

**‘V-Shaped Bending Support’ Membantu dalam
Eksperimen ‘3-Point Bending Test’ untuk
Tikus Bersaiz Kecil**
**(V-Shaped Bending Support Helps in 3-Point
Bending Test Experiment for Small Mice Bone)**

Noor Shafini Mohamad*, Mohd Hafizi Mahmud

Pusat Pengajian Pengimejan Perubatan, Fakulti Sains Kesihatan,
Universiti Teknologi MARA Cawangan Selangor, Kampus Puncak Alam,
Bandar Puncak Alam, 42300 Selangor

*E-mel: shafini.mohamad@uitm.edu.my

Tarikh terima: 28 Mac 2019

Tarikh diluluskan: 25 November 2020

ABSTRAK

‘3-point bending test’ merupakan salah satu teknik yang digunakan untuk mengenal pasti struktur dan ciri-ciri biomekanik tulang. Menerusi kajian ini, kebolehan mekanikal tulang tibia tikus yang berumur empat minggu telah dikaji dengan menggunakan alat untuk membengkok secara 3-point supaya ciri-ciri mekanikal tulang tikus yang berlainan genetik dan melalui intervensi tertentu dapat dikaji. Alat untuk membengkok 3-point yang sedia ada tidak sesuai untuk model haiwan yang kecil dan berpotensi mengakibatkan sampel tergelincir daripada alat sokongan semasa beban diaplikasikan. Secara kasar, panjang tulang tibia tikus berumur empat minggu adalah ~16mm. Panjang tulang tibia ini diukur dari titik pusat proksimal anatomi kondil (condyle) hingga titik pusat anatomi maleolus medial (medial malleolus). Garis pusat yang diukur dari pertengahan dan metafiseal (metaphyseal) tulang tibia adalah ~1mm dan ~3mm. Alat untuk membengkok tulang tikus ini direka khas untuk saiz tulang tibia yang kecil. Kedua-dua hujung tumpangan dipotong sedikit dalam bentuk ‘v’ yang kecil untuk memberikan kestabilan kepada tulang tibia semasa tampungan diaplikasikan ke atas tulang. Tulang tibia ini diuji secara mekanikal berdasarkan teknik ‘3-point bending test’ dengan menggunakan Bose ElectroForce® 3200 bersama alat bantuan membengkok yang direka

sehingga tulang tibia patah. Berdasarkan data yang diperoleh daripada lengkungan ‘load-displacement’, kebolehan tulang menyerap tenaga luar dari tampungan sehingga patah adalah signifikan. Penemuan ini memberi impak yang tinggi bagi pengkaji untuk menguji kapasiti tulang tikus yang berlainan genetik dan melalui intervensi tertentu secara kuantitatif.

Kata kunci: *3-point Bending Test, Tulang Tikus, Kebolehan Mekanikal Tulang, Alat Bantuan Membengkok*

ABSTRACT

Three-point bending test is one of the main methods used in long bones to characterise bone material and determine the biomechanical properties. We have examined the mechanical competencies of the mouse bones at four-week-old by using a three-point bending jig so that the potential genotype-related deficiencies in mechanical properties of bones explored. The available bending jig was not suitable for small animal model and may cause slippage when applying the load. The tibial gross length measurements of the four-week-old mouse measured using the proximal anatomical point of the centre of the condyles to the distal anatomical significance of the medial malleolus (~16 mm). The mid tibia diameter measurement is taken at the middle tibia (~1 mm) and metaphyseal diameter (~3 mm). The bending jig was custom-made, where both ends support were cut in a v-shape to provide stability. The tibias were mechanically tested with the v-shape support under three-point bending using a Bose ElectroForce® 3200 until failure. The test revealed a significant result of flexural strength, work-to-fracture and strain to failure obtained from the load-displacement curves. The finding may be useful in the studies of quantitative assessments of the strength and toughness of small animal bones.

Keywords: *3-point bending test, mice bone, biomechanical properties, bending support*

PENGENALAN

Pelbagai strategi boleh dilakukan untuk menguji kebolehan mekanikal tulang tikus. Antaranya ialah simulasi menggunakan aplikasi komputer termasuk ujian membengkok secara *3-point*. Simulasi menggunakan aplikasi komputer boleh dilakukan jika sesuatu institusi tiada fasiliti untuk membuat eksperimen *3-point*. Tambahan pula, penyelidik yang tidak mempunyai latar belakang *programming* atau *coding* disarankan untuk membuat kajian di dalam makmal. Latar belakang ini penting bagi tujuan simulasi. Ia juga dapat memelihara sampel. Namun, eksperimen ke atas sampel di makmal merupakan teknik yang ideal untuk menguji kebolehan mekanikal tulang tikus. Beberapa kajian yang menggunakan teknik ini dapat menghasilkan data atau keputusan kajian yang memberangsangkan.

Permasalahan yang timbul dalam ujian membengkok secara *3-point* adalah saiz tulang tikus yang kecil. Ini menyebabkan kesilapan boleh berlaku semasa prosedur dijalankan. Hal ini disebabkan oleh sampel eksperimen tidak sejajar dengan alat ujian dan pergerakan sampel sukar dilihat dengan menggunakan mata kasar (Steiner *et al.*, 2015 dan Cheung *et al.*, 2003).

Ritchie *et al.* (2008) telah mencadangkan supaya kedua-dua hujung tulang haiwan yang terlibat dipotong dengan menggunakan gergaji berkelajuan rendah. Tulang itu ditebus terlebih dahulu supaya stabil sebelum diletakkan di atas alat membengkok *3-point*. Namun, proses ini merosakkan sampel yang diuji dan memerlukan mesin khas. Tambahan pula, data yang dihasilkan melalui strategi ini secara relatifnya mempunyai varian yang besar dan menyukarkan analisis statistik. Kaedah ini sesuai untuk sampel binatang bersaiz besar seperti tulang lembu.

Penggunaan gam atau '*super glue*' di kedua-dua hujung tulang merupakan salah satu cara untuk memastikan tulang statik semasa pemberat diaplikasikan ke atas tulang tersebut. Walau bagaimanapun, bahan daripada gam atau '*super glue*' tersebut akan kekal di atas permukaan tulang selepas eksperimen dijalankan. Ini mungkin akan memberikan kesan secara tidak langsung ke atas ciri-ciri biomekanikal tulang tikus. Bahan kimia daripada gam atau '*super glue*' berkemungkinan meresap atau kekal berada di permukaan tulang dan mempengaruhi kebolehan menyerap tenaga luar yang diaplikasikan.

Alat tampungan bawah yang sedia ada untuk teknik membengkok 3-point tidak sesuai untuk tulang tibia tikus yang kecil (berumur empat minggu) (Bouxsein *et al.*, 2010). Tampungan alat yang sedia ada terlalu besar kerana direka untuk haiwan eksperimen yang bersaiz besar seperti tulang lembu. Tambahan pula, dengan saiz sampel yang besar, eksperimen yang dijalankan tidak memerlukan persediaan yang rapi berbanding sampel bersaiz kecil. Terdapat 24 bilangan tulang tibia terlibat dalam kajian ini. Tulang tibia ini terdapat dalam pelbagai saiz diameter dan bentuk. Oleh hal yang demikian, eksperimen ke atas tulang tibia adalah mencabar dan memerlukan persiapan yang rapi. Tebukan ‘v’ dibuat di atas permukaan tampungan sampel dapat membantu penyelidik mengatasi cabaran ini. Oleh itu, kebolehan mekanikal tulang tikus yang kecil dapat dijalankan.

Dalam kajian ini, 24 tulang tibia dari tikus yang berumur empat minggu diuji dengan menggunakan alat membengkok 3-point yang direka khas. Terdapat empat kumpulan tikus yang mempunyai latar belakang genetik tertentu yang telah dikenal pasti sebagai kontrol (*Wild Type*), mdx (Berpenyakit *Duchenne Muscular Dystrophy*), P2X7^{-/-} (intervensi 1) dan mdx/P2X7^{-/-} (intervensi 2). Terdapat enam tikus dalam setiap kumpulan. Tujuan kajian ini adalah untuk memahami kebolehan mekanikal tulang dalam keadaan kekurangan protein tertentu dalam komponen dan subkomponen tulang. Penyakit *Duchenne Muscular Dystrophy* (DMD) adalah penyakit tisu otot yang kehilangan protein yang dipanggil *dystrofin*. Penyakit ini melibatkan kanak-kanak seawal usia lima tahun. Malah, simptom penyakit ini dapat dilihat seawal bayi yang mana pesakit menghadapi kesukaran berdiri dari posisi duduk. Sehingga kini, tiada lagi ubat atau intervensi berkesan bagi merawat pesakit ini. Oleh itu, banyak kajian dijalankan untuk mencari intervensi yang berkesan mengubati penyakit ini.

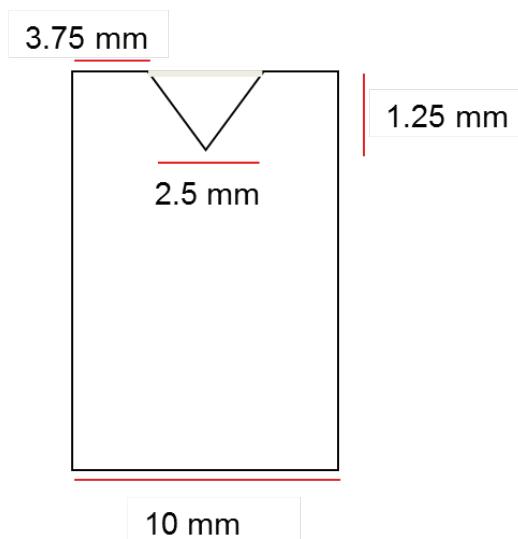
METODOLOGI

Spesifikasi dan Lakaran ‘V-Shaped Bending Support’

Tebukan kecil berbentuk ‘v’ dibuat pada permukaan alat yang menampung sampel 3-point. Tebukan kecil tersebut sesuai untuk pelbagai saiz diameter tulang tibia tikus yang diuji yang mana bahagian distal berukuran 0.73mm- 0.95mm dan bahagian *proksimal* berukuran 2.47mm-

'V-Shaped Bending Support' Membantu dalam Eksperimen '3-Point Bending Test' untuk Tikus Bersaiz Kecil

2.88mm. Alat menampung sampel ini direka dengan saiz $10\text{mm} \times 10\text{mm}$ dan saiz tebukan 'v' sedalam 1.25mm (Rajah 1). Alat membengkok dengan tebukan kecil pada kedua-dua hujung tampungan adalah rekaan yang ringkas, standard dan tidak memerlukan banyak masa serta kos yang tinggi. Tambahan pula, hasil keputusan eksperimen mudah dianalisis dan dibandingkan dengan tulang daripada kumpulan yang berbeza. Ini dapat membantu penyelidik mengkaji kesan intervensi baru berbanding intervensi yang sedia ada.

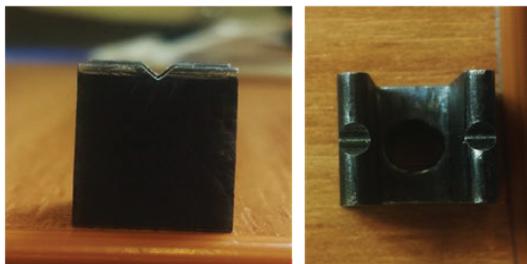


Rajah 1: Alat tampungan untuk teknik membengkok 3-point (*V-shaped bending support*). Alat tampungan bawah ini direka seperti dalam rajah bagi mengelakkan sebarang pergerakan di semua arah *plane* apabila 0.155mm/s pemberat diaplikasikan ke atas tulang tibia tikus.

'V-shaped bending support' ini juga mampu menampung berat dan dimensi sampel apabila pemberat berkelajuan rendah seperti 0.155mm/s dan berkelajuan tinggi sehingga 5.000mm/s. Kelajuan pemberat ini bergantung kepada penyelidik berdasarkan soalan kajian. Alat pemberat dan tampungan ini disambungkan ke komputer menggunakan mesin khas Mesin BOSE *Testing Machine (ElectroForces 3200)*.

Pemilihan dan Pembuatan

‘*V-shaped bending support*’ dihasilkan dengan menggunakan bahan keluli antikarat dan sangat kukuh (Rajah 2). Pemilihan bahan ini sesuai kerana bebanan diaplikasikan adalah 0.155 mm/s dan boleh tahan sehingga 225N. Ciri-ciri pemilihan bahan untuk alat membengkok ini kukuh, tahan lasak, mudah dibentuk, mudah diperoleh, ringan dan murah.



**Rajah 2: Pandangan sisi (kiri) dan pandangan atas (kanan)
‘V-shaped bending support’**

Pembuatan alat ini amat mudah dan tidak memerlukan proses yang kompleks. Alat membengkok ini diproses dengan menggunakan mesin pemotong khas yang sangat tepat dengan bantuan komputer. Dengan bantuan lakaran tertentu, alat ini dapat disiapkan dengan cepat.

Selain itu, beberapa kriteria telah diambil kira bagi menghasilkan ‘*V-shaped bending support*’ supaya ia berkualiti dan selamat digunakan oleh penyelidik. Kriteria tersebut ialah struktur utama dan fleksibiliti. Ujian fleksibiliti bahan untuk alat ini telah dilakukan supaya ciri-ciri pemilihan adalah bersesuaian dan berkualiti.

Tulang Tibia Tikus

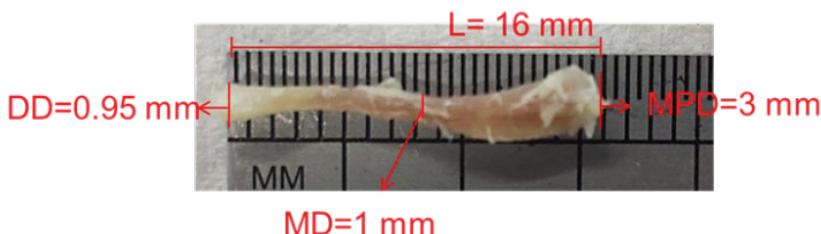
Tikus dalam kajian ini merupakan model haiwan yang sesuai untuk menguji kebolehan intervensi penyakit *Duchenne Muscular Dystrophy* (DMD) (<http://www.treat-nmd.eu/research/preclinical/dmd-sops/>). Eksperimen haiwan ini dijalankan berdasarkan garis panduan yang dinyatakan oleh *Institutional Ethical Review Board and the Home Office UK* (70/7479). Dalam Jadual 1, semua tikus yang dipilih berasal daripada

keluarga tikus yang sama kecuali mereka berada dalam keadaan yang berbeza. Satu kumpulan dilabelkan sebagai tikus kawalan (WT) yang mana tiada intervensi dilakukan ke atas tikus-tikus ini. Manakala, satu lagi kumpulan dilabelkan sebagai tikus berpenyakit DMD (Bulfield *et al.*, 1984) dan tikus-tikus ini tidak mempunyai protein yang dipanggil *distrofin*. Dua lagi kumpulan dilabelkan sebagai P2X7^{-/-} (Solle *et al.*, 2001) dan mdx/P2X7^{-/-} dan intervensi telah dilakukan ke atas kumpulan-kumpulan ini (P2X7^{-/-} dan mdx/P2X7^{-/-}) (Young *et al.*, 2015; Sinadinos *et al.*, 2015). Semua tikus ini daripada jantina dan umur yang sama agar faktor-faktor ini adalah sebagai pemalar.

Jadual 1: Deskripsi tikus yang terlibat dalam kajian ini

| Kumpulan | Latar belakang genetik | Umur | Jantan/Betina | n |
|-------------------------|---|-------------------------------------|---------------|---|
| WT | C57 BL10, liar, sihat, mempunyai reseptor P2X7 | 4 minggu | Jantan | 6 |
| mdx | Berpenyakit Dystrophic (Duchenne Muscular Dystrophy), tidak mempunyai distrofin | 4 minggu 1 hari dan 4 minggu 3 hari | Jantan | 6 |
| P2X7 ^{-/-} | Intervensi tikus dari kumpulan WT, tidak mempunyai reseptor P2X7 | 4 minggu 1 hari dan 4 minggu 3 hari | Jantan | 6 |
| mdx/P2X7 ^{-/-} | Intervensi tikus dari kumpulan mdx, tidak mempunyai distrofin. | 4 minggu | Jantan | 6 |

Rajah 3 menunjukkan ukuran secara kasar tulang tikus berumur empat minggu daripada proksimal *point* anatomi kondil (*condyle*) hingga *maleolus medial* (*medial malleolus*) tulang *point distal* anatomi kondil (L) adalah ~16mm. Diameter distal (DD) tibia berukuran ~0.95mm, diameter *midtibia* (MD) adalah ~1mm dan diameter *metafiseal* (metaphyseal) (MPD) adalah 3mm. Ukuran dan dimensi tulang tikus ini diukur dengan menggunakan alat ukuran khas *biomaterial*. Langkah-langkah kebersihan dan mengendalikan sampel *biomaterial* telah diambil kira oleh penyelidik semasa eksperimen dijalankan



Rajah 3: Ukuran saiz tulang tibia diambil dengan menggunakan pembaris elektronik dan bacaan diambil sebanyak tiga kali

Jadual 2 menunjukkan purata ukuran geometri bagi setiap kumpulan tikus yang terlibat. Variasi saiz tulang tikus ini telah dikenal pasti sebagai masalah utama dalam mengaplikasikan eksperimen teknik membengkok 3-point. Data juga menunjukkan bentuk asli tulang tibia adalah tidak lurus dan membengkok. Ini merupakan salah satu kesukaran bagi penyelidik untuk menjalankan teknik membengkok 3-point.

Jadual 2: Ukuran saiz tulang tibia untuk setiap kumpulan yang terlibat dalam eksperimen ini

| Ukuran | WT | mdx | P2X7 ^{-/-} | mdx/P2X7 ^{-/-} |
|------------------------|------------|------------|---------------------|-------------------------|
| Panjang (mm) | 14.62±0.55 | 14.10±0.64 | 15.02±0.46 | 14.62±0.55 |
| Dia. Midtibia (mm) | 1.10±0.006 | 0.97±0.12 | 1.00±0.06 | 0.82±0.04 |
| Dia. metaphyseal (mm) | 2.70±0.21 | 2.65±0.22 | 2.88±0.13 | 2.47±0.15 |
| Dia. distal tibia (mm) | 0.93±0.08 | 0.90±0.11 | 0.95±0.08 | 0.73±0.05 |

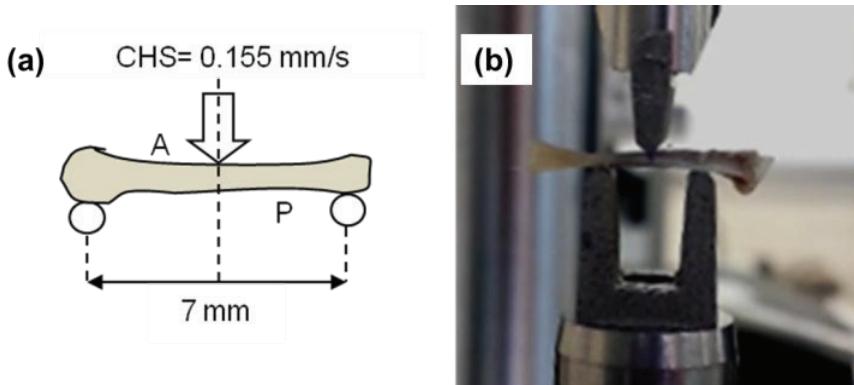
*Dia.=diameter

Kaedah Penggunaan ‘V-Shaped Bending Support’

Kebolehan biomekanikal untuk setiap tulang ditentukan dengan menggunakan alat bantuan membengkok 3-point (Vashishth, 2008). Tulang tikus diletakkan di atas ‘V-shaped bending support’ dan diposisikan secara melintang seperti dalam Rajah 4. Jarak antara kedua-dua ‘V-shaped bending support’ adalah 7mm (Silva et al., 2004) dan diukur menggunakan *digital caliper*. Mesin BOSE *Testing Machine* (ElectroForces 3200) digunakan

'V-Shaped Bending Support' Membantu dalam Eksperimen '3-Point Bending Test' untuk Tikus Bersaiz Kecil

dalam kajian ini bagi mengkaji kebolehan mekanikal subjek atau bahan secara berkomputer. Lengkungan 'Load-displacement' diperolehi dan digunakan untuk mengira ciri-ciri struktur dan bahan tulang tibia.



Rajah 4: Kaedah penggunaan 'V-shaped bending support'.

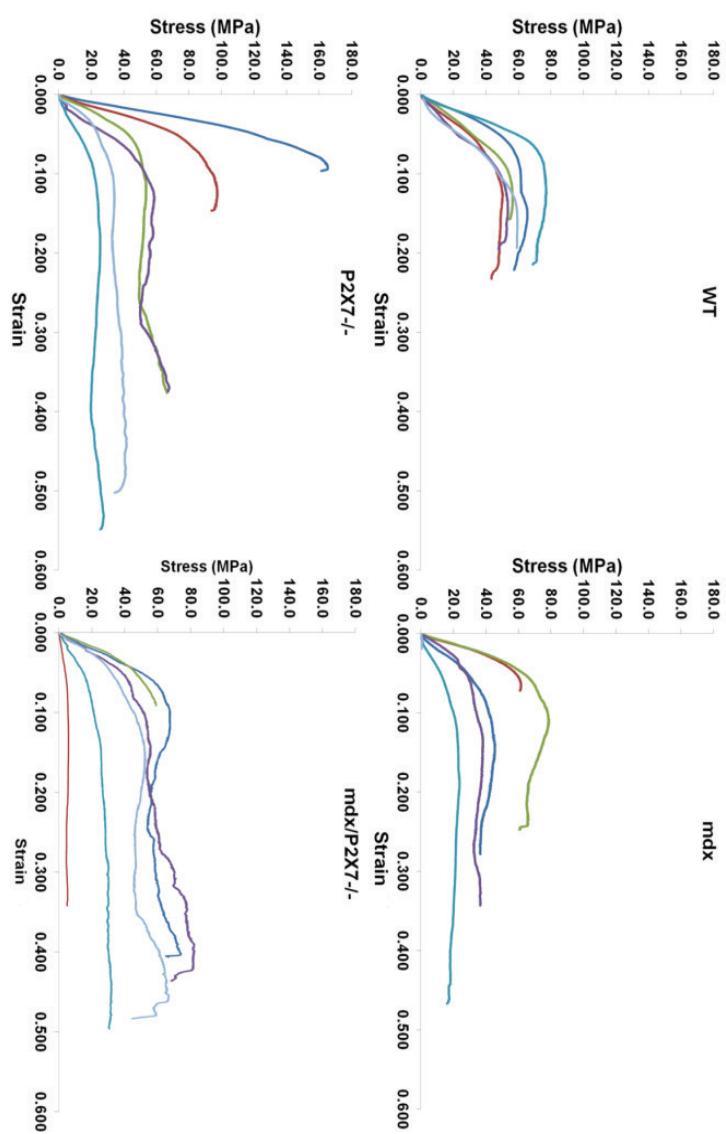
(a) Tulang tibia diletakkan di atas permukaan alat membengkok, dengan permukaan anterior tulang diposisikan menghadap ke atas sementara permukaan posterior diposisikan menghadap ke bawah. Bebanan (Cross Head Speed-CHS) diaplikasikan di tengah-tengah tulang tibia sehingga patah. (b) Bebanan dikira dengan menggunakan mesin berkapasiti 225N sel mengikut ISO 7500-1:2004 kelas 0.5.

Teknik 3-point ini adalah sangat sensitif kepada pergerakan sampel. Jika berlaku pergerakan, komputer akan menghasilkan bacaan dan graf. Dengan menggunakan alat tampungan yang stabil ini, pergerakan sampel adalah sangat minima dan membantu penyelidik untuk mendapatkan bacaan atau data yang paling tepat. Bebanan yang diaplikasikan adalah berkelajuan 0.155mm/s sesuai untuk haiwan kecil seperti tikus. Dengan teknik ini, kebolehan tisu tulang untuk bertindak ke atas bebanan luar dapat dianalisis dan signifikan dalam mimik relevan situasi klinikal.

KEBERHASILAN PROJEK

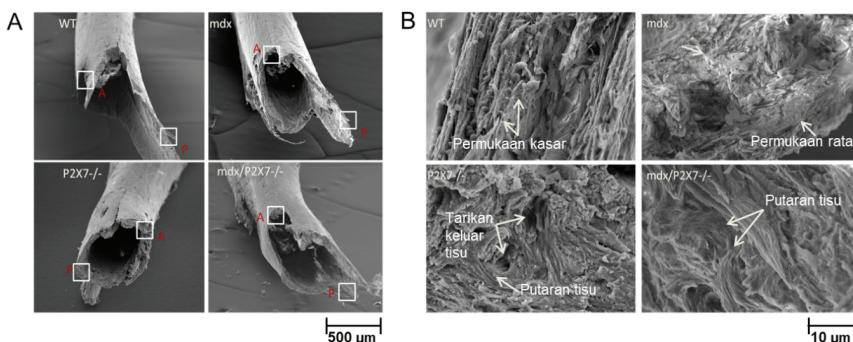
Daripada kajian yang telah dijalankan dengan menggunakan alat '*V-shaped bending support*' ini, beberapa impak telah berjaya dihasilkan dan kesan intervensi dapat dikaji. Daripada data '*Load-displacement*' yang diperoleh daripada teknik membengkok *3-point*, lengkungan tekanan-terikan dapat dikira dan dihasilkan (Rajah 5). Lengkungan bagi setiap tulang tibia ini amat penting untuk menganalisis struktur tulang-tulang.

Berdasarkan Rajah 5, tulang tibia tikus daripada kumpulan mdx/P2X7^{-/-} mempunyai kekuatan yang tinggi untuk menyerap tenaga daripada bebanan 0.155mm/s sehingga ia patah pada 0.500 *strain* (80 MPa). Ini diikuti dengan tulang tibia tikus daripada kumpulan P2X7^{-/-}. Ia dapat bertahan dengan tenaga daripada bebanan sehingga 0.600 *strain* (60 MPa). Seterusnya WT dan mdx, masing-masing 0.300 *strain* (40 MPa) dan 0.200 *strain* (60 MPa).



Rajah 5: Lengkungan tekanan-terikan (stress-strain) untuk setiap tulang tibia bagi semua kumpulan tikus

Selepas tulang tibia ini diuji sehingga patah, permerhatian di bawah lensa *scanning electron microscope* (SEM) menunjukkan jenis tulang patah yang tipikal. SEM adalah mesin mikroskop yang bermagnifikasi tinggi untuk memperlihatkan permukaan sesuatu bahan. Dalam kajian ini, SEM digunakan ke atas permukaan tulang yang patah, bagi menunjukkan hasil teknik membengkok *3-point* yang berkesan. Seterusnya, dapat menilai keupayaan dan respon tulang tibia ke atas bebanan secara *morphology*. Rajah 6 menunjukkan permukaan tulang selepas ujian membengkok dilakukan. Semasa bebanan diaplikasikan, permukaan tulang *anterior* mengalami tekanan, manakala permukaan tulang *posterior* mengalami ketegangan. Dengan ini, corak patah yang berlainan akan terhasil.



Rajah 6: Permukaan tulang yang patah bagi setiap kumpulan tikus di bawah pemerhatian SEM. Lensa berkapasiti tinggi (A) 500 μm dan (B) 10 μm digunakan untuk membolehkan corak patah dapat dilihat dan dianalisis

Corak patah pada permukaan tulang tibia ini berlainan apabila dibandingkan dengan semua kumpulan tikus. Corak yang berlainan ini dapat dihubungkan dengan trend graf *stress-strain* pada Rajah 5. Permukaan kasar pada tulang tikus menunjukkan terdapat aktiviti menyerap dan menahan tenaga daripada bebanan. Ini merupakan salah satu mekanisma tulang secara biologi bagi melindungi tulang daripada patah. Ini merupakan gambaran jika seseorang jatuh atau ditimpa sesuatu yang melibatkan bebanan yang tinggi.

RUMUSAN

'V-shaped bending support' merupakan satu alat yang direka yang terbukti berhasil dan berguna dalam teknik membengkok 3-point bagi tulang tikus yang berfizikal kecil. Melalui rekaan ini, penyelidik dapat memastikan kestabilan tulang dan dapat mengelakkan kesalahan serta varian yang tinggi. Selain itu, bahan yang digunakan untuk membina alat ini adalah kukuh, tahan lasak, mudah dibentuk, senang diperoleh, ringan, dan murah. Kekangan kaedah ini adalah sampel tulang yang bersaiz kecil dan rapuh, sebarang pergerakan tulang semasa tampungan mungkin tidak dapat dilihat dengan mata kasar.

PENERBITAN

Mohamad, N.S., Sinadinos, A., Górecki, D.C., Ziopoulos, P., Tong, J., (2016). Impact of P2RX7 ablation on the morphological, mechanical and tissue properties of bones in a murine model of Duchenne Muscular Dystrophy. *J. Biomech.* 49, 3444–3451.

PRA-SYARAT

International Engineering and Sciences Innovation Exhibition I-ESIX2018, 24 November 2018 di Park Royal Penang Resort, Malaysia, Pingat Emas

RUJUKAN

Bouxsein, M.L., Boyd, S.K., Christiansen, B. a, Guldberg, R.E., Jepsen, K.J., Müller, R., (2010). Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J. Bone Miner. Res.* 25, 1468–86. doi:10.1002/jbmr.141

Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P. a, Moore, K.J., (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 1189–1192. doi:10.1073/pnas.81.4.1189

Cheung K.M., Kaluarachi K., Andrew G., Lu W., Chan D., Cheah K.S. (2003). An externally fixed femoral fracture model for mice. *Orthop Res*, Jul; 21(4):685-90

Ritchie R.O., Koester K.J., Ionova S., Yao W., Lane N.E., Ager J.W. (2008). Measurement of the toughness of bone: A tutorial with special reference to small animal studies. *Bone*, 43, 798–812.

Silva M.J., Brodt M.D., Fan Z., Rho J-Y. (2004). Nanoindentation and whole-bone bending estimates of material properties in bones from the senescence accelerated mouse SAMP6. *J.Biomech.* 37, 1639–1646.

Sinadinos, A., Young, C., Al-Khalidi, R., Teti, A., Kalinski, P., Mohamad, S., Floriot, L., Henry, T., Tozzi, G., Jiang, T., Wurtz, O., Lefebvre, A., Tong, J., Vaudry, D., Arkle, S., DoRego, J.-C., Gorecki, D., Shugay, M., (2015). P2RX7 Purinoceptor: A Therapeutic Target for Ameliorating the Symptoms of Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS Med* 12(10), 1–33. doi:10.1371/journal.pmed.1001888

Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D.G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B.H., Griffiths, R.J., Gabel, C. A., (2001). Altered cytokine production in mice lacking P2X7 receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 125–132. doi:10.1074/jbc.M006781200

Steiner M., Volkheimer D., Meyers N, Wehner T., Wilke H-J., Claes L., Ignatius A. (2015). Comparison between Different Methods for Biomechanical Assessment of Ex Vivo Fracture Callus Stiffness in Small Animal Bone Healing Studies, *PLoS One*, 10(3).

Young, C.N., Sinadinos, A., Lefebvre, A., Chan, P., Arkle, S., Vaudry, D., Gorecki, D.C., (2015). A novel mechanism of autophagic cell death in dystrophic muscle regulated by P2RX7 receptor large-pore formation and HSP90. *Autophagy* 11, 113–130. doi:10.4161/15548627.2014.994402

Vashishth, D. (2008). Small Animal Bone Mechanics. *Bone*, 43, 794–797.