

Aus dem Zentrum für Orthopädie und Unfallchirurgie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

# Der Einfluss von Echinomycin und Schädel- Hirn-Trauma auf Frakturheilung

## **D i s s e r t a t i o n**

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Rut Regina Burkhardt aus Saarbrücken, Deutschland

Mainz, 2021

Tag der Promotion: 06.07.2021

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	II
Tabellenverzeichnis.....	VI
1 Einleitung .....	1
2 Literaturreückblick .....	3
2.1 Knorpelgewebe .....	3
2.2 Knochengewebe .....	3
2.2.1 Geflechtknochen .....	4
2.2.2 Lamellenknochen.....	4
2.3 Arten der Ossifikation.....	5
2.3.1 Desmale Ossifikation .....	5
2.3.2 Chondrale Ossifikation.....	5
2.4 Frakturen .....	7
2.4.1 Einteilung.....	7
2.4.2 Klassifikation.....	7
2.4.3 Klinik .....	9
2.4.4 Therapie.....	9
2.4.5 Komplikationen.....	11
2.5 Frakturheilung .....	12
2.5.1 Primäre (direkte) Frakturheilung .....	12
2.5.2 Sekundäre (indirekte) Frakturheilung.....	13
2.5.3 Rolle der Vaskularisierung in der Frakturheilung.....	16
2.5.4 Frakturheilung am Mausmodell.....	17
2.6 Hypoxie induzierter Faktor (HIF).....	19
2.6.1 Einfluss von HIF-1 $\alpha$ auf Chondro- und Osteogenese .....	20
2.6.2 Einfluss auf Vaskularisierung und GefäÙe .....	21
2.6.3 Echinomycin .....	22
2.6.4 Zusammenfassung.....	22
2.7 Schädel-Hirn-Trauma.....	24
2.7.1 Definition und Pathophysiologie .....	24
2.7.2 Einfluss auf enchondrale Ossifikation .....	25
2.7.3 Tiermodelle.....	27
2.7.4 Zusammenfassung.....	28
3 Ziel und Fragestellung .....	29

4	Material und Methoden .....	30
4.1	Allgemein.....	30
4.2	Anästhesie und perioperatives Management.....	31
4.3	Operationsverfahren .....	32
4.3.1	Schädel-Hirn-Trauma .....	32
4.3.2	Femurfraktur .....	33
4.4	Bildgebende Diagnostik.....	37
4.5	Echinomycin-Injektion .....	37
4.6	Auswertung .....	37
4.6.1	Auswertung anhand der OP-Protokolle .....	37
4.6.2	Auswertung anhand der Röntgenbilder.....	38
4.6.3	Vergleich der Röntgenbilder untereinander .....	38
4.7	Statistische Auswertung .....	39
5	Ergebnisse .....	40
5.1	Allgemein.....	40
5.2	Komplikationen .....	41
5.2.1	Intraoperative Komplikationen.....	41
5.2.2	Postoperative Komplikationen .....	41
5.3	Auswertung der Röntgenbilder .....	43
5.3.1	Klassifikation der Frakturen .....	43
5.3.2	Qualität der Repositionen.....	44
5.3.3	Kallusgröße und Entwicklung.....	46
5.4	Bewertung der Frakturheilung .....	49
5.4.1	Kallusausprägung an Tag 21 .....	49
5.4.2	Analyse der Frakturheilung im Verlauf .....	49
5.4.3	Ablauf der Frakturheilung in der Gruppe mit alleiniger Femurfraktur.....	51
5.4.4	Einfluss von Echinomycin auf Frakturheilung .....	52
5.4.5	Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf Frakturheilung.....	53
5.4.6	Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma und Echinomycin auf Frakturheilung.....	55
5.4.7	Zusammenfassung.....	56
6	Diskussion.....	57
6.1	Diskussion von Material und Methoden.....	57
6.1.1	Verwendung von Mäusen als Versuchstiere.....	57
6.1.2	Femurfraktur .....	57
6.1.3	Schädel-Hirn-Trauma .....	58
6.1.4	Echinomycin .....	58

6.1.5	Bildgebende Diagnostik .....	59
6.2	Diskussion der Ergebnisse .....	60
6.2.1	Beurteilung der Frakturheilung im Verlauf .....	60
6.2.2	Einfluss von HIF-1 $\alpha$ auf die Frakturheilung .....	63
6.2.3	Einfluss eines Schädel-Hirn-Traumas auf die Frakturheilung .....	70
6.2.4	Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma und Echinomycingabe auf die Frakturheilung .....	79
6.3	Ausblick .....	85
7	Zusammenfassung.....	86
8	Quellen.....	87
9	Danksagung.....	92
10	Lebenslauf .....	93

## Abkürzungsverzeichnis

HIF: Hypoxie-induzierter Faktor

IL-1: Interleukin-1

IL-6: Interleukin-6

TNF- $\alpha$ : Tumornekrosefaktor- $\alpha$

BMPs: Bone morphogenetic proteins

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

RUNX2: Runt-related transcription factor

RANK: Receptor Activator of NF- $\kappa$ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)

EPO: Erythropoetin

FIH: Factor inhibiting HIF-1 $\alpha$

IL-18: Interleukin 18

CGRP: Calcitonin Gene-Related Peptide

CRP: C-reaktives Protein

DMSO: Dimethylsulfoxid

SHT: Schädel-Hirn-Trauma

CCI: Controlled Cortical Impact

EC: Echinomycin

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Enchondrale Ossifikation, erstellt nach Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9th ed. 2014 ed2014; 954.....	6
Abbildung 2: Reifer Knochen mit Ausschnitt, erstellt nach Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9th ed. 2014 ed2014, 954.....	6
Abbildung 3: Entzündliche Phase der indirekten Frakturheilung, erstellt nach Baker CE, Moore-Lotridge SN, Hysong AA, Posey SL, Robinette JP, Blum DM, et al. Bone Fracture Acute Phase Response-A Unifying Theory of Fracture Repair: Clinical and Scientific Implications. Clin Rev Bone Miner Metab. 2018;16(4):142-58.....	14
Abbildung 4: Reparaturphase der sekundären Frakturheilung, erstellt nach Baker CE, Moore-Lotridge SN, Hysong AA, Posey SL, Robinette JP, Blum DM, et al. Bone Fracture Acute Phase Response-A Unifying Theory of Fracture Repair: Clinical and Scientific Implications. Clin Rev Bone Miner Metab. 2018;16(4):142-58.....	15
Abbildung 5: Umbauphase der sekundären Frakturheilung, erstellt nach Baker CE, Moore-Lotridge SN, Hysong AA, Posey SL, Robinette JP, Blum DM, et al. Bone Fracture Acute Phase Response-A Unifying Theory of Fracture Repair: Clinical and Scientific Implications. Clin Rev Bone Miner Metab. 2018;16(4):142-58.....	16
Abbildung 6: HIF-Signalweg, erstellt nach Semenza GL. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. Annu Rev Pathol. 2014;9:47-71.....	20
Abbildung 7: Einteilung der Versuchstiere .....	30
Abbildung 8: links: Einspannen der Versuchstiere; rechts: Freilegung der Schädeldecke und Markieren der Bohrführung.....	32
Abbildung 9: links: freigelegte Dura Mater; rechts: Positionierung des Kolbens.....	33
Abbildung 10: links: Applikation des Schädel-Hirn-Traumas; rechts: Schwellung und leichte Blutung nach SHT.....	33
Abbildung 11: links: Fixieren der Schädelplatte mit Histoacryl-Kleber; rechts: refixierte Schädelplatte .....	33
Abbildung 12: links: Aufbohren des Femurkanals mit 20G-Kanüle; rechts: Einbringen des Führungsdraht in den Femukanal.....	34
Abbildung 13: links: vollständig eingebrachter und wieder austretender Führungsdraht; rechts oben: Überprüfen der korrekten Drahtlage; rechts Mitte: Einspannen des Versuchstieres in das MouseScrew System zur Applikation der Fraktur; rechts unten: Überprüfen auf Fraktur .....	35
Abbildung 14: links: Überbohren des Führungsdrahts mit 16G-Kanüle; rechts: Herausschieben des Führungsdrahts und Einbringen der Schraube .....	35
Abbildung 15: links: komplett eingebrachte Schraube; rechts: Überprüfen auf korrekte Lage der Schraube .....	36
Abbildung 16: links: Entfernen der Führungshilfe; rechts: Wundverschluss .....	36
Abbildung 17: A - Einfache Fraktur, links: Querfraktur, rechts: Schrägfraktur .....	44
Abbildung 18: A – Einfache Fraktur, Spiralfaktur .....	44
Abbildung 19: B – Keilförmige Fraktur, links: Keil intakt, rechts: Keil fragmentiert .....	44
Abbildung 20: C – Mehrfragmentfraktur, links: Segment intakt, rechts: Segment fragmentiert.....	44
Abbildung 21: Beispiel gute Reposition, Maus Nr. 12 .....	45
Abbildung 22: Beispiel gute Reposition, Maus Nr. 14 .....	45
Abbildung 23: Beispiel mittelmäßige Reposition, Maus Nr. 15 .....	46
Abbildung 24: Beispiel schlechte Reposition, Maus Nr. 39.....	46
Abbildung 25: Kallusausprägung „leicht“; links: Maus Nr. 12; rechts: Maus Nr. 13 .....	46

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 26: mittelstarke Kallusausprägung; links: Maus Nr. 45; rechts: Maus Nr. 105 .....	47
Abbildung 27: starke Kallusausprägung; links: Maus Nr. 37; rechts: Maus Nr. 71 .....	47
Abbildung 28: Wiedererreichen der ursprünglichen Femurgröße im Verlauf, Maus Nr. 11 an Tag 0 (links oben), 14 (rechts oben) und 28 (Mitte unten) .....	48
Abbildung 29: Kallusausprägung an Tag 21 in allen Gruppen mit 3 und 8 Wochen Lebensdauer; links: tabellarisch; rechts: Balkendiagramm .....	49
Abbildung 30: zeitlicher Verlauf der maximalen Kallusausprägung in allen Gruppen mit 8 Wochen Lebensdauer; links: tabellarisch; rechts: Balkendiagramm .....	50
Abbildung 31: maximale Kallusausprägung in allen Gruppen mit 8 Wochen Lebensdauer; links: tabellarisch; rechts: Balkendiagramm .....	50
Abbildung 32: Wiedererreichen der ursprünglichen Femurgröße in allen Gruppen mit 8 Wochen Lebensdauer; links: tabellarisch; rechts: Balkendiagramm .....	51
Abbildung 33: Kallusausprägung an Tag 21 bei Femurfraktur in den Gruppen mit 3 und 8 Wochen Lebensdauer; links: tabellarisch; rechts: Balkendiagramm .....	51
Abbildung 34: links oben: maximale Kallusausprägung; rechts oben: Tag der maximalen Kallusausprägung; Mitte unten: Wiedererreichen der ursprünglichen Femurgröße; jeweils bei Femurfraktur in der Versuchsgruppe mit 8 Wochen Lebensdauer .....	52
Abbildung 35: Kallusausprägung an Tag 21 bei Femurfraktur und Echinomycingabe in den Gruppen mit 3 und 8 Wochen Lebensdauer; links: tabellarisch; rechts: Balkendiagramm .....	52
Abbildung 36: links oben: maximale Kallusausprägung; rechts oben: Tag der maximalen Kallusausprägung; Mitte unten: Wiedererreichen der ursprünglichen Femurgröße; jeweils bei Femurfraktur und Echinomycingabe in der Versuchsgruppe mit 8 Wochen Lebensdauer .....	53
Abbildung 37: Kallusausprägung an Tag 21 bei Femurfraktur und SHT in den Gruppen mit 3 und 8 Wochen Lebensdauer; links: tabellarisch; rechts: Balkendiagramm .....	54
Abbildung 38: links oben: maximale Kallusausprägung; rechts oben: Tag der maximalen Kallusausprägung; Mitte unten: Wiedererreichen der ursprünglichen Femurgröße; jeweils bei Femurfraktur und SHT in der Versuchsgruppe mit 8 Wochen Lebensdauer .....	54
Abbildung 39: Kallusausprägung an Tag 21 bei Femurfraktur, SHT und Echinomycingabe in den Gruppen mit 3 und 8 Wochen Lebensdauer; links: tabellarisch; rechts: Balkendiagramm .....	55
Abbildung 40: links oben: maximale Kallusausprägung; rechts oben: Tag der maximalen Kallusausprägung; Mitte unten: Wiedererreichen der ursprünglichen Femurgröße; jeweils bei Femurfraktur, SHT und Echinomycingabe in der Versuchsgruppe mit 8 Wochen Lebensdauer .....	56
Abbildung 41: Frakturheilung im Verlauf bei Maus Nr. 15, links: Tag 0 nach Applikation der Fraktur, rechts: Tag 0 nach Stabilisierung der Fraktur mittels Schraube .....	61
Abbildung 42: Frakturheilung im Verlauf bei Maus Nr. 15, links: Tag 7, rechts: Tag 14 .....	61
Abbildung 43: Frakturheilung im Verlauf bei Maus Nr. 15, links: Tag 21, rechts: Tag 28 .....	61
Abbildung 44: Frakturheilung im Verlauf bei Maus Nr. 15, links: Tag 35, rechts: Tag 49 .....	62
Abbildung 45: Frakturheilung im Verlauf bei Maus Nr. 15, Tag 56 .....	62
Abbildung 46: Ähnlich bis stärker ausgeprägter Kallus bei Echinomycingabe und vergleichbaren Frakturen; links Maus Nr. 13 (Fraktur), Tag 0, rechts Maus Nr. 44 (Fraktur + EC) Tag 0 .....	63
Abbildung 47: Ähnlich bis stärker ausgeprägter Kallus bei Echinomycingabe und vergleichbaren Frakturen; links Maus Nr. 13 (Fraktur), Tag 35, rechts Maus Nr. 44 (Fraktur + EC) Tag 35 .....	63
Abbildung 48: Ähnlich bis stärker ausgeprägter Kallus bei Echinomycingabe und vergleichbaren Frakturen; links Maus Nr. 14 (Fraktur), Tag 0, rechts Maus Nr. 43 (Fraktur + EC) Tag 0 .....	64
Abbildung 49: Ähnlich bis stärker ausgeprägter Kallus bei Echinomycingabe und vergleichbaren Frakturen; links Maus Nr. 14 (Fraktur), Tag 35, rechts Maus Nr. 43 (Fraktur + EC) Tag 35 .....	64
Abbildung 50: Klassifikation der Frakturen und Qualität der Reposition bei Femurfraktur und Echinomycingabe in den Versuchsgruppen mit 3 und 8 Wochen Lebensdauer .....	64



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 51: Keilförmige Fraktur mit schlechter Reposition und starker Kallusbildung bei Maus Nr. 37 (Fraktur +EC), links: Tag 0, rechts: Tag 21.....	65
Abbildung 52: Spiralfaktur mit schlechter Reposition und anschließender starker Kallusausprägung bei Maus Nr. 39 (Fraktur + EC), links: Tag 0, rechts: Tag 21.....	65
Abbildung 53: offene Reposition mit diffuser Kallusentwicklung bei Maus Nr. 41 (Fraktur + EC) an Tag 0 .....	65
Abbildung 54: offene Reposition mit diffuser Kallusentwicklung bei Maus Nr. 41 (Fraktur + EC), links: Tag 14, rechts: Tag 21.....	66
Abbildung 55: offene Reposition mit diffuser Kallusentwicklung bei Maus Nr. 41 (Fraktur + EC), links: Tag 35, rechts: Tag 56.....	66
Abbildung 56: Klassifikation und Qualität der Repositionen in der Versuchsgruppe mit Femurfraktur und SHT und 8 Wochen Lebensdauer .....	70
Abbildung 57: komplizierte Fraktur mit schlecht fixiertem und sekundär disloziertem Fragment und starker Kallusentwicklung bei Maus Nr. 74 (Fraktur + SHT), links: Tag 0, rechts: Tag 7 .....	71
Abbildung 58: komplizierte Fraktur mit schlecht fixiertem und sekundär disloziertem Fragment und starker Kallusentwicklung bei Maus Nr. 74 (Fraktur + SHT), links: Tag 14, rechts: Tag 21 .....	71
Abbildung 59: Vergleich einer dichteren Kallusbildung bei komplizierten Frakturen und gleichzeitigem Schädel-Hirn-Trauma, links: Nr. 73 (Fraktur+SHT), Tag 0, rechts: Nr. 36 (Fraktur+EC), Tag 0.....	71
Abbildung 60: Vergleich einer dichteren Kallusbildung bei komplizierten Frakturen und gleichzeitigem Schädel-Hirn-Trauma, links: Nr. 73 (Fraktur+SHT), Tag 21, rechts: Nr. 36 (Fraktur+EC), Tag 21.....	71
Abbildung 61: diffuser Kallus auf gesamter Femurlänge nach repetitivem Herabfallen des Gewichts bei Maus Nr. 71 (Fraktur + SHT), links: Tag 0, rechts: Tag 14 .....	72
Abbildung 62: diffuser Kallus auf gesamter Femurlänge nach repetitivem Herabfallen des Gewichts bei Maus Nr. 71 (Fraktur + SHT), links: Tag 21, rechts: Tag 35 .....	72
Abbildung 63: Kallusbildung auch um Schenkelhals bei Fraktur und Schädel-Hirn-Trauma nach repetitivem Herabfallen des Gewichts bei Maus Nr. 73 (Fraktur + SHT), links: Tag 28, rechts: Tag 49 .....	72
Abbildung 64: gute und schnelle Frakturheilung in Versuchsgruppe mit Femurfraktur und zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma bei unkomplizierter Fraktur und guter Reposition bei Maus Nr. 72 (Fraktur + SHT), links: Tag 0, rechts: Tag 14.....	73
Abbildung 65: gute und schnelle Frakturheilung in Versuchsgruppe mit Femurfraktur und zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma bei unkomplizierter Fraktur und guter Reposition bei Maus Nr. 72 (Fraktur + SHT), links: Tag 35, rechts: Tag 56.....	73
Abbildung 66: schnellere Frakturheilung in der Versuchsgruppe mit Femurfraktur und zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma bei einfacher Fraktur und guter Reposition, links: Maus Nr. 67 (Fraktur+SHT), Tag 0; rechts: Maus Nr. 7 (Fraktur), Tag 0 .....	74
Abbildung 67: schnellere Frakturheilung in der Versuchsgruppe mit Femurfraktur und zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma bei einfacher Fraktur und guter Reposition, links: Maus Nr. 67 (Fraktur+SHT), Tag 21; rechts: Maus Nr. 7 (Fraktur), Tag 21 .....	74
Abbildung 68: schnellere Frakturheilung in der Versuchsgruppe mit Femurfraktur und zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma bei einfacher Fraktur und guter Reposition, links: Maus Nr. 68 (Fraktur+SHT), Tag 0; rechts: Maus Nr. 10 (Fraktur), Tag 0 .....	74
Abbildung 69: schnellere Frakturheilung in der Versuchsgruppe mit Femurfraktur und zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma bei einfacher Fraktur und guter Reposition, links: Maus Nr. 68 (Fraktur+SHT), Tag 21; rechts: Maus Nr. 10 (Fraktur), Tag 21 .....	74
Abbildung 70: Kallusandeutung an Tag 7 in der Versuchsgruppe mit Femurfraktur, Echinomycingabe und SHT; links: Maus Nr. 102 (Fraktur+SHT+EC); rechts: Maus Nr. 103 (Fraktur+SHT+EC) .....	79

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 71: Vergleich der Frakturheilung zwischen der Gruppe mit Femurfraktur, Schädel-Hirn-Trauma und Echinomycingabe und Gruppe mit Femurfraktur und Echinomycingabe, links: Maus Nr. 103 (Fraktur+SHT+EC), Tag 0, rechts: Maus Nr. 43 (Fraktur+EC), Tag 0.....	80
Abbildung 72: Vergleich der Frakturheilung zwischen der Gruppe mit Femurfraktur, Schädel-Hirn-Trauma und Echinomycingabe und Gruppe mit Femurfraktur und Echinomycingabe, links: Maus Nr. 103 (Fraktur+SHT+EC), Tag 14, rechts: Maus Nr. 43 (Fraktur+EC), Tag 14 .....	80
Abbildung 73: Vergleich der Frakturheilung zwischen der Gruppe mit Femurfraktur, Schädel-Hirn-Trauma und Echinomycingabe und Gruppe mit Femurfraktur und Echinomycingabe, links: Maus Nr. 103 (Fraktur+SHT+EC), Tag 28, rechts: Maus Nr. 43 (Fraktur+EC), Tag 28 .....	80
Abbildung 74: Typ-C-Mehrfragmentfraktur Tag 0, links Nr. 101 (Fraktur+EC+SHT), rechts Nr. 74 (Fraktur+SHT) .....	81
Abbildung 75: Typ-C-Mehrfragmentfraktur nach Reposition an Tag 0, links Nr. 101 (Fraktur+EC+SHT), rechts Nr. 74 (Fraktur+SHT).....	82
Abbildung 76: Typ-C-Mehrfragmentfraktur, Kallusausprägung im Verlauf an Tag 21, links Nr. 101 (Fraktur+EC+SHT), rechts Nr. 74 (Fraktur+SHT).....	82
Abbildung 77: Diffuse Kallusentwicklung nach Muskeltrauma, Tag 0; links Maus-Nr. 96 (Fraktur+EC+SHT); rechts: Maus Nr. 71 (Fraktur+SHT) .....	82
Abbildung 78: Diffuse Kallusentwicklung nach Muskeltrauma; links Maus-Nr. 96 (Fraktur+EC+SHT); rechts: Maus Nr. 71 (Fraktur+SHT) .....	83
Abbildung 79: Geringere Kallusbildung auch bei komplizierten Frakturen, Maus Nr. 100 (Fraktur+SHT+EC), Tag 0.....	83
Abbildung 80: Geringere Kallusbildung auch bei komplizierten Frakturen, Maus Nr. 100 (Fraktur+SHT+EC), Tag 21.....	83

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lokalisation einer Fraktur nach AO, erstellt nach Meinberg EG, Agel J, Roberts CS, Karam MD, Kellam JF. Fracture and Dislocation Classification Compendium-2018. J Orthop Trauma. 2018;32 Suppl 1:S1-s170. ....	8
Tabelle 2: Schweregradeinteilung von diaphysären Frakturen nach AO-Klassifikation, erstellt nach Meinberg EG, Agel J, Roberts CS, Karam MD, Kellam JF. Fracture and Dislocation Classification Compendium-2018. J Orthop Traum .....	8
Tabelle 3: Schweregradeinteilung von Frakturen der Endsegmente nach AO-Klassifikation, erstellt nach Meinberg EG, Agel J, Roberts CS, Karam MD, Kellam JF. Fracture and Dislocation Classification Compendium-2018. J Orthop Traum .....	9
Tabelle 4: Anzahl der Frakturtypen je nach Schweregrad .....	43
Tabelle 5: Verteilung Qualität der Repositionen .....	45

# 1 Einleitung

Frakturen gehören zu den häufigsten Verletzungen des Menschen. Die Frakturheilung stellt somit einen wichtigen und gleichzeitig einzigartigen Prozess im menschlichen Körper dar. Im Idealfall heilen Knochenfrakturen vollständig aus und führen zu einer Wiederherstellung des ursprünglich unversehrten Zustands vor der Verletzung. Dies wird in der Medizin als Restitutio ad integrum bezeichnet.

Frakturheilung kann auf unterschiedliche Arten stattfinden, man unterscheidet dabei die direkte von der indirekten Frakturheilung. Bei der direkten Frakturheilung wird der Defekt primär durch die Bildung von Lamellenknochen überbrückt, es entsteht kein Kallus. Die indirekte Frakturheilung zeichnet sich im Gegensatz dazu durch die Bildung eines zunächst knorpeligen Kallus aus, der durch weiteren Umbau und Mineralisierung zunächst zu Geflechtknochen und später zu Lamellenknochen umgewandelt wird. Die indirekte Frakturheilung weist in ihrer Entstehung viele Parallelen zur primären Knochenentwicklung durch chondrale Ossifikation auf.

Ob es zur direkten oder indirekten Frakturheilung kommt, ist von der Position und Fixierung der Knochenfragmente zueinander sowie von der Durchblutung abhängig. Starr gerichtete Frakturen mit Kontakt der Knochenfragmente zueinander sowie Frakturen ohne Zerstörung des Periosts können per direkter Frakturheilung abheilen, während Frakturen mit großen hypoxischen Arealen durch Gefäßverletzung und Beweglichkeit der Fragmente zueinander per indirekter Frakturheilung abheilen. Im klinischen Alltag wird die direkte Frakturheilung der indirekten Frakturheilung oft als überlegen angesehen, obwohl sich beide im Hinblick auf das Ziel einer belastungsstabilen Überbrückung des Frakturspalts kaum unterscheiden.

Die Zeitspanne zum Erreichen einer Belastungsstabilität durch vollständige knöcherne Überbrückung des Frakturspalts reicht beim Erwachsenen von drei Wochen bei Frakturen der Fingerknochen bis zu 16 Wochen bei Frakturen des Femurschafts. Der anschließende Umbauprozess bis zur vollständigen Ausheilung und Wiederherstellung der ursprünglichen Knochenstruktur hingegen kann Jahre dauern.

Viele Faktoren beeinflussen den korrekten Ablauf der Frakturheilung und können zu Komplikationen wie der Verzögerung der Frakturheilung oder der Entstehung von Pseudarthrosen führen, was eine Beeinträchtigung im täglichen Leben und der Lebensqualität nach sich zieht.

Eine wichtige Rolle hierbei spielt u.a. die Vaskularisierung. Eine intakte Gefäßversorgung ist für die Neubildung von Knochen essenziell und dementsprechend können Faktoren, die die Durchblutung negativ beeinflussen (z.B. Alter, Nikotin-Abusus, Diabetes Mellitus) auch die Frakturheilung beeinträchtigen. Ein Schlüsselfaktor in der Vaskularisierung, aber auch in weiteren während der Frakturheilung auftretenden Vorgängen ist der Transkriptionsfaktor HIF (Hypoxie-induzierter Faktor). HIF ist ein Transkriptionsfaktor, der unter Hypoxie an die

## Einleitung

DNA bindet und zur gesteigerten Expression bestimmter Zielgene führt. In Studien konnte durch die pharmakologische Blockade von HIF mittels des Peptidantibiotikums Echinomycin eine Abschwächung von Ossifikationsprozessen beobachtet werden.

Das Schädel-Hirn-Trauma ist ein weiterer Einflussfaktor, der in den letzten Jahren häufig im Zusammenhang mit Frakturheilung diskutiert wurde. Studien belegen eine schnellere Frakturheilung bei gleichzeitigem Auftreten eines Schädel-Hirn-Traumas und einer Fraktur. Als Auslöser wird ein Freisetzen von proosteogenetischen Faktoren im verletzten Hirngewebe und deren Übertritt über die zeitweise defekte Bluthirnschranke in die Peripherie mit anschließender lokaler Wirkung diskutiert. Dieser Ansatz liefert dabei nicht nur eine mögliche Erklärung für die beschleunigte Frakturheilung, sondern auch für das Auftreten heterotoper Ossifikationen, die nach Schädel-Hirn-Trauma vermehrt beobachtet werden.

Die Frakturheilung bleibt somit ein wichtiger Bestandteil aktueller Forschung. Zum Verständnis dieses Prozesses tragen Studien zum exakten Ablauf der Frakturheilung, sowie zu Faktoren, die diesen verstärken oder abschwächen können, bei. Tiermodelle helfen hierbei ein reproduzierbares und modifizierbares System zu etablieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein System zu etablieren, mit dem Frakturen reproduziert werden können und das zudem eine Kombination mit anderen Verletzungen, wie in diesem Fall dem Schädel-Hirn-Trauma, erlaubt. Zudem soll das System eine der mit dem Menschen vergleichbare Morphologie der Verletzungen ermöglichen und die Möglichkeit bieten, weitere Einflussfaktoren untersuchen zu können, hier den Einfluss einer Blockade des HIF-Signalwegs.

## 2 Literaturreückblick

### 2.1 Knorpelgewebe

Knorpelgewebe befindet sich im menschlichen Körper an Stellen, an denen flexible und druckresistente Strukturen benötigt werden, z.B. in den Menisken der Kniegelenke oder den Knorpelüberzügen der gelenkbildenden Anteile von Knochen. Knorpel ist nicht durchblutet, die Ernährung erfolgt über Diffusion (1). Im Knorpelgewebe gibt es unterschiedliche Arten von Zellen:

Chondroblasten sind teilungsfähige Knorpelzellen. Sie bilden die Extrazellulärmatrix, die größtenteils aus Kollagen Typ II sowie Hyaluronsäure und Proteoglykanen besteht und somit ein faserverstärktes Gel darstellt. Chondroblasten verbleiben lebenslang unter dem Perichondrium, sind Ausgang für die Regeneration des Knorpels und können zu Chondrozyten differenzieren (2).

Chondrozyten sind Zellen im reifen Knorpelgewebe, die ihre Teilungsfähigkeit verloren haben und für die Erneuerung und dem Umsatz der Extrazellulärmatrix verantwortlich sind (2).

Während der chondralen Ossifikation entwickelt sich aus einer Knorpelvorlage der reife Knochen.

### 2.2 Knochengewebe

Knochengewebe besteht aus einem organischen und einem anorganischen Anteil. Der organische Anteil mit der Extrazellulärmatrix, bzw. dem Osteoid, stellt ca. 20% des Gewebes dar und besteht größtenteils aus Kollagen Typ I und nicht kollagenen Proteinen, wie z.B. Proteoglykanen und Fibronectin. Mit ca. 80% besteht der Großteil des Knochens aus anorganischen Hydroxylapatiten, die Calciumphosphaten entsprechen und in die Extrazellulärmatrix eingelagert für die Mineralisierung des Knochens sorgen (1).

Osteoprogenitorzellen stellen die Vorläuferzellen der unterschiedlichen Zellgruppen im Knochengewebe dar. Sie entstammen dem Mesenchym, ruhen lebenslang in den Knochenhüllen und können zu Osteoblasten differenzieren. Osteoblasten sind die Produzenten der Extrazellulärmatrix, dem Osteoid, und steuern dessen Mineralisation. Sie befinden sich an der freien Oberfläche von Knochen und sind noch nicht vollständig von Osteoid umgeben. Osteozyten sind von Osteoid vollständig „eingemauerte“ Osteoblasten, sie steuern die Funktionsfähigkeit der verkalkten Matrix. Osteoklasten sind die Fresszellen des Knochengewebes. Sie entstehen durch Fusion von Monozyten und sind für den Ab- und Umbau des Knochens verantwortlich (2).

Während der Entstehung des Knochengewebes kann man zwei unterschiedliche Arten von Knochen unterscheiden.

### **2.2.1 Geflechtknochen**

Bei Geflechtknochen handelt es sich um unreifen Knochen, der durch desmale oder chondrale Ossifikation entsteht. Er besteht aus zellreicher, wenig mineralisierter Knochensubstanz mit ungeordnet verlaufenden Kollagenfasern und wird nach und nach zu reifem Lamellenknochen umgebaut (2).

### **2.2.2 Lamellenknochen**

Lamellenknochen stellt die reife Form des Knochens dar. Die Knochensubstanz lagert sich zu Lamellen zusammen und die Kollagenfasern werden entlang der einwirkenden Kräfte ausgerichtet, um eine maximale Stabilität zu erreichen. Man kann im Lamellenknochen zwei Anteile unterscheiden: Die Spongiosa und die Kompakta. Die Kompakta bildet die äußere Schicht des Knochens: Konzentrische Knochenlamellen, sogenannte Osteone, bilden den Hauptbestandteil. Im Inneren des Knochens liegt die Spongiosa. Hier formen die Lamellen ein Trabekelwerk, zwischen denen das Knochenmark liegt. Das Trabekelwerk ist ebenfalls entlang der Hauptbelastungszonen des jeweiligen Knochens ausgerichtet (2).

## 2.3 Arten der Ossifikation

Im Laufe der Entwicklung von Knochengewebe im menschlichen Körper kann man zwei Arten der Ossifikation unterscheiden. Die desmale, direkte und die chondrale, indirekte Ossifikation.

### 2.3.1 Desmale Ossifikation

Die Knochenentwicklung durch desmale Ossifikation ist im menschlichen Körper auf wenige Knochen, wie z.B. die Klavikula und den Schädel beschränkt. Knochen entsteht hierbei direkt aus kondensierenden Mesenchymzellen, die zu Osteoblasten differenzieren und um sich herum Osteoid ablagern, das mineralisiert. Es entstehen kleine Knochenteilchen, die fusionieren und durch weitere Verdichtung zunächst Geflechtknochen bilden, der später zu Lamellenknochen umgebaut wird (2).

### 2.3.2 Chondrale Ossifikation

Bei der chondralen Ossifikation entsteht Knochengewebe aus einer Knorpelvorlage. Man unterscheidet die perichondrale Ossifikation, die um das Knorpelmodell herum stattfindet, von der enchondralen Ossifikation, bei der die Ossifikation im Knorpelmodell stattfindet. Zunächst kommt es zu einer Verdichtung der Mesenchymzellen, deren Differenzierung zu Chondroblasten und zur Produktion von Extrazellulärmatrix. So entsteht das primäre Knorpelmodell des Knochens. Am Rand des Knorpelgewebes kommt es anschließend zur Bildung des Perichondriums durch zu Fibroblasten differenzierende Mesenchymzellen. Nach Abschluss der Bildung des Knorpelmodells differenzieren im Perichondrium Zellen zu Osteoblasten, diese bilden eine Knochenmanschette um das Knorpelmodell, es entsteht die Kompakta. Das Perichondrium wird zum Periost umgewandelt. Dieser Prozess entspricht der perichondralen Ossifikation und dient dem appositionellem Knochenwachstum. Da hier streng genommen Knochen um, und damit außerhalb der Knorpelanlage entsteht, handelt es sich um eine desmale Form der Ossifikation. Im Knorpelmodell selbst findet anschließend die enchondrale Ossifikation statt. Die von der Knochenmanschette eingeschlossenen Chondrozyten hypertrophieren und sezernieren VEGF, was zur Mineralisierung der Knorpelmatrix und zum Einsprießen von Gefäßen in den Knorpel führt. Mit dem Blutstrom gelangen Nährstoffe sowie Mesenchymzellen mit Osteoprogenitorzellen und Chondroklasten in das Knorpelmodell. Die hypertrophierten Chondrozyten gehen durch Apoptose zugrunde und ihre Reste sowie Teile der Knorpelmatrix werden von den Chondroklasten abgebaut. Im Zentrum des Knochens entsteht so die primäre Markhöhle. In der verbliebenen Knorpelmatrix lagern sich Osteoprogenitorzellen ab, die zu Osteoblasten differenzieren und Osteoid synthetisieren. Durch Mineralisierung des Osteoids entsteht zunächst Geflechtknochen als primäre Spongiosa. Der Geflechtknochen wird nach und nach abgebaut und zu Lamellenknochen umgewandelt.

Während der Entwicklung schreitet die enchondrale Ossifikation nach proximal und distal in Richtung der Epiphysen fort und sorgt so für das Längenwachstum der Knochen. Postnatal



kommt es in den Epiphysen weiterhin zum Längenwachstum durch enchondrale Ossifikation. Dabei bildet die Epiphyse eine Übergangszone zwischen den Knorpelzellen der Epiphyse und dem durch enchondrale Ossifikation entstandenem Knochen auf der diaphysären Seite. Erst mit der Verknöcherung der Epiphysenfugen kommt das Längenwachstum zum Erliegen (1-3).

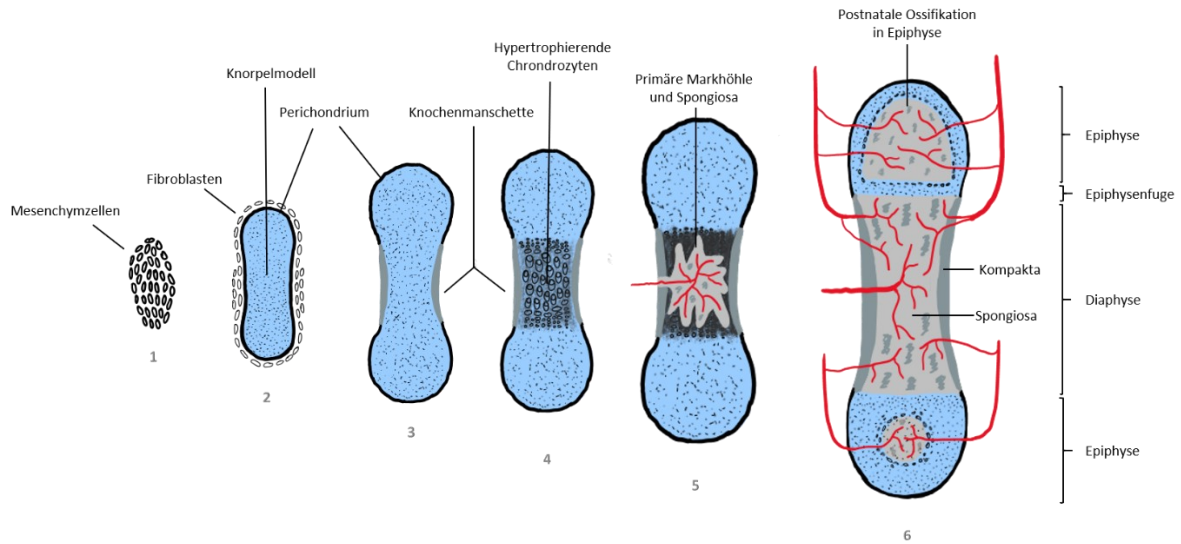


Abbildung 1: Enchondrale Ossifikation, erstellt nach Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9th ed. 2014 ed2014; 954

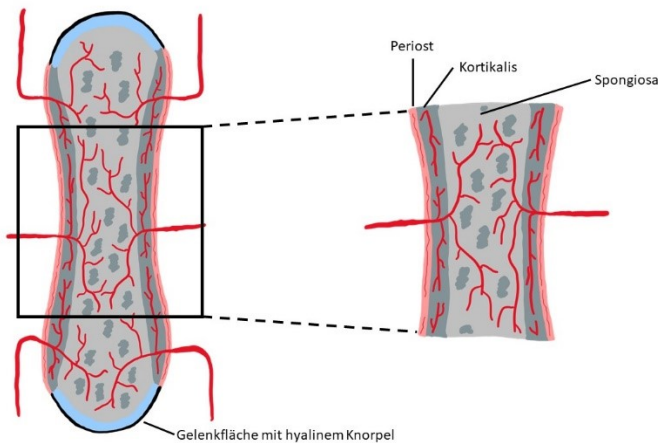


Abbildung 2: Reifer Knochen mit Ausschnitt, erstellt nach Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9th ed. 2014 ed2014, 954

## 2.4 Frakturen

Als Fraktur bezeichnet man eine Kontinuitätsunterbrechung des Knochens (4).

### 2.4.1 Einteilung

Frakturen können anhand unterschiedlicher Kriterien eingeteilt werden, wobei nachfolgend zwei der häufig gewählten Einteilungskriterien dargestellt werden sollen.

#### 1. Einteilung nach Mechanismus

Frakturen können anhand ihres Entstehungsmechanismus unterschieden werden. Dabei unterscheidet man Ermüdungsfrakturen durch gleichförmige mechanische Überbeanspruchung und pathologische Frakturen, die aufgrund einer Vorerkrankung ohne adäquates Trauma entstehen, von traumatischen Frakturen. Traumatische Frakturen können entweder durch eine direkte äußere Gewalteinwirkung oder indirekt durch die Wirkung interner Hebelkräfte entstehen. Der Entstehungsmechanismus kann anschließend weiter konkretisiert werden, sodass man z.B. Biegungs-, Kompressions-, Torsions-, Avulsions- und Abscherfrakturen voneinander unterscheidet (4, 5).

#### 2. Einteilung nach Integrität der Weichteildecke

Anhand der Verletzung der die Fraktur umgebenden Weichteildecke kann man Frakturen in geschlossene und offene Frakturen einteilen. Bei letzterem ist die Kontinuität der Weichteildecke unterbrochen, es besteht Kontakt zwischen Knochen und Außenwelt (4).

### 2.4.2 Klassifikation

Zur besseren Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Frakturformen untereinander wurde von der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen ein einheitliches Klassifikationssystem eingeführt. Eine Überarbeitung der Klassifikation wurde zuletzt in einem 2018 erschienenen Kompendium veröffentlicht (6). Demnach müssen zur korrekten Einteilung einer Fraktur folgende Punkte beachtet werden:

#### 1. Lokalisation der Fraktur

Jeder Körperregion wird mit einem Buchstaben beziffert, die eine genaue Zuordnung der Fraktur ermöglicht.

## Literaturrückblick

*Tabelle 1: Lokalisation einer Fraktur nach AO, erstellt nach Meinberg EG, Agel J, Roberts CS, Karam MD, Kellam JF. Fracture and Dislocation Classification Compendium-2018. J Orthop Trauma. 2018;32 Suppl 1:S1-s170.*

Nummerierung	Körperregion
1	Humerus
2	Radius bzw. Ulna
3	Femur
4	Tibia bzw. Fibula
5	Wirbelsäule
6	Becken
7	Hand
8	Fuß
9	Schädelknochen

### 2. Segmentlokalisierung

Innerhalb der Region der Fraktur wird mit einer Ziffer zusätzlich das Segment angegeben, um die Lokalisation genauer zu beschreiben. Bei langen Röhrenknochen bezieht sich diese Ziffer auf die Abschnitte proximales Endsegment (Ziffer 1), Diaphyse (Ziffer 2) und distales Endsegment (Ziffer 3). An den Knochen von Hand und Fuß beschreiben die Ziffern unterschiedliche Hand- und Fußwurzelknochen, bzw. Metacarpal- oder Phalangealknochen (6).

### 3. Morphologie und Schweregrad der Fraktur

Die Beschaffenheit und Schwere der Frakturen wird dabei für diaphysäre Frakturen je nach Beschaffenheit der Fraktur und für Frakturen der Endsegmente je nach Beteiligung der Gelenkfläche angegeben.

*Tabelle 2: Schweregradeinteilung von diaphysären Frakturen nach AO-Klassifikation, erstellt nach Meinberg EG, Agel J, Roberts CS, Karam MD, Kellam JF. Fracture and Dislocation Classification Compendium-2018. J Orthop Traum*

Schweregrad	Untergruppe	Beschreibung
Einfach – Typ A	1	Spiralfraktur
	2	Schrägfraktur (>30°)
	3	Querfraktur (<30°)
Keilförmig – Typ B	2	Keil intakt
	3	Keil fragmentiert
Mehrfragment – Typ C	2	Segment intakt
	3	Segment fragmentiert

Tabelle 3: Schweregradeinteilung von Frakturen der Endsegmente nach AO-Klassifikation, erstellt nach Meinberg EG, Agel J, Roberts CS, Karam MD, Kellam JF. *Fracture and Dislocation Classification Compendium-2018. J Orthop Traum*

Schweregrad	Untergruppe	Beschreibung
Extraartikulär - A	1	Avulsionsfraktur
	2	Einfache Fraktur
	3	Mehrfragmentfraktur
Partiell artikulär - B	1	Einfache Fraktur
	2	Splitter- und/oder Absenkungsfraktur
	3	Fragmentiert
Komplett artikulär - C	1	Einfache Fraktur
	2	Mehrfragmentfraktur

Hiernach entsteht ein vierstelliger Code, der die Lokalisation, Beschaffenheit und Schwere der Fraktur genau definiert. Beispiel: 32A3 = Einfache, diaphysäre Querfraktur des Femurs

### 2.4.3 Klinik

Klinisch kann man sichere von unsicheren Frakturzeichen unterscheiden. Zu den sicheren Frakturzeichen gehören Achsabweichung, übersteigerte Beweglichkeit, Stufenbildung, erkennbare Knochenlücken, Krepitationen, offene Frakturen mit sichtbaren Knochenfragmenten sowie der radiologische Nachweis einer Fraktur. Zu den unsicheren Frakturzeichen gehören Symptome wie Rötung, Schwellung, Schmerz, Funktionseinschränkungen und die Ausbildung eines Hämatoms. Bei der klinischen Untersuchung sollte stets eine Beurteilung der Hautverhältnisse sowie der peripheren Durchblutung, Sensibilität und Motorik erfolgen, um mögliche Begleitverletzungen auszuschließen (4, 5). Der radiologische Nachweis einer Fraktur erfolgt in der Regel durch Röntgenaufnahmen in zwei senkrecht aufeinander stehenden Ebenen. Eine zusätzliche Schnittbilddiagnostik wird häufig bei komplexen Frakturen oder Frakturen mit Beteiligung der Gelenkfläche durchgeführt (7).

### 2.4.4 Therapie

Die Grundprinzipien zur Therapie von Frakturen schließen die Reposition, Retention und Rehabilitation mit ein. Die Reposition beinhaltet dabei die Wiederherstellung der anatomischen Struktur des Knochens in Achse, Länge und Rotation und sollte möglichst atraumatisch unter entsprechender Analgesie erfolgen. Anschließend erfolgt die Retention mit Ruhigstellung der zueinander fixierten Frakturfragmente, entweder durch Operation oder durch stützende Verbände. Die Rehabilitation beinhaltet ein vom Behandlungsverfahren abhängiges Nachbehandlungsschema mit entsprechender Festlegung von Dauer und Ausmaß der Belastung. Grundsätzlich ist eine konservative oder operative Therapie von Frakturen möglich (4, 5).

#### **2.4.4.1 Konservativ**

Ein konservatives Therapieschema wird häufig bei nicht dislozierten Frakturen oder allgemeinen Kontraindikationen gegen eine Operation oder Narkose gewählt. Hierbei erfolgt nach erfolgreicher Reposition eine Ruhigstellung der Fraktur durch stützende Verbände, z.B. im Gipsverband. Vorteile einer konservativen Therapie sind das fehlende Operations- und Narkoserisiko, ein geringeres Infektionsrisiko, Vermeiden von Narben durch Operation sowie die fehlende Notwendigkeit der Durchführung von Folgeeingriffen zur Metallentfernung. Die Nachteile liegen in der langen Ruhigstellung mit dem Risiko der Entstehung von Inaktivitätsatrophien von Muskeln und Knochen, einer unzureichenden Reposition durch die konservative Behandlung und dem durch Immobilisation deutlich erhöhten Thrombose- und Embolierisiko. Bei Frakturen der unteren Extremität muss deshalb stets eine Thromboseprophylaxe erfolgen (4, 5).

#### **2.4.4.2 Operativ**

Prinzipiell mögliche Verfahren zur operativen Therapie von Frakturen sind die Osteosynthese, die Resektion, die Versteifung und der chirurgische Gelenkersatz. Notfallindikationen zur operativen Therapie stellen offene Frakturen und komplizierte Begleitverletzungen, wie Gefäß- oder Nervenverletzungen, dar. Weitere Indikationen zur operativen Therapie sind Frakturen mit Gelenkbeteiligung und einer Stufenbildung über zwei Millimeter, gelenknahe Frakturen sowie Frakturen mit erheblicher Dislokation und Instabilität. Die operative Therapie kann auch als sekundäre Maßnahme nach erfolgloser konservativer Therapie eingesetzt werden. Vorteile der operativen Therapie sind eine bessere und stabilere Wiederherstellung der anatomischen Achs- und Gelenkkontinuität sowie die Möglichkeit einer schnelleren und intensiveren Mobilisation. Nachteile liegen in der erhöhten Infektionsgefahr, dem Operations- und Narkoserisiko sowie in gegebenenfalls notwendigen Folgeoperationen.

Die operative Versorgung von Frakturen wird als Osteosynthese bezeichnet. Dabei kommen unterschiedliche Prinzipien und Vorgehensweisen zum Einsatz. Ein Kontakt der Fraktarenden sowie eine stabile Verbindung dieser Enden kann einerseits durch interfragmentäre Kompression, andererseits durch eine Schienung der Fraktur erreicht werden.

Bei der interfragmentären Kompression unterscheidet man eine statische Kompression durch senkrecht zum Frakturpalt eingebrachte Zugschrauben von einer dynamischen Kompression, bei der durch Zuggurtung eine Umwandlung von Zug- in Druckkräfte und so eine bewegungsabhängige Kompression des Frakturpalts erzielt wird. Die statische Kompression ermöglicht dabei meist eine primäre Knochenheilung.

Die operative Schienung einer Fraktur kann extra- oder intramedullär erfolgen. Die extramedulläre Schienung erfolgt dabei durch das Anbringen von Platten, einem Fixateur externe oder der Spickdrahtosteosynthese.

Bei der intramedullären Schienung wird ein Nagel in den Markraum von langen Röhrenknochen eingebracht und so eine Schienung der Fraktur von innen erreicht. Nach Einbringen des Nagels kann zusätzlich eine Verriegelung durch quer eingebrachte Bolzen

erfolgen, die ein Zusammensinken der Fraktur oder eine Rotationsinstabilität verhindern sollen.

Die Wahl des Osteosyntheseverfahrens hängt dabei von Art und Beschaffenheit der Fraktur ab (7).

#### **2.4.5 Komplikationen**

Komplikationen von Frakturen können entweder direkt durch den Verletzungsmechanismus oder indirekt im Verlauf auftreten. Zu den direkten Komplikationen zählen unter anderem Haut- und Weichteilschäden, Bandverletzungen sowie Verletzungen von Nerven und Gefäßen mit Beeinträchtigung von Motorik und Sensibilität und einem möglichen Blutverlust.

Indirekte Komplikationen umfassen zum Beispiel ein sich sekundär entwickelndes Kompartmentsyndrom, die Entstehung einer posttraumatischen Osteomyelitis oder Arthrose sowie das Auftreten von Folgefrakturen oder einem komplexen regionalen Schmerzsyndrom. Störungen in der Frakturheilung zählen ebenfalls zu den indirekten Komplikationen. Sie treten meist dann auf, wenn zentrale Voraussetzungen zur Frakturheilung wie eine intakte Durchblutung, eine suffiziente Ruhigstellung oder ein ausreichender Kontakt der Frakturrenden nicht gegeben sind. Man spricht dabei von einer verzögerten Frakturheilung, wenn nach Ablauf von vier bis sechs Monaten noch keine komplette Konsolidierung der Fraktur erreicht ist und von einer Pseudarthrose bei einer fehlenden knöchernen Überbrückung nach mehr als sechs Monaten. Pseudarthrosen können sich dabei hypertroph mit überschießender Knochenneubildung bei fehlender Ruhigstellung oder atroph durch mangelnde Versorgung der Fraktur darstellen (4, 5).

## 2.5 Frakturheilung

Im Anschluss an eine Fraktur setzt der Prozess der Frakturheilung ein, wobei hierbei im Idealfall eine „Resitutio ad integrum“ erreicht wird, es also zu einer Wiederherstellung der ursprünglichen unversehrten Knochenstruktur kommt (8, 9). Die Zeit bis zur Ausheilung einer Fraktur variiert je nach Verletzung von ca. zwei bis drei Wochen bei Frakturen der Fingerknochen und 12 bis 16 Wochen bei Frakturen der Wirbelsäule, des Femur- und des Tibiaschafts (9). Störungen im normalen Heilungsprozess wie oben beschrieben treten mit einer Häufigkeit von 5 bis 10 Prozent auf (8, 10, 11). Risikofaktoren für eine verzögerte Frakturheilung oder das Auftreten von Pseudarthrosen stellen unter anderem ein fortgeschrittenes Alter, ein Diabetes Mellitus, chronisch entzündliche Erkrankungen, Erkrankungen des Gefäßsystems sowie Alkohol- und Nikotinabusus dar (11).

Bei der Frakturheilung unterscheidet man die primäre direkte Frakturheilung von der sekundären indirekten Frakturheilung. Die Unterschiede und zugrunde liegenden Mechanismen sollen nachfolgend erläutert werden.

### 2.5.1 Primäre (direkte) Frakturheilung

Eine direkte Frakturheilung tritt bei Verletzungen auf, die ohne eine Zerstörung des Periosts oder mit Kontakt der Fraktarenden nach Verletzung einhergehen und zieht keine sichtbare Kallusbildung nach sich. Voraussetzung ist eine starre Fixierung der Fraktarenden zueinander. Man kann die direkte Frakturheilung wiederum in zwei Kategorien unterteilen, die Kontakt- und Spaltheilung. Die vollständige Wiederherstellung der ursprünglichen Knochenstruktur durch direkte Frakturheilung kann Monate bis Jahre dauern (12).

Kontaktheilung tritt auf, wenn der Frakturspalt unter 0,01 Millimeter beträgt. Dabei fressen kegelförmig angeordnete Osteoklasten kleine longitudinale Kanäle in das jeweilige benachbarte Fragment. In diesen Kanal wandern Kapillaren, Endothelzellen und Osteoprogenitorzellen ein. Dies führt über die gleichzeitige Wiederherstellung des Haver's-Gefäßsystems und durch von Osteonen gebildeten und zur Längsachse des Knochens gerichteten Lamellenknochen zum Wiederaufbau der ursprünglichen Knochenstruktur (12, 13).

Spaltheilung tritt bei einer Größe des Frakturspalts unter 1 Millimeter auf. Der Frakturspalt wird zunächst mit Knochengewebe (Lamellenknochen) aufgefüllt. Dieser ist noch ungerichtet und verläuft senkrecht zur Längsachse des Knochens. Anschließend folgt ein Prozess ähnlich der Kontaktheilung. Der ungerichtete Lamellenknochen wird nach und nach abgebaut und durch längsgerichtete Havers-Kanäle und Osteone, die Lamellenknochen produzieren, ersetzt (12, 13).

In der Theorie findet die direkte Frakturheilung bei perfekt gerichteten und starr fixierten Frakturen statt (14). In der Praxis findet jedoch auch bei Frakturen, die nicht diesem Typus entsprechen und die durch indirekte Frakturheilung ausheilen, in manchen Bereichen eine direkte Frakturheilung statt. Dies sind die Bereiche, in denen die periostale Blutversorgung trotz des Traumas intakt geblieben ist (14, 15). Eine ausschließlich direkte Frakturheilung ist folglich selten.

## 2.5.2 Sekundäre (indirekte) Frakturheilung

Die sekundäre Frakturheilung ist die häufigste Art der Frakturheilung. Sie geht mit einer Kallusbildung einher (9) und kommt bei nicht operativ versorgten sowie bei operativ versorgten Frakturen, die eine verbleibende Bewegung der Fragmente zueinander ermöglichen vor, z.B. bei intramedullärer Nagelung (12). Der Ablauf ähnelt dem der embryonalen chondralen Ossifikation, weist jedoch auch Unterschiede auf. So gibt es bei der embryonalen chondralen Ossifikation beispielsweise keine entzündliche Phase, gleichzeitig nehmen Hormone hier einen größeren Einfluss auf die Ossifikation (16). Die indirekte Frakturheilung läuft in unterschiedlichen Phasen ab:

### 1) Entzündliche Phase

Durch das Auftreten einer Fraktur wird die normale Architektur und Vaskularisierung des Knochens unterbrochen. Durch den Verlust der physiologisch schützenden Barriere zum umliegenden Gewebe und durch die Ruptur von Blutgefäßen kommt es zur Gefahr der Infektion und Blutung sowie durch verminderte Sauerstoffzufuhr und Verlust der Gefäßstrukturen zur Hypoxie im verletzten Gewebe (14, 15). Als Antwort kommt es durch zugrunde gegangene Zellen zur Aktivierung des Gerinnungssystems und zur Kontraktion von Arteriolen. Es bildet sich ein Netzwerk aus Thrombozyten und Fibrin, das Frakturhämatom, das zur Blutstillung beiträgt und eine schützende Barriere zum Schutz vor Infektion bildet (14). Im Frakturhämatom kommt es durch die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  und BMPs (8, 17) durch degranulierende Thrombozyten oder durch aufgrund der Hypoxie zugrunde gehender Zellen zur Rekrutierung von Entzündungszellen, darunter Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile und Lymphozyten (15). Diese Entzündungszellen sezernieren ihrerseits weitere proinflammatorische Zytokine und erhalten die entzündliche Kaskade aufrecht (15, 18). Die akute entzündliche Phase erreicht ihren Höhepunkt nach ca. 24 Stunden (12).

Eine koordinierte und balancierte Immunantwort ist für die Frakturheilung essenziell. Überschießende sowie abgeschwächte Immunantworten beeinträchtigen die Frakturheilung (19), während eine anhaltende Infektion die Heilung verhindert (8).



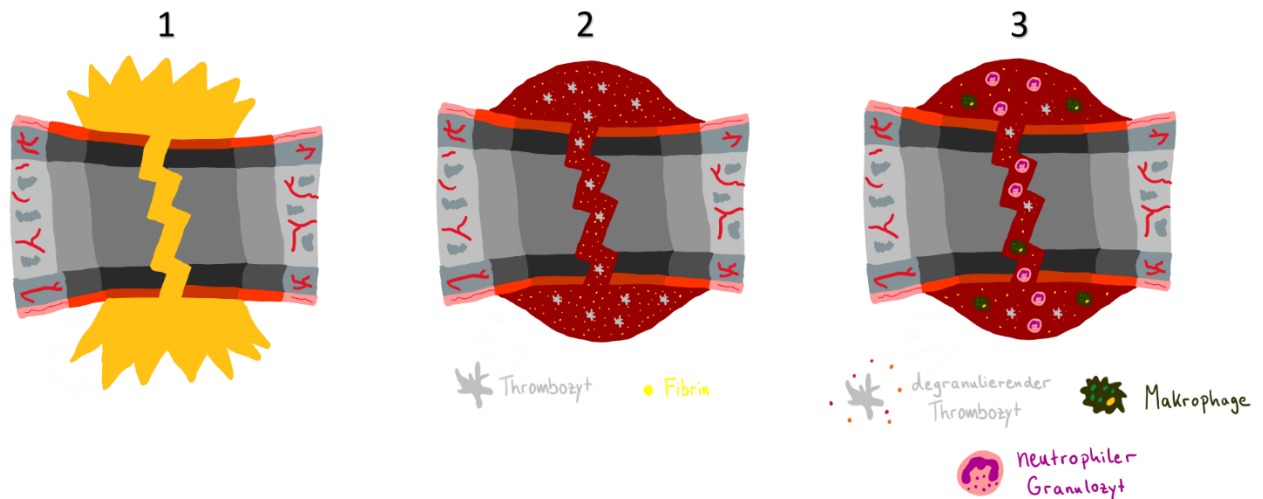


Abbildung 3: Entzündliche Phase der indirekten Frakturheilung, erstellt nach Baker CE, Moore-Lotridge SN, Hysong AA, Posey SL, Robinette JP, Blum DM, et al. Bone Fracture Acute Phase Response-A Unifying Theory of Fracture Repair: Clinical and Scientific Implications. Clin Rev Bone Miner Metab. 2018;16(4):142-58

1. Trauma mit Fraktur des Knochens und Entstehung einer Hypoxie im umliegenden Gewebe; 2. Einblutung durch rupturierte Gefäße, Entwicklung eines Frakturhämatoms mit Fibrin und Thrombozyten; 3. Entzündung und Immunantwort, Degranulation von Thrombozyten, Anlocken von Makrophagen, Neutrophilen und weiteren Entzündungszellen

## 2) Reparaturphase

Nach Abklingen der akuten Entzündungsphase beginnt die Reparaturphase. Auch hier sind weiterhin Entzündungszellen und proinflammatorische Zytokine präsent, es scheint aber ein Umschalten von pro-entzündlicher zu pro-reparativer Aktivität stattzufinden (14, 15). Durch chemotaktische Faktoren angelockt, lagern sich Fibroblasten und Endothelzellen um die Fraktur ab, es entsteht Granulationsgewebe (20). Gleichzeitig werden nekrotisches Gewebe und das Fibrinnetz im Frakturhämatom durch Makrophagen abgebaut (14). Ebenfalls durch Chemotaxis werden mesenchymale Stammzellen rekrutiert (14), die hauptsächlich lokal aus dem Periost und dem Knochenmark stammen (21). Diese Stammzellen sind multipotent und können u.a. zu Chondrozyten, Osteoblasten und Adipozyten differenzieren (17). Im immer noch hypoxischen und avaskulären Gewebe differenzieren diese Zellen unter dem Einfluss von HIF1- $\alpha$  und durch SOX-9 reguliert zu Chondrozyten (22), die eine Knorpelmatrix bilden (14, 18). Knorpelwachstum generell wird durch Hypoxie gefördert (23) und im Rahmen der indirekten Frakturheilung stellen Hypoxie und der Verlust der Vaskularisierung eine maßgebliche Voraussetzung für die Bildung einer primären Knorpelmatrix dar. Während diesem Abschnitt der Frakturheilung, der Chondrogenese, wird die Osteogenese durch die Inhibition von RUNX-2 aktiv unterdrückt (24). Durch die primäre Knorpelmatrix wird der Frakturspalt überbrückt und die Fraktur stabilisiert. Ist genügend Stabilität erreicht, beginnen die Chondrozyten zu hypertrophieren und Zytokine zu produzieren, die nun die Vaskularisierung und Osteogenese fördern (14, 15). Ein wichtiger Wachstumsfaktor in diesem Prozess ist der Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF, der untenstehend näher erläutert wird. Mit der Hypertrophie der Chondrozyten einhergehend nimmt zudem die Expression von SOX-9 ab, was eine vermehrte Expression von RUNX-2 und den Beginn der Osteogenese nach

sich zieht. Als Folge dieses Prozesses wird nun zunächst die Knorpelmatrix mineralisiert (15). Mit dem Einsprießen neuer Gefäße gelangen auch Osteoklasten und Osteoblasten in die Knorpelmatrix. Die Osteoklasten beginnen mit dem Abbau der mineralisierten Knorpelmatrix, während die Osteoblasten Geflechtknochen bilden. So entsteht ein harter Kallus, der nun physiologischer Belastung standhält (14). Da der weiche Kallus im Röntgenbild nicht zu sehen ist und der harte Kallus erst mit Beginn der Vaskularisierung entsteht, spiegelt die Detektion von hartem Kallus im Röntgenbild gewissermaßen auch die Vaskularisierung wider (14).

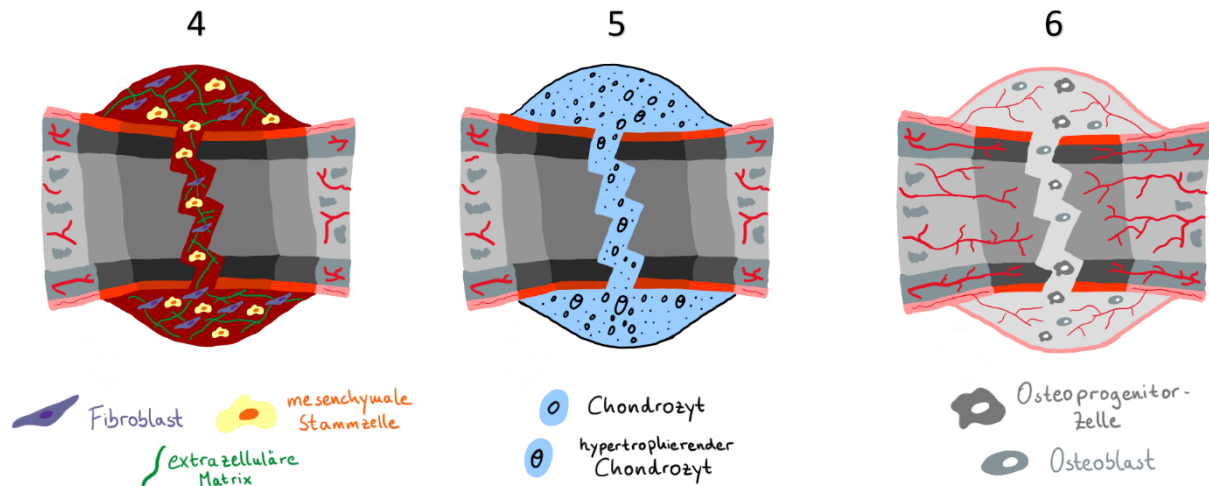


Abbildung 4: Reparaturphase der sekundären Frakturheilung, erstellt nach Baker CE, Moore-Lotridge SN, Hysong AA, Posey SL, Robinette JP, Blum DM, et al. Bone Fracture Acute Phase Response-A Unifying Theory of Fracture Repair: Clinical and Scientific Implications. Clin Rev Bone Miner Metab. 2018;16(4):142-58

4. Einlagerung von Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen, Bildung eines Granulationsgewebes; 5. Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu Chondrozyten und Bildung einer Knorpelmatrix, Reifung der Knorpelzellen mit Hypertrophie der Chondrozyten; 6. Vaskularisierung und Mineralisierung der Knorpelmatrix, Einschwemmen von Osteoprogenitorzellen, die zu Osteoblasten differenzieren und Geflechtknochen bilden

### 3) Umbauphase

Nach der Aushärtung des Kallus beginnt dessen Umbauprozess. Es kann beim Menschen Jahre dauern, bis eine vollständige Wiederherstellung der Knochenstruktur und des Gefäßsystems erreicht ist (12). Hierbei wird der Geflechtknochen nach und nach durch Lamellenknochen ersetzt (15).

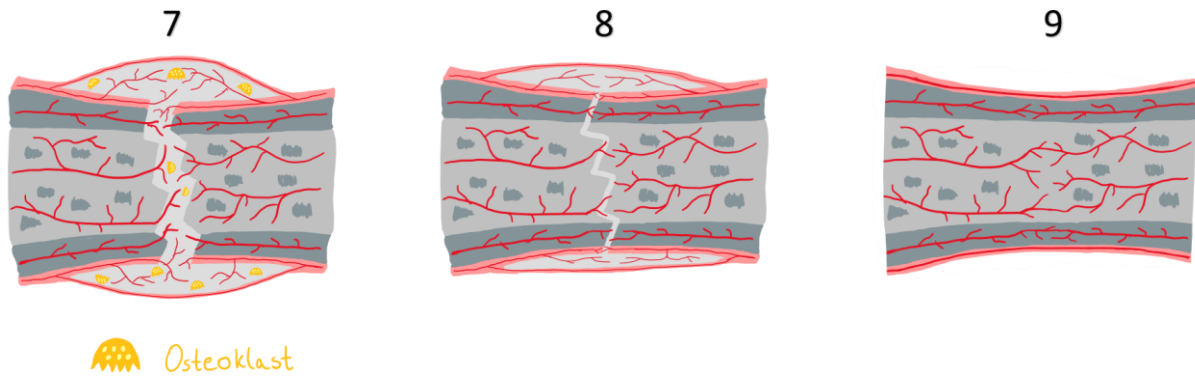


Abbildung 5: Umbauphase der sekundären Frakturheilung, erstellt nach Baker CE, Moore-Lotridge SN, Hysong AA, Posey SL, Robinette JP, Blum DM, et al. Bone Fracture Acute Phase Response-A Unifying Theory of Fracture Repair: Clinical and Scientific Implications. Clin Rev Bone Miner Metab. 2018;16(4):142-58

7. Beginnender Umbau des Kallus, Abbau von überschüssigem Kallus durch Osteoklasten; 8. Ersatz des Geflechtknochen durch Lamellenknochen und Revaskularisierung der Knochenmatrix; 9. abgeschlossene Frakturheilung mit revaskularisiertem Periost, Kortikalis und Spongiosa

Wie bereits zuvor erläutert, ist Frakturheilung meist eine Kombination aus direkter und indirekter Frakturheilung (8, 14). Yuasa et al. zeigten in einer Studie zur Frakturheilung, dass an den distalen Enden des Kallus, an denen es unverletztes Kortikalisgewebe und Shuntverbindungen zum intramedullären Blutfluss gibt, harter Kallus auch ohne vorherige Knorpelvorlage entsteht und dass Frakturheilung, in Abhängigkeit von der Vaskularisierung, eine Mischung aus direkter und indirekter Frakturheilung ist (25).

Im klinischen Alltag wird oft davon ausgegangen, dass die direkte Frakturheilung der indirekten überlegen ist, weshalb im Rahmen der Versorgung oft das Erreichen einer maximalen Stabilität durch eine Operation und osteosynthetische Versorgung angestrebt wird. Im Hinblick auf das Ergebnis der Wiedervereinigung der Frakturrenden sind indirekte und direkte Frakturheilung jedoch gleichwertig. Zudem ist das Ziel, eine direkte Frakturheilung durch starre Osteosynthese zu erreichen, nicht in jeder Umgebung sinnvoll, z.B. bei Frakturen mit unzureichender Blutversorgung und hypoxischer Umgebung (14).

### 2.5.3 Rolle der Vaskularisierung in der Frakturheilung

Die Vaskularisierung spielt eine wichtige Rolle in der Frakturheilung. Sie ist die treibende Kraft für die Ossifikation, nachdem in der zunächst avaskulären und hypoxischen Umgebung ein Knorpelmodell entstanden ist. Die Vaskularisierung und Angiogenese wird vor allem durch die Hypertrophie der Chondrozyten und die damit einhergehende Sezernierung von VEGF gefördert. Neben anderen proangiogenetischen Faktoren hat vor allem HIF-1 $\alpha$  einen Einfluss auf VEGF (17). Erst mit dem Einsprießen von Blutgefäßen werden Nährstoffe,

Wachstumsfaktoren, Zytokine, Osteoblasten und Osteoklasten in den weichen Kallus transportiert (20) und dieser kann abgebaut und harter Kallus aufgebaut werden. Beim anschließenden Umbau zu Lamellenknochen wird der Grad der Vaskularisierung reduziert, bis der Ausgangszustand wieder erreicht ist (14).

VEGF gehört zur Gruppe der Wachstumsfaktoren und fördert unter anderem die Proliferation und Migration von Endothelzellen und so die Formation von Blutgefäßen (17). VEGF hat zudem chemotaktische Effekte auf Osteoblasten und mesenchymale Stammzellen, fördert die Differenzierung von Osteoblasten und über die Expression von RANK die Rekrutierung von Osteoklasten, die für den Umbau des Knochens wichtig sind (24).

Yusua et al. zeigten in einer Studie zur Frakturheilung am Mausmodell den Verlauf der Frakturheilung im Zusammenhang mit der Vaskularisierung auf. Nach der Verletzung entstand in der zentralen, nun avaskulären, Region ein weicher Kallus, während proximal und distal bereits die Vaskularisierung begann, wobei die Blutgefäße direkt aus intakten intramedullären Gefäßen hervorgingen. Diese Region war auch die erste in der sich daraufhin harter Kallus entwickelte, wobei der vollständige Ersatz von weichem durch harten Kallus erst nach der vollständigen Vaskularisierung der Knorpelmatrix erfolgte. Nur im harten Kallus sowie in hypertrophen Chondrozyten nahe der Übergangszone konnte dabei eine vermehrte VEGF-Expression detektiert werden, im zentralen weichen Kallus hingegen nicht (25). Dies zeigt eindrücklich die zentrale Rolle der Vaskularisierung in der Frakturheilung sowie die Kopplung dieses Prozesses an die Expression von VEGF.

Unterschiedliche Forschungsgruppen haben bereits den Einfluss einer Blockade der Angiogenese auf Ossifikation und Frakturheilung untersucht. Dabei zeigte sich unter anderem eine verstärkte Bildung von weichem Kallus mit vermindertem Umbau zu hartem Kallus, eine verminderte Bildung neuer Blutgefäße (26) sowie eine reduzierte Mineralisierung des Kallus (27). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den zuvor erläuterten Mechanismen der Vaskularisierung in der Frakturheilung.

#### **2.5.4 Frakturheilung am Mausmodell**

Da es im Rahmen der Frakturheilung zu Beeinträchtigungen kommen kann und es derzeit noch nicht möglich ist, die Frakturheilung pharmakologisch zu beeinflussen, ist es weiterhin wichtig, Modelle zu etablieren, mit denen man die Prozesse und Signalkaskaden während der Frakturheilung studieren und pharmakologische Möglichkeiten zur Beeinflussung der Frakturheilung untersuchen kann. Hierzu eignet sich das Mausmodell, einerseits aus Kostengründen und der guten Reproduzierbarkeit mit der Möglichkeit hoher Versuchszahlen, andererseits besteht bei Mäusen die Möglichkeit der genetischen Manipulation, die neue Forschungsmöglichkeiten eröffnet. Häufige Frakturmodelle sind die Tibiaschaft- und die Femurschaftfraktur. Dabei besteht grundsätzlich die Möglichkeit einer offenen oder einer geschlossenen Fraktur. Modelle mit offener Fraktur und anschließender Anbringung eines

Fixateur Externe bieten den Vorteil, dass sie besser zu reproduzieren und die Frakturen deshalb ähnlicher sind. Bei starrer Fixierung der Frakturen zueinander heilen diese Modelle überwiegend durch direkte Frakturheilung und eignen sich deshalb besonders gut, um diese zu studieren. Die Nachteile der offenen Frakturen liegen darin, dass sie zeitaufwendiger und kostenintensiver sind und ein größeres chirurgisches Geschick erfordern. Geschlossene Frakturmodelle mit intramedullärer Fixierung ermöglichen eine indirekte Frakturheilung durch die Restbeweglichkeit der Frakturen zueinander. Meist wird hierbei das distale Femur bzw. die proximale Tibia freigelegt und ein Führungsstab oder Draht intramedullär eingeführt. Die Fraktur wird dann durch ein herabfallendes Gewicht an einer sogenannten Dreipunkt-Biegevorrichtung erzeugt. Dabei liegen das Femur bzw. die Tibia horizontal an zwei Punkten in festgelegtem Abstand auf einer Vorrichtung. An dem dazwischen liegenden Abschnitt wird an einem dritten Punkt durch ein herabfallendes Gewicht eine Fraktur erzeugt. Der Führungsdraht wird anschließend entweder belassen oder durch einen Pin oder eine Schraube ersetzt. Geschlossene Frakturen sind schlechter zu standardisieren, da die Lokalisation und Beschaffenheit der Fraktur nicht genau kontrolliert werden kann. Dafür spiegeln sie aber Frakturen durch hohen mechanischen Stress und Belastung wider. Die Vorteile liegen in der geringeren Kostenintensität und der einfachen Durchführung. Ob man ein Frakturmodell mit offener oder geschlossener Frakturdurchführung wählt hängt demnach von der zugrunde liegenden Fragestellung und den zu untersuchenden Mechanismen ab (10).

## 2.6 Hypoxie induzierter Faktor (HIF)

Alle zellkerntragenden Zellen des menschlichen Körpers können Sauerstoffkonzentrationen detektieren und auf eine Änderung der Konzentration reagieren. Akute Änderungen der Sauerstoffkonzentration ziehen Veränderungen bereits vorhandener Proteine nach sich, während chronische Veränderungen zu einer Anpassung der Genexpression führen (28). Diese Anpassung der Genexpression wird über Transkriptionsfaktoren geleistet. Der Transkriptionsfaktor HIF wurde ursprünglich bei Studien zum EPO-Gen entdeckt (29). HIF ist ein Heterodimer, das aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit besteht (30). Die labile  $\alpha$ -Untereinheit kommt in drei Isoformen vor: HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$ . Während die HIF-1 $\alpha$  und die  $\beta$ -Untereinheit in fast allen Geweben exprimiert werden, ist die Expression von HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$  eingeschränkt, sodass diese im Signalprozess eine untergeordnete Rolle spielen (31). Die Stabilität von HIF-1 $\alpha$  wird durch die Oxygenierung reguliert: Bei Normoxie erfolgt eine Hydroxylierung mit anschließender Ubiquitinierung durch das Von-Hippel-Lindau Protein und der Abbau im Proteasom (32). Der Abbau von HIF-1 $\alpha$  wird zudem über den „Factor inhibiting HIF-1 $\alpha$ “ (FIH-1) gefördert, einem Protein, das bei Normoxie ebenfalls hydroxyliert und damit aktiviert wird (33). Bei Hypoxie unterbleibt die Hydroxylierung von HIF-1 $\alpha$  und das Protein wird stabilisiert, statt abgebaut. In der Folge kann HIF-1 $\alpha$  mit HIF-1 $\beta$  dimerisieren, als Heterodimer an die DNA binden und so die Transkription von Zielgenen fördern (28). Viele Gene werden durch HIF-1 $\alpha$  reguliert transkribiert. Semenza et al. beschreiben dabei eine mögliche Einteilung in zwei Hauptgruppen: Proteine, die die Bereitstellung von Sauerstoff fördern, z.B. EPO und VEGF, und Proteine, die den Sauerstoffverbrauch senken, z.B. die Laktat- und Pyruvatdehydrogenase, zur Umstellung auf einen anaeroben Zellmetabolismus (28). HIF-1 $\alpha$  wird eine Rolle in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen zugeschriebene, darunter chronische Herz- und Lungenerkrankungen sowie Krebserkrankungen (34, 35). Nachfolgend soll der Einfluss auf die Ossifikation und Frakturheilung erläutert werden.

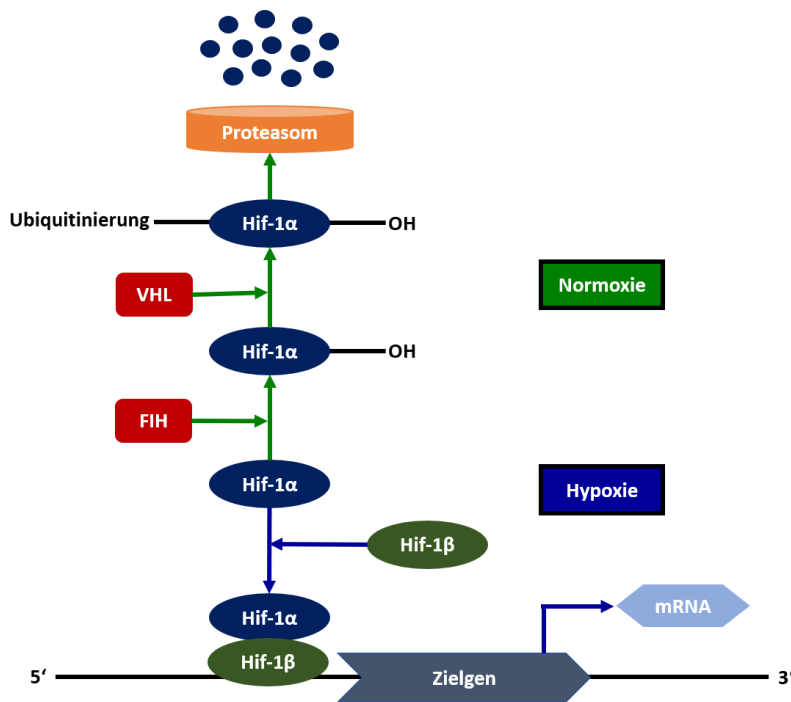


Abbildung 6: HIF-Signalweg, erstellt nach Semenza GL. *Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. Annu Rev Pathol. 2014;9:47-71.*

Hydroxylierung von HIF-1 $\alpha$  unter Normoxie und dem Einfluss von FIH, anschließende Ubiquitinierung durch VHL und Abbau im Proteasom. Unter Hypoxie Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  und Dimerisierung mit HIF-1 $\beta$ , Bindung an die DNA und Transkription von Zielgenen.

## 2.6.1 Einfluss von HIF-1 $\alpha$ auf Chondro- und Osteogenese

### 1) Einfluss auf Chondrogenese

Unterschiedliche Studien zeigen, dass durch Hypoxie die Bildung von Knorpel in vivo und vitro verstärkt werden kann. So zeigten Ströbel et al., dass eine Sauerstoffkonzentration von 5% im Vergleich zu 19% zur verstärkten Bildung einer Knorpelmatrix führt, während dieser Effekt unter Blockade von HIF-1 $\alpha$  aufgehoben werden konnte (23). Auch Kanichai et al. belegten eine durch HIF-1 $\alpha$  vermittelte Förderung der Chondrogenese bei Hypoxie (36). Diese Förderung der Chondrogenese wird durch ein direktes Binden des Heterodimers aus HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  an den Promoter von SOX-9 und damit einer Steigerung der Transkription und Förderung der Chondrogenese durch SOX-9 bewirkt (22, 37). Weitere Studien zum Einfluss von HIF-1 $\alpha$  auf den Knochenstoffwechsel untersuchen diesen durch gezielte Blockade oder Aktivierung des HIF-Signalwegs. So zeigten Zhou et al., dass die Zugabe von HIF-1 $\alpha$  zu einem durch BMP-2 induzierten Modell zur enchondralen Ossifikation eine verstärkten Knorpelaufbau mit der Ausbildung von nur wenig reifem Knochengewebe zur Folge hat (38). Eine Blockade des HIF-1 $\alpha$ -Signalwegs in heterozygoten knock-out Mäusen hingegen führt zu einer gestörten Differenzierung der Chondrozyten und zur verminderten Synthese von extrazellulärer

Knorpelmatrix. Postnatal waren die langen Röhrenknochen deformiert, kürzer und weniger mineralisiert und zudem die Gelenke von Knie, Ellenbogen und Fingern fusioniert, was eine Bedeutung des HIF-1 $\alpha$ -Signalwegs in der Gelenkbildung nahe legt (22). Des Weiteren demonstrieren verschiedene Studien an Tiermodellen, dass die pharmakologische Blockade von HIF-1 $\alpha$  eine verminderte Sox-9 Expression zur Folge hat (39, 40). Der HIF-1 $\alpha$ -Signalweg ist somit ein wichtiger Bestandteil in der Chondrogenese und damit auch in der indirekten Frakturheilung.

## 2) Einfluss auf Osteogenese

Während des Schritts der Chondrogenese reguliert HIF-1 $\alpha$  die Initiierung der Osteogenese im negativen Sinne über eine Hemmung der RUNX-2 Bildung und erhält so die Knorpelbildung- und Entwicklung aufrecht (24, 41). Während der späteren Schritte der Ossifikation, beginnend mit der Hypertrophie der Chondrozyten, übt HIF-1 $\alpha$  jedoch einen verstärkenden Einfluss auf die Proliferation der Osteoblasten und die Expression von VEGF aus, sodass es zur Mineralisierung und Vaskularisierung des neugebildeten Knochens kommt (42, 43). Shomento et al. konnten diese Hypothese bestätigen und zeigen, dass die Ausschaltung von HIF-1 $\alpha$  in Osteoblasten zu einer Reduktion des Knochenvolumens und Veränderung der Knochenstruktur sowie zur verminderten Ausbildung neuer Blutgefäße führt. In vitro war durch den Verlust von HIF-1 $\alpha$  zudem die Proliferation der Osteoblasten beeinträchtigt (44). Wang et al. kamen mit ähnlichem Studiendesign zu vergleichbaren Ergebnissen und demonstrierten zudem, dass der verminderte Abbau von HIF-1 $\alpha$  in einer Erhöhung des Knochenvolumens resultiert (43).

### 2.6.2 Einfluss auf Vaskularisierung und Gefäße

Der Formation von Blutgefäßen liegen unterschiedliche Mechanismen zugrunde. Rey et al. beschreiben hierbei drei verschiedene Arten: 1) Vaskulogenese – eine de novo Synthese von Blutgefäßen aus vaskulären Progenitorzellen, die sich zu Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Perizyten entwickeln; 2) Angiogenese – das Aussprossen neuer Blutgefäße aus bereits existierenden Blutgefäßen; 3) Arteriogenese – die Modifikation bestehender Blutgefäße mit Erhöhung des Durchmessers und des Blutflusses. Beim Erwachsenen finden sich nur noch die Mechanismen der Angio- und Arteriogenese (45).

Hypoxie ist der Hauptstimulus zur Neubildung von Blutgefäßen. Die Freisetzung der benötigten Zytokine und Wachstumsfaktoren wird dabei über HIF-1 $\alpha$  reguliert, wobei vor allem die Expression von VEGF eine wichtige Rolle spielt. Die Zytokine fördern zum einen die Rekrutierung präangiogenetischer Zellen, die größtenteils aus dem Knochenmark stammen, zum anderen binden sie über Rezeptoren an Endothelzellen und fördern so die Ausknospung



neuer Kapillaren aus bereits existierenden Gefäßen (45). Durch diese Mechanismen kommt es zur Angiogenese und zum Einsprießen neuer Blutgefäße in zuvor avaskuläre Regionen.

Der Einfluss von HIF-1 $\alpha$  auf diese Mechanismen zeigt sich bereits pränatal. Homozygote HIF-1 $\alpha$  knock-out Mäuse sind nicht lebensfähig, da es pränatal zu schwerwiegenden Malformationen und zur fehlerhaften Ausbildung von Gefäßen und des Herzens sowie zur fehlerhaften Migration von Zellen aus der Neuralleiste kommt (46). Bei heterozygoten knock-out Mäusen ist die Entwicklung des Gefäßsystems nicht beeinträchtigt, es kommt allerdings zur Beeinträchtigung der postnatalen Anpassungsfähigkeit an Hypoxie und Ischämie (28). Verschiedene Studien am Tiermodell zeigen, dass durch eine Aktivierung des HIF-1 $\alpha$ -Signalwegs die Expression von VEGF erhöht werden (47, 48), beziehungsweise durch die Inhibierung von HIF-1 $\alpha$  vermindert werden kann (40).

Der Zusammenhang von HIF-1 $\alpha$  und Vaskularisierung wird in der Literatur auch in Bezug auf die Vaskularisierung von Knochen untersucht. Shomento et al. zeigten, dass ein Ausschalten von HIF-1 $\alpha$  in Osteoblasten zu einer deutlich verringerten Vaskularisierung führt (44). Vergleichbare Ergebnisse erzielten auch Wang et al. durch gezieltes Ausschalten von HIF-1 $\alpha$  in Osteoblasten. (43).

### **2.6.3 Echinomycin**

Bei Echinomycin handelt es sich um ein kleines Molekül, das die Bindung von HIF-1 $\alpha$  an die DNA und damit die nachfolgende Transkription von Zielgenen verhindert. Die Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  wird dabei nicht vermindert (49). Durch Echinomycin wird somit die Expression von Genen, die über HIF-1 $\alpha$  und damit über Hypoxie reguliert werden, verringert (50).

### **2.6.4 Zusammenfassung**

In der Zusammenschau der Literatur zeigt sich ein verstärkender Einfluss von HIF-1 $\alpha$  auf die enchondrale Ossifikation und Frakturheilung. Dieser Effekt wird zunächst durch Förderung der Chondrogenese über eine direkte Aktivierung der beteiligten Signalkaskaden durch HIF-1 $\alpha$  erzielt. Im Anschluss an die Chondrogenese fördert HIF-1 $\alpha$  zudem die Osteogenese, einerseits durch die direkte Wirkung auf Osteoblasten, andererseits durch die Steigerung der Angiogenese über die vermehrte Expression von VEGF. Die pharmakologische Inhibierung oder Aktivierung des HIF-1 $\alpha$ -Signalwegs wird in unterschiedlichen Studien untersucht, wobei verschiedene Methoden zum Einsatz kommen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Inhibierung des HIF-1 $\alpha$ -Signalwegs die enchondrale Ossifikation und Vaskularisierung negativ beeinflusst, während die Aktivierung einen positiven Einfluss mit verstärkter Ossifikation und Vaskularisierung nach sich zieht. Der klinische Nutzen einer Manipulation des HIF-1 $\alpha$ -Signalwegs in Bezug auf die Ossifikation könnte demnach einerseits in der Aktivierung

## Literaturreückblick

des Signalwegs zur beschleunigten und verbesserten Frakturheilung und andererseits in der Inhibierung zur Vorbeugung heterotoper Ossifikationen bestehen.

## **2.7 Schädel-Hirn-Trauma**

### **2.7.1 Definition und Pathophysiologie**

Als Schädel-Hirn-Trauma wird die traumatische Schädigung von Gehirn und Schädel bezeichnet. Laut einer Studie von Dewan et al. aus dem Jahr 2018 wird die Inzidenz des Schädel-Hirn-Traumas auf ca. 69 Millionen pro Jahr geschätzt, wobei Autounfälle, Stürze und Sportunfälle die häufigsten Ursachen darstellen (51, 52). Somit stellt das Schädel-Hirn-Trauma ein häufiges Krankheitsbild mit hohen Belastungen und Herausforderungen an das Gesundheitssystem dar (52).

Anhand des Zustands der Dura Mater kann man das Schädel-Hirn-Trauma in ein geschlossenes (bei intakter Dura Mater) und ein offenes Schädel-Hirn-Trauma (bei verletzter Dura Mater) einteilen (53). Das geschlossene Schädel-Hirn-Trauma ist dabei die häufigere Form (52). Die Einteilung nach Schweregrad erfolgt beim Schädel-Hirn-Trauma anhand der Glasgow-Coma-Scale, bei der der Zustand des Patienten durch Bewertung der Vigilanz sowie der bestmöglichen motorischen und verbalen Reaktion beurteilt und mit einer entsprechenden Punktzahl bewertet wird (54). Bei einer Punktzahl von 15 bis 13 spricht man von einem milden, bei 12 bis 9 Punkten von einem moderaten und bei einer Punktzahl von 8 oder weniger von einem schweren Schädel-Hirn-Trauma (55). Mit der Schwere des Traumas steigt die Notwendigkeit der neurochirurgischen Eingriffe (55), die Wahrscheinlichkeit einer schweren posttraumatischen Beeinträchtigung sowie die Letalität, die bei schweren Traumata bis zu 40 Prozent betragen kann (56). Die klinische Symptomatik nach Schädel-Hirn-Trauma ist vielseitig und reicht von Bewusstseinsstörungen über Kopfschmerzen und Schwindel bis hin zu Übelkeit, Erbrechen und Krampfanfällen sowie Symptomen einer Hirnblutung (57). Die Genesung nach Schädel-Hirn-Trauma verläuft phasenweise, wobei die Dauer der Phasen je nach Schwere des Traumas variieren und stets die Gefahr von bleibenden Schäden besteht (55).

#### **2.7.1.1 Primäre Verletzung – fokal oder diffus**

Die primäre Verletzung beim Schädel-Hirn-Trauma entsteht innerhalb von Millisekunden als Folge der Gewalteinwirkung auf das Parenchym (58).

Fokale Verletzungen entstehen dabei durch die direkte Krafteinwirkung auf Schädel und Gehirn mit Gewebsverletzungen an der Anprallseite (Coup) und durch Rückschlag auch an der Gegenseite (Contrecoup), wobei die Schwere der Verletzung abhängig von der einwirkenden Kraft ist. Durch die Zellschädigung entstehen nekrotische Areale, die zu intrazerebralen Hämatomen und Kontusionsherden führen können. Durch die Verletzung von Gefäßen kann sich zudem ein Epidural- oder Subduralhämatom ausbilden (52, 55).

Diffuse Verletzungen entstehen meist durch das Einwirken von Scherkräften im Rahmen von Akzelerations-/Dezelerationsverletzungen (59) und treten oft im Rahmen von Verkehrsunfällen mit Hochgeschwindigkeitstraumata auf (55). Dabei kann es zur sogenannten diffusen axonalen Schädigung, zum diffusen Hirnödem sowie zur globalen Ischämie kommen (53). Die Schwere des Schädel-Hirn-Traumas ist dabei mit dem Ausmaß der axonalen Schädigung assoziiert (52), die Prognose ist meist schlecht (59).

### **2.7.1.2 Sekundäre Verletzung – Neuroinflammation**

Die zellulären und physiologischen Anpassungsmechanismen im verletzten Gewebe nach Schädel-Hirn-Trauma führen zur Ausbildung eines sekundären Hirnschadens, dessen Dauer und Schweregrad unterschiedlich ausgeprägt sein kann (52). Es kommt dabei zum weiteren Absterben von Zellen, zur axonalen Degeneration sowie zur Ausbildung von Glianarben (52). Des Weiteren kommt es zu einer ausgeprägten inflammatorischen Reaktion des verletzten Gewebes, die in der Folge zum weiteren neuronalen Zellverlust, zur zerebralen Ischämie und zur Ausbildung eines Hirnödems beiträgt und damit maßgeblich die Prognose nach Schädel-Hirn-Traumata beeinflusst (59). Schmidt et al. beschreiben dabei eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems über das Komplementsystem innerhalb von Sekunden bis Minuten nach Schädel-Hirn-Trauma. In der Folge kommt es zur kaskadenartigen Aktivierung von inflammatorischen Zytokinen, z.B. IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-18, und Chemokinen. Dies führt zur Rekrutierung von Immun- und Entzündungszellen. Die Zellen können dabei über die nach Schädel-Hirn-Trauma geschädigte Blut-Hirn-Schranke leicht aus dem Blut ins Gewebe übertreten, wobei die Zytokine, Chemokine und Entzündungszellen selbst zur weiteren Schädigung der Blut-Hirn-Schranke beitragen. Über die defekte Blut-Hirn-Schranke können Zytokine in den Kreislauf gelangen und eine systemische Wirkung hervorrufen. Allerdings ist der Prozess der Neuroinflammation zweiseitig zu betrachten, da die freigesetzten Zytokine zeitabhängig nicht nur pro- sondern auch antiinflammatorische Eigenschaften besitzen und somit nicht nur zur Entzündung, sondern auch zur Neuroprotektion- und Regeneration beitragen können (59).

### **2.7.2 Einfluss auf enchondrale Ossifikation**

Im Rahmen von Schädel-Hirn-Traumata ist in der Literatur eine Verstärkung der enchondralen Ossifikation mit der Folge einer beschleunigten Frakturheilung einerseits und dem vermehrten Auftreten heterotoper Ossifikationen andererseits beschrieben.

Bereits 1987 wird in der Literatur über eine beschleunigte Frakturheilung mit vermehrter Kallusformation nach Schädel-Hirn-Trauma berichtet. Perkins und Skirving konnten bei 22 Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma und begleitender Femurschaftfraktur eine beschleunigte

Frakturheilung sowie ein erhöhtes Kallusvolumen im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen (60). R.F. Spencer untersuchte die Frakturheilung im Rahmen eines Schädel-Hirn-Traumas nicht nur bei Femurschaft-, sondern auch bei Humerus- und Tibiafrakturen. Auch hier konnten eine beschleunigte Frakturheilung sowie ein höheres Kallusvolumen festgestellt werden, gleichzeitig warf Spencer jedoch auch die Frage auf, ob es sich hierbei um Kallus oder um eine Form der heterotopen Ossifikation handelt (61). Auch Newman et al. stellten in einem Fallbericht über Frakturen der langen Röhrenknochen bei Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma eine ungewöhnlich schnelle Heilung fest (62). In jüngeren Studien wird der Einfluss eines Schädel-Hirn-Traumas auf die Frakturheilung langer Röhrenknochen weiter untersucht, wobei in den meisten Studien eine positive Korrelation zwischen beschleunigter Frakturheilung und vermehrter Kallusproduktion bei gleichzeitigem Auftreten eines Schädel-Hirn-Traumas beschrieben werden kann (63-66). Die genauen Mechanismen hinter diesem Phänomen bleiben unklar, wobei sich unterschiedliche Theorien zur Entstehung etabliert haben.

### **2.7.2.1 Rolle der defekten Blut-Hirn-Schranke**

Die Blut-Hirn-Schranke dient als Schutzbarriere und soll verhindern, dass schädliche Substanzen aus dem Blut in den Extravasalraum des Gehirns und Rückenmarks übertreten. Sie besteht aus dem Kapillarendothel mit tight junctions, der Basalmembran sowie Perizyten und Astrozytenfortsätzen (2). Im Rahmen eines Schädel-Hirn-Traumas kommt es zu einer sich in zwei Phasen ausbildenden Schädigung der Blut-Hirn-Schranke. In der ersten Phase kommt es durch die Ruptur kleiner Gefäße mit konsekutiver Aktivierung des Gerinnungssystems zur Koagelbildung und Ausbildung ischämischer Areale, während die zweite Phase eine Folge der bereits zuvor beschriebenen Neuroinflammation ist (67). Die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke ermöglicht in der Folge einen Übertritt von Substanzen aus der Zirkulation ins verletzte Gewebe und umgekehrt, was eine Veränderung der Serumzusammensetzung zur Folge hat (68).

### **2.7.2.2 Veränderte Serumzusammensetzung**

Die veränderte Serumzusammensetzung nach Schädel-Hirn-Trauma wird in unterschiedlichen Arbeiten untersucht. Dabei findet sich eine Erhöhung inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$ , vermutlich durch den Übertritt der Zytokine in die Peripherie (69). Des Weiteren können erhöhte Konzentrationen von VEGF, vermutlich durch die zerebrale Hypoxie, Substanz P (69), CGRP (70), Leptin (71) und CRP (72) nachgewiesen werden. Es lässt sich somit zusammenfassend feststellen, dass das Serum nach Schädel-Hirn-Trauma vor allem entzündliche Eigenschaften aufweist, wobei diese entzündlichen Faktoren vom verletzten Hirngewebe ausgeschüttet werden und in die Peripherie übertreten (73). Da die Frakturheilung wie auch die Entstehung heterotoper Ossifikationen durch enchondrale

Ossifikation ein entzündliches Stadium aufweisen, kann somit von einer Förderung dieser Entzündung durch die veränderte Serumzusammensetzung und damit von osteoinduktiven Eigenschaften des Serums nach Schädel-Hirn-Trauma ausgegangen werden (73). Dieser osteoinduktive beziehungsweise proliferative Effekt des Serums wird in unterschiedlichen Studien durch die Zugabe des Serums von Patienten oder von Versuchstieren nach Schädel-Hirn-Trauma zu verschiedenen Zellkulturen belegt. Klein et al. konnten eine verstärkte Proliferation mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark durch Zugabe des Serums von Ratten nach Schädel-Hirn-Trauma feststellen (74). Cadosh et al. zeigten eine verstärkte Proliferation von Muskelzellen sowie deren Differenzierung zu Osteoblasten und eine Förderung der Mineralisierung der extrazellulären Matrix nach Zugabe von Serum von Patienten nach Schädel-Hirn-Trauma (75). Eine verstärkte Proliferation von Osteoblasten nach Zugabe von Serum von Patienten nach Schädel-Hirn-Trauma konnten zudem auch Boes et al. (76) und Gautschi et al. nachweisen (77).

Sang et al. berichteten außerdem über eine erhöhte Serum-Konzentration von HIF-1 $\alpha$  nach Schädel-Hirn-Trauma (64). Da es im Rahmen eines Schädel-Hirn-Traumas zu einer Hypoxie im verletzten Gewebe kommt, führt dies folglich auch zu einer Erhöhung der HIF-1 $\alpha$  Konzentration (78, 79). Durch die defekte Blut-Hirn-Schranke könnte HIF-1 $\alpha$  in den Kreislauf übertreten und über eine Erhöhung der Konzentration im Serum und lokal um die Fraktur so die Frakturheilung fördern.

Scherbel et al. stellten in ihrer Studie zur Frakturheilung von Tibiafrakturen mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma eine lokale Erhöhung von BMP-2 bzw. BMP-4 im frakturierten Knochen und umliegenden Weichteilgewebe, aber auch in der weiter entfernt liegenden Hüftmuskulatur fest. Auch hier könnte die Erhöhung der Konzentration durch einen Übertritt von nach Schädel-Hirn-Trauma im Gehirn vermehrt exprimiertem BMP-2 und BMP-4 nach peripher bedingt sein, auch wenn in dieser Studie keine Serum-Analysen der BMP-Konzentrationen vorlagen (80).

### 2.7.3 Tiermodelle

Da viele pathophysiologische Mechanismen des Schädel-Hirn-Traumas noch nicht abschließend untersucht und verstanden sind, ist es wichtig Tiermodelle zu etablieren, um weitere Erkenntnisse zu erlangen. Da die Traumata im Tierexperiment meist durch mechanische Krafteinwirkungen hervorgerufen werden, ist es notwendig, dass diese kontrolliert angewendet und reproduziert werden können. Des Weiteren sollte die Verletzung Komponenten des Schädel-Hirn-Traumas beim Menschen widerspiegeln und das Ausmaß der mechanischen Krafteinwirkung mit Schwere und Outcome korrelieren (81). Ein etabliertes Modell zur Durchführung des Schädel-Hirn-Traumas am Tiermodell ist das „Controlled cortical impact“, kurz CCI-, -Modell, das für Studien an Versuchstieren unterschiedlicher Größe geeignet ist. Dabei wird ein pneumatischer oder elektromagnetischer angetriebener Kolben

verwendet, um durch Anprall eine Verletzung hervorzurufen (82). Der Kolben kann dabei in einem offenen Modell auf die freigelegte Dura oder in einem geschlossenen Modell auf die geschlossene Schädeldecke angelegt werden. Die Geschwindigkeit, mit der der Kolben anschließend auf die Dura oder den Schädel eintrifft, sowie die Eindringtiefe und Verweildauer können dabei genau festgelegt werden und ermöglichen eine gute Reproduzierbarkeit der Verletzung (82). Das CCI-Modell produziert demnach ein fokales Schädel-Hirn-Trauma und eignet sich dementsprechend, um dessen Auswirkungen und Pathophysiologie zu untersuchen.

#### **2.7.4 Zusammenfassung**

In Zusammenschau der Ergebnisse unterschiedlicher klinischer Studien und Fallberichte sowie experimenteller Studien am Tiermodell lässt sich ein Zusammenhang zwischen einer beschleunigten Frakturheilung mit Produktion eines größeren und dichter mineralisierten Kallus sowie ein schnellerer Übergang in die Umbau-Phase der Frakturheilung bei gleichzeitig auftretendem Schädel-Hirn-Trauma feststellen. Die nach aktueller Datenlage wahrscheinlichste Ursache hierfür ist ein Übertreten von durch das Trauma im Gehirn freigesetzten Stoffen über die defekte Blut-Hirn-Schranke in das Serum. Diese Stoffe wirken peripher am Ort der Verletzung osteoinduktiv, in dem sie die Ausbildung eines entzündlichen Milieus fördern oder die Frakturheilung über andere Signalwege, wie den HIF-1 $\alpha$  oder den BMP-Signalweg fördern.

### 3 Ziel und Fragestellung

Komplikationen nach Frakturen durch unzureichende Frakturheilung bereiten auch im heutigen klinischen Alltag häufig Probleme. Vor allem bei vorerkrankten und alten Menschen kommt es oft zur Beeinträchtigung der Frakturheilung. Eine positive Beeinflussung der Frakturheilung, um bei allen Patienten ein gutes klinisches Ergebnis zu erreichen, könnte viele Vorteile bringen, unter anderem den Erhalt von Mobilität und Alltagsfähigkeit. Um eine solche positive Beeinflussung zu erreichen, ist es zunächst unabdingbar, allgemeine Einflüsse auf Frakturheilung und deren pathophysiologischen Grundlagen zu erforschen und zu verstehen. In unterschiedlichen Publikationen wurden bereits mögliche Auswirkungen einer Beeinflussung des HIF-1 $\alpha$ -Signalwegs sowie eines Schädel-Hirn-Traumas auf Frakturheilung erläutert. Diese Einflüsse sollen in der vorliegenden Arbeit anhand eines Tiermodells unter Verwendung von Mäusen als Versuchstieren näher betrachtet werden. Ziel dieser Arbeit ist es demnach, ein Modell zur kombinierten Anwendung eines Schädel-Hirn-Traumas und einer Fraktur zu etablieren, das eine indirekte Frakturheilung ermöglicht und zudem Komponenten der einzelnen und auch einer Kombination beider Verletzungen am Menschen widerspiegeln kann. Anhand dieses Modells sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Hat Echinomycin einen Einfluss auf die Heilung von Frakturen?
- 2) Wie wirkt sich ein begleitendes Schädel-Hirn-Trauma auf die Frakturheilung aus?



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Allgemein

Zur Durchführung der Studie wurden männliche Mäuse der Sorte C57BL/6 (Charles River, Köln), auch „black 6“ genannt, verwendet. Die Tiere wurden im Translational Animal Research Center (TARC) der Universitätsmedizin Mainz in standardisierten Käfigen zu max. 5 Tieren untergebracht. Sie erhielten uneingeschränkten Zugang zu Trockenpellets und Wasser und waren einem 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus und einer konstanten Temperatur von 21°C ausgesetzt. Studiendesign, sowie Unterbringung, Untersuchungsmethoden und postoperative Betreuung erfolgten in Absprache und Zustimmung des zuständigen Ethik-Komitees (DE RLP 23 177-07 / G 15-1-095).

Zum Zeitpunkt der Operation wogen die Mäuse im Durchschnitt 24,5g mit einer Spanne von 21,2g bis 30,8g und hatten ein Alter von 8 bis 10 Wochen.

Die Einteilung der Tiere in Gruppen erfolgte anhand der Lebensdauer von 5 Tagen, 3 Wochen oder 8 Wochen, der durchzuführenden Eingriffe sowie der Injektion von Echinomycin.

Die Euthanasie erfolgte je nach Gruppenzugehörigkeit durch zervikale Dislokation oder nach inhalativer Sedierung mit Isofluran.

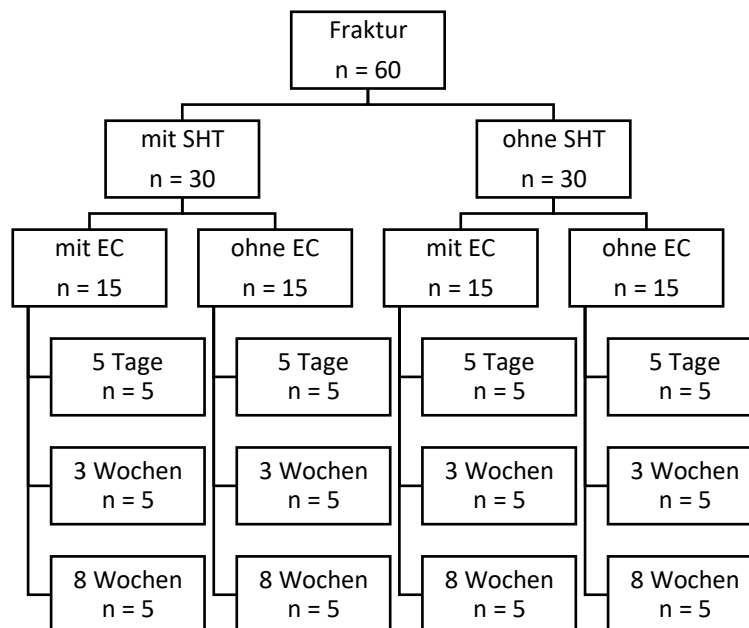


Abbildung 7: Einteilung der Versuchstiere

## 4.2 Anästhesie und perioperatives Management

Zunächst erfolgte die Einleitung der Tiere mittels Inhalation von Isoflurane (5%) (Florane<sup>®</sup>, Baxter, Deerfield II, USA). Sobald die Tiere sich nicht mehr bewegten und sich ihre Atmung verlangsamte, wurden Medetomidine (0,5 mg/kg) (Dorbene<sup>®</sup>, Pfizer, New York NY, USA), Midazolam (5mg/kg) (Dormicum<sup>®</sup>, Roche, Basel, Switzerland) und Fentanyl (0,05 mg/kg) (Fentanyl-Janssen<sup>®</sup>, Johnson and Johnson, New Brunswick, NJ, USA) subkutan injiziert. Bis zum Eintritt der Narkose wurden die Tiere in einen Käfig mit Wärmeerhalt durch Infrarotlicht gesetzt. In regelmäßigen Abständen wurde die Tiefe der Narkose beurteilt und erst nach vollständigem Ausfall von Schwanzspitzen- und Zehenzwischenreflex erfolgte der Eingriff. Zuvor wurde bei allen Tieren Dexapenthol-Augensalbe zum Schutz des Augenlichts aufgetragen und die Mäuse durch Ausstanzen von Ohrlöchern markiert. Längere Eingriffe erfolgten zum Schutz vor Auskühlung auf einer Wärmematte.

Im Anschluss an den Eingriff erfolgte die Antagonisierung der Narkose mittels Atipamezole (2,5 mg/kg) (Antisedan<sup>®</sup>, Pfizer, New York NY, USA) und Flumazenil (0,5 mg/kg) (Anexate<sup>®</sup>, Roche, Basel, Switzerland). Bis zum Eintritt der Antagonisierung wurden die Tiere in einen Käfig mit Wärmezufuhr durch Infrarotlicht gesetzt. In regelmäßigen Abständen wurden Aktivität und postoperatives Verhalten kontrolliert. Erst anschließend wurden die Tiere zusammen mit den anderen Tieren ihrer Gruppe in ihre ursprünglichen Käfige zurückgesetzt.

Die postoperative Analgesie erfolgte durch Zusatz von 0,5 mg/ml des Opiod-Analgetikums Tramadol zum Trinkwasser, zu dem die Tiere uneingeschränkten Zugang hatten. Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde im Verlauf engmaschig kontrolliert. Eine Prüfung und Dokumentation von Gewicht, Verhalten und Mobilität sowie Belastung des operierten Beines erfolgten an Tag 1,2,3,5,7,10,14 und im weiteren Verlauf wöchentlich.

## 4.3 Operationsverfahren

### 4.3.1 Schädel-Hirn-Trauma

Die Durchführung des Schädel-Hirn-Traumas erfolgte durch ein CCI-Modell mit Freilegung der Dura Mater durch Kraniotomie in der linken Hemisphäre. Die Tiere wurden in Bauchlage in eine Fixations-Vorrichtung verbracht, wobei eine gute Stabilität des Kopfes durch Fixierung der Zähne und des Mastoides beidseitig erreicht wurde. Nach Hautschnitt entlang der Sagittalnaht erfolgte durch Skalpierung die Freilegung der linken Hemisphäre und Schädeldecke. Der Kraniotomiebereich auf der Schädeldecke zwischen Sutura coronalis und Sutura lambdoidea wurde anschließend durch Verwendung eines glatten, 4mm breiten, Hohlbohrers markiert. Das Periost der Schädeldecke wurde zuvor mit einem Skalpell abgekratzt, um einem Einziehen des Periosts in den Bohrer und dessen Verkleben vorzubeugen. Mit einem feinen Diamant-Gravierbohrer wurde anschließend die Kraniotomiemarkierung umfahren, bis der Schädelknochen abgenommen und die darunter liegende Dura freigelegt werden konnte. Um ein Verkleben und Einreißen der Dura zu verhindern wurde vor Applikation des Schädel-Hirn-Traumas Paraffin aufgetragen. Anschließend erfolgte die Applikation des Schädel-Hirn-Traumas gemäß dem CCI-Modell. Der Antrieb des Kolbens erfolgte pneumatisch, was zu einer Geschwindigkeit zwischen 6,91 und 7,05 m/s bei Eintreffen des Kolbens auf die Dura führte. Die Eindringtiefe wurde auf 1mm, die Verweilzeit auf 200ms festgelegt. Nach Trauma konnten eine Schwellung des Hirnparenchyms sowie leichtere Blutungen beobachtet werden. Die ausgefräste Schädelplatte wurde anschließend wiedereingesetzt und mittels Histoacryl® (0,5 mg/kg) (B. Braun, Melsungen, Deutschland) fixiert. Der Verschluss der Haut erfolgte mit Einzelknopfnähten.

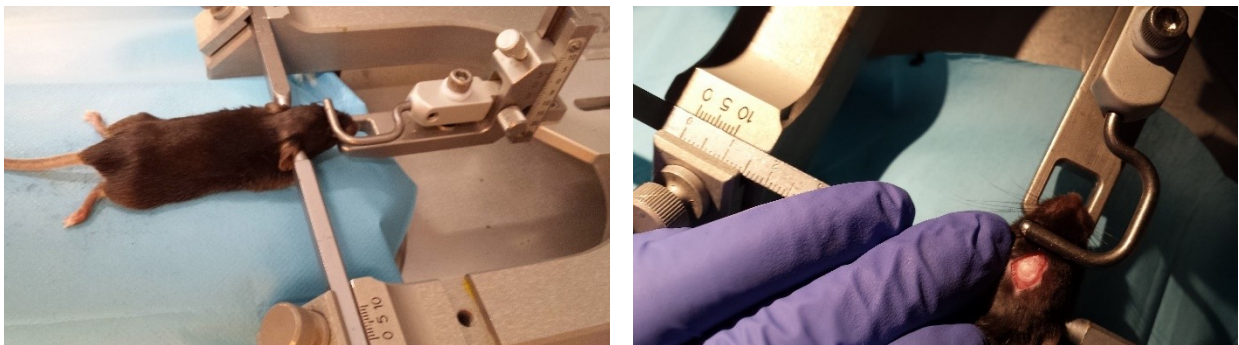


Abbildung 8: links: Einspannen der Versuchstiere; rechts: Freilegung der Schädeldecke und Markieren der Bohrführung

## Material und Methoden

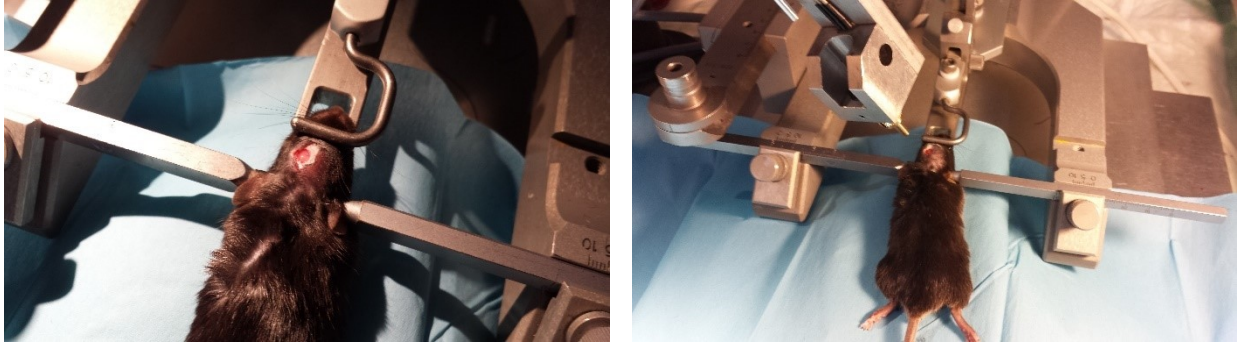


Abbildung 9: links: freigelegte Dura Mater; rechts: Positionierung des Kolbens



Abbildung 10: links: Applikation des Schädel-Hirn-Traumas; rechts: Schwellung und leichte Blutung nach SHT



Abbildung 11: links: Fixieren der Schädelplatte mit Histoacryl-Kleber; rechts: refixierte Schädelplatte

### 4.3.2 Femurfraktur

Die Durchführung der Femurfrakturen erfolgte stets am rechten Femur und durch ein offenes Modell mit anschließender intramedullärer Fixierung. Dazu wurde das MouseScrew RISystem® (RISystem AG, Davos, Switzerland) genutzt. Nach Rasur des Operationsgebiets erfolgte die Platzierung der Tiere in Rückenlage und die Fixierung des rechten Beines in ca. 90 Grad Beugung im Kniegelenk. Ein Hautschnitt von ca. 1-2cm Länge wurde medial der Patella gesetzt und die Patella nach longitudinaler Inzision medial der Patellarsehne nach lateral luxiert. Unter stärkerer Beugung konnten anschließend die Femurkondylen gut freigelegt und mit Hilfe einer Sterican-Kanüle der Größe 20G der Markraum des Femurs komplett aufgebohrt werden. Nach Entfernen der Kanüle wurde diese durch einen Führungsdraht ersetzt, der auf

der gegenüberliegenden Seite durch die Haut ausgeleitet und dessen korrekte Lage im Markraum radiologisch überprüft wurde. Im Anschluss wurde das Femur mit Hilfe des MouseScrew RISystems® frakturiert. Dabei wurde die Fraktur in einer Dreipunkt-Biegevorrichtung durch ein herabfallendes Gewicht aus zuvor festgelegter Höhe auf das Femur erzeugt und anschließend radiologisch kontrolliert. Die intramedulläre Fixierung der Fraktur erfolgte durch eine Schraube. Zunächst wurde der distale Teil des Markraums mit einer Sterican-Kanüle der Größe 16G entlang des Führungsdrahtes aufgebohrt, um das anschließende Einbringen der Schraube zu erleichtern. Anschließend wurde die Schraube auf den Führungsdraht aufgesetzt und unter kontinuierlichem Druck und Rotation im Uhrzeigersinn vorgeschoben. Dadurch kam es zu einem proximalen Herausschieben des Führungsdrahtes aus dem Markraum und einer gleichzeitigen intramedullären Fixierung durch die vorgeschobene Schraube. Die korrekte Lage der Schraube wurde abschließend radiologisch überprüft und die Führungshilfe am distalen Ende der Schraube an der Sollbruchstelle abgetrennt, was eine Reposition der Patella ermöglichte. Nach Prüfung des Funktionserhalts und der postoperativen Luxationsneigung der Patella erfolgte der Hautverschluss durch Einzelknopfnähte.



Abbildung 12: links: Aufbohren des Femurkanals mit 20G-Kanüle; rechts: Einbringen des Führungsdraht in den Femurkanal



## Material und Methoden

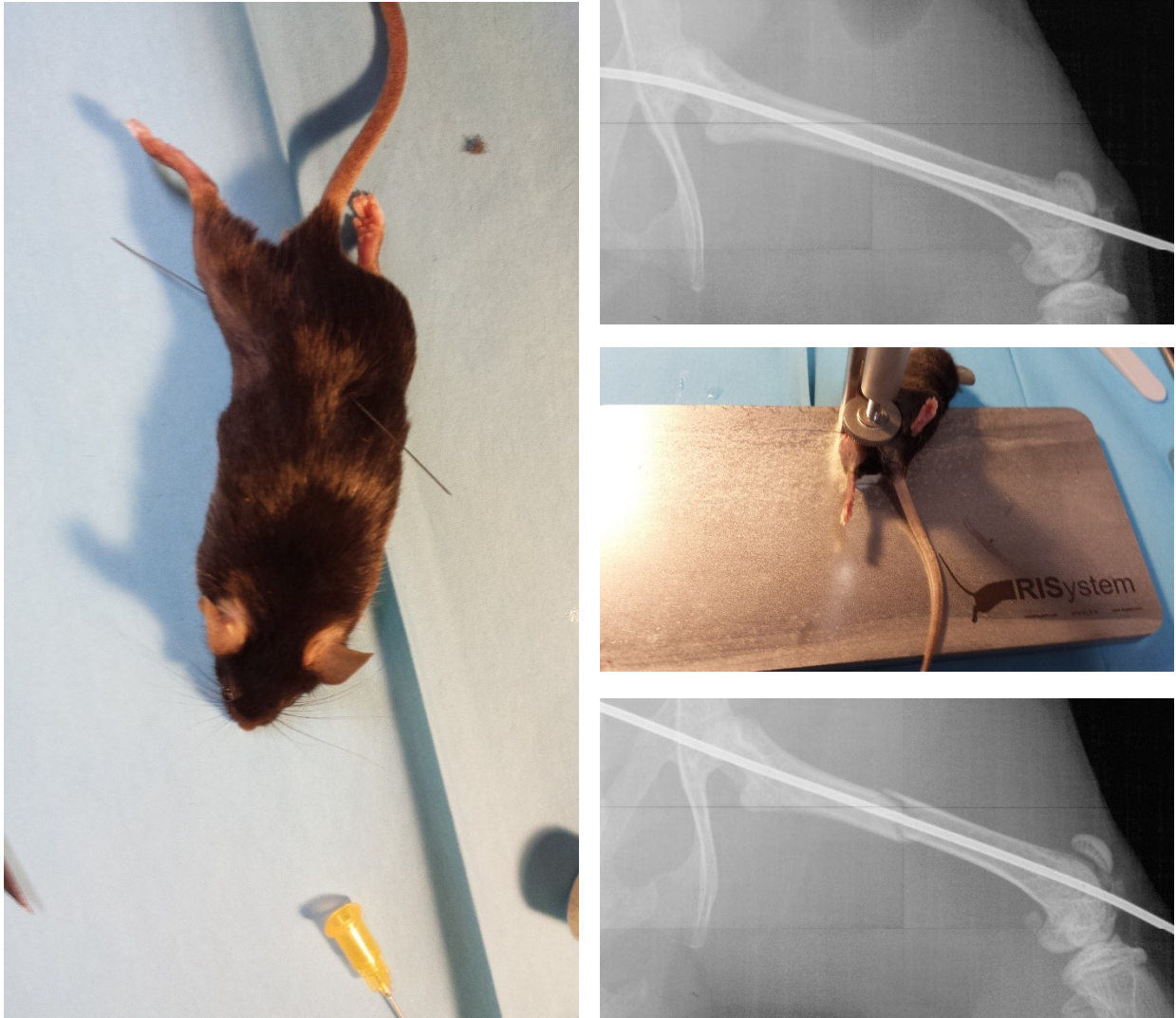


Abbildung 13: links: vollständig eingebrachter und wieder austretender Führungsdraht; rechts oben: Überprüfen der korrekten Drahtlage; rechts Mitte: Einspannen des Versuchstieres in das MouseScrew System zur Applikation der Fraktur; rechts unten: Überprüfen auf Fraktur

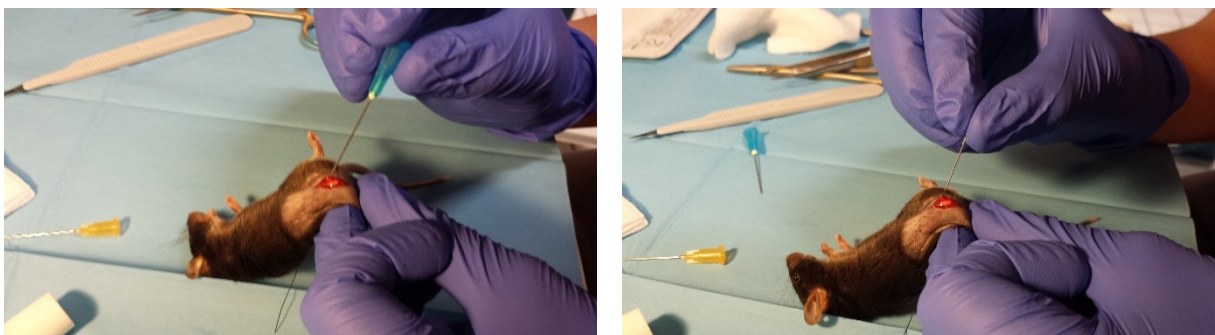


Abbildung 14: links: Überbohren des Führungsdrahts mit 16G-Kanüle; rechts: Herausschieben des Führungsdrahts und Einbringen der Schraube

## Material und Methoden

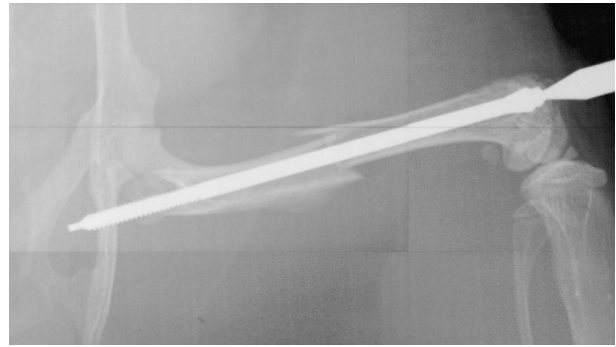
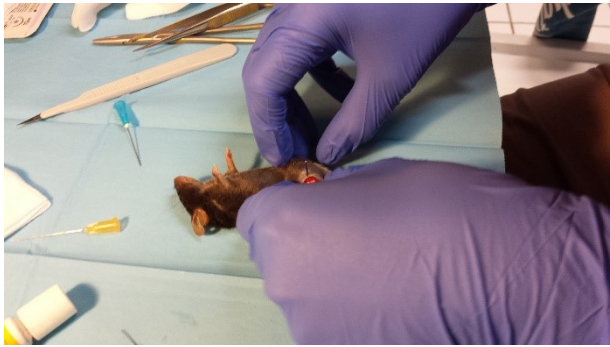


Abbildung 15: links: komplett eingebrachte Schraube; rechts: Überprüfen auf korrekte Lage der Schraube



Abbildung 16: links: Entfernen der Führungshilfe; rechts: Wundverschluss

## **4.4 Bildgebende Diagnostik**

Die bildgebende Diagnostik erfolgte sowohl im Rahmen der Operation als auch postoperativ durch Röntgenkontrollen mit dem Kleinterröntgengerät MX20 der Marke Faxitron® (Jet X-Ray, Forest Hill, London). Die Röntgenkontrollen bei den Gruppen mit 5 Tagen und 3 Wochen Lebensdauer erfolgten am Operationstag sowie nach Euthanasie der Tiere am 5. bzw. 21. postoperativen Tag. Bei den Gruppen mit 8 Wochen Lebensdauer erfolgten zusätzliche postoperative radiologische Kontrollen unter Kurznarkose durch Isoflurane-Inhalation (5%) an Tag 7, 14, 21, 28, 35, 49 und 56. Die Durchleuchtung erfolgte dabei mit einer Spannung von 35 kV und einer Durchleuchtungszeit von fünf Sekunden.

## **4.5 Echinomycin-Injektion**

Die Behandlungsgruppe erhielt nach Protokoll subkutane Injektionen von 1ml, enthaltend 0,1ml mit 10µg (0,3mg/kg) Echinomycin (ALX-380-201, Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA) in 0,9ml Dimethylsulfoxid verdünnt in die interskapuläre Region. Die erste Injektion erfolgte am OP-Tag und wurde dann wöchentlich für eine Dauer von insgesamt vier Wochen fortgeführt. Alle Tiere, die nach fünf Tagen abgesetzt wurden, erhielten dementsprechend eine Injektion, alle Tiere, die nach drei Wochen abgesetzt wurden, drei Injektionen und alle Tiere, die nach acht Wochen abgesetzt wurden, fünf Injektionen.

## **4.6 Auswertung**

Die Auswertung der Daten erfolgte einerseits anhand der festgehaltenen Daten in den OP-Protokollen, andererseits anhand der radiologischen Bilder. Die Auswertungen wurden zunächst mithilfe des Programms Excel für Microsoft in Tabellenform festgehalten.

### **4.6.1 Auswertung anhand der OP-Protokolle**

Anhand der OP-Protokolle erfolgte eine detaillierte Aufstellung des Ausgangsgewichts vor OP, der OP-Dauer, des durchgeführten Eingriffs und für die Gruppe mit Schädel-Hirn-Trauma die applizierte Geschwindigkeit des pneumatischen Kolbens für jedes Versuchstier. Anschließend wurden für jedes Versuchstier das Gewicht und die Aufnahme von Röntgenkontrollen im Verlauf dokumentiert. Für die Versuchsgruppe mit Echinomycin-Injektionen wurden das Datum der entsprechenden Injektion und Auffälligkeiten nach der Injektion festgehalten. Zudem wurden zu jedem Versuchstier Besonderheiten und Auffälligkeiten bei der Operation, z.B. die Notwendigkeit zur offenen Frakturposition oder postoperative Auffälligkeiten



dokumentiert. Hierzu zählten unter anderem agitiertes Verhalten nach der OP oder weitere Auffälligkeiten im Verlauf, wie z.B. eine anfangsweise auftretende Schonhaltung des operierten Beins. Die Daten wurden anschließend in Tabellenform mit Hilfe des Excel-Programms für Microsoft übertragen.

### **4.6.2 Auswertung anhand der Röntgenbilder**

Anhand der Röntgenbilder erfolgten eine Aufstellung, Beschreibung und eine erste Bewertung aller zu einem Versuchstier zuzuordnenden Röntgenbilder. Auch hier wurden die Auswertungen in Tabellenform mithilfe des Excel-Programms für Microsoft festgehalten.

Zunächst wurden die Bilder des Operationstags beschrieben und die Anzahl der Aufnahmen dokumentiert. Vermerke zu Besonderheiten während der Operation und im Verlauf wurden aus der vorherigen Auswertung der OP-Protokolle übernommen. Anhand der Beschreibung der Röntgenbilder erfolgte anschließend eine Zuordnung zur Klassifikation der Fraktur und zur Qualität der Reposition. Zudem wurden Auffälligkeiten, wie z.B. ein verbleibender Versatz der Fragmente nach Reposition oder eine fehlende Fixierung von Frakturfragmenten nach Reposition vermerkt. Anschließend erfolgte eine systematische Durchsicht aller Röntgenbilder eines jeden Versuchstiers. In den Versuchsgruppen mit 5 Tagen und 3 Wochen Lebensdauer standen dementsprechend nur die abschließenden Röntgenaufnahmen vom Tag der Euthanasie zur Verfügung, in den Gruppen mit 8 Wochen Lebensdauer wurden die wöchentlich aufgenommenen Röntgenbilder gesichtet, beschrieben und bewertet. Für jedes Röntgenbild wurde ein gegebenenfalls sichtbarer Kallus sowie dessen Ausprägung vermerkt. Zudem wurde ein sekundärer Versatz der Fraktur und ein Überbrücken des Frakturspalts beschrieben. Im Verlauf erfolgte zudem eine Bewertung der Kallusdynamik anhand einer Zu- oder Abnahme im Vergleich zur Voraufnahme. Nach Ansicht aller Bilder wurde für jedes Versuchstier die größte Kallusausprägung sowie das zeitliche Auftreten dieser vermerkt. Zu jeder Aufnahme wurden gegebenenfalls sichtbare Auffälligkeiten oder Besonderheiten festgehalten. Abschließend wurde evaluiert ob durch Umbau und Remodelling die ursprüngliche Femurgröße wieder erreicht wurde sowie abschließend im zeitlichen Verlauf der Tag der maximalen Kallusausprägung und dessen Grad der Ausprägung vermerkt.

Aus der Übersichtstabelle konnten die jeweiligen Gruppen isoliert und einzeln betrachtet werden und so die Ergebnisse für jede Versuchsgruppe einzeln ausgewertet und miteinander verglichen werden.

### **4.6.3 Vergleich der Röntgenbilder untereinander**

Zur besseren Visualisierung erfolgte eine Zusammenstellung der Röntgenbilder. Alle Bilder wurden mit der Versuchstiernummer, dem durchgeführten Eingriff und dem Tag, an dem die Röntgenaufnahme entstanden war, versehen. Zunächst erfolgte so in den Gruppen mit 3 Wochen Lebensdauer anhand der Röntgenaufnahme nach 21 Tagen und in den

Versuchsgruppen mit 8 Wochen Lebensdauer im Verlauf ein Gruppieren der Bilder mit ähnlicher Kallusausprägung, sodass abschließend eine Bewertung der Kallusausprägung erfolgen und die Röntgenbilder dementsprechend eingeordnet werden konnten.

Anschließend erfolgte in den Gruppen mit 3 Wochen Lebensdauer für jede Eingriffsgruppe und jedes Versuchstier eine Gegenüberstellung des Röntgenbilds am OP-Tag mit dem Röntgenbild am Tag der Euthanasie. Dem hinzugefügt wurden Gegenüberstellungen von Röntgenbildern des OP-Tags und der Verlaufsaufnahme an Tag 21 aus der Gruppe mit 8 Wochen Lebensdauer und dem gleichen erfolgten Eingriff. So konnten für jede Eingriffsgruppe 10 Röntgenbilder vom OP-Tag mit einer Aufnahme nach 21 Tagen verglichen werden.

Anhand dieser Darstellung der Fraktur am OP-Tag und der Kallusausprägung nach 3 Wochen erfolgte ein Vergleich der Gruppen untereinander. Dafür wurden zunächst Röntgenbilder vom OP-Tag verglichen und Frakturen ähnlicher Beschaffenheit aus den unterschiedlichen Versuchsgruppen ausgewählt. Anschließend erfolgte eine Gegenüberstellung des Röntgenbildes nach 21 Tagen. Die Versuchsgruppen mit Fraktur und Echinomycingabe und Fraktur und Schädel-Hirn-Trauma wurden jeweils den Bildern aus der Versuchsgruppe mit alleiniger Femurfraktur gegenübergestellt, um so Einflüsse von Echinomycin oder Schädel-Hirn-Trauma visualisieren und darstellen zu können. Die Bilder aus der Versuchsgruppe mit Echinomycingabe und gleichzeitigem Schädel-Hirn-Trauma wurden einerseits den Bildern aus der Versuchsgruppe mit Fraktur und Echinomycingabe und andererseits den Bildern aus der Versuchsgruppe mit Fraktur und Schädel-Hirn-Trauma gegenübergestellt.

Für die Versuchsgruppen mit 8 Wochen Lebensdauer wurde für jedes Versuchstier der Verlauf dargestellt, indem zunächst das Röntgenbild nach Fraktur, anschließend das Röntgenbild nach Reposition und anschließend alle Verlaufskontrollen hintereinandergestellt wurden. So konnte zum einen der Heilungsverlauf allgemein sowie auch der Heilungsverlauf bei unterschiedlichen Frakturformen gut dargestellt werden. Anschließend erfolgte ein Vergleich der Bilder in den unterschiedlichen Gruppen anhand Frakturen ähnlicher Morphologie und Beschaffenheit. So konnte beispielsweise anhand Frakturen gleicher Klassifikation, jedoch aus unterschiedlichen Eingriffsgruppen, die Frakturheilung und Kallusentwicklung Woche für Woche gegenübergestellt und verglichen werden.

## 4.7 Statistische Auswertung

Die zuvor teilweise in Textform und tabellarisch dargestellten und analysierten Bewertungen der OP-Protokolle und der Röntgenbilder wurde nun zur statistischen Auswertung in das SPSS-Programm für Microsoft übertragen und statistisch im Sinne einer deskriptiven Statistik ausgewertet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Allgemein

Nach Durchführung des operativen Eingriffs und Narkoseausleitung unter Wärmeerhalt kam es bei den meisten Tieren zum postoperativen Wiedererlangen der Mobilität, sodass die Tiere anschließend in die ursprünglichen Käfige zu Fünfergruppen zusammengesetzt werden konnten. Lediglich ein Versuchstier aus der Gruppe mit 3 Wochen Lebensdauer, Echinomycingabe und Schädel-Hirn-Trauma belastete das operierte Bein in keiner der Nachkontrollen. Alle anderen Tiere konnten das Bein entweder direkt postoperativ oder im Verlauf, spätestens jedoch an Tag 10, wieder aktiv nutzen. Nach initialem Gewichtsverlust bis zum zweiten postoperativen Tag kam es im Anschluss zur erneuten Gewichtszunahme. Die Tiere, die über einen längeren Zeitraum beobachtet wurden, hatten am 21. postoperativen Tag ihr Ausgangsgewicht fast wiedererlangt.

Zur Auswertung der insgesamt 60 Fälle wurden 74 Tiere operiert, 14 Versuchstiere verstarben aufgrund intra- oder postoperativer Komplikationen. Zur Einhaltung des Versuchsprotokolls wurden die entsprechenden Operationen beim Versterben eines Versuchstieres erneut durchgeführt.

## **5.2 Komplikationen**

### **5.2.1 Intraoperative Komplikationen**

#### **5.2.1.1 Schädel-Hirn-Trauma**

Drei Versuchstiere starben im Rahmen des Schädel-Hirn-Traumas intraoperativ oder während der Ausleitungs- und Nachbeobachtungsphase.

Des Weiteren kam es bei einem Versuchstier im Rahmen des CCI zu einem Versatz des pneumatisch angetriebenen Kolbens nach dem Probeschuss, was zu einer starken Blutung führte und die anschließende Schädeldeckung erschwerte. Das Versuchstier zeigte sich in der weiteren Nachbeobachtungsphase jedoch unauffällig.

#### **5.2.1.2 Femurfraktur**

Im Rahmen der Femurfraktur musste bei insgesamt sechs Mäusen eine offene, statt einer geschlossenen Reposition der Femurfraktur durchgeführt werden. Nach Einführen der Schraube in das distale Femurfragment und Herausschieben des Führungsdrahtes kam es beim Passieren des Frakturspalts zu einem Kontaktverlust zwischen Schraube und Führungsdraht, was ein Herausgleiten des Drahtes zur Folge hatte und die Schraube daher nicht im proximalen Femurfragment fixiert werden konnte. War ein blindes Auffinden des proximalen Fragments mit Fixierung durch die Schraube nicht mehr möglich, musste ein Hautschnitt an der lateralen Femurseite in Projektion auf die Längsachse des Femurs erfolgen, der proximale Anteil des Femurs unter Schonung der Nervenbahnen und der Muskulatur aufgesucht und die Reposition unter Sicht erfolgen.

Ein Versuchstier musste intraoperativ euthanasiert werden, da es bei Fixierung des Unterschenkels während des Einführens der Schraube zur versehentlichen Frakturierung der Fibula kam.

### **5.2.2 Postoperative Komplikationen**

#### **5.2.2.1 Schädel-Hirn-Trauma**

Bei zwei Versuchstieren aus der Versuchsgruppe mit Femurfraktur und Schädel-Hirn-Trauma sowie 8 Wochen Lebensdauer kam es in der 7. bzw. 8. postoperativen Woche zur Ausbildung

von Abszessen an der Stelle des ursprünglichen Hautschnitts zur Schädelöffnung. Die Abszesse mussten bei beiden Tieren unter Narkose eröffnet und gespült werden. Postoperativ zeigten sich die Tiere in ihrem Verhalten unauffällig und konnten nach dem ursprünglichen Studienprotokoll weiter beobachtet werden.

### **5.2.2.2 Femurfraktur**

Insgesamt neun Versuchstiere zeigten postoperativ eine Schonung und Minderbelastung des operierten Beines im Vergleich zu den restlichen Versuchstieren. Ein Versuchstier aus der Gruppe mit 3 Wochen Lebensdauer, Echinomycingabe und Schädel-Hirn-Trauma konnte das Bein in keiner der Kontrollen voll belasten, bei den Tieren mit längerer Lebensdauer war dies spätestens bis zum 10. postoperativen Tag rückläufig, bis hin zur vollen Belastung des operierten Beines. Bei einem Versuchstier kam es erst ab der 3. postoperativen Woche zu einer Minderbelastung und einem Abstehen des Beines, wobei ein Grund hierfür nicht ersichtlich war.

Bei zwei Versuchstieren kam es postoperativ zu einer Wunddehiszenz, die unter Isofluran-Kurzarkose mittels Einzelknopfnähten versorgt werden musste.

### **5.2.2.3 Echinomycin**

Bei zehn Versuchstieren musste aufgrund einer versehentlichen Echinomycin-Überdosierung die vorzeitige Euthanasie durch CO<sub>2</sub>-Inhalation erfolgen.

Im Rahmen der wöchentlichen subkutanen Echinomycin-Injektion kam es zu lokalen Nebenwirkungen. Diese zeigten sich bei allen Tieren der Versuchsgruppen mit einer Lebensdauer von 3 und 8 Wochen als Verhärtungen und verkrusteten Wunden in der interskalpulären Region. Bei drei Tieren musste in der 3. bzw. 4. postoperativen Woche eine Wundrevision in Narkose erfolgen. Nach Beenden der Echinomycin-Injektionen zeigten sich die Wunden bei den Versuchsgruppen mit 8 Wochen Lebensdauer rückläufig, es verblieben jedoch kahle Stellen.

## 5.3 Auswertung der Röntgenbilder

Die Beurteilung der Frakturheilung erfolgte anhand der aufgenommenen Röntgenbilder.

### 5.3.1 Klassifikation der Frakturen

Die Frakturen wurden zunächst in Anlehnung an die 2018 überarbeiteten Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen zur Klassifikation von Frakturen kategorisiert und eingeteilt (6). Einfache Frakturen der Klasse A wurden dabei weiter in Quer-, Schräg- und Spiralfrakturen unterteilt. Bei Frakturen der Klasse B (Keilförmige Frakturen) und C (Mehrfragmentfrakturen) erfolgte eine weitergehende Einteilung anhand dessen, ob der abgetrennte Keil, beziehungsweise das abgetrennte Segment, intakt oder fragmentiert war. Für die 60 insgesamt durchgeführten Eingriffe ergab sich damit folgende Häufigkeitsverteilung:

Tabelle 4: Anzahl der Frakturtypen je nach Schweregrad

<i>Frakturtyp</i>	<i>Unterteilung</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Anzahl pro Gruppe</i>
<i>A: Einfache Fraktur</i>	Querfraktur	11	
	Schrägfraktur	13	
	Spiralfraktur	20	
			<b>44</b>
<i>B: Keilförmige Fraktur</i>	Intakter Keil	8	
	Fragmentierter Keil	1	
			<b>9</b>
<i>C: Mehrfragmentfraktur</i>	Segment intakt	1	
	Segment fragmentiert	6	
			<b>7</b>
<i>Anzahl der Frakturen insgesamt</i>		<b>60</b>	<b>60</b>

## Ergebnisse



Abbildung 17: A - Einfache Fraktur, links: Querfraktur, rechts: Schrägfraktur



Abbildung 18: A – Einfache Fraktur, Spiralfraktur



Abbildung 19: B – Keilförmige Fraktur, links: Keil intakt, rechts: Keil fragmentiert



Abbildung 20: C – Mehrfragmentfraktur, links: Segment intakt, rechts: Segment fragmentiert

### 5.3.2 Qualität der Repositionen

Die Qualität der Reposition wurde anhand der abschließenden Röntgenkontrolle am Operationstag bewertet. Dabei wurde die Reposition als „gute Reposition“ gewertet, wenn zwar der Frakturspalt sichtbar, aber die Kortikalis der Fragmente ohne Versatz aufeinander

## Ergebnisse

stand oder nach Reposition der Frakturspalt und die einzelnen Fragmente nicht abzugrenzen waren. Als „mittelmäßige Reposition“ wurden Repositionen gewertet, bei denen zwar die Längsausrichtung des Femurs erhalten blieb, es jedoch zu einem geringen Versatz oder einem Verdrehen der Fragmente zueinander kam und die Kortikalis daher nicht exakt aufeinander stand. „Schlechte Repositionen“ waren Repositionen, bei denen es zur Ausbildung einer eindeutigen Stufe in der Längsausrichtung des Femurs nach Reposition mit deutlichem Versatz der Fragmente zueinander kam. Somit kam es insgesamt zu folgender Häufigkeitsverteilung bei der Qualität der Repositionen:

*Tabelle 5: Verteilung Qualität der Repositionen*

<i>Art der Reposition</i>	<i>Anzahl</i>
<i>gut</i>	18
<i>mittelmäßig</i>	35
<i>schlecht</i>	7
<b><i>insgesamt</i></b>	<b>60</b>
<i>Davon offene Repositionen</i>	6



*Abbildung 21: Beispiel gute Reposition, Maus Nr. 12*



*Abbildung 22: Beispiel gute Reposition, Maus Nr. 14*



## Ergebnisse



Abbildung 23: Beispiel mittelmäßige Reposition, Maus Nr. 15

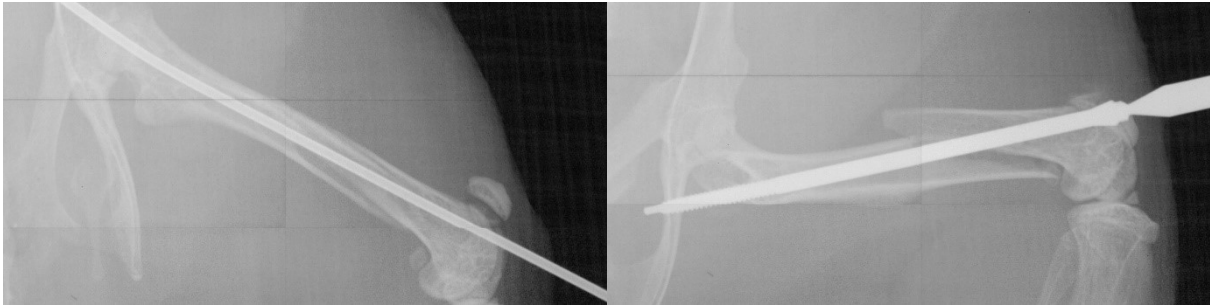


Abbildung 24: Beispiel schlechte Reposition, Maus Nr. 39

### 5.3.3 Kallusgröße und Entwicklung

Bei der Bewertung der Kallusgröße- und Entwicklung wurden die Röntgenbilder der Versuchsgruppen mit 3 bzw. 8 Wochen Lebensdauer bewertet, da auch bei physiologischer Frakturheilung nach fünf Tagen noch keine Kallusbildung zu erwarten ist. Dies konnte im dargestellten Versuchsaufbau bestätigt werden.

Zunächst wurde die Kallusausprägung nach drei Wochen analysiert. Dazu wurden die am 21. postoperativen Tag aufgenommenen Röntgenbilder aller Versuchstiere mit 3 und 8 Wochen Lebensdauer verglichen. Die Kallusausprägung wurde dabei mit „leicht“, „mittelstark“ oder „stark“ bewertet. Außerdem wurde ein Überbrücken des Frakturspalts durch den Kallus beurteilt.



Abbildung 25: Kallusausprägung „leicht“; links: Maus Nr. 12; rechts: Maus Nr. 13

## Ergebnisse



Abbildung 26: mittelstarke Kallusausprägung; links: Maus Nr. 45; rechts: Maus Nr. 105



Abbildung 27: starke Kallusausprägung; links: Maus Nr. 37; rechts: Maus Nr. 71

Zur Beurteilung des Verlaufs der Kallusentwicklung wurden die Röntgenbilder der Versuchsgruppe mit 8 Wochen Lebensdauer analysiert. Am 7. postoperativen Tag wurde zunächst die Andeutung einer Kallusbildung im Röntgenbild beurteilt, ohne eine Bewertung anhand der oben genannten Einteilung vorzunehmen. Bei den folgenden Röntgenaufnahmen wurde die Kallusausprägung entsprechend mit „leicht“, „mittelstark“ oder „stark“ sowie die Dynamik der Kallusausprägung im Sinne einer Zu- oder Abnahme im Vergleich zur Voraufnahme bewertet. Des Weiteren wurden das erstmalige Überbrücken des Frakturspalts durch den Kallus sowie das Erreichen der ursprünglichen Femurform durch Umbau des Kallus evaluiert.

## Ergebnisse



*Abbildung 28: Wiedererreichen der ursprünglichen Femurgröße im Verlauf, Maus Nr. 11 an Tag 0 (links oben), 14 (rechts oben) und 28 (Mitte unten)*

## 5.4 Bewertung der Frakturheilung

Die Bewertung der Frakturheilung und Kallusausprägung erfolgte bei der Versuchstiergruppe mit 3 Wochen Lebensdauer anhand der Röntgenbilder am 21. postoperativen Tag und bei der Versuchstiergruppe mit 8 Wochen Lebensdauer im wöchentlichen Verlauf. Die Frakturheilung bei der Versuchstiergruppe mit 5 Tagen Lebensdauer wurde aufgrund fehlender Kallusentwicklung am 5. postoperativen Tag nicht beurteilt, die folgenden Aussagen beziehen sich demnach nicht auf diese Gruppe.

### 5.4.1 Kallusausprägung an Tag 21

Bei allen Versuchstieren setzte die Frakturheilung ein. Am 21. postoperativen Tag war auf allen Röntgenbildern eine leichte bis starke Kallusausprägung zu sehen, wobei der Frakturspalt stets durch den Kallus überbrückt war. Vier Bilder standen nicht zur Auswertung zur Verfügung. Bei einem Versuchstier war versehentlich die Voraufnahme erneut abgespeichert worden, sodass nur zwei identische Bilder zur Auswertung zur Verfügung standen. Bei den übrigen drei Versuchstieren handelte es sich um Tiere, die unerwartet postoperativ verstorben waren. Zwar wurden später erneut Tiere operiert, diese wurden jedoch zur Auswertung in der in dieser Arbeit nicht abgehandelten Auswertung nach Gefäßinjektion mit Mikrofill® herangezogen und nicht weiter radiologisch nachkontrolliert.

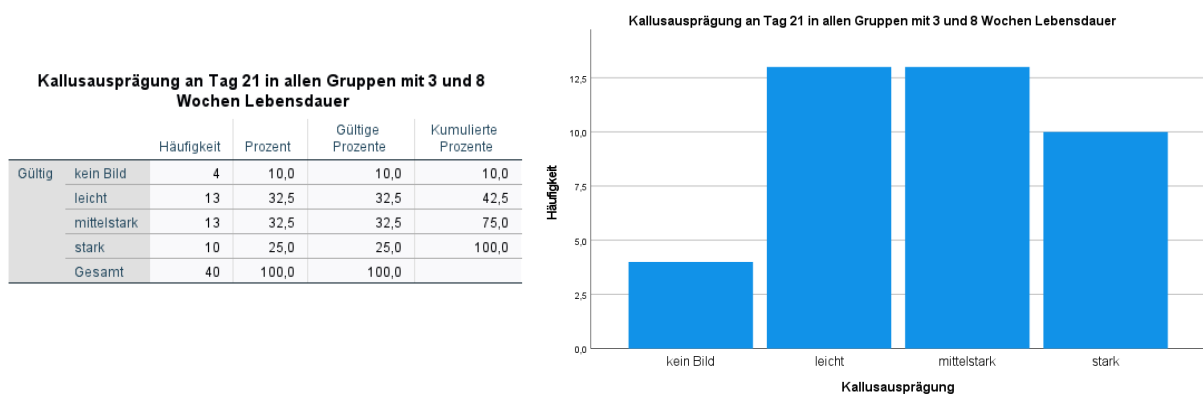


Abbildung 29: Kallusausprägung an Tag 21 in allen Gruppen mit 3 und 8 Wochen Lebensdauer; links: tabellarisch; rechts: Balkendiagramm

### 5.4.2 Analyse der Frakturheilung im Verlauf

Anhand der Röntgenbilder der Versuchsgruppe mit 8 Wochen Lebensdauer konnte der Verlauf der Frakturheilung beurteilt werden. Auf sechs von 20 Röntgenaufnahmen war bereits am 7.

## Ergebnisse

postoperativen Tag eine angedeutete Kallusbildung zu erkennen. Anschließend kam es zu einer Zunahme des Kallus mit maximaler Ausprägung am 14. oder 21. postoperativen Tag und darauffolgender Abnahme des Kallus mit einsetzendem Umbau. Bei zwei Bildern konnte nicht eruiert werden, ob der Kallus an Tag 14 oder 21 maximal ausgeprägt war. Einmal war versehentlich das falsche Versuchstier an Tag 14 geröntgt worden und somit konnte kein Vergleich zur Aufnahme nach 21 Tagen angestellt werden. Da der Kallus jedoch anschließend abnahm, musste er an Tag 14 oder 21 maximal ausgeprägt gewesen sein. Beim zweiten Bild war an Tag 14 und 21 ein identisches Bild abgespeichert worden, sodass ein Vergleich hier ebenfalls nicht möglich war. Der Kallus nahm jedoch an Tag 28 deutlich ab, sodass auch hier die maximale Ausprägung an Tag 14 oder 21 gelegen haben musste. Die maximale Ausprägung des Kallus variierte insgesamt von leicht bis stark. Es zeigte sich zudem, dass der Frakturspalt bei lediglich einem Tier erst an Tag 21, bei allen anderen bereits an Tag 14 durch harten Kallus überbrückt war. Bei zehn Tieren wurde die ursprüngliche Größe des Femurs spätestens an Tag 56 wieder erreicht, alle anderen Röntgenbilder zeigten noch leichte Kallusformationen im Umbau.

**Tag der maximalen Kallusausprägung in allen Gruppen mit 8 Wochen Lebensdauer**

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	14	14	70,0	70,0	70,0
	14/21	2	10,0	10,0	80,0
	21	4	20,0	20,0	100,0
Gesamt		20	100,0	100,0	

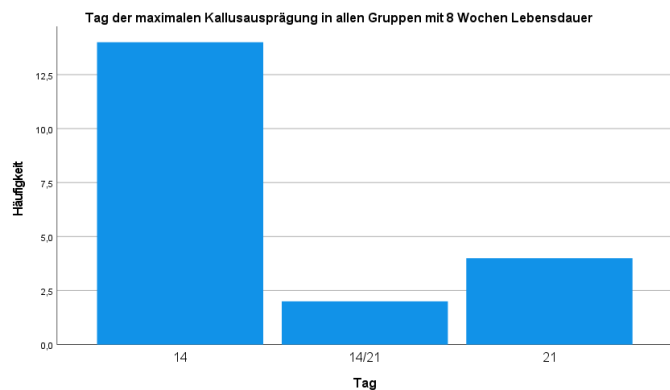


Abbildung 30: zeitlicher Verlauf der maximalen Kallusausprägung in allen Gruppen mit 8 Wochen Lebensdauer; links: tabellarisch; rechts: Balkendiagramm

**maximale Kallusausprägung in allen Gruppen mit 8 Wochen Lebensdauer**

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	leicht	7	35,0	35,0	35,0
	mittelstark	7	35,0	35,0	70,0
	stark	6	30,0	30,0	100,0
	Gesamt	20	100,0	100,0	

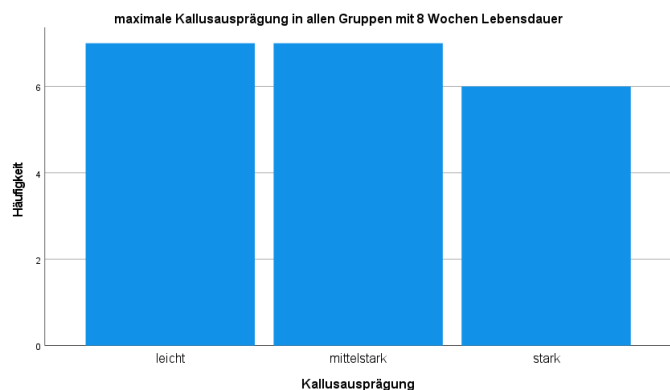


Abbildung 31: maximale Kallusausprägung in allen Gruppen mit 8 Wochen Lebensdauer; links: tabellarisch; rechts: Balkendiagramm

## Ergebnisse

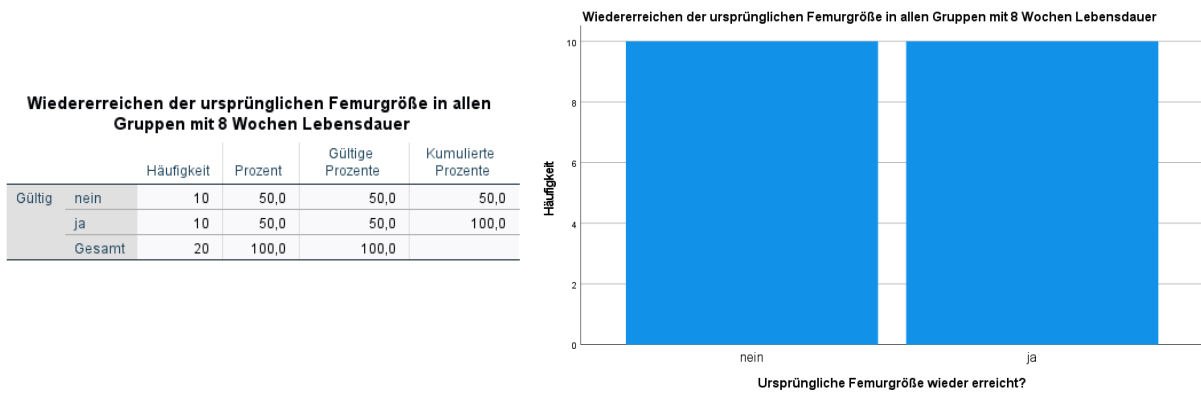


Abbildung 32: Wiedererreichen der ursprünglichen Femurgröße in allen Gruppen mit 8 Wochen Lebensdauer; links: tabellarisch; rechts: Balkendiagramm

### 5.4.3 Ablauf der Frakturheilung in der Gruppe mit alleiniger Femurfraktur

Nach 21 Tagen zeigte sich in den Versuchsgruppen mit 3 und 8 Wochen Lebensdauer und alleiniger Femurfraktur eine leichte bis mittelstarke Kallusausprägung, der Kallus überbrückte stets den Frakturspalt.

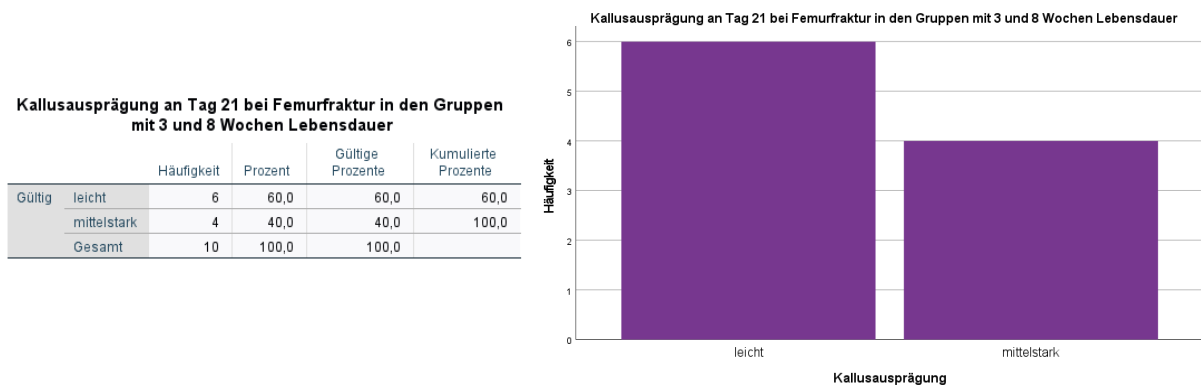


Abbildung 33: Kallusausprägung an Tag 21 bei Femurfraktur in den Gruppen mit 3 und 8 Wochen Lebensdauer; links: tabellarisch; rechts: Balkendiagramm

Bei der Verlaufsanalyse anhand der Röntgenbilder der Versuchsgruppe mit 8 Wochen Lebensdauer war eine Andeutung der Kallusbildung am 7. postoperativen Tag bei zwei der fünf Röntgenbilder zu erkennen. Am 14. postoperativen Tag war der Frakturspalt im Röntgenbild stets durch leichten bis mittelstarken Kallus überbrückt. Bei vier der fünf Versuchstiere war die maximale Kallusausprägung im Röntgenbild an Tag 14 erreicht, bei einem Versuchstier an Tag 21. Dabei war die maximale Kallusausprägung viermal als „leicht“ und einmal als „mittelstark“ einzustufen. Bis zur Aufnahme des letzten Röntgenbilds am 56. postoperativen Tag war auf vier der fünf Röntgenaufnahmen ein Wiedererreichen der ursprünglichen Femurgröße festzustellen.

## Ergebnisse

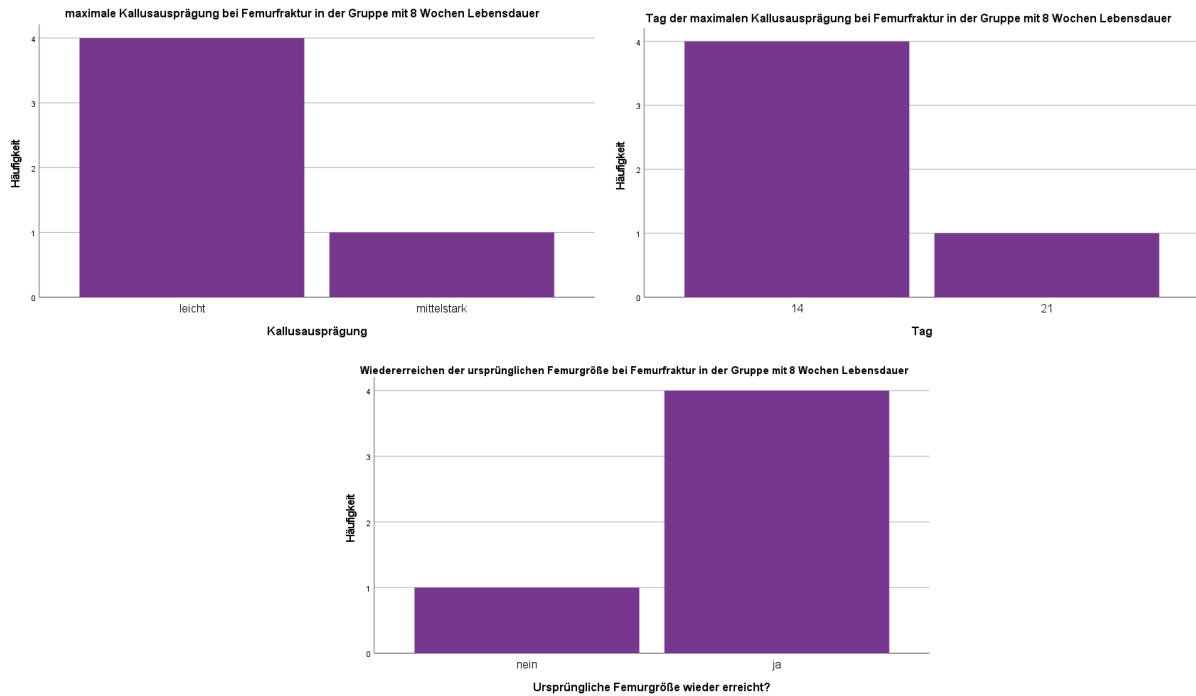


Abbildung 34: links oben: maximale Kallusausprägung; rechts oben: Tag der maximalen Kallusausprägung; Mitte unten: Wiedererreichen der ursprünglichen Femurgröße; jeweils bei Femurfraktur in der Versuchsgruppe mit 8 Wochen Lebensdauer

### 5.4.4 Einfluss von Echinomycin auf Frakturheilung

Insgesamt ließ sich auf den am 21. postoperativen Tag aufgenommenen Bildern der Versuchsgruppen mit 3 und 8 Wochen Lebensdauer mit Femurfraktur und zusätzlicher Echinomycingabe eine stärkere Kallusausprägung als bei der Versuchsgruppe mit alleiniger Femurfraktur erkennen.

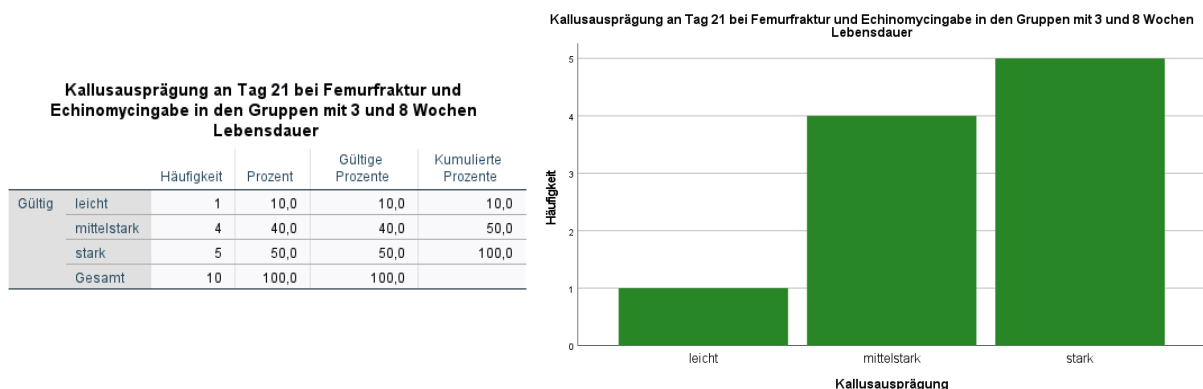


Abbildung 35: Kallusausprägung an Tag 21 bei Femurfraktur und Echinomycingabe in den Gruppen mit 3 und 8 Wochen Lebensdauer; links: tabellarisch; rechts: Balkendiagramm

In der wöchentlichen Analyse der Röntgenbilder der Versuchsgruppe mit 8 Wochen Lebensdauer deutete sich am 7. postoperativen Tag bei keinem Tier eine Kallusbildung an. Anschließend kam es bei vergleichbaren Zeitpunkten der maximalen Kallusausprägung zu

## Ergebnisse

einer insgesamt stärkeren Ausprägung des Kallus in der Gruppe mit zusätzlicher Echinomycingabe. Die ursprüngliche Größe des Femurs wurde bei zwei von fünf Tieren wieder erreicht.

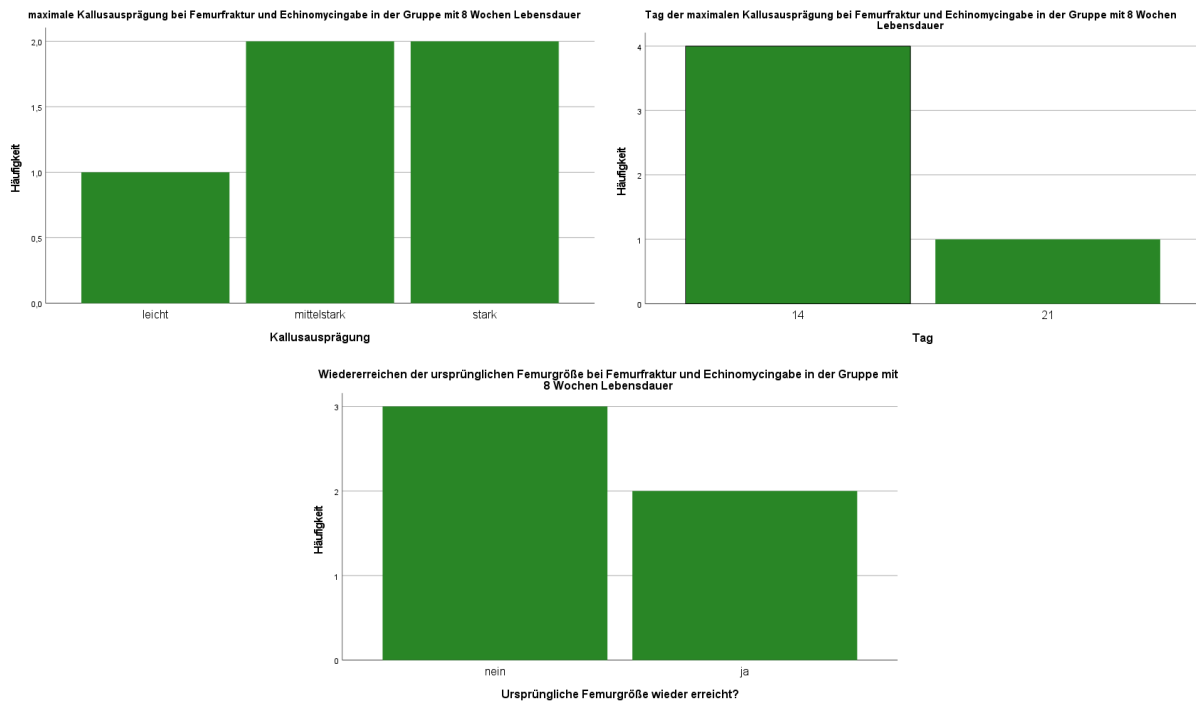


Abbildung 36: links oben: maximale Kallusausprägung; rechts oben: Tag der maximalen Kallusausprägung; Mitte unten: Wiedererreichen der ursprünglichen Femurgröße; jeweils bei Femurfraktur und Echinomycingabe in der Versuchsgruppe mit 8 Wochen Lebensdauer

### 5.4.5 Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf Frakturheilung

Bei der Auswertung aller am 21. postoperativen Tag aufgenommenen Röntgenbildern zeigte sich bei den Versuchsgruppen mit Femurfraktur und zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma eine stärkere Kallusausprägung als bei alleiniger Femurfraktur.



## Ergebnisse

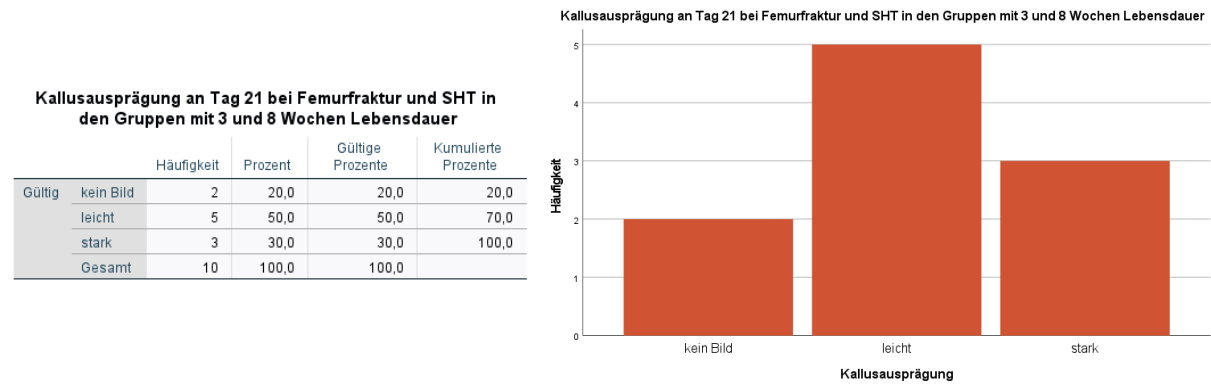


Abbildung 37: Kallusausprägung an Tag 21 bei Femurfraktur und SHT in den Gruppen mit 3 und 8 Wochen Lebensdauer; links: tabellarisch; rechts: Balkendiagramm

Bei Betrachtung der Röntgenbilder der Versuchsgruppe mit 8 Wochen Lebensdauer im wöchentlichen Verlauf zeichnete sich der Kallus bereits in früheren Wochen stärker ab, erreichte später seine maximale Ausprägung und war insgesamt stärker ausgeprägt als in der Versuchsgruppe mit alleiniger Femurfraktur. Nach Erreichen seiner maximalen Ausprägung nahm die Größe des Kallus in der Versuchsgruppe mit Femurfraktur und Schädel-Hirn-Trauma nur langsam ab oder blieb unverändert, sodass die ursprüngliche Größe des Femurs nur bei einem Tier wiedererreicht wurde.

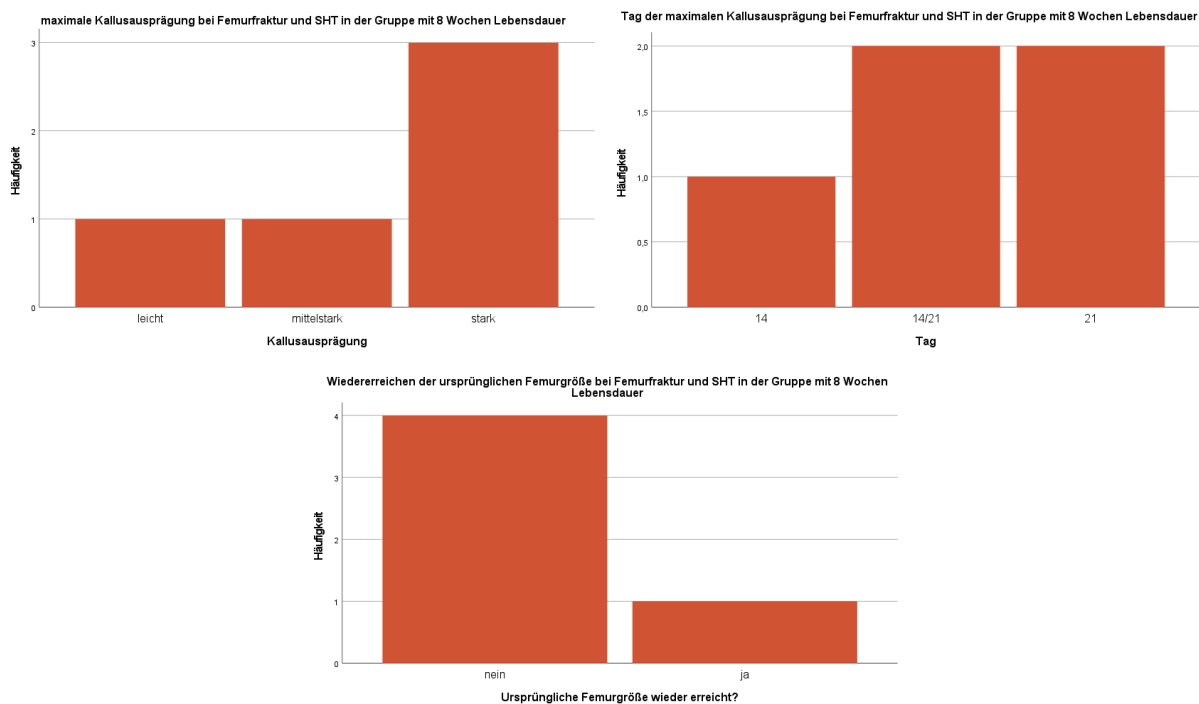


Abbildung 38: links oben: maximale Kallusausprägung; rechts oben: Tag der maximalen Kallusausprägung; Mitte unten: Wiedererreichen der ursprünglichen Femurgröße; jeweils bei Femurfraktur und SHT in der Versuchsgruppe mit 8 Wochen Lebensdauer

### 5.4.6 Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma und Echinomycin auf Frakturheilung

In den am 21. postoperativen Tag aufgenommenen Röntgenbildern der Versuchsgruppen mit Femurfraktur und Schädel-Hirn-Trauma sowie zusätzlicher Echinomycingabe zeigte sich eine stärkere Kallusausprägung als bei der Versuchsgruppe mit alleiniger Femurfraktur.

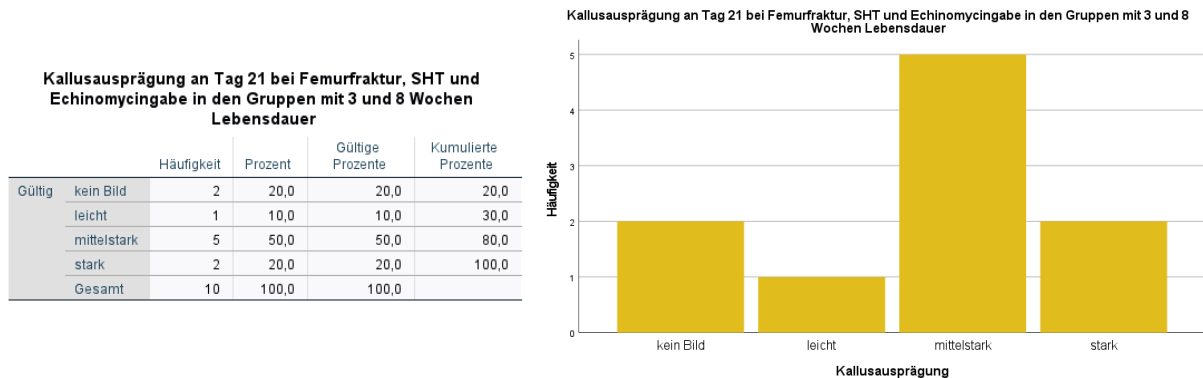


Abbildung 39: Kallusausprägung an Tag 21 bei Femurfraktur, SHT und Echinomycingabe in den Gruppen mit 3 und 8 Wochen Lebensdauer; links: tabellarisch; rechts: Balkendiagramm

In der Versuchsgruppe mit 8 Wochen Lebensdauer war auf zwei der fünf Röntgenbilder die Andeutung einer Kallusbildung am 7. postoperativen Tag zu erkennen. Die maximale Kallusausprägung sowie ein Überbrücken des Frakturspalts zeigten sich bei allen Röntgenaufnahmen des 14. postoperativen Tags. Die Kallusgröße variierte hier von leicht bis stark. Auf den Röntgenaufnahmen von drei der fünf Versuchstiere war bis zum 56. postoperativen Tag ein Wiedererreichen der ursprünglichen Femurgröße festzustellen.

## Ergebnisse

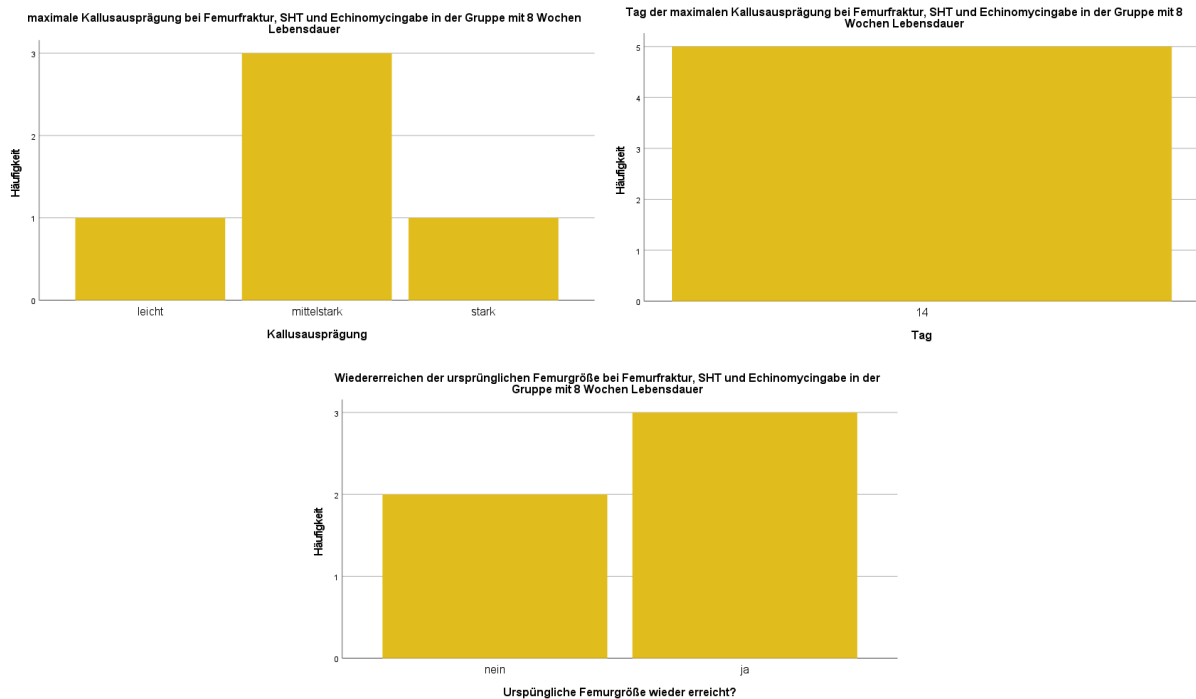


Abbildung 40: links oben: maximale Kallusausprägung; rechts oben: Tag der maximalen Kallusausprägung; Mitte unten: Wiedererreichen der ursprünglichen Femurgröße; jeweils bei Femurfraktur, SHT und Echinomycingabe in der Versuchsgruppe mit 8 Wochen Lebensdauer

### 5.4.7 Zusammenfassung

Zusammenfassend war bei Betrachtung der Kallusausprägung nach 21 Tagen in den Gruppen mit 3 und 8 Wochen Lebensdauer der Kallus in der Gruppe mit alleiniger Femurfraktur am geringsten ausgeprägt. Eine etwas stärkere Kallusausprägung war in der Gruppe mit zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma, gefolgt von der Gruppe mit Schädel-Hirn-Trauma und zusätzlicher Echinomycingabe zu beobachten. Am stärksten war der Kallus nach 21 Tagen in der Gruppe mit Femurfraktur und Echinomycingabe ausgeprägt.

In der Betrachtung des Verlaufs der Frakturheilung anhand der Gruppe mit 8 Wochen Lebensdauer zeigte sich die geringste Kallusausprägung ebenfalls in der Gruppe mit alleiniger Femurfraktur. Etwas stärker war in dieser Betrachtung die Kallusausprägung in der Gruppe mit zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma und Echinomycingabe, gefolgt von der Gruppe mit Femurfraktur und Echinomycingabe. Die stärkste Kallusausprägung in der Verlaufsanalyse war in der Gruppe mit Femurfraktur und Schädel-Hirn-Trauma zu beobachten.

## **6 Diskussion**

### **6.1 Diskussion von Material und Methoden**

#### **6.1.1 Verwendung von Mäusen als Versuchstiere**

Die Verwendung von Nagetieren zur klinischen Forschung am Tierexperiment ist heutzutage etabliert, wobei sich Mäuse aufgrund ihrer genetischen Manipulierbarkeit mit der Möglichkeit zur Schaffung sogenannter „knock-out Mäuse“ besonders eignen. Obwohl Studien zur Osteogenese auch in vitro möglich sind, kann dadurch ein intakter Organismus nicht ersetzt werden, sodass der Tierversuch in vivo bessere Erkenntnisse der physiologischen Abläufe der Frakturheilung und Reaktionen auf eventuell auftretende Begleitumstände bietet. Mäuse bieten hierbei zudem den Vorteil, dass durch die im Vergleich zum Menschen stark verkürzte Heilungszeit die Frakturheilung im Verlauf besser beobachtet werden kann (83).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse als Versuchstiere verwendet, wodurch die Anzahl von Operationen an 74 Tieren mit anschließender Auswertung der Daten von 60 Versuchstieren gewährleistet werden konnte.

Der perioperative Umgang mit den Tieren gestaltete sich komplikationslos. Die Einleitung, Aufrechterhaltung sowie Ausleitung der Narkose mittels Isofluran-Inhalation und anschließender subkutaner Injektion zur Ein- und Ausleitung waren problemlos möglich.

#### **6.1.2 Femurfraktur**

Da in der vorliegenden Arbeit die Beeinflussung der Kallusbildung und Kallusausprägung unter dem Einfluss von Schädel-Hirn-Traumata und Echinomycin untersucht werden sollte, eignete sich hierfür das Modell der geschlossenen Femurfraktur mit intramedullärer Fixierung. In diesem Modell wird die Kallusbildung dadurch gefördert, dass durch die intramedulläre Fixierung eine interfragmentäre Restbewegung verbleibt. Das Modell eignete sich zudem dadurch, dass es Frakturen imitiert, die durch hohe mechanische Belastung und Traumata entstehen und solche Frakturen beim Menschen, z.B. im Rahmen von Verkehrsunfällen, häufig in Kombination mit einem Schädel-Hirn-Trauma auftreten.

Im aufgeführten Versuchsaufbau zeigte sich jedoch, dass es sich mit dem Modell der geschlossenen Femurfraktur als schwierig erwies, Frakturen gleicher Beschaffenheit zu erzeugen. Dies führte zur Erzeugung von Frakturen unterschiedlicher Schweregrade, teilweise mit Mehrfragmentfrakturen und dislozierten Fragmenten. Schwere Frakturen waren mit Hilfe der Schraube jedoch schlecht zu reponieren, eine Fixierung aller Fragmente war teilweise

schwierig. Im Verlauf zeigte sich, dass die Schwere der Fraktur sowie eine teilweise eintretende sekundäre Dislokation durch unzureichende Fixation aller Fragmente einen Einfluss auf die Kallusbildung hatte.

### **6.1.3 Schädel-Hirn-Trauma**

Die Wahl eines offenen CCI-Modells zeigte sich auch im vorliegenden Versuchsaufbau als zuverlässig bei der Erzeugung von Schädel-Hirn-Traumata an den Versuchstieren. Die Zahl der durch den Eingriff verstorbenen Tiere war akzeptabel. Die Wahl eines pneumatisch angetriebenen Modells führte jedoch zu unterschiedlichen Geschwindigkeiten beim Auftreffen des Kolbens auf die Dura, sodass Unterschiede in der Ausprägung des Schweregrads der Schädel-Hirn-Traumata nicht auszuschließen waren. Ein elektromagnetisch angetriebener Kolben könnte hier gegebenenfalls zur Erzeugung einheitlicherer Traumata beitragen.

### **6.1.4 Echinomycin**

Die Wahl von Echinomycin als Inhibitor von HIF-1 $\alpha$  in Dosierung und Anwendung in der vorliegenden Arbeit erfolgte in Anlehnung an eine Studie von Zimmermann et al. aus dem Jahr 2013. In diesem Studiendesign erhielt eine Versuchsgruppe Mäuse nach beidseitiger Tenotomie der Achillessehne einmal pro Woche über vier Wochen subkutane interskapuläre Injektionen mit einer Dosierung von 0,3 mg/kg/KG Echinomycin in DMSO verdünnt. Dies führte zur signifikanten Reduktion des Volumens von heterotopen Ossifikationen in der Interventions- im Vergleich zur Kontrollgruppe (84). Die Dosierung und Applikationsart wurden dementsprechend den hiesigen Versuchsaufbau übernommen. Während Zimmermann et al. über keine Nebenwirkungen aufgrund der Echinomycin-Injektionen berichten und auch in einer weiteren Studie mit gleicher Applikationsform und Dosierung ebenfalls keine Nebenwirkungen durch Echinomycin auftraten (85), kam es in der vorliegenden Arbeit zu starken lokalen Nebenwirkungen, die zur Ausbildung von Verhärtungen sowie Wunden in der interskapulären Region führten. Da in der zugänglichen Literatur nach unserem Wissensstand keine solche Nebenwirkungen im Zusammenhang mit subkutaner Echinomycin-Injektion beschrieben sind, sind diese Nebenwirkungen am ehesten auf eine zu hohe Dosierung der Dimethylsulfoxid-Trägerlösung zurückzuführen. Die Ausbildung von Nekrosen und Blutungen im Zusammenhang mit der subkutanen Applikation von Dimethylsulfoxid sind in der Literatur beschrieben (86).

### **6.1.5 Bildgebende Diagnostik**

Röntgenbilder sind eine einfache Methode zur Beurteilung der Knochenstruktur und damit als einfache und kostengünstige Methode geeignet, die Frakturheilung anhand der Kallusbildung zu beobachten und zu beurteilen. Die Wahl von Röntgenbildern führte im vorliegenden Versuchsaufbau jedoch auch zu Schwierigkeiten. Durch die Untersuchung der Versuchstiere in Isofluran-Kurzarkose mit kurzer Wirkdauer, war durch die benötigten fünf Sekunden Durchleuchtungszeit die Qualität der Röntgenbilder teilweise beeinträchtigt, da nicht immer eine vollständige Bewegungslosigkeit der Tiere über die gesamte Aufnahmezeit garantiert werden konnte. Zudem erfolgten die Aufnahmen nur in einer Ebene, da die Tiere nicht wiederholten Isofluran-Kurzarkosen oder subkutan applizierten Narkosen ausgesetzt werden sollten. Außerdem konnten die Röntgenaufnahmen nicht im üblichen DICOM-Format abgespeichert und mit standardmäßigen Röntgenprogrammen vermessen und analysiert werden. Stattdessen erfolgte eine semiquantitative Analyse anhand der Ausprägung des Kallus im Röntgenbild. Die Bewertung aller Röntgenbilder erfolgte hierbei stets durch denselben Untersucher, um eine Beeinträchtigung der Ergebnisse durch persönliche Präferenzen zu minimieren.

## 6.2 Diskussion der Ergebnisse

### 6.2.1 Beurteilung der Frakturheilung im Verlauf

Anhand der vorhandenen Literatur zum physiologischen Ablauf der Frakturheilung am Mausmodell unter Verwendung eines geschlossenen Femurfraktur-Modells kann beurteilt werden, ob der vorliegende Versuchsaufbau geeignet ist, eine physiologische Frakturheilung zu reproduzieren. Hierdurch ist in der Folge eine Bewertung des Einflusses weiterer Faktoren auf den Heilungsprozess möglich.

Aus den Ergebnissen anderer Studien zu geschlossenen Femurfrakturen mit intramedullärer Fixierung am Mausmodell zeichnet sich für den zeitlichen Ablauf der Frakturheilung folgender Ablauf ab:

Williams et al. können histologisch nach durchschnittlich 7 Tagen Knorpel detektieren, der nach 14 Tagen den Frakturspalt komplett überbrückt. Die Chondrozyten beginnen an Tag 10-16 zu hypertrophieren und anschließend mit der Mineralisation des Kallus (10). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Yuasa und Colnot et al., die ein Maximum des weichen Kallus um Tag 10 detektieren (21, 25). Mit dem Abbau des weichen Kallus beginnt der Aufbau des harten Kallus, der ungefähr an Tag 14-21 sein Maximum erreicht (25). Anschließend beginnt der Umbau des Kallus. Laut Williams et al. nimmt das Kallusvolumen von Tag 14 bis 28 um durchschnittlich 50% ab (10) und innerhalb der meisten Studien ist nach ca. 42 Tagen die ursprüngliche Femurform wieder erreicht (25).

Der Verlauf der Frakturheilung im vorliegenden Versuchsaufbau kann am besten anhand des Verlaufs der Kallusentwicklung in der Versuchsgruppe mit 8 Wochen Lebensdauer und alleiniger Femurfraktur bewertet werden. Bei einfachen Typ-A Frakturen und guter bis mittelmäßiger Reposition zeigte sich in dieser Gruppe bereits am 7. postoperativen Tag bei zwei der fünf Versuchstiere eine leichte Andeutung eines harten Kallus im Röntgenbild, welcher proximal und distal des Frakturspalts lokalisiert war. Nach der oben aufgeführten Literatur sollte eine Umwandlung des weichen in harten Kallus und damit eine Detektion im Röntgenbild allerdings erst ab dem 10. postoperativen Tag stattfinden. Diese Ergebnisse lassen sich jedoch mit den Ergebnissen einer Studie von Yuasa et al. zur Vaskularisierung während der Frakturheilung in Einklang bringen. Yuasa et al. beschreiben hier, dass während der Frakturheilung an weiter entfernt vom Frakturspalt gelegenen Stellen eine frühe Revaskularisierung vom intakten Periost aus stattfinden und so Frakturheilung durch direkte Ossifikation auftreten kann. Diese wäre demnach auch im Röntgenbild früher zu detektieren (25). Die Kallusausprägung in der Versuchstiergruppe mit alleiniger Femurfraktur in der hier vorliegenden Arbeit fand im Einklang mit der Literatur an Tag 14 oder 21 ihr Maximum, wobei der Frakturspalt stets durch den harten Kallus überbrückt war. Anschließend erfolgte ein Ab- und Umbau des Kallus. Die ursprüngliche Femurform wurde anhand der Röntgenbilder bei vier von fünf Versuchstieren an Tag 28 bis 49 wieder erreicht, wobei im Röntgenbild des

## Diskussion

Versuchstieres ohne Erreichen der ursprünglichen Femurform lediglich noch eine sehr geringe Kallusausprägung zu erkennen war.

Der dargestellte Versuchsaufbau ist demnach geeignet, einen im Röntgenbild detektierbaren und mit der Literatur vergleichbaren Verlauf der Frakturheilung am Mausmodell hervorzurufen und zu reproduzieren. Somit kann anhand dieses Modells der Einfluss von äußeren Faktoren, hier das Auftreten eines zusätzlichen Schädel-Hirn-Traumas und eine zusätzliche Echinomycingabe, untersucht werden.



Abbildung 41: Frakturheilung im Verlauf bei Maus Nr. 15, links: Tag 0 nach Applikation der Fraktur, rechts: Tag 0 nach Stabilisierung der Fraktur mittels Schraube



Abbildung 42: Frakturheilung im Verlauf bei Maus Nr. 15, links: Tag 7, rechts: Tag 14



Abbildung 43: Frakturheilung im Verlauf bei Maus Nr. 15, links: Tag 21, rechts: Tag 28



## Diskussion



*Abbildung 44: Frakturheilung im Verlauf bei Maus Nr. 15, links: Tag 35, rechts: Tag 49*



*Abbildung 45: Frakturheilung im Verlauf bei Maus Nr. 15, Tag 56*

## 6.2.2 Einfluss von HIF-1 $\alpha$ auf die Frakturheilung

Im Vergleich der Kallusausprägung der Versuchsgruppen mit alleiniger Femurfraktur mit den Versuchsgruppen mit zusätzlicher Echinomycingabe ließ sich im dargestellten Versuchsaufbau weder eine verminderte Kallusausprägung noch ein Verhindern des Überbrückens des Frakturspalts durch Echinomycin feststellen. In allen Röntgenaufnahmen des 21. postoperativen Tags waren deutlich ausgeprägter harter Kallus sowie ein Überbrücken des Frakturspalts durch den Kallus zu erkennen. In der Versuchsgruppe mit 8 Wochen Lebensdauer waren harter Kallus und ein Überbrücken des Frakturspalts zudem schon ab dem 14. postoperativen Tag zu erkennen. Insgesamt zeigte sich der Kallus in der Gruppe mit zusätzlicher Echinomycingabe sogar stärker ausgeprägt als in der Versuchsgruppe mit alleiniger Femurfraktur. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass Echinomycin zwar nicht die Ausbildung des Kallus und ein Überbrücken des Frakturspalts beeinflusst, jedoch den späteren Umbau des Kallus verzögert. Dies könnte erklären warum der Kallus in der Versuchsgruppe mit Echinomycingabe zu späteren Zeitpunkten noch stärker ausgeprägt war und dass die ursprüngliche Femurgröße seltener als in der Versuchsgruppe mit alleiniger Femurfraktur wiedererreicht wurde. Im Vergleich von Frakturen ähnlicher Beschaffenheit aus beiden Versuchsgruppen ließ sich hier eine ähnliche bis verstärkte Kallusausprägung in der Gruppe mit Femurfraktur und zusätzlicher Echinomycingabe beschreiben, hier anhand von zwei Beispielen dargestellt:



Abbildung 46: Ähnlich bis stärker ausgeprägter Kallus bei Echinomycingabe und vergleichbaren Frakturen; links Maus Nr. 13 (Fraktur), Tag 0, rechts Maus Nr. 44 (Fraktur + EC) Tag 0



Abbildung 47: Ähnlich bis stärker ausgeprägter Kallus bei Echinomycingabe und vergleichbaren Frakturen; links Maus Nr. 13 (Fraktur), Tag 35, rechts Maus Nr. 44 (Fraktur + EC) Tag 35

## Diskussion

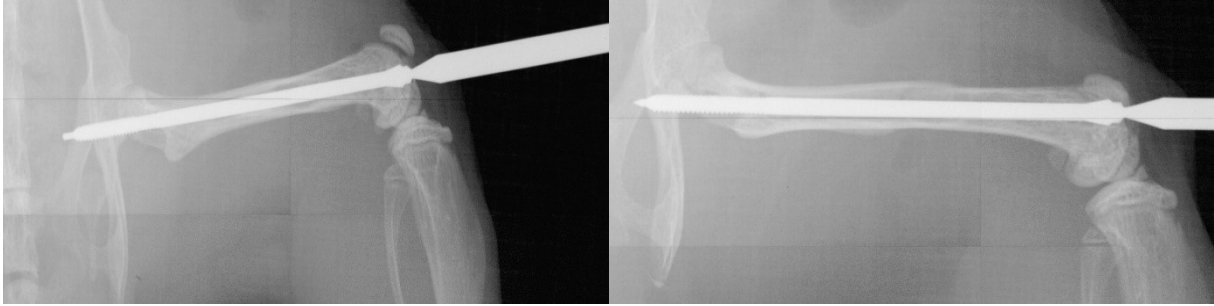


Abbildung 48: Ähnlich bis stärker ausgeprägter Kallus bei Echinomycingabe und vergleichbaren Frakturen; links Maus Nr. 14 (Fraktur), Tag 0, rechts Maus Nr. 43 (Fraktur + EC) Tag 0



Abbildung 49: Ähnlich bis stärker ausgeprägter Kallus bei Echinomycingabe und vergleichbaren Frakturen; links Maus Nr. 14 (Fraktur), Tag 35, rechts Maus Nr. 43 (Fraktur + EC) Tag 35

Unabhängig von der Wirkung des Echinomycins ist die stärkere Kallusausprägung in dieser Gruppe jedoch auch auf die Schwere der Frakturen und die Qualität der Repositionen zurückzuführen. Wie in den untenstehenden Grafiken dargestellt, traten in den Versuchsgruppen mit Echinomycingabe mehrfach komplizierte keilförmige oder Mehrfragmentfrakturen vom Typ B und C auf. Dies führte in der Folge zu einer erschwerten Reposition mit schlechter Fixierung der Frakturfragmente zueinander und aufgrund dessen teilweise zum sekundären Auseinanderweichen der Fragmente.

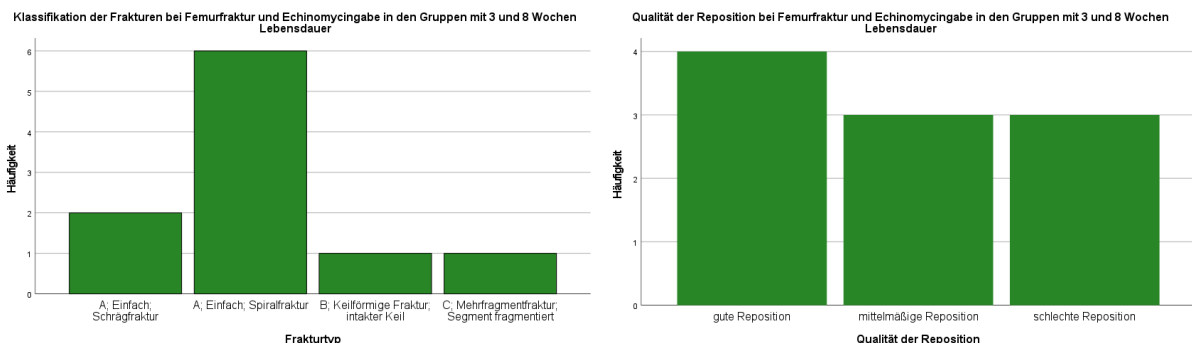


Abbildung 50: Klassifikation der Frakturen und Qualität der Reposition bei Femurfraktur und Echinomycingabe in den Versuchsgruppen mit 3 und 8 Wochen Lebensdauer

Dadurch war bei diesen Frakturen, wie auch in den untenstehenden Röntgenbildern abgebildet, die Produktion eines größeren Kallus nötig, um die Fragmente zu erfassen und den

## Diskussion

Frakturspalt zu überbrücken. Dass dies trotz Echinomycingabe möglich war deutet im vorliegenden Versuchsaufbau ebenfalls auf die fehlende Wirksamkeit von Echinomycin im Hinblick auf ein Verhindern der Kallusbildung und ein Überbrücken des Frakturspalts hin.



Abbildung 51: Keilförmige Fraktur mit schlechter Reposition und starker Kallusbildung bei Maus Nr. 37 (Fraktur +EC), links: Tag 0, rechts: Tag 21



Abbildung 52: Spiralfaktur mit schlechter Reposition und anschließender starker Kallusausprägung bei Maus Nr. 39 (Fraktur + EC), links: Tag 0, rechts: Tag 21

Eine weitere Beobachtung in dieser Versuchsgruppe lässt einen Zusammenhang zwischen offener Reposition und verstärkter Kallusbildung vermuten. Bei Versuchstier Nr. 41 in der Gruppe mit Echinomycingabe und 8 Wochen Lebensdauer musste eine offene Reposition mit Erweiterung des Hautschnitts und Aufsuchen der Fragmente unter der Muskulatur erfolgen. Obwohl die Fraktur anschließend gut reponiert war, zeigte sich im Verlauf eine diffuse Kallusbildung mit Entwicklung des Kallus nicht nur lokal um die Fraktur, sondern fast auf gesamter Femurlänge. Die Vermutung liegt nahe, dass es hier aufgrund des zusätzlichen Muskeltraumas durch die offene Reposition über eine verstärkte lokale Entzündungsreaktion zu einer Verstärkung des Ossifikationsprozesses gekommen sein könnte.



Abbildung 53: offene Reposition mit diffuser Kallusentwicklung bei Maus Nr. 41 (Fraktur + EC) an Tag 0





Abbildung 54: offene Reposition mit diffuser Kallusentwicklung bei Maus Nr. 41 (Fraktur + EC), links: Tag 14, rechts: Tag 21



Abbildung 55: offene Reposition mit diffuser Kallusentwicklung bei Maus Nr. 41 (Fraktur + EC), links: Tag 35, rechts: Tag 56

In der Vergangenheit haben bereits unterschiedliche Studien den Einfluss einer Inhibierung von HIF-1 $\alpha$  auf Frakturheilung oder die Entstehung heterotoper Ossifikationen durch enchondrale Ossifikation untersucht. Dabei kamen unterschiedliche Frakturmodelle und Arten der pharmakologischen Inhibierung von HIF-1 $\alpha$  zum Einsatz.

Lin Lin et al beschreiben bereits 2011 die Auswirkungen einer Inhibierung von HIF-1 $\alpha$  auf die Entwicklung heterotoper Ossifikationen nach Tenotomie der Achillessehne bei Ratten. Nach beidseitiger Tenotomie der Achillessehne erfolgte eine Blockade von HIF-1 $\alpha$  durch Injektion eines Lentivirusvektors in je eine der tenotomierten Seiten. Bei Behandlung nach 48 Stunden zeigte sich nach 10 Wochen in allen Gruppen eine signifikante Reduktion des Volumens heterotoper Ossifikationen (40). Auch Zimmermann et al. konnten durch Blockade von HIF-1 $\alpha$  in einer 2013 veröffentlichten Studie eine Reduktion heterotoper Ossifikationen bei Mäusen nachweisen. Die Blockade von HIF-1 $\alpha$  erfolgte hier durch Echinomycin, das mit 0,3 mg/kg/KG subkutan interscapulär wöchentlich über 4 Wochen injiziert wurde (84). Eine Reduktion heterotoper Ossifikation nach Tenotomie durch Blockade von HIF-1 $\alpha$  durch PX-478 oder Rapamycin belegten zudem Agarwal et al. Als Versuchstiere dienten hier Mäuse, die Injektion von PX-478 und Rapamycin erfolgte jeden zweiten Tag intraperitoneal über die gesamte Dauer der Studie. Die Auswertung des Volumens der heterotopen Ossifikation erfolgte nach 3, 5 und 9 Wochen (39).

Zusammenfassend beschreiben diese Studien einen Zusammenhang zwischen Inhibierung der enchondralen Ossifikation und vermindertem Volumen heterotoper Ossifikationen. Eine durch verminderte enchondrale Ossifikation ebenfalls denkbare verminderte Kallusbildung konnte im hier vorliegenden Versuchsaufbau jedoch nicht nachgewiesen werden. Lin Lin und

Agarwal et al. nutzten jeweils andere Ansätze zur Inhibierung von HIF-1 $\alpha$ , diese könnten dem hier vorliegenden Versuchsaufbau überlegen sein. Zwar konnten Zimmermann et al. mit der gleichen Dosierung und Applikationsform von Echinomycin eine deutliche Reduktion des Volumens heterotoper Ossifikationen nachweisen, jedoch kann im vorliegenden Versuchsaufbau eine Abschwächung der Wirkung von Echinomycin durch die vermutlich von Dimethylsulfoxid ausgelösten lokalen Nebenwirkungen nicht ausgeschlossen werden. Zur Verifizierung der lokalen Wirkung im Bereich der Fraktur hätten in diesem Versuchsaufbau, wie in den zuvor aufgeführten Studiendesigns durchgeführt, histologische, immunhistochemische und Gen-Expressions-Analysen beitragen können. Hierdurch wäre eine Bestätigung der Wirkung von Echinomycin im Sinne einer verminderten Expression der Zielgene und der verminderten Synthese von Proteinen möglich gewesen. Der Zeitraum der Untersuchungen ist in den hier aufgeführten Studien mit 5 bis 10 Wochen vergleichbar mit unserem gewählten Zeitraum von maximal 8 Wochen. Jedoch wird die Auswertung stets mittels Mikro-CT vorgenommen, wodurch eine dreidimensionale Auswertung mit Bewertung von Volumen und Dichte besser vorgenommen werden kann, als es in dieser Arbeit anhand konventioneller Röntgenbilder möglich war.

Erste Analysen zum Einfluss einer Inhibierung des HIF-1 $\alpha$ -Signalwegs auf Frakturheilung veröffentlichten Jentsch et al. 2016 in einer Studie, die die Kallusentwicklung nach Femurfraktur am Mausmodell unter dem Einfluss von Echinomycin untersuchte. Echinomycin wurde hier ebenfalls mit einer Dosierung von 0,3 mg/kg/KG interskapulär injiziert, Nebenwirkungen wurden nicht beschrieben. Zur Etablierung der Femurfraktur wurde gleichfalls eine intramedulläre Fixierung gewählt, wobei die intramedulläre Fixierung vor Applikation der Fraktur erfolgte. Nach 10 Wochen erfolgte die Euthanasie der Tiere und die Entnahme der Beine mit anschließender konventioneller Röntgen- und Mikro-CT-Untersuchung. Die Kallusformationen wurden in einer semiquantitativen Analyse ausgewertet, wobei die Ausprägung der Kallusformation von 0 bis 3 bewertet wurde. Anhand der zusätzlich angefertigten Mikro-CT Aufnahmen war eine Frakturheilung in den Aufnahmen aller Versuchstiere festzustellen, wobei die Kallusformationen von Interventions- und Kontrollgruppe vergleichbar waren und Echinomycin demnach weder die Frakturheilung noch die Kallusbildung verhindern konnte (85). Die Bewertung der Kallusformationen erfolgte bei Jentsch et al. ähnlich wie in der hier vorliegenden Arbeit, und zwar semiquantitativ. Zudem wurden ebenfalls Röntgenbilder zur Auswertung herangezogen. Auch die Größe der Versuchsgruppe beider Versuchsaufbauten ist vergleichbar. Bei Jentsch et al. verstarben in der Interventionsgruppe 2 Tiere, weshalb insgesamt 6 Fälle ausgewertet werden konnten, vergleichbar mit je 5 Tieren pro Versuchsgruppe in der vorliegenden Arbeit. Die von Jentsch et al. angebrachten Limitationen der Studie, eine zu geringe Fallzahl sowie das Fehlen histologischer Untersuchungen, lassen sich auch auf den hier vorliegenden Versuchsaufbau übertragen. Als mögliche Erklärung der fehlenden Wirksamkeit des Echinomycins im Hinblick auf eine Inhibierung der Frakturheilung vermuten Jentsch et al. eine mit 0,3mg/kg zu niedrig gewählte Dosierung des Echinomycins. Zudem wird angemerkt, dass - im Gegensatz zur heterotopen Ossifikation - während der Frakturheilung Kallusentwicklung auch in Bereichen

des Knochens mit normaler Sauerstoffversorgung stattfindet. Demnach könnte Echinomycin zwar geeignet sein, um heterotope Ossifikationen zu vermindern, die Wirkung in Bezug auf die Frakturheilung wäre aber limitiert. Diese Überlegungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit, wonach Echinomycin weder die Kallusbildung noch die Frakturheilung durch Überbrücken des Frakturspalts verhindern kann. Weitere Gemeinsamkeiten bestehen außerdem in der Heterogenität der erzeugten Frakturen durch das geschlossene Frakturmodell. Auch Jentsch et al. berichten von unterschiedlichen Ausprägungen der Frakturen mit teilweisem Verbiegen der intramedullären Fixierungen und der versehentlichen Produktion offener Frakturen. Als Komplikation wird hier jedoch eine nach 10 Wochen vermehrt auftretende Pseudarthrose beschrieben und nicht wie in dieser Arbeit eine verstärkte Kallusausprägung. Allerdings unterscheiden Jentsch et al. nicht zwischen einer hypertrophen und einer atrophen Pseudarthrose, die Kallusausprägung könnte also hier trotzdem verstärkt gewesen sein. Die radiologische Auswertung erfolgt, wie auch schon in den zuvor genannten Studien, neben der Analyse konventioneller Röntgenbilder, mittels Mikro-CT. Jentsch et al. verzichten jedoch im Gegensatz zur hier vorliegenden Arbeit auf regelmäßige radiologische Kontrollen, um einer möglichen Beeinflussung der Kallusentwicklung durch die Strahlung vorzubeugen. Daher ist bei Jentsch et al. lediglich eine Bewertung der Kallusausprägung nach 10 Wochen möglich, während in der hier vorliegenden Arbeit anhand der Versuchsgruppen mit 8 Wochen Lebensdauer eine wöchentliche Betrachtung der Röntgenbilder und demnach auch der Kallusausprägung und Dynamik möglich war. Histing et al. empfehlen in einem 2012 veröffentlichten Review zur Frakturheilung an Nagetieren zur Untersuchung der Frühphase der Frakturheilung bei Mäusen zudem einen Untersuchungszeitpunkt nach 1-2 Wochen. Zur Betrachtung der Spätphase wird ein Untersuchungszeitpunkt nach 3-5 Wochen angeraten, da die Frakturen bei adoleszenten Tieren meist bereits nach 4 Wochen verheilt sind (83). Der von Jentsch et al. gewählte Zeitpunkt erscheint demnach zu spät, sodass Unterschiede in der Frakturheilung vermutlich gar nicht zur Darstellung kommen konnten.

Qiao et al. wählten ein ähnliches Studiendesign in einer 2019 veröffentlichten Studie. Ratten wurde eine Tibiafraktur zugefügt, die anschließend mittels K-Draht stabilisiert wurde. Anschließend wurden die Tiere in eine Interventions- und eine Kontrollgruppe mit jeweils 32 Tieren unterteilt, wobei der Interventionsgruppe jeden zweiten Tag intraperitoneal Echinomycin in einer Dosierung von 0,05 mg/kg/KG injiziert wurde. In der Interventionsgruppe waren Kallusbildung und Umbau deutlich verzögert, während in der Kontrollgruppe nach 42 Tagen die Frakturen meist schon ausgeheilt waren. Qiao et al. konnten so eine Verzögerung der Frakturheilung und zusätzlich eine Repression der Zielgene von HIF-1 $\alpha$  durch Echinomycin nachweisen (87). Anders als in den zuvor erläuterten Studiendesigns und im vorliegenden Versuchsaufbau erfolgte die Injektion von Echinomycin bei Qiao et al. intraperitoneal statt subkutan interskapulär und zudem jeden zweiten Tag sowie über einen längeren Zeitraum. Diese Art der Applikation könnte der im hier vorliegenden und in den anderen dargestellten Studiendesigns demnach überlegen sein. Außerdem konnte hier durch Gen-Expressions-Analysen sowie immunhistochemische und Western-Blot-Analysen eine verminderte

Expression der Zielgene von HIF-1 $\alpha$  nachgewiesen werden. Wie oben bereits dargestellt, hätten solche Analysen auch in der hier vorliegenden Arbeit zum weiteren Verständnis beitragen können. Im Gegensatz zu Jentzsch et al. untersuchten Qiao et al. die Auswirkungen auf die Kallusentwicklung nach 7, 14, 28 und 42 Tagen, was den Untersuchungsintervallen in unserem Versuchsaufbau ähnelt. Sie konnten so in der Interventionsgruppe eine Verzögerung der Frakturheilung mit einem erhöhten Kallusvolumen in der Phase des Kallusumbaus feststellen. Dies steht im Einklang mit den hier vorgestellten Ergebnissen, nämlich einer teilweise stärkeren Kallusausprägung in späteren Phasen des Kallusumbaus. Zudem wird die Annahme unterstützt, dass eine radiologische Untersuchung in festen zeitlichen Abständen der Untersuchung eines Endpunkts überlegen ist, da so die Dynamik der Frakturheilung besser beurteilt werden kann. Da Jentzsh et al. nur eine Untersuchung nach 10 Wochen anstellten, könnte eine wie von Qiao et al. beschriebene Verzögerung der Frakturheilung zu früheren Zeitpunkten gar nicht zur Darstellung gekommen sein. Auch die Überlegenheit der Mikro-CT-Untersuchung kommt hier erneut zur Darstellung. Qiao et al. konnten den Umfang des Kallus, dessen Mineralisationsdichte und den Anteil des Knochenvolumens in Bezug auf das gesamte Volumen messen, was mit konventionellen Röntgenaufnahmen nicht möglich ist. Der Kallus in der Versuchsgruppe mit Echinomycin-Injektion im hiesigen Versuchsaufbau hätte sich demnach durchaus in seiner Beschaffenheit von dem der Versuchsgruppe mit alleiniger Femurfraktur unterscheiden können, ohne dass diese Unterschiede in den konventionellen Röntgenaufnahmen erkenntlich gewesen wären. Zuletzt lässt sich feststellen, dass Qiao et al. eine größere Gruppe an Versuchstieren verwendeten. Bei insgesamt 32 Tieren in der Interventionsgruppe konnten nach zervikaler Dislokation pro Untersuchungszeitpunkt 8 Tiere untersucht werden, während es im hier vorliegenden Versuchsaufbau nur 5 Tiere pro Gruppe waren.

Obwohl sich die Ergebnisse anderer Studien zur Wirksamkeit von Echinomycin hier nur teilweise im Hinblick auf eine verzögerte Frakturheilung bestätigen lassen, weisen die dargestellten Ergebnisse auf wichtige Punkte hin, die in künftigen Studien verbessert werden können, um deren Aussagekraft zu erhöhen. Dazu gehören eine größere Anzahl von Versuchstieren, verbesserte Methoden zur digitalen Bildauswertung, erweiterter histologische und immunhistochemische Untersuchungen sowie Gen-Expressions-Analysen und die Auswahl eines Frakturmodells zur Erzeugung homogenerer Frakturen. Zudem sollten die Untersuchungen in regelmäßige Zeitabständen erfolgen, wobei eine Beobachtung über 8 Wochen hinaus als nicht sinnvoll erscheint, da hier die Früh- und Spätphase der Frakturheilung, zumindest im Mausmodell, meist schon abgeschlossen ist.



### 6.2.3 Einfluss eines Schädel-Hirn-Traumas auf die Frakturheilung

Anhand der Röntgenaufnahmen des 21. postoperativen Tags stellte sich die Anzahl der leichten Kallusausprägungen in der Versuchsgruppe mit Femurfraktur und zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma in etwa vergleichbar zur Gruppe mit alleiniger Femurfraktur dar. Das Verhältnis der mittelstarken und starken Kallusausprägung verschob sich jedoch in der Versuchsgruppe mit Schädel-Hirn-Trauma zugunsten einer starken Kallusausprägung. Zu beachten ist hierbei, dass in der Versuchsgruppe mit Schädel-Hirn-Trauma in den Gruppen mit 3 und 8 Wochen Lebensdauer jeweils eine Röntgenaufnahme nicht ausgewertet werden konnte, da das Gerät die Aufnahme nicht abspeichern konnte, beziehungsweise statt der aktuellen Aufnahme die Voraufnahme abgespeichert wurde.

In dieser Versuchsgruppe wird erneut die Abhängigkeit der Kallusausprägung von der Schwere der Fraktur, der Qualität der Reposition und dem sekundären Verschieben von Frakturfragmenten deutlich. Wie anhand der untenstehenden Graphen aufgezeigt, stellten sich in der Versuchsgruppe mit 8 Wochen Lebensdauer drei der fünf Frakturen als komplizierte Typ-B oder Typ-C Frakturen dar, die Repositionsergebnisse waren hier mittelmäßig. Nur bei einer Fraktur erschienen die Frakturfragmente in der Aufnahme vom 7. postoperativen Tag im Vergleich zum OP-Tag nicht versetzt.

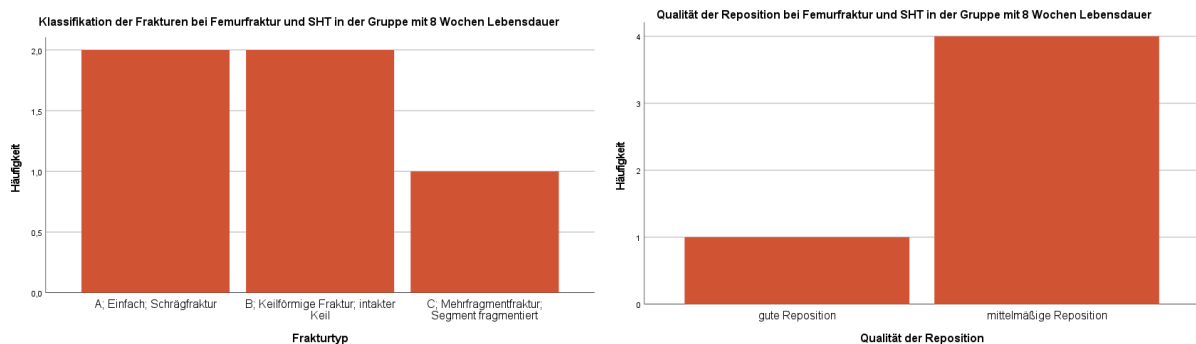


Abbildung 56: Klassifikation und Qualität der Repositionen in der Versuchsgruppe mit Femurfraktur und SHT und 8 Wochen Lebensdauer

Bei Ansicht der Röntgenbilder konnte zudem ein Unterschied in der Dichte des sich entwickelnden Kallus im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen festgestellt werden: Wie hier anhand von Versuchstier Nr. 74 aufgezeigt, stellte sich der Kallus in den Röntgenaufnahmen sehr dicht dar und nahm nach Erreichen seiner maximalen Ausprägung kaum an Größe ab. Stattdessen war ein Umbau im Sinne einer Dichteabnahme des Kallus zu beobachten. Dementsprechend wurde in dieser Gruppe nur bei einem der fünf Versuchstiere die ursprüngliche Kallusgröße in den Röntgenaufnahmen wieder erreicht.

## Diskussion



Abbildung 57: komplizierte Fraktur mit schlecht fixiertem und sekundär disloziertem Fragment und starker Kallusentwicklung bei Maus Nr. 74 (Fraktur + SHT), links: Tag 0, rechts: Tag 7



Abbildung 58: komplizierte Fraktur mit schlecht fixiertem und sekundär disloziertem Fragment und starker Kallusentwicklung bei Maus Nr. 74 (Fraktur + SHT), links: Tag 14, rechts: Tag 21

Im Vergleich von Frakturen ähnlicher Beschaffenheit, wie hier anhand eines Versuchstieres aus der Gruppe mit Fraktur und Schädel-Hirn-Trauma und eines Versuchstieres aus der Gruppe mit Fraktur und Echinomycingabe, wird der Unterschied in der Dichte des Kallus erneut deutlich.



Abbildung 59: Vergleich einer dichteren Kallusbildung bei komplizierten Frakturen und gleichzeitigem Schädel-Hirn-Trauma, links: Nr. 73 (Fraktur+SHT), Tag 0, rechts: Nr. 36 (Fraktur+EC), Tag 0



Abbildung 60: Vergleich einer dichteren Kallusbildung bei komplizierten Frakturen und gleichzeitigem Schädel-Hirn-Trauma, links: Nr. 73 (Fraktur+SHT), Tag 21, rechts: Nr. 36 (Fraktur+EC), Tag 21

## Diskussion

Auch in der Versuchsgruppe mit Femurfraktur und zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma ließ sich bei zwei Versuchstieren eine diffuse Kallusbildung auf gesamter Femurlänge beobachten.



Abbildung 61: diffuser Kallus auf gesamter Femurlänge nach repetitivem Herabfallen des Gewichts bei Maus Nr. 71 (Fraktur + SHT), links: Tag 0, rechts: Tag 14



Abbildung 62: diffuser Kallus auf gesamter Femurlänge nach repetitivem Herabfallen des Gewichts bei Maus Nr. 71 (Fraktur + SHT), links: Tag 21, rechts: Tag 35



Abbildung 63: Kallusbildung auch um Schenkelhals bei Fraktur und Schädel-Hirn-Trauma nach repetitivem Herabfallen des Gewichts bei Maus Nr. 73 (Fraktur + SHT), links: Tag 28, rechts: Tag 49

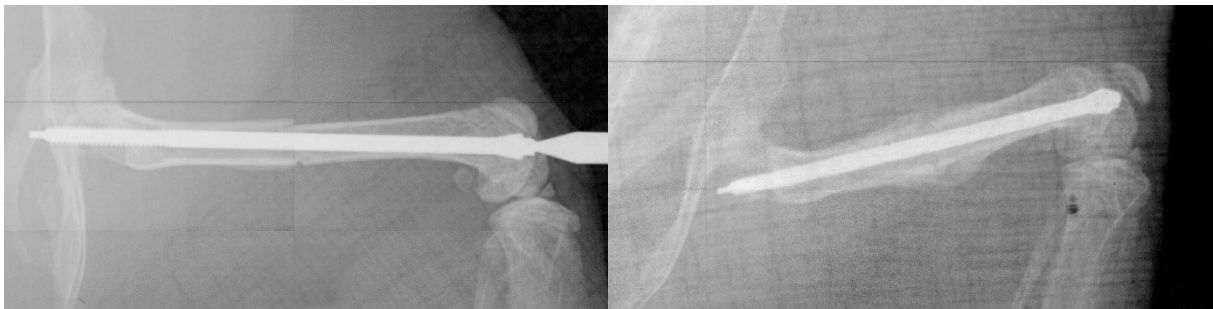
In der vorherigen Versuchsgruppe wurde als mögliche Ursache ein Muskeltrauma durch die offene Reposition und einen anschließenden über eine verstärkte lokale Entzündung ebenfalls verstärkten Ossifikationsprozess diskutiert. Bei beiden oben dargestellten Versuchstieren aus der Versuchsgruppe mit Femurfraktur und gleichzeitigem Schädel-Hirn-Trauma war ein wiederholtes Herabfallen des Gewichts notwendig, um die Fraktur zu erzeugen. Dies ging gleichzeitig mit einer repetitiven Verletzung der Muskulatur einher. Es könnte so auch hier über das wiederholte Muskeltrauma zu einer stärkeren begleitenden Entzündung und zur Förderung der Ossifikation gekommen sein.

Die Verstärkung von enchondraler Ossifikation nach Muskeltraumata an Tiermodellen ist in der Literatur beschrieben (88-90). Anthonissen et al. konnten durch Aufbohren des Femur-Markkanals und zusätzlichem Muskeltrauma an Musculus gluteus maximus und minimus eine

## Diskussion

zuverlässige enchondrale Ossifikation in Form von heterotoper Ossifikation erzeugen (89). Liu et al. waren in einem Modell zur BMP-2 induzierten heterotopen Ossifikation in der Lage, die Formation von HO durch ein begleitendes Muskeltrauma signifikant zu steigern. Das Muskeltrauma wurde hier ebenfalls durch ein herabfallendes Gewicht auf den Musculus quadrizeps femoris erzeugt (90).

Im Gegensatz zur starken Kallusausprägung bei komplizierten Frakturen und bei starkem Muskeltrauma kam es in der hier dargestellten Versuchsgruppe mit Femurfraktur und begleitendem Schädel-Hirn-Trauma bei unkomplizierten und gut reponierten Frakturen zu einer vergleichbaren Kallusentwicklung wie bei der Versuchsgruppe mit alleiniger Femurfraktur.



*Abbildung 64: gute und schnelle Frakturheilung in Versuchsgruppe mit Femurfraktur und zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma bei unkomplizierter Fraktur und guter Reposition bei Maus Nr. 72 (Fraktur + SHT), links: Tag 0, rechts: Tag 14*



*Abbildung 65: gute und schnelle Frakturheilung in Versuchsgruppe mit Femurfraktur und zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma bei unkomplizierter Fraktur und guter Reposition bei Maus Nr. 72 (Fraktur + SHT), links: Tag 35, rechts: Tag 56*

Im Vergleich von Frakturen ähnlicher Beschaffenheit am 21. postoperativen Tag, bestand bei der Gruppe mit zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma sogar ein etwas weniger dichter Kallus. Hier könnte die Frakturheilung im Vergleich zur Versuchsgruppe mit alleiniger Femurfraktur also gegebenenfalls schon fortgeschrittener sein und sich bereits in einem weiter entwickelten Umbaustadium befinden.



## Diskussion



Abbildung 66: schnellere Frakturheilung in der Versuchsgruppe mit Femurfraktur und zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma bei einfacher Fraktur und guter Reposition, links: Maus Nr. 67 (Fraktur+SHT), Tag 0; rechts: Maus Nr. 7 (Fraktur), Tag 0

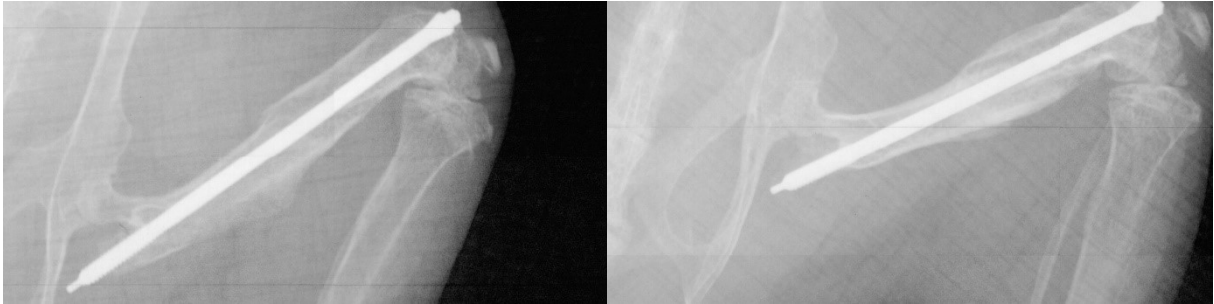


Abbildung 67: schnellere Frakturheilung in der Versuchsgruppe mit Femurfraktur und zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma bei einfacher Fraktur und guter Reposition, links: Maus Nr. 67 (Fraktur+SHT), Tag 21; rechts: Maus Nr. 7 (Fraktur), Tag 21



Abbildung 68: schnellere Frakturheilung in der Versuchsgruppe mit Femurfraktur und zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma bei einfacher Fraktur und guter Reposition, links: Maus Nr. 68 (Fraktur+SHT), Tag 0; rechts: Maus Nr. 10 (Fraktur), Tag 0



Abbildung 69: schnellere Frakturheilung in der Versuchsgruppe mit Femurfraktur und zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma bei einfacher Fraktur und guter Reposition, links: Maus Nr. 68 (Fraktur+SHT), Tag 21; rechts: Maus Nr. 10 (Fraktur), Tag 21

Die Auswertung der Röntgenbilder in der vorliegenden Arbeit weist zusammenfassend darauf hin, dass bei komplizierten Frakturen sowie bei Frakturen mit verschobenen Fragmenten, die ohnehin vermehrt angeregte Kallusbildung durch das Schädel-Hirn-Trauma zusätzlich

beeinflusst und verstärkt wird. Dadurch kommt es zur Ausbildung eines starken und sehr dichten Kallus, der anschließend umgebaut wird, aber nur langsam an Größe abnimmt. Ein darüber hinaus auftretendes Muskeltrauma scheint die Kallusbildung und ein Auftreten von Ossifikationen außerhalb der Lokalisation der Fraktur zusätzlich zu fördern. Dem gegenüber kommt es bei einfachen Frakturen mit guter Reposition zu einem normalen Ablauf der Frakturheilung. Bei Ansicht aller Röntgenaufnahmen des 21. postoperativen Tags ist eventuell sogar eine leichte Beschleunigung des Kallusumbaus mit geringerer Kallusausprägung und Dichte in der Versuchsgruppe mit zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma im Vergleich zur Versuchsgruppe mit alleiniger Fraktur zu vermuten.

Der Einfluss eines Schädel-Hirn-Traumas auf die Frakturheilung wurde in der Literatur anhand unterschiedlicher Versuchsaufbauten im Tiermodell untersucht.

Boes et al. untersuchten in einer 2006 veröffentlichten Studie die Heilung von Femurfrakturen anhand eines geschlossenen Modells mit anschließender intramedullärer Fixierung an Ratten. In der Interventionsgruppe wurde zusätzlich ein Schädel-Hirn-Trauma appliziert. Nach 21 Tagen konnten Boes et al. einen steiferen und im Durchmesser reduzierten Kallus beobachten und schlossen daraus auf eine verkürzte Frakturheilung nach Schädel-Hirn-Trauma mit sich nach 21 Tagen schon in der Umbauphase befindendem Kallus (76). Da Boes et al. Frakturen, die nicht middiaphysär lokalisiert waren, sowie Trümmerfrakturen ausschlossen, lassen sich diese Ergebnisse nur mit den hier als „einfach“ klassifizierten Frakturen vergleichen. Im Einklang mit den Ergebnissen von Boes et al. war auch in der vorliegenden Arbeit eine - im Vergleich zur Versuchsgruppe mit alleiniger Femurfraktur - verminderte Kallusausprägung bei den als „einfach“ klassifizierten Frakturen zu vermuten. Die Auswertung der Kallusausprägung erfolgte dabei bei Boes et al., wie auch in der hier vorgelegten Arbeit, anhand von Röntgenbildern. Zur Applikation des Schädel-Hirn-Traumas wurde jedoch im Gegensatz zu unserem Versuchsaufbau ein geschlossenes CCI-Modell genutzt, zudem erfolgten die Untersuchungen an Ratten. Bereits Hofmann et al. merken jedoch an, dass bei der Nutzung von Ratten als Versuchstieren die hier erfolgte Auswertung nach 21 Tagen etwas kurz erscheint, da die Frakturheilung bei Ratten je nach Alter 4 bis 12 Wochen benötigt (73). Die Anzahl der Auswertungen nach 21 Tagen ist bei Boes et al. mit 17 Tieren größer und damit aussagekräftiger als in unserer Arbeit, zudem führten Boes et al. biomechanische Testungen und Serumanalysen durch, die auch in der hier vorgelegten Arbeit zum weiteren Verständnis hätten beitragen können.

Auch Wei et al. untersuchten die Heilung von Femurschaftfrakturen bei Ratten und konnten nach 4 und 8 Wochen eine signifikante Zunahme des Kallusvolumens feststellen (71). Die Applikation des Schädel-Hirn-Traumas erfolgte bei Wei et al. über ein offenes CCI-Modell, während die Femurfraktur durch eine gezielte middiaphysäre Osteotomie mit anschließender intramedullärer Fixierung erzeugt wurde. Somit kamen auch bei Wei et al. keine komplizierten Frakturtypen im Versuchsaufbau vor, wodurch sich auch diese Ergebnisse nur mit den hier als „einfach“ klassifizierten Frakturen vergleichen lassen. Anders als bei Wei et al. konnte in unserem Versuchsaufbau jedoch keine verstärkte Kallusbildung bei diesen Frakturformen

festgestellt werden. Die Anzahl der Versuchstiere pro gemessenen Zeitpunkt ist in beiden Arbeiten mit 4 Tieren bei Wei et al. und bei uns mit 5 Tieren vergleichbar, ebenfalls wird in beiden Fällen die Auswertung anhand von Röntgenbildern vorgenommen. Wei et al. untersuchten jedoch jedes Tier nach Euthanasie und damit lediglich zu einem Untersuchungszeitpunkt. Eine Aussage über die Kallusdynamik und Entwicklung anhand der gleichen Fraktur im Verlauf ist demnach nicht möglich. Unterschiede in der Kallusdynamik könnten somit bei Wei et al. durch die Art der Auswertung gar nicht zur Darstellung gekommen sein. Zudem wird auch hier die Frakturheilung an Ratten und nicht an Mäusen beobachtet.

Zu ähnlichen Ergebnissen wie Wei et al. kamen auch Song et al. in einer 2012 veröffentlichten Studie. Nach 4 Wochen konnten sie bei zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma zu einer Femurfraktur einen erhöhten Mineralgehalt sowie eine erhöhte Mineralisationsdichte detektieren. Nach 8 Wochen konnte ein geringerer Mineralgehalt detektiert werden, woraus Song et al. auf eine beschleunigte Frakturheilung schlossen (70). Der Versuchsaufbau gleicht dem von Boes et al. Es wurden ebenfalls Ratten untersucht und Frakturen, die nicht middiaphysär lokalisiert waren, sowie Trümmerfrakturen ausgeschlossen. Wie schon zuvor bei Wei et al. festgestellt, wurde jedoch auch hier der Kallus nur zu einem Versuchszeitpunkt, und zwar nach der Euthanasie der Tiere untersucht, eine Verlaufsanalyse war somit nicht möglich. Da Song et al. zudem keine Kallusvolumina, sondern Mineralisationsdichte und Mineralgehalt betrachten, lassen sich ihre Ergebnisse mit unseren nur bedingt vergleichen. Festzustellen bleibt jedoch, dass Song et al. Mikro-CT-Aufnahmen zur Auswertung nutzen, wodurch andere Aspekte des Kallus besser bewertet und analysiert werden können.

Tsitsilonis et al. sowie auch Locher et al. berichteten 2015 über eine ab der 2. postoperativen Woche verstärkte Kallusbildung nach Kombination einer Femurfraktur und eines Schädel-Hirn-Traumas durch ein CCI-Modell im Vergleich zur alleinigen Femurfraktur am Mausmodell (91, 92). Wie in unserer Arbeit wurde die Kallusentwicklung dabei wöchentlich analysiert, allerdings nur über einen Zeitraum von maximal 3 oder 4 Wochen. Im Gegensatz zur hier vorliegenden Arbeit war deswegen keine Beobachtung und Beschreibung der Kallusentwicklung und Dynamik in späteren Umbauphasen der Frakturheilung möglich. In Übereinstimmung mit der hier vorliegenden Arbeit konnte in beiden Studien eine stärkere Kallusbildung bei zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma beschrieben werden. Locher et al. stellten in ihrer Arbeit außerdem eine erhöhte Torsionsfestigkeit nach vier Wochen fest und schlossen so auf eine positive Beeinflussung der Frakturheilung durch ein begleitendes Schädel-Hirn-Trauma. Allerdings wurde in beiden Studien kein geschlossenes Frakturmodell, sondern ein offenes Frakturmodell mit externer Stabilisierung genutzt. Da unter Verwendung dieses Modells Frakturen sehr kontrolliert appliziert werden können, sind Frakturen unterschiedlicher Schweregrade nahezu ausgeschlossen. Die starke Kallusbildung ist dadurch, im Gegensatz zur hier vorliegenden Arbeit, nicht zusätzlich auf die Schwere der Frakturform oder einen sekundären Versatz der Fragmente zurückzuführen, sondern allein auf das Schädel-Hirn-Trauma. Die Auswertung erfolgte zudem in beiden Versuchsaufbauten mittels Mikro-CT, wodurch eine exaktere Berechnung der Kallusvolumina möglich ist, als es anhand

von konventionellen Röntgenbildern der Fall ist. Die Gruppengröße der untersuchten Versuchstiere unterscheidet sich bei Tsitsilonis und Locher et al. zudem stark von der Gruppengröße in unserer Arbeit. Tsitsilonis et al. konnten die Kallusentwicklung bei 15 Tieren, Locher et al sogar bei 30 Tieren pro Gruppe auswerten. Allgemein könnten durch eine größere Anzahl an Versuchstieren Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zuverlässiger detektiert werden, zudem würde eine Verfälschung durch einzelne abweichende Messungen weniger wahrscheinlich. Allerdings ist eine Erhöhung der Fallzahl im Tierversuch nicht immer ohne weiteres möglich, da stets ethische Standards eingehalten und eine übermäßige Belastung der Tiere vermieden werden müssen. Die Nachteile der niedrigen Versuchstierzahl werden jedoch in der vorliegenden Arbeit deutlich: Die Erzeugung von Frakturen unterschiedlicher Beschaffenheit und Lokalisation führte bei ohnehin geringer Anzahl an Versuchstieren pro Gruppe zu einem erschwerten Vergleich der Frakturen untereinander und mit der Kontrollgruppe.

Zusätzlich zur Untersuchung des Kallusvolumens nach Tibiafraktur und geschlossenem Schädel-Hirn-Trauma bei Mäusen stellten Brady et al. 2016 histologische Untersuchungen an und konnten so nach 21 Tagen ein verstärktes Kallusvolumen im Mikro-CT sowie eine erhöhte Kallusfläche in der histologischen Untersuchung feststellen. Nach 35 Tagen waren diese Unterschiede in der Kontroll- und Interventionsgruppe nicht mehr nachzuweisen (93). Anhand dieses Studiendesigns wird einerseits deutlich, dass ein längeres Beobachtungsintervall sinnvoll erscheint, um weitergehende Unterschiede zwischen den Gruppen, auch hinsichtlich des Kallusumbaus und der Resorption zu erlangen. Andererseits wird erneut deutlich, dass auch histologische Untersuchungen essenziell sind, um zum weiteren Verständnis beizutragen. Da Brady et al. eine erhöhte Osteoklastendichte nach Tag 21 feststellen konnten, schlussfolgerten sie daraus auf eine schnellere Resorption des Kallus, wodurch nach 35 Tagen kein Unterschied mehr festzustellen war. Diese Schlussfolgerung stimmt mit den Beschreibungen von Boes et al. überein und bestärkt auch die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Überlegung, dass bei einfachen Frakturen ein beschleunigter Umbau des Kallus stattfindet.

In den meisten durchgeführten Studien zum Einfluss eines offenen oder geschlossenen Schädel-Hirn-Traumas auf die Frakturheilung kann demnach ein positiver Effekt mit erhöhtem Kallusvolumen, Mineralgehalt, Mineralisationsdichte und verbesserten biomechanischen Eigenschaften des Kallus festgestellt werden. In Studien mit wöchentlicher Analyse kann dabei eine Erhöhung des Kallusvolumens ab der 2. postoperativen Woche erfasst werden.

Die Aussagen, bis wann ein erhöhtes Volumen besteht variieren. Während Wei et al. bis zur 8. postoperativen Woche eine Zunahme des Kallusvolumens sowie ein im Vergleich zur alleinigen Fraktur erhöhtes Volumen beobachteten, nimmt das Volumen des Kallus bei Locher et al. ab der 3. postoperativen Woche wieder ab, bleibt aber im Vergleich zur Fraktur-Gruppe erhöht. Brady et al. hingegen können zwar auch einen Rückgang des Kallusvolumens nach 35 Tagen feststellen, jedoch keinen Unterschied mehr zwischen Fraktur- und Schädel-Hirn-Gruppe beobachten. Boes et al. hingegen beschreiben drei Wochen nach Fraktur keinen



Unterschied in der Kallusgröße, dafür aber einen steiferen Kallus, weswegen bereits von einem stattfindenden Umbau ausgegangen wird. Es scheint also anhand der Literatur keine Festlegung eines einheitlichen Schemas zum Ablauf der Kallusentwicklung möglich zu sein.

Eine mögliche Ursache hierfür könnte die Verwendung unterschiedlicher Versuchstiere sowie die Kombination unterschiedlicher Modelle zur Applikation von Schädel-Hirn-Trauma und Fraktur sein. Boes, Song und Brady et al. verwenden zur Applikation des Schädel-Hirn-Traumas ein herabfallendes Gewicht aus definierter Höhe, während Wei, Tsitsilonis und Locher et al. ein offenes CCI-Modell mit Freilegung der Dura bevorzugen. Brady et al. untersuchen die Frakturheilung anhand eines geschlossenen Modells mit intramedullärer Fixierung an Tibiafrakturen, während sich die restlichen aufgeführten Studien auf Femurfrakturen beziehen. Des Weiteren werden in all diesen Studien komplizierte und schlecht lokalisierte Frakturen aus der Untersuchung ausgeschlossen oder sie kommen aufgrund des gewählten Frakturmodells nicht vor. Dementsprechend wird auch die Auswirkung eines Schädel-Hirn-Traumas auf Frakturen unterschiedlicher Schweregrade in der hier aufgeführten Literatur nicht beschrieben.

Ein weiterer Unterschied liegt in der zeitlichen Art der Auswertung. In den meisten Arbeiten findet nur zum Zeitpunkt der Euthanasie eine Untersuchung, z.B. mittels Mikro-CT, Röntgen oder Histologie, statt. Nur in wenigen Arbeiten werden, wie in unserer Arbeit, die Versuchstiere wöchentlich untersucht. Demnach beziehen sich die Aussagen auf absolute Untersuchungszeitpunkte und können nicht im zeitlichen Verlauf anhand ein und derselben Fraktur analysiert werden. Es wird außerdem deutlich, dass ein längeres Untersuchungsintervall von bis zu ca. 8 Wochen sinnvoll erscheint, um auch Aussagen bezüglich des Einflusses eines Schädel-Hirn-Traumas auf Kallusresorption- und Umbau während der Spätphase der Frakturheilung treffen zu können.

Obwohl unsere Ergebnisse teilweise im Gegensatz zu anderen Forschungsergebnissen stehen, können dadurch wichtige Erkenntnisse gewonnen werden. Zum einen wird deutlich, dass es für zukünftige Studien und Forschungen von Vorteil sein kann, die Methoden zur Etablierung der Frakturen und des Schädel-Hirn-Traumas zu vereinheitlichen, um Ergebnisse besser vergleichen zu können. Zum anderen kann auch der Einbezug von extremeren, statt der durch die meisten Modelle standardisierten Frakturformen, einen Beitrag zu neuen Erkenntnissen liefern. Die beim Menschen oft durch Hochgeschwindigkeitstraumata entstehende Kombination aus Fraktur und Schädel-Hirn-Traumata zeigt schließlich auch häufig schwere Ausprägungen. Nach heutigem Stand hat sich außerdem die Analyse der Frakturheilung mittels Mikro-CT bewährt, da hierdurch eine Berechnung von Volumen und Dichte exakter als mittels Röntgenaufnahmen möglich ist.

## 6.2.4 Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma und Echinomycingabe auf die Frakturheilung

Der Einfluss auf die enchondrale Ossifikation durch ein zusätzliches Schädel-Hirn-Trauma bei Echinomycingabe beziehungsweise durch zusätzliche Echinomycingabe bei Schädel-Hirn-Trauma ist in der Literatur nicht beschrieben.

Anhand der Röntgenbilder im Verlauf in den Versuchsgruppen mit 8 Wochen Lebensdauer sollen hier anhand vergleichbarer Frakturformen und Repositionen mögliche Vergleiche und daraus abzuleitende Überlegungen vorgestellt werden.

Nach zuvor beschriebener Überlegung beeinflusst Echinomycin zwar nicht die Ausbildung eines Kallus und ein Überbrücken des Frakturspalts, jedoch den späteren Umbau des Kallus. Ein zusätzliches Schädel-Hirn-Trauma führt nach den zuvor aufgeführten Erläuterungen bei schwierigen Frakturformen sowie bei Frakturen mit großem Muskeltrauma zur exzessiven Kallusentwicklung, während einfache Frakturen sogar etwas schneller verheilen.

Demnach wäre im Vergleich zur Versuchsgruppe mit Fraktur und Echinomycingabe bei der Versuchsgruppe mit zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma zu Femurfraktur und Echinomycingabe bei leichten Frakturformen eine beschleunigte Frakturheilung zu erwarten. Bei schweren Frakturformen wäre durch das Schädel-Hirn-Trauma eine stärkere Kallusbildung zu erwarten.

Beim Vergleich der Frakturheilung im wöchentlichen Verlauf war in der Gruppe mit Femurfraktur, Echinomycingabe und Schädel-Hirn-Trauma bei zwei der Frakturen eine Kallusandeutung bereits an Tag sieben zu erkennen, während dies bei der Gruppe mit alleiniger Echinomycingabe auf keiner Röntgenaufnahme der Fall war. Diese Beobachtung könnte für eine beschleunigte Frakturheilung durch Schädel-Hirn-Trauma sprechen. Allerdings waren die Andeutungen minimal und anhand von konventionellen Röntgenaufnahmen nicht immer sicher zu bewerten.



Abbildung 70: Kallusandeutung an Tag 7 in der Versuchsgruppe mit Femurfraktur, Echinomycingabe und SHT; links: Maus Nr. 102 (Fraktur+SHT+EC); rechts: Maus Nr. 103 (Fraktur+SHT+EC)

Der weitere Verlauf der Frakturheilung stellte sich in beiden Gruppen vergleichbar dar: Am 14. postoperativen Tag war stets harter Kallus zu erkennen, der den Frakturspalt überbrückte. Die maximale Kallusausprägung war dabei bis auf ein Versuchstier aus der Gruppe mit alleiniger Echinomycingabe stets an Tag 14 erreicht. Anschließend erfolgten das Remodelling und die

## Diskussion

Resorption des Kallus, wobei die ursprüngliche Femurform in der Versuchsgruppe mit Femurfraktur, Echinomycingabe und zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma bei drei, statt bei zwei Versuchstieren in der Versuchsgruppe mit Echinomycingabe, erreicht werden konnte. Dies könnte daher auf eine beschleunigte Frakturheilung durch das zusätzliche Schädel-Hirn-Trauma hinweisen.

Bei direktem wochenweisem Vergleich der Röntgenbilder im Verlauf zeigte sich der Ablauf der Frakturheilung in beiden Gruppen ähnlich, gegebenenfalls konnte eine etwas schnellere Größenabnahme des Kallus in der Gruppe mit Echinomycin und zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma vermutet werden.



Abbildung 71: Vergleich der Frakturheilung zwischen der Gruppe mit Femurfraktur, Schädel-Hirn-Trauma und Echinomycingabe und Gruppe mit Femurfraktur und Echinomycingabe, links: Maus Nr. 103 (Fraktur+SHT+EC), Tag 0, rechts: Maus Nr. 43 (Fraktur+EC), Tag 0



Abbildung 72: Vergleich der Frakturheilung zwischen der Gruppe mit Femurfraktur, Schädel-Hirn-Trauma und Echinomycingabe und Gruppe mit Femurfraktur und Echinomycingabe, links: Maus Nr. 103 (Fraktur+SHT+EC), Tag 14, rechts: Maus Nr. 43 (Fraktur+EC), Tag 14



Abbildung 73: Vergleich der Frakturheilung zwischen der Gruppe mit Femurfraktur, Schädel-Hirn-Trauma und Echinomycingabe und Gruppe mit Femurfraktur und Echinomycingabe, links: Maus Nr. 103 (Fraktur+SHT+EC), Tag 28, rechts: Maus Nr. 43 (Fraktur+EC), Tag 28

Da genaue Messungen des Kallusvolumens allerdings anhand konventioneller Röntgenaufnahmen in einer Ebene jedoch nicht möglich sind, lässt sich zwar eine etwas

schnellere Frakturheilung durch das zusätzliche Schädel-Hirn-Trauma vermuten, zur sicheren Bewertung wären jedoch auch hier Mikro-CT-Aufnahmen von Vorteil gewesen, um die exakten Volumina zu berechnen.

Im Vergleich zur Versuchsgruppe mit Femurfraktur und Schädel-Hirn-Trauma wäre durch die zusätzliche Echinomycingabe zu Femurfraktur und Schädel-Hirn-Trauma bei schweren Frakturformen mit Ausbildung eines starken Kallus eine Beeinflussung des Kallusumbaus zu erwarten. Bei leichten Frakturformen wäre eine Verzögerung der Frakturheilung mit in späteren Phasen noch stärker ausgeprägtem Kallus zu erwarten.

Beim Vergleich der Frakturheilung im Verlauf anhand der Röntgenaufnahmen der Gruppen mit 8 Wochen Lebensdauer fiel in der Gruppe mit Femurfraktur und Schädel-Hirn-Trauma eine spätere maximale Ausprägung des Kallus und ein häufigeres Nicht-Erreichen der ursprünglichen Femurform auf. Dies hätte man eher in der Gruppe mit Femurfraktur, Schädel-Hirn-Trauma und zusätzlicher Echinomycingabe erwarten können, allerdings war das Nicht-Erreichen der ursprünglichen Femurform in der Gruppe mit Femurfraktur und Schädel-Hirn-Trauma am ehesten durch die Schwere der Frakturen mit sich sekundär verschiebenden Fragmenten und bereits beschriebener starker Induktion einer Kallusbildung bedingt.

Zur Überlegung, dass Echinomycin den Kallusumbau und die Resorption beeinflussen könnte, eignet sich ein Vergleich zwischen Versuchstier Nr. 101 und Nr. 74. In beiden Fällen bestand eine Typ-C-Mehrfragmentfraktur, im Verlauf kam es zusätzlich zur Dislokation eines Fragments. Anhand zuvor aufgeführter Überlegungen müsste es demnach, gerade bei begleitendem Schädel-Hirn-Trauma, auch zu einer starken und dichten Kallusbildung kommen. Es entwickelte sich auch in beiden Fällen ein großer Kallus, dieser erschien jedoch beim Versuchstier mit zusätzlicher Echinomycingabe weniger dicht, was im Vergleich sehr deutlich wird. Echinomycin könnte hier demnach zwar nicht die Ausbildung, jedoch die Beschaffenheit des Kallus, im Sinne eines weniger dichten Kallus, beeinflusst haben.



Abbildung 74: Typ-C-Mehrfragmentfraktur Tag 0, links Nr. 101 (Fraktur+EC+SHT), rechts Nr. 74 (Fraktur+SHT)

## Diskussion

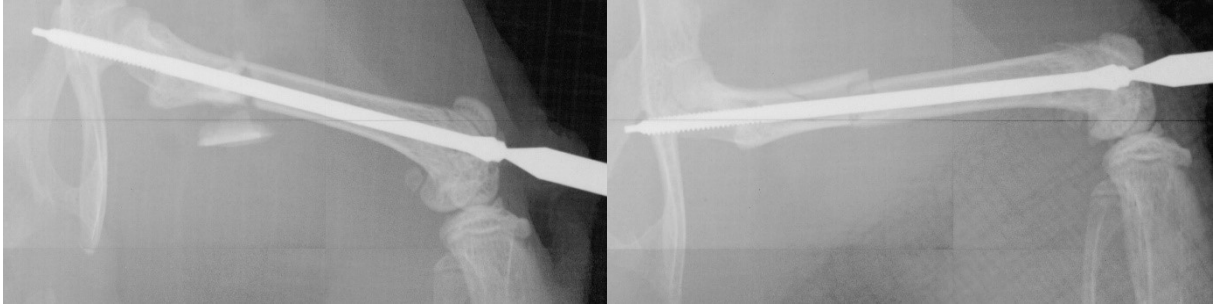


Abbildung 75: Typ-C-Mehrfragmentfraktur nach Reposition an Tag 0, links Nr. 101 (Fraktur+EC+SHT), rechts Nr. 74 (Fraktur+SHT)



Abbildung 76: Typ-C-Mehrfragmentfraktur, Kallusausprägung im Verlauf an Tag 21, links Nr. 101 (Fraktur+EC+SHT), rechts Nr. 74 (Fraktur+SHT)

Auch in der Versuchsgruppe mit Femurfraktur, Echinomycingabe und Schädel-Hirn-Trauma kam es bei einem Versuchstier zur Notwendigkeit einer offenen Reposition mit dadurch begleitendem Muskeltrauma. Auch hier war auf den Röntgenbildern ein diffuser Kallus um die Fraktur herum zu beobachten, allerdings erschien auch dieser weniger dicht als in der Versuchsgruppe mit Femurfraktur, Schädel-Hirn-Trauma und begleitendem Muskeltrauma.



Abbildung 77: Diffuse Kallusentwicklung nach Muskeltrauma, Tag 0; links Maus-Nr. 96 (Fraktur+EC+SHT); rechts: Maus Nr. 71 (Fraktur+SHT)



## Diskussion



Abbildung 78: Diffuse Kallusentwicklung nach Muskeltrauma; links Maus-Nr. 96 (Fraktur+EC+SHT); rechts: Maus Nr. 71 (Fraktur+SHT)

Auch hier könnte Echinomycin demnach die Ausbildung eines dichteren Kallus verhindert haben.

Diese Überlegung wird zudem durch Beobachtungen gestützt, dass sich auch bei komplizierteren Mehrfragmentfrakturen nur ein geringerer Kallus entwickelte, als man es anhand der Beobachtungen in der Gruppe mit Femurfraktur und Schädel-Hirn-Trauma hätte erwarten können.



Abbildung 79: Geringere Kallusbildung auch bei komplizierten Frakturen, Maus Nr. 100 (Fraktur+SHT+EC), Tag 0



Abbildung 80: Geringere Kallusbildung auch bei komplizierten Frakturen, Maus Nr. 100 (Fraktur+SHT+EC), Tag 21

Anhand dieser Vergleiche lässt sich in Bezug auf die zusätzliche Echinomycingabe zu Femurfraktur und Schädel-Hirn-Trauma eine bei schweren Frakturformen schwächere und vor allem weniger dichte Kallusausprägung feststellen.

Zusammenfassend lassen sich durch den Vergleich mit der Versuchsgruppe mit Femurfraktur, Echinomycingabe und Schädel-Hirn-Trauma die oben beschriebenen Beobachtungen und Vermutungen anhand von Vergleichen innerhalb der Verlaufsanalysen der Versuchsgruppe

## Diskussion

mit 8 Wochen Lebensdauer bestätigen. Allerdings handelt es sich hier stets um Einzelfälle, da ein sinnvoller Vergleich bei nur geringer Gruppengröße und unterschiedlich auftretenden Frakturformen nicht immer möglich ist. Um weitere Erkenntnisse über die gegenseitige Beeinflussung von Schädel-Hirn-Trauma und Echinomycin auf Frakturheilung und enchondrale Ossifikation zu erlangen bedarf es demnach in zukünftigen Studien einer größeren Gruppengröße von Versuchstieren sowie einer Beurteilung der Frakturheilung im Verlauf, am besten mittels Mikro-CT. Zudem wäre ein Modell zur einheitlichen Frakturzeugung sinnvoll, um die Frakturen besser vergleichen zu können.

### 6.3 Ausblick

Aufgrund der Tatsache, dass eine positive pharmakologische Beeinflussung der Frakturheilung bis heute nicht möglich ist, wird die Pathophysiologie und eine mögliche Beeinflussung der Frakturheilung weiterhin ein Bestand klinischer Forschung bleiben. Die Fragen nach einer Inhibierung der Frakturheilung durch Echinomycin und der Beschleunigung durch ein synchron auftretendes Schädel-Hirn-Trauma konnten in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Insbesondere das Problem, dass Echinomycin in anderer Applikationsform und Dosierung durchaus eine weitere Wirkung haben könnte, bedarf einer weiteren Klärung. Außerdem sollte auch ein Augenmerk auf die Beeinflussung der Frakturheilung durch Schädel-Hirn-Trauma bei Frakturen unterschiedlicher Schwere und unterschiedlich ausgeprägter begleitender Muskelverletzung gelegt werden. Zur Beantwortung dieser Fragen wären Studien mit größeren Fallzahlen, eine Vereinheitlichung der Methodik und der Einbezug unterschiedlicher Frakturtypen von Vorteil.

Die Erforschung der pathophysiologischen Grundlagen spielt ebenfalls eine wichtige Rolle. Vor allem die Pathophysiologie hinter der Beeinflussung der Frakturheilung durch Schädel-Hirn-Traumata ist bis heute nicht abschließend geklärt. Obwohl durch einige Studien Erklärungsansätze erläutert worden sind, bedarf es auch hier weiterer Forschung, um diesen Fragen abschließend nachzugehen. Das Tiermodell scheint hier, nicht nur zur radiologischen Beurteilung der Kallusentwicklung, sondern auch zur weiteren histologischen und immunhistochemischen Beurteilung und zur Untersuchung der Serumzusammensetzung unabdingbar.



## 7 Zusammenfassung

Frakturen stellen eine der häufigsten Verletzungen des Menschen dar. Trotz weitreichender Erkenntnis der pathophysiologischen Abläufe während der Frakturheilung bleiben die Ursachen einer Beeinträchtigung dieser Abläufe durch weitere äußere Einflüsse oft unklar. Um weitere Erkenntnisse über diese Mechanismen zu erlangen, sind Tiermodelle meist unverzichtbar. Sie bieten zudem oft neue Einblicke in diese Abläufe. Ziel der vorliegenden Studie war es, zwei dieser äußeren Einflüsse, nämlich eine Blockade des HIF-1 $\alpha$ -Signalwegs durch Echinomycin und ein begleitendes Schädel-Hirn-Trauma, und ihre Beeinflussung der Frakturheilung näher zu untersuchen. Der gewählte Versuchsaufbau war hierbei dazu geeignet eine indirekte Frakturheilung mit Entwicklung eines Kallus und anschließender physiologisch ablaufender Frakturheilung zu induzieren. Auch die Applikation eines fokalen Schädel-Hirn-Traumas war zuverlässig möglich.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Wirkung des Echinomycins im Hinblick auf ein Verhindern der Kallusbildung und ein Überbrücken des Frakturspalts nicht bestätigt werden. Auch eine Verzögerung der Frakturheilung durch Echinomycin konnte nur bedingt bestätigt werden. Eine Beschleunigung der Frakturheilung durch Schädel-Hirn-Trauma war durch die Auswertung anhand der Röntgenbilder nicht sicher zu belegen, während eine exzessive und dichte Kallusbildung bei komplizierten Frakturen und bei begleitendem Muskeltrauma aufgezeigt werden konnte. Die Möglichkeiten zur Anpassung der Echinomycin-Dosierung in Anlehnung an weitere Publikationen und die Notwendigkeit einer Vereinheitlichung der Methodik bei zukünftigen Studien wurde diskutiert. Zudem wurde der Einbezug komplizierter Frakturformen, wie sie auch beim Menschen in Kombination mit Schädel-Hirn-Trauma auftreten, angeregt. Das vorliegende Modell kann dabei als methodische Vorlage zur Applikation und Kombination der Traumata dienen und könnte in Ergänzung mit einer höheren Fallzahl, einer Erweiterung um histologische und immunhistochemische Untersuchung sowie verbesserten Aufnahmen mittels Mikro-CT zu neuen Erkenntnissen in diesem Gebiet beitragen.

## 8 Quellen

1. Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9th ed. 2014 ed2014.
2. Welsch U, Deller T, Elsberger S. Lehrbuch Histologie: Unter Mitarbeit von Thomas Deller: Elsevier Health Sciences; 2016.
3. Wennemuth G. Taschenbuch Histologie: Urban & Fischer/Elsevier; 2017.
4. Niethard FU, Pfeil J, Biberthaler P. Orthopädie und Unfallchirurgie. Duale Reihe. 7., überarb. Aufl. ed. Stuttgart2014.
5. Siewert JR, Allgöwer M. Chirurgie mit integriertem Fallquiz ; 40 Fälle nach neuer AO ; mit 182 Tabellen. 8., komplett überarb. Aufl. ed. Siewert JR, Allgöwer M, editors2006.
6. Meinberg EG, Agel J, Roberts CS, Karam MD, Kellam JF. Fracture and Dislocation Classification Compendium-2018. J Orthop Trauma. 2018;32 Suppl 1:S1-s170.
7. Reiser M, Bartenstein P. Duale Reihe Radiologie. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. ed2017.
8. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. Nat Rev Rheumatol. 2015;11(1):45-54.
9. Koehler A, Galanski M. Frakturheilung. In: Kompendium der traumatologischen Röntgendiagnostik Springer, Berlin, Heidelberg. 1999.
10. Williams JN, Li Y, Valiya Kambrath A, Sankar U. The Generation of Closed Femoral Fractures in Mice: A Model to Study Bone Healing. J Vis Exp. 2018(138).
11. Marsell R, Einhorn TA. Emerging bone healing therapies. J Orthop Trauma. 2010;24 Suppl 1:S4-8.
12. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. Injury. 2011;42(6):551-5.
13. Lieberman JR, Friedlaender GE. Bone Regeneration and Repair. Bone Regeneration and Repair - Biology and Clinical Applications2005. p. 24-5.
14. Baker CE, Moore-Lotridge SN, Hysong AA, Posey SL, Robinette JP, Blum DM, et al. Bone Fracture Acute Phase Response-A Unifying Theory of Fracture Repair: Clinical and Scientific Implications. Clin Rev Bone Miner Metab. 2018;16(4):142-58.
15. Bahney CS, Zondervan RL, Allison P, Theologis A, Ashley JW, Ahn J, et al. Cellular biology of fracture healing. J Orthop Res. 2019;37(1):35-50.
16. Ferguson C, Alpern E, Micalau T, Helms JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? Mech Dev. 1999;87(1-2):57-66.
17. Toosi S, Behravan J. Osteogenesis and bone remodeling: A focus on growth factors and bioactive peptides. Biofactors. 2019.
18. Bahney CS, Hu DP, Micalau T, 3rd, Marcucio RS. The multifaceted role of the vasculature in endochondral fracture repair. Front Endocrinol (Lausanne). 2015;6:4.
19. Rapp AE, Bindl R, Recknagel S, Erbacher A, Muller I, Schrezenmeier H, et al. Fracture Healing Is Delayed in Immunodeficient NOD/scidIL2Rgammacnull Mice. PLoS One. 2016;11(2):e0147465.
20. Saran U, Gemini Piperni S, Chatterjee S. Role of angiogenesis in bone repair. Arch Biochem Biophys. 2014;561:109-17.
21. Colnot C. Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. J Bone Miner Res. 2009;24(2):274-82.
22. Amarilio R, Viukov SV, Sharir A, Eshkar-Oren I, Johnson RS, Zelzer E. HIF1alpha regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis. Development. 2007;134(21):3917-28.
23. Strobel S, Loparic M, Wendt D, Schenk AD, Candrian C, Lindberg RL, et al. Anabolic and catabolic responses of human articular chondrocytes to varying oxygen percentages. Arthritis Res Ther. 2010;12(2):R34.
24. Yang DC, Yang MH, Tsai CC, Huang TF, Chen YH, Hung SC. Hypoxia inhibits osteogenesis in human mesenchymal stem cells through direct regulation of RUNX2 by TWIST. PLoS One. 2011;6(9):e23965.

25. Yuasa M, Mignemi NA, Barnett JV, Cates JM, Nyman JS, Okawa A, et al. The temporal and spatial development of vascularity in a healing displaced fracture. *Bone*. 2014;67:208-21.
26. Holstein JH, Karabin-Kehl B, Scheuer C, Garcia P, Histing T, Meier C, et al. Endostatin inhibits Callus remodeling during fracture healing in mice. *J Orthop Res*. 2013;31(10):1579-84.
27. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(15):9656-61.
28. Semenza GL. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:47-71.
29. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 1992;12(12):5447-54.
30. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(12):5510-4.
31. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* (1985). 2000;88(4):1474-80.
32. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*. 1997;272(36):22642-7.
33. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev*. 2001;15(20):2675-86.
34. Sousa Fialho MDL, Abd Jamil AH, Stannard GA, Heather LC. Hypoxia-inducible factor 1 signalling, metabolism and its therapeutic potential in cardiovascular disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865(4):831-43.
35. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res*. 1999;59(22):5830-5.
36. Kanichai M, Ferguson D, Prendergast PJ, Campbell VA. Hypoxia promotes chondrogenesis in rat mesenchymal stem cells: a role for AKT and hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha. *J Cell Physiol*. 2008;216(3):708-15.
37. Robins JC, Akeno N, Mukherjee A, Dalal RR, Aronow BJ, Koopman P, et al. Hypoxia induces chondrocyte-specific gene expression in mesenchymal cells in association with transcriptional activation of Sox9. *Bone*. 2005;37(3):313-22.
38. Zhou N, Hu N, Liao JY, Lin LB, Zhao C, Si WK, et al. HIF-1alpha as a Regulator of BMP2-Induced Chondrogenic Differentiation, Osteogenic Differentiation, and Endochondral Ossification in Stem Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36(1):44-60.
39. Agarwal S, Loder S, Brownley C, Cholok D, Mangiavini L, Li J, et al. Inhibition of Hif1alpha prevents both trauma-induced and genetic heterotopic ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(3):E338-47.
40. Lin L, Shen Q, Leng H, Duan X, Fu X, Yu C. Synergistic inhibition of endochondral bone formation by silencing Hif1alpha and Runx2 in trauma-induced heterotopic ossification. *Mol Ther*. 2011;19(8):1426-32.
41. Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitering S, Kloss F, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell*. 2007;6(6):745-57.
42. Hirao M, Hashimoto J, Yamasaki N, Ando W, Tsuboi H, Myoui A, et al. Oxygen tension is an important mediator of the transformation of osteoblasts to osteocytes. *J Bone Miner Metab*. 2007;25(5):266-76.
43. Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, et al. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest*. 2007;117(6):1616-26.

## Quellen

44. Shomento SH, Wan C, Cao X, Faugere MC, Boussein ML, Clemens TL, et al. Hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha exert both distinct and overlapping functions in long bone development. *J Cell Biochem.* 2010;109(1):196-204.
45. Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res.* 2010;86(2):236-42.
46. Compennolle V, Brusselmans K, Franco D, Moorman A, Dewerchin M, Collen D, et al. Cardia bifida, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cardiovasc Res.* 2003;60(3):569-79.
47. Liu P, Liu J, Xia K, Chen L, Wu X. Effect of leptin combined with CoCl<sub>2</sub> on healing in Sprague Dawley Rat fracture model. *Sci Rep.* 2016;6:30754.
48. Huang J, Liu L, Feng M, An S, Zhou M, Li Z, et al. Effect of CoCl<sub>2</sub> on fracture repair in a rat model of bone fracture. *Mol Med Rep.* 2015;12(4):5951-6.
49. Kong D, Park EJ, Stephen AG, Calvani M, Cardellina JH, Monks A, et al. Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. *Cancer Res.* 2005;65(19):9047-55.
50. Nickols NG, Jacobs CS, Farkas ME, Dervan PB. Modulating hypoxia-inducible transcription by disrupting the HIF-1-DNA interface. *ACS Chem Biol.* 2007;2(8):561-71.
51. Dewan MC, Rattani A, Gupta S, Baticulon RE, Hung YC, Punchak M, et al. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 2018:1-18.
52. Ng SY, Lee AYW. Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:528.
53. Hufschmidt A, Lücking CH. 2.19 Traumatische Schädigungen. 2009. In: *Neurologie compact* [Internet]. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 5., aktualisierte und erweiterte Auflage. Available from: <http://www.thieme-connect.de/products/ebooks/lookinside/10.1055/b-0034-4373>.
54. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet.* 1974;2(7872):81-4.
55. Andriessen TM, Jacobs B, Vos PE. Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury. *J Cell Mol Med.* 2010;14(10):2381-92.
56. Murray GD, Teasdale GM, Braakman R, Cohadon F, Dearden M, Iannotti F, et al. The European Brain Injury Consortium survey of head injuries. *Acta Neurochir (Wien).* 1999;141(3):223-36.
57. Hacke W. *Neurologie. Springer-Lehrbuch.* Berlin, Heidelberg 2016.
58. Stubbe H, Wölfer J. Schädel-Hirn-Trauma beim Erwachsenen. *Intensivmedup2date.* 2012;08(04):253-69.
59. Schmidt OI, Leinase I, Hasenboehler E, Morgan SJ, Stahel PF. [The relevance of the inflammatory response in the injured brain]. *Orthopade.* 2007;36(3):248, 50-8.
60. Perkins R, Skirving AP. Callus formation and the rate of healing of femoral fractures in patients with head injuries. *J Bone Joint Surg Br.* 1987;69(4):521-4.
61. Spencer RF. The effect of head injury on fracture healing. A quantitative assessment. *J Bone Joint Surg Br.* 1987;69(4):525-8.
62. Newman RJ, Stone MH, Mukherjee SK. Accelerated fracture union in association with severe head injury. *Injury.* 1987;18(4):241-6.
63. Cadosch D, Gautschi OP, Thyer M, Song S, Skirving AP, Filgueira L, et al. Humoral factors enhance fracture-healing and callus formation in patients with traumatic brain injury. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91(2):282-8.
64. Sang X, Wang Z, Qin T, Li Y. Elevated concentrations of hypoxia-inducible factor-1alpha in patients with fracture and concomitant traumatic brain injury. *Ann Clin Biochem.* 2017;54(5):584-92.
65. Yang TY, Wang TC, Tsai YH, Huang KC. The effects of an injury to the brain on bone healing and callus formation in young adults with fractures of the femoral shaft. *J Bone Joint Surg Br.* 2012;94(2):227-30.

66. Giannoudis PV, Mushtaq S, Harwood P, Kambhampati S, Dimoutsos M, Stavrou Z, et al. Accelerated bone healing and excessive callus formation in patients with femoral fracture and head injury. *Injury*. 2006;37 Suppl 3:S18-24.
67. Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic BV. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev*. 2019;99(1):21-78.
68. Shlosberg D, Benifla M, Kaufer D, Friedman A. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol*. 2010;6(7):393-403.
69. Huang H, Cheng WX, Hu YP, Chen JH, Zheng ZT, Zhang P. Relationship between heterotopic ossification and traumatic brain injury: Why severe traumatic brain injury increases the risk of heterotopic ossification. *J Orthop Translat*. 2018;12:16-25.
70. Song Y, Bi L, Zhang Z, Huang Z, Hou W, Lu X, et al. Increased levels of calcitonin gene-related peptide in serum accelerate fracture healing following traumatic brain injury. *Mol Med Rep*. 2012;5(2):432-8.
71. Wei Y, Wang L, Clark JC, Dass CR, Choong PF. Elevated leptin expression in a rat model of fracture and traumatic brain injury. *J Pharm Pharmacol*. 2008;60(12):1667-72.
72. Sakellariou VI, Grigoriou E, Mavrogenis AF, Soucacos PN, Papagelopoulos PJ. Heterotopic ossification following traumatic brain injury and spinal cord injury: insight into the etiology and pathophysiology. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2012;12(4):230-40.
73. Hofman M, Koopmans G, Kobbe P, Poeze M, Andruszkow H, Brink PR, et al. Improved fracture healing in patients with concomitant traumatic brain injury: proven or not? *Mediators Inflamm*. 2015;2015:204842.
74. Klein BY, Shohami E, Reikhshtein Y, Ben-Bassat H, Liebergall M. Serum-mediated osteogenic effects of head injury on cultured rat marrow stromal cells. *Calcif Tissue Int*. 1999;65(3):217-22.
75. Cadosch D, Toffoli AM, Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R, Skirving AP, et al. Serum after traumatic brain injury increases proliferation and supports expression of osteoblast markers in muscle cells. *J Bone Joint Surg Am*. 2010;92(3):645-53.
76. Boes M, Kain M, Kakar S, Nicholls F, Cullinane D, Gerstenfeld L, et al. Osteogenic effects of traumatic brain injury on experimental fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88(4):738-43.
77. Gautschi OP, Cadosch D, Frey SP, Skirving AP, Filgueira L, Zellweger R. Serum-mediated osteogenic effect in traumatic brain-injured patients. *ANZ J Surg*. 2009;79(6):449-55.
78. Huang RQ, Cheng HL, Zhao XD, Dai W, Zhuang Z, Wu Y, et al. Preliminary study on the effect of trauma-induced secondary cellular hypoxia in brain injury. *Neurosci Lett*. 2010;473(1):22-7.
79. Umschweif G, Alexandrovich AG, Trembovler V, Horowitz M, Shohami E. Hypoxia-inducible factor 1 is essential for spontaneous recovery from traumatic brain injury and is a key mediator of heat acclimation induced neuroprotection. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33(4):524-31.
80. U. S, P. R, J. K, C. B, W. D. Expression of BMP Proteins in Rats with and without Brain Injury and a Tibia Fracture. *The University of Pennsylvania Orthopaedic Journal*. 2001;14:85-9.
81. Cernak I. Animal models of head trauma. *NeuroRx*. 2005;2(3):410-22.
82. Osier N, Dixon CE. Mini Review of Controlled Cortical Impact: A Well-Suited Device for Concussion Research. *Brain Sci*. 2017;7(7).
83. Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, et al. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone*. 2011;49(4):591-9.
84. Zimmermann SM, Wurgler-Hauri CC, Wanner GA, Simmen HP, Werner CM. Echinomycin in the prevention of heterotopic ossification - an experimental antibiotic agent shows promising results in a murine model. *Injury*. 2013;44(4):570-5.
85. Jentsch T, Zimmermann SM, Nicholls F, Cinelli P, Simmen HP, Werner CM. Echinomycin did not affect the safety of fracture healing: an experimental pilot study on a murine femur fracture model. *Patient Saf Surg*. 2016;10:7.
86. Smith ER, Hadidian Z, Mason MM. The single--and repeated--dose toxicity of dimethyl sulfoxide. *Ann N Y Acad Sci*. 1967;141(1):96-109.
87. Qiao J, Huang J, Zhou M, Cao G, Shen H. Inhibition of HIF-1alpha restrains fracture healing via regulation of autophagy in a rat model. *Exp Ther Med*. 2019;17(3):1884-90.

## Quellen

88. Anthonissen J, Steffen CT, Alessandri B, Baranowski A, Rommens PM, Victor J, et al. Traumatic brain injury enhances the formation of heterotopic ossification around the hip: an animal model study. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2019.
89. Anthonissen J, Ossendorf C, Hock JL, Ritz U, Hofmann A, Rommens PM. A new small-animal model for the study of acquired heterotopic ossification after hip surgery. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2015;49(2):197-202.
90. Liu X, Kang H, Shahnazari M, Kim H, Wang L, Larm O, et al. A novel mouse model of trauma induced heterotopic ossification. *J Orthop Res.* 2014;32(2):183-8.
91. Tsitsilonis S, Seemann R, Misch M, Wichlas F, Haas NP, Schmidt-Bleek K, et al. The effect of traumatic brain injury on bone healing: an experimental study in a novel in vivo animal model. *Injury.* 2015;46(4):661-5.
92. Locher RJ, Lunnemann T, Garbe A, Schaser K, Schmidt-Bleek K, Duda G, et al. Traumatic brain injury and bone healing: radiographic and biomechanical analyses of bone formation and stability in a combined murine trauma model. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2015;15(4):309-15.
93. Brady RD, Grills BL, Church JE, Walsh NC, McDonald AC, Agoston DV, et al. Closed head experimental traumatic brain injury increases size and bone volume of callus in mice with concomitant tibial fracture. *Sci Rep.* 2016;6:34491.

Danksagung

## **9 Danksagung**

Ich möchte meiner Familie für die Unterstützung in allen Lebenslagen, nicht nur während der Promotion, danken.

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Rut Regina Burkhardt  
Adresse Fleischstraße 14, 54290 Trier  
Telefon / Mobil 01796137749  
E-Mail rutburkhardt@googlemail.com  
Geburtsdatum / -ort 18.09.1994 Saarbrücken  
Familienstand ledig



### Studium

01.10.2013 – 06.11.2019 Studium der Humanmedizin an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz

1. Staatsexamen 08/2015, Note 2,0
2. Staatsexamen 10/2018, Note 2
3. Staatsexamen 11/2019, Note 1

Gesamtnote 1,66

### Klinische Erfahrungen

Seit 03/2020 Assistenzärztin in der Chirurgie I im Klinikum Mutterhaus der Borromäerinnen

07/2019 – 10/2019 PJ-Tertial Innere Medizin im Klinikum Mutterhaus der Borromäerinnen

03/2019 – 06/2019 PJ-Tertial Chirurgie im Klinikum Mutterhaus der Borromäerinnen

11/2019 – 03/2019 PJ-Tertial Orthopädie im Klinikum Mutterhaus der Borromäerinnen

01.03.2018 – 30.03.2018 Famulatur in der Abteilung für Neurologie und Neurophysiologie des Bräderkrankenhauses Trier

21.08.2017 – 19.09.2017 Famulatur im Institut für Rechtsmedizin der Universitätsmedizin Mainz

01.03.2017 – 31.03.2017 Famulatur in der Unfallchirurgie des SHG-Klinikums Idar-Oberstein

September bis Oktober 2016 4-wöchige Famulatur in einer Facharztpraxis für Innere Medizin und Pneumologie



## Lebenslauf

- 14.01.2013 – 14.10.2013      Freiwilliges Soziales Jahr beim DRK Landesverband Saarland e.v.  
inklusive Ausbildung zur Rettungssanitäterin; Einsatzstelle:  
Rettungswache Merzig
- 20.08.2012 – 17.11.2012      Pflegepraktikum in der SHG-Klinik Merzig

## Nebenerwerbstätigkeiten

- 01.09.2015 – 31.08.2018      Arbeit als Wissenschaftliche Hilfskraft auf der Palliativstation der  
Universitätsmedizin Mainz

## Außeruniversitäres Engagement

- 2013 – 2018      Mitglied des Fachschaftsrats Medizin in Mainz  
Aufgaben: u.a. Organisation des Ausrüstungsverkaufs, IT- und  
Websiteverwaltung

Trier, den 12.06.2021