

**Aus der Chirurgischen Klinik, Abteilung für Unfall-, Hand- und  
Wiederherstellungs chirurgie, Universitätsklinikum Homburg/Saar**

**Direktor: Prof. Dr. med. T. Pohleman**

---

# **ERYTHROPOIETIN STIMULIERT DIE KNOCHENHEILUNG DER MAUS**

**DISSERTATION  
ZUR  
ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2012**

**vorgelegt von: Victor Speidel**

**geb. am: 05.01.1983 in Heidelberg**

Gewidmet  
Dr. Gertrude Heumann

## 1. Inhaltsverzeichnis

---

1.	Inhaltsverzeichnis .....	1
1.1.	Abkürzungsverzeichnis .....	4
2.	Zusammenfassung .....	7
2.1.	Deutsche Zusammenfassung.....	7
2.2.	Summary .....	8
3.	Einleitung .....	9
3.1.	Erythropoietin (EPO) und Erythropoiese .....	9
3.2.	Weiteres Vorkommen von EPO .....	9
3.3.	EPO und Angiogenese.....	10
3.4.	EPO und Gewebeprotektion.....	10
3.5.	Der EPO-Rezeptor (EPOR).....	11
3.6.	Biologie der Frakturheilung .....	12
3.6.1.	Direkte oder primäre kortikale Frakturheilung .....	12
3.6.2.	Indirekte oder sekundäre Frakturheilung.....	13
3.6.3.	Molekulare Aspekte der Frakturheilung.....	13
3.6.4.	Angiogenese und Frakturheilung .....	14
3.7.	EPO und Frakturheilung.....	14
3.8.	Fragestellung .....	15
4.	Material und Methoden .....	16
4.1.	Studieneinführung.....	16
4.1.1.	Tiere und Tierhaltung.....	17

## Inhaltsverzeichnis

4.1.2. Operationsvorbereitung .....	17
4.1.3. Behandlung mit EPO .....	18
4.1.4. Defektmodell und Pin-Clip Fixierung.....	18
4.1.5. Operationstechnik.....	19
4.1.6. Postoperatives Vorgehen.....	21
4.2. Auswertung.....	21
4.2.1. Hämatologische Analyse .....	21
4.2.2. Radiologische Analyse .....	22
4.2.3. Präparation der Knochen.....	23
4.2.4. Biomechanische Analyse.....	23
4.2.5. Histomorphometrische Analyse .....	25
4.2.6. Immunhistologische Analyse .....	27
4.2.7. Western-Blot-Analyse .....	28
4.2.8. Durchflusszytometrische Analyse .....	33
4.2.9. Statistische Auswertung .....	34
5. Ergebnisse.....	35
5.1. Hämatologische Analyse.....	35
5.2. Radiologische Analyse .....	36
5.2.1. Durchmesser des periostalen Kallus.....	36
5.2.2. Kallusdichte .....	37
5.2.3. Radiologisches Scoring .....	38
5.3. Biomechanische Analyse .....	39
5.3.1. Steifigkeit.....	39
5.4. Histomorphometrische Analyse.....	40

## Inhaltsverzeichnis

5.4.1. Heilungsrate .....	40
5.4.2. Größe des periostalen Kallus.....	40
5.4.3. Kalluszusammensetzung .....	42
5.5. Immunhistochemische Analyse.....	44
5.6. Western-Blot-Analyse .....	45
5.7. Durchflusszytometrische Analyse (FACS).....	46
6. Diskussion .....	47
6.1. Methoden .....	47
6.1.1. Anzahl der Tiere und Komplikationsrate .....	48
6.1.2. Modell.....	48
6.1.3. EPO-Dosierung .....	50
6.1.4. Radiologische, biomechanische und histologische Verfahren.....	50
6.2. Diskussion der Ergebnisse.....	54
6.2.1. Einfluss von EPO auf die Erythropoiese .....	54
6.2.2. Einfluss von EPO auf die Frakturheilung.....	55
6.2.3. Mechanismen der verbesserten Knochenheilung durch EPO .....	57
6.3. Zusammenfassung .....	59
6.4. Schlussfolgerung .....	60
7. Literaturverzeichnis.....	62
8. Publikationen und Danksagung.....	77
8.1. Kongressbeiträge und Publikationen.....	77
8.2. Danksagung.....	79
9. Lebenslauf .....	80

## 1.1. Abkürzungsverzeichnis

“	inch
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
ASBMR	American Society for Bone and Mineral Research
BMP	bone morphogenic protein
BSA	bovine serum albumin
ca.	zirka
CD	cluster of differentiation
CFU	colony forming unit
d	Tag
d.h.	das heißt
DAB	Diaminobenzidin
dl	Deziliter
EDTA	Ethyldiaminotetraessigsäure
EPC	endothelial progenitor cell
EPO	Erythropoietin
EPOR	Erythropoietin-Rezeptor
et al.	et alii
FACS	fluorescence-activated cell sorting
F <sub>c</sub>	fragment crystallizable region
FCS	fetal calf serum
FITC	fluorescein-Isothiocyanat
FP	FACS-Puffer
G	gauge
g	Gramm
GCSF	granulocyte colony-stimulating factor

## Abkürzungsverzeichnis

GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Gr.	Größe
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HPF	high power field
HRP	horseradish peroxidase
i.p.	intraperitoneal
Ig	Immunglobulin
IGF	insulin-like growth factor
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Stoffmengenkonzentration in Millimol/Liter
MW	Mittelwert
N	Newton
n.s.	nicht signifikant
NF $\kappa$ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
p.m.	post mortem
PBS	phosphate buffered saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31)
pH	potentia Hydrogenii
rhEPO	rekombinantes Humanes Erythropoietin
RT	Raumtemperatur
SEM	standard error of the mean; mittlerer Standardfehler
T	Temperatur
Tabl.	Tablette
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$

## Abkürzungsverzeichnis

TierSchG	Tierschutzgesetz
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
U	Einheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
VB	Vollblut
VEGF	vascular endothelial growth factor
w	Woche
βcR	β-common Rezeptor
s	Sekunde(n)

## 2. Zusammenfassung

---

### 2.1. Deutsche Zusammenfassung

Zusätzlich zu seiner klassischen Rolle in der Regulation der Erythropoiese konnten in der Erforschung des Erythropoetins (EPO) gewebeprotektive und regenerative Wirkungen in verschiedenen nicht-hämatopoietischen Geweben nachgewiesen werden. Es ist jedoch nur wenig über die potentiellen Effekte auf die Knochenheilung bekannt. Zur Untersuchung der Frakturheilung in einem Mausmodell wurden femorale Osteotomien mit einem Defekt von 0.25mm mittels pin-clip Osteosynthese stabilisiert. Die Versuchstiere wurden mit 500U EPO/kg KG täglich oder mit Kochsalzlösung intraperitoneal behandelt. Die Frakturheilung wurde nach 2 und 5 Wochen biomechanisch, radiologisch und histologisch beurteilt. Die Expression von PCNA und NfkB wurde durch Western Blot-Analysen untersucht. Die Vaskularisation wurde durch immunhistochemische Färbung von PECAM-1 ermittelt. Zirkulierende endotheliale Progenitorzellen wurden mittels Durchflusszytometrie gemessen.

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass EPO die Knochenheilung kleiner segmentaler Defekte bei Mäusen signifikant beschleunigt. Dies zeigt sich in einer signifikant erhöhten biomechanischen Steifigkeit und höherer radiologischer Kallusdichte, 2 und 5 Wochen nach Fraktur und Stabilisierung. Histologisch konnte ein erhöhter Knochenanteil sowie ein verringelter Anteil an Knorpel und Bindegewebe im periostalen Kallus nachgewiesen werden. Die endostale Vaskularisation war deutlich gesteigert. Des Weiteren war die Anzahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen unter EPO-Therapie signifikant erhöht. Die hier gezeigte Verbesserung der Frakturheilung bei Tieren, welche mit EPO behandelt wurden, könnte einen neuen Therapieansatz für Frakturen mit verzögter Heilung und Pseudarthrosebildung darstellen.

## 2.2. Summary

Beyond its classical role in regulation of erythropoiesis, erythropoietin (EPO) has been shown to exert protective and regenerative actions in a variety of non-hematopoietic tissues. However, little is known about potential actions in bone regeneration. To analyze fracture healing in mice, a femoral 0.25mm osteotomy gap was stabilized with a pin-clip technique. Animals were treated with 500U EPO/kg bw per day or with vehicle only. After 2 and 5 weeks, fracture healing was analyzed biomechanically, radiologically and histologically. Expression of PCNA and NfkB was analyzed by Western blot analysis. Vascularization was analyzed by immunhistochemical staining against PECAM-1. Circulating endothelial progenitor cells were measured by flow-cytometry. Herein, we demonstrate that EPO-treatment significantly accelerates bone healing in small segmental defects in mice. This is indicated by a significantly greater biomechanical stiffness and a higher radiological density of the periosteal callus 2 and 5 weeks after fracture and stabilization. Histological analysis demonstrated significantly more bone and less cartilage and fibrous tissue in the periosteal callus. Endosteal vascularization was significantly increased in EPO-treated animals when compared to controls. The number of circulating endothelial progenitor cells was significantly greater in EPO-treated animals. The herein shown acceleration of healing by EPO may represent a promising novel treatment strategy for fractures with delayed healing and non-union formation.

### 3. Einleitung

---

#### 3.1. Erythropoietin (EPO) und Erythropoiese

EPO ist ein aus 165 Aminosäuren bestehendes Glykoproteinhormon mit einer Molekülmasse von 35 kDa. Beim erwachsenen Menschen sind peritubuläre fibroblastenartige Zellen der Nierenrinde der Hauptsyntheseort von EPO, während es im fötalen Organismus überwiegend von Hepatozyten gebildet wird (JELKMANN, 2004). Eine wichtige Rolle für die Genexpression von EPO spielt der Transskriptionsfaktor HIF (Hypoxie-induzierbarer Faktor). HIF-2α wird überwiegend in Lunge, Gehirn sowie Gefäßendothel exprimiert und durch Hypoxie in diesen Geweben stabilisiert (GRUBER et al., 2007). Ein O<sub>2</sub>-Mangel führt somit durch eine Erhöhung von HIF zu einer gesteigerten EPO-Synthese (GOLDBERG et al., 1988). Neben dem endogenen EPO existiert das künstlich hergestellte rhEPO (rekombinantes humanes EPO). Letzteres spielt als medizinisches Therapeutikum bei Störungen der Erythropoiese und Anämien anderer Genese eine wichtige Rolle. EPO verhindert die Apoptose der erythrozytären Vorläuferzellen im Knochenmark und regt diese zu Proliferation und Differenzierung an. Somit ist es das wichtigste Signalmolekül für die Erythropoiese.

#### 3.2. Weiteres Vorkommen von EPO

Eine Expression von EPO wurde auch in anderen Geweben nachgewiesen, unter anderem in Makrophagen (VOGT et al., 1989), Astrozyten (MARTI et al., 1996), Plazenta (CONRAD et al., 1996), Neuronen (BERNAUDIN et al., 1999), Uterus (MASUDA et al., 2000), Sertoli-Zellen (MAGNANTI et al., 2001), Brustdrüsen und Muttermilch (SEMBA et al., 2002; WALKER, 2010). Über die Rolle von EPO in diesen Geweben ist noch wenig bekannt.

### **3.3. EPO und Angiogenese**

Es ist bekannt, dass angiogenetische Faktoren wie GM-CSF eine hämatopoetische Wirkung besitzen und hämatopoetische Faktoren im Gegenzug Gefäßendothelzellen zu Proliferation und Differenzierung anregen (BIKFALVI et al., 1994). Vascular endothelial growth factor (VEGF) gehört zu den wichtigsten Modulatoren der Gefäßbildung und reguliert Vaskulogenese, Angiogenese und Gefäßerhalt während der Embryogenese sowie im adulten Organismus (YLAHERTTUALA et al., 2007; ARCASOY, 2008). Darüber hinaus beeinflusst VEGF Neurogenese und Neuroprotektion (GREENBERG et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass EPO ähnliche angiogenetische Eigenschaften aufweist wie VEGF (JAQUET et al., 2002). Inwieweit EPO im adulten Organismus für die Angiogenese benötigt wird, ist noch unzureichend erforscht.

### **3.4. EPO und Gewebeprotektion**

Neben der hämatopoetischen und angiogenetischen Wirkung besitzt EPO auch gewebeprotektive Eigenschaften. So verhindert EPO Ischämie-Reperfusionsschäden in Haut (BUEMI et al., 2004), Niere (CHATTERJEE, 2005), Leber (SCHMEDING et al., 2007), Skelettmuskel (CONTALDO et al., 2007), Herz (RIKSEN et al., 2008) sowie peripherem (TOTH et al., 2008) und zentralem Nervensystem (VAN DER KOOIJ et al., 2008; YUEN et al., 2010). Unter anderem konnte eine antiinflammatorische Wirkung von EPO (VILLA et al., 2003) und eine Verminderung der Nekroserate nachgewiesen werden (HARDER et al., 2009).

Auch Geweberegeneration wird in zahlreichen Organen positiv durch EPO beeinflusst (GHEZZI et al., 2004; JOYEUX-FAURE et al., 2005; ROTTER et al., 2008). Eine mögliche Rolle spielt dabei die verstärkte Expression endothelialer Stickstoffmonoxid-Synthasen unter dem Einfluss von EPO, die zu einer verbesserten Kapillarperfusion führen (REZAEIAN et al., 2010) und eine kritische Rolle für die Mobilisierung von EPC spielen (SANTHANAM et al., 2008). Angiogenetische Eigenschaften von EPO könnten hier bei der Geweberegeneration eine wichtige Rolle spielen.

### 3.5. Der EPO-Rezeptor (EPOR)

Sowohl endogenes EPO als auch rhEPO binden an den EPO-Rezeptor (EPOR). Der für die Erythropoiese wichtigste Expressionsort des EPOR ist das Knochenmark. Der EPOR wurde aber auch in Organen und Geweben nachgewiesen, die nicht an der Erythropoiese beteiligt sind, beispielsweise in Gefäßendothel (ANAGNOSTOU et al., 1994), glatten Muskelzellen (AMMARGUELLAT et al., 1996), Gehirn (LIU et al., 1997), Herz (WU et al., 1999), Nieren (WESTENFELDER et al., 1999) und Myoblasten (OGILVIE et al., 2000). Die biologische Wirkung von EPO kann auch über die Anzahl der an der Zelloberfläche vorhandenen EPOR reguliert werden. Große intrazelluläre Reserven von EPOR erlauben die Anpassung an den basalen oder akuten hämatopoetischen Bedarf (BECKER et al., 2010).

Untersuchungen zeigten eine funktionelle Interaktion des EPOR mit dem β-common Rezeptor (βcR), auch bekannt als CD131 (JUBINSKY et al., 1997). Der βcR ist eine gemeinsame signaltransduzierende Komponente der Rezeptoren für GCSF, IL-3 und IL-5 (D'ANDREA et al., 2000). Mäuse, denen das entsprechende Gen für den βcR fehlt, zeigten jedoch keine Beeinträchtigung der hämatopoetischen Wirkung von EPO (SCOTT et al., 2000). In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die gewebeprotektiven Effekte von EPO über einen aus EPOR und βcR zusammengesetzten Heterodimerrezeptor vermittelt werden (BRINES et al., 2004). Dieser Heterodimerrezeptor wird direkt nach einem Gewebeschaden verstärkt exprimiert, noch bevor es zu einer gesteigerten EPO-Produktion kommt (BRINES et al., 2011). Einzelne künstlich gewonnene Peptide des Glykoproteins EPO, die dessen Tertiärstruktur simulieren, vermitteln über diesen Heterorezeptor gewebeprotektive Effekte, ohne eine hämatopoetische Wirkung zu entfalten (BRINES et al., 2008; PANKRATOVA et al., 2010).

### **3.6. Biologie der Frakturheilung**

Frakturheilung ist ein Prozess, der durch eine Folge komplexer intra- wie extrazellulärer Vorgänge reguliert wird. Die Abläufe folgen dabei bestimmten zeitlichen und räumlichen Mustern (CHO et al., 2002). Molekulare Mechanismen, die bereits in der embryologischen Entwicklung die Entstehung des Skeletts beeinflussen, wiederholen sich bei der Knochenheilung (FERGUSON et al., 1999; ROSEN, 2006). Die vier Gewebearten, die an der Frakturstelle vorhanden sind und den Heilungsprozess maßgeblich bestimmen, sind das Knochengewebe selbst, das Periost, das Knochenmark sowie das umgebende Weichteilgewebe. Hinzu kommen multiple Einflüsse wie Wachstumsfaktoren, Hormone, Nährstoffe, pH, Sauerstoffangebot, elektrische Umgebung und mechanische Stabilität (CARTER et al., 1996).

#### **3.6.1. Direkte oder primäre kortikale Frakturheilung**

Direkte oder primäre kortikale Frakturheilung findet nur statt, wenn eine anatomische Reduktion der Frakturfragmente stattgefunden hat, d.h. die Frakturflächen anatomisch korrekt aneinander liegen. Des Weiteren erfordert sie eine rigide mechanische Fixierung, damit sich die Fragmente möglichst wenig gegeneinander verschieben. Ausgehend von den Havers-Kanälen, die in der Mitte des Osteons verlaufen und Gefäße sowie Nervenfasern enthalten, durchwachsen Osteoblasten den Frakturspalt und stellen so direkt die Integrität des verletzten Knochens wieder her. (MCKIBBIN, 1978). Es wird daher davon ausgegangen, dass eine direkte Frakturheilung nur bei höheren Säugetieren möglich ist, da nur diese über Havers-Kanäle verfügen (HORNER et al., 1997). Im Gegensatz zu Kaninchen besitzen Ratten und Mäuse kein Havers-System. Während der direkten Frakturheilung ist wenig oder keine Periostreaktion und somit auch keine Kallusbildung nachweisbar (EINHORN, 1998).

### **3.6.2. Indirekte oder sekundäre Frakturheilung**

Der Großteil aller Frakturen heilt durch indirekte Frakturheilung. Dies beinhaltet eine Kombination aus intramembranöser und endochondraler Ossifikation mit Kallusbildung (EINHORN, 1998). Diese Art der Frakturheilung wird im Allgemeinen durch interfragmentäre Bewegung gefördert (MCKIBBIN, 1978).

Intramembranöse Ossifikation bedeutet die direkte Bildung von Knochen ohne vorausgehende Knorpelbildung. Das Knochengewebe wird dabei von Osteoprogenitorzellen und mesenchymalen Stammzellen gebildet, die dem intakten Periost nahe der Frakturstelle entstammen (MALIZOS et al., 2005).

Endochondrale Ossifikation bedingt die Rekrutierung, Proliferation und Differenzierung von undifferenzierten Mesenchymzellen zu Knorpel. Die hypertrophen Chondrozyten gehen nach ihrer terminalen Ausdifferenzierung in Apoptose (MICLAU et al., 2000). Das Knorpelgewebe kalzifiziert zunächst und wird schließlich durch Knochen ersetzt (DIMITROU et al., 2005). Dabei können sechs einzelne Phasen unterschieden werden: Die initiale Phase der Hämatombildung und Entzündung, die darauf folgende Angiogenese und Knorpelbildung, Kalzifizierung des Knorpels, Rückgang des Knorpelgewebes, Knochenbildung und schließlich Remodellierung des Knochens. Zu diesem Heilungsprozess tragen das Periost nahe der Frakturstelle sowie das umgebende Weichteilgewebe bei.

### **3.6.3. Molekulare Aspekte der Frakturheilung**

Für die Frakturheilung wichtige Signalmoleküle sind pro-inflammatorische Zytokine, transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und andere Wachstumsfaktoren sowie Angiogenesefaktoren (GERSTENFELD et al., 2003). Pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) spielen eine besondere Rolle für die Initiierung der Reparaturkaskade. Sie werden von Makrophagen und Zellen des Periost sezerniert und üben einen chemotaktischen Effekt auf andere Entzündungszellen aus. Des Weiteren stimulieren sie die Angiogenese und Synthese der extrazellulären Matrix (KON et al., 2001). Zur TGF- $\beta$ -Superfamilie zählen auch bone morphogenic proteins (BMP), die die Differenzierung

mesenchymaler Zellen zu Osteoblasten und Chondroblasten anregen (ROSEN, 2006). Sie zeigen ebenfalls chemotaktische und angiogenetische Wirkungen (REDDI, 2001; PENG et al., 2002) und stimulieren die Synthese und Sekretion von insulin-like growth factor (IGF) und VEGF (DECKERS et al., 2002), welche für die weitere Frakturheilung ebenfalls eine wichtige Rolle spielen.

### **3.6.4. Angiogenese und Frakturheilung**

Eine adäquate Vaskularisierung ist für eine erfolgreiche Frakturheilung unerlässlich. Während der endochondralen Ossifikation und dem anschließenden Remodelling bauen spezifische Metalloproteininasen Knorpel und Knochen ab und erlauben so das Einsprießen von Blutgefäßen (GERSTENFELD et al., 2003). Es wird davon ausgegangen, dass zwei unterschiedliche Systeme die Angiogenese bestimmen, die beide im Zuge der Frakturheilung aktiviert werden. Zum einen ist VEGF grundlegend für die Neoangiogenese (FERRARA et al., 1997), zum anderen beeinflusst Angiopoietin das Wachstum größerer Gefäße und die Ausbildung von Kollateralgefäßen (GERSTENFELD et al., 2003).

In verschiedenen Studien konnte die Rolle von VEGF als essentiellem Mediator von Angiogenese und enchondraler Ossifikation gezeigt werden (GEIGER et al., 2005; DAI et al., 2007).

### **3.7. EPO und Frakturheilung**

Da bekannt ist, dass EPO eine ähnliche Struktur und ein vergleichbares angiogenetisches Potential wie VEGF aufweist (JAQUET et al., 2002), liegt die Vermutung nahe, dass auch EPO sich, ähnlich wie VEGF selbst, positiv auf die Frakturheilung auswirkt. Zudem führt EPO zu einer Mobilisierung von endothelialen Progenitorzellen (EPC) aus dem Knochenmark (HEESCHEN et al., 2003), welche die Frakturheilung positiv beeinflussen können (MATSUMOTO et al., 2008a). HIF-1 $\alpha$ , ein entscheidender Transkriptionsfaktor von EPO und VEGF, spielt ebenfalls eine positive Rolle bei Knochenentstehung und -regeneration (WAN et al., 2010).

Tatsächlich wiesen Ratten, die nach einer offenen Osteotomie der Tibia eine Woche lang 200U/kg/d EPO i.p. erhielten, eine verbesserte Knochenheilung auf (BOZLAR et al., 2006). Dies wurde anhand radiologischer und biomechanischer Parameter gemessen.

Mäuse, die in einem geschlossenen Frakturmodell des Femurs über sechs Tage 5000U/kg/d rhEPO i.p. erhielten, zeigten eine gesteigerte enchondrale Ossifikation nach 2 Wochen, diese konnte jedoch 5 Wochen postoperativ nicht mehr nachgewiesen werden (HOLSTEIN et al., 2007). Obwohl Holstein et al. die EPO-Gabe auf 6 Tage beschränkten, konnten sie zeigen, dass der EPOR noch nach 2 Wochen in periostalem Kallus exprimiert wird. Darum erscheint im Gegensatz zu bisherigen Studien, eine langfristige Therapie mit EPO zur Verbesserung der Frakturheilung sinnvoll.

### 3.8. Fragestellung

Während einige Studien darauf hinweisen, dass EPO positive Effekte auf die normale Frakturheilung hat, ist noch nicht bekannt, ob EPO eine verzögerte Frakturheilung positiv beeinflussen und beschleunigen kann. Dies ist von besonderem Interesse, da es bei 5–10% aller Frakturen immer noch zu einer verzögerten Heilung oder Pseudarthrosebildung kommt (GAJDOBRANSKI et al., 2003).

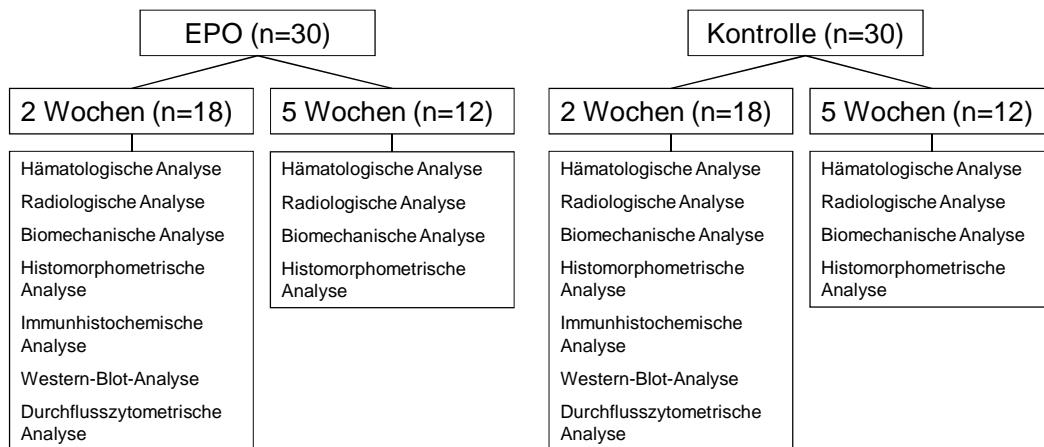
In der klinischen Anwendung zur Therapie einer Anämie werden derzeit niedrigere Dosen empfohlen, als sie in vergangenen Tierstudien zur Behandlung von Frakturen verwendet wurden (BOKEMEYER et al., 2007; JURADO GARCIA et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit soll darum die Wirkung von niedriger dosiertem EPO über einen längeren Zeitraum auf die Regeneration von Frakturen mit verzögter Heilung untersucht werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Studienaufbau

Insgesamt wurden in der Studie 60 Tiere untersucht. Eine Gruppe erhielt ab dem Tag vor der Osteotomie 500U/kg/d EPO in 2ml NaCl-Lösung in Form einer i.p. Injektion, die andere Gruppe diente als Kontrolle und erhielt nur 2ml NaCl-Lösung ohne EPO. Die Hälfte der Tiere wurde 2 Wochen postoperativ getötet und untersucht, die andere Hälfte nach 5 Wochen [Tab. 1].

Nach Ablauf der Versuchsdauer wurden die Tiere durch eine Überdosis Narkosemittel getötet. Das osteotomierte Femur wurde geröntgt, dem Tier wurde 1ml Blut aus der Vena cava inferior entnommen und beide Femora entnommen. Insgesamt wurden 66 Tiere operiert. 6 wurden jedoch nicht in die Studie eingeschlossen: 2 Tiere verstarben während oder kurz nach der Operation, 2 Tiere während des Beobachtungszeitraumes, ein Knochen wurde während der Präparation zerstört und ein Tier wurde wegen einer Infektion im Bereich des Kallus von der Studie ausgeschlossen.



Tab. 1: Gruppeneinteilung der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden nach Therapie und Untersuchungszeitpunkt in vier Untergruppen eingeteilt.

#### **4.1.1. Tiere und Tierhaltung**

Für die in-vivo-Experimente wurden ausgewachsene CD-1 Mäuse mit einem Körpergewicht von  $35\pm5$ g verwendet. Die Tierhaltung erfolgte im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes unter klimatisierten Raumbedingungen (Lufttemperatur: 22–24°C, relative Luftfeuchtigkeit ca. 60%) bei zwölfstündigem Tag-Nacht-Rhythmus. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen gehalten und erhielten Standarddiätfutter in Pelletform (Altromin 1320, Altromin, Lage, Deutschland) sowie Wasser ad libitum.

Alle Tierversuche wurden nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes nach Begutachtung durch die zuständige Tierschutzbeauftragte und Genehmigung der Kreispolizeibehörde durchgeführt (Ausnahmegenehmigung nach § 9 Abs. 1 Satz 2 TierSchG).

#### **4.1.2. Operationsvorbereitung**

Nach Bestimmung des Gewichts mit einer elektronischen Waage (TCM®, Hamburg, Deutschland) wurden die Tiere mittels intraperitonealer Injektion narkotisiert. Hierzu wurde ein Gemisch aus Ketamin (Ketanest®, Pfizer, New York, USA; 75mg/kg), Xylazin (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Deutschland; 25mg/kg) und NaCl-Lösung (Ecotainer® NaCl 0,9%, B. Braun Melsungen, Deutschland) injiziert. Die Arzneimittel wurden dabei so verdünnt, dass die Dosierung 0,1ml Narkosemischung pro Gramm Körpergewicht betrug.

Die Tiere wurden mit Zeigefinger und Daumen der einen Hand im Nackenbereich fixiert, der Schwanz des Tieres wurde zwischen Ringfinger oder kleinem Finger und Hypothenar festgehalten. So waren die Tiere gut fixiert und die Injektion der Narkoselösung konnte mit der anderen Hand einfach durchgeführt werden. Die Injektionsstelle befand sich im Bereich des Unterbauchs der Tiere, ca. 5mm kranial des Beckens. Durch Kopftieflage der Mäuse bei Injektion konnte der Darm nach kranial verlagert werden und so eine versehentliche Darmperforation verhindert werden. 2 bis 5 Minuten nach Injektion des Anästhetikums bewegten sich die Mäuse nicht mehr und zeigten keine Reaktion auf Schmerzreize. Die Narkosedauer betrug

in der Regel ungefähr 30–45 Minuten. Kündigte sich während der Operation ein Erwachen des Tieres an, wurde in kleinen Dosen von 0,05–0,1ml Injektionslösung nachdosiert.

Nach Narkotisierung der Tiere wurden zunächst die Augen der Mäuse durch Augencreme (Bepanthen Augen- und Nasensalbe®, Roche, Basel, Schweiz) bedeckt, um sie so vor Austrocknung zu schützen. Anschließend wurde das Fell der rechten Hinterbeine von der Behaarung befreit. Zuerst wurde ein elektrischer Kurzhaartrimmer verwendet, mit dem ein Großteil der Behaarung entfernt werden konnte. Danach wurden die Hinterbeine mit einem Einwegrasierer nass rasiert, bevor schließlich eine Enthaarungscreme (elcamed® Creme, ASID BONZ GmbH, Herrenberg, Deutschland) aufgetragen wurde, die nach einer Einwirkzeit von 3 Minuten mit warmem Wasser abgespült wurde und so die letzten Haare entfernte. Nach anschließender Reinigung des rechten Hinterbeines mit NaCl-Spüllösung wurde präoperativ Schmerzmittel verabreicht. 0,05ml einer Injektionslösung aus Carprofen (Rimadyl® Injektionslösung 50mg/ml, Pfizer, New York, USA) und NaCl-Lösung wurden subcutan in eine Nackenfalte injiziert. Hierfür wurden Rimadyl und NaCl im Verhältnis 1:10 gemischt.

#### **4.1.3. Behandlung mit EPO**

Mit der täglichen Injektion von EPO (NeoRecormon®, Roche) in NaCl-Lösung bzw. der reinen NaCl-Lösung wurde bereits am Vortag der Operation begonnen. Dabei wurden 2ml Lösung wie bereits beschrieben i.p. injiziert. Die Behandlung wurde bis zur Tötung der Tiere fortgeführt. Die in der Studienplanung festgelegte Tagesdosis EPO betrug 500U/kg. Da alle Tiere ein Gewicht von  $35\pm 5$ g aufwiesen, wurde die Tagesdosis aus Gründen der Durchführbarkeit für alle Tiere auf 17,5U festgesetzt (entsprechend 500U/kg/d bei 35g).

#### **4.1.4. Defektmodell und Pin-Clip Fixierung**

Das verwendete Modell beinhaltet einen Defekt der femoralen Diaphyse mit einer Breite von 0,25mm. Die Stabilisierung des Femurs erfolgt nach dem Pin-Clip Prinzip

(GARCIA et al., 2008a; GARCIA et al., 2008b). Dabei wird ein Marknagel (Pin) in den Markraum des Femurs eingebracht und in der proximalen Spongiosa verankert, um eine Flexionsstabilität zu erreichen. Um eine Rotationsstabilität zu gewährleisten und ein Auseinanderweichen der Fragmente zu verhindern, wird das Femur zusätzlich mit einer Klammer (Clip) fixiert. Die beiden Schenkel der Klammer werden dabei in Bohrlöcher proximal und distal des Defektes eingeführt, die orthogonal zur Längsachse des Knochens am Pin vorbei gebohrt werden. Ein Abknicken der Klammerschenkel verhindert anschließend die Dislokation der Klammer.

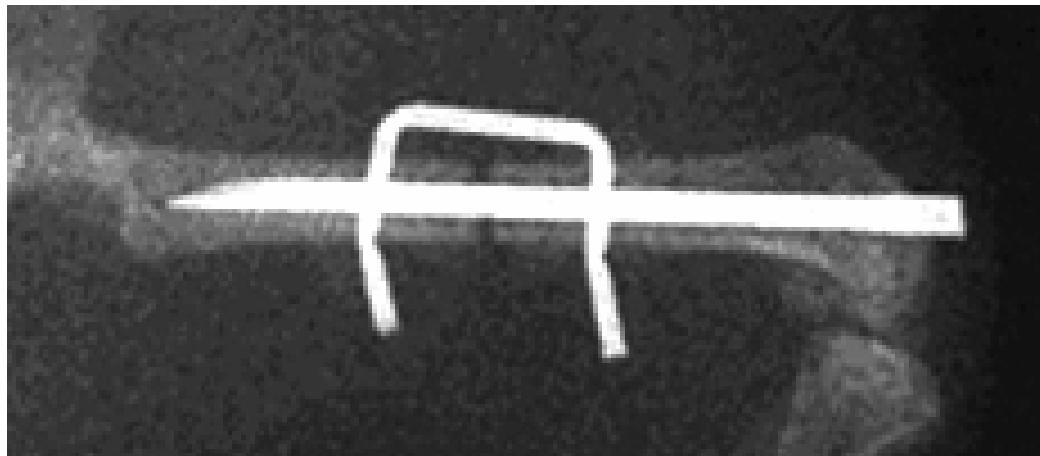


Abb. 1: Postoperatives Röntgenbild

Die Abbildung illustriert die Fixierung mittels Pin-Clip-Verfahren. Der Pin wird dabei von distal (rechts) in den Markraum eingebracht und mit der Spitze proximal (links) in der Spongiosa verankert.

#### 4.1.5. Operationstechnik

Der Operationsbereich wurde mit OP-Tüchern ausgelegt. Tupfer und Wattestäbchen (Funk&Walter GmbH, Merchtweiler, Deutschland), antiseptische Lösung (Braunol®, B. Braun) sowie NaCl-Spülösung (Ecotainer®NaCl 0,9% B. Braun) zur häufigen Spülung des OP-Situs wurden verwendet.

Das Instrumentarium bestand aus einem feinen Nadelhalter und Pinzette, des Weiteren einem Skalpell (Cutfix Einmalskalpell #15, B. Braun), einer Schere, einer

gebogenen Klemme sowie einer gebogenen Pinzette. Außerdem wurden ein Seitenschneider sowie eine Gigli-Drahtsäge von 0,2mm Durchmesser (AO Developement Institute, Davos, Schweiz) verwendet. Hinzu kamen ein elektrisch betriebener Fräsböhrer (Proxxon®, Proxxon GmbH, Föhren, Deutschland) sowie Nahtmaterial (Seide, 6-0).

Auch wurden Kanülen verschiedenen Durchmessers (Sterican® Gr. 17 - G 24 x 1" / Ø 0,55 x 25mm – lila, Sterican® Gr. 20 - G 27 x 3/4" / Ø 0,40 x 20mm – grau, B. Braun) zur Operation verwendet. Alle eingesetzten Instrumente und Materialien wurden vor Operationsbeginn mit alkoholischer Desinfektionslösung (Softasept® N, B. Braun) desinfiziert. Bei der Operation wurden unsterile Handschuhe (Peha-soft® Powderfree, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland) sowie OP-Oberbekleidung getragen.

Nach gründlicher Desinfektion des Beines wurde die Patella durch eine mediale, ca. 4mm lange Inzision der Haut mit dem Skalpell freigelegt. Anschließend wurde die Patella mit Hilfe einer kleinen Inzision (2-3mm) der medialen Anteile des Ligamentum patellae nach lateral luxiert und das Bein angewinkelt. Hierdurch wurde die Fossa intercondylaris femoris freigelegt.

Mit einem Spiralbohrkopf von 0,5mm Durchmesser wurde ein Loch in die Kortikalis der Facies patellaris gebohrt, mit Bohrrichtung in der femoralen Longitudinalachse. Eine Kanüle (G 24), zuvor am hinteren Ende mittels einer Zange abgeflacht, wurde durch das Bohrloch in den Markraum eingeführt und durch leichten Druck mit der Spitze in der proximalen Kortikalis verankert, wobei sich der abgeflachte Teil senkrecht zwischen den Kondylen verkeilte. Der überstehende Teil der Kanüle wurde mit einem Seitenschneider abgeschnitten, die Patella in Extension des Beines vor die Facies patellaris verlagert und das Ligamentum patellae locker mit dem Ligamentum collaterale mediale durch eine Einzelknopfnaht vernäht, um eine spätere Luxation zu verhindern. Anschließend wurde die Haut durch eine fortlaufende Naht verschlossen.

Im nächsten Schritt erfolgte ein lateraler Zugang zum Femur. Die Haut wurde dabei mit dem Skalpell auf einer Länge von ca. 2cm über der Diaphyse in Richtung der Femurlängsachse inzisiert. Anschließend wurde die Faszie vorsichtig geöffnet und das Femur intermuskulär freipräpariert. Mit Hilfe des bereits verwendeten

Spiralbohrkopfes wurden orthogonal zur Femurlängsachse proximal und distal des Defektes zwei Löcher mit einem Abstand von etwa 5mm am Marknagel vorbei durch das Femur gebohrt. Die Klammer, die aus einer entsprechend verformten Kanüle (G 27) bestand, wurde durch die Löcher geführt und an den Enden mit dem Seitenschneider umgeknickt, um eine späteres Herausrutschen zu vermeiden. Das Femur wurde darauf hin in der Schaftmitte mittels der Gigli-Drahtsäge um den Marknagel herum durchgesägt, wobei ein Defekt von 0,25mm entstand. Eine Dislokation der Fragmente wurde dabei durch das bereits *in situ* befindliche Osteosynthesematerial verhindert. Anschließend wurden erst Muskeln, dann Haut mit fortlaufenden Nähten verschlossen.

#### **4.1.6. Postoperatives Vorgehen**

Nach Beendigung der Operation wurden die Tiere in einen Einzelkäfig gelegt und mit einer Infrarotlampe bestrahlt um ein Auskühlen zu verhindern.

Erst nachdem die Tiere unter Infrarotbestrahlung wieder erwacht waren, wurden sie vom OP-Bereich in den Quarantänebereich des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes transportiert. Die operierten Beine konnten sofort nach der Operation voll belastet werden.

Nach 24 und 48h wurden den operierten Mäusen jeweils 0,05ml einer Injektionslösung mit Rimadyl s.c. zur Analgesierung in die Nackenfalte injiziert. Die Operationsnarbe sowie der Allgemeinzustand der Tiere wurden täglich überprüft.

### **4.2. Auswertung**

#### **4.2.1. Hämatologische Analyse**

Nach Ablauf des gruppenspezifischen Analysezeitraums wurden die Tiere durch eine Überdosis Narkosemittel getötet. Den Tieren wurde zuvor aus der freipräparierten Vena cava inferior Blut zur weiteren Analyse entnommen. Dies geschah mit Hilfe einer Kanüle (Sterican® Gr. 17 – G 24 x 1" / Ø 0,55 x 25mm – lila, B. Braun) und einer heparinisierten Spritze (Omnifix® 100 SOLO 1ml Insulinspritze,

B. Braun). Die Blutproben wurden sofort im Anschluss durch ein Hämatologiesystem analysiert (COULTER® AcT diff™, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). Das Blut wurde dabei auf Erythrozytenzahl [ $\times 10^6/\mu\text{l}$ ], Hämoglobinkonzentration [g/dl] und Hämatokrit [%] untersucht.

#### **4.2.2. Radiologische Analyse**

Nach Ablauf der Beobachtungsdauer von zwei bzw. fünf Wochen wurden die Tiere mit der bereits verwendeten Narkosemischung betäubt und geröntgt. Aufgenommen wurden dabei die osteotomierten Femora in ventro-dorsalem Strahlengang (Aufnahmespannung 60kV multipuls, Belichtungszeit 0,1s) mit einem zahnärztlichen Intraoralröntgengerät (Heliodent DS®, Sirona Dental Systems GmbH, Bensheim, Deutschland). Die Aufnahmen wurden nach der Entwicklung zur weiteren Auswertung digitalisiert.

Die Auswertung der Röntgenaufnahmen nach Ablauf des jeweiligen Analysezeitraums beruhte auf einem vor Beginn der Studie festgelegten Auswertungsbogen. Hierbei wurden verschiedene Parameter des Knochens im Frakturbereich bewertet:

1. Kallusdurchmesser
2. Femurdurchmesser
3. Knochendichte (KD) des dorsalen Kallus (bei ausbleibender Kallusbildung, Dichte des Frakturpalts)
4. Knochendichte der Spongiosa im Bereich des Tibiakopfes
5. Vergabe eines Punktwertes für die Frakturheilung nach Goldberg (GOLDBERG et al., 1985)

Die Auswertung der Röntgenaufnahmen erfolgte unter Verwendung des Grafikanalyseprogramms Image J (ImageJ Analysis System, National Institutes of Health, Bethesda, USA).

Der Kallusdurchmesser wurde in Relation zum Feumurdurchmesser angegeben, die Dichte des Kallus in Relation zur Spongiosadichte des Tibiakopfes. Für Fälle, in

denen sich kein Kallus bildete, wurde für den Quotienten aus Kallusdurchmesser und Femurdurchmesser ein Wert von 1 festgelegt.

Die Bestimmung eines Punktewertes für die Heilung des Knochens im Röntgenbild beruhte auf der subjektiven Einschätzung des Auswerters nach einem etablierten Schema: 0 = keine Heilung, 1 = mögliche Heilung, 2 = knöcherne Heilung (GOLDBERG et al., 1985).

#### **4.2.3. Präparation der Knochen**

Unmittelbar nach dem Tod der Tiere wurden beide Femora zur weiteren Analyse entnommen. Hierzu wurden die Femora im Hüftgelenk sowie im Kniegelenk exartikuliert und aus den Kadavern entfernt. Bei vorsichtigem Vorgehen unter Bewahrung der Integrität des Frakturbereichs wurden die umgebenden Weichteilreste vorsichtig reseziert.

Nach Abschluss der Präparation wurde zunächst die Klammer durchtrennt und aus dem Knochen entfernt, anschließend der Pin mit einer Zange aus dem distalen Femur gezogen.

Zur Durchführung der Western-Blot-Analyse wurde das Gewebe des Kallus entnommen, in Plastiktüten in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt. Die übrigen Knochen wurden der biomechanischen Analyse zugeführt.

#### **4.2.4. Biomechanische Analyse**

Nach Ausbau und Präparation der rechten sowie der linken Oberschenkelknochen wurden diese direkt anschließend biomechanisch untersucht. Vor Beginn der Testung wurden die Bestandteile des Marknagels und der Klammer sorgfältig entfernt, ohne die Strukturen des Knochens in der Frakturzone zu beschädigen.

Jedes Femur (rechtes und linkes) wurde einem 3-Punkt-Biegungstest unterzogen. Diese Untersuchung wurde mittels einer Materialtestungsmaschine (Zwick, Ulm/Deutschland) durchgeführt.

Die Knochen wurden hierzu auf eine Unterlage der Maschine platziert, die zentral eine Lücke von 6mm aufwies. Die Femora wurden so auf der Unterlage angebracht, dass sich der mittig diaphysär gelegene Frakturbereich genau in der Mitte dieser Lücke befand.

Auf diese Stelle wurde dann von oben mittels eines in vertikaler Richtung beweglichen Stempels eine Kraft auf die Knochen ausgeübt [Abb. 2].

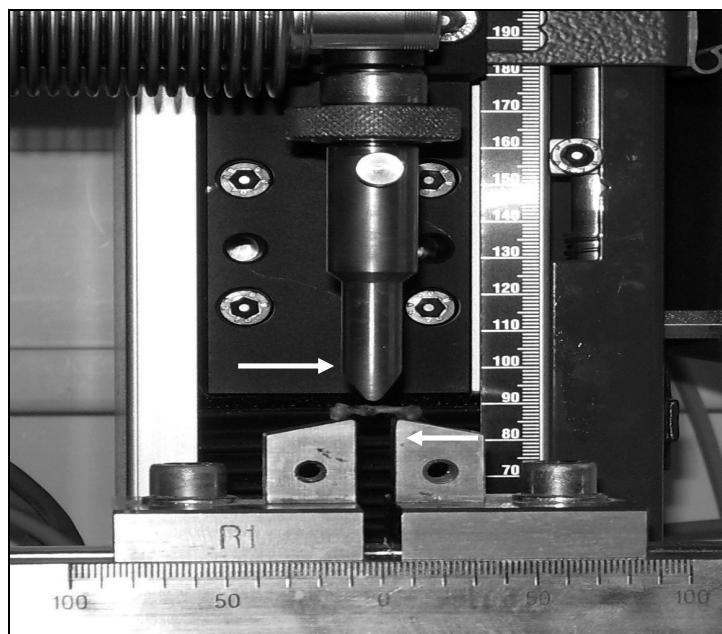


Abb. 2: 3-Punkt-Biegungstest

Darstellung der Testmaschine. Der linke Pfeil zeigt auf den Kraftstempel. Der rechte Pfeil deutet auf die Lücke der Auflage, die vom Femurknochen überbrückt wird.

Der Kraftstempel senkte sich mit einer Geschwindigkeit von 1mm/s auf den Knochen ab, wobei er an der vorderen Femuroberfläche ansetzte, so dass die hintere Femuroberfläche unter Spannung geriet.

Das Testungsgerät registrierte hierbei die für die Verformung der Knochen aufzuwendende Kraft.

Während der gesamten Zeit zwischen Ausbau und Testung wurden die Knochen mit NaCl-Spülösung feucht gehalten, um eine mögliche Verfälschung der Werte durch Austrocknung der Knochen zu verhindern.

Die Messung erfolgte zerstörungsfrei unter Bestimmung der Steifigkeit. Diese wurde definiert als die erste lineare Steigung auf der ermittelten Kraft-Deformationskurve. Die Messung wurde nach erreichen eines linearen Verlaufs der Kurve abgebrochen. Die Steifigkeit jedes Knochenpaars wurde auf diese Weise bestimmt. Anschließend wurde für jedes Paar der Wert für den rechten Oberschenkel in Verhältnis zum Steifigkeitswert des linken Oberschenkels gesetzt, um so den interindividuellen Unterschieden der Knochensteifigkeit gerecht zu werden.

#### **4.2.5. Histomorphometrische Analyse**

Zur histologischen Untersuchung wurden die rechten Oberschenkelknochen aller Tiere unmittelbar nach der mechanischen Knochentestung zunächst für 24 Stunden in Zinklösung fixiert. Anschließend wurden sie für 4 Wochen in 10%igem Ethyldiaminotetraessigsäure (EDTA) zur Entkalkung gelagert. Dies erfolgte bei 4°C Umgebungstemperatur.

Die entkalkten Knochen wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils eine Stunde mit 70%, 80%, 90%, sowie viermal eine Stunde mit 100% Alkohol) entwässert. Im Anschluss wurden die Proben dreimal für jeweils eine Stunde mit Xylol behandelt, um das Gewebe paraffingängig zu machen. Abschließend wurden die Proben über den Zeitraum von einer Stunde in heißem Paraffin eingebettet.

Im weiteren Verlauf wurden 5µm dicke zentrale Schnittpräparate im Bereich des maximalen Kallusdurchmessers in longitudinaler Schnittführung angefertigt (Kryostat Leica CM 1900, Nussloch, Deutschland), 30min getrocknet und nach der Masson-Goldner-Methode gefärbt. Diese Färbung ist für die Darstellung von Knorpel und Knochen gut geeignet (HOROBIN, 2002) und findet in zahlreichen Studien zu Frakturheilung und Knochenmetabolismus Verwendung (SCHWARZ et al., 2007; KAIVOSOJA et al., 2008; KOCH et al., 2008).

Zur Färbung wurden die Proben zunächst 1-2min in Weigert's Eisenhämatoxylin gefärbt, 10-15min unter fließendem Wasser gespült und anschließend weitere 5-

7min in Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin gefärbt. Nach Spülung mit 1% Essigsäure erfolgte die Behandlung mit Molybdatophosphorsäure-Orange bzw. Wolframatophosphorsäure-Orange bis zur völligen Entfärbung des Bindegewebes. Nach erneuter Spülung mit 1% Essigsäure wurden die Präparate mit Lichtgrün für fünf Minuten gegengefärbt und abschließend mit 1% Essigsäure für 5 Minuten ausgewaschen sowie in Isopropanol entwässert.

Zur Auswertung der Präparate wurden die histologischen Schnitte unter 1,25-facher Vergrößerung (Olympus BX60 Microscope, Olympus, Tokio, Japan) digitalisiert (Zeiss Axio Cam and Axio Vision 3.1, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und mit Hilfe eines Bildauswertungsprogramms analysiert (ImageJ Analysis System). Folgende Parameter wurden bewertet [Abb. 3]:

1. Durchmesser Kallus [mm]
2. Durchmesser Femur [mm]
3. Kallusfläche gesamt [ $\text{mm}^2$ ]
4. Fläche des knöchernen Anteils innerhalb des Kallus [ $\text{mm}^2$ ]
5. Fläche des knorpeligen Anteils innerhalb des Kallus [ $\text{mm}^2$ ]
6. Fläche des bindegewebigen Anteils des Kallus [ $\text{mm}^2$ ]
7. Punktewert für Heilung (ventraler und dorsaler Spalt max. je 2 Punkte, 0 = keine Heilung, 1 = knorpelige/bindegewebige Heilung, 2 = knochige Heilung)  
nach Garcia (GARCIA et al., 2008b)

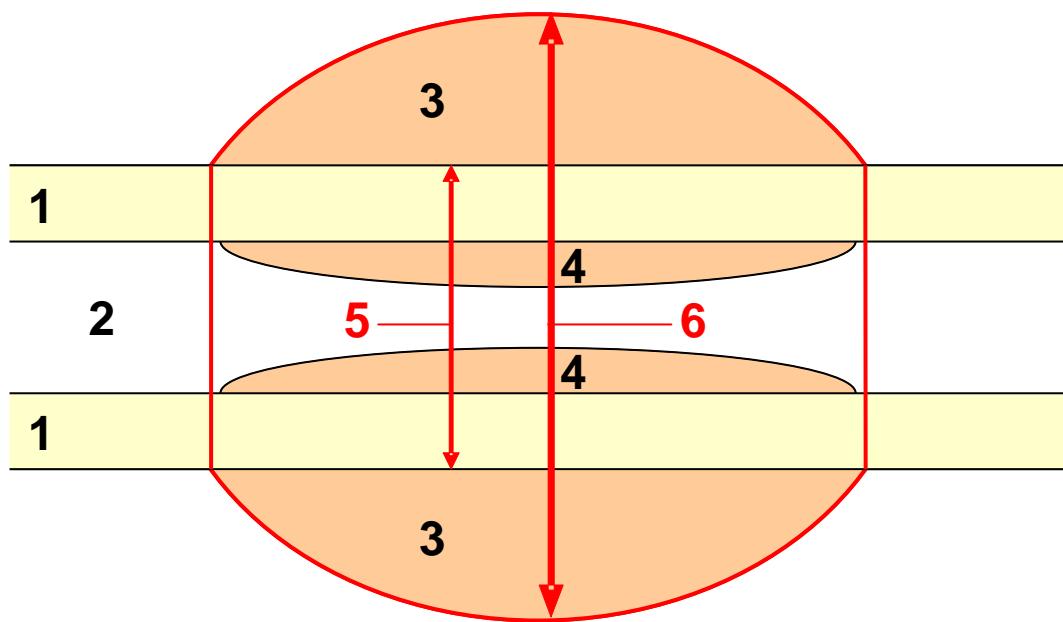


Abb. 3: Schematische Darstellung der Auswertungsparameter

1 = Kortikalis, 2 = Markhöhle, 3 = periostale Kallusfläche, 4 = endostale Kallusfläche,  
5 = Femurdurchmesser, 6 = Kallusdurchmesser

Als Zielwerte wurden gemäß den Empfehlungen der American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR) (PARFITT et al., 1987) folgende Parameter berechnet:

1. Kallusfläche / Femurdurchmesser [mm]
2. Kallusdurchmesser / Femurdurchmesser [%]
3. Knöcherne Kallusfläche / gesamte Kallusfläche [%]
4. Knorpelige Kallusfläche / gesamte Kallusfläche [%]
5. Bindegewebige Kallusfläche / gesamte Kallusfläche [%]

#### 4.2.6. Immunhistologische Analyse

Die für die Immunhistologie bestimmten Schnittpräparate wurden direkt nach dem Schneiden in Aceton fixiert (4°C, 5s) und 30min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschliessend wurden sie in 4%igem Formalin fixiert (RT, 5min) und mit Aqua

destillata gespült. Die endogene Peroxidase der Proben wurde durch Inkubation in 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geblockt (RT, 30min). Nach erneuter Spülung mit Aqua destillata und PBS wurden die Schnitte gefärbt. Hierzu wurden 75µl des 1:25 PBS verdünnten Primärantiköpers (Rat-anti-mouse CD31, BD, Heidelberg, Deutschland) auf die einzelnen Schnitte aufgebracht. Für die Negativkontrolle wurde reines PBS aufgetragen. Die Schnitte wurden mit einem Deckglas abgedeckt und 12h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Entfernung des Deckglases wurden die Schnitte 2x5min in PBS gespült. 100µl des 1:100 PBS verdünnten Sekundärantikörpers (Goat-anti-rat-IgG-HRP, Dianova, Hamburg, Deutschland) wurden auf die Schnitte aufgebracht und 30min bei RT in feuchter Kammer inkubiert. Nach Entfernung des Deckglases wurden die Schnitte erneut 2x5min in PBS gespült. 100µl DAB-Reagenz (1 Tablette S 3000, Dako, Glostrup, Dänemark) wurde auf die Schnitte aufgetragen und 5min in feuchter Kammer bei RT inkubiert. Nach 5min Spülung in Aqua destillata wurden die Proben durch fünfmaliges Eintauchen in Hämalaun nach Meyer gefärbt und erneut gespült. Die Schnitte wurden je 3min in einer aufsteigenden Alkoholreihe (bis 70% Ethanol) und dreimalig in Xylol getaucht und abschließend eingedeckt.

Zur Quantifizierung der Angiogenese wurden die Schnitte lichtmikroskopisch evaluiert und ausgewertet (Olympus BX60 Microscope; Zeiss Axio Cam and Axio Vision 3.1, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland; ImageJ). Dabei wurden der endostale, d.h. im Innern des Femurs liegende Teil sowie der zentrale, in der Nähe des Frakturpalts befindliche vom periostalen Kallus unterschieden [Abb. 3]. Hierzu wurden bei maximaler Vergrößerung Aufnahmen der verschiedenen Bereiche angefertigt und innerhalb dieser HPF (high power fields) die Anzahl der angefärbten Strukturen ausgezählt.

#### **4.2.7. Western-Blot-Analyse**

Das Western- oder Immunoblotting dient als quantitative Messmethode der Ermittlung von Proteinexpressionen in entsprechenden Gewebeproben. Hierbei werden die extrahierten Proteine zunächst in einer vertikalen Gelmatrix mit Hilfe eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Im Anschluss werden die resultierenden

Proteinbanden in einer zweiten horizontalen Elektrophorese vom Gel auf eine proteinbindende Membran transferiert. Die spezifischen Targetproteine werden durch eine Färbung mit Enzym-konjugierten Antikörpern markiert und die Stärke der Proteinexpression über eine lichtemittierende Enzym-Substrat-Reaktion auf einem Röntgenfilm detektiert. Die gewonnenen Proteinextrakte werden auf eine identische Proteinkonzentration eingestellt, um die Proteinexpression verschiedener Proben bei gleicher Beladung der Geltaschen und gleichmäßigem Gel-Membran-Transfer quantitativ zu vergleichen. Die Absicherung der Quantifizierbarkeit wird durch das „Mitführen“ eines ubiquitär konstitutiv exprimierten Proteins (in der Regel  $\beta$ -Actin) gewährleistet. Entsprechend muss dieses Protein in allen zu vergleichenden Ansätzen die gleiche Expressionsstärke aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des Proliferationsmarkers PCNA sowie des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B mittels Western-Blot-Analyse nach zweiwöchiger Frakturheilung quantifiziert. Vor Tötung der Tiere wurde hierzu der Weichteilmantel um die Femur-Diaphyse unter Narkose reseziert und der Kallus explantiert. Die so gewonnenen Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff ( $T < -196^{\circ}\text{C}$ ) eingefroren und bis zur weiteren Auswertung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  kryokonserviert. Entsprechend bestanden die Kallusproben aus Knochen, Knorpel und Bindegewebe. Auf eine Analyse der Expression nach fünfwochiger Frakturheilung wurde verzichtet, da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass in dieser Phase der Frakturheilung keine relevante Expression der entsprechenden Proteine stattfindet (HOLSTEIN et al., 2007) und der Kallus zu diesem Zeitpunkt bereits komplett aus Knochen bestand.

Die kryokonservierten Proben wurden zunächst mit je 150 $\mu\text{l}$  vorgekühltem Lyse-Puffer, einem Proteaseinhibitor-Cocktail (1:75; Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und 100mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 1:500) im Handhomogenisator homogenisiert. Danach wurden die Proben für 30min auf Eis inkubiert und für weitere 30min mit 13000U/min (16000 x g) bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert (Biofuge Fresco, Kendro, Hanau, Deutschland). Abschließend wurden die Überstände abpipettiert und Aliquots der gewonnenen Proteinextrakte bei  $-20^{\circ}\text{C}$  kryokonserviert.

Die aus der Proteinextraktion gewonnenen Proben wurden mit destilliertem Wasser auf 1:10 verdünnt. Unmittelbar vor der Protein-Bestimmung (Methode nach Lowry) wurde folgende Messlösung angesetzt:

- 5ml Reagenz A: 10g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/500ml 0,1 M NaOH (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland)
- 100µl Reagenz B: 0,5g KNa-Tartrat, 0,25g Cu-Sulfat x 5 H<sub>2</sub>O/50ml Aqua destillata (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Zu 250µl dieser Lösung wurden je 50µl der verdünnten Extrakte zugesetzt und 10sec gemischt (Vortex, Heidolph Reax Top, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland). Im Anschluss wurden die Proben für 10min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 25µl verdünntem Folin (1:2 Aqua destillata) vermischt (Vortex).

Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption des entstandenen Farbkomplexes bei einer Wellenlänge von 595nm gegen Aqua destillata photometrisch gemessen (GeneQuant pro, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer Bovine Serum Albumin (BSA)-Standardkurve ermittelt. Für jedes Proteinextrakt wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Extrakte wurden auf gleiche Proteingehalte (15µg/15µl) eingestellt und mit Laemmli-Puffer (Sigma) 2x5min im kochenden Wasserbad denaturiert.

Die Western-Blot-Analysen wurden als eindimensionale SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter diskontinuierlichen Bedingungen nach Laemmli (LAEMMLI, 1970) mit einer Acrylamidkonzentration von 5% im Sammelgel und einer Acrylamidkonzentration von 10% im Trenngel durchgeführt (30% Acrylamid / Bis Solution, 29:1, BioRad, München, Deutschland).

Die Gele wurden in einer vertikalen Flachapparatur mit Gießstand für Minigele (Mini-Protean II, BioRad) nach Anleitung des Herstellers gegossen. Damit eine Hemmung der Polymerisation an der Geloberfläche durch Sauerstoff verhindert wird und die Ausbildung einer glatten Trennfläche zwischen Trenn- und Sammelgel gegeben ist, wurde nach dem Einfüllen der Trenngellösung etwa 200µl Isopropanol (Roth)

übergeschichtet. Nachdem das Gel eine Stunde polymerisiert und der Alkohol entfernt wurde, wurde das Sammelgel in die Elektrophoreseapparatur gegossen. Unmittelbar im Anschluss wurden die entsprechenden Geltaschen, die ein maximales Beladungsvolumen von 15µl zulassen, mit einem Teflonkamm (15 Zähne, 4mm x 1cm x 0,75mm, BioRad) gesetzt. Nach einer Stunde Polymerisierung wurden 15µl der Proben in die Geltaschen aufgetragen. Im weiteren Verlauf wurde in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Mini-Protean II, BioRad) die Trennung der Proteine entsprechend ihrer Molekülgröße durchgeführt. Um die erforderliche Niederspannung zu gewährleisten, wurde ein spezielles Netzgerät für stabilisierten Gleichstrom (Power Pac, BioRad) verwendet. Hierbei wurde eine anfängliche Spannung von 100V angelegt, um die Proteine im Sammelgel zu konzentrieren. Diese wurde nach 15min auf 140V für etwa 1 Stunde zur Passage des Trengels erhöht. Nachdem die „blaue Lauffront“ der Bromphenolblau-Bande des Sample Buffers das untere Gelende erreicht hatte, wurde die Auftrennung der Proteine beendet. Im Anschluss wurden die Gele aus der Kammer genommen und in einem Transferpufferbad für das weitere Membranblotting äquilibriert.

Zur Durchführung des so genannten Tankblottings im Rahmen des horizontalen Proteintransfers wurde eine Mini-Trans-Blotkammer (BioRad) verwendet. Um Oberflächenladungen auszugleichen, wurde die PVDF-Membran (0,2µm Porengröße, BioRad) für 20 Sekunden in Methanol (Roth) gebadet und sofort mit destilliertem Wasser abgespült. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Äquilibrierung in Transferpuffer (12mM TRIS Base, 96mM Glycin in destilliertem Wasser). Für den Blotsandwich wurden die äquilierte PVDF-Membran und das Gel luftblasenfrei zwischen zwei Transferpuffer-getränkten Schwämme mit entsprechendem Filterpapier (Whatman, Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland) in die Blotkassette eingelegt. Die verschlossene Sandwichkassette wurde so in der Blotkammer ausgerichtet, dass der Stromfluss einen Proteintransfer vom Gel zur Membran gewährleistete. Zur Beibehaltung einer gleichmäßig niedrigen Temperatur wurden ein so genannter Eis-Spacer und ein Magnetrührer verwendet. Nach Auffüllung der Blotkammer mit Transferpuffer wurde über 2 Stunden ein stabilisierender Gleichstrom (Anfangsstromstärke 800mA / 2 Gele) bei konstanter Spannung (50V) angelegt. Die proteinbeladene Membran wurde über Nacht in TBS-

T-Puffer (1,5mM TRIS Base pH 7,5, 1% NaCl, 0,01% Tween 20 (Roth) in destilliertem Wasser) bei 4°C zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

Die Detektion der Targetproteine erfolgte über eine spezifische Antikörperfärbung der membrantransferierten Proteine. Alle Handhabungen zur Antikörperfärbung der Membranen wurden auf einem Horizontalschüttler (Heidolph Polymax 1040, Fisher Scientific, Hampton, USA) durchgeführt. Die über Nacht in TBS-T aufbewahrten Membranen wurden vor der Saturierung noch dreimal mit TBS-T gewaschen. Die Membran wurde in fünfprozentiger 54 Lösung aus Milchpulver (Blotting Grade Blocker non-fat dry milk, BioRad) und TBS-T für 30 Minuten inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T wurden die entsprechenden Primärantikörper für 180 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T erfolgte die Sekundärantikörper-Inkubation (1:5000) mit HRP-konjugiertem Schaf-anti-Maus-IgG (Dako) bzw. Esel-anti-Kaninchen-IgG (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). Die Membranen wurden nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur fünfmal in TBS-T gewaschen und anschließend einer Chemilumineszenzreaktion unterzogen (ECL Western Blotting Analysis System, Amersham Biosciences).

Die entsprechenden Signale der behandelten Membranen wurden durch Exposition von Röntgenfilmen (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) visualisiert. Als interner Standard wurde zur Kontrolle der Proteinbeladung und des Proteintransfers der monoklonale  $\beta$ -Actin-Antikörper Klon AC-15 (Sigma) verwendet. Als eines der höchst-konservierten eukaryotischen Proteine mit konstanter intrazellulärer Verteilung eignet sich  $\beta$ -Actin als Proteinkonzentrationsstandard. Konsekutiv wurde die densitometrisch ermittelte optische Dichte auf gleiche  $\beta$ -Actin-Konzentrationen korrigiert.

Die Röntgenfilme wurden mit einem Gel-Dokumentationssystem (Gel Doc, BioRad) und einem entsprechenden Quantifizierungsprogramm (Quantity One-Gel Doc, BioRad) ausgewertet.

#### 4.2.8. Durchflusszytometrische Analyse

##### Materialien und Reagenzien

- PBS ohne Mg und Ca
- Pharm Lyse (BD Biosciences)
- FACS-Puffer (FP): 500ml PBS + 25ml gefiltertes FCS + 2,5gr BSA
- Antikörper:
  - Rat anti Mouse VEGF-R2-PE (BD Biosciences)
  - Rat anti Mouse sca-1-FITC (BD Biosciences)
  - Rat anti Mouse CD117-FITC (BD Biosciences)
- Isotypkontrollen:
  - PE-Rat IgG2ak Isotype Control (BD Biosciences)
  - FITC-Rat IgG2ak Isotype Control (BD Biosciences)
  - FITC-Rat IgG2bk Isotype Control (BD Biosciences)
- F<sub>C</sub>-Block:
  - Rat anti Mouse CD16/CD32 (BD Biosciences)
- Cell Fix (BD Biosciences)

Für die Durchflusszytometrie wurde den Versuchstieren am Versuchsende nach 2 Wochen in Narkose mittels einer heparinisierten Kanüle (Sterican® Gr. 17 - G 24 x 1" / Ø 0,55 x 25mm – lila) ca. 500µl Vollblut (VB) entnommen. Das VB wurde daraufhin mit 3ml Pharm Lyse bei RT für 15min inkubiert und 4min zentrifugiert (1600U/min, Biofuge Fresco, Kendro). Nach Zugabe von 3ml FP wurde erneut zentrifugiert (4min, 1600U/min) und die Pellets mit FP mit 200µl resuspendiert. Jeweils 200µl Zellsuspension wurde mit 6µl F<sub>C</sub>-Block für 10min bei 4°C inkubiert. Jeweils 50µl Zellsuspension wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt:

- 2µl VEGF-R2-PE + 2µl sca-1-FITC
- 2µl Rat IgG2ak-PE + 2µl Rat IgG2ak-FITC
- 2µl CD117-FITC
- 2µl Rat IgG2bk-FITC

Die gefärbten Suspensionen wurden für 40min bei 4°C inkubiert und anschliessend mit 1ml FP in der Zentrifuge gewaschen (4min, 1600 U/min) und die Pellets mit 0,5ml Cell Fix resuspendiert.

Die Messung und Auswertung der Proben erfolgte mittels der Software CellQuest® (BD). Dabei wurden bei den Analysen jeweils 10.000 Zellen gezählt. Das Durchflusszytometer (BD FACScan) verfügt über einen Argon-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488nm.

#### **4.2.9. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten und ihre graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe einer Statistiksoftware. Zur Durchführung des t-Tests wurde Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) verwendet, sofern eine Normalverteilung vorlag (normality test alpha = 0.05) (CASSIDY, 2005). Die einzige Ausnahme hiervon bildete das radiologische Verhältnis zwischen Kallus- und Femurdurchmesser, bei dem keine Normalverteilung vorlag. Hier wurde ein Chi-Quadrat-Test verwendet. Für das histologische Scoring wurde der Mann-Whitney Rangsummentest angewendet (SigmaStat, Systat Software, San Jose, USA).

In den graphischen Darstellungen werden die folgenden Signifikanzniveaus unterschieden:

Keine Kennzeichnung:	nicht signifikant ( $p>0.05$ )
*	signifikant ( $p\leq 0.05$ )
**	hoch signifikant ( $p<0.01$ )
***	höchst signifikant ( $p<0.001$ )

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Hämatologische Analyse

Im Blut der Tiere wurden Erythrozytenzahl [ $\times 10^6/\mu\text{l}$ ], Hämoglobinkonzentration [g/dl] und Hämatokrit [%] untersucht und verglichen. Nach 2 Wochen waren alle Parameter bei den mit EPO behandelten Tieren signifikant erhöht (Erythrozytenzahl [ $\times 10^6/\mu\text{l}$ ] EPO MW  $11.3 \pm \text{SEM } 0.3$  vs. Kontrolle  $7.4 \pm 0.1$ ,  $p<0.0001$ ; Hämoglobinkonzentration [g/dl] MW  $19.0 \pm \text{SEM } 0.4$  vs.  $12.9 \pm 0.2$ ,  $p<0.0001$ ; Hämatokrit [%] MW  $62.8 \pm \text{SEM } 1.5$  vs.  $42.6 \pm 1.7$ ,  $p<0.0001$  [Tab. 2].

Auch nach 5 Wochen zeigte die Versuchsgruppe eine Erhöhung der untersuchten Parameter (Erythrozytenzahl [ $\times 10^6/\mu\text{l}$ ] EPO MW  $11.6 \pm \text{SEM } 0.4$  vs. Kontrolle  $7.8 \pm 0.2$ ,  $p<0.0001$ ; Hämoglobinkonzentration [g/dl] MW  $20.7 \pm \text{SEM } 0.9$  vs.  $13.0 \pm 0.6$ ,  $p<0.0001$ ; Hämatokrit [%] MW  $56.7 \pm \text{SEM } 1.0$  vs.  $39.5 \pm 0.6$ ,  $p<0.0001$ ) [Tab. 2].

Gruppe	Untersuchungszeitpunkt	Erythrozyten [ $\times 10^6/\mu\text{l}$ ] (MW $\pm$ SEM)	Hämoglobin [g/dl] (MW $\pm$ SEM)	Hämatokrit [%] (MW $\pm$ SEM)
Kontrolle	2 Wochen	$7.4 \pm 0.1$	$12.9 \pm 0.2$	$42.6 \pm 1.7$
	5 Wochen	$7.8 \pm 0.2$	$13.0 \pm 0.6$	$39.5 \pm 0.6$
EPO	2 Wochen	$11.3 \pm 0.3^{***}$	$19.0 \pm 0.4^{***}$	$62.8 \pm 1.5^{***}$
	5 Wochen	$11.6 \pm 0.4^{***}$	$20.7 \pm 0.9^{***}$	$56.7 \pm 1.0^{***}$

Tab. 2: Hämatologie

Zu beiden Untersuchungszeitpunkten wiesen die Versuchstiere im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Erythrozytenkonzentration, Hämoglobinkonzentration und erhöhten Hämatokritwert auf (\*\*:  $p<0.0001$  im Vergleich zur Kontrollgruppe)

## 5.2. Radiologische Analyse

### 5.2.1. Durchmesser des periostalen Kallus

Zur Beurteilung der Größe des periostalen Kallus wurde der Kallusdurchmesser in Relation zum Femurdurchmesser gesetzt. Nach 2 Wochen (A) war bei der Kontrollgruppe keine Kallusbildung nachzuweisen, der Durchmesser des röntgendichten Gewebes über dem Frakturspalt entsprach dem des Femur (MW  $100.0 \pm SEM 0.0\%$ ). Die mit EPO behandelten Tiere zeigten hingegen eine deutliche Kallusbildung (MW  $161.1 \pm SEM 7.7\%$  des Femurdurchmessers,  $p<0.0001$ ) [Abb. 4]. Nach 5 Wochen (B) war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachweisbar.

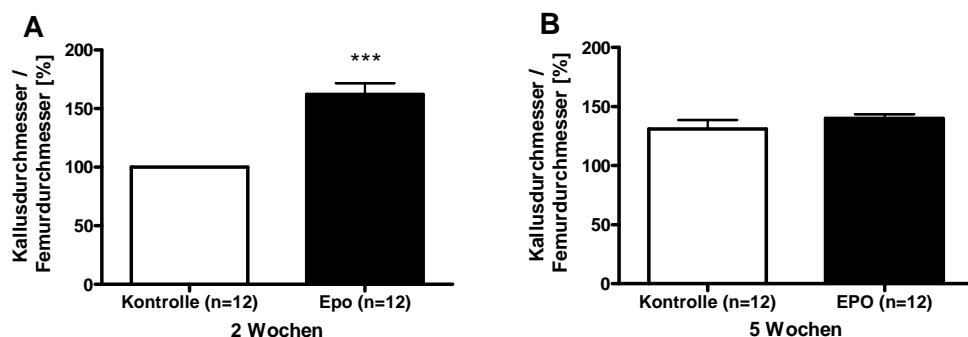


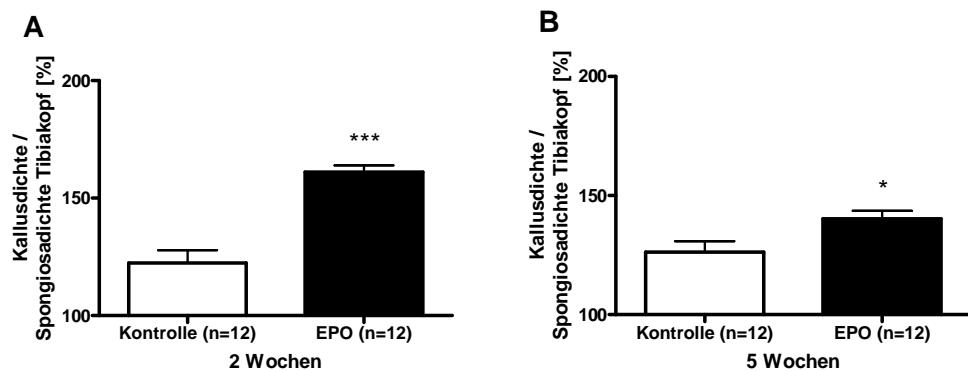
Abb. 4: Radiologie: Kallusdurchmesser

Die EPO-Gruppe zeigte nach 2 Wochen (A) radiologisch einen signifikant höheren Durchmesser des periostalen Kallus (EPO MW  $161.1 \pm SEM 7.7\%$  des Femurdurchmessers vs. Kontrolle  $100.0 \pm 0.0\%$ ). Nach 5 Wochen (B) zeigte sich kein Unterschied zwischen den Kallusdurchmessern der beiden Gruppen ( $140.1 \pm 3.4\%$  vs.  $131.1 \pm 7.7\%$ ,  $p=0.3$ , \*\*\*:  $p<0.0001$  im Vergleich zur Kontrollgruppe).

### 5.2.2. Kallusdichte

Zur Dichtebestimmung des Kallus wurde der Grauwert im Röntgenbild gemessen. Um die Verfälschung durch unterschiedlich entwickelte Bilder und interindividuelle Varianzen der Knochendichte zu minimieren, wurden die ermittelten Werte mit denen des Spongiosaknochens im Tibiakopf verglichen.

Nach 2 Wochen (A) zeigte sich bei der EPO-Gruppe eine erhöhte Dichte des periostalen Kallus (EPO MW  $161.1 \pm \text{SEM } 2.9\%$  vs. Kontrolle  $122.4 \pm 5.4\%$  der Spongiosadichte,  $p<0.0001$ ) [Abb. 5 und 7]. Auch nach 5 Wochen (B) war noch eine erhöhte Kallusdichte nachzuweisen ( $140.3 \pm 3.4\%$  vs.  $126.2 \pm 4.6\%$ ;  $p<0.05$ ).



Der periostale Kallus zeigte sich in der radiologischen Analyse nach 2 Wochen (A) in der EPO-Gruppe nachweislich dichter als in der Kontrollgruppe (EPO MW  $161.1 \pm \text{SEM } 2.9\%$  vs. Kontrolle  $122.4 \pm 5.4\%$  der Spongiosadichte). Auch nach 5 Wochen (B) wies die Versuchsgruppe eine höhere Kallusdichte auf ( $140.3 \pm 3.4\%$  vs.  $126.2 \pm 4.6\%$ ; \*\*\*:  $p<0.0001$  im Vergleich zur Kontrollgruppe; \*:  $p<0.05$ ).

### 5.2.3. Radiologisches Scoring

Die osteotomierten Femora wurden im Röntgenbild beurteilt und nach dem Goldberg-Score bewertet. Hierbei zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (nach 2 Wochen (A) EPO MW  $1.0 \pm SEM 0.2$  vs. Kontrolle  $0.6 \pm 0.2$ , n.s. [Abb. 6]; nach 5 Wochen (B)  $1.0 \pm 0.2$  vs.  $0.7 \pm 0.2$ , n.s.).

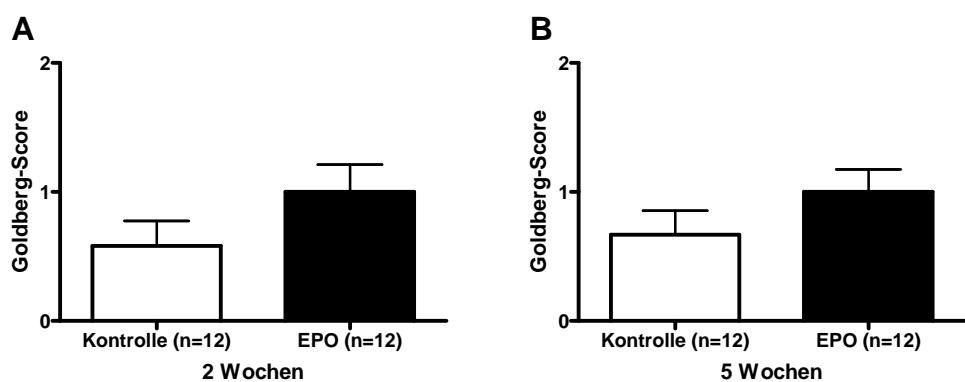


Abb. 6: Radiologie: Goldberg-Score

Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen im radiologischen Scoring erwies sich als nicht signifikant (nach 2 Wochen (A) EPO MW  $1.0 \pm SEM 0.2$  vs. Kontrolle  $0.6 \pm 0.2$ , n.s.; nach 5 Wochen (B)  $1.0 \pm 0.2$  vs.  $0.7 \pm 0.2$ , n.s.).

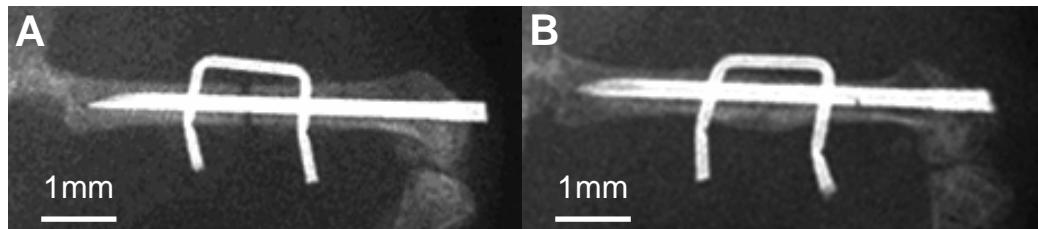


Abb. 7: Radiologie: Kallusbildung

Das Röntgenbild A zeigt das Femur eines Tieres ohne EPO-Behandlung 2 Wochen nach Osteotomie. Der Frakturspalt ist deutlich zu sehen, eine Kallusbildung ist nicht erkennbar. Die Aufnahme B zeigt das Femur eines Tieres, das über den Zeitraum von 2 Wochen EPO erhielt. Die Bildung eines Kallus ist hier deutlich erkennbar.

## 5.3. Biomechanische Analyse

### 5.3.1. Steifigkeit

Die Steifigkeit [N/mm] der osteotomierten Femora wurde mit dem kontralateralen Femur verglichen. Dabei zeigte sich eine signifikant höhere Steifigkeit der mit EPO behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe (nach 2 Wochen (A) EPO MW  $42.2 \pm \text{SEM } 6.7\%$  vs. Kontrolle  $3.4 \pm 0.8\%$ ,  $p<0.0001$  [Abb. 8]; nach 5 Wochen (B)  $57.4 \pm 10.0\%$  vs.  $32.2 \pm 4.8\%$ ,  $p<0.05$ ).

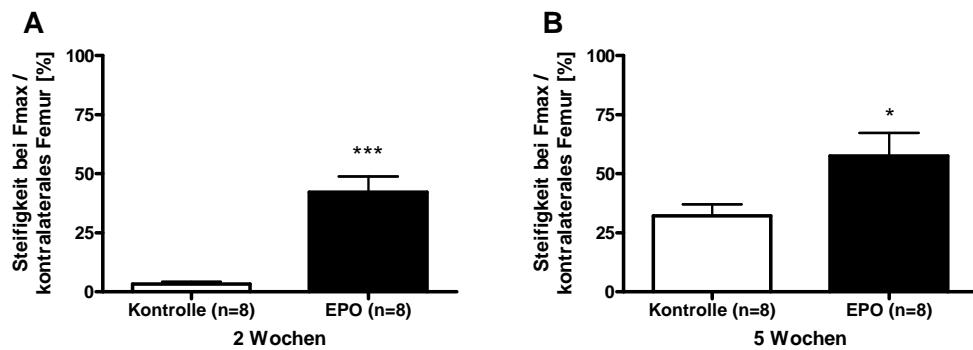


Abb. 8: Biomechanik: Steifigkeit

Die EPO-Gruppe zeigte bei der 3-Punkt-Biegung eine signifikant erhöhte Steifigkeit der osteotomierten Femora im Vergleich zur Kontrollgruppe (nach 2 Wochen (A) EPO MW  $42.2 \pm \text{SEM } 6.7\%$  vs. Kontrolle  $3.4 \pm 0.8\%$ ,  $p<0.0001$ ; nach 5 Wochen (B)  $57.4 \pm 10.0\%$  vs.  $32.2 \pm 4.8\%$ ,  $p<0.05$ ; \*\*\*:  $p<0.0001$  im Vergleich zur Kontrollgruppe; \*:  $p<0.05$ ).

## 5.4. Histomorphometrische Analyse

### 5.4.1. Heilungsrate

Anhand der histologischen Präparate wurde zunächst beurteilt, ob die Femora vollständig geheilt waren. Als Kriterium für eine vollständige Knochenheilung wurde eine knöcherne Überbrückung des Frakturpaltes auf beiden Seiten festgelegt.

Nach 2 Wochen waren 2/8 Femora der mit EPO behandelten Tiere geheilt im Gegensatz zu 0/8 in der Kontrollgruppe. Nach 5 Wochen lag bei allen (8/8) Tieren der EPO-Gruppe eine vollständige Heilung vor, in der Kontrollgruppe jedoch nur bei der Hälfte (4/8) der Tiere ( $p<0.05$  im Chi-Quadrat-Test).

### 5.4.2. Größe des periostalen Kallus

Zur Beurteilung der Größe des periostalen Kallus wurde der Durchmesser in Relation zum Femurdurchmesser des Tieres gesetzt. Es zeigte sich jedoch zu keinem Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen EPO-Gruppe und Kontrollgruppe (nach 2 Wochen (A) EPO MW  $231.7 \pm SEM 17.1\%$  vs. Kontrolle  $224.5 \pm 9.3\%$ , n.s.; nach 5 Wochen (B)  $180.4 \pm 2.6\%$  vs.  $180.1 \pm 8.3\%$ , n.s. [Abb.9]). Bei der Kallusfläche im histologischen Schnitt in Relation zum Femurdurchmesser war ebenfalls kein Unterschied zwischen EPO-Gruppe und Kontrollgruppe festzustellen (nach 2 Wochen (A) EPO MW  $3.8 \pm SEM 0.5mm$  vs. Kontrolle  $2.9 \pm 0.4mm$ , n.s.; nach 5 Wochen (B)  $2.1 \pm 0.1mm$  vs.  $2.5 \pm 0.5mm$ , n.s. [Abb.10]).

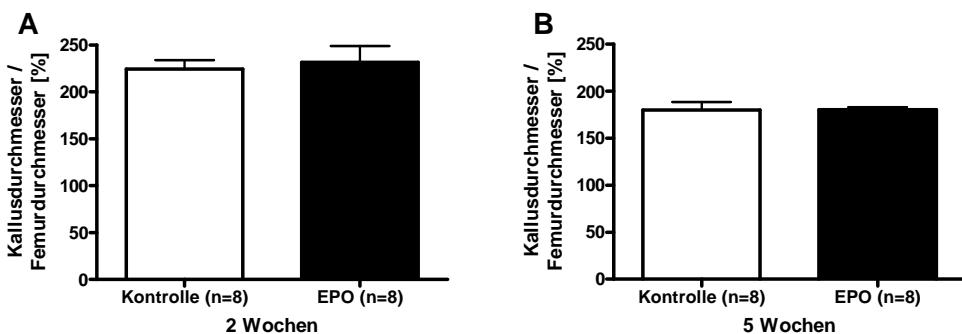


Abb. 9: Histologie: Kallusdurchmesser

Die Histologische Auswertung zeigte nach 2 Wochen (A) keinen Unterschied im Kallusdurchmesser (EPO MW  $231.7 \pm SEM 17.1\%$  vs. Kontrolle  $224.5 \pm 9.3\%$ , n.s.). Nach 5 Wochen (B) war ebenfalls kein Unterschied im Kallusdurchmesser der beiden Gruppen messbar ( $180.4 \pm 2.6\%$  vs.  $180.1 \pm 8.3\%$ , n.s.).

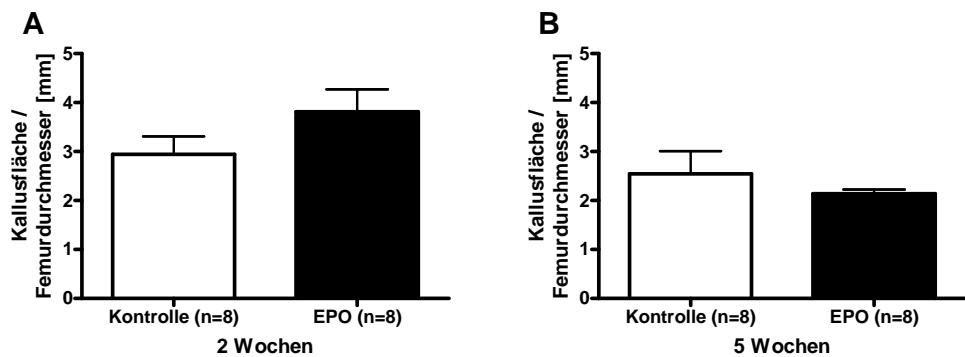


Abb. 10: Histologie: Kallusfläche

Die beiden Gruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Gesamtfläche des Kallus (nach 2 Wochen (A) EPO MW  $3.8 \pm SEM 0.5\text{mm}$  vs. Kontrolle  $2.9 \pm 0.4\text{mm}$ , n.s.; nach 5 Wochen (B)  $2.1 \pm 0.1\text{mm}$  vs.  $2.5 \pm 0.5\text{mm}$ , n.s.).

### 5.4.3. Kalluszusammensetzung

Nach 2 Wochen (A) zeigten die mit EPO behandelten Tiere einen signifikant geringeren Anteil von Bindegewebe (EPO MW  $1.0 \pm$  SEM  $0.6\%$  vs. Kontrolle  $26.8 \pm 11.2\%$ ,  $p<0.0001$ ) sowie von Knorpel ( $2.8 \pm 2.8\%$  vs.  $46.7 \pm 13.9\%$ ,  $p<0.01$ ) am Gesamtgewebe des periostalen Kallus. Der Knochenanteil hingegen war signifikant erhöht ( $96.2 \pm 2.1\%$  vs.  $26.5 \pm 6.3\%$ ,  $p<0.0001$ ) [Abb. 11 und 12].

Nach 5 Wochen (B) konnte kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (EPO MW  $5.5 \pm$  SEM  $3.7\%$  vs. Kontrolle  $0.6 \pm 0.4\%$  Bindegewebe, n.s.;  $0.5 \pm 0.5\%$  vs.  $0.5 \pm 3.4\%$  Knorpel, n.s.;  $94.0 \pm 3.6\%$  vs.  $94.4 \pm 3.0\%$  Knochen, n.s.).

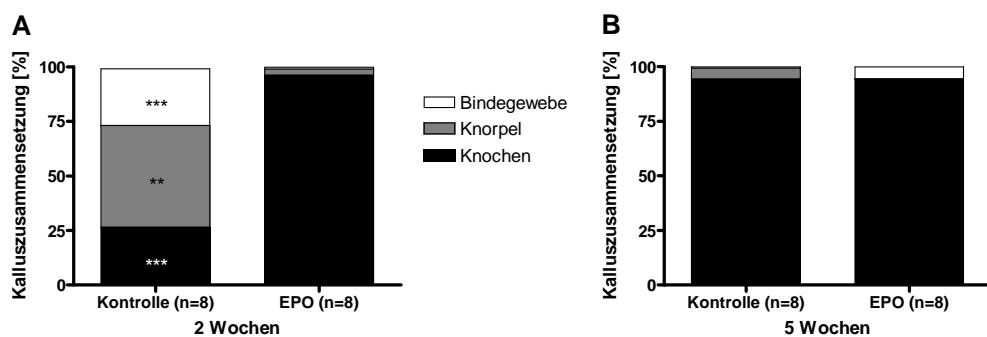


Abb. 11: Histologie: Kalluszusammensetzung

Die Versuchstiere zeigten nach 2 Wochen (A) einen signifikant höheren Knochenanteil des periostalen Kallus (Bindegewebe: EPO MW  $1.0 \pm$  SEM  $0.6\%$  vs. Kontrolle  $26.8 \pm 11.2\%$ ,  $p<0.0001$ , Knorpel:  $2.8 \pm 2.8\%$  vs.  $46.7 \pm 13.9\%$ ,  $p<0.01$ , Knochen:  $96.2 \pm 2.1\%$  vs.  $26.5 \pm 6.3\%$ ,  $p<0.0001$ ). Nach 5 Wochen (B) war jedoch kein Unterschied mehr in der Kalluszusammensetzung der beiden Gruppen festzustellen (Bindegewebe: EPO MW  $5.5 \pm$  SEM  $3.7\%$  vs. Kontrolle  $0.6 \pm 0.4\%$ , n.s.; Knorpel:  $0.5 \pm 0.5\%$  vs.  $0.5 \pm 3.4\%$ , n.s.; Knochen:  $94.0 \pm 3.6\%$  vs.  $94.4 \pm 3.0\%$  n.s., \*\*\*:  $p<0.0001$  im Vergleich zur EPO-Gruppe; \*\*:  $p<0.01$ ).

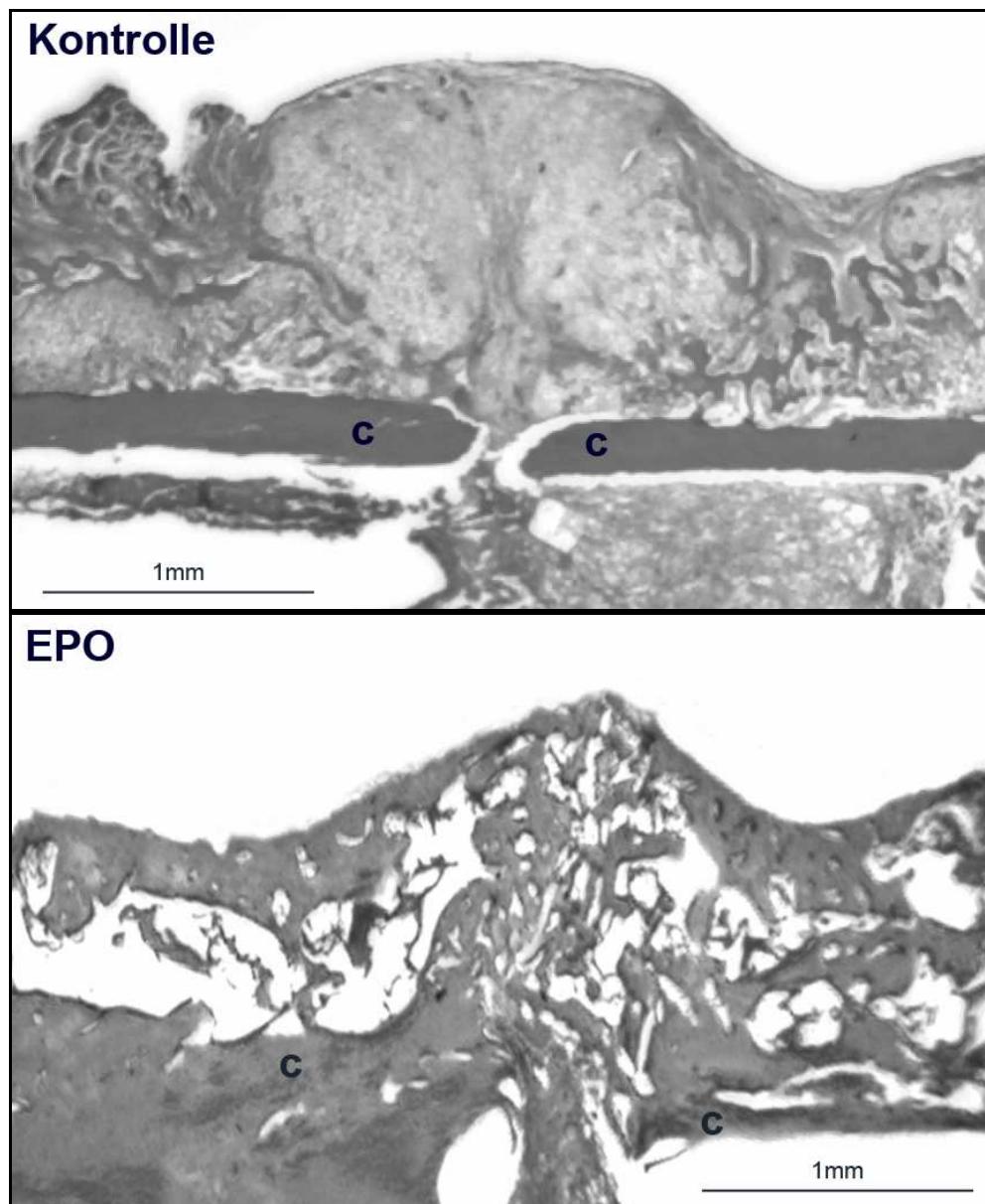


Abb. 12: Histologisches Präparat des Kallus

Die histologischen Schnitte zeigen Femora mit von Kallus überbrücktem Defekt 2 Wochen postoperativ. Während der Kallus in der Kontrollgruppe überwiegend aus Knorpel besteht, ist in der EPO-Gruppe die Bildung von Geflechtknochen erkennbar. Der untere Bildteil zeigt jeweils die Kortikalis des Femurs (c).

## 5.5. Immunhistochemische Analyse

Zur Beurteilung der Neovaskularisation wurden 2 Wochen postoperativ die PECAM-1-positiven Strukturen in den einzelnen High power fields (HPF) gezählt. Hierbei wurde zwischen endostalem, zentralem und periostalem Kallus unterschieden. Im Bereich des endostalen Kallus (A) zeigte sich hierbei eine signifikant erhöhte Anzahl von Gefäßen (EPO MW  $4.1 \pm SEM 0.3$  vs. Kontrolle  $2.4 \pm 0.6$ ,  $p<0.05$ ). Im zentralen (B) und periostalen (C) Kallus konnte hingegen kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden (zentral:  $5.1 \pm 0.4$  vs.  $5.4 \pm 0.9$ , n.s.; periostal:  $5.4 \pm 0.4$  vs.  $4.6 \pm 0.6$ , n.s.) [Abb. 13].

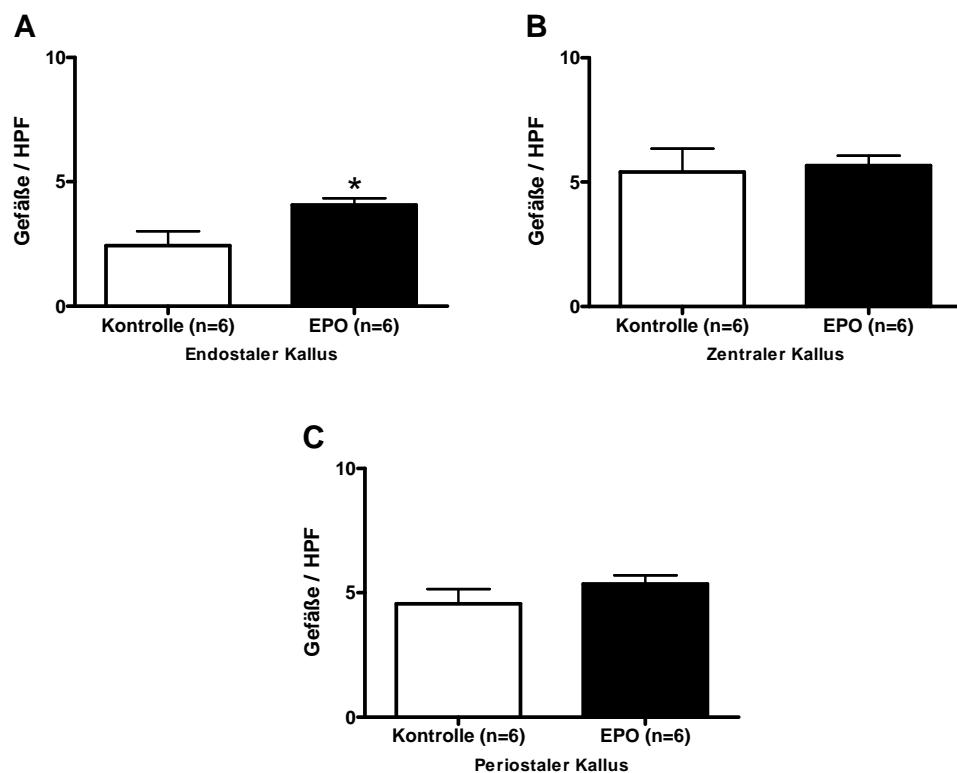


Abb. 13: Immunhistochemie: Vaskularisation des Kallus

Im Gegensatz zu den übrigen Bereichen des Kallus konnte in der endostalen Region eine signifikante Steigerung der Vaskularisation nachgewiesen werden (endostal (A): EPO MW  $4.1 \pm SEM 0.3$  vs. Kontrolle  $2.4 \pm 0.6$ ,  $p<0.05$ , zentral (B):  $5.1 \pm 0.4$  vs.  $5.4 \pm 0.9$ , n.s., periostal (C):  $5.4 \pm 0.4$  vs.  $4.6 \pm 0.6$ , n.s., \*:  $p<0.05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe).

## 5.6. Western-Blot-Analyse

Bei der Western-Blot-Analyse wurde nach 2 Wochen der Kallus, der sich um den Femurdefekt gebildet hatte, auf eine verstärkte Expression von PCNA (A) und NFkB (B) hin untersucht. Dabei konnte kein Unterschied in der Expression des Proliferationsmarkers PCNA nachgewiesen werden (EPO MW  $12.9 \pm SEM 8$  vs. Kontrolle  $10.2 \pm 2.9$ , n.s.). Es fand sich jedoch eine signifikant geringere Expression von NFkB bei den mit EPO behandelten Tieren ( $4.0 \pm 0.3$  vs.  $10.1 \pm 2.6$ ,  $p<0.05$ ) [Abb. 14].

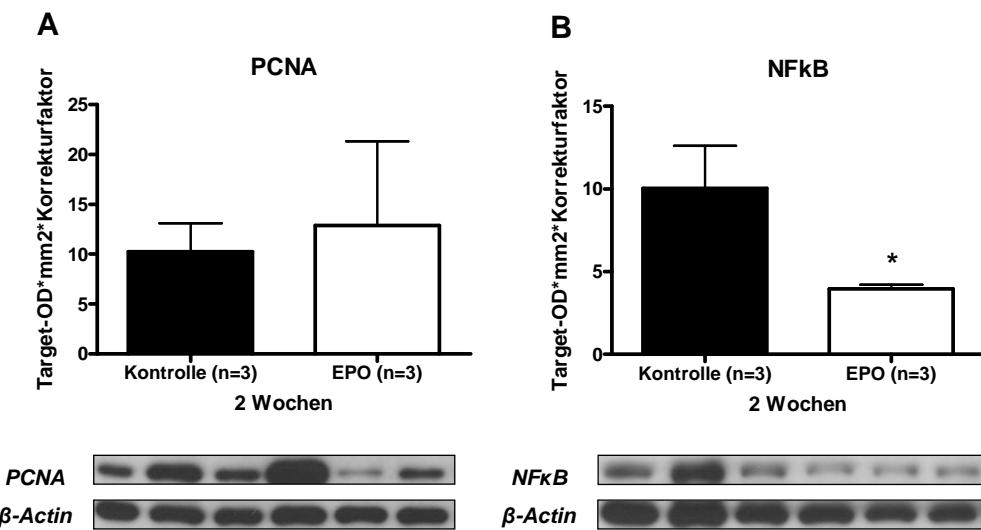


Abb. 14: Western Blot des Kallus

Nach 2 Wochen zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen in der Expression von PCNA (A) (EPO MW  $12.9 \pm SEM 8$  vs. Kontrolle  $10.2 \pm 2.9$ , n.s.), jedoch wies die EPO-Gruppe eine erhöhte Expression von NFkB (B) auf ( $4.0 \pm 0.3$  vs.  $10.1 \pm 2.6$ ,  $p<0.05$ , \*:  $p<0.05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe).

## 5.7. Durchflusszytometrische Analyse (FACS)

Das Blut der EPO-behandelten Versuchstiere zeigte nach zwei Wochen eine signifikant erhöhte Zahl an endothelialen Progenitorzellen (VEGFR2/sca1-positiven Zellen) im Vergleich zur Kontrollgruppe (EPO MW  $227.3 \pm SEM 19.20$  vs.  $148.3 \pm 21.99$ ,  $p<0.05$ ) [Abb. 15].

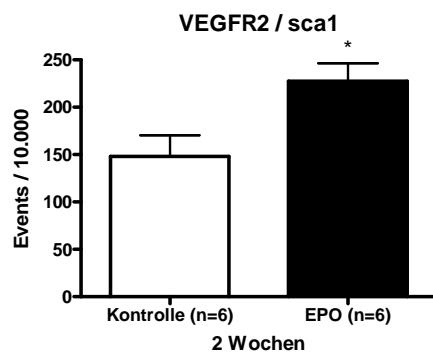


Abb. 15: Durchflusszytometrie (FACS)

Mit EPO behandelte Tiere wiesen eine erhöhte Zahl an VEGFR2/sca1-positiven Zellen auf (EPO MW  $227.3 \pm SEM 19.20$  vs. Kontrolle  $148.3 \pm 21.99$ ,  $p<0.05$ , \*:  $p<0.05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe).

## 6. Diskussion

---

### 6.1. Methoden

Die Knochenheilung stellt einen komplexen biologischen Prozess dar, der die Interaktion zahlreicher knochenfremder Gewebetypen, wie etwa des periostären Weichteilgewebes, des Periosts oder des Gefäßsystems erfordert. Aufgrund des komplexen örtlichen und zeitlichen Zusammenspiels der verschiedenen Phasen der Frakturheilung und aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit des ossären „micro-environment“ sind in-vitro-Untersuchungen zur Knochenbruchheilung nur sehr begrenzt aussagekräftig (FRIEDMAN et al., 1996). Daher wurde der Einfluss von Erythropoietin auf die Frakturheilung im Tiermodell untersucht. Während früher vor allem Schafe und Hunde als Versuchstiere gewählt wurden, bieten heute verfügbare Mausmodelle deutliche Vorteile im Hinblick auf Tierhaltung und Kosten.

Die Maus besitzt im Gegensatz zum Menschen kein Havers-System. Dies kann durchaus als Nachteil für die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Studien an der Maus auf den Menschen angesehen werden. Dennoch weist die Ausbildung so genannter Resorptionshöhlen im Rahmen der Frakturheilung an der Maus Analoga mit dem Remodeling über das Havers-System auf (NUNAMAKER, 1998). Des Weiteren entschieden wir uns für die Durchführung der Studie an der Maus aufgrund der relativ geringen Haltungs- und Zuchtkosten und somit einer guten Realisierbarkeit großer Gruppenstärken. Prinzipiell ist im Mausmodell auch von Vorteil, dass das Genom der Maus bereits in seiner Gesamtheit entschlüsselt ist und folgend auch für keine andere Spezies ein derart großes Spektrum transgener Stämme sowie spezifischer Antikörper verfügbar ist (ROSSANT et al., 1995), die es erlauben, die molekularen Grundlagen der Frakturheilung zu erforschen.

Das in dieser Studie verwendete Mausmodell wurde von unserer Arbeitsgruppe entwickelt und in mehreren Folgeprojekten verwendet (GARCIA et al., 2008a; GARCIA et al., 2008b) und kann für Folgeversuche beispielsweise an Knock-Out-Tieren herangezogen werden.

### **6.1.1. Anzahl der Tiere und Komplikationsrate**

Von 66 operierten Tieren konnten 60 in die Studie eingeschlossen werden. Die perioperative Mortalität ist mit 3% geringer als für das verwendete Osteosynthesemodell beschrieben (6%) und auf intraoperative oder Narkosekomplikationen zurückzuführen (GARCIA et al., 2008a).

Weitere 3% der Versuchstiere verstarben aus ungeklärten Gründen während des Beobachtungszeitraums während 1.5% wegen einer postoperativen Infektion und weitere 1.5% der Beschädigung einer Probe während der Verarbeitung ausgeschlossen wurden. Es besteht kein Anhaltspunkt für unerwünschte Nebenwirkungen der EPO-Gabe bei den Versuchstieren.

Die Gesamtkomplikationsrate der Studie von 9% liegt dabei im Rahmen der von einer Expertenkommission für Tiermodelle zur Frakturheilung geforderten 5-10% (AUER et al., 2007).

### **6.1.2. Modell**

Für die Maus sind verschiedene Osteosyntheseverfahren bekannt, die sich in interne und externe Fixierung unterteilen lassen.

Das verwendete Tiermodell zur internen Fixierung wurde bereits publiziert (GARCIA et al., 2008b) und konnte in vorangegangenen Studien erfolgreich angewendet werden (GARCIA et al., 2010). Da die mechanischen Gegebenheiten im Frakturspalt einen wichtigen Einfluss auf die Knochenbruchheilung haben (CLAES et al., 1998), sind die Ergebnisse von Studien mit instabiler Osteosynthese nur begrenzt auf den Menschen übertragbar, bei dem eine stabile Osteosynthese obligat ist. Um das „mechanical environment“ innerhalb des Frakturspaltes zu standardisieren, entwickelte unsere Arbeitsgruppe daher ein rotationsstabiles Osteosyntheseverfahren für das Mäusefemur. Durch das hier angewendete Modell gelang uns eine Frakturstabilisierung, durch die sich die biomechanischen Einflussfaktoren auf die Frakturheilung weitgehend standardisieren lassen. Da die

Pins offen eingebracht werden müssen, bedingt dieses Verfahren eine höhere Invasivität als die alleinige Marknagelung.

Der bedeutende Vorteil einer internen Fixation gegenüber der externen liegt in einer Minimierung des Infektionsrisikos durch eine geschlossene Haut- und Weichteildeckung sowie eine geringere Behinderung der physiologischen Bewegungsfähigkeit der Tiere durch das geringe Implantatgewicht von 0.025g gegenüber bis zu 7.2g für einen Fixateur externe (THOMPSON et al., 2002).

Die meisten Frakturstudien an der Maus werden an Femur- sowie Tibiamodellen durchgeführt, wobei für diese Arbeit aufgrund zahlreicher Vorteile ein Femurmodell gewählt wurde. Die anatomischen Nachteile der Tibiamodelle sind in dem geringen, nach distal abnehmenden, dreieckigen Knochenquerschnitt zu sehen, der eine mangelhafte Vergleichsmöglichkeit für unterschiedliche Frakturlokalisationen bietet und eine biomechanische Testung erschwert. Zudem bedingt die kaum vorhandene Muskel- und Weichteildeckung der Tibia eine höhere Infektgefahr und schlechtere Blutversorgung im Vergleich zu Femurmodellen. Allerdings ist in diesem Zusammenhang anzumerken, dass die Frakturierung aufgrund der geringen Weichteildeckung in Tibiamodellen grundsätzlich einfacher durchzuführen ist (CHEUNG et al., 2003). Der Femurschaft unterliegt als funktionell belasteter Knochen sowohl Biege- und Schub-, als auch Torsionsbewegungen, die sich unter Belastung im Sinne einer physiologischen Kraftverteilung gleichmäßig auf die Frakturzone und das Implantat verteilen (RADASCH, 1999).

Die Versuchstiere wiesen ein bis drei Tage nach Frakturierung einen physiologischen Bewegungsablauf auf. Bei Tötung der Tiere zeigten sich lediglich in einem der untersuchten Tiere Anzeichen von Knochenheilungsstörungen, Infekten oder sonstigen Pathologien. Dementsprechend ergab sich kein Anhalt dafür, dass das Frakturmodell oder die Therapie mit EPO Einfluss auf die Wundheilung oder das postoperative Verhalten der Tiere hatte.

Das gewählte Tiermodell kann somit ohne wesentliche Einschränkungen als reproduzierbar und für die Fragestellung geeignet beurteilt werden.

### **6.1.3. EPO-Dosierung**

Über die Wirkung von EPO auf die Frakturheilung ist gegenwärtig noch wenig bekannt. Insbesondere fehlen Dosis-Wirkungsstudien, aus denen sich die optimale Dosierung von EPO mit der Zielsetzung einer verbesserten Frakturheilung ableiten ließe.

In früheren Studien wurde EPO in einer hohen Dosierung von 5000U/kg/d über 5 Tage verabreicht, wobei nach 5 Wochen kein positiver Effekt auf die Frakturheilung mehr nachzuweisen war (HOLSTEIN et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde eine geringere Dosierung von 500U/kg/d über die gesamte Beobachtungsdauer gewählt, um die Effekte einer längerfristigen Therapie zu untersuchen.

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich dabei immer noch um eine relativ hohe Dosis handelt. Zur klinischen Therapie der Anämie beim Menschen empfiehlt der Hersteller eine Maximaldosis von 900U/kg/w EPO (NeoRecormon®, Roche) bis zur Normalisierung des Hämoglobinwertes, die in dieser Studie um mehr als das Dreifache überschritten wurde. Es liegt nahe, dass eine EPO-Therapie mit dem Ziel der Gewebeprotektion oder -regeneration mit höheren Dosen erfolgen muss, da der für diese Effekte verantwortliche Heterorezeptor eine niedrigere Bindungssaffinität zu EPO aufweist als der für die erythropoietische Wirkung zuständige EPOR (BRINES, 2010). Neue, nicht-erythropoietische EPO-Derivate könnten eine Möglichkeit darstellen, die gewebeprotektiven Eigenschaften von EPO zu nutzen, ohne eine übermäßige Stimulation des erythropoietischen Systems zu bedingen (HAND et al., 2011).

### **6.1.4. Radiologische, biomechanische und histologische Verfahren**

Um die biomechanischen, histologischen und proteinbiochemischen Untersuchungen in unserer Studie durchzuführen, mussten die Versuchstiere getötet werden. Grundsätzlich ist es jedoch möglich, mit verschiedenen Bildgebungsverfahren die Frakturheilung auch am lebenden Tier zu analysieren. Mikro-PET- und Mikro-MRT-Untersuchungen, aber auch innovative Verfahren der

molekularen Bildgebung wie etwa Biolumineszenz- oder Nuklear томография eröffnen neue Möglichkeiten der Darstellung von Gewebemorphologie, Genexpression, Proteindegradation, Zellmigration und Zelltod in lebenden Tieren (LU et al., 2005; ZACHOS et al., 2007; LEE et al., 2009). Etablierte Standardverfahren der Knochenbildung sind jedoch hochauflösende Röntgenaufnahmen und 2D- sowie 3D-Mikro-CT-Untersuchungen. Mittels konventioneller Röntgenaufnahmen ist es möglich, Größe und radiologische Dichte des Kallusgewebes sowohl *in vivo* als auch am resezierten Knochen zu analysieren (AUGAT et al., 2005; HOLSTEIN et al., 2007; GARCIA et al., 2008b; HOLSTEIN et al., 2008). In unserer Studie verwendeten wir die konventionelle Röntgendiagnostik, um die Pinlage nach Frakturversorgung sowie vor Tötung der Versuchstiere zu kontrollieren. Die Röntgenaufnahmen vor Tötung der Versuchstiere dienten zudem der quantitativen Analyse der Kallusgröße. Die radiologisch gemessene größere Dichte ging histologisch mit einem größeren Anteil an Knochen im Kallus einher. Dies zeigt, dass die verwendeten Untersuchungsverfahren in sich konsistent sind. Da die Wirkung von Röntgenstrahlung auf die Frakturheilung nicht ausreichend bekannt ist und selbst die Frakturheilung negativ beeinflussen kann, wurde auf wiederholte Röntgenkontrollen während des Untersuchungszeitraumes verzichtet. Hierzu wäre des Weiteren eine wiederholte Narkotisierung der Tiere erforderlich gewesen, was den Heilungserfolg in den einzelnen Gruppen ebenfalls beeinflusst hätte. Da alle Tiere erst wenige Minuten vor dem Ausbau der zu untersuchenden Knochen geröntgt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die Strahlenbelastung minimale oder keine Auswirkungen auf spätere biomechanische oder histologische Analysen hatte. Die Kallusdichtebestimmung im Röntgenbild wird durch Varianzen von Helligkeit des Röntgenbildes und unterschiedlichen Knochendichten der einzelnen Tiere beeinflusst. Um diese Variablen zu exkludieren wurden alle Messergebnisse zu Knochendichtewerten derselben Aufnahme in Relation gesetzt. Auch der Kallusdurchmesser wurde stets im Verhältnis zum Femurdurchmesser bewertet.

Der Goldberg-Score (GOLDBERG et al., 1985) ist nach seinem Erstbeschreiber ein subjektiver Parameter, der auch bei Verblindung der Gruppenzugehörigkeit

zwischen verschiedenen Untersuchern variiert. Der Wert erlaubt daher nur eine qualitative Bewertung der Frakturheilung, jedoch keine quantitativen Bestimmungen.

Die quantitative histologische Auswertung (Histomorphometrie) des Frakturkallus stellt die Standardmethode in der Untersuchung der Frakturheilung dar (GERSTENFELD et al., 2005). In Ergänzung zu histomorphometrischen Untersuchungen ermöglichen immunhistochemische Analysen die in-situ-Detektion von Proteinen wie Zytokinen und Zellmarkern innerhalb des Frakturkallus (HOLSTEIN et al., 2007).

Aufgrund der heterogenen dreidimensionalen Struktur des Frakturkallus ist es schwierig, histologisch die Volumina der einzelnen Gewebe zu ermitteln. Standardisierte longitudinale Schnittpräparate im Bereich des maximalen Femurdurchmessers ermöglichen hierbei dennoch eine reproduzierbare und repräsentative Auswertung der Kallusgröße sowie der Gewebezusammensetzung des Frakturkallus. Entsprechend wählten wir in Anlehnung an vergleichbare Frakturstudien an Maus und Ratte eine longitudinale middiaphysäre Schnittführung, um den Frakturkallus histomorphometrisch auszuwerten (GERSTENFELD et al., 2005). Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, sowohl kalzifizierten als auch dekalzifizierten Knochen histologisch aufzuarbeiten (GERSTENFELD et al., 2005). Ein Nachteil histomorphometrischer Analysen am dekalzifizierten Knochen liegt darin, dass nicht zwischen mineralisiertem und nicht-mineralisiertem Knochen unterschieden werden kann.

Die histologischen Präparate wurden mit der Masson-Goldner-Methode gefärbt, da sich unter dieser Färbung Knochen- und Knorpelstrukturen sehr gut darstellen und unterscheiden lassen. Sie gilt als eine Standardmethode zur Färbung von Knochenpräparaten und wird in zahlreichen Studien beschrieben (HOROBIN, 2002). Die Untersuchung verschiedener Parameter des Frakturkallus anhand der histologischen Präparate wurde in Übereinstimmung mit den ASBMR-Kriterien durchgeführt (PARFITT et al., 1987). Die Differenzierung der Zusammensetzung des Kallusgewebes (Knochen, Knorpel, Bindegewebe) und der Größenausmaße der

Kallusfläche dienten der Beurteilung des Verlaufs der Frakturheilung (HANKEMEIER et al., 2001).

CD31, auch bekannt als PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule) ist ein Zell-Adhäsions-Molekül, das spezifisch auf Endothelzellen exprimiert wird (WOODFIN et al., 2007). In Tiermodellen wird CD31 häufig als Marker für Gefäße verwendet und im Rahmen immunhistologischer Untersuchungen angefärbt (LINDENBLATT et al., 2010). Neben CD31 stehen weitere Marker zur Verfügung, beispielsweise Smooth muscle actin, welches in glatter Muskulatur in der Tunica media von Gefäßwänden von großen und kleinen Arterien, Arteriolen und Venen exprimiert wird und ebenfalls als Gefäßmarker verwendet werden kann (SKALLI et al., 1986). Da Kapillaren jedoch keine Tunica media besitzen, können sie mit dieser Methode immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden.

Generell stehen für die biomechanische Knochentestung drei etablierte Verfahren zur Verfügung: Die 3-Punkt-Biegung, die 4-Punkt-Biegung und die Rotationstestung. Der Nachteil der 3-Punkt-Biegung liegt in der maximalen Belastung über nur einem Punkt des Knochens. Im Gegensatz dazu wird bei der 4-Punkt-Biegung die maximale Kraft über eine größere Fläche verteilt (BURSTEIN et al., 1971). Bei einer durchschnittlichen Länge des Mäusefemurs von etwa 15 mm (MANIGRASSO et al., 2004) ist die Verwendung einer 4-Punkt-Biegung jedoch technisch schwer umsetzbar. Zur mechanischen Testung der Knochen wurde in der vorliegenden Arbeit eine 3-Punkt-Biegung verwendet. Grund hierfür war die Möglichkeit, die Untersuchung im Sinne einer nichtdestruktiven Biegungstestung auszuführen. So wurden die analysierten Knochen nicht beschädigt und konnten für die anschließende Anfertigung histologischer Schnittpräparate verwendet werden. Hierdurch konnte die Anzahl der Versuchstiere halbiert werden. Auf eine Testung der Rotationsstabilität, in anderen Arbeiten als Methode zur mechanischen Analyse der Knochenstabilität verwendet (HOLSTEIN et al., 2007; GARCIA et al., 2008a), wurde verzichtet, da dabei der Knochen für eine präzise histologische Auswertung zu stark beschädigt wird.

## 6.2. Diskussion der Ergebnisse

### 6.2.1. Einfluss von EPO auf die Erythropoiese

Die bislang therapeutisch wichtigste und namensgebende Funktion von EPO ist die Stimulation der Erythropoiese. Die Entwicklung eines Proerythoblasten zum Retikulozyten dauert etwa 7 Tage, kann aber unter zusätzlicher Stimulation durch einen akuten Anstieg des Plasmaspiegels von EPO auf 3–4 Tage verkürzt werden (JELKMANN, 2004). In 1–2 Tagen reift der Retikulozyt zum Erythrozyten heran. Hierdurch lässt sich hinreichend erklären, dass die EPO-Gruppe zu allen Untersuchungszeitpunkten höchstsignifikant erhöhte Werte von Hämoglobin, Hämatokrit und Erythrozytenzahl aufwies. Die gesteigerte Erythropoiese kann somit als Beweis der biologischen Wirksamkeit von EPO in der gewählten Dosis und Applikationsart angesehen werden. Inwieweit der erhöhte Hämatokrit selbst einen Einfluss auf die Frakturheilung hat, ist nicht bekannt. Der deutliche Anstieg des Hämatokrits wirkt sich jedoch negativ auf Rheologie und Mikrozirkulation aus und könnte die Frakturheilung somit negativ beeinflussen. Da es unter EPO jedoch zu einer verbesserten Frakturheilung kam, gehen wir davon aus, dass die nicht-hämatopoietischen Effekte von EPO dafür verantwortlich sind.

In der 2. bis 5. Woche kam es zu keinem zusätzlichen Anstieg der Hämoglobinkonzentration unter fortgesetzter Behandlung. Dies könnte auf eine Erschöpfung des erythropoietischen Potentials oder eine Herunterregulierung, beispielsweise durch eine reduzierte Rezeptorexpression, zurückzuführen sein.

Die Hämoglobinkonzentration der Kontrollgruppe blieb ebenfalls stabil, weshalb wir davon ausgehen, dass die Versuchstiere durch die Operation keinen kritischen Blutverlust erlitten. Daher erscheint es unwahrscheinlich, dass die positive Wirkung von EPO auf die Frakturheilung auf die Korrektur einer Blutungsanämie zurückzuführen ist.

### **6.2.2. Einfluss von EPO auf die Frakturheilung**

Nach 2 Wochen zeigte sich eine Zunahme des radiologischen Kallusdurchmessers sowie der Kallusdichte unter der EPO-Therapie. Zu diesem Zeitpunkt kommt es zur Mineralisierung des weichen Kallus und Resorption des Knorpels.

Im Rahmen der einsetzenden enchondralen Ossifikation wird neuer Geflechtknochen gebildet. Eine wichtige Voraussetzung dafür ist die Angiogenese, die bereits am 3. Tag der Frakturheilung beginnt (DIMITRIOU et al., 2005). Eine erhöhte Röntgendiffenz des Kallus ist zu diesem Zeitpunkt durch eine fortgeschrittene Kalzifikation zu erklären. Während nach 5 Wochen der Kallusdurchmesser bei beiden Gruppen gleich war, zeigte die EPO-Gruppe immer noch eine erhöhte Kallusdichte. Somit war der Grad der Mineralisierung zu beiden Untersuchungszeitpunkten höher. Die Kallusbildung erreicht bei der Maus zwischen 14 und 21 Tagen ihren Höhepunkt und es kommt nach 21 bis 28 Tagen zu einer knöchernen Konsolidierung der Fraktur. Danach wird der entstandene Geflechtknochen im Rahmen des einsetzenden Remodelings zu lammellärem Knochen umgewandelt (DIMITRIOU et al., 2005). Wir gehen daher davon aus, dass die beobachtete Erhöhung der radiologischen Dichte in Tieren, welche mit EPO behandelt wurden auf eine vermehrte Knochenbildung und Mineralisierung hinweisen.

Das radiologische Scoring zeigte keine Unterschiede in der Frakturheilung. Der verwendete Score wurde ursprünglich zur Verwendung in einem Hundemodell entwickelt (GOLDBERG et al., 1985) und ist möglicherweise für die deutlich kleineren Aufnahmen des durchschnittlich 15mm langen Mäusefemurs mit einem Defekt von 0.25mm nicht sensitiv genug. Zusätzlich variieren die Ergebnisse aufgrund des subjektiven Charakters des Score je nach Untersucher, weshalb wir die Bedeutung der Methode zur objektiven Quantifizierung der Frakturheilung als verhältnismäßig gering einschätzen.

Im Hinblick auf eine mögliche spätere klinische Anwendung stellt die Belastbarkeit ein überaus wichtiges Kriterium für den Therapieerfolg dar. Zu beiden Untersuchungszeitpunkten präsentieren sich die Femora der Studiengruppe belastbarer und mit einer signifikant erhöhten Biegesteifigkeit. Diese mechanische

Verbesserung der Frakturheilung ist übereinstimmend mit der radiologisch erhöhten Kallusdichte sowie der histologisch fortgeschrittenen Ossifikation des Kallus.

Die Tatsache, dass die Frakturheilung in der biomechanischen Analyse in der Kontrollgruppe auch nach 5 Wochen noch nicht vollständig abgeschlossen war, lässt sich dadurch erklären, dass es bei einer offenen Osteotomie mit einem Defekt von 0.25mm zu einer verzögerten Heilung im Vergleich zu einer geschlossenen Fraktur ohne Substanzdefekt kommt.

EPO führt zu einer insgesamt akzelerierten Frakturheilung, durch eine erhöhte enchondrale Ossifikation entsteht mehr mineralisierter Knochen und dadurch eine höhere Steifigkeit. Die zu beiden Untersuchungszeitpunkten höhere Steifigkeit der EPO-Gruppe ist darauf zurückzuführen, dass der Kallus nach 2 Wochen mehr Knochen enthielt und nach 5 Wochen mehr lammellären Knochen von besserer Qualität. Lammellärer Knochen besitzt eine höhere Dichte, hochgradig organisierte Struktur und erhöhte mechanische Stabilität (WEINER et al., 1992).

Nach 2 und 5 Wochen zeigte sich histologisch eine verbesserte Frakturheilung. In der Kontrollgruppe waren nach 5 Wochen lediglich die Hälften der Femora vollständig geheilt. Frühere Studien zeigen nach 3–4 Wochen bereits eine Konsolidierung, im Gegensatz zu diesen Studien führten wir jedoch eine offene Osteotomie durch, die einen Weichteilschaden verursacht, welcher sich negativ auf die Frakturheilung auswirkt. Zudem entspricht der 0.25mm messende Defekt etwa 20% des Femurdurchmessers und führt daher ebenfalls zu einer verzögerten Heilung.

Weder im Kallusdurchmesser noch in der Kallusfläche im Längsschnitt fanden sich histologisch zu einem der beiden Untersuchungszeitpunkte Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Kalluszusammensetzung unterschied sich jedoch nach 2 Wochen deutlich: Während der Knochenanteil der Kontrollgruppe 27% betrug, lag er in der Studiengruppe bei 96%. Der deutlich erhöhte Anteil an Knochen im Kallus erklärt zum einen die höhere Knochensteifigkeit, zum anderen, warum der Kallus radiologisch größer erscheint, da der Weichteilanteil nicht röntgendicht ist. Nach 5 Wochen bestand der Kallus beider Gruppen weitestgehend aus Knochen, wobei nicht zwischen Gewebeknochen und lammellärem Knochen unterschieden wurde. Die Behandlung mit EPO führte somit zu einer gesteigerten enchondralen Ossifikation. Hierdurch kam es nicht zu einer quantitativen Zunahme des

Frakturkallus, sondern zu einer qualitativen Verbesserung mit signifikant höherem Knochenanteil.

### **6.2.3. Mechanismen der verbesserten Knochenheilung durch EPO**

Wir waren erstmalig in der Lage, eine Zunahme der Vaskularisierung unter EPO-Therapie während der Fakturheilung nachzuweisen. Diese Zunahme der Gefäßdichte war beschränkt auf den endostalen Bereich. In den zentralen und periostalen Bereichen des Kallus war dieser Effekt nicht zu beobachten. Dass EPO sein regeneratives Potential unter Anderem durch eine Zunahme der Vaskularisation erreicht, ist von vorherigen Studien in Hautwunden bekannt (BUEMI et al., 2004; GALEANO et al., 2004). Der Wirkungsort der hämatopoetischen Effekte von EPO liegt im Knochenmark, wo es die Anzahl von Stammzellen, Progenitorzellen und CFU erhöht (HEESCHEN et al., 2003). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass EPO zu einer Steigerung der Angiogenese im Knochenmark führt (PELLETIER et al., 2000). Aus unseren Ergebnissen folgern wir daher, dass EPO sein größtes vaskulogenetisches Potential im Knochenmark entfaltet.

PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ist ein Proliferationsmarker, der bei gesteigerter Zellteilung erhöht ist und klinisch unter anderem zum Grading von Tumoren eingesetzt wird. Im Kallus der Versuchstiere ließ sich keine erhöhte Expression von PCNA nachweisen. Die Wirkung von EPO scheint daher nicht auf einer gesteigerten Zellproliferation zu beruhen, sondern gegebenenfalls auf einer Beeinflussung der Zelldifferenzierung.

NFkB ist ein früher Transkriptionsfaktor der Entzündungsreaktion und führt zur Hochregulation vieler proinflammatorischer Moleküle (GHOSH et al., 2008). Die verringerte Expression in der EPO-Gruppe kann als Anzeichen einer geringeren Entzündungsreaktion interpretiert werden, die unter EPO-Therapie mehrfach nachgewiesen wurde (LIU et al., 2006; TOTH et al., 2008; ZHU et al., 2009). Darüber hinaus konnten andere Studien zeigen, dass EPO zu einer Modulation der

Immunantwort führt (KATZ et al., 2007), zu geringerer Nekroserate (SIREN et al., 2001; HARDER et al., 2009) und zu verminderter Zytokinproduktion (VILLA et al., 2003). Inwiefern sich dieser Effekt auf die Knochenregeneration auswirkt, ist anhand der vorliegenden Arbeit nicht zu beurteilen, da eine Entzündungsreaktion sowohl positive (YAMAGUCHI et al., 2009) als auch negative (REIKERAS et al., 2007) Auswirkungen auf die Frakturheilung haben kann. Im Allgemeinen wird jedoch davon ausgegangen, dass starke Entzündungen die Frakturheilung beeinträchtigen indem sie die Neubildung von Knochen hemmen und die Resorption fördern (TANIZAWA et al., 2000). Der größere Anteil von Knochen im Fraktuskallus könnte somit Folge einer geringeren Entzündungsreaktion im Kallusgewebe sein.

Im Blut der Studiengruppe fand sich eine signifikant erhöhte Anzahl von endothelialen Progenitorzellen (EPC). In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass EPO zur Mobilisierung von EPC aus dem Knochenmark führt (HEESCHEN et al., 2003) und diese eine Vaskularisierung fördern können (WERNER et al., 2002). Andere Studien haben gezeigt, dass EPC auch zur Frakturheilung beitragen können (LAING et al., 2007; LEE et al., 2008; MATSUMOTO et al., 2008a; ATESOK et al., 2010). EPC werden dabei zur Frakturstelle rekrutiert und fördern durch Neovaskularisierung den Prozess der Frakturheilung (MATSUMOTO et al., 2008b). Die Transplantation von EPC führt durch eine Stimulation von Osteogenese und Vaskulogenese zu einer verbesserten Frakturheilung (MATSUMOTO et al., 2006; MATSUMOTO et al., 2008a).

EPC tragen möglicherweise nicht nur zu einer verbesserten Angiogenese bei, sondern differenzieren auch zu osteoblastischen Zellen (MATSUMOTO et al., 2008a; ATESOK et al., 2010). Dies kann somit Ursache für einen erhöhten Knochenanteil im Kallusgewebe unter EPO-Therapie sein. Inwieweit die erhöhte Anzahl peripher zirkulierender EPC die Angiogenese oder Osteogenese stimuliert, ist anhand der vorliegenden Arbeit nicht zu beantworten.

### 6.3. Zusammenfassung

Das gewählte Tiermodell wurde mehrfach publiziert, ist gut reproduzierbar und für die Fragestellung geeignet. Bei seiner Anwendung kam es zu einer geringen Komplikationsrate, die im akzeptablen Bereich tierexperimenteller Studien liegt. Für die Dosierung von EPO zur Beeinflussung der Frakturheilung existieren kaum Erfahrungswerte. Im Vergleich zu vorhergehenden Studien wurde in der vorliegenden Arbeit eine zehnfach geringere Dosis gewählt, die jedoch immer noch über der beim Menschen angewandten Dosierung zur Therapie der Anämie liegt. EPO wurde dabei über den gesamten Beobachtungszeitraum appliziert. Die Analysen erfolgten mittels etablierten radiologischen, histologischen, biomechanischen sowie biochemischen Verfahren.

In der hämatologischen Analyse zeigte sich unter EPO-Therapie eine gesteigerte Erythrozytenzahl und ein erhöhter Hämatokrit, was als Wirkungsnachweis des Präparates und der Applikationsform angesehen werden kann. In der radiologischen Analyse zeigte sich in der EPO-Gruppe eine erhöhte Kallusdichte, die wir als Ausdruck einer vermehrten Knochenbildung und Mineralisierung ansehen. In der biomechanischen Analyse zeigte sich eine erhöhte Biegesteifigkeit unter EPO-Therapie als Ausdruck einer vermehrten Knochenbildung und besseren Knochenqualität. In der histologischen Analyse fanden sich keine Hinweise auf quantitative Unterschiede in der Kallusbildung, jedoch eine qualitativ verbesserte Frakturheilung mit einem erhöhten Knochenanteil des Kallus unter EPO-Therapie. Die Western-Blot-Analyse zeigte eine verminderte Expression des entzündungsassoziierten Transkriptionsfaktors NFkB. In der durchflusszytometrischen Analyse fand sich eine erhöhte Anzahl von EPC in der EPO-Gruppe.

In einer früheren Studie, die die Effekte von EPO auf die Frakturheilung von Ratten in einem Modell mit offener Osteotomie und interner Fixierung untersuchte, wurde EPO in niedrigerer Dosierung (200U/kg/d) über einen Zeitraum von nur 7 Tagen appliziert (BOZLAR et al., 2006). Die biomechanische Testung zeigte nach 3 Wochen eine erhöhte Biegesteifigkeit, histologisch wurde eine erhöhte Rate von

knöcherner Überbrückung und ein gesteigertes Remodeling des Kallus nachgewiesen.

In einer weiteren Studie an einem Mausmodell mit geschlossener Osteotomie und interner Fixierung wurde eine deutlich höhere EPO-Dosis von 5000U/kg/d über einen Zeitraum von 6 Tagen verwendet (HOLSTEIN et al., 2007). Nach 2 Wochen EPO-Gabe zeigten sich eine erhöhte Torsionssteifigkeit und eine radiologisch erhöhte Kallusdichte, sowie ein histologisch erhöhter Knochenanteil im Kallus. Nach 5 Wochen konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen mehr nachgewiesen werden.

Den in diesen Studien nachgewiesenen positiven Einfluss von EPO auf die Frakturheilung können wir in der vorliegenden Arbeit bestätigen. Die Tatsache, dass sich unter der hier verwendeten Dosis und Therapiedauer auch nach 5 Wochen noch eine Verbesserung der Frakturheilung fand, spricht für eine längere Applikationsdauer. Die Wirksamkeit der gewählten Dosis konnte bestätigt werden. Zur für die Frakturheilung optimalen Dosierung kann bei fehlender Vergleichbarkeit der Modelle und ungenügenden Daten noch keine Aussage getroffen werden. Die vorliegenden Ergebnisse legen eine im Vergleich niedrigere Dosierung nahe, die jedoch über einen längeren Zeitraum verabreicht wird.

Aufgrund unserer Ergebnisse sowie der aktuellen Studienlage gehen wir davon aus, dass der positive Einfluss von EPO auf die Frakturheilung mit einer gesteigerten Vaskularisierung des Frakturkallus zusammenhängt, die wiederum die Mineralisierung und den Knochenumbau beschleunigt. Eine kontinuierlich verbesserte Vaskularisierung unter EPO-Gabe könnte erklären, warum die Knochenheilung auch 2 Wochen postoperativ noch durch EPO beeinflusst wird.

#### **6.4. Schlussfolgerung**

Von den klinisch eingesetzten rekombinanten Wachstumsfaktoren hat EPO die größte Verbreitung. Zu den häufigsten Indikationen zählt ein Erythrozytenmangel im

Rahmen einer renalen Anämie, Tumoranämie oder Anämie in Folge einer Zytostatikatherapie.

In den letzten Jahren ist in der Forschung das gewebeprotektive und regenerative Potential von EPO in den Vordergrund gerückt. Im Tiermodell konnten bereits positive Effekte auf die Frakturheilung nachgewiesen werden. Die Anwendung hoher Dosen über einen kurzen Zeitraum hatte jedoch nur einen vorübergehenden Effekt. Dabei könnte ein kritischer Anstieg des Hämatokrits aufgrund veränderter Rheologie sogar nachteilige Konsequenzen auf die Frakturheilung haben. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung in niedrigerer Dosierung über einen längeren Zeitraum eine nachhaltigere Wirkung entfaltet. Radiologisch, histologisch und biomechanisch lässt sich eine verbesserte Frakturheilung nachweisen. Diese ist nicht durch eine gesteigerte Kallusbildung, sondern durch eine erhöhte Kallusqualität mit vermehrter Knochbildung bedingt, was mit einer radiologisch höheren Dichte und biomechanisch höheren Steifigkeit einhergeht. Darüber hinaus bewirkt EPO eine Verminderung der Entzündungsreaktion im Kallus und erhöht die endostale Angiogenese sowie die Anzahl zirkulierender EPC.

Die Verbesserung der Frakturheilung unter EPO ist möglicherweise durch eine Verbesserung der Angiogenese und Vaskularisierung zu erklären. Diese wiederum kann erklärt werden durch die erhöhte Anzahl an EPC in mit EPO behandelten Tieren.

EPC können darüber hinaus direkt zu osteoblastischen Zellen differenzieren, was für den erhöhten Anteil an Knochen und die höhere biomechanische Steifigkeit der mit EPO behandelten Tiere verantwortlich sein kann.

EPO ist ein klinisch langjährig eingesetzter Wachstumsfaktor mit einem gut bekannten Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil. Hierdurch wäre die klinische Anwendung von EPO zur Verbesserung der Frakturheilung deutlich vereinfacht. Inwieweit EPO analog zu den hier beobachteten Effekten im Mausmodell in der Lage ist, beim Menschen die Frakturheilung zu verbessern, muss in zukünftigen klinischen Studien gezeigt werden.

## 7. Literaturverzeichnis

---

1. Ammarguellat F, Gogusev J, Drueke TB (1996) Direct effect of erythropoietin on rat vascular smooth-muscle cell via a putative erythropoietin receptor. *Nephrol Dial Transplant* 11:687-692
2. Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT (1994) Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3974-3978
3. Arcasoy MO (2008) The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Haematol* 141:14-31
4. Atesok K, Li R, Stewart DJ, Schemitsch EH (2010) Endothelial progenitor cells promote fracture healing in a segmental bone defect model. *J Orthop Res* 28:1007-1014
5. Auer JA, Goodship A, Arnoczky S, Pearce S, Price J, Claes L, von Rechenberg B, Hofmann-Amtenbrinck M, Schneider E, Muller-Terpitz R, Thiele F, Rippe KP, Grainger DW (2007) Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. *BMC Musculoskelet Disord* 8:72
6. Augat P, Simon U, Liedert A, Claes L (2005) Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. *Osteoporos Int* 16 Suppl 2:S36-43
7. Becker V, Schilling M, Bachmann J, Baumann U, Raue A, Maiwald T, Timmer J, Klingmuller U (2010) Covering a broad dynamic range: information processing at the erythropoietin receptor. *Science* 328:1404-1408

8. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E (1999) A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:643-651
9. Bikfalvi A, Han ZC (1994) Angiogenic factors are hematopoietic growth factors and vice versa. *Leukemia* 8:523-529
10. Bokemeyer C, Aapro MS, Courdi A, Foubert J, Link H, Osterborg A, Repetto L, Soubeyran P (2007) EORTC guidelines for the use of erythropoietic proteins in anaemic patients with cancer: 2006 update. *Eur J Cancer* 43:258-270
11. Bozlar M, Kalaci A, Aslan B, Bakiroglu L, Yanat AN, Tasci A (2006) Effects of erythropoietin on fracture healing in rats. *Saudi Med J* 27:1267-1269
12. Brines M (2010) The therapeutic potential of erythropoiesis-stimulating agents for tissue protection: a tale of two receptors. *Blood Purif* 29:86-92
13. Brines M, Cerami A (2011) The receptor that tames the innate immune response. *Mol Med*
14. Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, Latini R, Xie QW, Smart J, Su-Rick CJ, Pobre E, Diaz D, Gomez D, Hand C, Coleman T, Cerami A (2004) Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14907-14912
15. Brines M, Patel NS, Villa P, Brines C, Mennini T, De Paola M, Erbayraktar Z, Erbayraktar S, Sepedes B, Thiemermann C, Ghezzi P, Yamin M, Hand CC, Xie QW, Coleman T, Cerami A (2008) Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10925-10930

16. Buemi M, Galeano M, Sturiale A, Ientile R, Crisafulli C, Parisi A, Catania M, Calapai G, Impala P, Aloisi C, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A, Tuccari G, Frisina N (2004) Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and healing of ischemic skin wounds. *Shock* 22:169-173
17. Burstein AH, Frankel VH (1971) A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech* 4:155-158
18. Carter DR, Van Der Meulen MC, Beaupre GS (1996) Mechanical factors in bone growth and development. *Bone* 18:S-10S
19. Cassidy LD (2005) Basic concepts of statistical analysis for surgical research. *J Surg Res* 128:199-206
20. Chatterjee PK (2005) Pleiotropic renal actions of erythropoietin. *Lancet* 365:1890-1892
21. Cheung KM, Kaluarachi K, Andrew G, Lu W, Chan D, Cheah KS (2003) An externally fixed femoral fracture model for mice. *J Orthop Res* 21:685-690
22. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (2002) Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 17:513-520
23. Claes LE, Heigle CA, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D, Seidl W, Margevicius KJ, Augat P (1998) Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clin Orthop Relat Res*:S132-147
24. Conrad KP, Benyo DF, Westerhausen-Larsen A, Miles TM (1996) Expression of erythropoietin by the human placenta. *Faseb J* 10:760-768
25. Contaldo C, Meier C, Elsherbiny A, Harder Y, Trentz O, Menger MD, Wanner GA (2007) Human recombinant erythropoietin protects the striated muscle microcirculation of the dorsal skinfold from postischemic injury in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H274-283

26. D'Andrea RJ, Gonda TJ (2000) A model for assembly and activation of the GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors: insights from activated mutants of the common beta subunit. *Exp Hematol* 28:231-243
27. Dai J, Rabie AB (2007) VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *J Dent Res* 86:937-950
28. Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, van Der Bent C, Papapoulos SE, Lowik CW (2002) Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 143:1545-1553
29. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV (2005) Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 36:1392-1404
30. Einhorn TA (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*:S7-21
31. Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA (1999) Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* 87:57-66
32. Ferrara N, Davis-Smyth T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18:4-25
33. Friedman RJ, An YH, Ming J, Draughn RA, Bauer TW (1996) Influence of biomaterial surface texture on bone ingrowth in the rabbit femur. *J Orthop Res* 14:455-464
34. Gajdoranski D, Zivkovic D (2003) [Disorders in fracture healing]. *Med Pregl* 56:146-151
35. Galeano M, Altavilla D, Cucinotta D, Russo GT, Calo M, Bitto A, Marini H, Marini R, Adamo EB, Seminara P, Minutoli L, Torre V, Squadrito F (2004) Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetes* 53:2509-2517

36. Garcia P, Holstein JH, Histing T, Burkhardt M, Culemann U, Pizanis A, Wirbel RJ, Pohleman T, Menger MD (2008a) A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: impact of stability on fracture healing. *J Biomech* 41:1689-1696
37. Garcia P, Holstein JH, Maier S, Schaumloffel H, Al-Marrawi F, Hannig M, Pohleman T, Menger MD (2008b) Development of a reliable non-union model in mice. *J Surg Res* 147:84-91
38. Garcia P, Schwenzer S, Slotta JE, Scheuer C, Tami AE, Holstein JH, Histing T, Burkhardt M, Pohleman T, Menger MD (2010) Inhibition of angiotensin-converting enzyme stimulates fracture healing and periosteal callus formation - role of a local renin-angiotensin system. *Br J Pharmacol* 159:1672-1680
39. Geiger F, Bertram H, Berger I, Lorenz H, Wall O, Eckhardt C, Simank HG, Richter W (2005) Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J Bone Miner Res* 20:2028-2035
40. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA (2003) Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 88:873-884
41. Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA (2005) Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. *J Bone Miner Res* 20:1715-1722
42. Ghezzi P, Brines M (2004) Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death Differ* 11 Suppl 1:S37-44
43. Ghosh S, Hayden MS (2008) New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* 8:837-848

44. Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF (1988) Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 242:1412-1415
45. Goldberg VM, Powell A, Shaffer JW, Zika J, Bos GD, Heiple KG (1985) Bone grafting: role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res* 3:389-404
46. Greenberg DA, Jin K (2005) From angiogenesis to neuropathology. *Nature* 438:954-959
47. Gruber M, Hu CJ, Johnson RS, Brown EJ, Keith B, Simon MC (2007) Acute postnatal ablation of Hif-2alpha results in anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2301-2306
48. Hand CC, Brines M (2011) Promises and pitfalls in erythropoietin-mediated tissue protection: are nonerythropoietic derivatives a way forward? *J Investig Med* 59:1073-1082
49. Hankemeier S, Grassel S, Plenz G, Spiegel HU, Bruckner P, Probst A (2001) Alteration of fracture stability influences chondrogenesis, osteogenesis and immigration of macrophages. *J Orthop Res* 19:531-538
50. Harder Y, Amon M, Schramm R, Contaldo C, Metzkow E, Matzen A, Rucker M, Vollmar B, Menger MD (2009) Erythropoietin reduces necrosis in critically ischemic myocutaneous tissue by protecting nutritive perfusion in a dose-dependent manner. *Surgery* 145:372-383
51. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S (2003) Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 102:1340-1346
52. Holstein JH, Klein M, Garcia P, Histing T, Culemann U, Pizanis A, Laschke MW, Scheuer C, Meier C, Schorr H, Pohleman T, Menger MD (2008)

- Rapamycin affects early fracture healing in mice. Br J Pharmacol 154:1055-1062
53. Holstein JH, Menger MD, Scheuer C, Meier C, Culemann U, Wirbel RJ, Garcia P, Pohleman T (2007) Erythropoietin (EPO): EPO-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing. Life Sci 80:893-900
54. Horner K, Loeffler K, Holtzmann M (1997) Comparison of the histologic structure of the compact bone of the long hollow bones of mouse, hamster, rat, guinea pig, rabbit, cat, and dog during development. Anat Histol Embryol 26:289-295
55. Horobin RW (2002) Biological staining: mechanisms and theory. Biotech Histochem 77:3-13
56. Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck KH (2002) Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. Microvasc Res 64:326-333
57. Jelkmann W (2004) Molecular biology of erythropoietin. Intern Med 43:649-659
58. Joyeux-Faure M, Godin-Ribuot D, Ribuot C (2005) Erythropoietin and myocardial protection: what's new? Fundam Clin Pharmacol 19:439-446
59. Jubinsky PT, Krijanovski OI, Nathan DG, Tavernier J, Sieff CA (1997) The beta chain of the interleukin-3 receptor functionally associates with the erythropoietin receptor. Blood 90:1867-1873
60. Jurado Garcia JM, Torres Sanchez E, Olmos Hidalgo D, Alba Conejo E (2007) Erythropoietin pharmacology. Clin Transl Oncol 9:715-722

61. Kaivosoja SM, Mattila PT, Knuutila ML (2008) Dietary xylitol protects against the imbalance in bone metabolism during the early phase of collagen type II-induced arthritis in dark agouti rats. *Metabolism* 57:1052-1055
62. Katz O, Gil L, Lifshitz L, Prutchi-Sagiv S, Gassmann M, Mittelman M, Neumann D (2007) Erythropoietin enhances immune responses in mice. *Eur J Immunol* 37:1584-1593
63. Koch C, Kandziora F, Huenigen H, Plendl J (2008) Histological evaluation of the sheep's cervical spine segment 3/4--a histomorphological and histomorphometrical study. *Anat Histol Embryol* 37:200-204
64. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (2001) Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 16:1004-1014
65. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
66. Laing AJ, Dillon JP, Condon ET, Street JT, Wang JH, McGuinness AJ, Redmond HP (2007) Mobilization of endothelial precursor cells: systemic vascular response to musculoskeletal trauma. *J Orthop Res* 25:44-50
67. Lee DY, Cho TJ, Kim JA, Lee HR, Yoo WJ, Chung CY, Choi IH (2008) Mobilization of endothelial progenitor cells in fracture healing and distraction osteogenesis. *Bone* 42:932-941
68. Lee SW, Padmanabhan P, Ray P, Gambhir SS, Doyle T, Contag C, Goodman SB, Biswal S (2009) Stem cell-mediated accelerated bone healing observed with in vivo molecular and small animal imaging technologies in a model of skeletal injury. *J Orthop Res* 27:295-302

69. Lindenblatt N, Platz U, Althaus M, Hegland N, Schmidt CA, Contaldo C, Vollmar B, Giovanoli P, Calcagni M (2010) Temporary angiogenic transformation of the skin graft vasculature after reperfusion. *Plast Reconstr Surg* 126:61-70
70. Liu C, Shen K, Liu Z, Noguchi CT (1997) Regulated human erythropoietin receptor expression in mouse brain. *J Biol Chem* 272:32395-32400
71. Liu X, Shen J, Jin Y, Duan M, Xu J (2006) Recombinant human erythropoietin (rhEPO) preconditioning on nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) activation & proinflammatory cytokines induced by myocardial ischaemia-reperfusion. *Indian J Med Res* 124:343-354
72. Lu C, Miclau T, Hu D, Hansen E, Tsui K, Puttlitz C, Marcucio RS (2005) Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *J Orthop Res* 23:1300-1307
73. Magnanti M, Gandini O, Giuliani L, Gazzaniga P, Marti HH, Gradilone A, Frati L, Agliano AM, Gassmann M (2001) Erythropoietin expression in primary rat Sertoli and peritubular myoid cells. *Blood* 98:2872-2874
74. Malizos KN, Papatheodorou LK (2005) The healing potential of the periosteum molecular aspects. *Injury* 36 Suppl 3:S13-19
75. Manigrasso MB, O'Connor JP (2004) Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma* 18:687-695
76. Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M (1996) Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* 8:666-676
77. Masuda S, Kobayashi T, Chikuma M, Nagao M, Sasaki R (2000) The oviduct produces erythropoietin in an estrogen- and oxygen-dependent manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E1038-1044

78. Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, Ishikawa M, Mifune Y, Iwasaki H, Miwa M, Horii M, Hayashi S, Oyamada A, Nishimura H, Murasawa S, Doita M, Kurosaka M, Asahara T (2006) Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by peripheral blood CD34-positive cells for functional bone healing. *Am J Pathol* 169:1440-1457
79. Matsumoto T, Kuroda R, Mifune Y, Kawamoto A, Shoji T, Miwa M, Asahara T, Kurosaka M (2008a) Circulating endothelial/skeletal progenitor cells for bone regeneration and healing. *Bone* 43:434-439
80. Matsumoto T, Mifune Y, Kawamoto A, Kuroda R, Shoji T, Iwasaki H, Suzuki T, Oyamada A, Horii M, Yokoyama A, Nishimura H, Lee SY, Miwa M, Doita M, Kurosaka M, Asahara T (2008b) Fracture induced mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for bone healing. *J Cell Physiol* 215:234-242
81. McKibbin B (1978) The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 60-B:150-162
82. Miclau T, Helms JA (2000) Molecular aspects of fracture healing. *Current Opinion in Orthopaedics* 11:367–371.
83. Nunamaker DM (1998) Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*:S56-65
84. Ogilvie M, Yu X, Nicolas-Metral V, Pulido SM, Liu C, Ruegg UT, Noguchi CT (2000) Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. *J Biol Chem* 275:39754-39761
85. Pankratova S, Kiryushko D, Sonn K, Soroka V, Kohler LB, Rathje M, Gu B, Gotfryd K, Clausen O, Zharkovsky A, Bock E, Berezin V (2010) Neuroprotective properties of a novel, non-haematopoietic agonist of the erythropoietin receptor. *Brain*

86. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987) Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2:595-610
87. Pelletier L, Regnard J, Fellmann D, Charbord P (2000) An in vitro model for the study of human bone marrow angiogenesis: role of hematopoietic cytokines. *Lab Invest* 80:501-511
88. Peng H, Wright V, Usas A, Gearhart B, Shen HC, Cummins J, Huard J (2002) Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J Clin Invest* 110:751-759
89. Radasch RM (1999) Biomechanics of bone and fractures. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29:1045-1082, v-vi
90. Reddi AH (2001) Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1:S1-6
91. Reikeras O, Wang JE, Foster SJ, Utvag SE (2007) *Staphylococcus aureus* peptidoglycan impairs fracture healing: an experimental study in rats. *J Orthop Res* 25:262-266
92. Rezaeian F, Wettstein R, Egger JF, Sandmann F, Rucker M, Tobalem M, Vollmar B, Menger MD, Harder Y (2010) Erythropoietin-induced upregulation of endothelial nitric oxide synthase but not vascular endothelial growth factor prevents musculocutaneous tissue from ischemic damage. *Lab Invest* 90:40-51
93. Riksen NP, Hausenloy DJ, Yellon DM (2008) Erythropoietin: ready for prime-time cardioprotection. *Trends Pharmacol Sci* 29:258-267

94. Rosen V (2006) BMP and BMP inhibitors in bone. *Ann N Y Acad Sci* 1068:19-25
95. Rossant J, Nagy A (1995) Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat Med* 1:592-594
96. Rotter R, Menshykova M, Winkler T, Matziolis G, Stratos I, Schoen M, Bittorf T, Mittlmeier T, Vollmar B (2008) Erythropoietin improves functional and histological recovery of traumatized skeletal muscle tissue. *J Orthop Res*
97. Santhanam AV, d'Uscio LV, Peterson TE, Katusic ZS (2008) Activation of endothelial nitric oxide synthase is critical for erythropoietin-induced mobilization of progenitor cells. *Peptides* 29:1451-1455
98. Schmeding M, Neumann UP, Boas-Knoop S, Spinelli A, Neuhaus P (2007) Erythropoietin reduces ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Eur Surg Res* 39:189-197
99. Schwarz F, Herten M, Sager M, Wieland M, Dard M, Becker J (2007) Histological and immunohistochemical analysis of initial and early osseous integration at chemically modified and conventional SLA titanium implants: preliminary results of a pilot study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 18:481-488
100. Scott CL, Robb L, Papaevangelou B, Mansfield R, Nicola NA, Begley CG (2000) Reassessment of interactions between hematopoietic receptors using common beta-chain and interleukin-3-specific receptor beta-chain-null cells: no evidence of functional interactions with receptors for erythropoietin, granulocyte colony-stimulating factor, or stem cell factor. *Blood* 96:1588-1590
101. Semba RD, Juul SE (2002) Erythropoietin in human milk: physiology and role in infant health. *J Hum Lact* 18:252-261

102. Siren AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P (2001) Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. Proc Natl Acad Sci U S A 98:4044-4049
103. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillessen D, Gabbiani G (1986) A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. J Cell Biol 103:2787-2796
104. Tanizawa T, Yamaguchi A, Uchiyama Y, Miyaura C, Ikeda T, Ejiri S, Nagai Y, Yamato H, Murayama H, Sato M, Nakamura T (2000) Reduction in bone formation and elevated bone resorption in ovariectomized rats with special reference to acute inflammation. Bone 26:43-53
105. Thompson Z, Miclau T, Hu D, Helms JA (2002) A model for intramembranous ossification during fracture healing. J Orthop Res 20:1091-1098
106. Toth C, Martinez JA, Liu WQ, Diggle J, Guo GF, Ramji N, Mi R, Hoke A, Zochodne DW (2008) Local erythropoietin signaling enhances regeneration in peripheral axons. Neuroscience 154:767-783
107. van der Kooij MA, Groenendaal F, Kavelaars A, Heijnen CJ, van Bel F (2008) Neuroprotective properties and mechanisms of erythropoietin in vitro and in vivo experimental models for hypoxia/ischemia. Brain Res Rev 59:22-33
108. Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, Viviani B, Marinovich M, Cerami A, Coleman TR, Brines M, Ghezzi P (2003) Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. J Exp Med 198:971-975

109. Vogt C, Pentz S, Rich IN (1989) A role for the macrophage in normal hemopoiesis: III. In vitro and in vivo erythropoietin gene expression in macrophages detected by in situ hybridization. *Exp Hematol* 17:391-397
110. Walker A (2010) Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *J Pediatr* 156:S3-7
111. Wan C, Shao J, Gilbert SR, Riddle RC, Long F, Johnson RS, Schipani E, Clemens TL (2010) Role of HIF-1alpha in skeletal development. *Ann N Y Acad Sci* 1192:322-326
112. Weiner S, Traub W (1992) Bone structure: from angstroms to microns. *Faseb J* 6:879-885
113. Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Bohm M, Dirnagl U, Nickenig G (2002) Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1567-1572
114. Westenfelder C, Biddle DL, Baranowski RL (1999) Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors. *Kidney Int* 55:808-820
115. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S (2007) PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:2514-2523
116. Wu H, Lee SH, Gao J, Liu X, Iruela-Arispe ML (1999) Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development* 126:3597-3605
117. Yamaguchi T, Takada Y, Maruyama K, Shimoda K, Arai Y, Nango N, Kosaki N, Takaishi H, Toyama Y, Matsuo K (2009) Fra-1/AP-1 impairs inflammatory

- responses and chondrogenesis in fracture healing. *J Bone Miner Res* 24:2056-2065
118. Yla-Herttula S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J (2007) Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol* 49:1015-1026
119. Yuen CM, Leu S, Lee FY, Yen CH, Lin YC, Chua S, Chung SY, Chai HT, Sheu JJ, Ko SF, Sun CK, Yip HK (2010) Erythropoietin Markedly Attenuates Brain Infarct Size and Improves Neurological Function in the Rat. *J Investig Med*
120. Zachos TA, Bertone AL, Wassenaar PA, Weisbrode SE (2007) Rodent models for the study of articular fracture healing. *J Invest Surg* 20:87-95
121. Zhu L, Jin W, Pan H, Hu Z, Zhou J, Hang C, Shi J (2009) Erythropoietin inhibits the increase of intestinal labile zinc and the expression of inflammatory mediators after traumatic brain injury in rats. *J Trauma* 66:730-736

## 8. Publikationen und Danksagung

---

### 8.1. Kongressbeiträge und Publikationen

#### Vorträge

Garcia P, Speidel V, Scheuer C, Laschke MW, Holstein JH, Histing T, Pohlemann T, Menger MD, *Erythropoietin Stimulates Fracture Healing in Small Segmental Defects in Mice*. Vortrag, 18th European Conference on Orthopaedics, 2010, Davos, Schweiz.

Garcia P, Speidel V, Scheuer C, Laschke MW, Holstein JH, Histing T, Pohlemann T, Menger MD, *Low dose erythropoietin stimulates bone healing in small segmental defects in mice*. Vortrag, 7th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies, 2010, Kyoto, Japan.

Garcia P, Speidel V, Histing T, Holstein JH, Menger MD, Pohlemann T, *Erythropoietin (EPO) zur Stimulation der Frakturheilung - Einfluss im Modell der verzögerten Frakturheilung in der Maus*. Vortrag, Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, 2009, Berlin.

Speidel V, Garcia P, Histing T, Holstein J, Pohlemann T and Menger MD, *Long-term erythropoietin (EPO) treatment improves fracture healing in a model of delayed union*. Postervortrag, 12. Chirurgische Forschungstage, 2008, Freiburg.

Poster

Garcia P, Speidel V, Scheuer C, Laschke MW, Holstein JH, Histing T, Pohlemann T, Menger MD, *Erythropoietin stimulates fracture healing in small segmental defects in mice*. Online poster, 12th biennal Conference, International Society for Fracture Repair, 2010, London.

Publikationen

Garcia P, Speidel V, Scheuer C, Laschke MW, Holstein JH, Histing T, Pohlemann T and Menger MD, *Low dose erythropoietin stimulates healing of fractures with small segmental defects in mice*. Journal of orthopaedic research, 2011, 29 (2): p. 165-72.

Speidel V, Garcia P, Histing T, Holstein JH, Pohlemann T, Menger MD, *Long-term erythropoietin (EPO) treatment improves fracture healing in a model of delayed union*. Langenbecks Arch Surg, 2008. 393 (5): p. 796.

## **8.2. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben:

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Tim Pohlemann danke ich für die Überlassung des Themas, Herrn Professor Dr. med. Michael D. Menger für die großzügige Bereitstellung von Räumlichkeiten und Gerätschaften.

Herrn Dr. med. Patric Garcia danke ich für die gute Betreuung der Arbeit, die Einführung in die Methodik und die produktive Zusammenarbeit bei Auswertung und Veröffentlichungen.

Frau Janine Becker, Frau Dr. rer. nat. Claudia Scheuer und Frau Ruth Nickels danke ich für die hervorragende fachliche und menschliche Kooperation bei der histologischen Auswertung, der proteinbiochemischen Analyse sowie im Rahmen der durchflusszytometrischen Untersuchung.

Ferner möchte ich mich bei allen Kollegen aus dem Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie für das freundliche Arbeitsklima und die Hilfestellung bei den Versuchen bedanken.

Darüber hinaus gebührt meinen Freunden und meiner Familie großer Dank für Unterstützung und Rückhalt, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## 9. Lebenslauf

---

### Persönliche Angaben

Name: Speidel  
Vorname: Victor  
Geburtsdatum: 05.01.1983  
Geburtsort: Heidelberg  
Adresse: Hauptstraße 55/1, 69117 Heidelberg

### Schulischer Werdegang

1989 – 1993 Friedrich-Ebert-Grundschule Heidelberg  
1993 – 2002 Kurfürst-Friedrich-Gymnasium Heidelberg  
Juni 2002 Abitur

### Zivildienst

2002 – 2003 Rettungssanitäter, Deutsches Rotes Kreuz,  
Heidelberg

### Universitärer Werdegang

2003 – 2005 Medizinstudium, Universität des Saarlandes,  
Homburg/Saar  
September 2005 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
2005 – 2006 Medizinstudium, Université libre de Bruxelles,  
Belgien  
2006 – 2010 Medizinstudium, Universität des Saarlandes,  
Homburg/Saar

Juni 2010	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Juli 2010	Approbation als Arzt

Famulaturen

März 2006	Plastische und rekonstruktive Chirurgie, Hôpital Erasme, Université libre de Bruxelles, Belgien
April 2006	Kardiologie, Hôpital Erasme, Université libre de Bruxelles, Belgien
März 2007	Neurochirurgie, Hopital universtario de los Andes, Mérida, Venezuela
September 2007	Akupunktur, Tongji Medical College, Wuhan, China
Dezember 2008	Pneumologie, Universitätsklinik Homburg/Saar

Praktisches Jahr

Februar 2009 – Mai 2009	Plastische und rekonstruktive Chirurgie, Prof. B. Pittet, Hôpitaux universitaires de Genève, Schweiz
Juni 2009 – September 2009	Orthopädie und Unfallchirurgie, PD Dr. A. Gerber Popp, Regionalspital Emmental, Burgdorf BE, Schweiz
Oktober 2009 – Januar 2010	Pneumologie, Prof. Th. Geiser, Inselspital Bern, Schweiz

Berufserfahrung

Januar 2011 – März 2012	Assistenzarzt, Notfallzentrum Hirslanden Bern, Schweiz, Dr. C. Morger
Juli 2012 – aktuell	Assistenzarzt, Medizinische Klinik, Spitalzentrum Biel, Schweiz, Prof. Dr. J. Rutishauser

Publikationen

Speidel V, Weil E, Müller AK, Köllner V, *Geschichte und Zukunft der Anamnesegruppen*. In: Schüffel W (ed) Wartburgphänomen Gesundheit, Projekte Verlag, 2012, Halle (Saale): p. 68-89

Garcia P and Speidel V, Scheuer C, Laschke MW, Holstein JH, Histing T, Pohleman T, Menger MD, *Low dose erythropoietin stimulates healing of fractures with small segmental defects in mice*. Journal of orthopaedic research, 2011, 29 (2): p. 165-72.

Speidel V, D'Amelio R, Wevers-Donauer G, Köllner V, *Die Droge Arzt nutzen lernen – Unterricht in Arzt-Patient-Kommunikation an der Medizinischen Fakultät in Homburg*. Saarländisches Ärzteblatt, 2010, 63 (7): p. 18-19.

Köllner V, Speidel V, *40 Jahre Anamnesegruppen – Bericht vom 30. Maitreffen in Homburg*. Ärztliche Psychotherapie und Psychosomatische Medizin, 2010; 5: p. 213.

Speidel V, Hambach N, Kattner A, Koletzko L, Müller AK, Weil E, Willms L, Wunder N, Köllner V, *Anamnesegruppen – Vermittlung und Prüfung von Arzt-Patienten-Kommunikation im Medizinstudium*. Z Med Psychol, 2010, 19: 67.

Speidel V, Garcia P, Histing T, Holstein JH, Pohleman T, Menger MD, *Long-term erythropoietin (EPO) treatment improves fracture healing in a model of delayed union*. Langenbecks Arch Surg, 2008. 393 (5): p. 796.

Kongressbeiträge

Speidel V, Heintz S, Willms L, Hayer L, Greß H, Köllner V, *Medical students' attitudes towards communication skills learning – validation of a german version of the communication skills attitude scale (CSAS-D)*. Vortrag, International Conference on Communication in Healthcare, 2012, St. Andrews, UK.

Speidel V, Heintz S, Willms L, Hayer L, Greß H, Köllner V, *Einstellung von Studierenden zum Erlernen kommunikativer Fertigkeiten – Validierung der deutschsprachigen Version der Communication Skills Attitude Scale (CSAS-D)*. Postervortrag, Deutscher Kongress für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie, 2012, München.

Speidel V, Willms L, Heintz S, Müller AK, Greß H, Köllner V, *Einstellung zum Erlernen kommunikativer Fertigkeiten – Validierung der deutschsprachigen Version der Communication Skills Attitude Scale (CSAS-D)*. Postervortrag, Jahrestagung der Gesellschaft für Medizinische Ausbildung (GMA), 2011, München.

Willms L, Speidel V, *Technik- oder Haltungsorientierung in der Vermittlung von Gesprächsführungskompetenz: Anamnesegruppen als Einstieg in die Psychosomatik*. Vortrag, Deutscher Kongress für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie, 2011, Essen.

Willms L, Allmendinger I, Hayer L, Koletzko L, Müller AK, Wunder N, Speidel V, *Einstellungsbezogenes Lernen in Anamnesegruppen*. Postervortrag, Deutscher Kongress für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie, 2011, Essen.

Speidel V, Hambach N, Kattner A, Koletzko L, Müller AK, Weil E, Willms L, Wunder N, Köllner V, *Anamnesegruppen – Vermittlung und Prüfung von Arzt-Patienten-*

*Kommunikation im Medizinstudium.* Ausgezeichnet als bester Kurzvortrag, gemeinsamer Kongress der deutschen Gesellschaft für Medizinische Psychologie und der deutschen Gesellschaft für Medizinische Soziologie, 2010, Gießen.

Garcia P, Speidel V, Scheuer C, Laschke MW, Holstein JH, Histing T, Pohlemann T, Menger MD, *Low dose erythropoietin stimulates bone healing in small segmental defects in mice.* 7th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies, 2010, Kyoto, Japan.

Garcia P, Speidel V, Scheuer C, Laschke MW, Holstein JH, Histing T, Pohlemann T, Menger MD, *Erythropoietin stimulates fracture healing in small segmental defects in mice.* Online poster, 12th biennal Conference, International Society for Fracture Repair, 2010, London.

Speidel V, Garcia P, Scheuer C, Laschke MW, Holstein JH, Histing T, Pohlemann T, Menger MD, *Low dose erythropoietin stimulates fracture healing in small segmental defects in mice.* Vortrag, 18th European Conference on Orthopaedics of the European Orthopaedic Research Society, 2010, Davos.

Garcia P, Speidel V, Histing T, Holstein JH, Menger MD, Pohlemann T, Erythropoietin (EPO) zur Stimulation der *Frakturheilung - Einfluss im Modell der verzögerten Frakturheilung in der Maus.* Vortrag, Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, 2009, Berlin.

V. Speidel, P. Garcia, T. Histing, J. Holstein, T. Pohlemann and M.D. Menger, *Long-term erythropoietin (EPO) treatment improves fracture healing in a model of delayed union.* Postervortrag, 12. Chirurgische Forschungstage, 2008, Freiburg.