

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
(Direktor: Professor Dr. med. Andreas Seekamp)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

DIE WIRKUNG VON RIVAROXABAN AUF DIE FRAKTURHEILUNG DER RATTE

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Stefan Brüggemann

aus Meschede - Eversberg

Kiel (2015)

Referent: Priv. -Doz. Dr. Sebastian Lippross, Klinik für Orthopädie
und Unfallchirurgie

Korreferent: Prof. Dr. B. Kurz, Anatomisches Institut

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. Johann Roider

Tag der mündlichen Prüfung: Kiel den 16.09.2016

Zum Druck genehmigt: Kiel den 16.09.2016

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Thrombose und unfallchirurgische Erkrankungen	5
1.2 Gerinnung	6
1.3 Gerinnungshemmung	7
1.4 Heparine	8
1.5 Cumarinderivate	8
1.6 Acetylsalicylsäure	8
1.7 Glykoprotein IIa / IIIb Antagonisten.....	9
1.8 Klinische Anwendung von Antikoagulantien	9
1.9 Heparininduzierte Thrombozytopenie.....	10
1.10 Rivaroxaban.....	11
1.11 Thromboseprophylaxe und Frakturheilung	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Versuchstiere	13
2.2 Femurfraktur nach Bonnareo	14
2.3 Postoperative Applikation von Rivaroxaban.....	17
2.4 Vorbereitung zur Probenentnahme und Untersuchung	17
2.5 Biomechanische Testung nach Manigrasso	17
2.6 Mikro CT Analyse.....	19
2.7 Vorbereitung der Hartschliffe für die Einbettung in Metacrylsäuremethylester	21
2.7.1 Herstellung der Hartschliffe	22
2.7.2 Färbung der Hartschliffe mit O – Toludinblau.....	23
2.7.3 Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE)	23
2.8 Statistik.....	24
3 Ergebnisse.....	25
3.1 Makroskopie	25
3.2 Biomechanik.....	26
3.3 Kallusvolumen.....	27
3.4 Gewebemineralsationsdichte (TDM)	28
3.5 Histologie	29
4 Diskussion	31

4.1	Diskussion der Methoden.....	31
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	33
5	Zusammenfassung.....	36
6	Quellenangaben.....	39
7	Materialverzeichnis.....	42
7.1	Chemikalien.....	42
7.2	Geräte	43
7.3	Medikamente	44
7.4	Verbrauchsmaterialien.....	44
8	Abbildungsverzeichnis.....	45
9	Danksagung	46

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
BMD	Bone Mineralized Density (Knochenmineralisationsdichte)
BV	Bone Volume (Knochenvolumen)
CT	Computer Tomography
COX	Cyclooxygenase
Cm	Zentimeter
HE	Hämatoxylin Eosin
HIT	Heparininduzierte Thrombozytopenie
J	Joule
Kg	Kilogramm
M	Meter
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
NaCl	Natriumchlorid
Nm	Newtonmeter
PMMA	Polymethylmethacrylat
ROI	Region of interest
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TMD	Tissue Mineralized Density (Gewebemineralisationsdichte)
VOI	Volume of interest
μA	Microampere
μCT	Micro Computer Tomograph
μm	Micrometer
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
ASS	Acetylsalicylsäure
Fg	Fibrinogen
H	Stunde

HC	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
kV	Kilovolt
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
MMA	Methylmetacrylat
NaCl	physiologische Kochsalzlösung
PMMA	Polymethylmetacrylat
Sec	Sekunde
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Für Millionen von Jahren war eine schwerwiegende Verletzung wie eine Femurfraktur tödlich. Sie verhinderte die Nahrungsbeschaffung und die Flucht vor Fleisch fressenden Tieren. Zusätzlich stellten Blutverlust und eventuell offene Wunden eine Todesursache dar. Die durchschnittliche Zeit bis zur ausreichenden Knochenheilung und damit zur Mobilisation hat sich jedoch trotz eines evolutionären Drucks nicht verändert. Auch heute heilt eine Femurfraktur erst binnen 6 Wochen bis zu der zur Belastung benötigten Stabilität aus. Wird ein Patient im Rahmen einer konservativen Behandlung bettlägerig, oder wenn die Risiken einer möglichen Operation überwiegen, können Thrombembolien und Pneumonien den Patienten durch die Immobilisation gefährden.

1.1 Thrombose und unfallchirurgische Erkrankungen

Es ist eine Errungenschaft der modernen Chirurgie, dass Verfahren zur Osteosynthese entwickelt werden konnten, mit denen eine übungsstabile Frakturversorgung möglich ist. Ein Beispiel hierfür ist die von Prof. Gerhard Küntscher zusammen mit Ernst Pohl entwickelte Marknagelosteosynthese. Diese half lange Bettlägerigkeit zu verhindern (Pohl, 1939). Es gibt zahlreiche andere offene oder geschlossene Operationsmethoden, die einen ähnlichen Effekt auf die Frühmobilisierung haben. Dazu zählen Plattenosteosynthese oder der Fixateur externe nach Hoffmann oder Ilizarov (Wolinsky, 2007).

Durch eine operative Osteosynthese kann heute eine sehr exakte Reposition von Frakturen erreicht werden. Es ist keine lange Immobilisation des Patienten im Bett mehr notwendig, es kann eine Frühmobilisation unter Teilbelastung der verletzten Extremität erfolgen. Das Risiko von Pneumonie und der Thrombose kann so signifikant reduziert werden (H. W. Hamilton, 1970). Trotzdem ist auch bei einer teilbelasteten Extremität das Thromboserisiko an sich erhöht.

Die Bildung von Thromben ist eigentlich eine überschießende Hämostase. Hämostase ist eine lebenswichtige Reaktion des Organismus bei fast jeder Art der Gewebeerletzung. Initial erfolgt das Anhaften von Thrombozyten zur Blutstillung. So wird Blutverlust verhindert. Durch das Anhaften von Thrombozyten entsteht aber auch eine strukturelle Basis für das Einwan-

dern von Zellen zur Geweberegeneration. Die Hämostase muss im Fall einer Verletzung hinreichend schnell einsetzen, um größeren Blutverlust zu vermeiden. Sie muss auf den Bereich der Verletzung beschränkt bleiben und darf nicht fälschlicherweise durch andere Ereignisse wie Entzündungen oder Infektionen ausgelöst werden. Die Hämostase lässt sich in zwei Teilvorgänge aufteilen, die miteinander in Wechselwirkung stehen.

1.2 Gerinnung

Bei der primären, zellulären Hämostase, der Blutstillung, sind die Thrombozyten, die Wandzellen des betroffenen Blutgefäßes wie Endothel und glatte Muskelzellen sowie Gewebe außerhalb des Gefäßes beteiligt. Das Gefäß verengt sich zunächst, dann kommt es durch Thrombozytenaggregation zum primären Gefäßverschluss (Lori Luchtman-Jones, 1995). Bei der sekundären, plasmatischen Hämostase wird dieser noch lose Verschluss durch die Bildung von Fibrin verstärkt. Hierbei spielt die Aktivierung von im Blutplasma enthaltenen Gerinnungsfaktoren eine wichtige Rolle. Ein genetischer Defekt von Gerinnungsfaktoren kann die Ursache von krankhaften Gerinnungsstörungen wie der Hämophilie A + B sein.

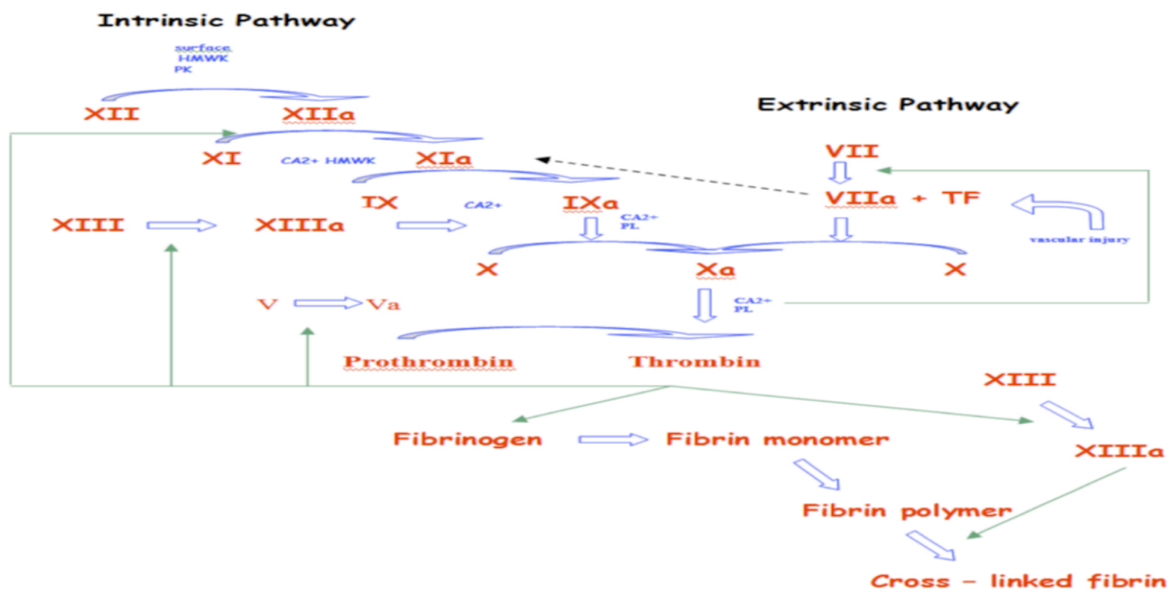


Abb.1 Die Gerinnungskaskade einer Abbildung des Basislehrbuch Innere Medizin nachempfunden (Elsevier Verlag, 3. Auflage, Seite 321). In diesem Bild ist die Wirkung von Protein S und Protein C nicht verdeutlicht. Der Komplex aus Antithrombin und den Heparinoiden wie Xarelto (s.u.) bindet an Faktor Xa und setzt diesen damit außer Kraft.

Die plasmatische Hämostase kann auf zwei Wegen aktiviert werden. Durch den Kontakt von Thrombozyten mit negativ geladenen Oberflächenmolekülen wie Kollagen werden die Faktoren XII und XI aktiviert, die wiederum das intrinsische System aktivieren. Die Aktivierung des extrinsischen Systems wird durch Kontakt von Blut mit Gewebethromboplastin aus verletztem subendotheliales Gewebe initiiert. Thromboplastin oder auch der sogenannte Tissue Factor (TFPI; Tissue Factor Pathway Inhibitor) ist ein Membranprotein, welches in der Adventitia von Blutgefäßen vorkommt, von Endothelzellen wird es nur nach Aktivierung freigesetzt. Es bildet einen Komplex mit Faktor VII, der in seine aktive Form überführt wird. Dadurch wird etwas Thrombin gebildet, der Prozess wird aber relativ schnell durch den TFPI gehemmt (Porreca et al., 1996). Wenn genug Thrombin gebildet wurde, wird ein sogenannter Aktivator-Komplex der Faktoren IX und VIII angestoßen. Dieser Komplex aktiviert Faktor X. Bei beiden Mechanismen wird Faktor X zu Faktor Xa überführt. Dieser spaltet Prothrombin, Faktor II, es entsteht Thrombin, Faktor IIa. Diese Reaktion auf der Thrombozyten-Membran findet nur in Anwesenheit von Calcium statt und wird durch positive Rückkopplung mit dem Komplex der Faktoren VIII und IX stark beschleunigt. Das enzymatisch aktive Thrombin ist für die Polymerisation von Fibrin und damit die Bildung des sogenannten roten Thrombus verantwortlich: In der Koagulationsphase spaltet es aus der inaktiven Vorstufe Fibrinogen (Faktor I) Monomere ab, welche sich zum polymeren Fibrin zusammenlagern und im folgenden Erythrozyten in den entstehenden Gefäß- und Wundverschluss einbetten. Die dann einsetzende Wundheilung wird durch Wachstumsfaktoren initiiert, die von Thrombozyten und Endothelzellen abgegeben werden. Nach der vollständigen Wundheilung wird das Fibrin durch das fibrinolytische System des Blutplasmas wieder aufgelöst.

1.3 Gerinnungshemmung

Um eine Gerinnung in Abwesenheit von Verletzungen zu vermeiden, enthält das Blutplasma verschiedene Inhibitoren. Proteaseinhibitoren hemmen die Bildung von Fibrin. Antithrombin hemmt mehrere Gerinnungsproteasen in der Aktivierungsphase und Koagulationsphase. Die inhibitorische Wirkung wird durch seinen Kofaktor, das Heparin, deutlich verstärkt. Heparin wird von Endothelzellen und Mastzellen gebildet. Thrombomodulin, das ebenfalls aus dem Endothel stammt, bindet an Thrombin und aktiviert Protein C, das nach Bindung an Protein S die Cofaktoren Va und VIIIa inaktiviert. Um Thrombosen und Lungenembolien vorzubeugen,

werden bei bettlägerigen Patienten und nach immobilisierenden Operationen, oder nach dem Einbringen von negativ geladenen Oberflächen wie z. B. künstlichen Herzklappen, gerinnungshemmende Medikamente verwendet. Zur medikamentösen Gerinnungshemmung können Heparin und Heparinoide eingesetzt werden.

1.4 Heparine

Es handelt sich um eine stark negativ geladene Kette aus Polysacchariden, die sich an Antithrombin heftet. Dieser Komplex bindet die Faktoren Thrombin und Xa, die außer Kraft gesetzt werden. Die Wirkung setzt nach intravenöser Gabe sofort ein. Üblich ist die subkutane Gabe bei immobilen Patienten. Des Weiteren gibt es seit kurzem die Möglichkeit Faktor Xa Inhibitoren, z. B. Dabigatranetexilat oder Rivaroxaban, oral zu verabreichen. Diese gehören nicht zu den Heparinen. Eine weitere Möglichkeit sind sogenannte Vitamin-K-Antagonisten wie die Cumarinderivate Phenprocoumon und Warfarin.

1.5 Cumarinderivate

Vitamin K wird zur Synthese der meisten Gerinnungsfaktoren als Coenzym benötigt. Cumarin wirkt in der Leber und verhindert die Reduktion von Vitamin K (Phyllochinon). Dieses wirkt bei der γ -Carboxylierung der Gerinnungsfaktoren (II, VII, IX, X) mit und wird dabei selbst oxidiert. Ohne eine darauf folgende Reduktion bleibt Vitamin K funktionslos. Die Wirkung setzt erst nach einer gewissen Zeit ein, die Gabe kann oral erfolgen (Marcoumar®).

1.6 Acetylsalicylsäure

Acetylsalicylsäure kann in die Thrombozytenaggregation, also in die zelluläre Hämostase, eingreifen. Die Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX-1 und COX 2), die für die Synthese des Plättchenfaktors Thromboxan A₂ benötigt werden, werden irreversibel durch das Anlagern eines Essigsäure-Restes gehemmt. Durch die Wirkung auf alle Cyclooxygenasen wirkt ASS

ebenfalls analgetisch sowie antipyretisch, jedoch wird durch die ubiquitäre Hemmung der Cyclooxygenasen genauso die Synthese schleimhautschützender Prostaglandine gehemmt was zu gastrointestinalen Blutungen führen kann. Ebenfalls kann es durch die Hemmung der Cyclooxygenasen zu einem Überangebot von Arachidonsäuren kommen, deren bronchokonstriktorische Wirkung einen Asthmaanfall auslösen kann.

1.7 Glykoprotein IIa / IIIb Antagonisten

Ebenfalls auf die Aggregation der Blutplättchen wirkt Clopidogrel, das eine Hemmung der ADP-abhängigen Thrombozytenaktivierung durch eine irreversible Rezeptor-Blockierung bewirkt. Abciximab ist ein rekombinanter monoklonaler Antikörper, der das Glykoprotein IIb/IIIa der Thrombozyten blockiert, und dadurch gleichfalls die Thrombozytenaggregation unterbindet. Denselben Angriffsort hat Tirofiban (K. Peerlink MD, 1993).

1.8 Klinische Anwendung von Antikoagulantien

Ohne eine angemessene Prophylaxe werden bei Patienten mit Hüft- und Kniegelenkersatzoperationen Thromboseraten von bis zu 60 % angegeben, bei Verletzungen des Beckens oder der Wirbelsäule von sogar 80 % (Geerts et al., 2008). Tiefe Beinvenenthrombosen werden bei allgemeinchirurgischen Patienten bei durchschnittlich 25 % beobachtet, und die Raten venöser Thrombembolien liegen bei internistischen Patienten bei bis zu 20 % (Geerts et al., 2008). Trotz breitem Einsatz der antithrombotischen Maßnahmen stellen Thrombembolien immer noch ernst zu nehmende Probleme bei Patienten verschiedenster Risikoprofile dar. Ausgehend vom Risikoprofil, dass durch eine Kombination expositioneller und dispositioneller Risikofaktoren bestimmt wird sind letztendlich auch die Indikationsstellung und die Wahl der Thromboseprophylaxe zu entscheiden. Das expositionelle Risiko wird durch die Art und den Umfang der Verletzungen und des chirurgischen Eingriffs bestimmt. Das dispositionelle Risiko wird dagegen von individuellen Faktoren wie Grunderkrankungen und eventuell bekannten allergischen Reaktionen bestimmt. Dabei sollten alle medikamentösen Maßnahmen durch Krankengymnastik und

Frühmobilisation unterstützt werden (Alejandro González Della Valle MD, 2006). Bereits vor 30 Jahren hat man unfraktioniertes Heparin zur Verminderung von tödlich verlaufenden Lungenembolien nach chirurgischen Eingriffen eingesetzt (Sharnoff, 1975). Nachteile der Gabe von umfunktioniertem Heparin sind das Risiko der immunallergischen heparininduzierten Thrombozytopenie (HIT) und der Osteoporose bei der Langzeitanwendung von Heparin (Street et al., 2000c). Heparin hemmt nicht nur den Faktor Xa und Thrombin, sondern interagiert unspezifisch auch mit anderen Proteinen, Thrombozyten, Makrophagen und Endothelzellen. In der klinischen Anwendung führten besonders verlängerte Blutungszeiten durch die verlängerte Thromboplastinzeit zu unerwünschten Effekten. Anstelle von unfraktioniertem Heparin werden seit 20 Jahren niedermolekulare Heparine zur Thromboseprophylaxe eingesetzt. Diese besitzen verbesserte pharmakologische Eigenschaften wie hohe Bioverfügbarkeit, lange Halbwertszeit und reduziertes HIT- und Osteoporoserisiko.

1.9 Heparininduzierte Thrombozytopenie

Die Heparininduzierte Thrombozytopenie (HIT) ist eine Komplikation bei der Behandlung von Patienten mit Heparin. Die HIT kann zu einem Abfallen der funktionierenden Thrombozyten und damit zu Blutungen und durch eine Aggregation zu thrombotischen Gefäßverschlüssen führen. Die HIT Typ I ist klinisch häufig unbedeutend und geht mit einem geringen Verlust von Blutplättchen einher, welche auf der direkten Aktivierung der Thrombozyten durch das Heparin beruht. Da diese Form der Thrombozytopenie nach wenigen Tagen rückläufig ist, bedarf sie meist keiner weiteren Therapie.

Die HIT Typ II beruht auf einer Antikörperbildung gegen Heparin - Proteinkomplexe. Damit stellt sie eine echte allergische Reaktion auf Heparin dar. Durch die Bindung des Proteinkomplexes an Antikörper kommt es zur Thrombozytenaggregation und zur Aktivierung dieser. Dies kann zu einem lebensbedrohlichen Abfall der Thrombozyten und damit einhergehenden Blutungen sowie zu thrombotischen Gefäßverlegungen führen.

Die fraktionierten Heparine hemmen selektiv den Faktor Xa und verlängern damit die aktivierte Thromboplastinzeit nicht. Trotzdem sind Komplikationen durch erhöhte Blutungsneigung kaum seltener geworden, dafür kommt es bei der Anwendung von

unfraktionierten Heparinen seltener zur dramatisch verlaufenden HIT. Zur Thromboseprophylaxe bei HIT steht seit langem Fondaparinux zur Verfügung. Fondaparinux ist eine subkutan applizierbare Substanz, die aber kein Protein sondern ein aus Schweinedarm gewonnenes Pentasaccharid ist. Fondaparinux bindet an den physiologischen Inhibitor Antithrombin, aufgrund seiner Molekülgröße kann es keine Kreuzreaktivität mit HIT – Antikörpern geben. Sowohl Heparin als auch Fondaparinux ist gemeinsam, dass sie subkutan appliziert werden müssen, was die Compliance negativ beeinflussen kann. Weiterhin müssen diese Substanzen an die renale Clearance angepasst werden, weil sie bei Niereninsuffizienz akkumulieren. Schon lange ist versucht worden für die stationäre und poststationäre Thromboseprophylaxe Substanzen zu entwickeln, die folgende Bedingungen erfüllen:

1. Keine Gefahr der HIT.
2. Gute Steuerbarkeit, keine Abhängigkeit von der renalen Funktion.
3. Sehr hohe orale Bioverfügbarkeit.
4. Mindestens dem fraktionierten Heparin vergleichbare, effektive Thromboseprophylaxe.

1.10 Rivaroxaban

Seit dem 1.10.2008 ist das Oxazolidinon Rivaroxaban in Deutschland als Medikament zugelassen. Orale Faktor Xa Inhibitoren sind kleinmolekulare Substanzen, die direkt an das aktive Zentrum des freien, und des im Prothrombin-Komplex gebundenen Faktor Xa binden. Die Bioverfügbarkeit beträgt 80 – 100 %, die Halbwertszeit beträgt 7 – 11 Stunden, womit sie sich für die einmal tägliche Anwendung eignen. Rivaroxaban wird zu zwei Dritteln über die Leber eliminiert. Damit ist eine Anpassung an die Nierenfunktion in den meisten Fällen nicht notwendig.

Rivaroxaban konnte in allen Studien dem fraktionierten Heparin ebenbürtige antithrombotische Eigenschaften und gleichzeitig mindestens gleiches Blutungsrisiko bei einfacher oraler Applikation, ohne Abhängigkeit von der Nierenfunktion, aufweisen (Eriksson et al., 2007, Eriksson et al., 2006, Eriksson et al., 2008). Obwohl Medikamente zur Thromboseprophylaxe zu den am häufigsten verordneten Medikamenten gehören, ist ihr Einfluss auf die Frakturheilung ein bis dato wenig untersuchter Aspekt.

1.11 Thromboseprophylaxe und Frakturheilung

Schon 1956 konnte Stinchfield im Tierversuch zeigen, dass Heparin in thromboprophylaktischer Dosierung die Frakturheilung verzögert (Stinchfield et al., 1956). In der einzigen in jüngerer Zeit durchgeführten Untersuchung zu diesem Thema wurde ein ähnlicher Effekt von fraktioniertem Heparin gefunden. (Hak et al., 2006, Stinchfield et al., 1956, Street et al., 2000b). Klinische Studien konnten eine klinische Relevanz des gezeigten Effektes bisher nicht belegen. Eine Störung der Frakturheilung ist pathophysiologisch vielfach diskutiert worden. Die wesentlichen potentiellen Mechanismen sind einerseits die Bindung von Heparinen an die Endothelzellen und Hemmung der Gefäßneubildung (Deepa and Varalakshmi, 2006). Ein solcher Mechanismus ist für Rivaroxaban bisher nicht nachgewiesen worden. Andererseits belegen mehrere Studien dass das Frakturhämatom die Frakturheilung in der Initialphase negativ beeinflusst. Durch Hyperkaliämie werden Kaliumkanäle in Osteoblasten und Endothelzellen in ihrer Regulation beeinflusst, so dass sie nicht mehr auf proliferative Zytokine reagieren können. So könnte es zur Zytostase und verzögerter Knochenbruchheilung kommen (Hak et al., 2006, Henry et al., 2002, Street et al., 2000a). Wirkstoffe, die zu einer erhöhten Blutungsrate mit größerem Frakturhämatom führen, können so Einfluss auf die Frakturheilung nehmen. Vor diesem Hintergrund scheint es notwendig, den Einfluss von neuartigen Substanzen zur Thromboseprophylaxe experimentell auf ihre Wirkung auf die Knochenbruchheilung zu untersuchen. In der vorliegenden Untersuchung wurde daher das an der eigenen Klinik etablierte Femurfrakturmodell nach Bonnarens (Bonnarens and Einhorn, 1984) zur Untersuchung eines Effektes von Rivaroxaban auf die Frakturheilung benutzt. Die genaue Applikationsform und Dosierung bei der Ratte ist bekannt, da die Entwicklung und experimentelle Testung der Substanz weitestgehend an der Ratte durchgeführt wurde (Perzborn et al., 2005).

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Als Tierart wurde die Ratte vom Stamm Wistar verwendet. Die Ratte ist als Modell durch zahlreiche Studien zur Frakturheilung etabliert (Bonnarens and Einhorn,1984). Das rodente Tiermodell hat sich in zahlreichen Untersuchungen bewährt, weil die Belastung für das Tier im Gegensatz zu humanen Studien unter standardisierten Bedingungen bezüglich Ernährung, Frakturtyp und Untersuchungszeitpunkten durchgeführt werden kann. Die Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen wird dadurch limitiert, dass eine spezifische monokausale Erkrankung entsteht, wogegen die beim Menschen vorkommende Erkrankung teilweise multi-kausal bedingt ist. Daneben bestehen artspezifische Unterschiede, wie eine wesentlich kürzere Heilungszeit an sich und eine andere biomechanische Belastung des frakturierten Knochens beim Vierfüßlergang. Das vorgestellte Modell wurde gewählt, weil so ein pathophysiologischer Schlüsselmechanismus kontrolliert untersucht werden kann. Ziel ist es, die Beeinflussung der Frakturheilung durch orale Faktor Xa Hemmung als Komplikation und Nebenwirkung mit weitreichenden Folgen auf die Knochenheilung auszuschließen. Die Versuchstiere wurden randomisiert in 2 Futtergruppen aufgeteilt. Sie erhielten je 4 bzw. 7 Wochen mit Rivaroxaban angereichertes Futter in der Versuchsgruppe, oder jeweils 4 bzw. 7 Wochen Futter ohne Rivaroxaban. Die Tiere wurden nach dem Ende des Versuchszeitraums getötet.

Zeitpunkt	Untersuchung	Anzahl
D 28	- Biomechanik - Volumen Scan	6 pro Gruppe
	- μ CT - Histologie	Mind 6 pro Gruppe davon alle μ CT, 2 Entkalkifizierte Histologie 2 Hartschliff
D 49	- Biomechanik - Volumen Scan	6 pro Gruppe
	- μ CT - Histologie	6 pro Gruppe davon alle μ CT, 2 Entkalkifizierte Histologie 2 Hartschliff

Abb.2 Die Versuchsplanung der vorliegenden Arbeit verdeutlicht die Gruppeneinteilung und die verwendeten Verfahren der jeweiligen Gruppen

2.2 Femurfraktur nach Bonnarens

Nach der Genehmigung durch die Ethikkommission des Landes Schleswig-Holstein (V312-72241.12t9) wurde die Studie in der zentralen Tierhaltung des UKSH Campus Kiel unter Leitung des Tierschutzbeauftragten Professor Dr. G. Schultheiß durchgeführt. Insgesamt wurden 48 weibliche Ratten (Stamm Wistar) mit einem mittleren Gewicht von 230 ± 30 Gramm nach der von Bonnarens beschriebenen Methode mit einem intramedullären Kraftträger am Femur versorgt (Bonnarens and Einhorn, 1984).

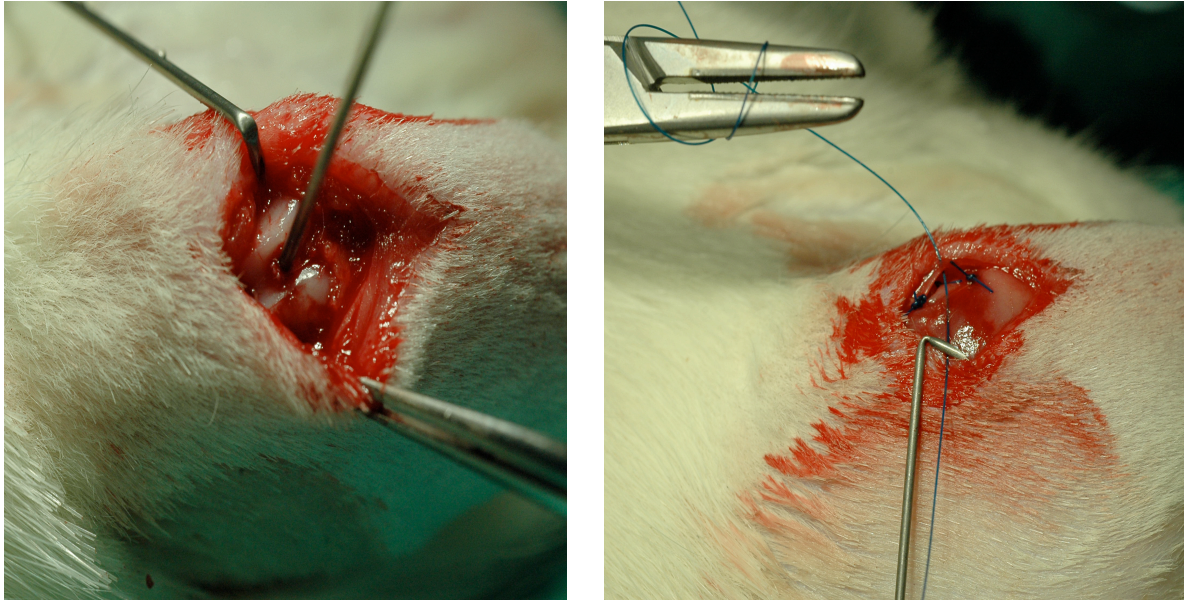


Abb.3 Linkes Bild : Interkondyläre Einbringung des intramedullären Kraftträgers, rechtes Bild : Subkutane Naht und Naht des Kniestreckapparates.

Präoperativ wurden 0,03 – 0,06 mg Buprenorphin oral verabreicht. Die Tiere wurden in intraperitonealer dreifach-Narkose (Fentanyl 0,005 mg/kg, Midazolam 2,0 mg/kg und Medetomidin 0,15 mg/kg) unter aseptischen Bedingungen operiert. Während der Operation wurden die Tiere auf einer Wärmeplatte gelagert. Die Operation dauerte ca. 5 Minuten, bei der zuerst die Haut medial der Patella mit einem Einwegskalpell eröffnet, und dann die Patella leicht luxiert wurde, wobei eine sterile Kanüle (Braun Sterican Einmalkanüle nach ISO 7864 - 0,90 x 40 mm) als intramedullärer Kraftträger durch die interkondyläre Rinne in das Femur eingebracht wurde. Danach wurde der mediale Schnitt mit 5.0 resorbierbarem chirurgischem Nahtmaterial (Ethicon, Inc., Sommerville, NJ) verschlossen. Dann erfolgte das kontrollierte Setzen einer Fraktur mit einem standardisierten Gewicht in einem Drei-Punkt-Biegeapparat.

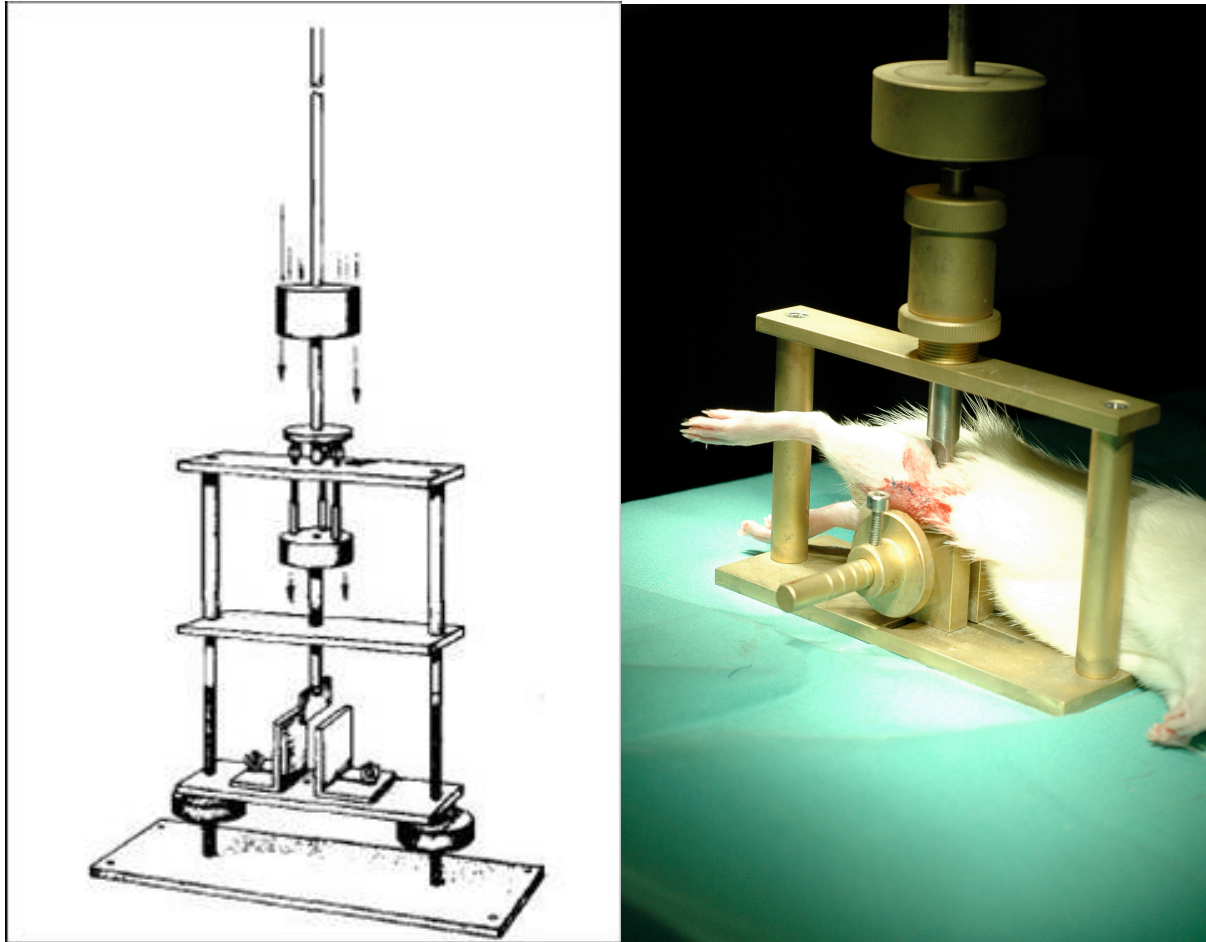


Abb.4 Der Drei-Punkt-Biegeapparat nach dem Vorbild von Bonnarens; Rechtes Bild mit einem Versuchstier nach erfolgreich gesetzter Fraktur im Tier OP.

Die Antagonisierung der Narkose erfolgte mit einem dreifach-Antidot (Naloxon 0,12 mg/kg, Flumazenil 0,2 mg/kg und Atipamezol 0,75 mg/kg). Die postoperative Analgesie erfolgte mit Metamizol 50 - 100 mg/kg Körpergewicht für fünf Tage.

2.3 Postoperative Applikation von Rivaroxaban

Die Tiere erhielten postoperativ eine tägliche Diät (je nach Versuchsgruppe, für 28 oder 49 Tage) von 3 mg/kg Körpergewicht Rivaroxaban mit dem Futter verabreicht, die Kontrolltiere erhielten kein Rivaroxaban (Eriksson et al., 2007).

2.4 Vorbereitung zur Probenentnahme und Untersuchung

Nach dem Ende des Untersuchungszeitraumes wurden die Tiere unter erneuter dreifach-Narkose (Fentanyl 0,005 mg/kg, Midazolam 2,0 mg/kg und Medetomidin 0,15 mg/kg) per Herzschnitt durch Entbluten getötet. Als Abbruchkriterien vor Ablauf der geplanten Beobachtungszeit galten Gewichtsverlust über 20 % Körpergewicht, Wundinfekt und Verhaltensauffälligkeiten wie durch äußere Umgebungseinflüsse nicht erklärbare Lethargie und Agitiertheit, was bei keinem Versuchstier zu beklagen war. Nach erfolgreicher Euthanasie wurden die operierten Femora mittels Einwegskalpell von Weichteilgewebe befreit, und entweder der Biomechanik zugeführt oder zum späteren Erstellen eines Mikro-CT (μ CT) und der Histologie in 4 % iger Formalinlösung gelagert.

2.5 Biomechanische Testung nach Manigrasso

Die Knochen wurden nach der Methode von Manigrasso auf ihre Torsionssteifigkeit untersucht (Manigrasso and O'Connor, 2004). Nachdem der Knochen vollständig von Weichteilgewebe befreit war, wurde dieser orthograd in proximale und distale Kraftaufnehmer geklebt. Dazu wurden 12 mm verzinkte, hexagonale Hutmuttern, die mit einem PMMA (polymerem Methyl-Methacrylat der Firma Heraeus) Knochenzement gefüllt waren, verwendet. Mit diesem wurden auch die Knochen verklebt. Bei diesem Vorgang, ebenso wie beim Aushärten des PMMA, wurden die Knochen ständig mit 0,9 % NaCl Lösung befeuchtet um ein Austrocknen der Knochenstrukturen zu verhindern. Die Torsionstestung wurde im biomechanischen Labor der Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie an der nach dem Vorbild von Manigrasso gebauten Testapparatur vollzogen.

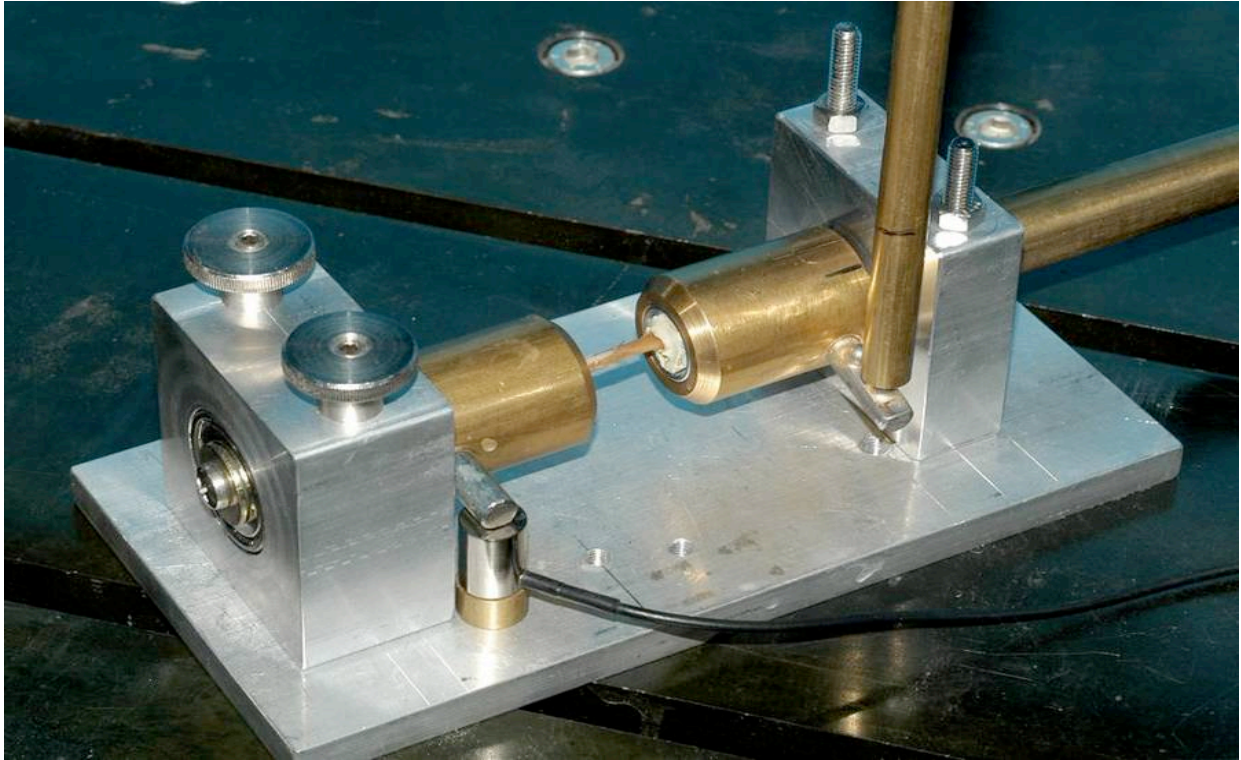


Abb.5. Torsionstest nach Manigrasso. Ein Testknochen ist zwischen rechtem und linkem Rotationszylinder eingespannt. Der Kraftgeber am rechten Zylinder wird durch einen servomotorischen Antrieb nach unten bewegt. Am rechten Zylinder wird die Rotation bis zum Bruch gemessen. Am linken Zylinder wird der Kraftaufnehmer betätigt.

Die Femora wurden mit einem servomotorischen Antrieb mit einer Rotation von 1° pro Sekunde bis zum Bruch belastet, wobei die Gradzahl gegen die aufgewendete Kraft in Newton aufgetragen wurde.

Durch den Kraftaufnehmer (Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH, Model U1A) wurden die Daten ermittelt und über das Interface (BMCM Messysteme GmbH, Modell MeM-Adfo) an den Labor PC gesendet, wo durch das Programm („Quetsche V5“, geschrieben von H.J. Hahne, August 2008) die gemessenen Werte in Nm umgerechnet wurden.

Die Spitzenbelastung und der maximale Winkel konnten aus den Winkel/Kraft Auslenkungskurven entnommen werden. Die Torsionssteifigkeit, die Schubspannung, das polare Flächenträgheitsmodul und das Schubmodul wurden wie folgt berechnet (Turner and Burr, 1993):

1) Torsionssteifigkeit: $(T_{\max} \times L)/\varphi$,

wobei T_{\max} die maximale Torsionskraft in Nm ist, L die Länge der uneingebetteten Probe in m und φ der maximale Auslenkungswinkel in Grad ist.

2) Schubspannung (τ): $(T_{\max} \times R_{\max})/J$, wobei R der maximale Radius des Frakturkallus in m ist und J ist das polare Flächenträgheitsmodul.

3) Schubmodul (G): $(T_{\max}/L)/J\varphi$.

4) Polares Flächenträgheitsmodul (J) : $[\pi(ab^3 + a^3b - (a-t)(b-t)^3 - (a-t)^3(b-t)]/4$, wobei a der maximale Kallus oder diaphyseale Radius, b der kleinste Kallus oder diaphyseale Radius und t ist die durchschnittliche Kortikalisstärke von 0,000819 m, bei 10 zufällig aus der Kohorte ausgewählten Ratten im CT ausgemessen.

2.6 Mikro CT Analyse

Die μ CT Analyse erfolgte am AO-Research Institute, Davos, Schweiz. Hier wurden die 24 Proben mit dem Mikro CT Scanner (Scanco Medical, Brüttisellen Schweiz) gescannt. Der Scanner ist ausgerüstet mit einer 70 μ m Focus Röntgenröhre als Quelle. Die Scans wurden mit einer Energie von 70 kV Röhrenspannung und einer Intensität von 114 μ A durchgeführt. Die Integrationszeit betrug 200 Millisekunden bei 500 Projektionen auf 180° und einer isotropen Voxelgröße von 16 Mikrometern. Die Region of Interest (ROI) wurde 4,2 mm über und unter der erfassten Frakturlinie festgelegt, also auf insgesamt 8,4 mm axiale Ausdehnung. Die aufgenommenen 3D Arrays wurden mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixeln gespeichert. Hier wurden die Proben jeweils in eine passende vertikale Röhre in das CT Gerät gestellt. Der Scan erfolgte in einer mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung um die Proben vor dem Austrocknen zu schützen. Die Untersuchung der Datensätze wurde mittels Scano Evaluation Software (Scano Medical, Brüttisellen Schweiz) durchgeführt. Nach der Verarbeitung und Auftrennung der Volumes of interest (VOI) wurden die Volumina der implantierten Kanüle, des hoch mineralisierten Gewebes (Knochen) und des wenig mineralisierten Gewebes (Kallus) bestimmt. Dazu wurden die Grenzwerte verwendet, welche zuvor im AO Institut definiert und in vorherigen Studien mehrfach getestet wurden, um Knochen, Kallus und die noch im

Knochen implantierte Kanüle genau voneinander zu unterscheiden. Diese Werte sind Graustufen in Prozent des maximalen Grauwertes der entstandenen Bilder. Die Grenzwerte wurden wie folgt festgelegt; Für den Kallus 17,5 bis 33 %, für den Knochen 33 bis 60 % und für die Kanüle 60 bis 100 %. Nach dem Auftrennen der VOI mit den entsprechenden Filtern wurden die jeweiligen Volumina in mm^3 und in ihrer entsprechenden Dichte in mg HA/cm^3 jeweils von Knochen und Kallus berechnet. Um eine Aussage über die Festigkeit des Kallus treffen zu können, muss die Tissue mineralized density (TMD), also die Dichte des mineralisierten Gewebes in der gescannten Region, bestimmt werden. Um den Wert der Gewebemineralisationsdichte zu berechnen, wird das Volumen des mineralisierten Kallus (BMD) durch seine ermittelte Dichte des Gewebes (BV) dividiert ($\text{BMD} / \text{BV} = \text{TMD}$).

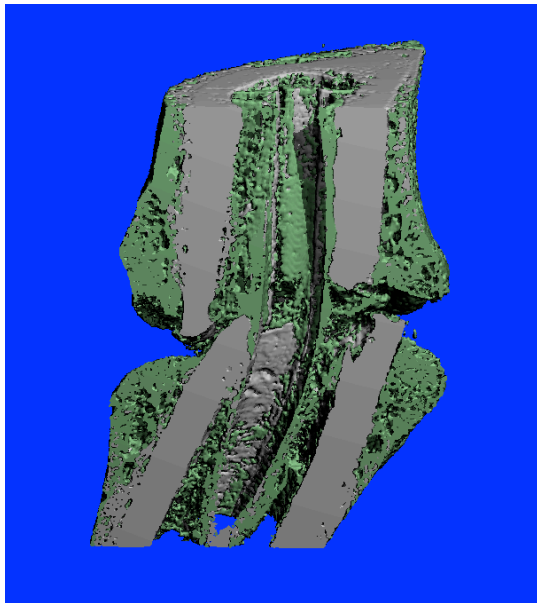


Abb.6 Tier 8, 28 d Kontrolle, wenig Knochen ($54,35 \text{ mm}^3$) bei großem Kallusvolumen ($34,86 \text{ mm}^3$)

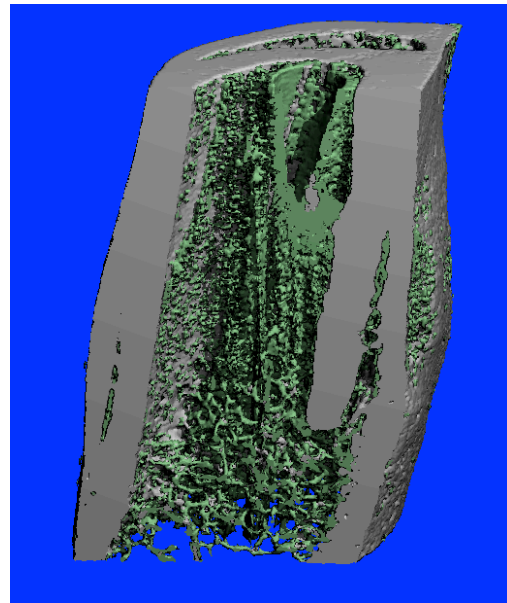


Abb.7 Tier 47, 49 d Kontrolle, wenig Kallus ($8,7 \text{ mm}^3$) bei deutlich ausgeheiltem Knochen ($86,4 \text{ mm}^3$)

2.7 Vorbereitung der Hartschliffe für die Einbettung in Metacrylsäuremethylester

Zur Darstellung der Knochen- und Kallusstruktur wurden Hartschliffpräparate hergestellt. Die Proben wurden dazu in Kunststoff eingebettet. Für diese sogenannte kalzifizierte Histologie wurden die Knochen zunächst in 10 % igem gepufferten Formalin fixiert. Je nach Präparatgröße war dazu eine Zeit von 10 bis 14 Tagen notwendig. Dann wurden die Gewebe mit Hilfe von ansteigenden Ethanolreihen dehydriert und in Polymethylmetacrylat (PMMA) eingebettet. Die Dehydratation wurde wie folgt durchgeführt:

1. 60 % vergälltes Ethanol 2 Stunden
2. 80 % vergälltes Ethanol 2 Stunden
3. 90 % vergälltes Ethanol 4 Stunden
4. 96 % vergälltes Ethanol 5 Stunden
5. 100% vergälltes Ethanol 4 Stunden
6. 1:1 Aceton: Ethanol 1 Stunde
7. 1:1 Aceton: Ethanol 4 Stunden
8. 100% vergälltes Ethanol 1 Stunde
9. 100% vergälltes Ethanol 4 Stunden
10. 100% vergälltes Ethanol 3 Stunden
11. Reiner Metacrylsäuremethylester 10 – 24 Stunden
12. Einbettgemisch sofort über ca. 3 bis 5 Tage kühl gelagert

Gefahren, die bei der Entwässerung auftreten können, sind Zerreißen, Schrumpfen, Härten oder Lipidextraktion der Präparate (Romeis B, Bock P, Denk H, 1989). Es ist unbedingt notwendig, das Einbettungsgemisch sofort nach der Einbettung kühl zu lagern. Bei zu warmer Lagerung besteht die Gefahr der Auspolymerisation, was dazu führt, dass die Proben nicht mehr ausreichend beurteilt werden könnten. Dann folgte die Einbettung in Kunststoff. Dazu wurden die Proben in einem Glasgefäß in das Einbettungsgemisch aus Metacrylsäuremethylester (Polymethylmethacrylat Monomer Sigma-Aldrich M5,590-9), Weichmacher (Nonylphenyl-polyethyleneglycol acetate Fluka 74432) und einem Katalysator (α,α -Azobutyronitril Fluka 11630) eingebettet. Eine Fixierung der Präparate auf dem Boden der Einbettungsgefäße war notwendig, um ein Abheben des Gewebes zu vermeiden.

Anschließend folgte die Polymerisation in einem warmen Wasserbad. Die ausgehärteten Blöcke mit den darin enthaltenen Proben wurden durch Zerschlagen des Glasgefäßes befreit.

2.7.1 Herstellung der Hartschliffe

Um dünne Präparatscheiben zu erhalten, wurden die Präparate in 2 Sägevorgängen mit der Präzisionsbandsäge (Exakt, Norderstedt) weiter zugeschnitten. Dann erfolgte eine Politur der Oberfläche und Aufkleben auf einen mit Spezialfolie (Gudy Clear 23, Neschen AG, Bückenburg) beklebten Objektträger mit Sekundenkleber (Loctite 493, Henkel, Garching). Während der Trockenphase des Klebers wurden Präparatblöcke mit Druck auf den beschichteten Objektträger aufgepresst, um eine Entstehung von Blasen zwischen Präparat und Objektträger zu vermeiden. Dann wurden die Präparate mit Hilfe einer Vakuumpumpe in eine Saugvorrichtung gespannt. Es folgte das Einstellen der Distanz zum Sägeblatt, um 200 µm dicke Präparate zu erhalten, und die Einstellung des Oszillationskippwinkels an der Präparathaltvorrichtung mit gleichzeitiger Wasserkühlung zur Gewebeschonung während des Sägevorganges.

Nach erfolgreichem Sägevorgang wurden die Präparate mit dem Präzisionsschleifgerät (Exakt, Norderstedt) ebenfalls unter ständiger Wasserkühlung auf eine Solldicke von 40 µm für die Färbung vorgeschliffen. Dabei wurde der Schleifteller mit Schleifpapier (Körnung 1200) bestückt. Das Anbringen der zugeschnittenen Präparate erfolgte ebenfalls an einer Vakuumhaltevorrichtung. Die Schleifmaschine wurde geeicht und der Schleifvorgang anschließend durchgeführt. Danach erfolgte eine Kontrolle der Präparatdicke mit Hilfe einer Schiebellehre. Die weiteren Schleifvorgänge erfolgten bis zur Politur per Hand mit steigend gekörntem Schleifpapier (2400er und 4000er Körnung) und unter ständiger Wasserkühlung auf Tellerschleifern. Bei zu hohen Drehzahlen der Schleifteller, beziehungsweise fehlender oder zu geringer Wasserkühlung oder auch zu hohem Anpressdruck der Präparate sind Schäden des Gewebes möglich. Um Schäden durch den Schleifvorgang rechtzeitig zu erkennen, Schleifspuren zu entfernen und den Fortschritt bewerten zu können, erfolgten ständige Kontrollen unter dem Mikroskop.

2.7.2 Färbung der Hartschliffe mit O – Toluidinblau

Toluidinblau ist ein basischer Thiazinfarbstoff. Mit ihm lassen sich unterschiedliche Gewebe differenzieren. Die mineralisierte Hartgewebmatrix bleibt ungefärbt und stellt sich blassblau dar. Zellen und Weichteilgewebe sind unterschiedlich blau, Knorpelmatrix und Mastzellgranula erscheinen metachromatisch rotviolett, und die verkalkte Knorpelmatrix ist dunkelblau gefärbt (1984, (Romeis B, 1989). Zum Entkalken der Schnittoberfläche und zur Verbesserung der Anfärbbarkeit der Knochenmatrix wurden die Präparate für 2 bis 4 Minuten mit 0,1 %iger Ameisensäure vorbereitet und anschließend mit Aquadest gespült. Um die Zell- und Weichteilgewebefärbung zu verbessern, müssen die Präparate anschließend für 60 bis 120 Minuten in 20 %iges Methanol eingelegt werden, jedoch kann ein längeres Einlegen zum Verquellen der Zellen führen. Es folgte eine weitere Spülung mit Aquadest. Daraufhin wurden die Hartschliffpräparate für 3 Minuten in das filtrierte Toluidinblau eingelegt. Danach wurde eine weitere Spülung mit Aquadest vorgenommen. Anschließend erfolgte eine Differenzierung unter dem Mikroskop mit HCl-Alkohol und Toluidinblau, um die Strukturen optimal darstellen zu können.

2.7.3 Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE)

Präparate der Rattenfemora wurden als Standardübersicht mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Bei diesem Verfahren wird mit Hämatoxylin negativ geladenes Gewebe, wie die DNA des Kernchromatins oder die RNA des rauen endoplasmatischen Retikulums, blau gefärbt. Mit Eosin wird positiv geladenes, azidophiles Gewebe, wie Eiweiße (Zytoplasma), je nach Einwirkungsdauer stärker oder schwächer rot gefärbt. Zur Färbung wurden folgende Schritte durchlaufen: Zuerst wurden die Präparate für 3 Minuten in saures Hämatoxylin nach Meyer eingetaucht (Neumeister B., 2000) Anschließend wurden sie 10 Minuten unter fließendes kaltes Leitungswasser gehalten, um dann für 30 Sekunden in 1%iges Eosin, getaucht zu werden. Dann wurden die Proben kurz in 70 %iges Ethanol, 80 %iges Ethanol und dann 100%iges Ethanol eingetaucht. Zuletzt wurde das Präparat mit einem alkoholischem Eindeckmittel (Eukitt, Hattfield) und einem Deckglas (Gerhard Menzel, Braunschweig) abgedeckt.

2.8 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte nach der Beratung durch das Institut für Medizininformatik des UKSH, Campus Kiel. Alle statistischen Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die Versuchsgruppen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov Test auf Normalverteilung untersucht, wobei alle Daten eine Normalverteilung aufwiesen. Mit einer univariaten Varianzanalyse wurden die Daten der Torsionsteifigkeit sowie die aus den μ CT gewonnenen Daten zu Kallusvolumen und Gewebemineralisationsdichte untereinander verglichen. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS 11.5 verwendet.

Für die graphische Darstellung der Daten wurden Box-Whisker-Plots gewählt. Diese ermöglichen eine gute Einschätzung der Verteilung der Werte und der Mittelwerte der Datenlage. Box-Whisker-Plots eignen sich zur Darstellung kardinalskaliertter Daten. Die Box stellt die Verteilung der mittleren 50 % der Daten dar, welche durch das obere und untere Quartil begrenzt werden. Der Median der Daten wird als durchgehender Strich in der Mitte der Box dargestellt. Die Whisker oder Antennen ermöglichen eine Darstellung der Ausreißer, welche oberhalb des 2,5 % Quantils und unterhalb des 97,5 % Quantils liegen, so dass innerhalb der Whisker 95 % der Daten liegen.

3 Ergebnisse

Die Futterdiät von von 3 mg/kg Körpergewicht Rivaroxaban wurde von allen Tieren postoperativ in adäquater Menge aufgenommen. Im postoperativen Verlauf kam es innerhalb von ein bis zwei Tagen zur Aufbelastung des frakturierten Beines. Die Tiere waren mobil, und wiesen innerhalb der Versuchsgruppen ein dem präoperativen vergleichbares Verhalten auf, ohne wesentliche erkennbare Veränderungen des Bewegungsablaufes oder äußerer Schmerzzeichen. Als postoperative Ausschlußkriterien dienten ein nachgewiesener Knochen- oder Weichteilinfekt, eine Gewichtsabnahme von mehr als 20 % des Körpergewichtes sowie eine makroskopisch oder radiologisch erkennbare Implantatdislokation. Zudem wurden Tiere, die keine einfache Schaft- Querfrakturen oder Schaft- Schrägfrakturen aufwiesen, von der Studie ausgeschlossen.

3.1 Makroskopie

Alle Tier wurden *post mortem* im Rahmen der Explantation der operierten Femora auf eventuelle Pathologien hin untersucht. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf die femoropatellaren und femoro-tibialen Gelenkverhältnisse, die Beinmuskulatur sowie die Frakturlokalisierung gelegt. Bei keinem der Tiere zeigten sich in diesem Zusammenhang Hinweise auf Patella- oder Kniegelenksluxationen, Infekte, Wundheilungsstörungen oder Muskelatrophien. Des Weiteren wurde bei jedem Tier die korrekte Lage und Länge der Kanüle überprüft. Nach Resektion des Weichteilmantels wurde die Überbauung des Frakturspaltes begutachtet. Makroskopisch zeigten sich hierbei im Hinblick auf die Kallusgröße und die Kallusbeschaffenheit keine erkennbaren Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.

3.2 Biomechanik

Nach vierwöchiger Diät war die Torsionssteifigkeit des Frakturkallus in Versuchstieren, die mit einer mit Rivaroxaban angereicherten Diät gefüttert wurden, nicht signifikant verändert im Vergleich zu den Versuchstieren, die eine entsprechenden Kontrolldiät erhalten hatten. ($0,0154 \pm 0,0039 \text{ N/m}^2$ versus $0,0141 \pm 0,0056 \text{ N/m}^2$; $p > 0,05$). Ebenso verhielt es sich mit den Tieren nach siebenwöchiger Diät mit Rivaroxaban, die Steifigkeit war nicht signifikant erniedrigt ($0,0329 \pm 0,0063 \text{ N/m}^2$ versus $0,0365 \pm 0,0098 \text{ N/m}^2$; $p > 0,05$).

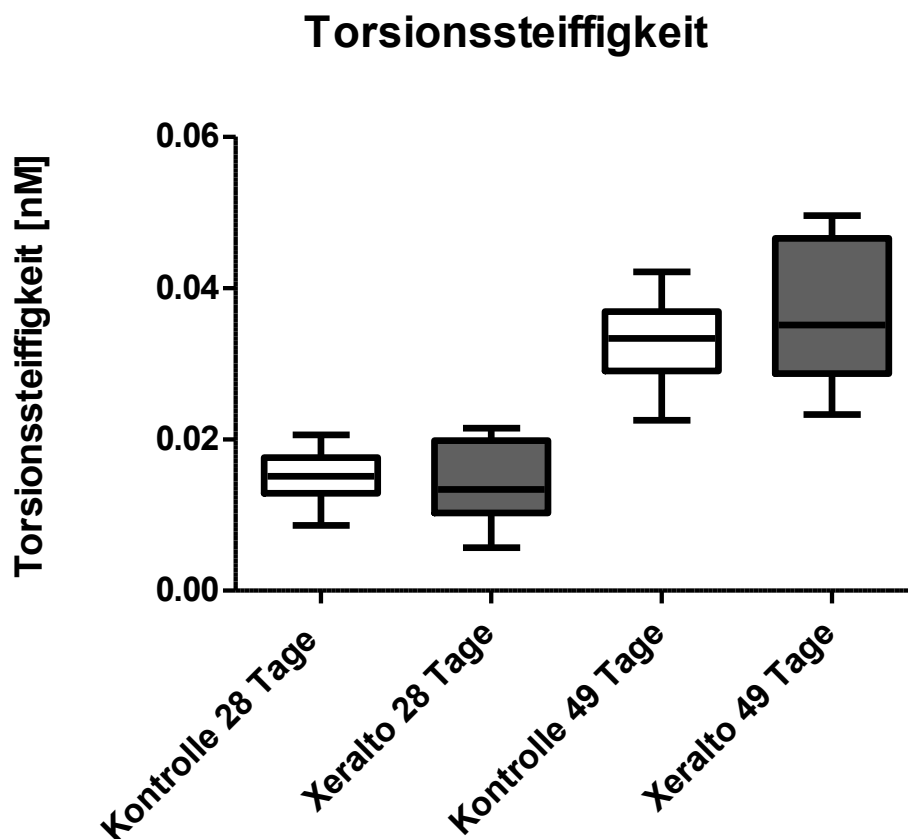


Abb.8 Bestimmung der Torsionssteifigkeit von Tieren die mit dem oralen Antikoagulanzen Rivaroxaban behandelt wurden (graue Whisker Boxplots) und den Tieren denen eine entsprechende Kontrolldiät verabreicht wurde (weiße Whisker Boxplots), getestet jeweils nach 28 und nach 49 Tagen (n=6 pro Gruppe).

3.3 Kallusvolumen

Bei der Messung des Kallusvolumens mittels μ CT wurden die Proben in einem Bereich von 4,2 mm jeweils ober und unterhalb des Frakturspalts gescannt und das entsprechende Kallusvolumen mittels Sano evaluation Software rekonstruiert. Nur 16 der 24 Proben konnten konkret gemessen und ausgewertet werden aufgrund von Schäden an den Knochen, die durch Transport oder technische Fehler bei der Messung aufgetreten waren. Eine erneute Messung nach Erweiterung des Studiumumfangs erschien jedoch aufgrund der anderen, schon vorliegenden Ergebnisse ethisch nicht vertretbar.

Bei dem gemessenen Kallusvolumen zeigten sich nach vierwöchiger Diät bei den Versuchstieren die mit einer Rivaroxaban angereicherten Diät gefüttert wurden eine positive Volumenveränderung im Vergleich zu den Kontrolltieren. ($28,37 \pm 13,42 \text{ mm}^3$ versus $42,17 \pm 11,98 \text{ mm}^3$; $p < 0,05$). Umgekehrt verhielt es sich mit den Versuchstieren nach siebenwöchiger Diät. Die Volumenveränderung wies einen negativen Trend auf ($10,07 \pm 2,61 \text{ mm}^3$ versus $8,9 \pm 0,29 \text{ mm}^3$; $p < 0,05$). Aufgrund der geringen Gruppenstärke (Kohorten 49 Tage: $n=2$ in Versuchsgruppe, $n=4$ in Kontrollgruppe) darf das Ergebnis allenfalls als Tendenz jedoch nicht als signifikantes Ergebnis betrachtet werden.

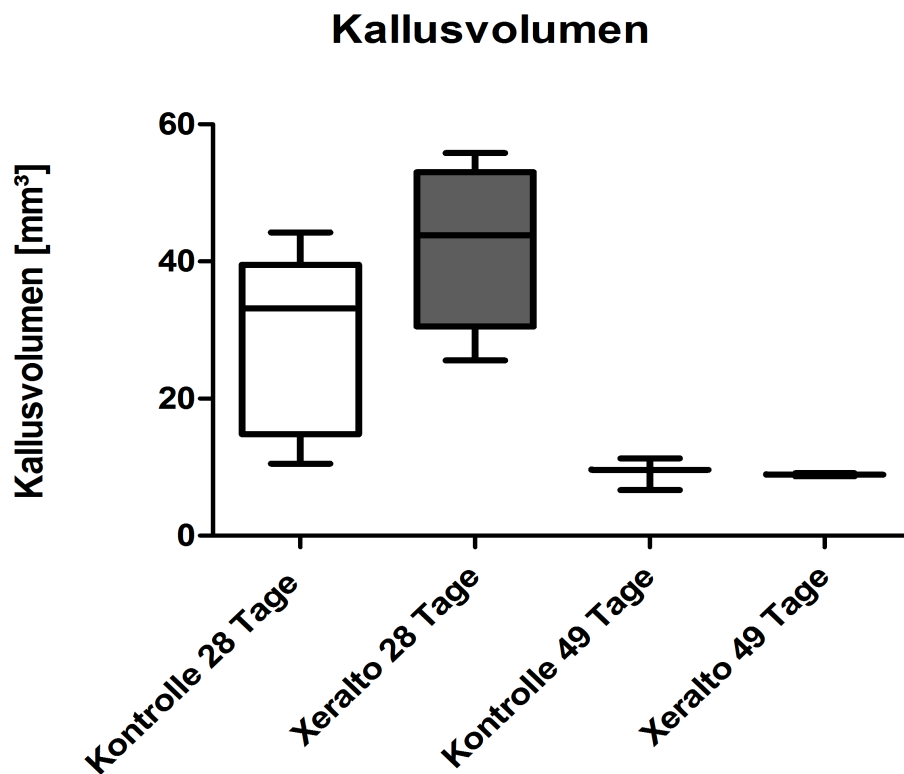


Abb.9 Bestimmung des Kallusvolumens von Tieren die mit dem oralen Antikoagulanzen Rivaroxaban behandelt wurden (graue Whisker Boxplots) und den Tieren denen eine entsprechende Kontrolldiät verabreicht wurde (weiße Whisker Boxplots), getestet jeweils nach 28 (n=6 pro Gruppe) und nach 49 Tagen (n=4 bei Kontrollgruppe und n=2 bei Versuchsgruppe)

3.4 Gewebemineralisationsdichte (TDM)

Nur 16 der 24 Proben konnten gemessen und ausgewertet werden. Bei dem gemessenen Knochendichten zeigten sich nach vierwöchiger Diät bei den Versuchstieren, die mit einer Rivaroxaban angereicherten Diät gefüttert wurden, eine nicht klar erkennbare Mineralisationsdichteveränderung im Vergleich zu den Versuchstieren, die mit entsprechender Kontrolldiät gefüttert wurden ($0,057 \pm 0,017 \text{ mg/cm}^3$ versus $0,055 \pm 0,012 \text{ mm}^3$; $p > 0,5$), die Dichteveränderung der Versuchsgruppe war ebenfalls nicht deutlich ($0,08 \pm 0,008 \text{ mg/cm}^3$ versus $0,076 \pm 0,007$; $p > 0,05$). Aufgrund der geringen Gruppenstärke (n=2 in Versuchsgruppe 49 Tage und n=4 in Kontrollgruppe 49 Tage) darf auch dieses Ergebnis allenfalls als Tendenz, jedoch nicht als aussagekräftiges, signifikantes Ergebnis betrachtet werden.

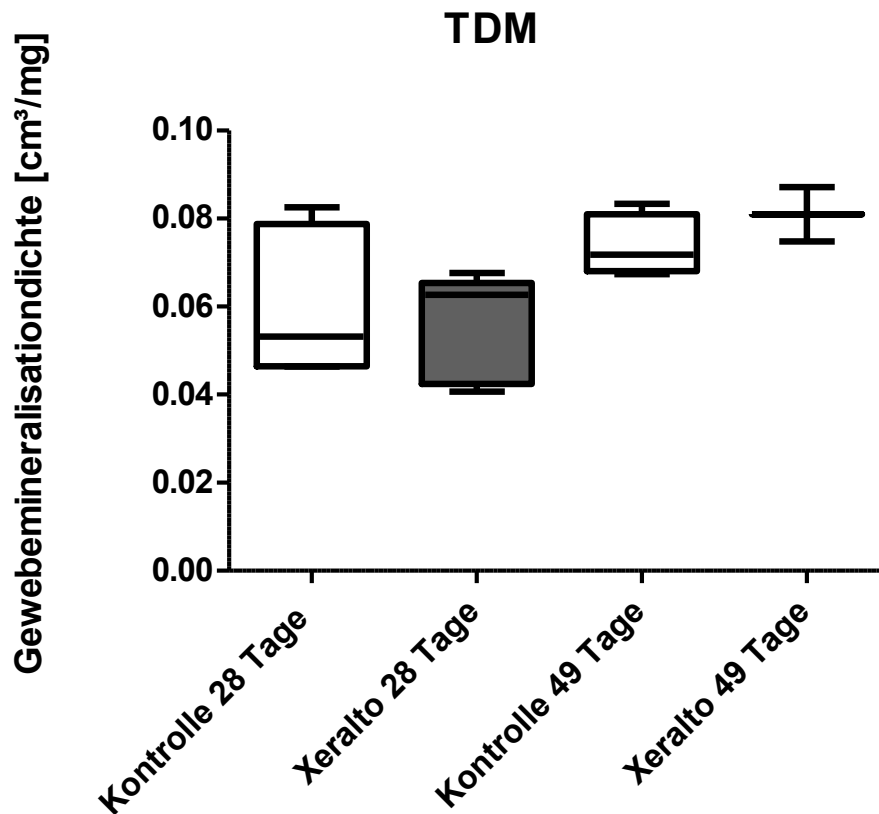


Abb.10 Bestimmung der Knochenmineralisationsdichte von Tieren die mit dem oralen Antikoagulant Rivaroxaban behandelt wurden (graue Whisker Boxplots) und den Tieren denen eine entsprechende Kontrolldiät verabreicht wurde (weiße Whisker Boxplots), getestet jeweils nach 28 (n=6 pro Gruppe) und nach 49 Tagen (n= 4 für Kontrollgruppe und n=2 für Versuchsgruppe).

3.5 Histologie

Zur histologischen Untersuchung wurden Schnitte in Hartschlifftechnik hergestellt und mit Toluidinblau und Hämatoxylin Eosin gefärbt. Die mikroskopische Analyse der fusionierten Präparatausschnitte zeigt eine 10fache Vergrößerung der Knochen im Längsschnitt.

28 Tage nach Fraktur sind die typischen reaktiven Veränderungen nach geschlossener Femurfraktur deutlich sichtbar in der Kortikalisunterbrechung und Kallusbildung.

In der Toluidinblau Färbung sind die knöchernen Anteile tiefblau dargestellt. Knorpelige Strukturen färben sich blass an. Die HE Färbung dokumentiert die typische blasse zytoplasmatische Anfärbung der Knorpelstrukturen. Nach 49 tägiger Beobachtungszeit ist eine deutliche Zunahme des knöchernen Anteils der Frakturzone zu erkennen. Dargestellt sind zwei Bei-

spiele für die unterschiedlich starke Ausprägung der Kallusreaktion bei verschiedenen Knochen.

Sowohl in der Kontroll- als auch in der Versuchsgruppe sind stärkere und schwächere Kallusreaktionen dokumentierbar. Es waren keine eindeutigen histologischen Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe festzustellen.

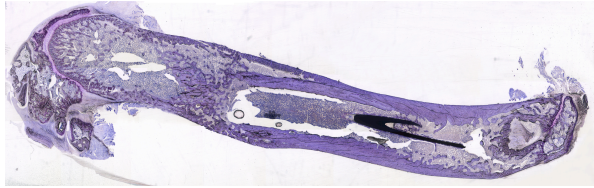


Abb.11 Tier 13, Kontrollgruppe nach 28 Tagen, Tolouidinblau

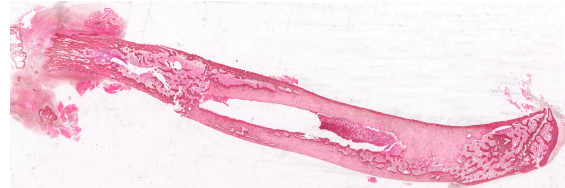


Abb.12 Tier 13, Hämatoxylin – Eosin

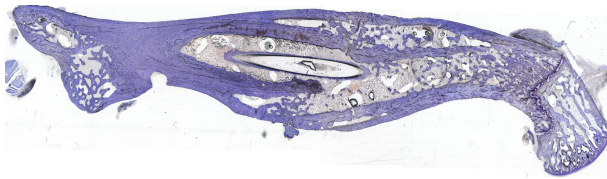


Abb.13 Tier 39, Versuchsgruppe nach 49 Tagen Tolouidinblau

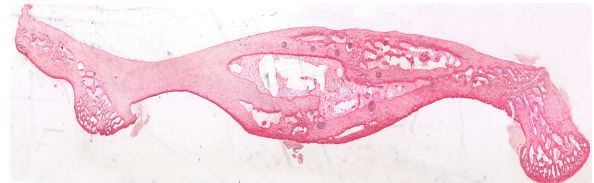


Abb.14 Tier 39, Hämatoxylin – Eosin

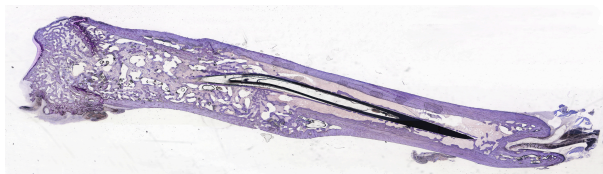


Abb.15 Tier 50, Kontrollgruppe nah 49Tagen Tolouidinblau

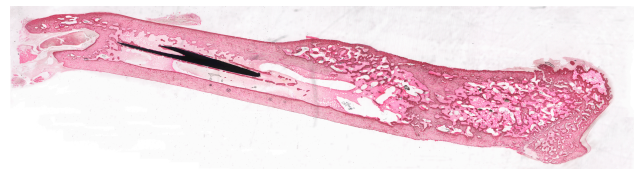


Abb.16 Tier 50, Hämatoxylin – Eosin

4 Diskussion

Es gibt Hinweise darauf, dass die Frakturheilung unter der subkutanen Antikoagulation, durch Faktor Xa vermittelt, bei der Verabreichung von unfraktioniertem und niedermolekularem Heparin verzögert ist (Hak et al., 2006, Kambiz Sarahrudi, 2011). Allerdings gibt es bis dato keine Untersuchung die zeigt in wie weit der orale Faktor Xa Inhibitor Rivaroxaban die Knochenheilung beeinflusst. Die Knochenbruchheilung stellt einen komplexen biologischen Prozess dar, der die Interaktion zahlreicher, auch knochenfremder Gewebstypen, wie etwa des periostären Weichteilgewebes oder des Gefäß-Kreislauf-Systems, erfordert (STREET et al., 2002). Aufgrund des komplexen örtlichen und zeitlichen Zusammenspiels der verschiedenen Phasen der Frakturheilung und aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit des ossären „micro-environments“ sind in-vitro-Untersuchungen zur Knochenbruchheilung nur sehr begrenzt aussagekräftig (Friedman RJ, 1996). Daher wurde der Einfluss des oralen Antikoagulanz Rivaroxaban auf die Frakturheilung anhand eines Tiermodells an der Ratte untersucht.

4.1 Diskussion der Methoden

Gründe für die Verwendung von Kleintiermodellen, und hier im Besonderen der Ratte, sind die geringeren Kosten für die Beschaffung, Zucht und die Haltung dieser Spezies. Daher sind größere Versuchsgruppen realisierbar. Da auch die Entwicklung und die experimentelle Testung von Rivaroxaban weitestgehend an der Ratte durchgeführt wurden, sind die Applikationsform und Dosierung bekannt. Das in der Arbeitsgruppe etablierte Frakturmodell nach Bonnarens an der Ratte wird zeitgleich in anderen Studien zur Frakturheilung verwendet, und die Ergebnisse sind dadurch gut vergleichbar. Eine große Herausforderung in der Verwendung von Frakturmodellen an der Ratte stellt deren geringe Größe dar. Demzufolge sind die großen Röhrenknochen, Femur und Tibia, am besten geeignet für Studien zur Frakturheilung (Hiltunen et al., 1993, Manigrasso and O'Connor, 2004). Frakturmodelle an Rippen eignen sich aufgrund der ungünstigen Anatomie schlecht für biomechanische Testmethoden. Die anatomischen Vorteile des Rattenfemur gegenüber der Tibia liegen in einem einheitlichen runden Querschnitt bei guter Weichteildeckung (Cheung KM, 2003). Aus diesem Grund zeigen diaphysäre Frakturen auch auf unterschiedlicher Höhe eine vergleichbare Kallusgröße. Somit ist anhand der geraden longitudinalen Achse am Rattenfemur mit großer Sicherheit ei-

ne standardisierte Fraktur zu erreichen. Die biomechanische Testung ist aufgrund der anatomischen Gegebenheiten am Femur ebenfalls zuverlässiger als an der Tibia. Zusammengefasst ist das Rattenfemur, das in der hier vorgestellten Arbeit als Frakturlokalisierung gewählt wurde, im Vergleich zu der Tibia als geeigneter für Studien zur Frakturheilung anzusehen (Holstein JH, 2009a). Die Knochensteifigkeit wurde mittels einer Rotationstestung bestimmt. Generell stehen zur biomechanischen Testung der Frakturheilung verschiedene Methoden zur Verfügung. Die am weitesten verbreiteten Testverfahren zur Untersuchung der Knochenbruchheilung im Kleintiermodell stellen die Drei-Punkt-Biegetestung und die Vier-Punkt-Biegetestung (Burstein AH, 1971), sowie die in dieser Studie verwendete Rotationstestung dar (Manigrasso and O'Connor, 2004). Im Rahmen der Vier-Punkt-Biegetestung wird die Kraft auf eine relativ große Fläche verteilt (Burstein AH, 1971). Für diese Messmethode muss jedoch bei einem Knochen mit einem Durchmesser von etwa 1,9 mm die einwirkende Kraft auf eine etwa 30 mm lange Messfläche verteilt werden. Da die zu testenden Rattenfemora aber nur eine Länge von ca. 20 mm haben, ist die Vier-Punkt-Biegetestung an diesen Proben praktisch nicht durchführbar (Manigrasso and O'Connor, 2004). Bei der Drei-Punkt-Biegetestung liegt die maximale Belastung des Knochens über nur einem einzigen Punkt (Burstein AH, 1971). Vergleichbar mit der Vier-Punkt-Belastung führt ein minimales Verdrehen des Femurs zu einer signifikanten Reduktion der Testpräzision (Lind PM, 2001). Im Gegensatz hierzu ist die Rotationstestung am Rattenfemur gut durchführbar und birgt geringes Fehlerpotential (Holstein JH, 2009b, Holstein JH, 2008). Ein überschüssiges Drehmoment wird in der klinischen Praxis als ein gängiger Frakturmechanismus betrachtet (Burstein AH, 1971). Die Rotationstestung stellt somit eine realitätsnahe Imitation eines klinischen Frakturszenarios dar, so dass die Rotationstestung zusammengefasst als eine geeignete Messmethode angesehen werden kann.

Eine weitere Methode um die Festigkeit des Knochens valide zu beurteilen ist die μ CT, welche bei der Beurteilung der Knochenfestigkeit in der Literatur einen ähnlich hohen Stellenwert besitzt wie die Torsionstestung (Markel M.D., 1990, Tiedeman J.J., 1990, Nyman JS, 2009). Hierbei kann mit Hilfe einer hochauflösenden Messmethode die Mikrostruktur des Knochens und des Kallus beurteilt werden. Besonderes Augenmerk wird auf die Gewebemineralisationsdichte des Kallus gelegt, da in einigen Studien gezeigt werden konnte, dass die Gewebemineralisationsdichte einen positiv signifikanten Zusammenhang mit der Stabilität des Knochens aufweist. Dabei weist ein generell erhöhtes Kallusvolumen auf eine niedrigere Kallusmineralisation und eine geringere Fusion des Frakturspalts hin, und bedeutet damit eine

schlechtere Frakturheilung und einen wenig belastbaren Kallus (Nyman JS, 2009). Aus diesem Grund sind in dieser Arbeit beide Größen untersucht worden. Der besondere Vorteil der μ CT liegt in der Möglichkeit die Proben im Anschluss noch weiteren Untersuchungen zuführen zu können, wie hier der histologischen Überprüfung, ohne die Proben durch die Untersuchung zu verändern und damit die Aussagekraft folgender Untersuchungen in Frage stellen zu müssen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Obwohl es Hinweise darauf gibt, dass subkutan applizierte Faktor X Inhibitoren die Frakturheilung verzögern (Stinchfield et al., 1956, Street et al., 2000c), konnte in der vorliegenden tierexperimentellen Studie kein signifikanter Einfluss von Rivaroxaban auf die Frakturheilung nachgewiesen werden.

Sowohl in der Biomechanik, als auch im μ CT und in der histologischen Untersuchung der Proben war keine Korrelationen zwischen der Einnahme von oralen Faktor X Inhibitoren und Knochenheilung nachweisbar.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Torsionssteifigkeit durch die Einnahme von Rivaroxaban nicht verändert wurde. Die Messung der Torsionssteifigkeit ist als wissenschaftlich anerkannter Standard zur Evaluation der Knochenbruchheilung mehrfach beschrieben worden (Street et al., 2000a, Nyman JS, 2009, Yankel Gabet, 2004). Die hier verwendete Methode der Rotationstestung nach Manigrasso (Manigrasso and O'Connor, 2004) scheint für unsere Studie der Drei- und Vier-Punkt-Biegetestung überlegen, und wurde daher von uns verwendet (Burstein AH, 1971).

Der Einfluss von niedermolekularem Heparin in einem stabilisierten Rattenfemur Modell wurde 2006 von Hak und Kollegen beschrieben. Die Tiere wurden randomisiert mit 70 IU/kg Körpergewicht Dalteparin oder Kochsalzlösung behandelt und nach 2, 3 und 6 Wochen biomechanisch getestet. Dabei konnte keine signifikante Veränderung der mechanischen Eigenschaften des Knochens festgestellt werden (Hak et al., 2006). Auch Street und Kollegen beschrieben 2009 die biomechanische Festigkeit unter dem Einfluss von Heparinen. 48 Kaninchen der Rasse New Zealand White wurden jeweils 2 Rippen rechts thorakal gebrochen. Da-

von wurden je 24 Tiere randomisiert mit jeweils 2 mg Enoxaparin oder Kochsalzlösung behandelt. Nach 21 Tagen wurden 6 Tiere getötet und die Rippen biomechanisch auf ihre Torsionssteifigkeit getestet. Dabei wurde eine geringe aber signifikante Reduktion der Torsionssteifigkeit gemessen (Street et al., 2000c).

Die inhomogene und geringe Datenlage bezüglich der Frakturheilung unter dem Einfluss von Heparinen, im Besonderen im Bezug auf Substanz, Spezies und Frakturmodell, macht den genauen Vergleich zu anderen Arbeiten schwierig. Der geringe Einfluss von niedrigmolekularen Heparinen auf den Heilungsprozeß bei Kaninchen (Street et al., 2000c) ließ sich in dem Versuch von Hak und Kollegen im Rattenmodell nicht nachweisen (Hak et al., 2006), was jedoch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur biomechanischen Stabilität unter Applikation von Rivaroxaban stützt.

Da die biomechanische Torsionstestung als Goldstandard zur Beurteilung von Knochenqualität gilt, und sich die Ergebnisse mit anderen Torsionstest zu unbehandelt frakturierten Rattenfemuren decken (Nyman JS, 2009), ist das Ergebnis nachvollziehbar.

In der Untersuchung der Proben mittels μ CT zeigten sich Unterschiede zwischen Test- und Kontrolltieren. Auch zeigte sich verschieden starke Kallusbildung innerhalb einer Gruppe. Dies ist vor allem durch die unterschiedlich rigide Fixierung bei diesem Frakturmodell zu erklären und auch schon in vorangegangenen Studien diskutiert worden, z.B bei Nyman und Kollegen, was jedoch in keiner Weise unsere Arbeit in Frage stellen darf. (Nyman JS, 2009) Bei der Auswertung des Kallusvolumens zeigte sich nach vierwöchiger Diät bei den Versuchstieren ein vergrößertes Kallusvolumen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Nach sieben Wochen konnte man eine leichte Volumenabnahme des Kallus im Vergleich von Versuchs- und Kontrolltieren beobachten.

Bei der Auswertung der Gewebemineralisationsdichte zeigte sich nach vierwöchiger Diät bei den Versuchstieren, die mit einer Rivaroxaban angereicherten Diät gefüttert wurden, eine nicht signifikante Dichteveränderung im Vergleich zu den Versuchstieren die mit entsprechender Kontrolldiät gefüttert wurden (n=2 in Versuchsgruppe und n=4 in Kontrollgruppen 28 Tage).

Ebenso verhielt es sich mit den Versuchstieren nach siebenwöchiger Diät, die Dichteveränderung ist nicht signifikant. Zu berücksichtigen ist jedoch bei diesen Ergebnissen die geringe Gruppenstärke in den einzelnen Gruppen (n=2 in Versuchsgruppe 49 Tage und n=4 in Kon-

trollgruppe 49 Tage). Damit lässt sich nach statistischen Kriterien kein signifikantes Ergebnis beschreiben.

Im Sinne der Tierschutzbestimmungen schien es als ethisch nicht vertretbar, den Versuchsumfang zu vergrößern um einen Teilaspekt der vorliegenden Arbeit als statistisch signifikant zu bewerten.

Da die Ergebnisse von Kallusvolumen und Gewebemineralisationsdichte keinen Zusammenhang mit der Applikation von Rivaroxaban zeigen, kann man vermuten, dass keine Auswirkungen auf die Frakturheilung bestehen. Beweisen lässt sich die Aussage damit jedoch nicht, da die Gruppenstärke nicht ausreichte um ein aussagekräftiges Ergebnis zu produzieren. Aufgrund technischer Probleme war es hier jedoch nicht möglich, mehr Knochen zu messen.

Gabet und Kollegen konnten die Wirksamkeit von Osteogenic growth peptide in Rattenknochen durch erhebliche Unterschiede im μCt bezüglich der Gewebemineralisationsdichte und des Kallusvolumens belegen (Yankel Gabet, 2004). Das stützt unsere Ergebnisse nach denen Rivaroxaban keinen im μCt nachweisbaren Einfluss auf Gewebemineralisationsdichte und Kallusvolumen und damit auf die Frakturheilung hat.

Jedoch zeigte die biomechanische Messung der Torsionssteifigkeit, welche als anerkannter Standard zur Evaluation der Knochenbruchheilung gilt, keine Veränderung.

Nach vier und sieben Wochen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Somit wird angenommen, dass die Applikation von Rivaroxaban keine messbaren Auswirkungen auf die Frakturheilung hat

5 Zusammenfassung

Wird ein Patient im Rahmen einer Frakturbehandlung bettlägerig, können Thrombembolien und Pneumonien den Patienten durch die Immobilisation gefährden. Ohne eine angemessene Prophylaxe werden bei Patienten mit Hüft- und Kniegelenksersatzoperationen Thrombosseraten von bis zu 60 % angegeben, bei Verletzungen des Beckens oder der Wirbelsäule von sogar 80 % (Geerts et al., 2008). Tiefe Beinvenenthrombosen werden bei allgemeinchirurgischen Patienten bei durchschnittlich 25 % beobachtet, die Raten von Thrombembolien liegen bei internistischen Patienten bei bis zu 20 % (Geerts et al., 2008). Trotz breitem Einsatzes der antithrombotischen Maßnahmen stellen Thrombembolien immer noch ernst zu nehmende Probleme bei Patienten verschiedenster Risiokoprofile dar.

Als Versuchstier dienten ausgewachsene Ratten des Typs Wistar, da für diese Spezies bereits ein standardisiertes und publiziertes Frakturmodell existiert. Die für die Versuchsdurchführung benötigte Applikationsform und Dosierung sind bekannt, da auch die Entwicklung und die experimentelle Testung von Rivaroxaban weitestgehend an der Ratte durchgeführt wurde. Es wurden 48 Ratten für die Studie verwendet. Den Tieren wurde nach geschlossener Femurfraktur und Stabilisierung mittels intramedullärem Kraftträger für vier Wochen (n=12), und für sieben Wochen (n=12), Rivaroxaban mit dem Futter verabreicht. Die weiteren Versuchsgruppen (n=12) erhielten in der gleichen Zeit entsprechende Kontrolldiäten. Unmittelbar nach Ablauf des Versuchszeitraumes wurden die Tiere getötet und die Femora für die weiteren radiologischen, histologischen und biomechanischen Untersuchungen explantiert.

Die an der eigenen Klinik konstruierte Testmaschine nach Manigrasso wurde zur biomechanischen Testung verwendet. Die histomorphologische Auswertung von Knochenpräparaten ist seit 1987 durch die Empfehlung des Nomenclature Committee der American Society of Bone and Mineral Research nach internationalem Standard möglich.

Die labortechnischen Voraussetzungen bestehen im kooperierenden Labor der Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie des UKSH Campus Kiel, (Leiter Prof. Rer. nat. Yeha Acil, Direktor Professor Dr. Med. dent. Wiltfang) und im AO Research Institute Davos (Professor Dr. Mauro Alini). In Zusammenarbeit mit dem AO Research Institute wurden die radiologische Untersuchungen der Knochenstruktur durchgeführt und mittels μ CT detailliert untersucht.

In allen Versuchsgruppen konnten nach vier- und siebenwöchiger Frakturheilung sowohl makroskopische, histologische als auch radiologisch Zeichen einer knöchernen Frakturüberbrückung gefunden werden.

Die biomechanischen Untersuchungen zeigten, dass nach oraler Applikation von Rivaroxaban im Vergleich zu den Kontrolltieren kein signifikanter Unterschied in der Torsionssteifigkeit des Frakturkallus besteht, ebenso wie in der radiologischen Untersuchung kein signifikanter Unterschied in Kallusvolumen und Gewebemineralisationsdichte zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe feststellbar ist.

Die histologische Untersuchung zeigte in Kontroll- als auch in der Versuchsgruppe stärkere und schwächer nachweisbare Kallusreaktionen. Es waren keine eindeutigen histologischen Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe zu dokumentieren.

Die inhomogene und geringe Datenlage bezüglich der Frakturheilung unter dem Einfluss von Heparinen, im Besonderen im Bezug auf Substanz, Spezies und Frakturmodell, macht den Vergleich zu anderen Arbeiten schwierig. Der geringe Einfluss von niedrigmolekularen Heparinen auf den Heilungsprozess bei Kaninchen (Street et al., 2000c) ließ sich in dem Versuch von Hak und Kollegen im Rattenmodell nicht nachweisen (Hak et al., 2006), was die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur biomechanischen Stabilität unter Applikation von Rivaroxaban stützt.

Da die Ergebnisse von Kallusvolumen und Gewebemineralisationsdichte keinen Zusammenhang mit der Applikation von Rivaroxaban zeigen, kann man vermuten, dass keine Auswirkungen auf die Frakturheilung bestehen. Beweisen ließ sich die Aussage damit jedoch nicht, da die Gruppenstärke nicht ausreichte um ein aussagekräftiges Ergebnis zu produzieren. Aufgrund technischer Probleme war es hier nicht möglich mehr Knochen zu messen.

Obwohl es Hinweise darauf gibt, dass subkutane applizierte Faktor X Inhibitoren die Frakturheilung verzögern (2006, Stinchfield et al., 1956, Street et al., 2000c), konnte in der vorliegenden tierexperimentellen Studie kein signifikanter Einfluss von Rivaroxaban auf die Frakturheilung nachgewiesen werden.

Sowohl in der Biomechanik, als auch im μ CT wie in der histologischen Untersuchung der Proben konnten keine Korrelationen zwischen oralen Faktor X Inhibitoren und Knochenheilung gezeigt werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die orale Antikoagulanz durch Rivaroxaban die Knochenbruchheilung im Femurfrakturmodell der Ratte nicht negativ beeinflusst.

6 Quellenangaben

- ALEJANDRO GONZÁLES DELLA VALLE MD, A. S. M., GEORGE GO BS, GREGORY SORRIAUX MD, THOMAS P. SCULCO MD, NIGEL E. SHARROCK MB CHB, EDUARDO A. SALVATI MD 2006. Venous Thromboembolism Is Rare with a Multimodal Prophylaxis Protocol after Total Hip Arthroplasty. *Clinical Orthopedics and Related Research*, 444, 146 - 153.
- BONNARENS, F. & EINHORN, T. A. 1984. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J.Orthop.Res.*, 2, 97-101.
- BURSTEIN AH, F. V. 1971. A standart test for laboratory animal bone. *Biomech*, 4, 155-158.
- CHEUNG KM, K. K., ANDREW G, LU W, CHAN D, CHEAH KS 2003 An externally fixed femoral fracture model for mice. *J Orthop Res*, 21, 471-480.
- DEEPA, P. R. & VARALAKSHMI, P. 2006. Influence of a low-molecular-weight heparin derivative on the nitric oxide levels and apoptotic DNA damage in adriamycin-induced cardiac and renal toxicity. *Toxicology*, 217, 176-183.
- ERIKSSON, B. I., BORRIS, L. C., DAHL, O. E., HAAS, S., HUISMAN, M. V., KAKKAR, A. K., MISSELWITZ, F., MUEHLHOFER, E. & KALEBO, P. 2007. Dose-escalation study of rivaroxaban (BAY 59-7939)--an oral, direct Factor Xa inhibitor--for the prevention of venous thromboembolism in patients undergoing total hip replacement. *Thromb.Res.*, 120, 685-693.
- ERIKSSON, B. I., BORRIS, L. C., DAHL, O. E., HAAS, S., HUISMAN, M. V., KAKKAR, A. K., MUEHLHOFER, E., DIERIG, C., MISSELWITZ, F. & KALEBO, P. 2006. A once-daily, oral, direct Factor Xa inhibitor, rivaroxaban (BAY 59-7939), for thromboprophylaxis after total hip replacement. *Circulation*, 114, 2374-2381.
- ERIKSSON, B. I., BORRIS, L. C., FRIEDMAN, R. J., HAAS, S., HUISMAN, M. V., KAKKAR, A. K., BANDEL, T. J., BECKMANN, H., MUEHLHOFER, E., MISSELWITZ, F. & GEERTS, W. 2008. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip arthroplasty. *N.Engl.J.Med.*, 358, 2765-2775.
- FRIEDMAN RJ, A. Y., 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.
- GEERTS, W. H., BERGQVIST, D., PINEO, G. F., HEIT, J. A., SAMAMA, C. M., LASSEN, M. R. & COLWELL, C. W. 2008. Prevention of venous thromboembolism: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*, 133, 381S-453S.
- H. W. HAMILTON, J. S. C., J. H. GARDINER, A. M. WILEY 1970. Venous Thrombosis in Patients with Fracture of the Upper End of the Femur. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 52 b, 268 - 289.
- HAK, D. J., STEWART, R. L. & HAZELWOOD, S. J. 2006. Effect of low molecular weight heparin on fracture healing in a stabilized rat femur fracture model. *J.Orthop.Res.*, 24, 645-652.

- HENRY, B. J., KENISON, M., MCVAY, C., ROLFE, R., GRAHAM, S., RASTY, J., SLAUTERBECK, J. & DABEZIES, E. J. 2002. The effect of local hematoma blocks on early fracture healing. *Orthopedics*, 25, 1259-1262.
- HILTUNEN, A., VUORIO, E. & ARO, H. T. 1993. A standardized experimental fracture in the mouse Tibia. *J Orthop Res*, 11, 305-312.
- HOLSTEIN JH, G. P., CULEMAN U, SCHEUER C, KRISTEN A, POHLEMANN T, MENGER MD 2009a. Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration. *J Orthop Traume*, 23, 31-38.
- HOLSTEIN JH, M., HISTING T, BECKER SC, FIEDLER M, GARCIA P, CULEMAN U, SCHEUER C, KRISTEN A, POHLEMANN T, MENGER MD 2009b. Development of a Stable Closed Femoral Fracture in Mice. *J Surg Res*, 153, 71-75.
- HOLSTEIN JH, M. R., HISTING T, BECKER SC, FIEDLER M, GARCIA P, MEIER C, POHLEMANN T, MENGER MD 2008. Rapamycin affects early fracture healing in mice. *Br J Pharmacol*, 154, 1055-1062.
- K. PEERLINK MD, I. D. L. P., M. GOLDBERG MD PHD, D. FARREL BA, J. BARRETT PHD, E. HAND BS, D. PANEBIANCO MS, H DECKMYN PHD, J. VERMYLEN MD PHD, J. ARNOUT DSC 1993. MK- 383 (L-700,462), a Selective Nonpeptide Paletet Glycoprotein IIa/IIIb Antagonist, Is Active in Man. *Circulation*, 88, 1512 - 1517.
- KAMBIZ SARAH RUDI, G. K., ANITA THOMAS, MARK MICHEL, HARALD WOLF, MHEDI MOUSAVI, SEYEDHOSSEIN AHARINEJAD 2011. The influence of low molecular weight heparin on the expression of osteogenic growth factors in human fracture healing. *International Orthopaedics*, 36, 1095 - 1098.
- LIND PM, L. L., LARSSON S, ORBERG J 2001. Torsional testing and peripheral quantitative computed tomography in rat humerus. *Bone*, 29, 265-270.
- LORI LUCHTMAN-JONES, G. J. B. J. 1995. The Current Status of Coagulation. *Annals of Medicine*, 27 47 - 52.
- MANIGRASSO, M. B. & O'CONNOR, J. P. 2004. Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J. Orthop. Trauma*, 18, 687-695.
- NEUMEISTER B., B. I., LIEBICH H. 2000. *Klinikleitfaden Labordiagnostik*, Urban & Fischer.
- NYMAN JS, S. M., SATYAWAN JADAV, ALFRED MANSOUR, TOSHIKA YOSHII, GREGORY R. MUNDY, GLORIA E. GUTIERREZ, 2009. Quantitative measures of femoral fracture repair in rats derived by micro-computed tomography. *Journal of Biomechanics*, 42, 891-897.
- PERZBORN, E., STRASSBURGER, J., WILMEN, A., POHLMANN, J., ROEHRIG, S., SCHLEMMER, K. H. & STRAUB, A. 2005. In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939--an oral, direct Factor Xa inhibitor. *J. Thromb. Haemost.*, 3, 514-521.
- POHL, E. 1939. *Die Marknagelosteosynthese*. Germany patent application 742097.
- PORRECA, E., REALE, M., DI FEBBO, C., DI GIOACCHINO, M., BARBACANE, R. C., CASTELLANI, M. L., BACCANTE, G., CONTI, P. & CUCCURULLO, F. 1996. Down-regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) by interleukin-1 receptor antagonist in human monocytes. *Immunology*, 89, 424-9.

- ROMEIS B, B. P., DENK H, 1989. *Romeis Mikroskopische Technik*, München, Baltimore, Urban und Schwarzenberg.
- SHARNOFF, J. G. 1975. Letter: Prevention of postoperative thromboembolism. *Lancet*, 2, 361.
- STINCHFIELD, F. E., SANKARAN, B. & SAMILSON, R. 1956. The effect of anticoagulant therapy on bone repair. *J.Bone Joint Surg.Am.*, 38-A, 270-282.
- STREET, J., WINTER, D., WANG, J. H., WAKAI, A., MCGUINNESS, A. & REDMOND, H. P. 2000a. Is human fracture hematoma inherently angiogenic? *Clin.Orthop.Relat Res.*, 224-237.
- STREET, J. T., MCGRATH, M., O'REGAN, K., WAKAI, A., MCGUINNESS, A. & REDMOND, H. P. 2000b. Thromboprophylaxis using a low molecular weight heparin delays fracture repair. *Clin.Orthop.Relat Res.*, 278-289.
- STREET, J. T., MCGRATH, M., O'REGAN, K., WAKAI, A., MCGUINNESS, A. & REDMOND, H. P. 2000c. Thromboprophylaxis Using a Low Molecular Weight Heparin Delays Fracture Repair. *Clinical Orthopedics and Related Research*, 381, 278-289.
- TURNER, C. & BURR, D. 1993. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*, 14(4), 595-608.
- WOLINSKY, S., FEMUR, SHAFT 2007. *AO Principles of Fracture Management*, Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.
- YANKEL GABET, R. M., ERAN REGEV, JONA SELA, ARIE SHTEYER, KRISTY SALISBURY, MICHAEL CHOREV, ITAI BAB, 2004. Osteogenic growth peptide modulates fracture callus structural and mechanical properties. *Bone*, 35, 65-73.

7 Materialverzeichnis

7.1 Chemikalien

- Ameisensäure 0,1 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Aqua dest (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- BSA, Fraction V (Sigma Chemical, St. Louis, USA)
- Eindeckmittel für Mikroskopie (Eukitt, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethanol absolut (1.00983.2500, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol vergällt 99% (642, BüFa Chemikalien, Hude/ Altmoorhausen, Deutschland)
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Fixierung mit Aquatex (Boehringer, Mannheim, Deutschland)
- Flüssigstickstoff (Air Liquid, Düsseldorf, Deutschland)
- Formalin (7040, J. T. Baker, Phillipsburg, USA)
- Hämalun (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Hämatoxylin-Eosin (HE) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- HCl-Alkohol (1.00327.1000, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Hot Start Taq DNA-Polymerase (Invitrogen/ Life technologies, Darmstadt, Deutschland)
- Katalysator: α - α - Azoisobutyronitril (11630, Sigma-Aldrich/Fluka, St. Louis, USA)
- Loctite 493 Sekundenkleber (Loctite/ Henkel, Garching, Deutschland)
- Mayer's Hämalunlösung (1.09249.0500, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Methanol 20 % (8045, J. T. Baker, Phillipsburg, USA)
- Monomer: Methacrylsäuremethylester 99 % (64200, Sigma-Aldrich/ Fluka, St. Louis, USA)
- Paraffin (McCormick Scientific/ Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland)
- Paraformaldehyd (J. T. Baker, Phillipsburg, USA)
- PBS
8,0 g NaCl (1.06400.5000, Merck, Darmstadt, Deutschland)
1,44 g Na₂HPO₄ * 2 H₂O (Di-Natriumhydrogenphosphat mit 2 Wasser)
(1.06580.1000, Merck, Darmstadt, Deutschland)
0,2 g KCl (1.04936.0500, Merck, Darmstadt, Deutschland)
0,2 g KH₂PO₄ (Kaliumdihydrogenphosphat) (1.04873.1000, Merck, Darmstadt)

ad.1000 ml Aqua dest

- Polyacryl Carrier (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, USA)
- Polyacrylmetacrylat (PMMA) (Sigma Aldrich/ Fluka, St. Louis, USA)
- Protease-Induced Epitope Retrieval (PIER) (Sigma-Aldrich/ Fluka, St. Louis, USA)
- Protease-induced Epitope Retrieval (PIER) (Sigma Aldrich/ Fluka, St. Louis, USA)
- Proteinase K (Dako, Glostrup, Dänemark)
- Safranin-O (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Stoppbad
4 ml Eisessig (1.00063.1000, Merck, Darmstadt, Deutschland)
400ml Fixierer (Kodak, Stuttgart, Deutschland)
- Spüll.sung AGEPON (Agfa-Gevert, Leverkusen, Deutschland)
- TBS
0,9 g Tris-Base (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
6,85 g Tris-HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
8,78g NaCl (s. PBS)
ad. 1000 ml Aqua dest

7.2 Geräte

- Achatmörser
- Axioskop 40 (Zeiss, Jena, Deutschland)
- Diamantbandsäge Typ 300 (Exakt, Norderstedt, Deutschland)
- Gewebelysators (Homogenisator, Precellys/ Bertin Corp., Villeurbanne, Frankreich)
- Homogenisator (Stahl Kit PeqLab, Precellys/ Bertin Corp., Villeurbanne, Frankreich)
- I-Cycler (BioRad, München, Deutschland)
- Hochgeschwindigkeitszentrifuge (Biomet, Warsaw, USA)
- Kraftaufnehmer ; Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH, Model U1A
- Knochenzement PMMA; polymerem Methyl-Methacrylat der Firma Heraeus
- Luminex 100.™ - IS (Luminex, Austin, USA)

- Röntgengerät HP Faxitron X-Ray System (Elaton/ Faxitron, Tucson, USA)
- Schiebelehre/ Handmessgerät (Elaton, Schweiz)
- Schleifmaschine (Exakt, Norderstedt, Deutschland)
- Schlittenmikrotom HM 430 (Richard-Allan Scientific/ Thermo Scientific, Waltham, USA)
- Vakuumpumpe (Exakt, Norderstedt, Deutschland)

7.3 Medikamente

- Metamizol (Novalgin ®) (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Deutschland)
- Midazolam (Dormicum ®) (Ratiopharm, Ulm, Deutschland)
- Rivaroxaban (Xarelto ®) (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland)

7.4 Verbrauchsmaterialien

- Einmalskalpell Feather No.10 (Dr. Junghans Medical, Bad Lausick, Deutschland)
- Gudy-Clear 23 (Neschen, Bückeberg, Deutschland)
- Klebeband (Tesafilm, Hamburg, Deutschland)
- Kryogefäße (Genaxxon BioScience, Ulm, Deutschland)
- Luminex assays (LiquiChip200, Qiagen, Valencia, USA)
- Matrix2D Röhrchen (Vitaris, Baar, Belgien)
- Mikroradiographieröntgenplatte High Resolution HD Plates (HTA Enterprises Microchrome Tecnology Products, Remuda Lane, USA)
- Monovetten CPDA-beschichtet (Saerstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Röntgenplattenentwickler (Kodak, Stuttgart, Deutschland)
- Spezialfolie (Gudy clear 23, Neschen, Bückeberg, Deutschland)
- Superfrost ® plus Objektträger (Gerhard Menzel GmbH/ Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland)
- Braun Sterican Einmalkanüle nach ISO 7864 - 0,90 x 40mm

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Die Gerinnungskaskade	Seite 5
Abb. 2:	Die Versuchsplanung	Seite 13
Abb. 3:	Operation der Versuchstiere	Seite 14
Abb. 4:	Femurfraktur nach Bonnarens	Seite 15
Abb.5:	Torsionstest nach Manograsso	Seite 17
Abb. 6: und 7:	Micro CT Bildgebung der Frakturregion	Seite 19
Abb. 8:	Bestimmung der Torsionssteifigkeit	Seite 25
Abb. 9:	Bestimmung des Kallusvolumens	Seite 27
Abb. 10:	Bestimmung der Knochenmineralisationsdichte	Seite 28
Abb. 11 bis 16:	Histologische Darstellung der Proben	Seite 29

9 Danksagung

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn PD. Dr. med. Sebastian Lippross bedanken, der sich bereit erklärte, mich als Doktoranden zu betreuen und mir zu jeder Tages- und Nachtzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Darüber hinaus hat er ein hohes Maß an Vertrauen, freundschaftlichem Entgegenkommen und viel Zeit und Geduld bewiesen.

Ebenso will ich mich bei Dr. med. Matthias Weuster bedanken, der mir auch jederzeit mit Interesse und Zeit zu Seite gestanden hat.

Herzlichen Dank gilt Dr. rer. nat. Nadine Steubesand, Kathrin Lange und Gaby Neßenius für die exzellente technische Unterstützung, die gute Stimmung und das gute Arbeitsklima im Labor.

Prof. Dr. Seekamp danke ich für die Möglichkeit die Arbeit an seinem Institut zu schreiben Herrn Vogiatzis Herrn Studt und Herrn und Herrn Hahne, Klinik für Orthopädie, Direktor Prof Hasselflug, gilt mein Dank für die Betreuung der biomechanischen Versuche, die technische Umsetzung und die EDV Unterstützung.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr.Dr. Wiltfang und Prof. Acil, Klinik für Mund, Kiefer und Gesichtschirurgie für die Möglichkeit die histologischen Untersuchungen in Ihrem Labor durchzuführen.

Meinen Freunden danke ich für Ihre aufbauenden Worte, ihr stets offenes Ohr und ihre kritischen Anregungen an meiner Arbeit, ganz besonders Claudia Ehlert und Kai Kunstmann waren mir eine große Hilfe.

Ganz besonders bedanken will ich mich bei meiner Familie.

Ohne deren Geduld, aufbauenden Worte, der vielen gemeinsam geschulterten Problemen sowie der finanziellen Unterstützung wäre ich nicht in der Lage gewesen, weder mein Studium noch diese Arbeit in dieser Form zu gestalten. Vielen lieben Dank Jutta, Alfred und Anna.

Zum Schluss möchte ich mich auch noch bei Albert Hegener bedanken. Für sein stets offenes Ohr und guten Rat in jeder Lebenslage, besonders der kritische Erörterung, der ethischen Vertretbarkeit einer solchen Arbeit. Danke Albert.

Akademischer Lebenslauf

Stefan Brüggemann

Julienlusterweg 37 a, 24109 Kiel

Tel.: 0176 - 84017986

E-Mail: SchreibStefan@gmx.de

Persönliche Daten

Geboren am 06. 02. 1982 in Meschede

Familienstand: Ledig

Schulbildung

2002 **Allgemeine Hochschulreife
Gymnasium der Benediktiner Meschede**

Studium

2004- 2005 **Studium der Physik**

Ab 2005 **Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Heinrich
Heine Universität zu Düsseldorf**

2008 **Ärztliche Vorprüfung**

2008 – 2012 **Klinisches Studium der Humanmedizin an der Christian Alb-
recht Universität zu Kiel**

2012 **Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**

Praktischer Teil der medizinischen Ausbildung

Famulaturen:

02/2009 **Handchirurgie Lubinus Klinik, Kiel**

10/2009 Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel
03/2010 Allgemeinchirurgie, Addington Hospitel, Durban (Südafrika)
09/2010 Public Health, Center Pacitan, East Java

Praktisches Jahr:

09 / 2011 – 12 / 2011 I. Radiologie
Radiologische Klinik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel

12 / 2011 – 04 / 2012 II. Chirurgie
Addington Hospital, Kwazlu Natal, Durban (Südafrika)

04 / 2012 – 08 / 2012 III. Innere Medizin
Inland Klinik Eckernförde

Veröffentlichung

Rivaroxaban does not impair fracture healing in a rat femur fracture model: an experimental study.

Tim Klüter^{1*†}, Matthias Weuster^{1†}, Stefan Brüggemann¹, Leif Menzdorf¹, Stefanie Fitschen-Oestern¹, Nadine Steubesand¹, Yahya Acil³, Thomas Pufe², Deike Varoga¹, Andreas Seekamp¹ and Sebastian Lippross¹

Weitere Tätigkeiten

11 / 2003 – 06 / 2004 Zivildienst Deutsches Rotes Kreuz, Köln

03 / 2009 – 11 / 2011 Studentische Hilfskraft in der Handchirurgie Lubinus Klinik, Kiel

09 / 2011 – 02 / 2012 Studentische Hilfskraft in der Unfallchirurgischen Arbeitsgruppe
Weuster / Lippross