simon 2002, Sudmann 1976], oder die Präparate wurden in verschiedene Stadien der Frakturheilung eingeteilt, um daraus eventuell signifikante Unterschiede zu erhalten. Eine Einteilung erfolgte beispielsweise mittels einer 10-Punkte-Skala [Altman 1995, Huo 1991], wobei diese Ergebnisse anschließend statistisch beurteilt wurden. Andere Autoren benutzten eine Fünf-Zonen-Feineinteilung im Bereich des Frakturspalt des Kallus, welche den mittleren Bereich des Kallus entlang der vermeintlich schwächsten Linie berücksich-



tigte [Krischak 2007c]. Entlang dieser Linie sei das morphologische Korrelat der biomechanischen Festigkeit (durch  $F_{max}$  und Stiffness ermittelt) zu erwarten. Hierbei lag ein Schwerpunkt der Auswertung auf der Entfernung von der Kortikalis, da der Außenbereich des Kallus für die mechanische Stabilität entscheidender sei als der Innenbereich in der Nähe des ortsständigen Knochens. Den Hintergrund dazu stellte die Tatsache dar, dass nach den Gesetzen der Mechanik die Stabilität eines Rohres – in diesem Fall des Knochens – mit dem Radius zunimmt. Eine Heilungsverzögerung müsste sich initial im Außenbereich des Kallus zeigen, da hier die knöcherne Überbrückung des Kallus beginnt. Dies konnte anhand von Diclofenac belegt werden [Krischak 2007c]. In der Korrelation zwischen Biomechanik und Histologie konnte nachgewiesen werden, dass eine hohe mechanische Festigkeit ( $F_{max}$  und Stiffness) einen hohen Knochenanteil bedeutet, wobei der Umkehrschluss nicht zutrifft. Das heißt, ein hoher Knochenanteil in der Außenzone des Kallus korreliert nicht mit einer hohen mechanischen Festigkeit. Somit ist ein hoher Knochenanteil für eine hohe Stabilität notwendig, jedoch keine *conditio sine qua non*. Dies führte zu einer schlechten Korrelation zwischen Histologie und Biomechanik [Beck 2003, Krischak 2007c].

Im Gegensatz zur  $\mu$ Ct oder der Biomechanik gingen in die histologische Beurteilung immer nur Teile eines Präparates ein: Dazu wurden aus dem zentralen Anteil zwei repräsentative Schnitte je Probe untersucht. Des Weiteren musste beachtet werden, dass pro 100  $\mu$ m-Schnitt durch die Dicke des Sägeblattes 300  $\mu$ m des Präparates verloren gehen. Durch die verlorengegangenen Bereiche/nicht berücksichtigten Randbereiche können sich (zum Gesamtpräparat/Randbereich) differierende Ergebnisse ergeben, welche sich bei kleinen Fallzahlen (in Tierversuchen) nicht immer ausgleichen können. Somit lassen sich nur eingeschränkt Rückschlüsse zur biomechanischen Stabilität aus histologischen Untersuchungen ableiten.

Ergebnisse von Studien zur Knochenregeneration in Frakturmodellen, welche nur histomorphometrische Auswertungen verwenden, jedoch keine zusätzliche biomechanische Prüfung der Präparate durchführen, sind daher unter diesem Aspekt kritisch zu sehen [Beck 2003, Krischak 2007c].

Die Histologie bietet jedoch eine zusätzliche Möglichkeit, die Weichgewebe und die zelluläre Ebene zu evaluieren. Daher haben wir die Histologie als supportive Modalität, welche die Aussagen der anderen Methoden untermauern sollte, angewendet.

## 5.6 Biomechanik

Während histologische Auswertungen nur bedingt Aussagen zur knöchernen Belastbarkeit machen können, ist es durch biomechanische Tests exakt möglich, hierzu quantitative und qualitative Ergebnisse zu generieren.

Biomechanische Untersuchungen können sowohl an frischen Präparaten als auch nach Lagerung der Proben durchgeführt werden. Sofern das Material jedoch nicht direkt nach Opfertung verwendet wird, sind Daten von biomechanischen Tests eher relativ als absoluter Natur. Von entscheidender Bedeutung sind Probenvorbereitung, Wässerung und Temperatur [Burstein 1972, Sedlin 1966]. Die beste Methode zum Knochenfixieren ist die Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  [Sedlin 1966, Turner 1993, van Haaren 2008]. Vor der Testung sollte der Knochen rehydriert sein. Um die genauesten Ergebnisse zu erzielen, sollte der Knochen bei  $37^{\circ}\text{C}$  gemessen werden, da dies aber wenig praktikabel ist, wird – wie von uns durchgeführt – im allgemeinen Schrifttum Raumtemperatur empfohlen [Turner 1992, Turner 1993].

Kräfte können auf drei Arten auf den Knochen einwirken: Als Kompressions-, Zug- und Scherkräfte. Kompression auf einen Knochen resultiert aus zwei entgegengerichteten Kräften, welche auf einer Linie verlaufen, während Zug entsteht, wenn zwei Kräfte auf einer Linie entgegengesetzt verlaufen. Scherkräfte entstehen, wenn zwei Kräfte, welche nicht auf einer Linie verlaufen, parallel gegeneinander gerichtet sind. In der Klinik können diese Kräfte kombiniert auftreten und zu verschiedenen Frakturmustern führen.

Generell stehen für die biomechanische Knochentestung vier etablierte Verfahren zur Verfügung: Zug-, Biege-, Kompressions- und Torsionstests. Der Zugtest erfordert relativ große Proben [Harrigan 1988] und verursacht eine reine Querfraktur [Einhorn 1992a]. Kompressionstests sind vor allem für spongiösen Knochen (Wirbel/Schenkelhals) weit verbreitet, wobei gerade hier auch kleine Proben gemessen werden können [Leppanen 2008]. Dabei wird eine Schrägfraktur produziert [Einhorn 1992a]. Des Weiteren simulieren Kompressionstests gerade im Wirbelbereich die in vivo-Belastung, wo auch ein hoher spongiöser Anteil von 66 - 90% zu finden ist [Einhorn 1992a, Turner 1993]. Genauer jedoch sind Biegetests, welche bei uns zur Anwendung kamen. Diese sind bei Nagetieren weit verbreitet. Sie verursachen auf der konkaven Seite Kompression und auf der konvexen Seite Zugbeanspruchung. Knochen ist gegenüber Kompression robuster als gegenüber Spannung, so dass

eine Fraktur normalerweise (erst) auf der Zugseite entsteht [Reilly 1975, Turner 1993]. Letztendlich entsteht eine Querfraktur (mit einem kleinen Biegekeil auf der konkaven Seite) [Einhorn 1992a]. Dabei kann die 3-Punkt- und die deutlich seltenere 4-Punkt-Biegung unterschieden werden [Leppanen 2008]. Der entscheidende Vorteil der 3-Punkt-Biegung ist ihre Einfachheit sowie ihre häufige Anwendung und damit ihre Vergleichbarkeit. Der Biegemechanismus stellt zudem einen der häufigeren klinischen Frakturmuster dar [Einhorn 1992a]. Die Knochen können ohne Einbettung getestet werden. Der Nachteil liegt in der maximalen Belastung über nur einem Punkt des Knochens, verbunden mit dem Auftreten von Scherkräften im Mittelteil des Knochens. Daher wird der Knochen immer an diesem Punkt brechen [Burstein 1971].

Nachteilig sind bei beiden Verfahren die Scherkräfte zwischen unteren und oberen Auflagen, die bei abnehmender Distanz größer werden.

Die horizontalen Scherkräfte sind bei der 4-Punkt-Biegung nicht vorhanden, hier wird die maximale Kraft über eine größere Fläche verteilt. Daher bricht der Knochen hier nicht in der Mitte, sondern an seinem strukturell schwächsten Punkt zwischen den Auflagen [Burstein 1971]. Das Problem ist jedoch, dass die Kraft bei jedem Auflagepunkt gleich groß sein muss, was bei ganzen Knochen schwierig sein kann. Ein weiterer Nachteil ist die Quetschung des Knochens durch hohe Querkräfte bei geringem Abstand zwischen den oberen und unteren Auflagen.

Daher wird bei Nagetieren die 3-Punkt-Biegung vorgezogen [Turner 1993]. Torsionstests induzieren maximale Scherkräfte an der Oberfläche und minimale Scherkräfte im Inneren. Sie wirken sich auf die ganze Länge des Knochens aus und führen in der Regel zu (klinisch seltenen) Spiralfrakturen [Einhorn 1992a]. Vorteilhaft an der Rotationstestung jedoch ist, dass hier leichte Veränderungen in der Knochengeometrie keine relevanten Auswirkungen auf eine gleichmäßige Verteilung des Drehmomentes über die gesamte Femurlänge und somit auf die Quantifizierung der Rotationssteifigkeit haben [Lind 2001]. Hier müssen die Knochenenden jedoch eingebettet werden [Einhorn 1992b], zudem werden Torsionstests selten zur Testung von ganzen Knochen bei Nagetieren angewandt [Leppanen 2008].

Im Rahmen biomechanischer Untersuchungen ist vor allem die Versagenslast letztlich in der Lage, über die Stabilität des getesteten Knochens Auskunft zu geben [Jarvinen 2005, Leppanen 2008]. Gerade sie kann bereits bei einer kleinen Gruppengröße von 11 Tieren einen Behandlungseffekt auf Signifikanzniveau zeigen. Die

Variabilität der Ergebnisse an unfrakturierten Kontrollfemora schwankt laut Literatur am wenigsten bei der Versagenslast. Hier beobachtet man die größte Konstanz der Ergebnisse bei der 3-Punkt-Biegung, während die Resultate der 4-Punkt-Biegung oder der Torsionsmessungen einer größeren Variabilität unterliegen [Leppanen 2008]. Diese Daten decken sich mit denen anderer Spezies, so dass wir uns für unser Tier-/Frakturheilungsmodell und die beschriebene biomechanische Auswertung entschieden haben.

Um möglichst exakte Ergebnisse zu erzielen, ist es notwendig, Messungenauigkeiten zu minimieren. Ursache für diese könnte ein systematischer Fehler – bedingt durch inter- und intraindividuelle Varianz und Unregelmäßigkeiten während der Messung – sein, der in Summe die Effektgrößen experimenteller Veränderungen durch beispielsweise Pharmaka übertrifft. Daher könnte versucht werden, den systematischen Fehler durch methodische Änderung des experimentellen Setups weiter zu verkleinern.

Einen sehr engen Gewichtsbereich der Tiere hatten wir bereits gewählt, um diese Ursache für Unregelmäßigkeiten auszuschließen.

Eine zusätzliche Versuchsoptimierung könnte durch eine individualisierte Anpassung der Versuchsanordnung erreicht werden, da die Länge der getesteten Knochen beziehungsweise der Abstand der Auflageflächen maßgeblich die Versagenslast beeinflusst. Dabei wurden in eigenen Untersuchungen erstmals die Auflageflächen und der einwirkende Kraftarm prozentual an die Länge des zu testenden Knochens adaptiert. Im Vergleich zu Femora von gewichtsäquivalenten Tieren, die mit einer fixen Spannlänge biomechanisch getestet worden waren, gelang durch die Versuchsanordnung eine signifikante Verbesserung der interindividuellen Varianz [Prodingner 2010].

So könnte in nachfolgenden Studien der Messfehler weiter reduziert werden. Dadurch würden vor allem die biomechanischen Daten als härtestes Kriterium an Bedeutung gewinnen. Laut Jarvinen ist nämlich die Messung ganzer Knochen immer noch der Goldstandard [Jarvinen 2005]. Im Rahmen von nachfolgenden Untersuchungen wäre es gegebenenfalls sinnvoll, eine Korrelation zwischen Biomechanik und  $\mu$ CT vorzunehmen.

## 5.7 Medikamente

Wegen der besseren Vergleichbarkeit zum Menschen wurde die parenterale Gabe der oralen Gabe vorgezogen. Gegen die orale Gabe spricht, dass diese Form der Applikation über eine zweimal pro Tag gelegte Magensonde durchgeführt hätte werden müssen. Diese unnatürliche Art der Applikation ist zudem aufwendig. Gegen eine orale Gabe (ad libitum) spricht, dass diese schwierig sicherzustellen ist. Selbst wenn man das Tier isoliert, müsste der Wirkstoff aufwendig – beispielsweise in Fruchtgelée – verpackt werden [Flecknell 1994, Liles 1993]. Dadurch ist aber weder eine schnelle noch eine komplette Aufnahme garantiert [Nungu 1995]. Zudem wird empfindlich das Sozialleben gestört. Daher bevorzugten wir die sichere und schnelle subkutane Gabe der Medikamente.

Um sicherzustellen, dass die Applikationsart und -menge des jeweiligen Medikaments korrekt sind, könnte es sinnvoll sein, im Rahmen eines Vorversuchs Plasma- und Wirkspiegel einzustellen. Dies gilt gerade für neuere Medikamente, zu denen noch nicht so viele Studien veröffentlicht sind, wie zu den hier verwendeten.

### *Diclofenac*

Die Diclofenac-Dosis von 5 mg/kg KG pro Tag wurde aus der Literatur übernommen. Vorangegangene Publikationen haben gezeigt, dass bei der Ratte eine 2,5-fache Dosis notwendig ist, um humanäquivalente pharmakologische Daten zu generieren [Beck 2003, Krischak 2007b, Simon 2007]. Hierbei wurde eine Dosis von 150 mg/Tag Diclofenac (analog 2 mg/kg KG) berücksichtigt, welche bei einem 75 kg schweren Menschen üblich ist.

Die ermittelten Serumwerte zeigten, dass Art und Menge der Applikation von Diclofenac zu Spiegel im therapeutisch erwünschten Bereich von 0,1 - 2,5 µg/ml führten. Die mittlere Serumkonzentration betrug nach der ersten Abnahme 1,34 µg/ml und bei der zweiten Abnahme 2,33 µg/ml.

Für Diclofenac konnte bereits eine in vivo-Frakturheilungsverzögerung biomechanisch, CT-morphologisch und histometrisch nachgewiesen werden [Beck 2003, Krischak 2007c]. Die Heilungsverzögerung unter NSAR-Gabe setzt wohl bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt ein [Beck 2003, Krischak 2007c, Reikeraas 1998]. Nach einer Fraktur ist ein Anstieg in der Sekretion von Prostaglandinen durch Osteoblasten zu finden [Dekel 1981]. Diclofenac scheint die Osteoblasten in vitro bereits früh zu

hemmen [Kaspar 2005], wobei die Konzentrationen den in vivo gebräuchlichen entsprechen könnten [Matziolis 2002]. Prostaglandine scheinen allerdings einen positiven Effekt auf Zellproliferation und -synthese zu haben [Frost 1997, Krischak 2007c]. Diese Erkenntnisse sind bedeutend, da NSAR in der klinischen Anwendung zur Analgesie häufig kurzzeitig nach Operationen oder Traumata gegeben werden. Da es hierzu noch keine Studien mit so umfangreicher Methodik (Kombination aus  $\mu$ CT/Histologie/Biomechanik) wie unserer gab, wählten wir ebenfalls Diclofenac.

### *Prednisolon*

Die Prednisolon-Dosis von 0,5 mg/kg KG pro Tag, um humanäquivalente pharmakologische Daten zu generieren, wurde aus der Literatur übernommen [Newman 1987]. Die ermittelten Serumwerte zeigten, dass Art und Menge der Applikation von Prednisolon zu Spiegeln im therapeutisch erwünschten Bereich von 30 - 400 ng/ml führten. Die mittlere Serumkonzentration betrug nach der ersten Abnahme 94,05 ng/ml und nach der zweiten Abnahme 40,01 ng/ml.

Physiologische humane Dosen von Glukokortikoiden in vivo sind äquivalent zu Dosen, die in vitro maximal stimulierenden Effekt auf Osteoblasten haben. Erhöht man in vitro die Dosis über die optimale Konzentration, sinkt die Differenzierungsfähigkeit der Osteoblasten ab. In Übereinstimmung mit den in vitro-Beobachtungen kommt es in vivo bei extern zugeführten Glukokortikoiden nur zu hemmenden Effekten auf die Knochenbildung – egal bei welcher Dosis [Ishida 1998].

Anders als Cyclooxygenase-Hemmer, die erst bei der Konversion von Arachidonsäure zu Prostaglandinen in die Biosynthese eingreifen, unterbinden Glukokortikoide die Herstellung der Arachidonsäure und greifen so bereits früher als NSAR in den zur Prostaglandinsynthese führenden Prozess ein [Spies 2011]. Somit könnten Glukokortikoide eine schwerwiegende(re) Beeinträchtigung der Knochenheilung nach sich ziehen [Ho 1995, Luppen 2002, Waters 2000].

Es gibt jedoch keinen klaren Beweis dafür, dass die Frakturheilung bei Patienten, welche unter Glukokortikoidmedikation stehen, eingeschränkt ist [Iwamoto 2010]. Langzeitmedikation von 5,5 Wochen bis 3,5 Monaten zeigte bei Kaninchen (Ulnarosteotomie) und Ratten (geschlossene/offene Femurfraktur) eine eingeschränkte Frakturheilung [Bostrom 2000, Gilley 2009, Iwamoto 2010, Luppen 2002, Newman 1987, Waters 2000], während Kurzzeitmedikation von 3 - 4 Tagen in einem Femur-

osteotomiemodell der Ratte keinen Einfluss auf die Biomechanik oder Histologie hatte [Aslan 2005, Hogevoold 1992]. Hierbei reichten die verabreichten Dosen von 0,02 mg/kg KG bis 2 mg/kg KG pro Tag. Daher stellte sich für uns die Frage, wie sich eine Prednisolontherapie über einem Zeitraum von drei Wochen auf die Frakturheilung auswirken würde.

### *Cefuroxim*

Die Cefuroxim-Dosis von 30 mg/kg KG pro Tag, um humanäquivalente pharmakologische Daten zu generieren, wurde aus der Literatur übernommen [Chen 2006, Huddleston 2000].

Die ermittelten Serumwerte zeigten, dass Art und Menge der Applikation von Cefuroxim zu Spiegeln im therapeutisch erwünschten Bereich von 2 - 20 µg/ml führten. Die mittlere Serumkonzentration betrug nach der ersten Abnahme 3,07 µg/ml und bei der zweiten Abnahme 5,65 µg/ml.

Eine neuere Studie zeigte, dass höhere Dosen von Cefuroxim die Proliferation, Differenzierung und den Metabolismus von Osteoblasten *in vitro* stark beeinträchtigt haben. Dies war nach 72 Stunden (dem längsten Beobachtungszeitraum) am meisten ausgeprägt. Diese Nebenwirkungen scheinen zumindest partiell reversibel. Niedrigere Konzentrationen jedoch steigerten die Proliferation, den Metabolismus und die Calciumablagerung [Salzmann 2007]. Da auch dieses Medikament häufig eingesetzt wird, war es für den klinischen Alltag von großer Bedeutung, die Wirkung *in vivo* genauer zu untersuchen. Bislang gibt es noch keine veröffentlichte (*in vivo*-)Studie, in welcher der Einfluss von Cefuroxim auf die Frakturheilung untersucht wurde.

Aufgrund der kontinuierlichen Arzneimittelfreisetzung aus dem Zement kann die Verwendung von Antibiotika-imprägniertem Knochenzement zur Infektionsprophylaxe zusätzlich zu einer längeren Antibiotika-Wirkung mit hohen Konzentrationen auf Knochenzellen führen, wobei der Wirkmechanismus noch nicht näher identifiziert werden konnte [Mader 1997]. Dies könnte im Fall von Cefuroxim zu eingeschränktem Stoffwechsel, schlechterer Einheilung und frühzeitigem Implantatverlust führen [Salzmann 2007]. Daher sollten weitere Studien durchgeführt werden, welche die Freisetzungskinetik von Cefuroxim-imprägniertem Knochenzement sowie seine erreichbaren lokalen Konzentrationen untersuchen. *In vivo* müssen diese Effekte auf die Knochenheilung untersucht werden.

## 5.8 Ergebnisse

### *Diclofenac*

Die Diclofenacgruppe zeigte signifikant niedrigere Werte für BV und BMC im Vergleich zur Kontrollgruppe. Gelegentlich kam es zu Diastasen des Frakturspaltes. In der Histometrie zeigte sich bei nur 29% der Proben mineralisierter Kallus im Bereich des Frakturspaltes, wobei mit 57% am häufigsten Bindegewebe nachzuweisen war (negatives Verhältnis von Knochen/Knorpel/Bindegewebe).

Auch von Krischak konnte dieses Phänomen histomorphometrisch verifiziert werden. Sowohl der knöcherne Anteil im Bereich des Frakturspaltes als auch die knöchernen Brücken waren erniedrigt, während der Anteil an Knorpel erhöht war [Krischak 2007c]. Ebenso bei Tiseo et al. zeigte sich eine Verzögerung des Knochenremodelling, da hier der mineralisierte Anteil innerhalb des Kallus gering war und im zeitlichen Verlauf noch abnahm (von zwei zu vier Wochen) [Tiseo 2006]. Hier wurde jedoch nur die Histologie zu Rate gezogen. Sie vermuten eine simultane Inhibition von COX-1 und COX-2. Zusätzlich könnte eine dosisabhängige Hemmung der Osteoblasten vorliegen [Kaspar 2005]. Die Knochenbildung scheint bei Diclofenac erniedrigt, und die Resorption erhöht. Der SMI betrug  $0,08 \pm 0,72$  und nahm als einziger der Gruppen einen positiven Wert ein. Somit lag eine eher plattenähnliche Struktur vor. Trotz nahezu gleicher Dichte der Gruppen zeigte sich hier ein Unterschied, was unter Vorbehalt für einen weniger stabilen Knochen sprechen könnte, da man hier auch auf die Belastungssituation rückschließen kann [Bevill 2006]. Die trabekuläre Dicke war gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt, was für ein schwächeres Netzwerk sprechen kann. Betrachtet man die knöcherne Frakturspaltüberbrückung, so ließ sich diese in der Kontrollgruppe zu 33% und in der Cephalosporingruppe zu 50% nachweisen, während diese in der Diclofenacgruppe nur 14% betrug.

Biomechanisch zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich erniedrigte  $F_{max}$ , wobei eine relativ hohe Standardabweichung der Kontrolle einen möglichen signifikanten Unterschied verhinderte. Die Stiffness der Diclofenacgruppe war analog zu Beck im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt [Beck 2003].

Zusammengefasst zeigte die Diclofenacgruppe mittels  $\mu$ CT und Biomechanik eine gegenüber der Kontrolle signifikant eingeschränkte Frakturheilung, was durch die Histologie bestätigt werden konnte.



Somit sollte vor allem bei Patienten mit Risikofaktoren (Arteriosklerose, Diabetes mellitus, Nikotinabusus) für eine verzögerte Knochenheilung beispielsweise auf Opiode oder Metamizol zur postoperativen Analgesie ausgewichen werden – gerade wenn die analgetische Wirkung im Vordergrund steht [Geusens 2013, Histing 2011]. Trotz der Beeinträchtigung der Frakturheilung ist allerdings die antiphlogistische Wirkung ein großer Vorteil neben der analgetischen Wirkung, um das postoperative und posttraumatische Wundödem zu reduzieren [Krischak 2007c].

### *Prednisolon*

Betrachtet man die Daten der Prednisolongruppe, so zeigte sich kein signifikanter Unterschied des erhöhten BV im Vergleich zur Kontrollgruppe. Jedoch war es signifikant höher als das der Diclofenac- und Cephalosporingruppe.

In einer aktuellen Arbeit [Iwamoto 2010] zeigte die Prednisolongruppe in einem Rattenfemurfrakturmodell histomorphometrisch ebenfalls eine Erhöhung der Knochengesamtfläche, wobei hier der Geflechtknochen erhöht war, während der Lamellenknochen erniedrigte Werte zeigte. Hierbei zeigte sich gegenüber der Kontrolle ein langsamerer Übergang von Geflechtknochen zu Lamellenknochen innerhalb des Kallus, was mit einer Verzögerung der Frakturheilung gleichkommt. In den konventionellen Röntgenbildern war der Osteotomiespalt noch deutlicher zu sehen als in der Kontrollgruppe. Allerdings fehlen in dieser Arbeit biomechanische und Schnittbilduntersuchungen.

Weinstein konnte eine verringerte Osteoklastenproduktion nachweisen, was zu einer Reduktion des Remodelling führt [Weinstein 1998]. King konnte in einer Studie nachweisen, dass die Masse und Dichte von Rattenknochen nach Dexamethasontherapie zunahm [King 1996], da die Resorption vermutlich stärker verringert war als die Neubildung. Betrachtet man in unserer Studie histologisch die knöcherne Frakturspaltüberbrückung, so ließ sich diese nur zu 17% nachweisen (trotz hohem Kallus-BV). Auch Newman konnte an der Tibia der Ratte nachweisen, dass die Prednisolongruppe eine Heilungsverzögerung von 5 Tagen gegenüber der Kontrollgruppe aufwies [Newman 1987], wobei es zu einer verzögerten Vereinigung der Frakturenden und einem verzögertem Abbau des Kallus kam.

Der SMI war mit -1,30 signifikant niedriger als der SMI der anderen Therapiegruppen und zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe einen ‚Trend‘. Negative Werte sprechen

für dichte, stabile Strukturen. Die trabekuläre Dicke war gegenüber der Diclofenacgruppe signifikant höher. Bei der Interpretation der Strukturparameter sollte man vorsichtig sein, da sie initial für rein trabekulären Knochen definiert wurden.

Biomechanisch zeigte sich eine deutlich erniedrigte  $F_{max}$  ( $54,30 \pm 28,68$ ), welche als Absolutwert jedoch keine Signifikanz gegenüber der Kontrolle ( $77,65 \pm 41,82$ ) erreichte. Dies ist am ehesten durch die erhöhte Standardabweichung der Kontrollgruppe bedingt. Im Vergleich zu Cephalosporin ( $78,54 \pm 20,52$  > ähnlicher Wert wie Kontrollgruppe) zeigte sich eine signifikante Erniedrigung. Die Stiffness der Prednisolongruppe war im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt, jedoch nicht signifikant.

Die Histometrie bestätigte die Alteration. Hier zeigte sich im Vergleich zu den anderen Gruppen eine seltenere Frakturspaltüberbrückung sowie ein negatives Verhältnis von Knochen/Knorpel/Bindegewebe.

Somit hatte die 3-wöchige postoperative Gabe von Prednisolon eine beeinträchtigte, verzögerte Frakturheilung zur Folge. Zu einem etwas späteren Zeitpunkt wiesen schon Newman mit gleicher Dosierung (30 Tage post operationem) bzw. Gilley mit höherer Dosierung (28 Tage post operationem) eine eingeschränkte Frakturheilung nach [Gilley 2009, Newman 1987]. Ganz kurze Applikationen (3 - 4 Tage) führten zu keiner Beeinträchtigung [Aslan 2005, Hogevoold 1992].

Zusammengefasst zeigten sich biomechanisch im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich niedrigere Absolutwerte, wobei signifikante Unterschiede knapp verfehlt wurden. Die Alterationen bestätigten sich in Zusammenschau mit mikrocomputertomografischen und histometrischen Untersuchungen.

### *Cefuroxim*

Die Cefuroximgruppe zeigte gegenüber der Kontrollgruppe in den mikrocomputertomografischen Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede. Biomechanisch zeigten sich sowohl bezüglich  $F_{max}$  ( $p = 0,95$ ) als auch bezüglich Stiffness ( $p = 0,97$ ) sehr hohe Korrelationen zur Kontrollgruppe.  $F_{max}$  der Cephalosporingruppe war (im Gegensatz zu  $F_{max}$  der Kontrollgruppe) jedoch signifikant besser als  $F_{max}$  der Prednisolongruppe.  $F_{max}$  relativ (Cefuroxim) zeigte sogar gegenüber Diclofenac einen ‚Trend‘ ( $p = 0,06$ ). Hier konnte der positive Einfluss auf den Metabolismus von Osteoblasten in niedrigeren Dosen (i.v.-Dosen), welchen Salzmann in vitro nachweisen konnte [Salzmann 2007], in vivo nachvollzogen werden. Bislang existierte noch keine veröffentlichte (in vivo-)Studie, in welcher der Einfluss von Cefuroxim auf die

Frakturheilung untersucht wurde. Analog der Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikant höhere Stiffness der Cephalosporingruppe gegenüber der Diclofenacgruppe. Histomorphometrisch ließ sich in der Cephalosporingruppe zu 50% – und damit häufiger als in den anderen Gruppen – eine knöcherne Frakturspaltüberbrückung nachweisen. Das Verhältnis Knochen/Knorpel/Bindegewebe war das günstigste. Insgesamt zeigten sich somit bezüglich Cefuroxim nach 3 Wochen keine negativen Auswirkungen auf die Frakturheilung verglichen mit den anderen beiden Medikamenten und der Kontrollgruppe, so dass sich die hemmenden in vitro-Beobachtungen bei hohen Konzentrationen im Tiermodell (Cefuroxim-imprägnierter Knochenzement) nicht bestätigt haben. Dies ist insbesondere unter dem Aspekt der Dauer der Applikation wichtig, da sich die negativen Auswirkungen in vitro über die Zeit am meisten ausgeprägt zeigten.

#### *Ausblick*

Mit Hilfe der Fluoreszenzauswertung, welche Gegenstand einer anderen Promotion ist, können gegebenenfalls genauere Aussagen über den zeitlichen Verlauf einer Alteration der Knochenheilung gemacht werden. Mit den hier angewendeten, standardisierten und geeigneten Methoden sollte der Einfluss weiterer, neuer Medikamente auf die Knochenbruchheilung untersucht werden (z. B. Rivaroxaban).

Weitere Arbeiten sollten die Freisetzungsscharakteristik und die erreichbaren lokalen Konzentrationen nach Anwendung von Cefuroxim-imprägniertem Knochenzement untersuchen [Salzmann 2007]. In vivo müssen diese Effekte auf die Knochenheilung untersucht werden.

Auf der Basis der vorgestellten Daten müssten weitere Untersuchungen zur Verbesserung der Knochenheilung unter beeinträchtigten Bedingungen gemacht werden, da es beispielsweise allein in den USA 250000 schlecht heilende Frakturen pro Jahr gibt [Bostrom 2000]. Hierbei gibt es beispielsweise bereits lokale Ansätze mittels BMP-2 [Luppen 2002] oder extrakorporaler Stoßwellentherapie [Tischer 2008] und systemisch mit dem Parathormon related Protein PTHrP Analog RS-66271 oder Vitamin K2 [Bostrom 2000, Iwamoto 2010]. Neue Technologien, wie Stammzell- und Gentherapie, besitzen ein enormes Potential, die Knochenregeneration zu verbessern [Lau 2013, Siddiqui 2013]. Mittels „Gentherapie“, also dem Einbringen von Genen in Zellen, um die genetische Information durch Nukleinsäuren zu vermitteln und einen the-

rapeutischen Nutzen zu erzielen [Avery 1944, Fischer 2010, Geusens 2013, Kolk 2011], wäre es möglich, den Körper selbst die gezielte Produktion von WF am Ort einer Fraktur übernehmen zu lassen.

## 6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde anhand eines Frakturmodells der Ratte der Einfluss von Cephalosporin, Diclofenac und Prednisolon auf die Frakturheilung detailliert untersucht. Es kamen radiologische, biomechanische und histologische Verfahren zum Einsatz.

Die Versuche wurden an ausgewachsenen männlichen Wistar-Ratten (Alter: 16 Wochen) durchgeführt. Die 64 eingeschlossenen Versuchstiere wurden in 2 Gruppen aufgeteilt. Gruppe A bestand aus 25 Tieren und wurde der Auswertung mittels  $\mu$ CT [Knochenvolumen (BV), -dichte (TMD) und -masse (BMC) und trabekuläre Strukturparameter] und Histomorphometrie (semiquantitativ) zugeführt. Die biomechanische Auswertung (Fmax und Stiffness) erfolgte an den 39 Tieren der Gruppe B. Allen Versuchstieren wurde durch eine Drei-Punkt-Biegung nach vorangegangener Marknagelung eine standardisierte Femurfraktur im Bereich der Diaphyse des Knochens gesetzt. Es erfolgten konventionell radiologische Kontrollen. Die Überlebenszeit betrug für alle Tiere 21 Tage.

Die Diclofenacgruppe zeigte mittels  $\mu$ CT und Biomechanik eine gegenüber der Kontrolle signifikant eingeschränkte Frakturheilung, was durch die Histologie bestätigt werden konnte. Eine Prednisolon-Kurzzeittherapie über drei Wochen führte biomechanisch im Vergleich zur Kontrollgruppe zu deutlich niedrigeren Absolutwerten, wobei signifikante Unterschiede knapp verfehlt wurden. Die Alterationen bestätigten sich in Zusammenschau mit mikrocomputertomografischen und histometrischen Untersuchungen.

Die Cefuroximgruppe zeigte gegenüber der Kontrollgruppe in den mikrocomputertomografischen und biomechanischen Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede. Fmax der Cephalosporingruppe war (im Gegensatz zu Fmax der Kontrollgruppe) jedoch signifikant besser als Fmax der Prednisolongruppe. Fmax relativ (Cefuroxim) zeigte sogar gegenüber Diclofenac einen ‚Trend‘ ( $p = 0,06$ ). Histomorphometrisch zeigte sich am häufigsten eine Frakturspaltüberbrückung.

Die negativen Auswirkungen von Diclofenac auf die Frakturheilung konnten auch in unserer Studie bestätigt werden, weshalb bei Risikofaktoren (Arteriosklerose, Diabetes mellitus, Nikotinabusus) beispielsweise auf Opioide oder Metamizol ausgewichen werden sollte – gerade wenn die analgetische Wirkung im Vordergrund steht. Liegen diese nicht vor, stellt die antiphlogistische Wirkung einen großen Vorteil neben der

analgetischen Wirkung dar, um das postoperative und posttraumatische Wundödem zu reduzieren.

Die 3-wöchige postoperative Gabe von Prednisolon hatte eine beeinträchtigte, verzögerte Frakturheilung zur Folge.

In vitro beeinträchtigten höhere Dosen von Cefuroxim die Proliferation, Differenzierung und den Metabolismus von Osteoblasten stark, was sich jedoch in vivo nicht bestätigte. Hier konnte der positive Einfluss auf den Metabolismus von Osteoblasten in niedrigeren Dosen, welchen Salzmann in vitro nachweisen konnte [Salzmann 2007], tendenziell in vivo nachvollzogen werden.

Es wurde als Nebenziel auch überprüft, ob es möglich sei, mittels  $\mu$ CT vollautomatisch Kallus von ortsständigem Knochen zu trennen. Dazu entwickelten wir ein Skript, welches vollautomatisch den Knochen detektiert und gleichzeitig Kallus von ortsständigem Knochen trennt, ohne für jede Struktur einzelne regions of interest (ROIs) zeichnen zu müssen (vollautomatisches Zweiswellenwertverfahren). Es mussten dabei nur etwa 16 äußere ROIs gezeichnet werden, dazwischen wurde interpoliert. Dieses Verfahren hat insbesondere neben der enormen Zeitersparnis den Vorteil, dass das teilweise nahezu unmögliche Trennen des Knochens durch viele ROIs innerhalb des Frakturbereiches entfällt, und damit die Präzision steigt.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Akman, S., Gogus, A., Sener, N., Bilgic, B., Aksoy, B., Seckin, F. Effect of diclofenac sodium on union of tibial fractures in rats. *Adv Ther* 19 (2002) 119-125
2. Allen, H.L., Wase, A., Bear, W.T. Indomethacin and aspirin: effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. *Acta Orthop Scand* 51 (1980) 595-600
3. Altman, R.D., Latta, L.L., Keer, R., Renfree, K., Hornicek, F.J., Banovac, K. Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on fracture healing: a laboratory study in rats. *J Orthop Trauma* 9 (1995) 392-400
4. Amling, M., Herden, S., Posl, M., Hahn, M., Ritzel, H., Delling, G. Heterogeneity of the skeleton: comparison of the trabecular microarchitecture of the spine, the iliac crest, the femur, and the calcaneus. *J Bone Miner Res* 11 (1996) 36-45
5. Aslan, M., Simsek, G., Yildirim, U. Effects of short-term treatment with systemic prednisone on bone healing: an experimental study in rats. *Dent Traumatol* 21 (2005) 222-225
6. Avery, O.T., Macleod, C.M., McCarty, M. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. *J Exp Med* 79 (1944) 137-158
7. Back, M., Yin, L., Ingelsson, E. Cyclooxygenase-2 inhibitors and cardiovascular risk in a nation-wide cohort study after the withdrawal of rofecoxib. *Eur Heart J* (2011)
8. Barbier, A., Martel, C., de Vernejoul, M.C., Tirode, F., Nys, M., Mocaer, G., Morieux, C., Murakami, H., Lacheretz, F. The visualization and evaluation of bone architecture in the rat using three-dimensional X-ray microcomputed tomography. *J Bone Miner Metab* 17 (1999) 37-44
9. Beck, A., Krischak, G., Sorg, T., Augat, P., Farker, K., Merkel, U., Kinzl, L., Claes, L. Influence of diclofenac (group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs) on fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 123 (2003) 327-332
10. Bensaid, W., Oudina, K., Viateau, V., Potier, E., Bousson, V., Blanchat, C., Sedel, L., Guillemin, G., Petite, H. De novo reconstruction of functional bone by tissue engineering in the metatarsal sheep model. *Tissue Eng* 11 (2005) 814-824
11. Bergenstock, M., Min, W., Simon, A.M., Sabatino, C., O'Connor, J.P. A comparison between the effects of acetaminophen and celecoxib on bone fracture healing in rats. *J Orthop Trauma* 19 (2005) 717-723

12. Betz, O.B., Betz, V.M., Nazarian, A., Pilapil, C.G., Vrahas, M.S., Bouxsein, M.L., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T.A., Evans, C.H. Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 88 (2006) 355-365
13. Bevill, G., Eswaran, S.K., Gupta, A., Papadopoulos, P., Keaveny, T.M. Influence of bone volume fraction and architecture on computed large-deformation failure mechanisms in human trabecular bone. *Bone* 39 (2006) 1218-1225
14. Blunt, J.W., Jr., Plotz, C.M., Lattes, R., Howes, E.L., Meyer, K., Ragan, C. Effect of cortisone on experimental fractures in the rabbit. *Proc Soc Exp Biol Med* 73 (1950) 678-681
15. Bonnarens, F., Einhorn, T.A. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 2 (1984) 97-101
16. Bostrom, M.P., Gamradt, S.C., Asnis, P., Vickery, B.H., Hill, E., Avnur, Z., Waters, R.V. Parathyroid hormone-related protein analog RS-66271 is an effective therapy for impaired bone healing in rabbits on corticosteroid therapy. *Bone* 26 (2000) 437-442
17. Boxma, H., Broekhuizen, T., Patka, P., Oosting, H. Randomised controlled trial of single-dose antibiotic prophylaxis in surgical treatment of closed fractures: the Dutch Trauma Trial. *Lancet* 347 (1996) 1133-1137
18. Brown, K.M., Saunders, M.M., Kirsch, T., Donahue, H.J., Reid, J.S. Effect of COX-2-specific inhibition on fracture-healing in the rat femur. *J Bone Joint Surg Am* 86-A (2004) 116-123
19. Bruder, S.P., Kraus, K.H., Goldberg, V.M., Kadiyala, S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 80 (1998) 985-996
20. Buchholz, H.W., Engelbrecht, H. [Depot effects of various antibiotics mixed with Palacos resins]. *Chirurg* 41 (1970) 511-515
21. Burghardt, A.J., Kazakia, G.J., Laib, A., Majumdar, S. Quantitative assessment of bone tissue mineralization with polychromatic micro-computed tomography. *Calcif Tissue Int* 83 (2008) 129-138
22. Burstein, A.H., Currey, J.D., Frankel, V.H., Reilly, D.T. The ultimate properties of bone tissue: the effects of yielding. *J Biomech* 5 (1972) 35-44
23. Burstein, A.H., Frankel, V.H. A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech* 4 (1971) 155-158
24. Chen, X., Schmidt, A.H., Tsukayama, D.T., Bourgeault, C.A., Lew, W.D. Recombinant human osteogenic protein-1 induces bone formation in a



- chronically infected, internally stabilized segmental defect in the rat femur. *J Bone Joint Surg Am* 88 (2006) 1510-1523
25. Cheung, K.M., Kaluarachi, K., Andrew, G., Lu, W., Chan, D., Cheah, K.S. An externally fixed femoral fracture model for mice. *J Orthop Res* 21 (2003) 685-690
  26. Chikazu, D., Fujikawa, Y., Fujihara, H., Suenaga, H., Saijo, H., Ohkubo, K., Ogasawara, T., Mori, Y., Iino, M., Takato, T. Cyclooxygenase-2 activity is important in craniofacial fracture repair. *Int J Oral Maxillofac Surg* 40 (2011) 322-326
  27. Chiu, F.Y., Chen, C.M., Lin, C.F., Lo, W.H. Cefuroxime-impregnated cement in primary total knee arthroplasty: a prospective, randomized study of three hundred and forty knees. *J Bone Joint Surg Am* 84-A (2002) 759-762
  28. Chiu, F.Y., Lin, C.F., Chen, C.M., Lo, W.H., Chaung, T.Y. Cefuroxime-impregnated cement at primary total knee arthroplasty in diabetes mellitus. A prospective, randomised study. *J Bone Joint Surg Br* 83 (2001) 691-695
  29. Chu, T.M., Warden, S.J., Turner, C.H., Stewart, R.L. Segmental bone regeneration using a load-bearing biodegradable carrier of bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials* 28 (2007) 459-467
  30. Claes, L., Blakytyn, R., Gockelmann, M., Schoen, M., Ignatius, A., Willie, B. Early dynamization by reduced fixation stiffness does not improve fracture healing in a rat femoral osteotomy model. *J Orthop Res* 27 (2009a) 22-27
  31. Claes, L., Schmalenbach, J., Herrmann, M., Olku, I., Garcia, P., Histing, T., Obeid, R., Schorr, H., Herrmann, W., Pohlemann, T., Menger, M.D., Holstein, J.H. Hyperhomocysteinemia is associated with impaired fracture healing in mice. *Calcif Tissue Int* 85 (2009b) 17-21
  32. Clein, L.J., Kowalewski, K. Some effects of cortisone and an anabolic steroid on healing of experimental fractures. *Can J Surg* 5 (1962) 108-117
  33. David, V., Laroche, N., Boudignon, B., Lafage-Proust, M.H., Alexandre, C., Ruegsegger, P., Vico, L. Noninvasive in vivo monitoring of bone architecture alterations in hindlimb-unloaded female rats using novel three-dimensional microcomputed tomography. *J Bone Miner Res* 18 (2003) 1622-1631
  34. de Lalla, F. Antibiotic prophylaxis in orthopedic prosthetic surgery. *J Chemother* 13 Spec No 1 (2001) 48-53
  35. Dekel, S., Lenthall, G., Francis, M.J. Release of prostaglandins from bone and muscle after tibial fracture. An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br* 63-B (1981) 185-189
  36. Dimitriou, R., Tsiridis, E., Giannoudis, P.V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 36 (2005) 1392-1404

37. Ding, M., Odgaard, A., Hvid, I. Accuracy of cancellous bone volume fraction measured by micro-CT scanning. *J Biomech* 32 (1999) 323-326
38. Donath, K., Breuner, G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 11 (1982) 318-326
39. Doyon, A.R., Ferries, I.K., Li, J. Glucocorticoid attenuates the anabolic effects of parathyroid hormone on fracture repair. *Calcif Tissue Int* 87 (2010) 68-76
40. Drosse, I., Volkmer, E., Seitz, S., Seitz, H., Penzkofer, R., Zahn, K., Matis, U., Mutschler, W., Augat, P., Schieker, M. Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective. *Tissue Eng Part C Methods* 14 (2008) 79-88
41. Dumont, C., Kauer, F., Bohr, S., Schmidtman, U., Knopp, W., Engelhardt, T., Sturmer, E.K., Sturmer, K.M. Long-term effects of saw osteotomy versus random fracturing on bone healing and remodeling in a sheep tibia model. *J Orthop Res* 27 (2009) 680-686
42. Edin, M.L., Miclau, T., Lester, G.E., Lindsey, R.W., Dahners, L.E. Effect of cefazolin and vancomycin on osteoblasts in vitro. *Clin Orthop Relat Res* (1996) 245-251
43. Einhorn, T.A. Bone strength: the bottom line. *Calcif Tissue Int* 51 (1992a) 333-339
44. Einhorn, T.A. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* (1998) S7-21
45. Einhorn, T.A., Wakley, G.K., Linkhart, S., Rush, E.B., Maloney, S., Faierman, E., Baylink, D.J. Incorporation of sodium fluoride into cortical bone does not impair the mechanical properties of the appendicular skeleton in rats. *Calcif Tissue Int* 51 (1992b) 127-131
46. Engelke, K., Karolczak, M., Lutz, A., Seibert, U., Schaller, S., Kalender, W. [Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure]. *Radiologe* 39 (1999) 203-212
47. Espehaug, B., Engesaeter, L.B., Vollset, S.E., Havelin, L.I., Langeland, N. Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty. Review of 10,905 primary cemented total hip replacements reported to the Norwegian arthroplasty register, 1987 to 1995. *J Bone Joint Surg Br* 79 (1997) 590-595
48. Fajardo, R.J., Cory, E., Patel, N.D., Nazarian, A., Laib, A., Manoharan, R.K., Schmitz, J.E., DeSilva, J.M., MacLatchy, L.M., Snyder, B.D., Bouxsein, M.L. Specimen size and porosity can introduce error into microCT-based tissue mineral density measurements. *Bone* 44 (2009) 176-184

49. Feldkamp, L.A., Goldstein, S.A., Parfitt, A.M., Jesion, G., Kleerekoper, M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res* 4 (1989) 3-11
50. Fischer, J., Kolk, A., Wolfart, S., Pautke, C., Warnke, P.H., Plank, C., Smeets, R. Future of local bone regeneration - Protein versus gene therapy. *J Craniomaxillofac Surg* 39 (2010) 54-64
51. FitzGerald, G.A., Patrono, C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* 345 (2001) 433-442
52. Flecknell, P.A. Refinement of animal use--assessment and alleviation of pain and distress. *Lab Anim* 28 (1994) 222-231
53. Fritsch, H. Staining of different tissues in thick epoxy resin-impregnated sections of human fetuses. *Stain Technol* 64 (1989) 75-79
54. Frost, A., Jonsson, K.B., Nilsson, O., Ljunggren, O. Inflammatory cytokines regulate proliferation of cultured human osteoblasts. *Acta Orthop Scand* 68 (1997) 91-96
55. Gabet, Y., Muller, R., Regev, E., Sela, J., Shteyer, A., Salisbury, K., Chorev, M., Bab, I. Osteogenic growth peptide modulates fracture callus structural and mechanical properties. *Bone* 35 (2004) 65-73
56. Garcia, P., Herwerth, S., Matthys, R., Holstein, J.H., Histing, T., Menger, M.D., Pohlemann, T. The LockingMouseNail--a new implant for standardized stable osteosynthesis in mice. *J Surg Res* 169 (2010) 220-226
57. Garcia, P., Holstein, J.H., Histing, T., Burkhardt, M., Culemann, U., Pizanis, A., Wirbel, R.J., Pohlemann, T., Menger, M.D. A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: impact of stability on fracture healing. *J Biomech* 41 (2008a) 1689-1696
58. Garcia, P., Holstein, J.H., Maier, S., Schaumloffel, H., Al-Marrawi, F., Hannig, M., Pohlemann, T., Menger, M.D. Development of a reliable non-union model in mice. *J Surg Res* 147 (2008b) 84-91
59. Gerstenfeld, L.C., Al-Ghawas, M., Alkhiary, Y.M., Cullinane, D.M., Krall, E.A., Fitch, J.L., Webb, E.G., Thiede, M.A., Einhorn, T.A. Selective and nonselective cyclooxygenase-2 inhibitors and experimental fracture-healing. Reversibility of effects after short-term treatment. *J Bone Joint Surg Am* 89 (2007) 114-125
60. Gerstenfeld, L.C., Alkhiary, Y.M., Krall, E.A., Nicholls, F.H., Stapleton, S.N., Fitch, J.L., Bauer, M., Kayal, R., Graves, D.T., Jepsen, K.J., Einhorn, T.A. Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. *J Histochem Cytochem* 54 (2006) 1215-1228
61. Gerstenfeld, L.C., Sacks, D.J., Pelis, M., Mason, Z.D., Graves, D.T., Barrero, M., Ominsky, M.S., Kostenuik, P.J., Morgan, E.F., Einhorn, T.A. Comparison

- of effects of the bisphosphonate alendronate versus the RANKL inhibitor denosumab on murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 24 (2009) 196-208
62. Gerstenfeld, L.C., Thiede, M., Seibert, K., Mielke, C., Phippard, D., Svagr, B., Cullinane, D., Einhorn, T.A. Differential inhibition of fracture healing by non-selective and cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Orthop Res* 21 (2003) 670-675
63. Geusens, P., Emans, P.J., de Jong, J.J., van den Bergh, J. NSAIDs and fracture healing. *Curr Opin Rheumatol* 25 (2013) 524-531
64. Gilley, R.S., Wallace, L.J., Bourgeault, C.A., Kidder, L.S., Bechtold, J.E. OP-1 augments glucocorticoid-inhibited fracture healing in a rat fracture model. *Clin Orthop Relat Res* 467 (2009) 3104-3112
65. Glenny, A., Song, F. Antimicrobial prophylaxis in total hip replacement: a systematic review. *Health Technol Assess* 3 (1999) 1-57
66. Gold, B., Rodriguez, W.J. Cefuroxime: mechanisms of action, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical applications, adverse reactions and therapeutic indications. *Pharmacotherapy* 3 (1983) 82-100
67. Goulet, R.W., Goldstein, S.A., Ciarelli, M.J., Kuhn, J.L., Brown, M.B., Feldkamp, L.A. The relationship between the structural and orthogonal compressive properties of trabecular bone. *J Biomech* 27 (1994) 375-389
68. Hao, Y.J., Zhang, G., Wang, Y.S., Qin, L., Hung, W.Y., Leung, K., Pei, F.X. Changes of microstructure and mineralized tissue in the middle and late phase of osteoporotic fracture healing in rats. *Bone* 41 (2007) 631-638
69. Harrigan, T.P., Jasty, M., Mann, R.W., Harris, W.H. Limitations of the continuum assumption in cancellous bone. *J Biomech* 21 (1988) 269-275
70. Hawkey, C.J. COX-2 inhibitors. *Lancet* 353 (1999) 307-314
71. He, Y., Zhang, Z.Y., Zhu, H.G., Qiu, W., Jiang, X., Guo, W. Experimental study on reconstruction of segmental mandible defects using tissue engineered bone combined bone marrow stromal cells with three-dimensional tricalcium phosphate. *J Craniofac Surg* 18 (2007) 800-805
72. Hedberg, E.L., Kroese-Deutman, H.C., Shih, C.K., Lemoine, J.J., Liebschner, M.A., Miller, M.J., Yasko, A.W., Crowther, R.S., Carney, D.H., Mikos, A.G., Jansen, J.A. Methods: a comparative analysis of radiography, microcomputed tomography, and histology for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 11 (2005) 1356-1367
73. Heiner, D.E., Meyer, M.H., Frick, S.L., Kellam, J.F., Fiechtl, J., Meyer, R.A., Jr. Gene expression during fracture healing in rats comparing intramedullary fixation to plate fixation by DNA microarray. *J Orthop Trauma* 20 (2006) 27-38

74. Hildebrand, T., Ruesgesser, P. Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 1 (1997) 15-23
75. Hiltunen, A., Aro, H.T., Vuorio, E. Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice. *Clin Orthop Relat Res* (1993a) 23-27
76. Hiltunen, A., Vuorio, E., Aro, H.T. A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res* 11 (1993b) 305-312
77. Histing, T., Garcia, P., Holstein, J.H., Klein, M., Matthys, R., Nuetzi, R., Steck, R., Laschke, M.W., Wehner, T., Bindl, R., Recknagel, S., Stuermer, E.K., Vollmar, B., Wildemann, B., Lienau, J., Willie, B., Peters, A., Ignatius, A., Pohlemann, T., Claes, L., Menger, M.D. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 49 (2011) 591-599
78. Histing, T., Garcia, P., Matthys, R., Leidinger, M., Holstein, J.H., Kristen, A., Pohlemann, T., Menger, M.D. An internal locking plate to study intramembranous bone healing in a mouse femur fracture model. *J Orthop Res* 28 (2009a) 397-402
79. Histing, T., Holstein, J.H., Garcia, P., Matthys, R., Kristen, A., Claes, L., Menger, M.D., Pohlemann, T. Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture. *J Orthop Res* 27 (2009b) 1152-1156
80. Ho, M.L., Chang, J.K., Wang, G.J. Antiinflammatory drug effects on bone repair and remodeling in rabbits. *Clin Orthop Relat Res* (1995) 270-278
81. Hogevoid, H.E., Groggaard, B., Reikeras, O. Effects of short-term treatment with corticosteroids and indomethacin on bone healing. A mechanical study of osteotomies in rats. *Acta Orthop Scand* 63 (1992) 607-611
82. Holstein, J.H., Matthys, R., Histing, T., Becker, S.C., Fiedler, M., Garcia, P., Meier, C., Pohlemann, T., Menger, M.D. Development of a stable closed femoral fracture model in mice. *J Surg Res* 153 (2009) 71-75
83. Holstein, J.H., Menger, M.D., Culemann, U., Meier, C., Pohlemann, T. Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech* 40 (2007) 215-219
84. Holtom, P.D., Pavkovic, S.A., Bravos, P.D., Patzakis, M.J., Shepherd, L.E., Frenkel, B. Inhibitory effects of the quinolone antibiotics trovafloxacin, ciprofloxacin, and levofloxacin on osteoblastic cells in vitro. *J Orthop Res* 18 (2000) 721-727
85. Huddleston, P.M., Steckelberg, J.M., Hanssen, A.D., Rouse, M.S., Bolander, M.E., Patel, R. Ciprofloxacin inhibition of experimental fracture healing. *J Bone Joint Surg Am* 82 (2000) 161-173

86. Hughes, S., Field, C.A., Kennedy, M.R., Dash, C.H. Cephalosporins in bone cement: studies in vitro and in vivo. *J Bone Joint Surg Br* 61 (1979) 96-100
87. Huo, M.H., Troiano, N.W., Pelker, R.R., Gundberg, C.M., Friedlaender, G.E. The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. *J Orthop Res* 9 (1991) 383-390
88. Isefuku, S., Joyner, C.J., Simpson, A.H. Toxic effect of rifampicin on human osteoblast-like cells. *J Orthop Res* 19 (2001) 950-954
89. Isefuku, S., Joyner, C.J., Simpson, A.H. Gentamicin may have an adverse effect on osteogenesis. *J Orthop Trauma* 17 (2003) 212-216
90. Ishida, Y., Heersche, J.N. Glucocorticoid-induced osteoporosis: both in vivo and in vitro concentrations of glucocorticoids higher than physiological levels attenuate osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 13 (1998) 1822-1826
91. Ito, M., Nakamura, T., Matsumoto, T., Tsurusaki, K., Hayashi, K. Analysis of trabecular microarchitecture of human iliac bone using microcomputed tomography in patients with hip arthrosis with or without vertebral fracture. *Bone* 23 (1998) 163-169
92. Iwamoto, J., Seki, A., Sato, Y., Matsumoto, H., Tadedo, T., Yeh, J.K. Vitamin K2 promotes bone healing in a rat femoral osteotomy model with or without glucocorticoid treatment. *Calcif Tissue Int* 86 (2010) 234-241
93. Jager, M., Degistirici, O., Knipper, A., Fischer, J., Sager, M., Krauspe, R. Bone healing and migration of cord blood-derived stem cells into a critical size femoral defect after xenotransplantation. *J Bone Miner Res* 22 (2007) 1224-1233
94. Jager, M., Sager, M., Lensing-Hohn, S., Krauspe, R. The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (I): Comparative anatomical study on rats' femur. *Biomed Tech (Berl)* 50 (2005a) 107-110
95. Jager, M., Sager, M., Lensing-Hohn, S., Krauspe, R. The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (II): implant evolution and surgical technique on a rat's femur. *Biomed Tech (Berl)* 50 (2005b) 137-142
96. Jarvinen, T.L., Sievanen, H., Jokihaara, J., Einhorn, T.A. Revival of bone strength: the bottom line. *J Bone Miner Res* 20 (2005) 717-720
97. Jenó, L., Geza, L. A simple differential staining method for semi-thin sections of ossifying cartilage and bone tissues embedded in epoxy resin. *Mikroskopie* 31 (1975) 1-4
98. Jiang, Y., Zhao, J., White, D.L., Genant, H.K. Micro CT and Micro MR imaging of 3D architecture of animal skeleton. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1 (2000) 45-51

99. Kaspar, D., Hedrich, C.M., Schmidt, C., Liedert, A., Claes, L.E., Ignatius, A.A. [Diclofenac inhibits proliferation and matrix formation of osteoblast cells]. *Unfallchirurg* 108 (2005) 18, 20-14
100. Katzer, A., Wening, J.V., Kupka, P., Meenen, N.M., Jungbluth, K.H. [Perioperative antibiotic prophylaxis in hip operations. Penetration into bone, capsule tissue and cartilage exemplified by cefuroxime]. *Unfallchirurgie* 23 (1997) 161-170
101. Kazakia, G.J., Burghardt, A.J., Cheung, S., Majumdar, S. Assessment of bone tissue mineralization by conventional x-ray microcomputed tomography: comparison with synchrotron radiation microcomputed tomography and ash measurements. *Med Phys* 35 (2008) 3170-3179
102. Ketterl, R., Wittwer, W. [Possibilities for the use of the basic cephalosporin cefuroxime in bone surgery. Tissue levels, effectiveness and tolerance]. *Infection* 21 Suppl 1 (1993) S21-27
103. King, C.S., Weir, E.C., Gundberg, C.W., Fox, J., Insogna, K.L. Effects of continuous glucocorticoid infusion on bone metabolism in the rat. *Calcif Tissue Int* 59 (1996) 184-191
104. Klaushofer, K., Peterlik, M. [Pathophysiology of fracture healing]. *Radiologe* 34 (1994) 709-714
105. Kolk, A., Haczek, C., Koch, C., Vogt, S., Kullmer, M., Pautke, C., Deppe, H., Plank, C. A strategy to establish a gene-activated matrix on titanium using gene vectors protected in a polylactide coating. *Biomaterials* 32 (2011) 6850-6859
106. Kon, E., Muraglia, A., Corsi, A., Bianco, P., Marcacci, M., Martin, I., Boyde, A., Ruspantini, I., Chistolini, P., Rocca, M., Giardino, R., Cancedda, R., Quarto, R. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res* 49 (2000) 328-337
107. Kostenszky, K.S., Olah, E.H. Effect of prednisolone on callus formation. *Acta Biol Acad Sci Hung* 25 (1974) 49-60
108. Kowalewski, K. Comparison of the effects of cortisone and certain anabolic-androgenic steroids on the uptake of radiosulfur in a healing fractured bone. *Endocrinology* 62 (1958) 493-497
109. Kowalewski, K., Gort, J. An anabolic androgen as a stimulant of bone healing in rats treated with cortisone. *Acta Endocrinol (Copenh)* 30 (1959) 273-276
110. Krischak, G.D., Augat, P., Blakytyn, R., Claes, L., Kinzl, L., Beck, A. The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac reduces appearance of osteoblasts in bone defect healing in rats. *Arch Orthop Trauma Surg* 127 (2007a) 453-458

111. Krischak, G.D., Augat, P., Claes, L., Kinzl, L., Beck, A. The effects of non-steroidal anti-inflammatory drug application on incisional wound healing in rats. *J Wound Care* 16 (2007b) 76-78
112. Krischak, G.D., Augat, P., Sorg, T., Blakytyn, R., Kinzl, L., Claes, L., Beck, A. Effects of diclofenac on periosteal callus maturation in osteotomy healing in an animal model. *Arch Orthop Trauma Surg* 127 (2007c) 3-9
113. Kruyt, M.C., Wilson, C.E., de Bruijn, J.D., van Blitterswijk, C.A., Oner, C.F., Verbout, A.J., Dhert, W.J. The effect of cell-based bone tissue engineering in a goat transverse process model. *Biomaterials* 27 (2006) 5099-5106
114. Kuhn, J.L., Goldstein, S.A., Feldkamp, L.A., Goulet, R.W., Jesion, G. Evaluation of a microcomputed tomography system to study trabecular bone structure. *J Orthop Res* 8 (1990) 833-842
115. Lau, K.H., Kothari, V., Das, A., Zhang, X.B., Baylink, D.J. Cellular and molecular mechanisms of accelerated fracture healing by COX2 gene therapy: studies in a mouse model of multiple fractures. *Bone* 53 (2013) 369-381
116. Leigh, D.A. Serum and bone concentrations of cefuroxime in patients undergoing knee arthroplasty. *J Antimicrob Chemother* 18 (1986) 609-611
117. Leppanen, O.V., Sievanen, H., Jarvinen, T.L. Biomechanical testing in experimental bone interventions--May the power be with you. *J Biomech* 41 (2008) 1623-1631
118. Liles, J.H., Flecknell, P.A. The effects of surgical stimulus on the rat and the influence of analgesic treatment. *Br Vet J* 149 (1993) 515-525
119. Lind, P.M., Lind, L., Larsson, S., Orberg, J. Torsional testing and peripheral quantitative computed tomography in rat humerus. *Bone* 29 (2001) 265-270
120. Link, T.M., Bauer, J.S. Imaging of trabecular bone structure. *Semin Musculoskelet Radiol* 6 (2002) 253-261
121. Liu, H.T., Chiu, F.Y., Chen, C.M., Chen, T.H. The combination of systemic antibiotics and antibiotics impregnated cement in primary total knee arthroplasty in patients of rheumatoid arthritis--evaluation of 60 knees. *J Chin Med Assoc* 66 (2003) 533-536
122. Lovering, A.M., Perez, J., Bowker, K.E., Reeves, D.S., MacGowan, A.P., Bannister, G. A comparison of the penetration of cefuroxime and cephmandole into bone, fat and haematoma fluid in patients undergoing total hip replacement. *J Antimicrob Chemother* 40 (1997) 99-104
123. Luppen, C.A., Blake, C.A., Ammirati, K.M., Stevens, M.L., Seeherman, H.J., Wozney, J.M., Bouxsein, M.L. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances osteotomy healing in glucocorticoid-treated rabbits. *J Bone Miner Res* 17 (2002) 301-310



124. Mader, J.T., Calhoun, J., Cobos, J. In vitro evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated biodegradable beads and polymethylmethacrylate beads. *Antimicrob Agents Chemother* 41 (1997) 415-418
125. Mader, J.T., Shirliff, M.E., Bergquist, S.C., Calhoun, J. Antimicrobial treatment of chronic osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res* (1999) 47-65
126. Manigrasso, M.B., O'Connor, J.P. Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma* 18 (2004) 687-695
127. Marechal, M., Luyten, F., Nijs, J., Postnov, A., Schepers, E., van Steenberghe, D. Histomorphometry and micro-computed tomography of bone augmentation under a titanium membrane. *Clin Oral Implants Res* 16 (2005) 708-714
128. Martiniakova, M., Grosskopf, B., Omelka, R., Vondrakova, M., Bauerova, M. Differences among species in compact bone tissue microstructure of mammalian skeleton: use of a discriminant function analysis for species identification. *J Forensic Sci* 51 (2006) 1235-1239
129. Matthys, R., Perren, S.M. Internal fixator for use in the mouse. *Injury* 40 Suppl 4 (2009) S103-109
130. Matziolis, G., Rau, H.M., Klever, P., Erli, H.J., Paar, O. [Modification of human osteoblasts by various analgesics]. *Unfallchirurg* 105 (2002) 527-531
131. McCann, R.M., Colleary, G., Geddis, C., Clarke, S.A., Jordan, G.R., Dickson, G.R., Marsh, D. Effect of osteoporosis on bone mineral density and fracture repair in a rat femoral fracture model. *J Orthop Res* 26 (2008) 384-393
132. McQueen, M., Littlejohn, A., Hughes, S.P. A comparison of systemic cefuroxime and cefuroxime loaded bone cement in the prevention of early infection after total joint replacement. *Int Orthop* 11 (1987) 241-243
133. McQueen, M.M., Hughes, S.P., May, P., Verity, L. Cefuroxime in total joint arthroplasty. Intravenous or in bone cement. *J Arthroplasty* 5 (1990) 169-172
134. Mehta, M., Strube, P., Peters, A., Perka, C., Hutmacher, D., Fratzl, P., Duda, G.N. Influences of age and mechanical stability on volume, microstructure, and mineralization of the fracture callus during bone healing: is osteoclast activity the key to age-related impaired healing? *Bone* 47 (2010) 219-228
135. Meyer, R.A., Jr., Tshakis, P.J., Martin, D.F., Banks, D.M., Harrow, M.E., Kiebzak, G.M. Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *J Orthop Res* 19 (2001) 428-435
136. Miclau, T., Edin, M.L., Lester, G.E., Lindsey, R.W., Dahners, L.E. Bone toxicity of locally applied aminoglycosides. *J Orthop Trauma* 9 (1995) 401-406

137. Miclau, T., Edin, M.L., Lester, G.E., Lindsey, R.W., Dahners, L.E. Effect of ciprofloxacin on the proliferation of osteoblast-like MG-63 human osteosarcoma cells in vitro. *J Orthop Res* 16 (1998) 509-512
138. Morgan, E.F., Mason, Z.D., Chien, K.B., Pfeiffer, A.J., Barnes, G.L., Einhorn, T.A., Gerstenfeld, L.C. Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone* 44 (2009) 335-344
139. Muller, R., Van Campenhout, H., Van Damme, B., Van Der Perre, G., Dequeker, J., Hildebrand, T., Ruegsegger, P. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 23 (1998) 59-66
140. Murakami, H., Kowalewski, K. Effects of cortisone and an anabolic androgen on the fractured humerus in guinea pigs: clinical and histological study over a six-week period of fracture healing. *Can J Surg* 9 (1966) 425-434
141. Nazarian, A., Snyder, B.D., Zurakowski, D., Muller, R. Quantitative micro-computed tomography: a non-invasive method to assess equivalent bone mineral density. *Bone* 43 (2008) 302-311
142. Newman, R.J., Francis, M.J., Duthie, R.B. Nuclear magnetic resonance studies of experimentally induced delayed fracture union. *Clin Orthop Relat Res* (1987) 253-261
143. Nunamaker, D.M. Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* (1998) S56-65
144. Nungu, K.S., Larsson, S., Wallinder, L., Holm, S. Bone and wound fluid concentrations of cephalosporins. Oral cefadroxil and parenteral cefuroxime compared in 52 patients with a trochanteric fracture. *Acta Orthop Scand* 66 (1995) 161-165
145. Nuss, K.M., Auer, J.A., Boos, A., von Rechenberg, B. An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones. *BMC Musculoskelet Disord* 7 (2006) 67
146. O'Loughlin, P.F., Morr, S., Bogunovic, L., Kim, A.D., Park, B., Lane, J.M. Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J Bone Joint Surg Am* 90 Suppl 1 (2008) 79-84
147. Odgaard, A. Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture. *Bone* 20 (1997) 315-328
148. Parfitt, A.M., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M., Recker, R.R. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2 (1987) 595-610

149. Pautke, C., Vogt, S., Tischer, T., Wexel, G., Deppe, H., Milz, S., Schieker, M., Kolk, A. Polychrome labeling of bone with seven different fluorochromes: enhancing fluorochrome discrimination by spectral image analysis. *Bone* 37 (2005) 441-445
150. Peersman, G., Laskin, R., Davis, J., Peterson, M. Infection in total knee replacement: a retrospective review of 6489 total knee replacements. *Clin Orthop Relat Res* (2001) 15-23
151. Petite, H., Viateau, V., Bensaid, W., Meunier, A., de Pollak, C., Bourguignon, M., Oudina, K., Sedel, L., Guillemin, G. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 18 (2000) 959-963
152. Petrizzi, L., Mariscoli, M., Valbonetti, L., Varasano, V., Langhoff, J.D., Von Rechenberg, B. Preliminary study on the effect of parenteral naloxone, alone and in association with calcium gluconate, on bone healing in an ovine "drill hole" model system. *BMC Musculoskelet Disord* 8 (2007) 43
153. Phillips, A.M. Overview of the fracture healing cascade. *Injury* 36 Suppl 3 (2005) S5-7
154. Probst, A., Spiegel, H.U. Cellular mechanisms of bone repair. *J Invest Surg* 10 (1997) 77-86
155. Prodinger, P., Bürklein, D., Holzapfel, B., Grande Garcia, E., Kreutzer, K., Tischer, T. Schwierigkeit biomechanischer Versuchsreihen - Analyse und Reduktion systematischer Fehler im Kleintiermodell. *Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie* (2010)
156. Radi, Z.A. Pathophysiology of cyclooxygenase inhibition in animal models. *Toxicol Pathol* 37 (2009) 34-46
157. Reikeraas, O., Engebretsen, L. Effects of ketoralac tromethamine and indomethacin on primary and secondary bone healing. An experimental study in rats. *Arch Orthop Trauma Surg* 118 (1998) 50-52
158. Reilly, D.T., Burstein, A.H. The elastic and ultimate properties of compact bone tissue. *J Biomech* 8 (1975) 393-405
159. Ro, J., Sudmann, E., Marton, P.F. Effect of indomethacin on fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 47 (1976) 588-599
160. Rontgen, V., Blakytyn, R., Matthys, R., Landauer, M., Wehner, T., Gockelmann, M., Jermendy, P., Amling, M., Schinke, T., Claes, L., Ignatius, A. Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator. *J Orthop Res* 28 (2010) 1456-1462
161. Ruegsegger, P., Koller, B., Muller, R. A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcif Tissue Int* 58 (1996) 24-29

162. Salzmann, G.M., Naal, F.D., von Knoch, F., Tuebel, J., Gradinger, R., Imhoff, A.B., Schauwecker, J. Effects of cefuroxime on human osteoblasts in vitro. *J Biomed Mater Res A* 82 (2007) 462-468
163. Schieker, M., Seitz, S., Gulkan, H., Nentwich, M., Horvath, G., Regauer, M., Milz, S., Mutschler, W. [Tissue engineering of bone. Integration and migration of human mesenchymal stem cells in colonized constructs in a murine model]. *Orthopade* 33 (2004) 1354-1360
164. Schmidhammer, R., Zandieh, S., Mittermayr, R., Pelinka, L.E., Leixnering, M., Hopf, R., Kroepfl, A., Redl, H. Assessment of bone union/nonunion in an experimental model using microcomputed technology. *J Trauma* 61 (2006) 199-205
165. Schmidmaier, G., Wildemann, B., Ostapowicz, D., Kandziora, F., Stange, R., Haas, N.P., Raschke, M. Long-term effects of local growth factor (IGF-I and TGF-beta 1) treatment on fracture healing. A safety study for using growth factors. *J Orthop Res* 22 (2004) 514-519
166. Schoen, M., Rotter, R., Schattner, S., Mittlmeier, T., Claes, L., Vollmar, B., Gradl, G. Introduction of a new interlocked intramedullary nailing device for stabilization of critically sized femoral defects in the rat: A combined biomechanical and animal experimental study. *J Orthop Res* 26 (2008) 184-189
167. Sedlin, E.D., Hirsch, C. Factors affecting the determination of the physical properties of femoral cortical bone. *Acta Orthop Scand* 37 (1966) 29-48
168. Seitz, S., Ern, K., Lamper, G., Docheva, D., Drosse, I., Milz, S., Mutschler, W., Schieker, M. Influence of in vitro cultivation on the integration of cell-matrix constructs after subcutaneous implantation. *Tissue Eng* 13 (2007) 1059-1067
169. Sell, S., Teschner, M., Gaissmaier, C., Martini, F., Weidner, S.A., Kusswetter, W. [Effect of diclofenac on human osteoblasts and their stromal precursors in vitro in relation to arthroplasty]. *Z Rheumatol* 58 (1999) 13-20
170. Shefelbine, S.J., Augat, P., Claes, L., Beck, A. Intact fibula improves fracture healing in a rat tibia osteotomy model. *J Orthop Res* 23 (2005a) 489-493
171. Shefelbine, S.J., Simon, U., Claes, L., Gold, A., Gabet, Y., Bab, I., Muller, R., Augat, P. Prediction of fracture callus mechanical properties using micro-CT images and voxel-based finite element analysis. *Bone* 36 (2005b) 480-488
172. Siddiqui, N.A., Owen, J.M. Clinical advances in bone regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther* 8 (2013) 192-200
173. Simon, A.M., Manigrasso, M.B., O'Connor, J.P. Cyclo-oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. *J Bone Miner Res* 17 (2002) 963-976

174. Simon, A.M., O'Connor, J.P. Dose and time-dependent effects of cyclooxygenase-2 inhibition on fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am* 89 (2007) 500-511
175. Sissons, H.A., Hadfield, G.J. The influence of cortisone on the repair of experimental fractures in the rabbit. *Br J Surg* 39 (1951) 172-178
176. Smith, W.L., DeWitt, D.L., Garavito, R.M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69 (2000) 145-182
177. Southwell-Keely, J.P., Russo, R.R., March, L., Cumming, R., Cameron, I., Brnabic, A.J. Antibiotic prophylaxis in hip fracture surgery: a metaanalysis. *Clin Orthop Relat Res* (2004) 179-184
178. Spies, C.M., Strehl, C., van der Goes, M.C., Bijlsma, J.W., Buttgerit, F. Glucocorticoids. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 25 (2011) 891-900
179. Spiro, A.S., Beil, F.T., Baranowsky, A., Barvencik, F., Schilling, A.F., Nguyen, K., Khadem, S., Seitz, S., Rueger, J.M., Schinke, T., Amling, M. BMP-7-induced ectopic bone formation and fracture healing is impaired by systemic NSAID application in C57BL/6-mice. *J Orthop Res* 28 (2010) 785-791
180. Steinmeyer, J. Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Res* 2 (2000) 379-385
181. Stuermer, E.K., Sehmisch, S., Rack, T., Wenda, E., Seidlova-Wuttke, D., Tezval, M., Wuttke, W., Frosch, K.H., Stuermer, K.M. Estrogen and raloxifene improve metaphyseal fracture healing in the early phase of osteoporosis. A new fracture-healing model at the tibia in rat. *Langenbecks Arch Surg* 395 (2008) 163-172
182. Sudmann, E., Hagen, T. Indomethacin-induced delayed fracture healing. *Arch Orthop Unfallchir* 85 (1976) 151-154
183. Tamada, T., Sone, T., Jo, Y., Imai, S., Kajihara, Y., Fukunaga, M. Three-dimensional trabecular bone architecture of the lumbar spine in bone metastasis from prostate cancer: comparison with degenerative sclerosis. *Skeletal Radiol* 34 (2005) 149-155
184. Thompson, Z., Miclau, T., Hu, D., Helms, J.A. A model for intramembranous ossification during fracture healing. *J Orthop Res* 20 (2002) 1091-1098
185. Thomsen, J.S., Laib, A., Koller, B., Prohaska, S., Mosekilde, L., Gowin, W. Stereological measures of trabecular bone structure: comparison of 3D micro computed tomography with 2D histological sections in human proximal tibial bone biopsies. *J Microsc* 218 (2005) 171-179
186. Tischer, T., Milz, S., Weiler, C., Pautke, C., Hausdorf, J., Schmitz, C., Maier, M. Dose-dependent new bone formation by extracorporeal shock wave application on the intact femur of rabbits. *Eur Surg Res* 41 (2008) 44-53

187. Tiseo, B.C., Namur, G.N., de Paula, E.J., Junior, R.M., de Oliveira, C.R. Experimental study of the action of COX-2 selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs and traditional anti-inflammatory drugs in bone regeneration. *Clinics (Sao Paulo)* 61 (2006) 223-230
188. Tornkvist, H., Lindholm, T.S. Effect of ibuprofen on mass and composition of fracture callus and bone. An experimental study on adult rat. *Scand J Rheumatol* 9 (1980) 167-171
189. Turner, C.H., Akhter, M.P., Heaney, R.P. The effects of fluoridated water on bone strength. *J Orthop Res* 10 (1992) 581-587
190. Turner, C.H., Burr, D.B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 14 (1993) 595-608
191. Uchiyama, T., Tanizawa, T., Muramatsu, H., Endo, N., Takahashi, H.E., Hara, T. A morphometric comparison of trabecular structure of human ilium between microcomputed tomography and conventional histomorphometry. *Calcif Tissue Int* 61 (1997) 493-498
192. Underwood, E.E. Stereology, or the quantitative evaluation of microstructures. *J Microsc* 89 (1969) 161-180
193. van Haaren, E.H., van der Zwaard, B.C., van der Veen, A.J., Heyligers, I.C., Wuisman, P.I., Smit, T.H. Effect of long-term preservation on the mechanical properties of cortical bone in goats. *Acta Orthop* 79 (2008) 708-716
194. Vasileiadis, G.I., Sioutis, I.C., Mavrogenis, A.F., Vlasis, K., Babis, G.C., Papagelopoulos, P.J. COX-2 inhibitors for the prevention of heterotopic ossification after THA. *Orthopedics* 34 (2011) 467
195. Viateau, V., Guillemin, G., Bousson, V., Oudina, K., Hannouche, D., Sedel, L., Logeart-Avramoglou, D., Petite, H. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep. *J Orthop Res* 25 (2007) 741-749
196. Villalba, L., Witter, J. Rofecoxib, Merck, and the FDA. *N Engl J Med* 351 (2004) 2875-2878; author reply 2875-2878
197. Vogelin, E., Jones, N.F., Huang, J.I., Brekke, J.H., Lieberman, J.R. Healing of a critical-sized defect in the rat femur with use of a vascularized periosteal flap, a biodegradable matrix, and bone morphogenetic protein. *J Bone Joint Surg Am* 87 (2005) 1323-1331
198. von Rechenberg, B., Akens, M.K., Nadler, D., Bittmann, P., Zlinszky, K., Kastner, S.B., Auer, J.A. Mosaicplasty with photooxidized, mushroom shaped, bovine, osteochondral xenografts in experimental sheep. *Vet Comp Orthop Traumatol* 19 (2006) 147-156

199. Waters, R.V., Gamradt, S.C., Asnis, P., Vickery, B.H., Avnur, Z., Hill, E., Bostrom, M. Systemic corticosteroids inhibit bone healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *Acta Orthop Scand* 71 (2000) 316-321
200. Weinstein, R.S., Jilka, R.L., Parfitt, A.M., Manolagas, S.C. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 102 (1998) 274-282
201. Weinstein, R.S., Nicholas, R.W., Manolagas, S.C. Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. *J Clin Endocrinol Metab* 85 (2000) 2907-2912
202. Whitehouse, W.J. The quantitative morphology of anisotropic trabecular bone. *J Microsc* 101 (1974) 153-168
203. Wiancko, K.B., Kowalewski, K. Strength of callus in fractured humerus of rat treated with anti-anabolic and anabolic compounds. *Acta Endocrinol (Copenh)* 36 (1961) 310-318
204. Wingerter, S., Calvert, G., Tucci, M., Tsao, A., Russell, G., Benghuzzi, H. Comparison of two different fixation techniques for a segmental defect in a rat femur model. *J Invest Surg* 20 (2007) 149-155
205. Wolff, K.D. Management of animal bite injuries of the face: experience with 94 patients. *J Oral Maxillofac Surg* 56 (1998) 838-843; discussion 843-834
206. Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T., Nagasaka, T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Implants Res* 15 (2004) 589-597
207. Yeom, H., Blanchard, S., Kim, S., Zunt, S., Chu, T.M. Correlation between micro-computed tomography and histomorphometry for assessment of new bone formation in a calvarial experimental model. *J Craniofac Surg* 19 (2008) 446-452
208. Zalavras, C.G., Patzakis, M.J., Holtom, P. Local antibiotic therapy in the treatment of open fractures and osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res* (2004) 86-93
209. Zhang, X., Xie, C., Lin, A.S., Ito, H., Awad, H., Lieberman, J.R., Rubery, P.T., Schwarz, E.M., O'Keefe, R.J., Guldborg, R.E. Periosteal progenitor cell fate in segmental cortical bone graft transplantations: implications for functional tissue engineering. *J Bone Miner Res* 20 (2005) 2124-2137
210. Zhou, G., Liu, W., Cui, L., Wang, X., Liu, T., Cao, Y. Repair of porcine articular osteochondral defects in non-weightbearing areas with autologous bone marrow stromal cells. *Tissue Eng* 12 (2006) 3209-3221

211. Zhou, X.Z., Zhang, G., Dong, Q.R., Chan, C.W., Liu, C.F., Qin, L. Low-dose X-irradiation promotes mineralization of fracture callus in a rat model. *Arch Orthop Trauma Surg* 129 (2009) 125-132
212. Zhu, L., Liu, W., Cui, L., Cao, Y. Tissue-engineered bone repair of goat-femur defects with osteogenically induced bone marrow stromal cells. *Tissue Eng* 12 (2006) 423-433



## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 3-1	Guillotineartige Apparatur	18
Abb. 3-2	Femurfraktur durch Drei-Punkt-Biegung	18
Abb. 3-3	Radiologische C-Bogen-Kontrolle	18
Abb. 3-4	Makroskopische Ansicht	20
Abb. 3-5	Mikrocomputertomograph $\mu$ CT 40	20
Abb. 3-6	Probe und Probenhalter	21
Abb. 3-7	Scout view	22
Abb. 3-8	Messregion: 6,2 mm	22
Abb. 3-9	Ermittlung des Schwellenwertes, 2D-Bild	23
Abb. 3-10	2-Schwellenwertverfahren, 3D-Bild	23
Abb. 3-11	Ermittlung des Schwellenwertes für den ortsständigen Knochen	25
Abb. 3-12	Ermittlung des Schwellenwertes für den Kallus	26
Abb. 3-13	ROIs	27
Abb. 3-14	Hydroxylapatitprüfkörper	28
Abb. 3-15	Bestimmung der lokalen Trabekeldicke	28
Abb. 3-16	$\mu$ Ct, 3D-Rekonstruktion, semitransparente Darstellung des Kallus	30
Abb. 3-17	Ablauf Histologie	31
Abb. 3-18	Innenlochsäge Leica® SP1600	31
Abb. 3-19	Wolpert TZZ 707/386	33
Abb. 3-20	Biegeversuch	33
Abb. 3-21	Kraft-Weg-Diagramm	34
Abb. 4-1	Anzahl der Ein- und Ausschlüsse [%]	35
Abb. 4-2	$\mu$ Ct, Volumen: Einzelwertverteilung, MW und SD	37
Abb. 4-3	$\mu$ Ct, Dichte: Einzelwertverteilung, MW und SD	38
Abb. 4-4	$\mu$ Ct, Masse: Einzelwertverteilung, MW und SD	39
Abb. 4-5	$\mu$ Ct, SMI: Einzelwertverteilung, MW und SD	41
Abb. 4-6	$\mu$ Ct, DA: Einzelwertverteilung, MW und SD	42
Abb. 4-7	$\mu$ Ct, BS: Einzelwertverteilung, MW und SD	43
Abb. 4-8	$\mu$ Ct, Tb. Th.: Einzelwertverteilung, MW und SD	44
Abb. 4-9	Histologische Darstellung der Frakturheilung	46

Abb. 4-10 Histometrie, Gewebeart der einzelnen Therapien im Bereich des Frakturspaltes	47
Abb. 4-11 Histometrie, Frakturspaltüberbrückung der einzelnen Therapien	47
Abb. 4-12 Biomechanik, Fmax: Einzelwertverteilung, MW und SD	50
Abb. 4-13 Biomechanik, Fmax relativ: Einzelwertverteilung, MW und SD	50
Abb. 4-14 Biomechanik, Stiffness: Einzelwertverteilung, MW und SD	52
Abb. 4-15 Biomechanik, Stiffness relativ: Einzelwertverteilung, MW und SD	52
Abb. 4-16 Modalitätenegegenüberstellung (Kontrolle/Cephalosporin)	54
Abb. 4-17 Modalitätenegegenüberstellung (Diclofenac)	55
Abb. 5-1 $\mu$ Ct, 3D: proximaler und distaler Kallus	61
Abb. 5-2 $\mu$ Ct, 2D: proximaler und distaler Kallus	61
Abb. 5-3 Vollautomatische 2-Schwellenwertauswertung zur Abgrenzung des Kallus vom ortsständigen Knochen	63

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1 Implantate zur Frakturstabilisation von Mäusen und Ratten [nach Histing 2011]	13
Tab. 3-1 Übersicht über die verschiedenen therapeutischen Gruppen	15
Tab. 3-2 MMA-Einbettverfahren	30
Tab. 3-3 Protokoll <i>Laczko-Levai</i> -Färbung	32
Tab. 4-1 Medikamentenspiegel	35
Tab. 4-2 $\mu$ Ct, Volumen: MW, SD, mittlere Differenz, 95%-CI der Differenz und Signifikanz	36
Tab. 4-3 $\mu$ Ct, Dichte: MW, SD, mittlere Differenz, 95%-CI der Differenz und Signifikanz	37
Tab. 4-4 $\mu$ Ct, Masse: MW, SD, mittlere Differenz, 95%-CI der Differenz und Signifikanz	39
Tab. 4-5 $\mu$ Ct, Strukturparameter: MW, SD, mittlere Differenz, 95%-CI der Differenz und Signifikanz	40
Tab. 4-6 Histometrie, Einzelbewertung der Proben	48
Tab. 4-7 Biomechanik, Fmax: MW und SD der einzelnen Therapien	49
Tab. 4-8 Biomechanik, Fmax: MW, SD, mittlere Differenz, 95%-CI der Differenz und Signifikanz	49

Tab. 4-9 Biomechanik, Stiffness: MW und SD der einzelnen Therapien	51
Tab. 4-10 Biomechanik, Stiffness: MW, SD, mittlere Differenz, 95%-CI der Differenz und Signifikanz	51

## 9 Danksagung

Mit dem Abschluss dieser Dissertation danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Klaus-Dietrich Wolff, Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der TU München, der mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit unter seiner Klinikführung durchzuführen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Tischer, Orthopädische Klinik und Poliklinik der Universität Rostock, Leiter der Sektion Sportorthopädie & Prävention, ehemals wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie der TU München, für das Studiendesign, die vielen Anregungen und seine Hilfsbereitschaft bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit und nicht zuletzt für die zeitnahe Korrektur. Ohne seine Mitfinanzierung wäre das Projekt nicht realisierbar gewesen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Christoph Pautke, Medizin & Ästhetik, Praxisambulanz für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie, München, danke ich für die Finanzierung des Projektes sowie seine Mitbetreuung.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern der Forschungsgruppe der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der TU München und hier insbesondere Herrn Dr. med. dent. Kilian Kreutzer für die erfolgreiche Zusammenarbeit und auch Frau Dr. med. vet. Gabriele Wexel, Zentrum für Präklinische Forschung (ZPF) am Klinikum Rechts der Isar, für ihre kooperative Unterstützung bei den Tierversuchen. Ebenfalls gilt mein Dank Herrn apl. Prof. Dr. med. Stefan Milz, Anatomische Anstalt der LMU, Lehrstuhl II, Neuroanatomie, für die Bereitstellung der histologischen Arbeitsplätze sowie die kompetenten Ratschläge und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. dent. Karl-Heinz Kunzelmann aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der LMU für die Nutzung des  $\mu$ CT 40.

Nicht zuletzt danke ich Herrn Dipl.-Stat. Dr. Alexander Hapfelmeier, Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der TUM, für die Beratung und Unterstützung im Rahmen der statistischen Auswertung sowie Herrn Dipl.-Ing. Eduardo Grande Garcia, Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie der TUM, Labor für Biomechanik, für die Unterstützung im Rahmen der biomechanischen Auswertung.

Mein größter Dank jedoch gilt meiner Freundin Carolina Wolff, meinen Eltern und Großeltern und meiner Schwester Caroline, die mich immer unterstützten und ohne deren Verständnis die Promotion so nicht möglich gewesen wäre.

## 10 Curriculum vitae

### PERSÖNLICHE DATEN

---

Name: Marc Oliver Bissinger  
Geburtsdatum: 21. Januar 1980  
Geburtsort: Tübingen, Baden-Württemberg  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### AUSBILDUNG

---

1987 - 1991 Grundschule Herterichschule, München  
1991 - 2000 Pater-Rupert-Mayer-Gymnasium, Pullach bei München  
30.06.2000 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### WEHRDIENST

---

09/2000 - 06/2001 Prinz-Heinrich-Kaserne, Lenggries

### HOCHSCHULSTUDIUM

---

10/2001 - 04/2008 Studium der Humanmedizin an der LMU und TU München und an der University of Sydney,  
08/2003 ärztl. Vorprüfung  
04/2008 ärztl. Prüfung (Gesamtnote: sehr gut)  
19.05.2008 Approbation als Arzt  
24.05.2011 Promotion (Humanmedizin, Gesamtnote: sehr gut)

04/2008 - 10/2011 Studium der Zahnmedizin an der LMU München  
(Gesamtnote: sehr gut)  
14.10.2011 Approbation als Zahnarzt

### BERUFLICHE TÄTIGKEIT

---

seit 15.05.2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der TU München