

Aus dem Bereich
Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. T. Pohlemann

Einfluss von Sildenafil auf die Frakturheilung im Mausmodell

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2014

Vorgelegt von: Kerstin Christina Marciniak
geb. am: 04.10.1982 in Krefeld

Dekan: Prof. Dr. med. M. D. Menger

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Jahr der Promotion: 2014

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Synonyme	1
1. ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT	4
1.1 Zusammenfassung	4
1.2 Abstract	5
2. EINLEITUNG	7
2.1 Knochen	7
2.1.1 Morphologie	7
2.1.1.1 Femur.....	7
2.1.2 Histologie	7
2.1.3 Physiologie.....	14
2.1.4 Knochenentwicklung	16
2.2 Frakturen	18
2.3 Frakturheilung.....	18
2.3.1 Primäre Frakturheilung.....	18
2.3.2 Sekundäre Frakturheilung	19
2.4 Frakturmodelle.....	21
2.4.1 Großtiermodelle	21
2.4.2 Kleintiermodelle.....	22
2.4.2.1 Maus	23
2.5 Sildenafil.....	26
2.5.1 Historie.....	26
2.5.2 Struktur	26
2.5.3 Anwendungsgebiete.....	27
2.5.4 Wirkmechanismus.....	27
2.5.5 Pharmakokinetik.....	29
2.5.6 Nebenwirkungen	30
2.6 Zielsetzung der Studie.....	31
2.7 Fragestellung	31
3. MATERIAL UND METHODEN	32
3.1 Versuchsaufbau	32
3.1.1 Versuchsprotokoll.....	32
3.1.2 Tiermodell	33
3.2 Materialien.....	33
3.2.1 Implantat	33
3.2.2 Guillotine	33

Inhaltsverzeichnis

3.3 Versuchsdurchführung	35
3.3.1 Narkotisierung	35
3.3.2 Operationstechnik	35
3.3.3 Schmerzmittel	41
3.3.4 Medikamentenapplikation	42
3.3.5 Tötung der Tiere	43
3.3.6 Explantation und Präparation der Knochen	43
3.4 Auswertungsverfahren und Messgrößen	43
3.4.1 Radiologie	43
3.4.2 Biomechanik	45
3.4.3 Histologie	47
3.4.3.1 Histomorphometrie	47
3.4.3.2 Histo-Score	49
3.4.4 Western Blot	49
3.4.5 Statistik	51
4. ERGEBNISSE	52
4.1 postoperativer Verlauf	52
4.2 Makroskopie	54
4.3 Radiologie	54
4.4 Biomechanik	56
4.5 Histologie	59
4.5.1 Histomorphometrie	59
4.5.2 Histo-Score	63
4.6 Western Blot	64
5. DISKUSSION	68
5.1 Methoden	68
5.2 Ergebnisse	73
5.3 Schlussfolgerungen	76
6. LITERATURVERZEICHNIS	77
7. PUBLIKATIONEN	95
8. DANKSAGUNG	96

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Synonyme

%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
a.p.	anterior-posterior
Abb.	Abbildung
Ang-1	Angiopoietin 1
Ang-2	Angiopoietin 2
ANOVA	analysis of variance
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
AUC	The area under the curves
BMU	Basic multicellular unit
bzw.	beziehungsweise
BZW1	Bezugswert 1
BZW2	Bezugswert 2
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
C _{max}	maximale Konzentration
COX	Cyclooxygenase
CYR61	Cysteine-rich protein 61
D	Durchmesser
d.h.	das heißt
Dmax	maximaler Durchmesser
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
et al.	et alteri
G	Gauge
g	Gramm
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
i.p.	intraperitoneal

Abkürzungsverzeichnis

i.v.	intravenös
iNOS	inducible nitric oxide synthase
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kp	Kilopond
kV	Kilovolt
L	Länge
l	Liter
Lig.	Ligamentum
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mol	Mol
MW	Mittelwert
n	Anzahl
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm (10 ⁹ g)
Nmm	Newtonmillimeter
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug
Ø	Durchmesser
OD	optische Dichte
OPG	Osteoprotegerin
PAH	Pulmonale arterielle Hypertonie
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDE	Phosphodiesterase
PDE5	Phosphodiesterase 5
RANK	receptor for activation of nuclear factor kappa B
RANKL	receptor for activation of nuclear factor kappa B ligand
ROI	Region of Interest
s.c.	subkutan
S	Sildenafil-Gruppe
SEM	Standardfehler (englisch: Standard Error of the Mean)

Abkürzungsverzeichnis

Tab.	Tabelle
TGF β	Transforming growth factor β
Tie-2	Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains
t_{\max}	maximale Zeit
VEGF	vascular endothelial growth factor
vs.	versus
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel

1. Zusammenfassung/Abstract

1.1 Zusammenfassung

Die Knochenheilung stellt einen komplexen Prozess dar. Im Rahmen der initialen Entzündungsreaktion sowie der Chondrogenese, Angiogenese und Osteogenese kommt es zu zahlreichen Interaktionen verschiedener Wachstumsfaktoren, Zellen und Gewebetypen. Während des Frakturheilungsprozesses ist eine ausreichende Vaskularisierung Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Frakturheilung, da hinreichend bekannt ist, dass eine verminderte Vaskularisierung zu einer verzögerten Heilung oder Pseudarthrose führen kann. Sildenafil ist ein potenter selektiver Hemmer der zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP)-spezifischen Phosphodiesterase vom Typ 5 (PDE 5). Die erhöhten Konzentrationen von cGMP verursachen dabei hauptsächlich eine Relaxtion der glatten Muskulatur. Verschiedene Studien konnten jedoch bereits zeigen, dass Sildenafil die Vaskularisierung auch über eine Stimulation angiogener Wachstumsfaktoren verbessern kann. Es ist bekannt, dass diese Wachstumsfaktoren, wie VEGF und Cyr 61, eine wichtige Rolle während des Frakturheilungsprozesses spielen. Bisher gibt es keine Informationen darüber, ob Sildenafil in der Lage ist, die Frakturheilung über Stimulation dieser Wachstumsfaktoren zu verbessern. Ziel der Studie war es deshalb, den Einfluss von Sildenafil auf den Frakturheilungsprozess zu untersuchen. Unsere Hypothese lautete, dass die Behandlung mit Sildenafil die Frakturheilung verbessert.

Als Versuchstiere wurden 12-14 Wochen alte CD-1 Mäuse verwendet (n=50). Fünfundzwanzig Mäuse wurden täglich mit 5 mg/kg KG Sildenafil per os behandelt. Die Kontrollgruppe (n=25) erhielt eine entsprechende Menge 0,9 %ige Kochsalzlösung. Die Knochenheilung wurde in einem geschlossenen Femurfrakturmodell der Maus untersucht. Zwei und fünf Wochen postoperativ wurden die Knochen radiologisch, biomechanisch, histologisch sowie proteinbiochemisch untersucht.

Die radiologischen Untersuchungen 2 Wochen postoperativ konnten zeigen, dass nach Behandlung mit Sildenafil die Frakturheilung signifikant verbessert war. Bei diesen Tieren zeigte sich eine frühere knöcherne Überbauung des Frakturspalt, im Vergleich zu den Kontrolltieren ($p < 0.05$). Nach 5 Wochen war in beiden Gruppen der Frakturspalt komplett knöchern überbaut. Die biomechanischen Untersuchungen zeigten 2 Wochen postoperativ eine signifikant höhere Biegesteifigkeit nach Behandlung mit Sildenafil, im Vergleich zu den Kontrolltieren ($p < 0.05$). Die histologischen Untersuchungen konnten nachweisen, dass alle Femora beider Gruppen sekundär im Sinne einer enchondralen und intramembranösen Ossifikation geheilt waren. Die Kallusfläche der mit Sildenafil

behandelten Tiere war 2 Wochen postoperativ signifikant kleiner ($p < 0.05$) im Vergleich zu den Kontrolltieren. 5 Wochen postoperativ nahm die Kallusfläche in beiden Gruppen, entsprechend dem fortschreitenden Remodelingprozess, deutlich ab ($p > 0.05$). Zudem erreichte die Sildenafil-Gruppe 2 Wochen postoperativ einen signifikant erhöhten Punktwert in der histologischen Beurteilung des Frakturspaltes. Der Knochenanteil war nach Behandlung mit Sildenafil geringfügig höher und der Anteil an Knorpelgewebe geringer. 5 Wochen postoperativ waren die Gewebeanteile in beiden Gruppen vergleichbar. Die proteinbiochemische Analyse des Kallusgewebes 2 Wochen postoperativ konnte zeigen, dass die Behandlung mit Sildenafil keinen signifikanten Einfluss auf die Expression des angiogenen Markers VEGF hat. Die Expression von CYR61 war jedoch signifikant erhöht. PCNA, ein Marker der Zellproliferation, und OPG, ein Inhibitor der Osteoklastogenese, waren geringfügig erhöht. Im Gegensatz dazu war die Expression von RANKL, ein Stimulator der Osteoklastogenese, vermindert. Interessanterweise war der Wachstumsfaktor eNOS, der ebenfalls angiogene Wirkung hat, signifikant erniedrigt.

Zusammenfassend konnte in der hier vorgestellten Studie erstmals gezeigt werden, dass die Behandlung mit Sildenafil die Frakturheilung verbessert. Die Frakturheilung wird wahrscheinlich über einen CYR61 assoziierten Signalweg stimuliert.

1.2 Abstract

Fracture healing is a complex, sequentially orchestrated process, including inflammation, mesenchymal cell condensation, chondrogenesis, angiogenesis and osteogenesis. Within this process, the vascularization of the tissue is a prerequisite for successful bone healing. Reduced vascularity at the fracture site has been identified as one of the most significant parameters, accounting for delayed fracture healing and atrophic non-union formation. PDE5 catalyzes the breakdown of cyclic guanosine monophosphate (cGMP), one of the primary factors causing smooth muscle relaxation. Sildenafil is a selective inhibitor of phosphodiesterase-5 (PDE5). During the last few years, several studies have shown that sildenafil exerts also angiogenic actions through upregulation of distinct pro-angiogenic growth factors. Accordingly, the action of the drug has been analyzed in a variety of ischemic disease models. Previous studies have shown that the angiogenic and osteogenic factors vascular endothelial growth factor (VEGF) and cysteine-rich protein (CYR) 61 are involved in the process of bone formation and fracture healing. There is complete lack of information, however, whether sildenafil is capable of influencing these growth factors and thus the process of fracture healing. Therefore, we herein aimed at determining a novel role of sildenafil in fracture healing. We hypothesized that sildena-

fil accelerates fracture healing through stimulation of growth factor expression and bone formation.

For the present study a total of fifty 12 to 14 week old CD-1 mice was used. Twenty-five mice were fed daily with 5mg/kg body weight (BW) sildenafil (Viagra®, Pfizer, Germany). Twenty-five vehicle (saline)-treated mice served as controls. Bone healing was studied in a murine closed femur fracture model using radiological, biomechanical, histomorphometric and protein biochemical analysis at 2 and 5 weeks after fracture.

Radiological analyses 2 weeks after fracture indicated an improved healing in sildenafil-treated animals. In these animals osseous bridging of the fracture gap was achieved earlier, compared to non-treated controls ($p < 0.05$). After 5 weeks, the fractures in both groups were completely healed radiologically. Biomechanical analysis at 2 weeks after fracture healing showed a significantly higher bending stiffness in sildenafil-treated animals compared to controls. At 2 weeks after fracture healing, the sildenafil-treated animals showed a significantly smaller total callus area when compared to controls, indicating predominant intramembranous healing. After 5 weeks, callus size was found decreased also in controls, indicating appropriate remodeling at this time point. In parallel, we observed a greater healing score in sildenafil-treated animals at 2 weeks after fracture healing when compared to controls ($p < 0.05$). According to the radiological and biomechanical results, at 2 weeks bone tissue was found slightly increased in sildenafil-treated animals compared to controls. After 5 weeks, all animals of the two groups showed a comparable amount of bone tissue, i.e. ~90 %. Accordingly, at 2 weeks cartilaginous tissue was found reduced after sildenafil treatment, while at 5 weeks the remaining amount of cartilage within the callus of sildenafil-treated animals was comparable to that of controls. After 2 weeks of fracture healing, Western blot analysis of the callus tissue revealed that sildenafil did not affect the expression of VEGF. Interestingly, CYR61 was found significantly increased compared to controls ($p < 0.05$). In addition, expression of PCNA, indicating cell proliferation, and OPG, inhibiting osteoclastogenesis, were found slightly, but not significantly increased in the callus of sildenafil-treated animals. In contrast, expression of RANKL, a stimulator of osteoclastogenesis, was slightly reduced after sildenafil treatment. Furthermore, eNOS, which is also capable of promoting angiogenesis, was found significantly lowered to ~50 % in sildenafil-treated animals when compared to vehicle-treated controls.

Taken together, the present study shows for the first time that sildenafil treatment accelerates fracture healing, most probably by a CYR61-associated pathway.

2. Einleitung

2.1 Knochen

Das Knochengewebe ist ein spezialisiertes Bindegewebe und gehört, ebenso wie das Knorpelgewebe, zum Stützgewebe. So gibt diese Gruppe von Geweben, durch ihre besondere Festigkeit, dem Körper eine bestimmte Form. (Junqueira et al., 2005)

2.1.1 Morphologie

Die einzelnen Knochen unterscheiden sich in Form und Größe entsprechend ihrer Lage und Funktion. Sie werden eingeteilt in (Schiebler et al., 1997):

- Lange Knochen = Röhrenknochen (Ossa longa)
- Kurze Knochen (Ossa brevia)
- Platte Knochen (Ossa plana)

2.1.1.1 Femur

Das Femur ist der längste und stärkste Röhrenknochen im menschlichen Körper. Es besteht proximal aus dem Kopf (Caput) und dem Hals (Collum), in der Mitte aus dem Schaft (Corpus) und distal aus den beiden Gelenkknollen (Kondylen) (Schiebler et al., 1997).

Allgemein lassen sich Röhrenknochen in 3 Abschnitte einteilen. Man unterscheidet zwischen dem Schaft (Diaphyse), den beiden Knochenenden (Epiphysen) und den jeweils zwischen dem Schaft und den Knochenenden liegenden Metaphysen (Junqueira et al., 1996).

In dieser Studie wurde für die Untersuchung der Frakturheilung das Femur der Maus verwendet. Dieses entspricht in seinem Aufbau weitestgehend dem Aufbau des menschlichen Femurs (Bab et al., 2007). Die Frakturierung zur Untersuchung der Frakturheilung wurde im Bereich der Diaphyse durchgeführt.

2.1.2 Histologie

Den menschlichen Knochen kann man makroskopisch in zwei Anteile gliedern:

- die äußere Substantia compacta (Kompakta)
- die innere Substantia spongiosa (Spongiosa)

Die Kompakta ist die Rindenschicht aller Knochen und liegt an der Knochenoberfläche direkt unter dem Periost. Sie wird daher auch als Substantia corticalis (Kortikalis) bezeichnet. Im mittleren Teil der Röhrenknochen kann sie bis zu mehreren Millimetern dick sein. Die Spongiosa ist ein schwammartiges Gerüstwerk feiner Knochenbälkchen, so genannten Trabekeln (Moll & Moll, 2002).

Das Knochengewebe selbst besteht zum einen aus der extrazellulären Matrix, auch Interzellulärsubstanz genannt, die sich aus Wasser, organischen Substanzen (Grundsubstanz, Kollagenfasern) und anorganischen Substanzen (Mineralien) zusammensetzt. Diese Zusammensetzung kann sich mit dem Alter ändern. Zum anderen finden sich im Knochengewebe verschiedene Zellen, die für den Knochenaufbau, -umbau und -abbau verantwortlich sind (Moll & Moll, 2002).

Extrazelluläre Matrix (Interzellulärsubstanz):

- Wasser (ca. 20-30 %, nimmt mit dem steigenden Alter ab)
- organische Substanzen:
 - Kollagenfasern
 - Grundsubstanz = Osteoid:
 - Proteoglykane
 - Glykoproteine
- anorganische Substanzen:
 - Mineralien 45-60 %
 - Phosphat 50 %
 - Kalzium 35 %

Durch das Kalzium und das Phosphat, die im Knochen als Apatitkristalle, vor allem als Hydroxylapatit, vorliegen, erhält der Knochen seine hohe Druckfestigkeit (ca. 14 bis 16 kp/mm²). Während der hohe Anteil an Kollagenfasern die hohe Zugfestigkeit des Knochens (ca. 10 kp/mm²) bedingt (Moll & Moll, 2002).

Zu den verschiedenen Zellen, die sich im Knochengewebe befinden, zählen:

- Osteoblasten
- Osteozyten
- Osteoklasten

Osteoblasten sind Zellen, die sich aus mesenchymalen Vorläuferzellen entwickeln. Die Vorläuferzellen findet man in der äußeren und der inneren Oberfläche des Knochens während des gesamten Lebens. Dabei sind sie besonders aktiv während der Wachs-

tumsphase (Moll & Moll, 2002). Zudem sind diese auch in den Havers-Kanälen zu finden und bei entsprechender Stimulation, wie z. B. bei Knochenbrüchen, differenzieren sie sich zu Osteoblasten (Junqueira et al., 1996).

Osteoblasten befinden sich an der Oberfläche von Knochenbälkchen, wo sie dicht nebeneinander liegen (Junqueira et al., 1996). Die Osteoblasten synthetisieren und sezernieren die organischen Bestandteile der Interzellulärsubstanz, wie z. B. Kollagen vom Typ I, Glykoproteine, Proteoglykane und die alkalische Phosphatase. Zusätzlich speichern sie in Vesikeln Ca^{2+} und PO_4^{2-} (Moll & Moll, 2002). Die von den Osteoblasten neu gebildete, noch nicht verkalkte Knochengrundsubstanz an der Oberfläche der Knochenbälkchen wird als Osteoid (Vorknochen) bezeichnet. Die Grundsubstanz wird schließlich durch Proteoglykane und andere, von Osteoblasten gebildete Proteine, sowie durch die Ablagerung von Hydroxyapatitkristallen und zusätzlich durch die alkalische Phosphatase mineralisiert (Junqueira et al., 2005).

Die Osteoblasten besitzen zudem die Fähigkeit die Osteoklastenvorläuferzellen zu aktivieren (Schiebler & Korf, 2007). Die Osteoblasten sind über zytoplasmatische Ausläufer miteinander verbunden. Durch die Sezernierung der Substanzen mauern sie sich langsam ein, bis sie vollkommen von der Interzellulärsubstanz umgeben sind. Dann nimmt ihre Syntheseaktivität ab und man nennt diese Zellen Osteozyten. Die Osteozyten stehen aber weiterhin mit ihren zytoplasmatischen Ausläufern untereinander in Kontakt (Moll & Moll, 2002). Die Fortsätze erstrecken sich in die Kanalikuli und dienen dem Stofftransport zwischen den einzelnen Osteozyten (Junqueira et al., 1996).

Die Osteozyten können in zwei funktionell verschiedene Arten unterteilt werden:

- osteoblastische Osteozyten
- osteolytische Osteozyten

Die osteoblastischen Osteozyten können zum Aufbau der Knochengrundsubstanz das Kalziumphosphat, das sie enthalten, abgeben. Dagegen können die osteolytischen Osteozyten den Knochen mit Hilfe von Lysosomen, die sie enthalten, abbauen und somit das Kalzium freisetzen (Junqueira et al., 1996).

Die Zellen, die den Knochen abbauen, nennt man Osteoklasten. Anders als die anderen Knochenzellen, entwickeln sich die Osteoklasten aus hämatopoetischen Vorläuferzellen (Junqueira et al., 2005). Damit sind sie nicht mesenchymalen Ursprungs, sondern gehören zum mononukleären Phagozytosesystem (Moll & Moll, 2002).

Osteoklasten sind amöboid bewegliche, stark verzweigte Riesenzellen und können bis zu 50 oder sogar auch mehr Zellkerne enthalten. Sie enthalten Lysosomen und sind azidophil. Sie dienen dem Abbau der von den Osteoblasten gebildeten mineralisierten Knochengrundsubstanz. Durch lysosomale Enzyme der Osteoklasten im Rahmen der Knochenresorption werden das Kollagen und die Glykosaminoglykane des angrenzenden Knochens gespalten (Moll & Moll, 2002). Dies geschieht, indem zuerst die Hydroxyapatitkristalle aufgelöst werden und der Knochen demineralisiert wird. Anschließend werden die jetzt freiliegenden Kollagenfibrillen von den Proteasen hydrolysiert (Junqueira et al., 2005). Die dadurch entstandenen Vertiefungen werden Howship-Lakunen genannt und die Osteoklasten liegen in diesen Hohlräumen (Moll & Moll, 2002).

Osteoblasten und Osteoklasten werden durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, inflammatorisch wirkenden Mediatoren und auch durch Hormone beeinflusst (Mundy, 1992; Mundy, 1993; Simonet et al., 1997; Suda et al., 1992). Zum Beispiel werden die Osteoklasten in ihrer Aktivität indirekt durch das Parathormon gesteigert und durch Kalzitonin und Östrogene gehemmt (Moll & Moll, 2002).

Osteoblasten und Osteoklasten stehen funktionell in einer sehr engen Beziehung. Osteoblasten besitzen die Fähigkeit, Faktoren zur Umwandlung der Osteoklastenvorläuferzellen in aktive Osteoklasten oder zur Hemmung der Osteoklastenaktivität freizusetzen (Schiebler & Korf, 2007).

Osteoblasten können die Proliferation der eigenen Vorläuferzellen, durch die Sezernierung des M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), fördern. Die Osteoblasten selbst unterliegen allerdings auch regulierenden Prozessen. Ein Absinken des Kalziumspiegels im Serum fördert durch eine erhöhte Parathormonausschüttung die Aktivität der Osteoblasten. Diese Regulation ist möglich, da die Osteoblasten, im Gegensatz zu den Osteoklasten, Rezeptoren für Parathormon besitzen (Schiebler & Korf, 2007).

Um die Osteoklastenvorläuferzellen in aktive Osteoklasten umwandeln zu können, ist der membrangebundene Osteoblastenfaktor RANKL (receptor for activation of nuclear factor kappa B ligand), der sich auf den Osteoblasten befindet, notwendig. Die Osteoklastenvorläuferzellen besitzen dafür auf ihrer Oberfläche einen RANK-Rezeptor (receptor for activation of nuclear factor kappa B). Bei Bindung des Liganden an den Rezeptor wird die Differenzierung der Osteoklastenvorläuferzellen in reife Osteoklasten ausgelöst (Schiebler & Korf, 2007; Theill et al., 2002).

Die Osteoblasten hemmen die Tätigkeit der Osteoklasten, wenn der Transforming growth factor β (TGF β) beim Abbau der Matrix des Knochens freigesetzt wird, auf sie einwirkt und dadurch OPG (Osteoprotegerin) freigesetzt wird, ein Inhibitor der Osteoklasten. Durch die Behinderung der Signalwirkung von RANKL durch das OPG kommt es zu einer Hemmung der Osteoklasten (Schiebler & Korf, 2007; Simonet et al., 1997).

Es zeigt sich, dass ein Abbau des Knochens durch die Osteoklasten dann stattfindet, wenn in den Osteoblasten die OPG-Produktion vermindert und die von RANKL erhöht ist (Schiebler & Korf, 2007).

Jeder Knochen besitzt eine Oberflächenbedeckung, aus knochenbildenden Zellen und Bindegewebe, von der die gesamte Kortikalis bis auf die knorpeligen Gelenkflächen überzogen ist. Auf der äußeren Oberfläche findet man das sogenannte Periost, während die innere Oberfläche durch das Endost bedeckt wird (Moll & Moll, 2002).

Das Periost kann in zwei Schichten unterteilt werden:

- Stratum fibrosum (äußere Schicht)
- Stratum osteogenicum (innere Schicht)

Das Stratum fibrosum besteht aus Kollagenfasern. Diese Kollagenfaserbündel werden Sharpey-Fasern genannt und sind mit der Kortikalis (des Knochens) verbunden (Junqueira et al., 2005). Durch die Sharpey-Fasern, die in manchen Bereichen fest und in anderen eher lockerer mit dem Knochen verbunden sind, kann eine lokale Zugbeanspruchung durch Sehnen- und Bandansätze vermieden werden, da die Kollagenfasern der Sehnen zum größten Teil breit in das Stratum fibrosum ausstrahlen. So verteilen sich die Zugkräfte der Sehnen und Bänder auf eine größere Fläche (Schiebler et al., 1997).

Das Stratum osteogenicum wird auch als Kambiumschicht bezeichnet und enthält kleine Gefäße und Kapillaren, die mit den Osteozytenfortsätzen in Verbindung stehen und so den Stofftransport gewährleisten. Neben den Gefäßen enthält das Stratum osteogenicum auch Nerven. Diese sensiblen Nervenfasern sind für die Schmerzempfindungen, die vom Periost ausgehen können, verantwortlich (Schiebler et al., 1997).

Ebenso findet man in dieser Schicht des Periosts sogenannte Belegzellen (lining cells), die inaktive Osteoblasten darstellen, und sich zu aktiven Osteoblasten differenzieren, sobald sie einem Wachstumsreiz ausgesetzt sind. So kann das Stratum osteogeni-

cum während des Knochenwachstums zur Knochenneubildung beitragen (Junqueira et al., 2005). Nach Abschluss des Knochenwachstums nimmt die Differenzierung der Osteoblasten und somit die Produktion der Knochensubstanz wieder ab und setzt erst wieder ein, wenn durch eine Fraktur der Prozess der Frakturheilung aktiviert wird (Schiebler et al., 1997).

Das Endost trennt den Knochen vom Knochenmark und besteht aus einer Schicht abgeflachter Retikulumzellen (Moll & Moll, 2002). Das Endost kleidet die innere Oberfläche des Knochens und der Knochenbälkchen der Spongiosa ebenso wie die Knochenkanälchen aus (Junqueira et al., 1996). Auch das Endost versorgt den Knochen mit Nährstoffen. Diese Versorgung ist absolut notwendig, da der Knochen eine hohe Stoffwechselaktivität durch den ständigen Knochenumbau aufweist (Moll & Moll, 2002).

Bezogen auf die Anordnung der Kollagenfasern der Interzellularsubstanz kann man zwei Arten des Knochengewebes unterscheiden:

- Geflechtknochen
- Lamellenknochen

Der Geflechtknochen zeigt charakteristischerweise eine zufällige Anordnung von Kollagenfasern und den Knochenzellen und erscheint dadurch ungeordnet. Das Stadium der Geflechtknochenbildung wird bei der Entwicklung ebenso wie bei der Neubildung von Knochen im Rahmen der Knochenbruchheilung durchlaufen (Junqueira et al., 1996). Der Geflechtknochen stellt also die erste Knochenform dar, die allerdings bis zum fünften Lebensjahr durch den Lamellenknochen ersetzt wird. Geflechtknochen findet sich lediglich nur noch in den Nähten (Suturae) der Schädelknochen, im Felsenbein, sowie in den Alveolarfortsätzen der Zähne des erwachsenen Menschen. Wenn nach einer Fraktur wieder neuer Knochen gebildet wird, wird auch beim Erwachsenen zunächst Geflechtknochen gebildet und anschließend in Lamellenknochen umgebaut (Moll & Moll, 2002). Die Kollagenfaserbündel des Geflechtknochens liegen zum Teil in groben und feineren Bündeln in der Grundsubstanz. Aufgrund der Tatsache, dass sie dadurch keine besondere Verlaufsrichtung haben, besteht auch keine Lamellenbildung, allerdings besitzen sie für die Blutgefäße und Nerven entsprechende Knochenkanälchen (Junqueira et al., 1996). Der Geflechtknochen besitzt einen hohen Anteil an Osteozyten, dagegen ist der Anteil an Mineralien, im Vergleich zum Lamellenknochen, verringert. Der Geflechtknochen besitzt eine gute Vaskularisation und hat eine besondere Zugfestigkeit und Biegungselastizität (Moll & Moll, 2002).

Der Lamellenknochen besteht im Gegensatz zum Geflechtknochen aus regelmäßig parallel angeordneten Kollagenfasern in der Grundsubstanz, die für die typische Lamellenbildung verantwortlich sind. Die einzelnen Knochenlamellen sind im Durchschnitt 3 bis 7µm dick und stellen einzelne Knochenschichten dar, die man klar voneinander abgrenzen kann (Junqueira et al., 1996).

Je nach Verlauf der einzelnen Kollagenfasern in den Lamellen und der Lage der entsprechenden Lamellen im Knochen unterscheidet man:

- Generallamellen (äußere und innere)
- Speziallamellen (Lamellae osteoni)
- Schaltlamellen (Lamellae interstitiales)

In jeder Lamelle haben die Kollagenfasern einen charakteristischen Verlauf (Junqueira et al., 1996).

In den Generallamellen findet man gerade verlaufende Kollagenfasern. Die Generallamellen liegen an der inneren und äußeren Oberfläche des Knochens und bilden somit auf der einen Seite die Grenze zum Periost hin und auf der anderen zum Endost. In den äußeren Generallamellen findet man teilweise Sharpey-Fasern, die dem Verbund der Sehnen und Bänder mit dem Knochen dienen (Moll & Moll, 2002). Die äußeren Generallamellen sind in einer höheren Anzahl im Vergleich zu den inneren Generallamellen zu finden (Junqueira et al., 1996). Die inneren Generallamellen sind im Gegensatz zu den äußeren Generallamellen an vielen Stellen unterbrochen, besonders an den Stellen der Spongiosalücken. Außerdem setzen sich die inneren Generallamellen in Spongiosabälkchen fort (Moll & Moll, 2002).

Als Speziallamellen bezeichnet man die Lamellen, die im Innern der Kompakta, also zwischen den Generallamellen liegen (Moll & Moll, 2002). Man findet sie vor allem im Bereich der Diaphysen von Röhrenknochen (Junqueira et al., 1996). Hier zeigen die Kollagenfaserbündel einen spiralförmigen Verlauf, wobei sich die Richtung der einzelnen Kollagenfasern bei jeder einzelnen Lamelle ändert. Von diesen Lamellen umgeben ist der Zentralkanal (Canalis centralis), auch Havers-Kanal genannt. Dabei sind die Lamellen konzentrisch angeordnet und die Äußeren stellen die ältesten Lamellen dar. Der Havers-Kanal, in dem die Gefäße zur Versorgung des Knochens und die Nerven verlaufen, wird von flachen Zellen ausgekleidet. Auch findet man dort die Knochenvorläuferzellen. Die Einheit aus Zentralkanal und den dazu gehörenden Speziallamellen wird als Havers-System oder auch als Osteon bezeichnet. Zwischen den Osteonen, die ca. 1mm dick sind, befindet sich eine faserarme Grund-(Kitt-)Substanz. Die Knochenhöhlen, in denen

die Osteozyten hauptsächlich liegen, sind untereinander über Knochenkanälchen und den Zentralkanal verbunden. Die zytoplasmatischen Fortsätze der Osteozyten liegen ebenfalls in den Knochenkanälchen (Moll & Moll, 2002).

Neben den beiden Lamellenarten gibt es auch noch die Schaltlamellen. Sie stellen die Reste von Lamellen oder auch Lamellenbruchstücke von abgebauten oder umgebauten Osteonen dar. Die Schaltlamellen findet man also in den Bereichen zwischen neu gebildeten Osteonen (Junqueira et al., 1996).

Im Knochen findet sich ebenfalls ein System verschiedener Kanälchen. Man unterscheidet zwei Arten von Knochenkanälchen:

- Havers-Kanäle (Canales centrales)
- Volkmann-Kanäle (Canales perforantes)

Die Havers-Kanäle sind Zentralkanäle mit einem, von der Anzahl der Speziallamellen abhängigem, Durchmesser zwischen 20 bis 300µm, in denen sich die Nerven und Blutgefäße zur Versorgung des Knochens befinden. In ihnen findet man lockeres Bindegewebe mit Vorläuferzellen, sowie Zellen, die die Oberfläche des Knochens bedecken (Junqueira et al., 1996).

Die Canales perforantes werden auch Volkmann-Kanäle genannt und ziehen unabhängig vom Lamellenverlauf von einer Oberfläche zur anderen Oberfläche durch die Osteone. Sie verlaufen also senkrecht durch den Knochen und stehen mit den Havers-Kanälen in Kontakt. Durch sie werden die Havers-Kanäle mit den Blutgefäßen aus dem Periost ebenso wie aus dem Endost verbunden (Junqueira et al., 1996).

2.1.3 Physiologie

Der Knochen bzw. das Knochengewebe übernimmt bestimmte Aufgaben und Funktionen im Körper. Zu diesen Hauptaufgaben zählen:

- Stützfunktion
- Schutzfunktion
- Bewegungsfunktion
- Depotfunktion

Mit der Stützfunktion ist die mechanische Stützung des Körpers gemeint (Moll & Moll, 2002). Die Knochen dienen als Ansatzstellen für die Muskeln des Skeletts deren Sehnen

mit dem Periost in Verbindung stehen und mit Kollagenfasern in die Grundsubstanz des Knochens einstrahlen (Junqueira et al., 1996). Unter der Schutzfunktion versteht man den Schutz der Organe, die unter den Knochen liegen, wie z. B. der Schädelknochen. Die Knochen, besonders die Knochen der Extremitäten, übernehmen auch die Bewegungsfunktion des Körpers (Moll & Moll, 2002). So können die Knochen durch die Ausbildung verschiedener Hebelsysteme die auftretenden mechanischen Kräfte verstärken (Junqueira et al., 1996). Auch dient der Knochen als Depot für Mineralsalze (Moll & Moll, 2002). So enthält das Skelettsystem 99 % des gesamten Kalziums im Körper und ist damit der wichtigste Kalziumspeicher (Junqueira et al., 1996).

Der Knochen besitzt die Fähigkeit durch verschiedene Umbauprozesse seine Form zu verändern und sich damit den geforderten mechanischen Gegebenheiten anzupassen. Diese Fähigkeit wird als Modeling bezeichnet und ist besonders ausgeprägt in der Phase des Wachstums zu finden und nimmt mit zunehmendem Alter wieder ab (Fleisch, 1997).

Die dynamischen Umbauprozesse im Knochen, bestehend aus einem Knochenabbau durch die Osteoklasten und einem Knochenaufbau durch die Osteoblasten, werden als Remodeling bezeichnet. Remodeling findet während des gesamten Lebens statt und dient als Reparaturmechanismus, sowie der Anpassung an wechselnde Bedingungen (Aro et al., 1990; Parfitt, 1988; Rueter et al., 2003). Zunächst wird überschüssiges Knochengewebe abgebaut und entsprechend der aktuellen mechanischen Belastung wird der neu gebildete Geflechtknochen in Lamellenknochen umgebaut. So kann die ursprüngliche Knochenstruktur, bestehend aus Havers- und Volkmann-Kanälen und dem durchgehenden Markraum, wieder hergestellt werden (Aro et al., 1990, Rueter et al., 2003; Siewert, 2006).

Anatomisch und klinisch zeigt sich diese funktionelle Anpassung darin, dass es bei verstärkter Belastung, die über die Gelenkenden auf den Knochen einwirkt, zu einer Verdickung der Kompakta und der Spongiosabälkchen kommt. Hingegen führt eine längere Ruhigstellung zu einem Verlust der Knochensubstanz. Ebenso geht ein konstant ausgeübter lokaler Druck auf den Knochen mit einem Knochenabbau einher. Die funktionelle Anpassung des Knochens bzw. des Spongiosaaufbaues ist besonders gut zu beobachten bei Frakturen der Röhrenknochen, die mit axialer Abweichung verheilt sind, denn hier zeigt sich eine Neuausrichtung der Spongiosabälkchen entsprechend der neuen Belastungsverteilung (Schiebler & Korf, 2007). Dieses ständig bestehende Gleichge-

wicht zwischen Knochenaufbau und -abbau durch die BRU (Basic Remodeling Unit) wird auch als Coupling bezeichnet (Fleisch, 1997).

2.1.4 Knochenentwicklung

Das Knochengewebe kann sich auf 2 verschiedene Weisen entwickeln:

- desmale Ossifikation (Osteogenesis membranacea)
- chondrale Ossifikation (Osteogenesis cartilaginea)

Die desmale oder intramembranöse Ossifikation stellt die häufigste Art der Knochenbildung dar und wird auch direkte Knochenbildung genannt, weil hierbei der Knochen direkt aus Mesenchymzellen gebildet wird. Genauer gesagt differenzieren sich die Mesenchymzellen in umschriebenen Gebieten des embryonalen Bindegewebes zunächst zu Vorläuferzellen, vermehren sich dort und differenzieren sich anschließend zu Osteoblasten weiter. Die Osteoblasten mauern sich mit Osteoid und Kollagen ein. Die Kollagenfasern in der Grundsubstanz haben keinen geordneten Verlauf. Die Zellen stehen weiterhin mit ihren Fortsätzen in Kontakt. So entsteht bei dieser Art der Knochenbildung Geflechtknochen (Schiebler et al., 1997).

Während das Osteoid mineralisiert wird, setzen gleichzeitig Um- und Abbauprozesse durch Osteoklasten ein, wodurch ein spongiöses Knochenbild aus Knochenbälkchen entsteht. Die Stellen der beginnenden desmalen Knochenbildung werden als primäre Ossifikationszentren bezeichnet. Von diesen Ossifikationszentren treten mehrere gleichzeitig auf, die miteinander verschmelzen (Junqueira et al., 1996).

Bei der chondralen Ossifikation bildet sich zunächst hyalines Knorpelgewebe, welches anschließend durch Knochen ersetzt wird. Diese Art der Knochenbildung findet sich besonders bei den langen und kurzen Knochen. Diese indirekte Knochenbildung kann in zwei Vorgänge unterteilt werden, die zusammen zeitversetzt ablaufen:

- perichondrale Ossifikation (Ossificatio perichondralis)
- enchondrale Ossifikation (Ossificatio enchondralis)

Bei der perichondralen Ossifikation entstehen ab dem dritten Entwicklungsmonat Ossifikationszentren im Bereich der späteren Diaphyse. Zunächst geht die Knochenneubildung vom Perichondrium und später vom Periost aus, welches das Perichondrium ersetzt. So entsteht um den Knorpelschaft herum eine aus Geflechtknochen bestehende Knochenmanschette, die bis zu dem Übergang der Epiphysen hinreicht. Durch diese

entstandene Knochenmanschette kann der Knorpel des Schaftes nicht mehr ausreichend ernährt werden, was zu einer Hypertrophie der Chondrozyten führt. Ebenfalls kommt es zu einer Resorption der Interzellulärsubstanz und zu einer Vergrößerung der Knorpelhöhlen, sodass der vorhandene Knorpel als Blasenknorpel bezeichnet wird. Im weiteren Verlauf degenerieren die Knorpelzellen und Kalzium wird eingelagert, sodass es langsam zu einer Verkalkung des Knorpelgewebes kommt. Durch Osteoklasten entstehen nun an der Oberfläche der perichondralen Knochenmanschette Löcher, in die Blutgefäße aus dem Periost einwachsen. Ebenfalls gelangen durch diese Löcher undifferenzierte Mesenchymzellen in den geschädigten Knorpel. Nach intensiven Um- und Abbauprozessen umschließt der Knochen die primäre Markhöhle, in der sich jetzt kein Knorpel- und auch kein Knochengewebe mehr befindet (Junqueira et al., 1996). Hier entwickeln sich die Mesenchymzellen zu Retikulumzellen und Blutvorläuferzellen und es beginnt die Blutbildung. Nun wird auch von sekundärem Knochenmark gesprochen. Durch den Knochenabbau erweitert sich die Knochenmarkhöhle bis zu der Umbauzone zwischen der Diaphyse und der Epiphyse, wo nun die enchondrale Ossifikation stattfindet (Schiebler & Korf, 2007).

Die enchondrale Ossifikation findet man also in den Epiphysen. In dem Bereich der Umbauzone lassen sich verschiedene Zonen abgrenzen.

Von der Epiphyse aus findet man folgende Zonen:

- Reservezone
- Proliferationszone
- Resorptionszone
- Verknöcherungszone

In der Reservezone findet man hyalinen Knorpel. Am Anfang findet man hyalinen Knorpel in der gesamten Epiphyse, nach Beginn der Verknöcherung nur noch einen breiten Streifen. Die Proliferationszone zeichnet sich durch eine lebhaft Teilung der Knorpelzellen aus, die sich in der Längsachse säulenartig anordnen. Daher nennt man den Knorpel in dieser Zone auch Säulenknorpel. In der Resorptionszone findet sich Blasenknorpel. Hier sind die Knorpelzellen und die Knorpelhöhlen stark vergrößert und die Interzellulärsubstanz findet sich nur noch in schmalen Septen mit Kalkeinlagerungen. Die Verknöcherungszone wird auch Eröffnungszone genannt, weil hier die Knorpelzellen zugrunde gehen und durch die Chondroblasten aus ihren Höhlen freigesetzt werden. Man findet hier Kalkablagerungen in der Grundsubstanz und in den verkalkten Knorpelspangen lagern sich Osteoblasten an und bilden Geflechtknochen. Daraus entsteht ein, mit der

perichondralen Knochenmanschette in Verbindung stehendes, Knochengerüst aus Knochenbälkchen (Schiebler & Korf, 2007).

Die Verknöcherung der Epiphyse findet wesentlich später als die der Diaphyse statt. Auch hier wachsen in das Gebiet des Blasenknorpels von der Umgebung her Gefäße und Mesenchymzellen ein und es beginnen Umbauprozesse. Die Entwicklung der Knochenbälkchen schreitet vom Zentrum der Epiphyse aus in die Peripherie fort. Eine Knochenschale bildet sich an der Epiphysenoberfläche (Schiebler et al., 1997).

Durch den Knochenaufbau und den gleichzeitigen Knochenabbau kommt es in der Summe zu einem Längen- und Dickenwachstum des Knochens (Schiebler et al., 1997).

2.2 Frakturen

Eine Fraktur wird als Kontinuitätsunterbrechung des Knochens definiert.

Die Einteilung von Frakturen kann nach verschiedenen Gesichtspunkten durchgeführt werden. Dabei werden die Ätiologie der Fraktur, der Entstehungsmechanismus, der Verlauf der Frakturlinien und die Anzahl der Bruchstücke berücksichtigt. Die Frakturen der langen Röhrenknochen werden im klinischen Alltag nach der AO Klassifikation eingeteilt (Müller et al., 1991).

2.3 Frakturheilung

Das Knochengewebe besitzt, durch seine ständigen Umbauvorgänge, im Gegensatz zu anderen Geweben, die Fähigkeit zu einer narbenlosen Ausheilung (Siewert et al., 2006). Für eine erfolgreiche Frakturheilung müssen die Reposition und Fixation, ebenso wie eine adäquate Blutversorgung gegeben sein (Hankenson et al., 2011).

In Abhängigkeit der Frakturversorgung unterscheidet man zwischen einer primären und sekundären Frakturheilung.

2.3.1 Primäre Frakturheilung

Unter der primären Knochenbruchheilung versteht man eine direkte Überbrückung des Bruches ohne Ausbildung eines Frakturkallus.

Bei dieser Art der Knochenbruchheilung werden die Fraktarenden durch einwachsende Osteone ohne Ausbildung einer Knorpelmanschette überbrückt (Siewert et al., 2006).

Eine anatomische Reposition, ebenso wie eine ausreichende Vaskularisation sind Grundvoraussetzungen für eine primäre Frakturheilung (Rueter et al., 2003). So findet man diese Form der Knochenbruchheilung lediglich nach rigider Fixation (Siewert et al., 2006). Man unterscheidet, abhängig von der absoluten Größe des Frakturspalt, die Spaltheilung (Frakturspalt größer als 0,2 mm) und die Kontaktheilung (Frakturspalt kleiner als 0,2 mm).

2.3.2 Sekundäre Frakturheilung

Die meisten Knochenbrüche heilen sekundär. Die Heilung erfolgt über ein bindegewebiges Reparationsgewebe mit sekundärer Knochenbildung (Rueter et al., 2003). Diese Form der Knochenheilung findet statt, wenn die Fraktarenden oder die Knochenfragmente gar nicht oder nur unzureichend reponiert sind, wie es bei der konservativen Therapie von Knochenbrüchen oder auch bei der Stabilisierung mit Hilfe eines Fixateur externe oder mittels Marknagels der Fall sein kann. Hier verläuft der Prozess der Frakturheilung mit der Knochenneubildung über die periostale und auch die enostale Kallusbildung (Siewert et al., 2006). Man kann die sekundäre Frakturheilung in vier bzw. mit der Frakturphase zusammen in fünf verschiedene Phasen unterteilen, bei denen folgende Schritte durchlaufen werden (Gerstenfeld et al., 2005; Rueter et al., 2003):

- Verletzungsphase (Frakturphase)
- Entzündungsphase
- Granulationsphase
- Phase der Kallushärtung
- Remodelingphase

In der Frakturphase wird der Knochen samt Kortikalis, Periost, sowie der Spongiosa und dem Knochenmark verletzt. Auch die umgebenden Weichteile werden traumatisiert, wobei das Ausmaß der Verletzung variiert. Durch diese Verletzungen kommt es zur Ausbildung eines Hämatoms im Frakturbereich (Rueter et al., 2003).

Die Entzündungsphase setzt unmittelbar nach der Frakturierung ein. Sie ist gekennzeichnet durch Zellproliferation, besonders neutrophiler Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen. Zudem findet eine überschießende Kapillaraussprossung statt (Rueter et al., 2003). Es wird angenommen, dass die Mastzellen durch das enthaltene Heparin und die heparinähnlichen Substanzen einen großen Einfluss auf die Vaskularisation und die Zellwanderung haben (Banovac et al., 1995). Die Mastzellen, die zum hämatopoetischen System gehören, werden von einigen Forschern als die Vorläufer bzw. Ur-

sprungszellen der Osteoklasten bezeichnet (Boyle et al., 2003; Rueter et al., 2003; Treitelbaum & Ross, 2003). Die gesteigerte Vaskularisierung dient nicht nur der Versorgung der vorhandenen Zellen vor Ort, sondern auch dem Transport von neuen Zellen über den Blutfluss und direkt aus dem Gefäßendothel. Die dadurch entstandene Durchblutungssteigerung erreicht ihren Höhepunkt in der zweiten Woche nach der Verletzung und kann das 6-fache der Norm erreichen. Während die Kortikalis normalerweise von den Markraumgefäßen zentrifugal hauptsächlich zu 2/3 versorgt wird, erfolgt in dieser Phase eine „Flussumkehr“, sodass die Kortikalis nun von den periostalen Gefäßen ernährt wird. Zusätzlich sind zwischen der Knochenoberfläche und der kambialen Schicht des Periosts sogenannte Spindelzellen zu finden. Sie werden auch als Osteoprogenitorzellen bezeichnet, da aus ihnen Osteoblasten entstehen (Einhorn TA, 19998; Li et al., 2002). Nach 2-3 Tagen findet man im Hämatom ein Fibrinnetz und Kollagenfibrillen und die Entzündungsphase ist beendet (Rueter et al., 2003).

Nun setzt die Granulationsphase ein, d.h. das vorhandene Gewebe wird durch Granulationsgewebe ersetzt. Dies besteht aus Fibroblasten, zahlreichen Kapillaren sowie neu gebildetem Kollagen. Es entsteht der sogenannte weiche Kallus, da das Granulationsgewebe dafür sorgt, dass sich zwischen den Fragmenten Brücken bilden. Nun werden tote Fragmentenden durch Osteoklasten abgebaut. Durch Chondroblasten und Osteoblasten beginnt die erste subperiostale Knochenneubildung, die man primäre Kallusreaktion nennt. Zusätzlich wird ein medullärer Kallus gebildet. Dabei handelt es sich um ein in das Hämatom eingewandertes Blastem, das aus dem Markraum des Knochens stammt. Die Fragmente des gebrochenen Knochens sind nun am Ende der Granulationsphase nach 3-4 Wochen durch Bindegewebe und Knorpel weich miteinander verbunden (Rueter et al., 2003).

In der Phase der Kallushärtung geben hypertrophierte Chondrozyten Kalzium ab, welches zur Mineralisierung der Grundsubstanz dient und damit zur Aushärtung des Kallus führt. Durch enchondrale Ossifikation entsteht entlang der Kapillaren, ohne eine entsprechende Ausrichtung, der Geflechtknochen. Im sogenannten osteogenen Blastem laufen die Ossifikationsprozesse fast gleichzeitig ab. Eine multizentrische Grundeinheit, die „basic multicellular unit (BMU), ist sowohl für den Abbau von nekrotischem Knochen, als auch für den Umbau von mineralisiertem Knorpel in Knochen verantwortlich. Die BMU besteht aus Zellen, Interzellulärschicht und Kapillaren. Zeitabhängig entstehen Osteoklasten, welche das harte Gewebe abbauen. So wird der mineralisierte Knorpel durch Geflechtknochen ersetzt und der Geflechtknochen zu Lamellenknochen umgebaut (Kon et al., 2001; Rueter et al., 2003).

Die Umwandlung des Geflechtknochens in lamellären Knochen durch die BMU bezeichnet man als Modeling. Dieser Knochen ist nun wieder seiner späteren mechanischen Beanspruchung nach ausgerichtet (Rueter et al., 2003).

Das Remodeling bezeichnet die Wiederherstellung des Markraumes und der normalen Knochenkontur und schließt den Prozess der Frakturheilung ab (Ai-Aqi et al., 2008; Gerstenfeld et al., 2009; Mountziaris & Mikos, 2008; Rueter et al., 2003).

2.4 Frakturmodelle

Die Frakturheilung wurde bereits in einer Vielzahl von klinischen- und in-vitro Studien untersucht. Aufgrund des komplizierten Zusammenspiels der verschiedenen Zellen und Gewebe sind jedoch Studien am Tiermodell unverzichtbar. In der Vergangenheit wurden bereits zahlreiche Tiermodelle etabliert. So lassen sich Großtiermodelle, wie Schafe (Jäger et al., 2011; Gonzalez-Torres et al., 2011; Preininger et al., 2011) oder Schweine (Ho et al., 2010; Nakata et al., 2011) unterscheiden. Als Kleintiermodelle werden vor allem Mäuse (Brown et al., 2014; Garcia et al., 2008b; Grimes et al., 2011; Oetgen et al., 2008; Sheu et al., 2014; Timmen et al., 2014), Ratten (An et al., 1994; Doi et al., 2011; Schmidmaier et al., 2004) und Kaninchen (Lettin, 1965; Veneroni et al., 1962) verwendet. Zu beachten ist allerdings, dass sich die verschiedenen Spezies nicht nur in ihrer anatomischen Struktur unterscheiden, sondern auch im Knochenaufbau sowie in dessen Stoffwechsel (Rhineland, 1974). So ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen nicht immer uneingeschränkt möglich (Rhineland, 1974).

2.4.1 Großtiermodelle

Eine besondere Stellung bei Großtierstudien nimmt das Schaf ein. Aufgrund der Größe und der vergleichbaren Knochenstruktur (Schenk & Willenegger, 1977) werden Schafe vor allem zur Implantattestung von humanen Implantaten oder deren Entwicklung verwendet (Cheal et al., 1991; Nunamaker & Perren, 1979; Richardson & Nunamaker, 1991; Steen et al., 1988). So werden z.B. verschiedene Plattenosteosynthesen (Perren et al., 1969; Schenk & Willenegger, 1977) und Marknagelsysteme im Schaf untersucht (Schemitsch et al., 1994 und 1995; Steen & Fjeld, 1989). Allerdings sind Schafe bei Studien mit größeren Versuchsgruppen aufgrund der relativ hohen Zucht- und Haltungskosten sehr teuer (Nunamaker, 1998).

Im Gegensatz dazu ist die Ziege durch die hohe Inzidenz von Erkrankungen des Stütz- und Bewegungsapparates für Studien zur Untersuchung der Frakturheilung nicht geeignet (Adams et al., 1983). Ebenso sind Pferde als Versuchstier für Frakturheilungsstudien

aufgrund der eingeschränkten Compliance und den enormen Zucht- und Haltungskosten ungeeignet (Nunamaker et al., 1991). Aus ethischen Gründen wird der Primat als Versuchstier im Bereich Frakturheilungsforschung nicht herangezogen, obwohl seine Knochenstruktur mit der des Menschen sehr gut vergleichbar ist (Nunamaker, 1998). Schweine können ebenfalls als Versuchstiere verwendet werden. Allerdings bestehen auch hier die Nachteile der hohen Zucht- und Haltungskosten. Sie werden hauptsächlich in Studien im Bereich der Zahnmedizin als Versuchstiere eingesetzt (Freilich et al., 2011; Slotte et al., 2011). Aber auch in Studien der Frakturheilung und der Implantatfestigkeit werden Schweine verwendet (Hansen et al., 2011; Ho et al., 2010; Nagatani et al., 2010; Nakata et al., 2010; Ochman et al., 2010). Hunde und Katzen werden vor allem in veterinärmedizinischen Studien eingesetzt. Der Frakturheilungsprozess beim Hund ist bereits hinreichend untersucht (Arnault et al., 2011; Clark & Hayes, 1963; Henry et al., 1985; Johnson & Stein, 1988; Newton & Zeitlin, 1977; Olerud & Danckwardt-Lillieström, 1968; Puech et al., 1990; Toombs et al., 1985). Bei Hunden existieren bereits zahlreiche Frakturmodelle mit interner und externer Stabilisierung, ebenso wie Modelle zur Untersuchung der verzögerten Frakturheilung (Chao et al., 1989; Davy & Connolly, 1982; Egger et al., 1993; Heckman et al., 1991; Lenehan et al., 1985; Muller et al., 1968; Peter et al., 1996; Roush & Wilson 1990).

2.4.2 Kleintiermodelle

Als Versuchstiere werden vor allem Nagetiere, wie Mäuse, Ratten und Kaninchen, herangezogen. Nachteil ist, dass das Havers-System erst wieder beim Kaninchen zu finden ist. Mäuse und Ratten besitzen eine primitivere Knochenstruktur ohne Havers-System. Ratten werden als Versuchstiere schon seit längerer Zeit für Studien der Frakturheilung verwendet. Mittlerweile existieren bereits eine Vielzahl verschiedener standardisierter Frakturmodelle, wie z.B. geschlossene Frakturmodelle mittels intramedullärem Pin am Femur (Bonnarens & Einhorn, 1984) und Tibia (Bak & Jensen, 1992; Beck et al., 2003; Krischak et al., 2007a; Krischak et al., 2007b). Daneben werden auch andere Knochen, wie Metatarsale, Radius und Ulna oder der Schädel, für Studien herangezogen (Gurgel et al., 2005; Heino et al., 2008; Hietaniemi et al. 1995; Niu et al., 2011; Utvåg et al., 1994).

Für Studien an Kaninchen (Ashhurst et al., 1982; Stafford et al., 1994; Strong et al., 1992) wurden ebenfalls Schrauben, Verriegelungsnägel, Plattenosteosynthesen und Fixateure zur Frakturstabilisierung entwickelt (Kaplan et al., 1985; Brighton et al., 1985; Deibert et al., 1994; Danckwardt-Lillieström et al., 1970; Pilla et al., 1990). Die operative Technik ist, durch die Größe der Tiere, gegenüber Ratten und Mäusen wesentlich einfacher.

Insgesamt sind die Kosten für Studien an Kleintiermodellen, vor allem bei Studien zur Medikamententestung deutlich geringer (Critchlow et al., 1995).

2.4.2.1 Maus

Der entscheidende Vorteil der Maus ist, dass das Genom der Maus komplett entschlüsselt ist und daher eine große Anzahl transgener Stämme und auch spezifische Antikörper zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der Frakturheilung zur Verfügung stehen (Jacenko & Olsen, 1995). Der Nachteil der Maus liegt in der primitiven Knochenstruktur mit sogenannten Resorptionskanälen anstatt der Havers-Systeme wie beim Menschen, wobei die Mechanismen sich nicht wesentlich unterscheiden (Histing et al., 2011). Die Knochenheilung verläuft über die Ausbildung von sogenannten Resorptionshöhlen, die mit Osteoblasten aufgefüllt werden. So sind Mäuse z.B. ungeeignet für Studien, die sich mit der Beschaffenheit und der Funktion des Havers-Systems beschäftigen (Nunamaker et al., 1998). Die meisten Frakturmodelle an der Maus zeigen eine sekundäre Frakturheilung (Hiltunen et al., 1993; Manigrasso & O'Connor, 2004). Eine Verbindung der Knochenfragmente durch einen weichen knorpelig-bindegewebigen Kallus ist bei der Maus schon nach 1-2 Wochen nachzuweisen (Manigrasso & O'Connor, 2004). In Frakturheilungsstudien an der Maus wurden bisher die Untersuchungen an Rippen, Tibia oder Femur durchgeführt (Brown et al., 2014; Cho et al., 2002; Hiltunen et al., 1993; Horikiri et al., 2013; Nakase et al., 1994; Ohta et al., 1999; Yamagiwa et al., 1999), wobei sich die Rippen nicht zur biomechanischen Testung eignen (Yamagiwa et al., 1999). Generell eignet sich das Femur der Maus aufgrund des homogenen Querschnitts besser als die Tibia, da vor allem biomechanische Untersuchungen standardisierter durchführbar sind (Cheung et al., 2003; Histing et al., 2011).

Inzwischen ist bekannt, dass die mechanischen Gegebenheiten einen entscheidenden Einfluss auf den Frakturheilungsprozess haben. Um das „mechanical environment“ besser kontrollieren zu können, wurden in den letzten Jahren für die Maus verschiedene Stabilisierungsverfahren verwendet, die sehr viel stabiler als die herkömmliche Versorgung mittels einfachem Pin sind. So konnten Verfahren, wie der Fixateur externe, die Plattenosteosynthese oder intramedulläre Verriegelungsnägel entwickelt werden, die eine standardisierte Untersuchung der Frakturheilung ermöglichen (Garcia et al., 2008a; Histing et al., 2010; Holstein et al., 2007a; Kaspar et al., 2007 und 2008; Kolln et al., 1983; Liu et al., 2013; Manassero et al., 2013; Russel et al., 2007; Schoen et al., 2007; Willie et al., 2009; Windolf et al., 2013; Wingerter et al., 2007).

Für die Frakturheilung an den langen Röhrenknochen der Maus lassen sich grundsätzlich geschlossene und offene Frakturmodelle unterscheiden. Bei den offenen Modellen muss der Knochen durch einen entsprechenden Zugang durch den Weichteilmantel freipräpariert und anschließend osteotomiert werden, während bei den geschlossenen Modellen der Knochen im Sinne einer 3-Punkt-Biegung mit einer stumpfen Guillotine frakturiert wird (Histing et al., 2011).

Zur Versorgung der Femurfraktur im Mausmodell stehen mittlerweile verschiedene standardisierte Osteosyntheseverfahren zur Verfügung. Bei den ersten geschlossenen Frakturmodellen wurden die frakturierten Mäusefemora mittels einfachen Pins (Abb.1a), wie bei Manigrasso und O'Connor (2004), stabilisiert. Dieser Pin wurde größtenteils aus einer herkömmlichen Spritzkanüle gefertigt (Manigrasso und O'Connor, 2004; Timmen et al., 2014). Dieser Pin eignet sich allerdings aufgrund einer fehlenden Rotationsstabilität nicht für standardisierte Untersuchungen (Histing et al., 2009). Um die Rotationsstabilität zu verbessern, entwickelte Holstein et al. einen Verriegelungsnagel (Abb.1b), der ebenfalls aus einer 24-gauge-Spritzkanüle besteht, welche an beiden Enden abgeflacht ist (distales Ende in 90° Drehung zum proximalen Ende), um zusätzlich eine bessere Verankerung im Markraum zu erreichen (Holstein et al., 2007a). Der Pin-Clip (Abb.1b/c) ist eine Implantatkombination aus einer rechtwinkligen Klammer und einer einfachen 24-gauge-Spritzkanüle. Die Klammer wird quer zum Knochen verlaufend offen eingebracht und sorgt so für eine zusätzliche Verriegelung und damit höhere Rotationsstabilität. Diese Osteosyntheseklammer bietet den großen Vorteil, dass die zu untersuchende Frakturspaltgröße variiert werden kann, sodass dieses Modell zur Untersuchung der Pseudarthrose geeignet ist (Garcia et al., 2008b). Mit der MouseScrew™ (Abb.1d), der intramedullären Zugschraube, kann durch das proximale Gewinde und den distalen Konus neben der Rotationsstabilität auch eine axiale Stabilität erzeugt werden (Holstein et al., 2009b). Zu den neueren Entwicklungen zählt die winkelstabile Platte (Abb.1e) die aufgrund der speziell geformten Unterfläche dem Knochen nicht direkt anliegt und mit 4 winkelstabilen Mikroschrauben am Knochen fixiert wird (Histing et al., 2009; Histing et al., 2010; Manassero et al., 2013; Matthys and Perren, 2009; Windolf et al., 2013). Zu einer weiteren Entwicklung des AO Development Institute gehört auch der MouseNail (Abb.1f), der mit einem proximalen Gewinde und zwei Löchern zum Einbringen von Verriegelungspins ausgestattet ist. Die Frakturstabilisierung durch einen Fixateur externe (Abb.1g) und anschließender Osteotomie, als offenes Frakturmodell, wurde bereits durch Cheung et al. publiziert. Die Stabilisierung erfolgt durch einen Fixateur-Block und 4 Mini-Schanz-Schrauben. Genauso wie bei der Stabilisierung mit dem Pin-Clip bietet der Fixateur den Vorteil, dass die Größe des Osteotomiespaltes variierbar ist. Nachteilig

ist jedoch das Gewicht und zum anderen die mögliche Behinderung des physiologischen Bewegungsablaufes der Mäuse (Cheung et al., 2003). Der Fixateur externe bietet ebenfalls eine hohe Rotationsstabilität (Histing et al., 2009).

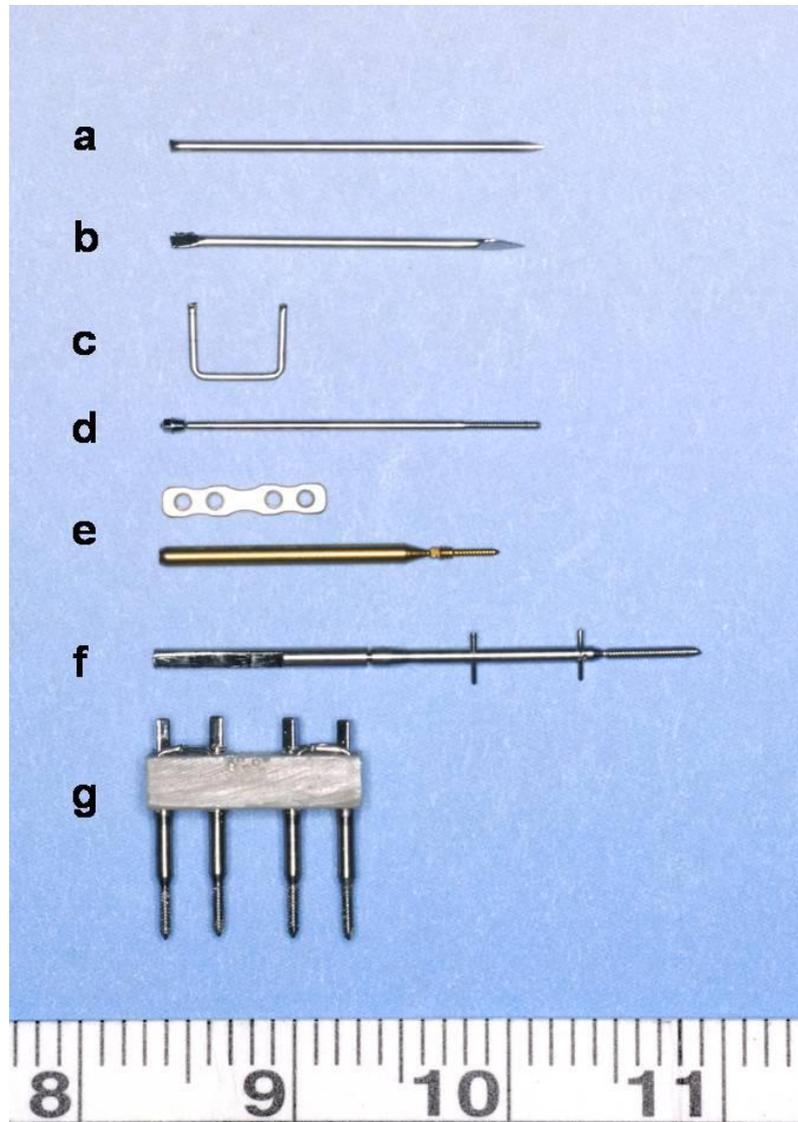


Abb. 1: Implantate zur Frakturstabilisierung am Mausfemur. (a) konventioneller intramedullärer Pin - herkömmliche 24-gauge Spritzkanüle, (b) intramedullärer Verriegelungsnagel - bds. abgeflachte 24-G-Kanüle, (c) Pin-Clip - Implantatkombination aus dist. abgeflachtem Pin mit einer extramedullären rechtwinkligen Klammer, (d) MouseScrewTM - intramedulläre Zugschraube mit distalem konischem Schraubenkopf und proximalem Gewinde, (e) winkelstabile 4-Loch Platte mit Mikroschrauben, (f) Mouse Nail - mit einem proximalen Gewinde und 2 Löchern zur Verriegelung mittels zweier Pins, (g) Fixateur externe - Fixateurblock mit 4 Mini-Schanz-Schrauben.

2.5 Sildenafil

Sildenafil (Viagra®, Pfizer, Deutschland) wurde erstmals 1998 zur Behandlung der erektilen Dysfunktion (Erektionsstörungen) eingesetzt (Cheitlin et al., 1999; Corbin et al., 1999; Shinlapawittayatorn et al., 2005). Seit 2006 ist Sildenafil zusätzlich unter dem Namen Revatio® zur Behandlung der idiopathischen pulmonalen arteriellen Hypertonie (PAH) auf dem Markt.

2.5.1 Historie

Der Wirkstoff Sildenafil wurde von einer Gruppe pharmazeutischer Chemiker der Firma Pfizer in England entwickelt. Ursprünglich wurde es für den Gebrauch bei Patienten mit Hypertonie und bei Patienten mit Angina pectoris Beschwerden untersucht. Im Morrison Hospital in Swansea wurden die ersten klinischen Versuche mit Sildenafil durchgeführt. Bei der Phase 1 der klinischen Untersuchungen stellte sich heraus, dass Sildenafil nur einen leichten Effekt auf die Angina pectoris Beschwerden zeigte, allerdings bei den Patienten eine merkliche Erektion hervorrief (Boolell et al., 1996a und b; Corbin et al., 1999; Terrett et al., 1996). So wurde Sildenafil von der Firma Pfizer schließlich unter dem Markennamen Viagra® zur Therapie der erektilen Dysfunktion auf den Markt gebracht (Cheitlin et al., 1999; Corbin et al., 1999; Shinlapawittayatorn et al., 2005).

2.5.2 Struktur

Sildenafil 1-[4-ethoxy-3-(6,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)phenylsulphonyl]-4-methyl piperazine ist ein potenter selektiver Hemmstoff der cGMP-spezifischen Phosphodiesterase vom Typ 5 (PDE5) mit der Summenformel C₂₂H₃₀N₆O₄S (Hyland et al., 2001; Yathirajan et al., 2005).

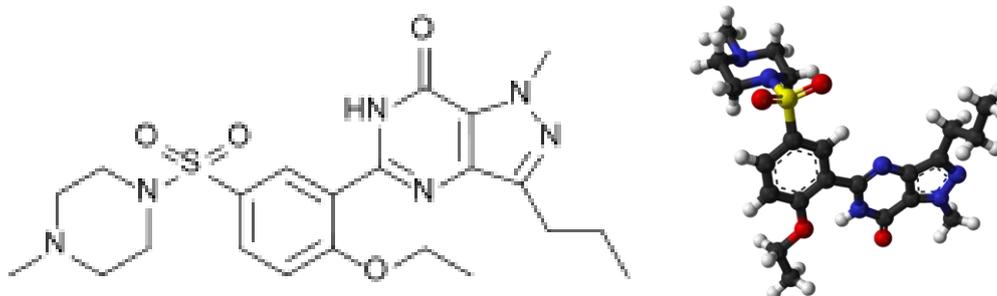


Abb. 2: Strukturformel von Sildenafil (Kukreja et al., 2004; Yathirajan et al., 2005).

2.5.3 Anwendungsgebiete

Sildenafil hat zwei große Behandlungsgebiete:

- Behandlung von Männern mit erektiler Dysfunktion (Boolell et al., 1996a und b; Goldstein et al., 1998; Ghofrani et al., 2006).
- Behandlung von Patienten mit pulmonaler arterieller Hypertonie (PAH) der WHO-Funktionsklasse III zur Verbesserung der körperlichen Leistungsfähigkeit (Galiè et al., 2005).

Auch konnten einige Studien zeigen, dass Sildenafil erfolgreich zur Behandlung von Komplikationen der progressiven systemischen Sklerodermie, wie dem sekundären Raynaud-Syndrom und der damit verbundenen akralen Ulzera, eingesetzt werden konnte (Colglazier et al., 2005; Kamata et al., 2005; Rosenkranz et al., 2004).

Über diese Einsatzgebiete hinaus wird auch eine kardioprotektive Wirkung des Sildenafils diskutiert. Ferreira-Melo et al. konnte in einer Studie zur Myokardischämie im Rattenmodell zeigen, dass Sildenafil über die Inhibition der PDE5 die Bioverfügbarkeit von cGMP erhöht, was zu einer Hochregulation der Aktivität anderer PDEs führen kann (Ferreira-Melo et al., 2006). cGMP führt auch dazu, dass endogene Mediatoren, wie Bradykinin oder Adenosin, freigesetzt werden, was über Signalkaskaden in den Myozyten zu einer Phosphorylation von NOS (eNOS/iNOS) und einer damit verbundenen Freisetzung von NO führt (Kukreja et al., 2004). Über diesen Mechanismus kann Sildenafil die Gesamtfläche von myokardialen Läsionen, im Sinne von nekrotischen und/oder fibrotischen Geweben, reduzieren (Ferreira-Melo et al., 2006).

2.5.4 Wirkmechanismus

Sildenafil ist ein sehr selektiv wirksamer Inhibitor der cGMP-spezifischen Phosphodiesterase vom Typ5 (PDE5). Das Enzym PDE5 gehört zu der Gruppe der Phosphodiesterasen (PDE). Diese sind für den Abbau von intrazellulären Botenstoffen (second messenger), wie dem zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) und dem zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) zuständig (Cheitlin et al., 1999). Die Phosphodiesterasen bzw. das cyclic adenosine monophosphate (cAMP) wurde von Sutherland et al. 1958 entdeckt, dem folgte ca. fünf Jahre später die Entdeckung des zweiten second messenger cGMP durch die Arbeit von Ashman et al., bei der ebenfalls gezeigt wurde, dass die PDE in der Lage ist, das cAMP zu inaktivieren (Ashman et al., 1963; Boswell-Smith et al., 2006; Sutherland et al., 1958). Die PDEs werden in zwei Hauptklassen eingeteilt (Charbonneau et al., 1990). In die Klasse I sind alle bei Säugetieren entdeckten Phos-

phodiesterasen eingeschlossen, welche durch unterschiedliche Gene exprimiert werden und mittlerweile in elf verschiedene Subtypen unterteilt werden, von denen über 50 Isoformen identifiziert wurden (Beavo et al., 1995; Corbin et al., 2004; Fawcett et al., 2000; Fisher et al., 1998; Soderling et al., 1998; Wallace et al., 2005).

Während einige der PDEs, wie z.B. die PDE 11, den Abbau beider second messenger katalysieren können, sind die PDE4 und die PDE7 zum Beispiel selektive Katalysatoren des Abbaus für cAMP. Andere der Phosphodiesterasen sind nur in der Lage selektiv cGMP abzubauen, so die PDE 5 (Boswell-Smith et al., 2006; Corbin et al., 2004). Die Phosphodiesterase 5, als im Zytosol lokalisiertes Isoenzym der Phosphodiesterase-Familie wurde zuerst aus Ratten-Thrombozyten isoliert und im weiteren Verlauf charakterisiert (Hamet und Coquil, 1978). Mittlerweile konnte die PDE5 nicht nur in Thrombozyten, sondern auch in verschiedenen Organen nachgewiesen werden. Sie wird im Corpus Cavernosum des Penis gefunden und in hoher Anzahl in der glatten Muskulatur der Blutgefäße exprimiert. Ebenso ist ihre Expression im Lungengewebe, der Trachea, dem Herzen und im Kleinhirn zu finden (Ghofrani et al., 2006; Omori und Kotera, 2007; Sanchez et al., 1998; Takimoto et al., 2007; Yanaka et al., 1998).

cGMP wird als second messenger von dem endothelialen Relaxationsfaktor Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert. NO wird durch das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) aus Sauerstoff und der Aminosäure L-Arginin synthetisiert. Über neuronale Signalwege wird bei sexueller Erregung das Stickstoffmonoxid durch endotheliale Zellen und Nerven freigesetzt und dringt in die Zellen der glatten Muskulatur der Gefäße, um dort an die Guanosin-Cyclase zu binden. Die Cyclase ändert durch die Bindung des NO ihre Konformation und katalysiert die Bildung von 3'-5'-cGMP aus dem GTP (Guanosin-5'-Triphosphat). Proteinkinasen werden durch das cGMP aktiviert und es entsteht eine reduzierte intrazelluläre Calciumkonzentration, die verantwortlich ist für die arterielle und trabekuläre Relaxation der glatten Muskulatur. So kommt es zur arteriellen Dilatation, ebenso wie zur venösen Konstriktion. Das cGMP wird schließlich durch die PDE5 wieder abgebaut (Corbin et al., 2004).

Sildenafil hemmt die PDE5, indem es mit dem cGMP um die Bindungsplätze an der Phosphodiesterase konkurriert und somit das cGMP nicht abgebaut wird und der Spiegel steigt (Corbin et al., 2004). Ohne die Aktivierung des Signalweges durch Stickstoffmonoxid ist die Wirkung von Phosphodiesterasehemmern eigentlich nicht effektiv, allerdings konnte in einer Studie am isolierten Corpus Cavernosum gezeigt werden, dass Sildenafil auch in Abwesenheit von NO einen schwachen Effekt auf die Relaxation von glatten Muskelzellen hatte (Chuang et al., 1998).

2.5.5 Pharmakokinetik

Sildenafil ist in der Darreichungsform als Filmtabletten in verschiedenen Dosierungen zur oralen Einnahme erhältlich. Die Resorption von Sildenafil geschieht rasch. Innerhalb von 30-120 Minuten (Mittel: 60 Minuten) nach oraler Einnahme im nüchternen Zustand wird der maximale Plasmaspiegel erreicht (Cheitlin et al., 1999). Die mittlere absolute orale Bioverfügbarkeit beträgt ca. 40 % bei einer hohen Plasmaeiweißbindung (96 %) (Ceithlin et al., 1999; Muirhead et al., 2002). Nach oraler Einnahme von Sildenafil nehmen AUC und C_{\max} dosisproportional über den empfohlenen Dosisbereich (25 bis 100mg) zu. Wenn Sildenafil zusammen mit einer Mahlzeit eingenommen wird, reduziert sich die Resorptionsrate. Dabei verzögert sich t_{\max} ca. um 60 Minuten während C_{\max} im Mittel um 29 % verringert wird (Nichols et al., 2002).

Sildenafil hat im steady state ein mittleres Verteilungsvolumen von 105 l, was für eine Verteilung in die Gewebe spricht (Cheitlin et al., 1999). Sildenafil und ebenso sein wichtigster im Blutkreislauf zirkulierender N-desmethylierter Metabolit sind zu 96 % an Plasmaproteine gebunden, in erster Linie an Albumin, und ca. 4 % frei gelöst (Cheitlin et al., 1999; Francis & Corbin, 2005; Muirhead et al., 2002). Diese Proteinbindung ist unabhängig von der Gesamtkonzentration des Sildenafil. Bei einer oralen Einmalgabe von 100mg beträgt die mittlere maximale Gesamt-Plasmakonzentration von Sildenafil ca. 450ng/ml (Francis & Corbin, 2005). Daraus ergibt sich eine mittlere maximale freie Sildenafil-Plasmakonzentration von 18 ng/ml. Im Ejakulat von gesunden Probanden wurde nach Gabe von 100 mg Sildenafil als Einzeldosis weniger als 0,0002 % (im Mittel 188 ng) der verabreichten Menge nach 90 Minuten gefunden (Cheitlin et al., 1999).

Die Metabolisierung des Sildenafil erfolgt überwiegend hepatisch über die mikrosomale Cytochrom-450 Isoenzyme CYP3A4 und CYP2C9 (Ceithlin et al., 1999; Hyland et al., 2001). Aus einer N-Demethylierung des Sildenafil entsteht der wichtigste zirkulierende Metabolit, der eine ähnliche Phosphodiesterase-Selektivität wie das Sildenafil aufweist (Cheitlin et al., 1999). In vitro beträgt diese Hemmwirkung auf die PDE5 50 % der des Sildenafil. Die Plasmaspiegel von dem aus der N-Demethylierung resultierendem Metabolit betragen rund 40 % der für Sildenafil beobachteten Werte (Ceithlin et al., 1999; Hyland et al., 2001). Der N-Demethyl-Metabolit wird weiter verstoffwechselt und die terminale Halbwertszeit beträgt rund 4 Stunden (Cheitlin et al., 1999).

Sildenafil wird nach Metabolisierung hauptsächlich, d.h. rund 80 % der oral verabreichten Dosis, über die Fäzes und nur zu ca. 13 % der eingenommenen Dosis, über die Nie-

ren ausgeschieden. Die gesamte Clearance von Sildenafil beträgt 41l/h mit einer daraus resultierenden Plasmahalbwertszeit von 3 bis 5 Stunden (Cheitlin et al., 1999).

Die Pharmakokinetik von Sildenafil ist bei älteren Patienten, bei Patienten mit Nierenfunktionsstörungen, ebenso wie bei Patienten mit Leberstörungen verändert (Cheitlin et al., 1999).

Sildenafil zeigt im Vergleich von Mensch und Nager ein annähernd äquivalentes Verteilungsvolumen. Im Nager konnte allerdings eine im Vergleich zum Menschen und zum Hund höhere Clearance beobachtet werden, aus der eine kürzere Halbwertszeit von Sildenafil im Nager resultiert (Walker et al., 1999).

2.5.6 Nebenwirkungen

Die Nebenwirkungen, die durch die Einnahme von Sildenafil auftreten können, wurden in Plazebo-kontrollierten klinischen Studien ermittelt. Kopfschmerzen und Gesichtsrötung (Flush) gehören zu denen am häufigsten beobachteten Nebenwirkungen (Corbin & Francis, 1999; Ghofrani et al., 2006). Seltener traten Verdauungsstörungen (Dyspepsie), Schwindel, verstopfte Nase, Sehstörungen wie erhöhte Lichtempfindlichkeit und/oder unscharfes Sehen sowie zumeist leicht und vorübergehende Veränderungen des Farbsehens (Chromatopsie) und auch Herzklopfen (Palpitationen) auf (Corbin & Francis, 1999; Ghofrani et al., 2006). Das Auftreten von Schwindelgefühl, Hypotonie, Kopfschmerzen und Rhinitis lassen sich teilweise aufgrund einer Gefäßerweiterung durch die Wirkung von Sildenafil erklären (Oliver et al., 2006). Die Störungen des Farbsehens, sowie die Wirkung auf das Helligkeitsempfinden und den Visus werden durch eine gleichzeitige Hemmung der PDE6, die sich in den Photorezeptoren der Retina findet, bedingt (Bender und Beavo, 2006). Dies ist möglich, da die Affinität von Sildenafil zu der PDE5 lediglich 10fach höher ist als zur PDE6 (Cheitlin et al., 1999). Mittleman et al. konnten in einer Studie zeigen, dass die Einnahme von Sildenafil nicht mit einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkt oder Tod durch kardiovaskuläre Genese assoziiert ist (Mittleman et al., 2003).

2.6 Zielsetzung der Studie

Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, inwieweit die Behandlung mit Sildenafil die Frakturheilung im Tiermodell beeinflusst.

2.7 Fragestellung

Die Nullhypothese lautet:

“Die Frakturheilung wird durch die Behandlung mit Sildenafil nicht beeinflusst”.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchsaufbau

3.1.1 Versuchsprotokoll

Für die tierexperimentellen Untersuchungen wurden insgesamt 50 Mäuse verwendet. Es wurden zwei Versuchsgruppen mit jeweils 25 Tieren pro Gruppe gebildet:

- 1. Gruppe (n=25) ⇒ tgl. orale Gabe von 5 mg/kg KG Sildenafil (Sildenafil)
- 2. Gruppe (n=25) ⇒ tgl. orale Gabe einer entsprechenden Menge 0,9 % NaCl-Lösung (Kontrolle)

In beiden Gruppen wurden jeweils 10 Tiere nach einer Standzeit von 2 und 5 Wochen zur radiologischen, biomechanischen und histomorphologischen Untersuchung verwendet, wobei diese am selben Tier durchgeführt wurden (Tab. 1). Für die proteinbiochemische Auswertung wurden jeweils 5 Tiere/Gruppe bei einer Standzeit von 2 Wochen herangezogen. Auf eine proteinbiochemische Untersuchung nach 5 Wochen Standzeit wurde verzichtet, da aufgrund des bereits begonnenen Remodelingprozesses nicht genügend Kallusgewebe für weitere Auswertungen gewonnen werden konnte (Tab. 1).

	Sildenafil		Kontrolle	
	2 Wo	5 Wo	2 Wo	5 Wo
Radiologie	n=10	n=10	n=10	n=10
Biomechanik	n=10	n=10	n=10	n=10
Histologie	n=10	n=10	n=10	n=10
Western-Blot	n= 5	-	n= 5	-

Tab. 1: Versuchsprotokoll: Anzahl der verwendeten Tiere.

Die Tierversuche mit der Versuchs-Nr. 37/07 wurden von der entsprechenden Behörde (Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittel- und Veterinärwesen - Zentralstelle, Konrad-Zuse-Straße 11, 66115 Saarbrücken) genehmigt und am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes durchgeführt.

3.1.2 Tiermodell

In dieser Studie wurden ausgewachsene, 12-14 Wochen alte CD1-Mäuse verwendet. Das Gewicht der Tiere betrug durchschnittlich $28,2 \text{ g} \pm 0,2$.

Die Mäuse wurden in Käfigen mit einer maximalen Anzahl von 5 Mäusen in der Tierhaltung des Institutes für Klinisch-Experimentelle Chirurgie gehalten. Die Mäuse wurden mit Wasser ad libitum sowie mit Standarddiätfutter der Firma Altromin 1320, Altromin, Deutschland in Pelletform gefüttert und in klimatisierten Räumen (Lufttemperatur: 22-24°C, relative Luftfeuchtigkeit 60 %) bei einem 12-stündigen Tag-/Nachtrhythmus untergebracht.

3.2 Materialien

3.2.1 Implantat

Die Schraube (MouseScrewTM, RISystem AG, Davos, Schweiz), die in Zusammenarbeit mit dem AO Entwicklungsinstitut (Davos, Schweiz) entwickelt wurde, ist aus medizinischem Stahl gefertigt. Die Schraube ist 18 mm lang und hat einen Durchmesser von 0,5 mm. Sie besitzt distal zur Verankerung in den Femurkondylen einen konischen Schraubenkopf ($\varnothing = 0,8 \text{ mm}$) und proximal zur Frakturspaltkompression ein Gewinde ($\varnothing = 0,5 \text{ mm}$; L 4,0 mm). Am proximalen Gewindeende ist die Schraube kanüliert ($\varnothing = 0,2 \text{ mm}$; L 1,0 mm), um das Einbringen über einen Wolfram-Führungsdraht ($\varnothing = 0,2 \text{ mm}$) (Goodfellow, Friedberg, Deutschland) zu ermöglichen (Abb. 3). Zum Eindrehen der Schraube in das Femur wurde ein entsprechendes Eindrehinstrumentarium verwendet (RISystem AG, AO Foundation, Davos, Schweiz), (Abb. 3). Bei einem definierten Drehmoment bricht die Schraube im Bereich der Sollbruchstelle distal des Konus (Abb. 3).

3.2.2 Guillotine

Zur Frakturierung des Femurs wurde eine Guillotine-ähnliche Dreipunktvorrichtung verwendet (Abb. 4). Diese Vorrichtung besteht aus einem Stempel, unter dem das Femur platziert wurde (Abb. 4). Das Fallgewicht betrug 80 g.

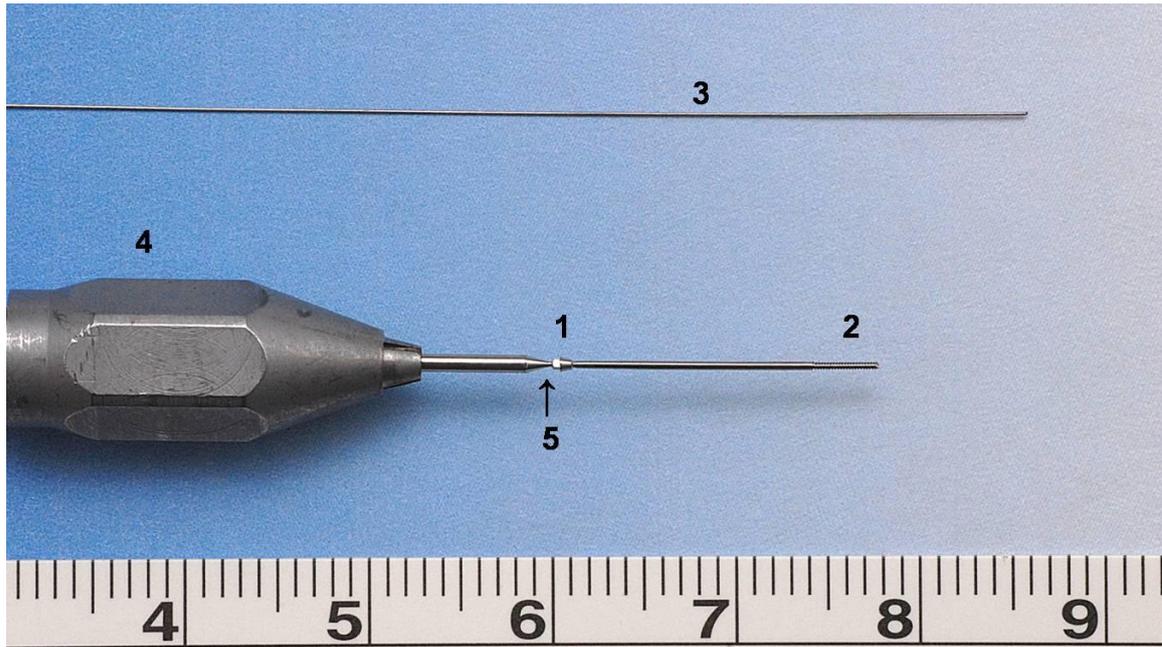


Abb. 3: Intramedulläre Zugschraube (MouseScrewTM) mit distalem konischem Schraubenkopf (1) und proximalem Gewinde (2) und Sollbruchstelle (5). Wolfram-Führungsdraht (3) und Schraubendreher (4).



Abb. 4: Guillotine-ähnliche Dreipunktbiegeapparatur zur Frakturierung der Femora. Stempel (1), Fallgewicht (2) und Führungsstange (3).

3.3 Versuchsdurchführung

3.3.1 Narkotisierung

Die Tiere wurden mittels intraperitonealer Injektion von 75 mg/kg KG Ketamin (Ketavet®, Pharmacia, Erlangen, Deutschland) und 25 mg/kg KG Xylazin 2 % (Rompun®, Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland) narkotisiert.



Abb. 5: Intraperitoneale Gabe des Narkosemittels.

3.3.2 Operationstechnik

Nach Narkotisierung wurde den Tieren Dexpanthenol-Salbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) auf die Hornhaut aufgetragen. Die rechte Extremität wurde entsprechend rasiert und mit Softasept® N (B Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert und in Flexion fixiert (Abb. 6).

Anschließend wurde über einen ca. 5 mm langen medialen parapatellaren Hautschnitt (Abb. 7) die Patella dargestellt und nach vorsichtiger Mobilisation nach lateral luxiert (Abb. 8). Für die Hautinzision und die weitere Gewebepreparation wurde eine sterile Skalpellklinge (Carbon Steel Skalpellklingen #15, Aesculap AG et Co. KG, B Braun Melsungen AG, Tuttlingen, Deutschland) verwendet.

Zur Markraumaufbohrung des Femurs wurde zunächst mit einer 24-gauge Injektionskanüle (0,55 x 25 mm, 24G x 1", BD Mikrolance™, BD, NJ, USA) im Bereich der Femurkondylen der Knochen eröffnet (Abb. 9, 10).

Anschließend wurde vor Einbringen des Führungsdrahtes der Markraum mit einer Dentalkanüle (Sterican® 0.40 x 40 mm 27G x 1 ½“, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) vollständig durchbohrt und die Kanüle im Bereich des Trochanter major perkutan ausgeleitet (Abb. 11).

Der Wolfram-Führungsdraht ($\varnothing = 0,2$ mm) konnte dann über die Kanüle eingefädelt werden. Die Nadel wurde vollständig entfernt. Der Wolfram-Draht verblieb im Markraum des Femurs (Abb. 12).

Im Anschluss erfolgte die Frakturierung des Femurs mittels Guillotine im Sinne einer 3-Punkt-Biegung (Abb. 13). Nach der Frakturierung wurde zur Lagekontrolle des Drahtes sowie zur Darstellung der Fraktur das Femur geröntgt (Abb. 14).

Die Schraube wurde nun über den Führungsdraht von distal eingebracht (Abb.15). Nach fester Verankerung der Schraube brach die Schraube an der Sollbruchstelle ab (Abb. 16). Implantatlage und Fraktur wurden postoperativ radiologisch kontrolliert (Abb. 17).

Anschließend erfolgte die Reposition der Patella und Verschluss der Gelenkkapsel mittels Naht (Abb. 18). Der Wundverschluss wurde mit 3-4 Einzelknopfnähten durchgeführt (Abb. 19). (Ethicon Prolene™ 5-0, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland).



Abb. 6: Beinfixierung bei der Operation.

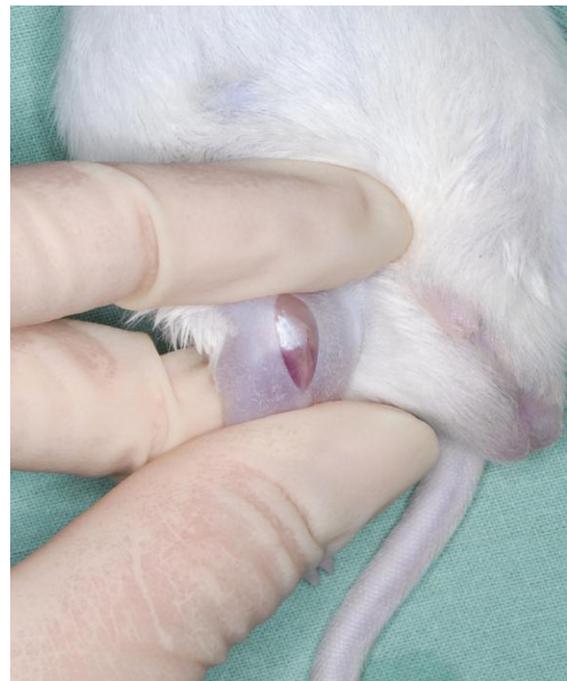


Abb 7: Blick auf das Lig. patellae nach medio-patellarem Hautschnitt.



Abb. 8: Luxation der Patella nach lateral und Sicht auf die Fossa intercondylaris.

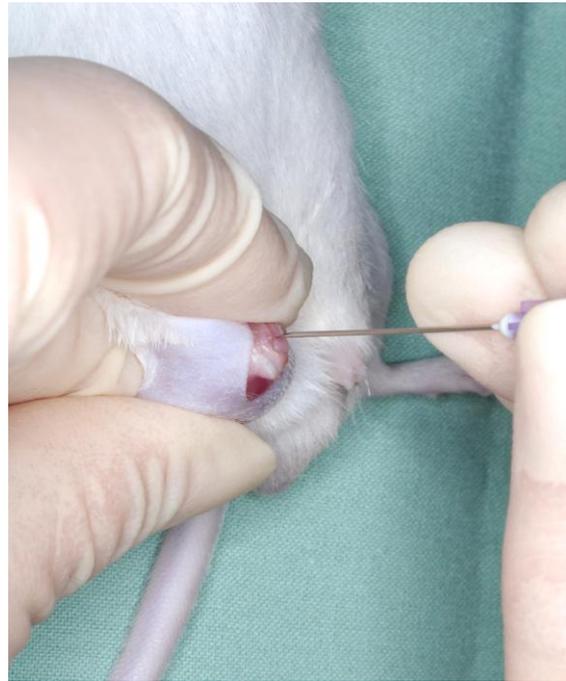


Abb. 9: Markraumeröffnung im Bereich der Femurkondylen mit Hilfe einer Kanüle.



Abb. 10: Markraumaufbohrung mittels Kanüle.

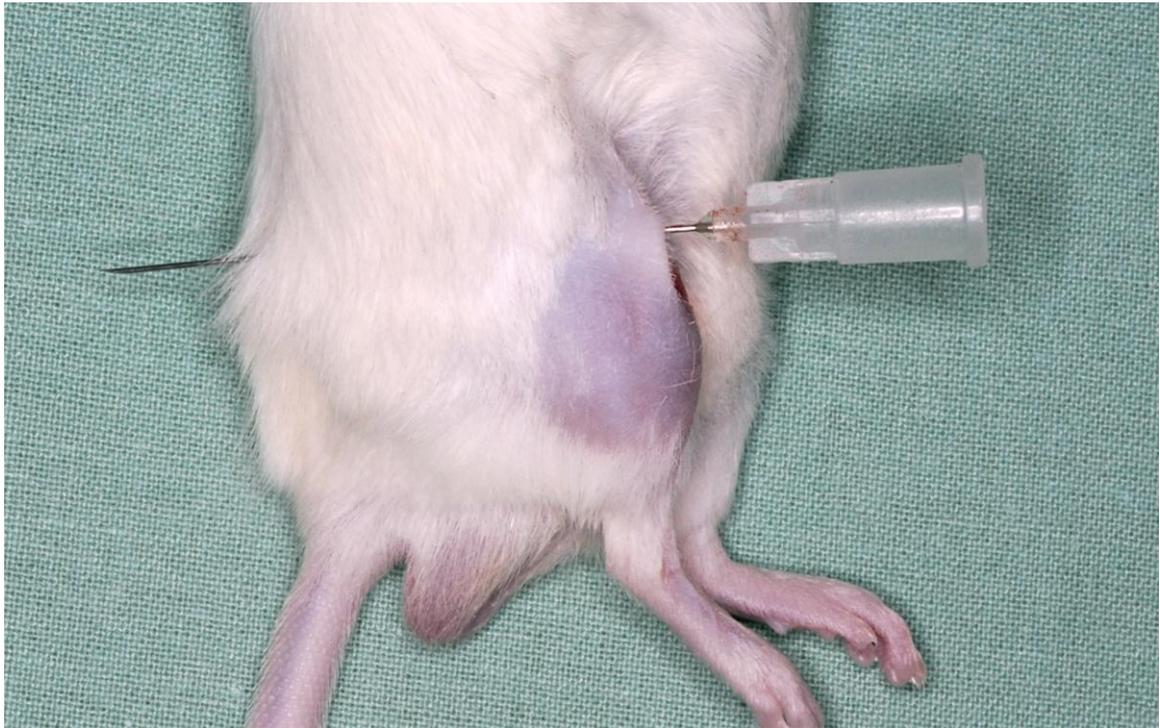


Abb. 11: *Eingebrachte Dental-Kanüle.*



Abb. 12: *Eingebrachter Wolfram-Führungsdraht.*



Abb. 13: Positionierung des Beines in der Guillotine.



Abb. 14: Intraoperative Röntgenkontrolle des frakturierten Femur mit einliegendem Wolfram-Führungsdraht.

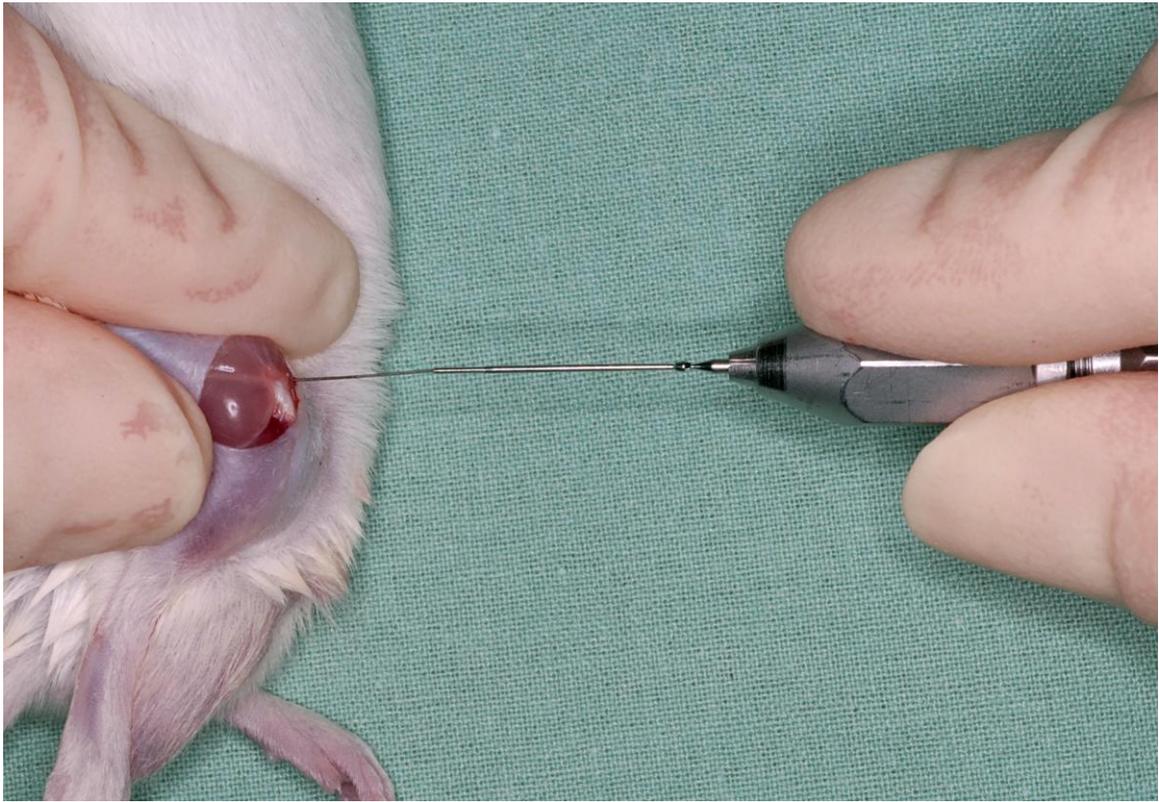


Abb. 15: Einbringung der Zugschraube in das Femur über den einliegenden Wolfram-Führungsdraht.



Abb. 16: Sicht auf die Femurkondylen nach Einbringung der intramedullären Zugschraube.



Abb. 17: Röntgenkontrolle postoperativ.



Abb. 18: Kapselnaht.



Abb. 19: Wundverschluss.

3.3.3 Schmerzmittel

Zur Schmerztherapie erhielten die Mäuse intraoperativ, sowie am 1. Tag postoperativ je 0,25 mg Carprofen (Rimadyl*, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) subkutan in die Nackenfalte.

3.3.4 Medikamentenapplikation

Im weiteren Verlauf erhielten die Tiere je nach Gruppenzugehörigkeit eine tägliche Dosis von 5 mg/kg KG Sildenafil oder eine entsprechende Menge NaCl-Lösung (Kontroll-Gruppe).

Die tägliche orale Applikation von Sildenafil bzw. die entsprechende Menge NaCl-Lösung wurde mit Hilfe einer Knopfkanüle (\varnothing 1,2 mm, Länge 60 mm, Bohrung Luer-Lock, Spitenolive B, ACUFIRM, Ernst Kratz GmbH, Dreieich, Deutschland) durchgeführt (Abb. 20, 21).



Abb. 20: Knopfkanüle.



Abb. 21: Durchführen der oralen Medikamentenapplikation.

3.3.5 Tötung der Tiere

Die Mäuse wurden nach entsprechender Standzeit von 2 bzw. 5 Wochen nach erneuter Narkotisierung mittels Genickbruch getötet.

3.3.6 Explantation und Präparation der Knochen

Nach der Tötung der Versuchstiere wurden beide Femora explantiert. Dafür wurden die Mäuse auf dem Bauch gelagert. Nach einem Hautschnitt wurden die Muskeln und Bandstrukturen abgelöst und das Femur im Kniegelenk und Hüftgelenk luxiert. Nach weiterer Präparation nach proximal wurde der Hüftkopf aus der Hüftpfanne luxiert. Anschließend wurde die Zugschraube entfernt. Während der Explantation wurden die Knochen ständig mit NaCl-Lösung befeuchtet, um das Austrocknen der Knochen zu vermeiden (Abb. 22).



Abb. 22: *Explantiertes rechtes Femur nach zweiwöchiger Frakturheilung*

3.4 Auswertungsverfahren und Messgrößen

3.4.1 Radiologie

Nach einer Standzeit von 2 bzw. 5 Wochen wurden die Tiere getötet und es erfolgte eine Röntgenkontrolle (Abb. 23, 24).



Abb. 23: Röntgenbild des Femurs 2 Wochen postoperativ.



Abb. 24: Röntgenbild des Femurs 5 Wochen postoperativ.

Die radiologische Auswertung mittels Goldberg-Score erfolgte nach Explantation der Femora und Entfernung des Implantats (Abb. 25, 26).



Abb. 25: Explantierte Femora (frakturierter und kontralateraler Knochen) nach einer Standzeit von 2 Wochen.

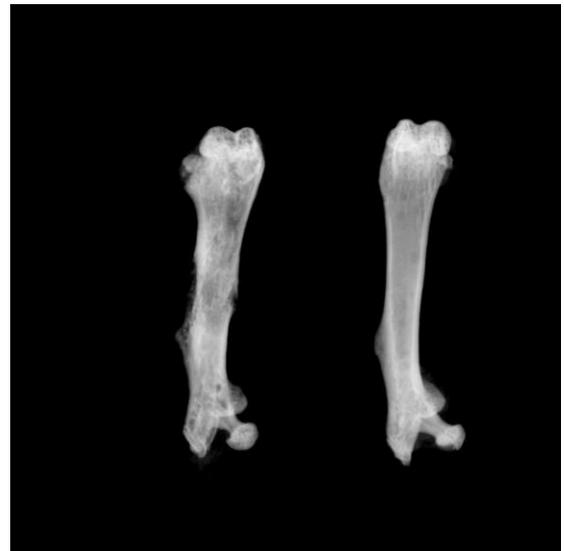


Abb. 26: Explantierte Femora (frakturierter und kontralateraler Knochen) nach einer Standzeit von 5 Wochen.

Die Röntgenaufnahmen wurden mit einem speziellen Röntgengerät der Firma Faxitron durchgeführt (MX-20 Radiographie System, der Faxitron X-Ray Corporation, Illinois, USA). Die Belichtungszeit betrug 10 s, die Spannung 26 kV.

Die digitalisierten Röntgenbilder wurden anschließend mit Hilfe eines Bildauswertungsprogrammes (Image J, Wayne Rasband, Bethesda, Maryland, USA) ausgewertet.

Die knöcherne Durchbauung des Frakturspaltes wurde mit dem Goldberg-Score beurteilt (Goldberg et al., 1985). Dazu wurden 0-2 Punkte vergeben:

- keine knöcherne Durchbauung des Frakturspaltes: 0 Punkte
- partielle knöcherne Durchbauung des Frakturspaltes: 1 Punkt
- komplette knöcherne Durchbauung des Frakturspaltes: 2 Punkte

3.4.2 Biomechanik

Die biomechanische Analyse wurde mit einer Prüfmaschine (Mini-Zwick Z 2.5, Zwick GmbH, Ulm, Deutschland) als 3-Punkt-Biegungstestung zerstörungsfrei durchgeführt (Abb. 28). Um individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstieren zu berücksichtigen, wurde die Biegesteifigkeit sowohl in Absolutwerten [N/mm], als auch in Prozent zu den kontralateralen gesunden Knochen angegeben.

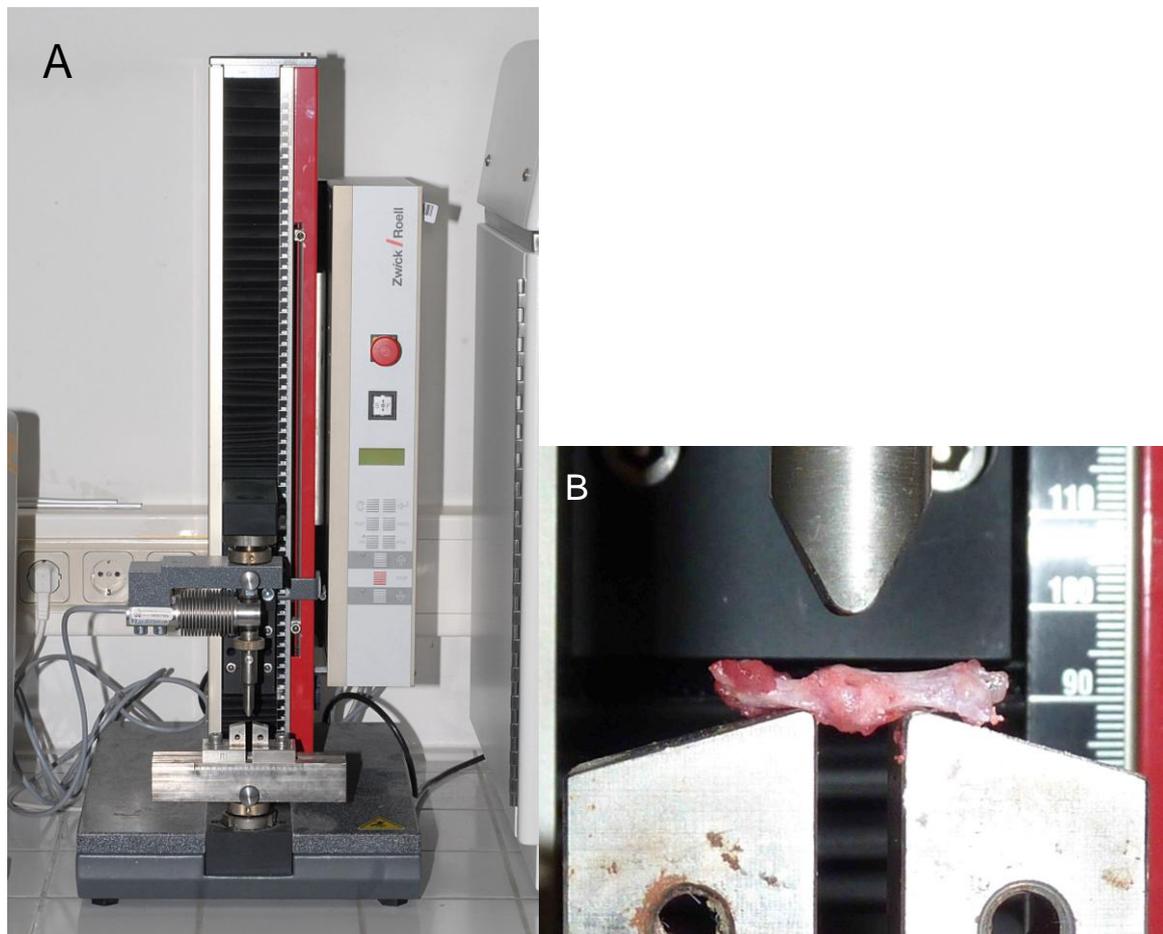


Abb. 28: Apparatur zur 3-Punkt-Biegungstestung (A) und Auflagestempel mit Femora (B) (Mini-Zwick Z 2.5, Zwick GmbH, Ulm, Deutschland).

Um standardisierte Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurden die Femora jeweils mit der ventralen Seite nach unten in der Prüfvorrichtung positioniert. Der Abstand der beiden Stempel betrug 6 mm (Abb. 28 B). Anschließend wurde die Messung mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1 mm/min durchgeführt.

Folgende biomechanischen Parameter wurden ermittelt:

- Kraft [N]
- Weg [mm]

Anhand des Kraft-Weg-Diagramms (Abb. 29) wurde die Biegesteifigkeit als Absolutwert [N/mm] und in Prozent zum kontralateralen Knochen [%] errechnet. Die Biegesteifigkeit wurde im linearen Anteil des Kraft-Weg-Diagramms bestimmt.

Die biomechanische Prüfung wurde jeweils vor einem Bruch des Knochens, d.h. bei einer Abweichung der Linearität der Kurve des Kraft-Weg-Diagramms um 1 %, abgebrochen (Schoen et al., 2008).

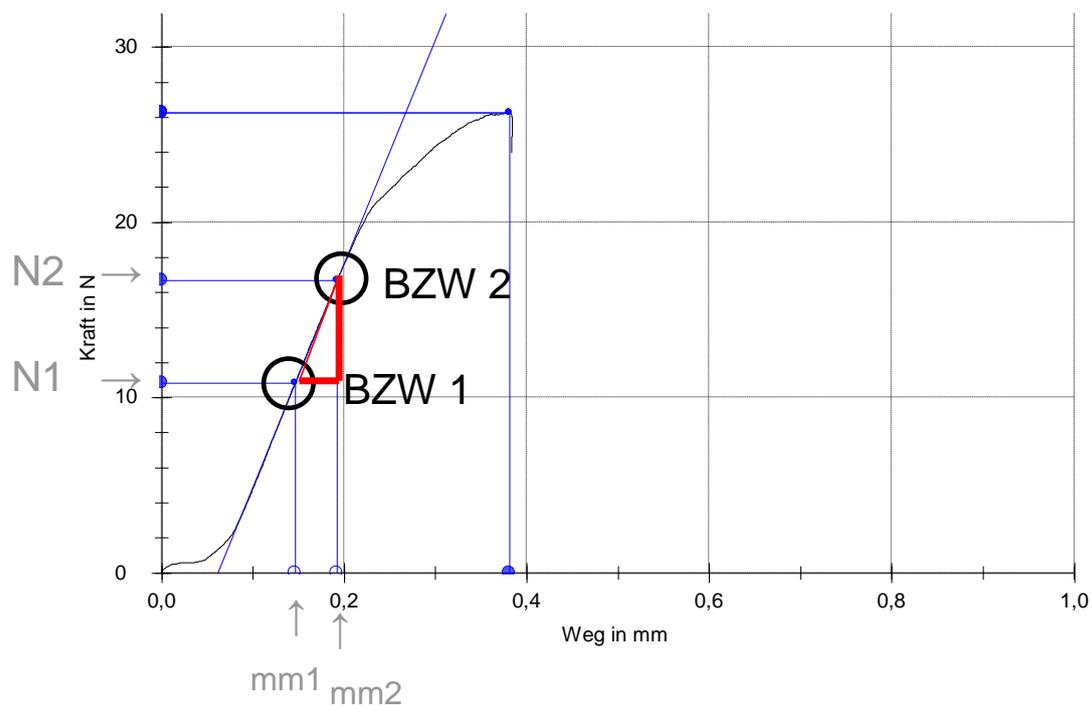


Abb. 29: Kraft-Weg Diagramm zur Ermittlung der Biegesteifigkeit mit den jeweiligen Bezugspunkten und eingezeichnetem Steigungsdreieck.

3.4.3 Histologie

3.4.3.1 Histomorphometrie

Für die histologische Auswertung wurden die Knochen nach der biomechanischen Testung zunächst für 24 Stunden in ICH Zinc Fixative (BD PharmingenTM, San Diego, CA, USA) fixiert und im Anschluss für 14 Tage in 13 % Ethylendiaminetetraessigsäure-Lösung (EDTA-Lösung) bei 4 °C entkalkt. Nach anschließender Einbettung in Paraffin wurden sagittal-longitudinale Schnitte im Bereich des maximalen Kallusdurchmessers mit einer Dicke von 5 µm angefertigt. Zur Visualisierung der unterschiedlichen Gewebeszusammensetzung wurden die Schnitte anschließend nach der Trichrome Masson-Goldner-Methode angefärbt.

Bei dieser Methode werden die Präparate zunächst zur Kernfärbung in Weigerts Eisenhämatoxylin für 1-2 Minuten eingelegt und anschließend für ca. 10-15 Minuten unter fließendem Wasser gespült. Bestandteile wie Muskulatur, Zytoplasma und Erythrozyten werden mit Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin (Goldner-Lösung I) für 5-10 Minuten gefärbt und mit 1 %iger Essigsäure gespült. Zur vollständigen Entfärbung des Bindegewebes werden die Schnitte mit Goldner-Lösung II (Orange G) behandelt und wieder mit Essigsäure (1 %ig) gespült. Das Bindegewebe wird anschließend mit der Goldner-Lösung III (Lichtgrün SF-Lösung) ca. 5 Minuten lang gegengefärbt. Abschließend erfolgt nochmaliges Auswaschen mit 1 %iger Essigsäure für 5 Minuten, sowie eine Entwässerung mit Ethanol und Eindeckung durch Xylol mit Xylol-Kitt II (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland).

Das Färbeergebnis zeigt:

- Zellkerne - dunkelbraun bis schwarz
- Zytoplasma, Muskulatur - ziegelrot
- Bindegewebe - grün
- Erythrozyten - leuchtend orange-rot

Die Schnitte wurden bei einer 1,25 fachen Vergrößerung mit einem Mikroskop (Olympus BX60 Microscope, Olympus, Tokio, Japan; Zeiss Axio Cam und Axio Vision 3.1, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) digitalisiert (Abb.30).

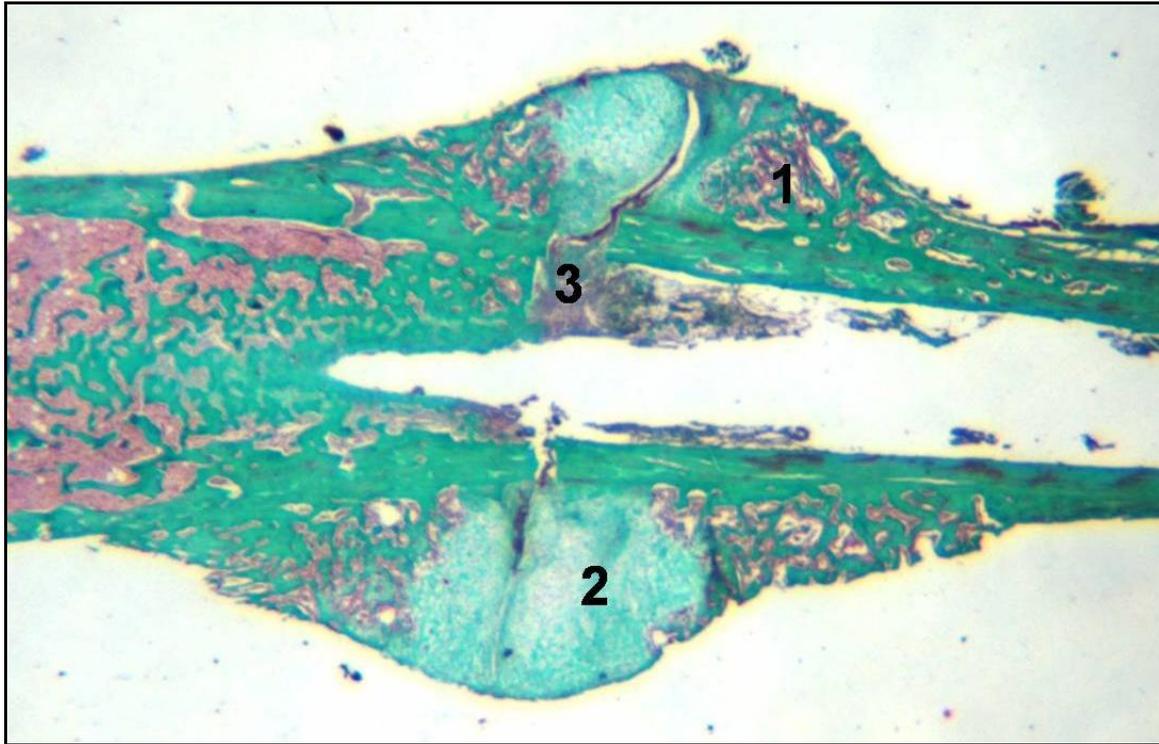


Abb. 30: Histologischer Schnitt 2 Wochen postoperativ. Kallusgewebe mit typischer Gewebzusammensetzung aus Knochen- (1), Knorpel- (2) und Bindegewebe (3).

Folgende Parameter wurden mittels eines Bildauswertungsprogramms (ImageJ Analysis System, NIH, Bethesda, Maryland, USA) bestimmt:

- Kallusdurchmesser [mm]
- Femurdurchmesser [mm]
- Periostale Kallusfläche [mm²]
- Knöcherner Anteil innerhalb der periostalen Kallusfläche [mm²]
- Knorpeliger Anteil innerhalb der periostalen Kallusfläche [mm²]
- Bindegewebiger Anteil innerhalb der periostalen Kallusfläche [mm²]

Anhand dieser Parameter ließen sich die folgenden Zielwerte ermitteln:

- Kallusdurchmesser / Femurdurchmesser
- Fläche des periostalen Kallus / Femurdurchmesser [mm]
- Fläche des knöchernen Kallus / Fläche des periostalen Kallus [%]
- Fläche des knorpeligen Kallus / Fläche des periostalen Kallus [%]
- Fläche des bindegewebigen Kallus / Fläche des periostalen Kallus [%]

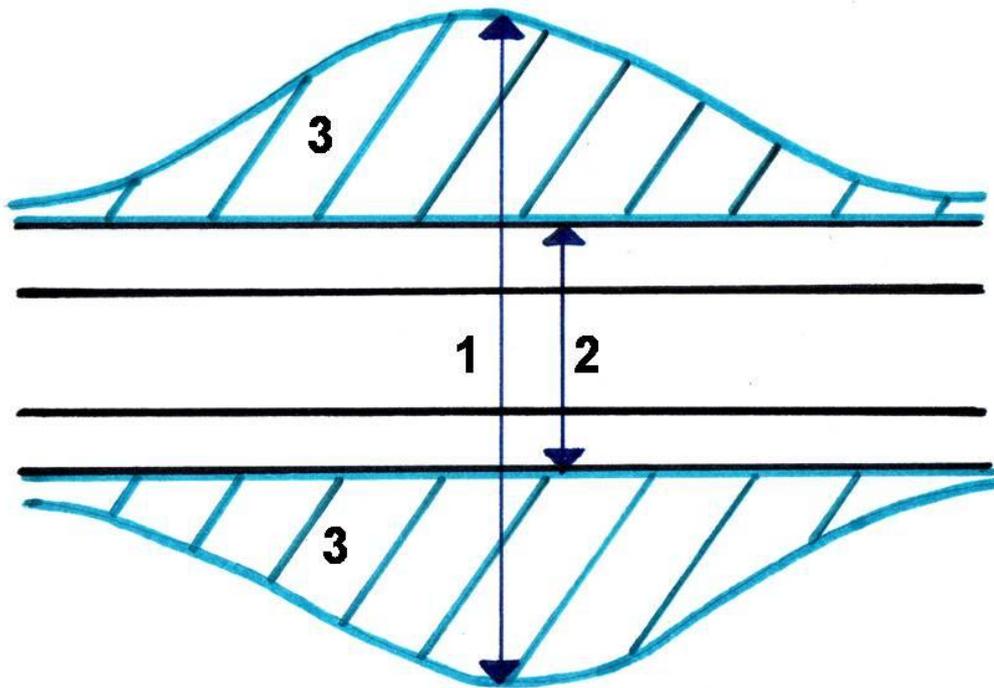


Abb. 31: Schematische Darstellung des Femurs mit Frakturkallus (blau), Kallusdurchmesser [mm] (1), Femurdurchmesser [mm] (2), Gesamtkallusfläche [mm²] (3).

3.4.3.2 Histo-Score

Zusätzlich wurden beide Kortices unabhängig voneinander bezüglich der Gewebeart im Frakturspalt mit einem Punktesystem (Histo-Score) zur Bestimmung der Kallusqualität bewertet. Die Punkte beider Kortices wurden anschließend addiert, sodass maximal vier Punkte erreicht werden konnten (Garcia et al., 2008a).

- knöcherne Überbrückung des Frakturspalt: 2 Punkte
- knorpelige Überbrückung des Frakturspalt: 1 Punkt
- bindegewebige Überbrückung des Frakturspalt: 0 Punkte

3.4.4 Western Blot

Als quantitative Methode zur Ermittlung der Proteinexpression im Kallusgewebe diente in dieser Studie der Western Blot. Dabei wurden die extrahierten Proteine durch ein elektrisches Feld in einer vertikalen Gelmatrix aufgrund ihres Molekulargewichtes getrennt. Die entstandenen Proteinbanden wurden anschließend in einem zweiten Schritt durch eine horizontale Elektrophorese auf eine proteinbindende Membran transferiert. Nun wurden die Proteine mit Enzym-konjugierten spezifischen Antikörpern angefärbt. Durch die lichtemittierende Enzym-Substrat-Reaktion konnte die Stärke der Proteinexpression als Belichtungssignal auf einem Röntgenfilm detektiert werden. Um die ver-

schiedenen Proben quantitativ vergleichen zu können, mussten die Proteinextrakte auf eine identische Proteinkonzentration eingestellt werden. Um diese Quantifizierbarkeit zu gewährleisten, wurde ein ubiquitär konstitutiv exprimiertes Protein (β -Actin) mitgeführt, welches in allen Ansätzen dieselbe Expressionsstärke zeigen musste.

Mittels Western Blot-Analyse wurde die Expression der unten aufgeführten Proteine quantitativ nach zweiwöchiger Frakturheilung analysiert:

- proliferating cell nuclear antigen (PCNA)
- vascular endothelial growth factor (VEGF)
- Cysteine-rich protein (CYR61)
- endothelial nitric oxide synthase (eNOS)
- receptor for activation of nuclear factor kappa B ligand (RANKL)
- Osteoprotegerin (OPG)

Um das Kallusgewebe zu gewinnen, wurde den Versuchstieren post mortem jeweils das rechte Femur explantiert und der umgebende Weichteilmantel abpräpariert. Anschließend wurden Proben vom Frakturkallus mit einem Skalpell abgetragen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren (-80°C).

Für die Extraktion der Gesamtproteinfraktion wurde das kryokonservierte Kallusgewebe, bestehend aus Knochen, Knorpel und Bindegewebe, zunächst in Lysepuffer (10mM Tris, pH 7,5, 10mM NaCl, 0,1mM EDTA, 0,5 % Triton-X 100, 0,02 % NaN_3 , 0,2mM PMSF) und einer NaN_3 Proteaseninhibitor-Mischung (1:75, v/v; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) homogenisiert, anschließend für 30 Minuten auf Eis inkubiert und für weitere 30 Minuten zentrifugiert (16000 x g). Die Proteinkonzentration wurde anschließend nach der Methode von Lowry bestimmt (Lowry et al., 1951). Die gesamten Proteinextrakte, d.h. 10 μg Protein pro Bande, wurden in einem Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel diskontinuierlich elektrophoretisch aufgetrennt und in einer 2. Elektrophorese auf eine inerte Polyvinylendifluorid-Membran (PVDF) (BioRad, München, Deutschland) transferiert. Nach Blockade der unspezifischen Bindungsstellen wurden die Membranen für 4 Stunden mit Antikörpern inkubiert. In dieser Studie wurden folgende Antikörper verwendet:

- Kaninchen anti-Maus VEGF (A20, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland)
- Ziegen anti-Maus CYR61 (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland)

- Maus anti-Maus PCNA (1:500, Dako, Hamburg, Deutschland)
- Kaninchen anti-Maus gespaltene Caspase-3 (1:400, Cell Signaling, Frankfurt, Deutschland)
- Kaninchen anti-Maus RANKL (1:300 Abcam, Cambridge, United Kingdom)
- Kaninchen anti-Maus eNos (1:300, BD Transduction, Heidelberg, Deutschland)
- Kaninchen anti-Maus OPG (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland)
- Maus anti-Maus β -Aktin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Anschließend folgte die Behandlung mit korrespondierenden peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper (1,5 Std, 1:5000, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland). Die Proteinexpression wurde mittels Chemiluminiszens (ECL, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) auf UV-sensitiven Autoradiographie-Filmen visualisiert (Hyperfilm ECL; GE Healthcare, Freiburg, Deutschland). Die Signale wurden desitometrisch ausgewertet (Quantity one, Geldoc, BioRad, München, Deutschland) und gegen β -Aktin normalisiert (1:20,000, Anti- β -actin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), um die Quantifizierbarkeit der Proteinexpression zu gewährleisten.

3.4.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism 4 (GraphPad SoftwareInc, San Diego, CA, USA (2004)).

Alle statistischen Daten wurden im Text als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Nach Überprüfung der Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) und der Varianzgleichheit (F-Test) wurde der Gruppenvergleich mittels Student's t-Test durchgeführt. Es wurde ein p-Wert von kleiner als 0,05 festgelegt, um signifikante Unterschiede anzuzeigen.

4. Ergebnisse

4.1 postoperativer Verlauf

Die Versuchstiere wurden im postoperativen Versuchsverlauf täglich bezüglich Schmerzzeichen, des Gangbildes und des Körpergewichtes überwacht.

Zu den postoperativen Abbruchkriterien zählten medikamentös nicht beherrschbare Schmerzen, eine Nahrungsverweigerung und ein Gewichtsverlust von mehr als 20 % des Körpergewichts, sowie Wundinfekte. Versuchstiere, die in der postoperativen Röntgenkontrolle eine Implantatdislokation (n=1) zeigten oder deren Fraktur nicht in Schaftmitte lokalisiert war (n=2), wurden von der Versuchsreihe ausgeschlossen.

Die Versuchstiere waren nach 2-3 Tagen postoperativ vollständig mobil und zeigten einen physiologischen Bewegungsablauf.

Zur Dosierung der Narkotika sowie zur täglichen Gabe der Sildenafil-Dosis wurde das Körpergewicht der Mäuse präoperativ protokolliert. Nach der jeweiligen Standzeit von 2 bzw. 5 Wochen wurde das Gewicht erneut dokumentiert. Alle Mäuse wiesen über den Versuchsverlauf eine Gewichtszunahme auf (Abb. 31 und 32).

Die Versuchstiere der Sildenafilgruppe zeigten sowohl nach 2 als auch nach 5 Wochen eine signifikante Gewichtszunahme. In der Kontrollgruppe zeigte sich nur nach 5 Wochen Standzeit eine signifikante Gewichtszunahme im Vergleich zum präoperativen Gewicht der Mäuse (Abb. 31 und 32).

Im Vergleich der beiden Gruppen nach jeweils 2 bzw. 5 Wochen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Gewichtszunahme.

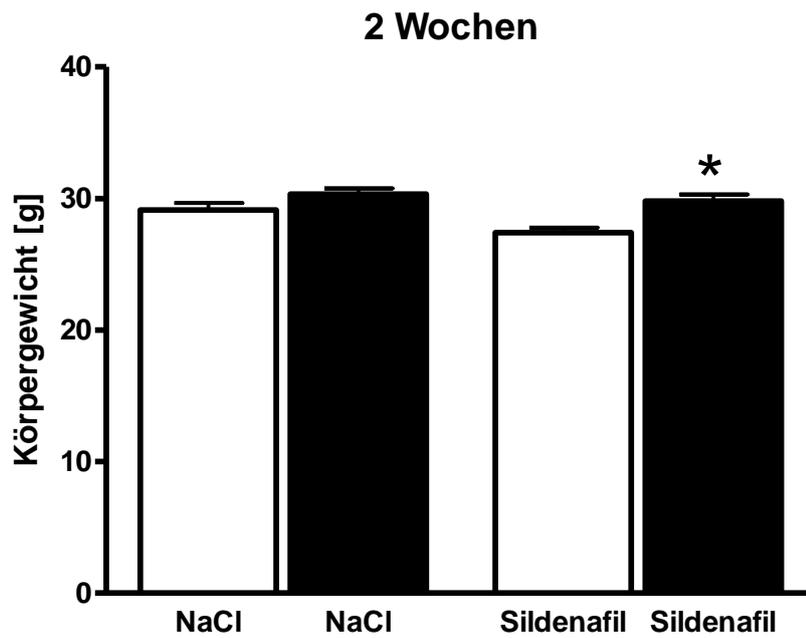


Abb. 31: Körpergewicht der Versuchstiere der Kontroll-Gruppe und der Sildenafil-Gruppe präoperativ (weiße Balken) und 2 Wochen postoperativ (schwarze Balken). Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. (* $p < 0,05$ versus der Sildenafil-Gruppe präoperativ).

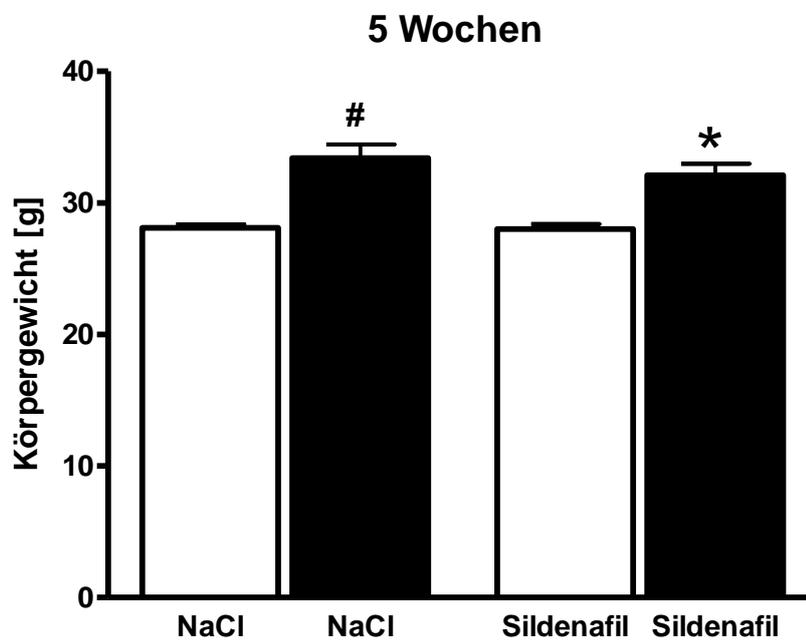


Abb. 32: Körpergewicht der Versuchstiere der Kontroll-Gruppe und der Sildenafil-Gruppe präoperativ (weiße Balken) und 5 Wochen postoperativ (schwarze Balken). Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. (* $p < 0,05$ versus der Sildenafil-Gruppe präoperativ), (# $p < 0,05$ versus der Kontroll-Gruppe präoperativ).

4.2 Makroskopie

Nach Explantation der Femora wurden die Knochen und Weichteile makroskopisch bezüglich Infektzeichen, Fehlstellungen und Implantatlockerung beurteilt.

Bei keinem der Versuchstiere zeigten sich Anhaltspunkte für einen Infekt oder Wundheilungsstörungen. Bei der Präparation der Femora zeigte sich im Bereich der Muskulatur weder eine Hypertrophie noch eine Atrophie. Des Weiteren konnten keine Implantatdislokationen nachgewiesen werden.

4.3 Radiologie

Die radiologische Auswertung erfolgte nach Explantation der Femora und Implantatentfernung (Abb. 33).

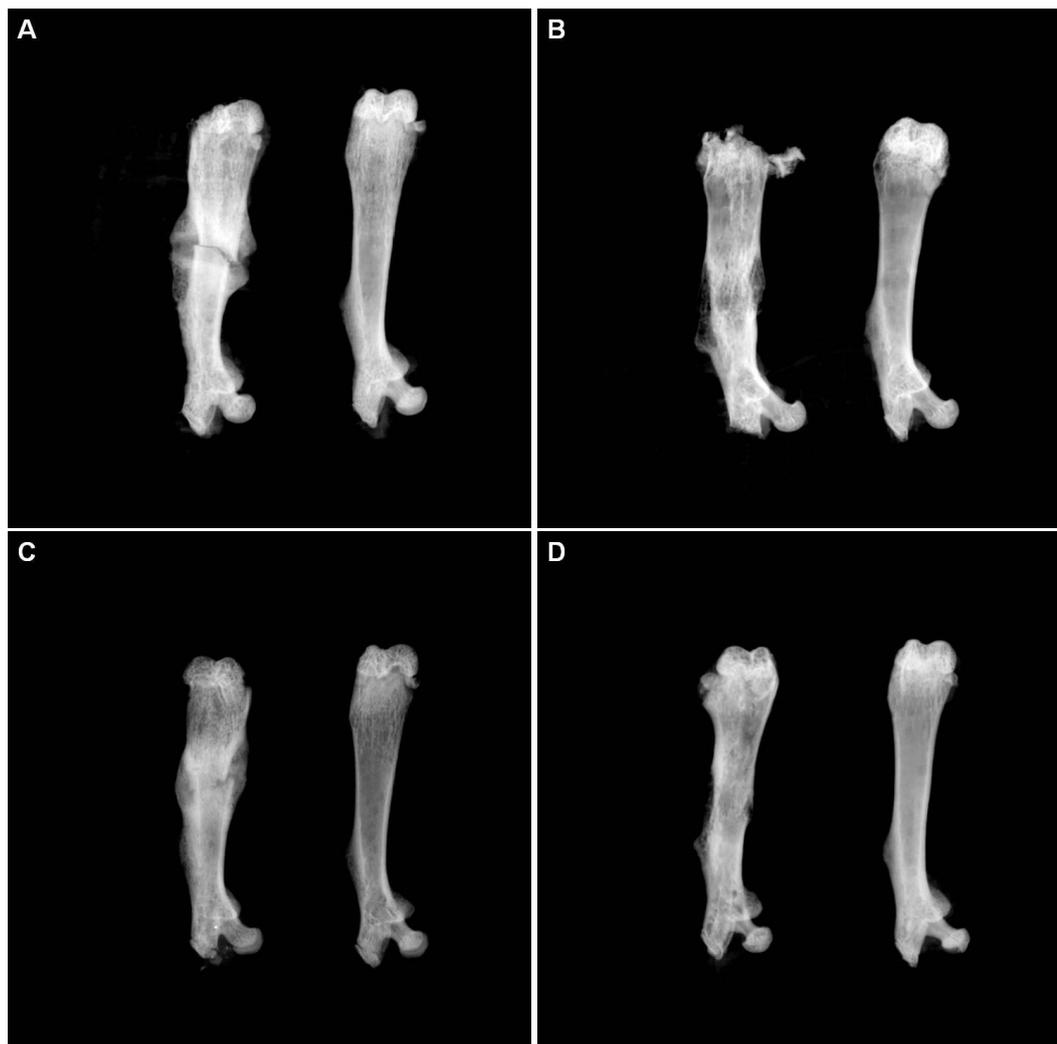


Abb. 33: Röntgenaufnahmen der explantierten frakturierten und gesunden kontralateralen Femora der Kontroll-Gruppe (A und B) und der Sildenafil-Gruppe (C und D), jeweils nach einer Standzeit von zwei Wochen (A und C) und fünf Wochen (B und D).

Die Röntgenbilder wurden zusätzlich hinsichtlich der knöchernen Durchbauung des Frakturspaltes mittels Goldberg-Score bewertet (Abb. 34 und 35).

- keine knöchernen Durchbauung des Frakturspaltes: 0 Punkte
- partielle knöchernen Durchbauung des Frakturspaltes: 1 Punkt
- komplette knöchernen Durchbauung des Frakturspaltes: 2 Punkte

2 Wochen

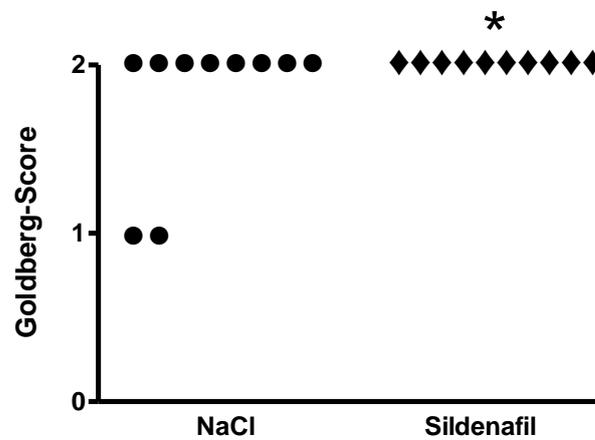


Abb. 34: Goldberg-Score der Kontroll-Gruppe (●) und der Sildenafil-Gruppe (◆) 2 Wochen postoperativ (* $p < 0,05$ versus der Kontrolle).

5 Wochen

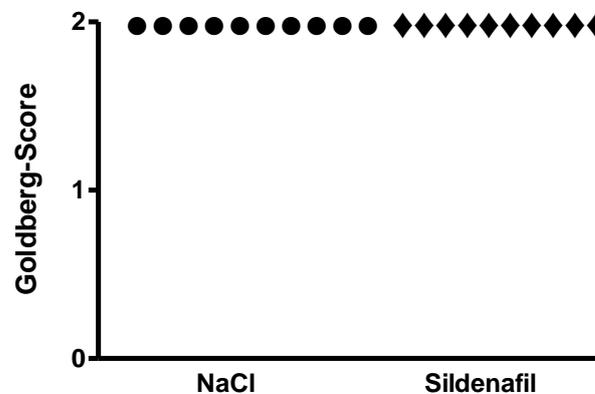


Abb. 35: Goldberg-Score der Kontroll-Gruppe (●) und der Sildenafil-Gruppe (◆) 5 Wochen postoperativ.

4.4 Biomechanik

Für die biomechanische Untersuchung wurden die explantierten Femora nach Entfernung der Schrauben mittels 3-Punkt-Biege-Prüfung getestet.

Mit Hilfe des Kraft-Weg-Diagrammes wurde im linearen Anteil der Kurve anhand der Steigungsdreiecke die Biegesteifigkeit ermittelt (Abb. 36).

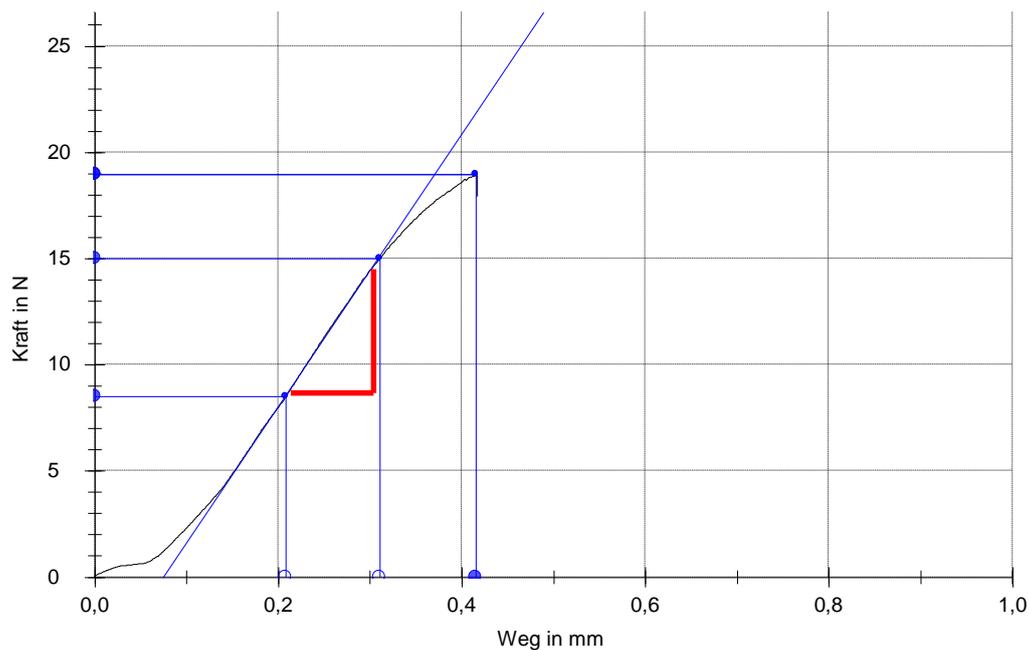


Abb. 36: Kraft-Weg-Diagramm mit eingezeichnetem Steigungsdreieck der Sildenafilgruppe 5 Wochen postoperativ.

Um individuelle Unterschiede zwischen den Versuchstieren zu berücksichtigen, wurde die Biegesteifigkeit sowohl in Absolutwerten [N/mm] als auch in Prozent [%] zu den kontralateralen gesunden Knochen angegeben.

Die Biegesteifigkeit der frakturierten Knochen nach Behandlung mit Sildenafil erreichte Werte von 22,80 bis 54,41 N/mm² 2 Wochen postoperativ. Im Vergleich dazu war die Biegesteifigkeit der Kontrollgruppe 2 Wochen postoperativ deutlich erniedrigt (1,45 bis 10,51 N/mm).

Die durchschnittliche Biegesteifigkeit der Sildenafil-Gruppe ($40,5 \pm 4,0$ N/mm) war damit signifikant ($p < 0,0001$) höher im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe ($6,0 \pm 0,9$ N/mm) (Abb. 37).

Die relative Biegesteifigkeit der Knochen der mit Sildenafil behandelten Versuchstiere ($61,8 \pm 4,9$ %) war ebenfalls zwei Wochen postoperativ signifikant höher ($p < 0,0001$), im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($10,7 \pm 1,6$ %) (Abb. 38).

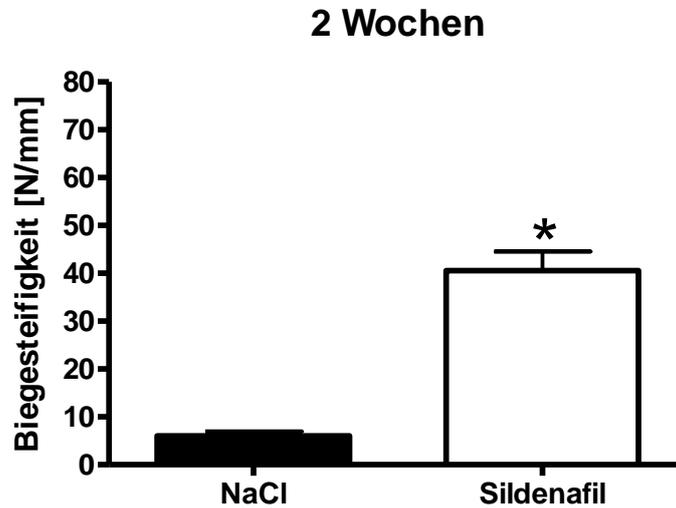


Abb. 37: Absolute Biegesteifigkeit in [N/mm]. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. (* $p < 0,05$ versus der Kontrolle).

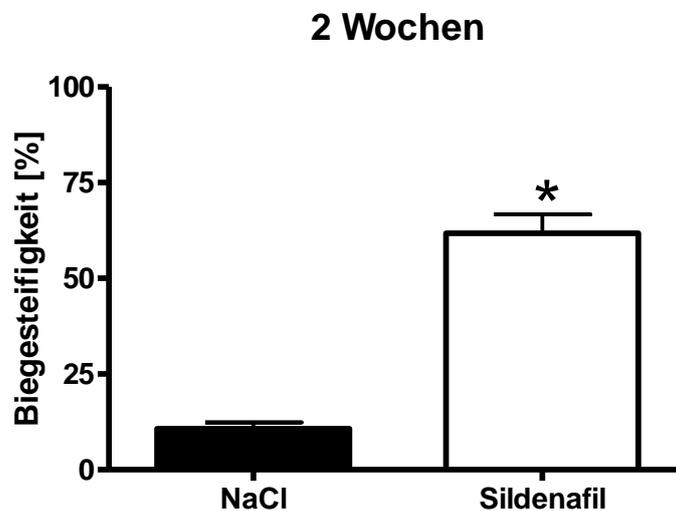


Abb. 38: Relative Biegesteifigkeit in [%]. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. (* $p < 0,05$ versus der Kontrolle).

Im Gegensatz zu den frakturierten Knochen zeigte die Messung der Biegesteifigkeit an den gesunden linken Femora der Versuchstiere keinen signifikanten Unterschied. Bei den mit Sildenafil behandelten Versuchstieren ergaben sich Absolutwerte von 42,95 bis 88,15 N/mm ($65,9 \pm 5,0$ N/mm) und bei den Tieren der Kontrollgruppe zeigten sich Werte von 45,19 bis 76,61 N/mm ($57,4 \pm 2,9$ N/mm).

5 Wochen postoperativ war die Biegesteifigkeit aufgrund des fortgeschrittenen Heilungsprozesses in beiden Gruppen deutlich höher. Die Tiere, die mit Sildenafil behandelt wurden, erreichten eine absolute Biegesteifigkeit von 58,67 bis 90,92 N/mm ($72,1 \pm 3,9$ N/mm). Die absolute Biegesteifigkeit der Kontrollgruppe war mit Werten von 25,83 bis 87,02 N/mm ($60,2 \pm 5,8$ N/mm) geringer. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren jedoch nicht signifikant (Abb. 39).

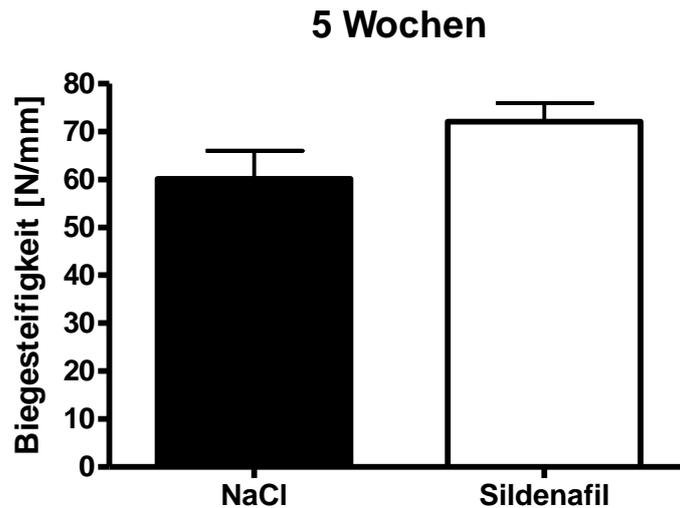


Abb. 39: Absolute Biegesteifigkeit in [N/mm]. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

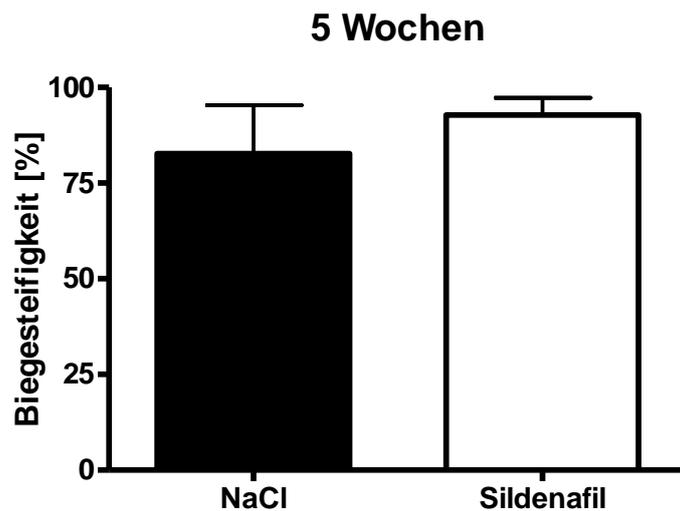


Abb. 40: Relative Biegesteifigkeit in [%]. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

Vergleichbare Werte wurden für die prozentuale Biegesteifigkeit 5 Wochen postoperativ ermittelt. Die Biegesteifigkeit der Sildenafil-Gruppe war mit durchschnittlich $92,8 \pm 4,5$ % geringfügig höher als die Biegesteifigkeit der Kontrollgruppe mit $82,7 \pm 12,7$ % (Abb. 40).

4.5 Histologie

4.5.1 Histomorphometrie

Die histomorphometrische Auswertung erfolgte an longitudinalen sagittalen Schnittpräparaten. Die Analyse der Gesamtkallusfläche 2 Wochen postoperativ zeigte, dass die Kallusfläche in der Sildenafilgruppe ($2,8 \pm 0,5$ mm²) signifikant kleiner war als die Kallusfläche der Kontrollgruppe ($6,1 \pm 0,5$ mm²) (Abb. 41 und 42).

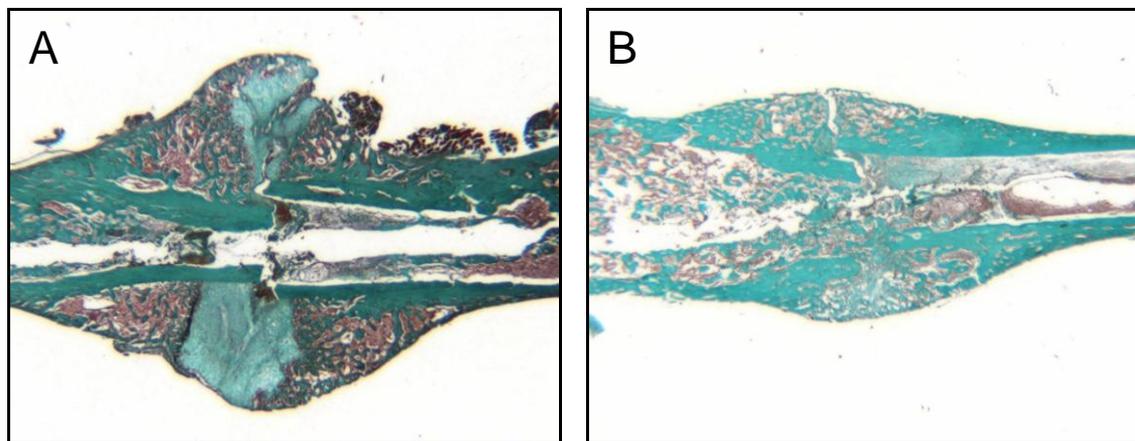


Abb. 41: Sagittale longitudinale Schnittpräparate der Knochen im Bereich des Frakturkallus der Kontroll-Gruppe (A) und der Sildenafil-Gruppe (B) 2 Wochen postoperativ.

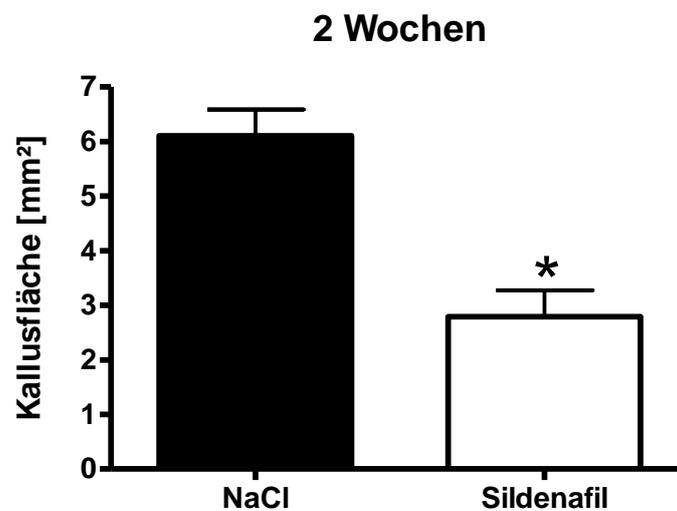


Abb. 42: Gesamtkallusfläche [mm²] 2 Wochen postoperativ. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. (* $p < 0,05$ versus der Kontrolle).

5 Wochen postoperativ war die Gesamtkallusfläche in beiden Versuchsgruppen aufgrund des begonnenen Remodelingprozesses geringer. Die Unterschiede waren nicht signifikant ($p > 0,05$) (Abb. 43 und 44).

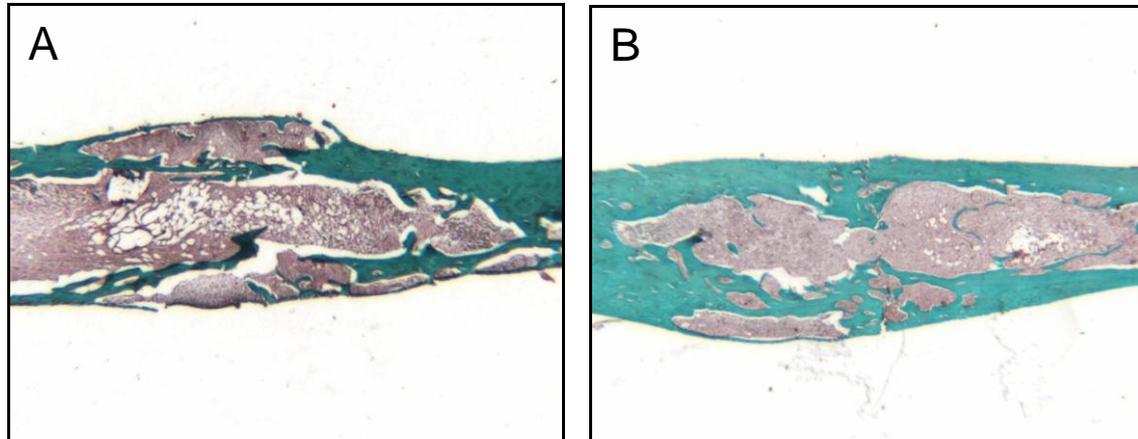


Abb. 43: Sagittale longitudinale Schnittpräparate der Knochen im Bereich des Frakturkallus der Kontroll-Gruppe (A) und der Sildenafil-Gruppe (B) 5 Wochen postoperativ.

5 Wochen

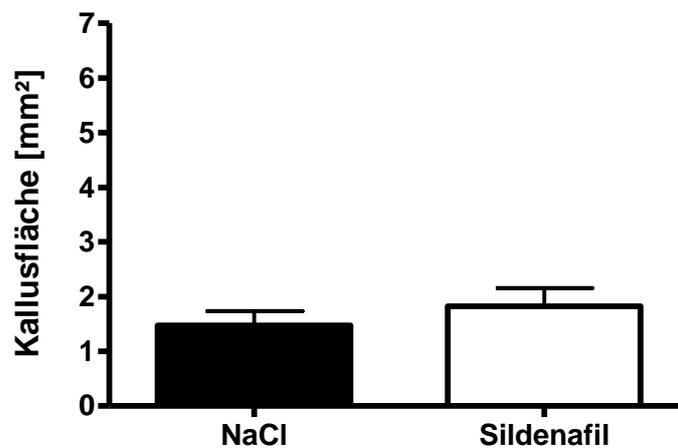


Abb. 44: Gesamtkallusfläche [mm²] 5 Wochen postoperativ. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

Um individuelle Unterschiede bezüglich der Femurgröße der Versuchstiere zu berücksichtigen, wurde die Kallusgröße zusätzlich in Relation zum Femurdurchmesser in Höhe des Frakturspalt angegeben.

Die Ergebnisse der relativen Kallusfläche 2 Wochen postoperativ waren vergleichbar mit den Werten der absoluten Kallusfläche. Es zeigte sich in der Sildenafil-Gruppe eine relative Kallusfläche von $2,1 \pm 0,4$ %, im Vergleich zur Kontroll-Gruppe mit $4,3 \pm 0,5$ % (Abb. 45).

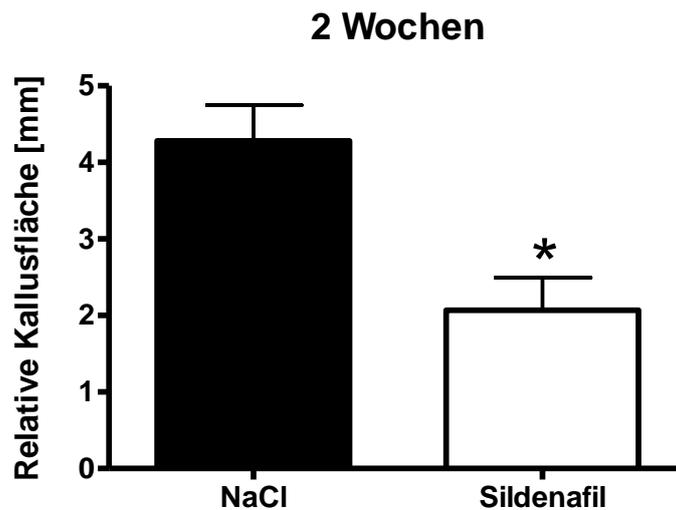


Abb. 45: Relative Kallusfläche [mm] 2 Wochen postoperativ. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. (* $p < 0,05$ versus der Kontrolle).

Insgesamt spricht die verminderte Kallusfläche nach Gabe von Sildenafil für einen beschleunigten Remodelingprozess.

5 Wochen postoperativ war die relative Kallusfläche beider Gruppen ebenfalls vergleichbar (Abb. 46).

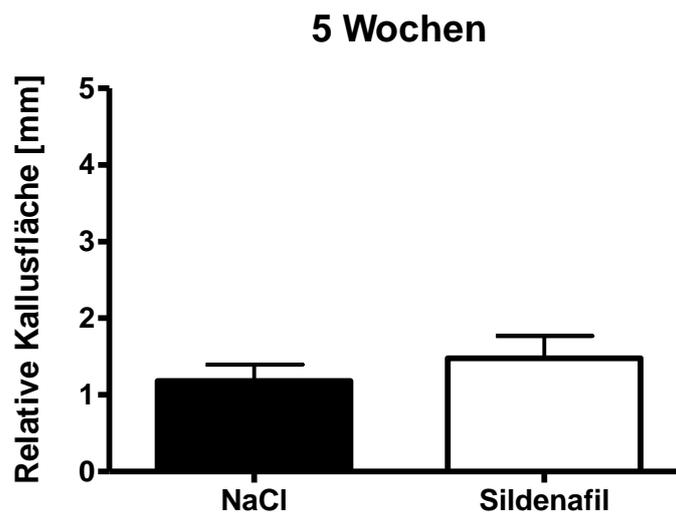


Abb. 46: Relative Kallusfläche [mm] 5 Wochen postoperativ. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

Die Analyse der Gewebezusammensetzung des Frakturkallus zeigte 2 Wochen postoperativ in der Sildenafilgruppe einen höheren Anteil an Knochengewebe, verglichen mit der

Kontrolle. Der prozentuale Knochenanteil der Sildenafilgruppe erreichte im Mittel $79,5 \pm 3,8$ % und der der Kontroll-Gruppe $70,9 \pm 4,6$ % (Abb. 47).

5 Wochen postoperativ war der Anteil an Knochengewebe in beiden Gruppen vergleichbar. Es zeigten sich Durchschnittswerte in der Sildenafilgruppe von $93,5 \pm 1,6$ % und in der Kontrolle von $91,5 \pm 1,9$ %, ($p > 0,05$) (Abb. 47).

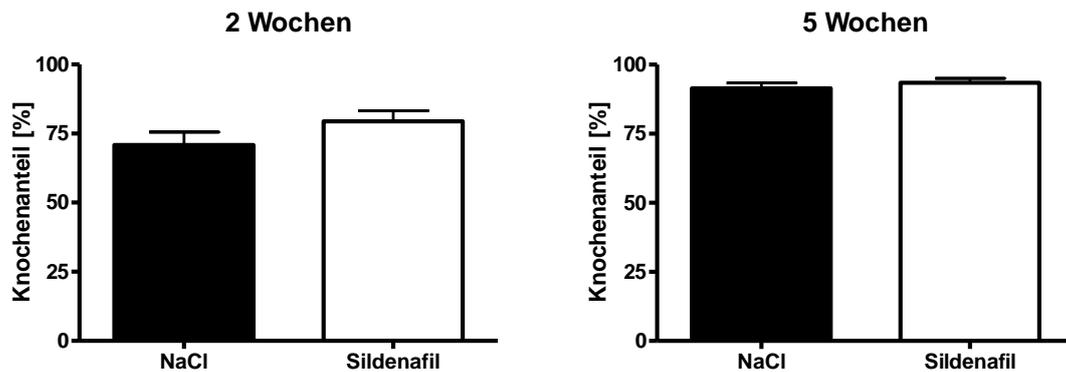


Abb. 47: Knochenanteil in Prozent zur Gesamtkallusfläche 2 Wochen postoperativ (links) und 5 Wochen postoperativ (rechts). Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

Der Anteil an Knorpelgewebe war in der Sildenafilgruppe 2 Wochen postoperativ deutlich geringer, mit durchschnittlichen Werten von $16,0 \pm 4,1$ % im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ($24,3 \pm 4,1$ %). Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$), (Abb. 48).

Auch im späteren Frakturheilungsverlauf 5 Wochen postoperativ konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ermittelt werden. Insgesamt waren durchschnittlich $2,0 \pm 0,7$ % Knorpelgewebe in der Gesamtkallusfläche der Sildenafil-Gruppe und $2,2 \pm 0,9$ % Knorpelgewebe in der Kontrolle nachweisbar (Abb. 48).

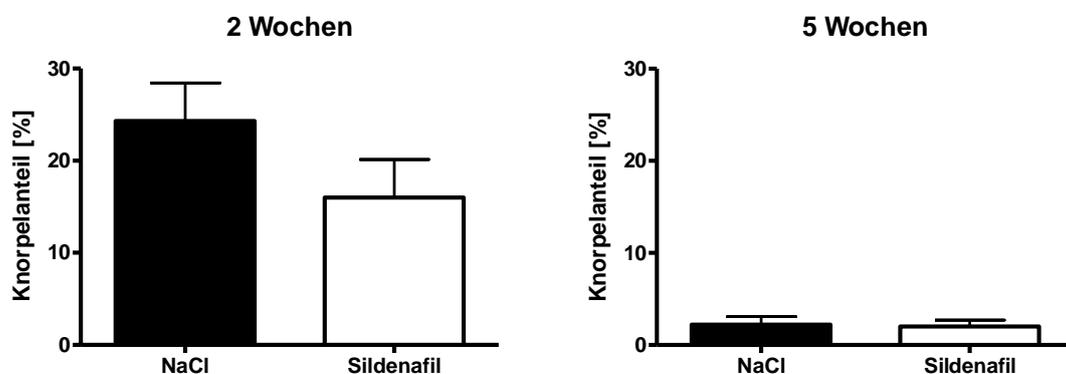


Abb. 48: Knorpelanteil in Prozent zur Gesamtkallusfläche 2 Wochen postoperativ (links) und 5 Wochen postoperativ (rechts). Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

Der Bindegewebsanteil unterschied sich in der Kontrollgruppe und der Sildenafilgruppe sowohl nach 2 Wochen als auch nach 5 Wochen nicht signifikant. Der Anteil an Bindegewebe in der Sildenafil-Gruppe lag bei durchschnittlich $4,5 \pm 0,7$ % und in der Kontroll-Gruppe bei $4,8 \pm 1,1$ % 2 Wochen postoperativ ($p > 0,05$). 5 Wochen postoperativ lag der Anteil in der Sildenafil-Gruppe bei $4,5 \pm 1,3$ % versus der Kontrolle von $6,3 \pm 1,5$ % ($p > 0,05$), (Abb. 49).

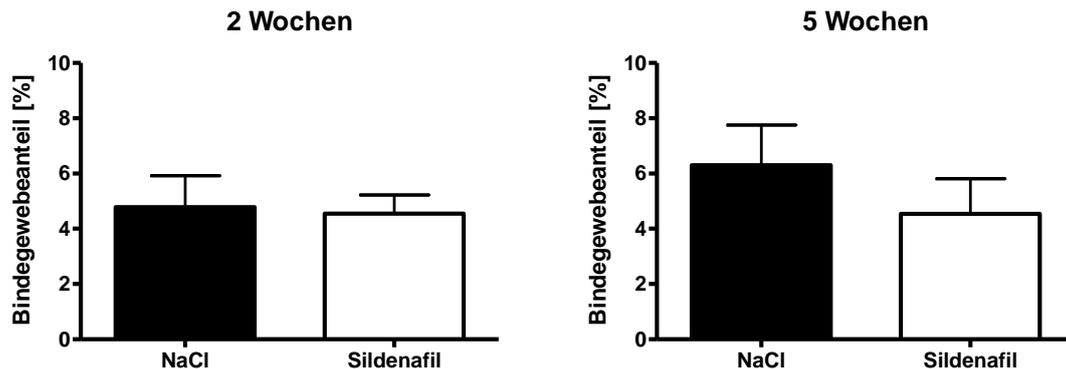


Abb. 49: Bindegewebeanteil in Prozent zur Gesamtkallusfläche 2 Wochen postoperativ (links) und 5 Wochen postoperativ (rechts). Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

4.5.2 Histo-Score

Zur Beurteilung der Frakturheilung wurde an den histologischen Präparaten zusätzlich die Gewebezusammensetzung im Frakturspalt beurteilt. Dazu wurde ebenfalls ein Punktesystem verwendet. Je nach Gewebeart im Frakturspalt wurden folgende Punkte vergeben:

- Bindegewebe 0 Punkte
- Knorpel 1 Punkt
- Knochen 2 Punkte

Bei den Versuchstieren, die mit Sildenafil behandelt wurden, zeigte sich ein signifikant höherer Histo-Score im Vergleich zur Kontrolle ($2,4 \pm 0,3$ vs. $1,3 \pm 0,3$ Punkte), (Abb. 50).

5 Wochen postoperativ erreichten beide Gruppen einen vergleichbaren Punktwert ($3,8 \pm 0,2$ Punkte in der Sildenafil-Gruppe versus $3,4 \pm 0,3$ in der Kontroll-Gruppe (Abb. 51). Der Frakturspalt war fast vollständig mit Knochengewebe ausgefüllt.

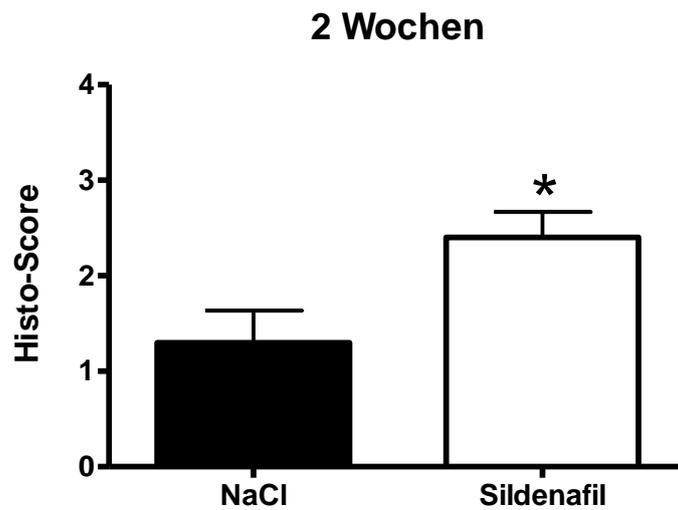


Abb. 50: Histo-Score 2 Wochen postoperativ. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. (* $p < 0,05$ versus der Kontrolle).

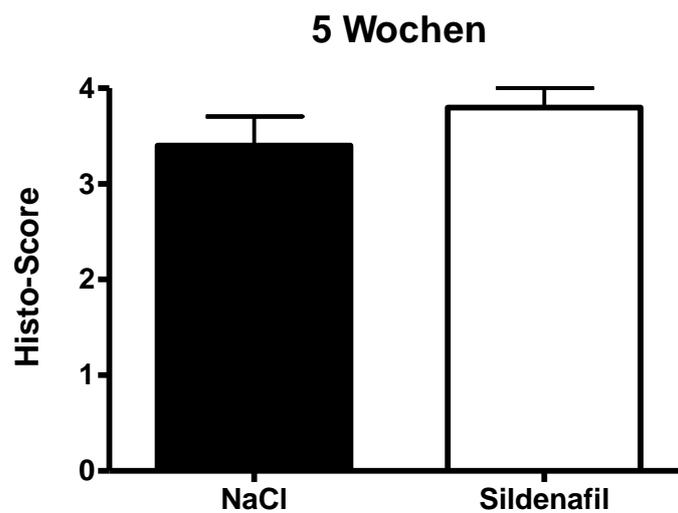


Abb. 51: Histo-Score 5 Wochen postoperativ. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

4.6 Western Blot

Bei der quantitativen Analyse der Proteinexpression des Kallusgewebes mit Hilfe der Western-Blot-Analyse 2 Wochen postoperativ zeigte sich, dass die Behandlung mit Sildenafil keinen Einfluss auf die VEGF-Expression hatte. In beiden Gruppen wurde eine vergleichbare Expression gemessen. (Abb. 52, 53).

Die Expression von CYR61, ein potenter Stimulator der Angiogenese und Osteogenese, war in den Sildenafil-behandelten Tieren signifikant erhöht ($9,63 \pm 0,62 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$) im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe ($7,01 \pm 0,62 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$) (Abb. 52, 53).

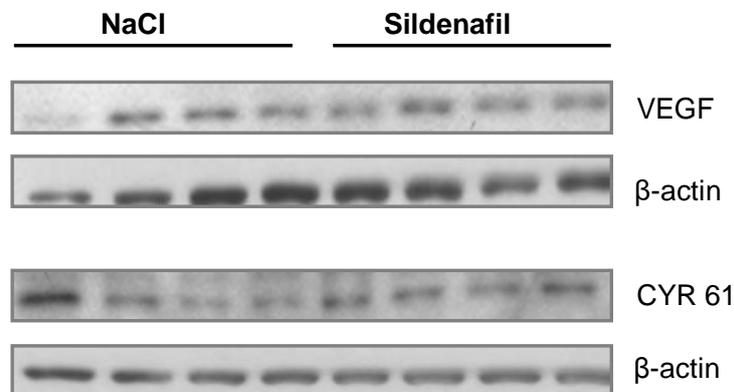


Abb. 52: Western-Blot-Analyse der Proteinexpression im Frakturkallus 2 Wochen postoperativ. Expression der Wachstumsfaktoren VEGF und CYR61 in den Kontrolltieren (links) und der Sildenafil-Gruppe (rechts).

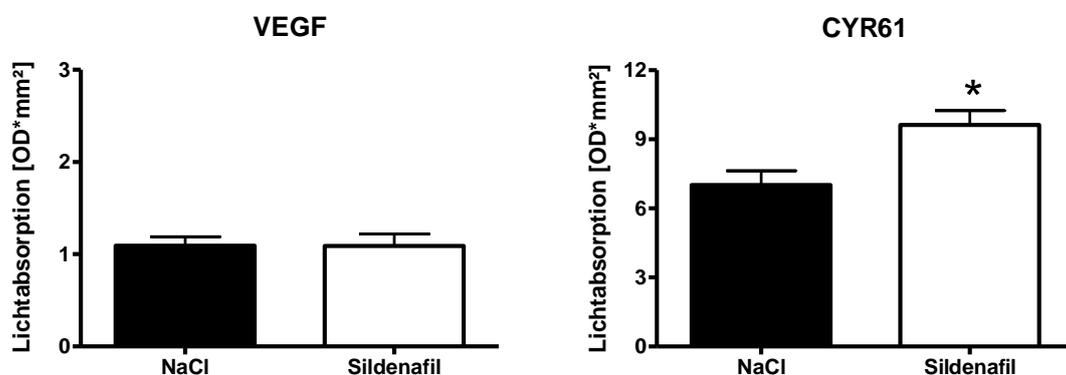


Abb. 53: Quantitative Analyse der Expression von VEGF (links) und CYR61 (rechts). Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. (* $p < 0,05$ versus der Kontrolle).

Es zeigte sich ebenfalls eine deutliche Erhöhung der Expression des Proliferationsmarkers PCNA nach Gabe von Sildenafil ($7,89 \pm 2,66 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ vs. $3,61 \pm 0,59 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$) (Abb. 54).

Insgesamt zeigte sich, dass die Gabe von Sildenafil eher zu einer Hemmung der Osteoklastenaktivität führt. Die Expression von RANKL war geringer ($1,04 \pm 0,30 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ vs. $1,34 \pm 0,29 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$) und die Expression von OPG erhöht ($15,03 \pm 2,16 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ vs. $10,98 \pm 1,73 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$). Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Abb. 54 und 55).

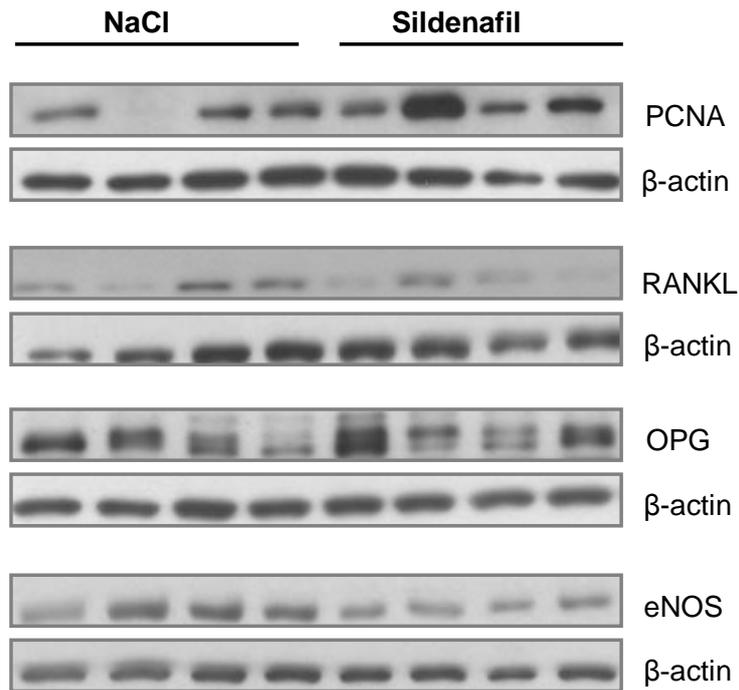


Abb. 54: Western-Blot-Analyse der Proteinexpression im Frakturkallus 2 Wochen postoperativ. Expression der Wachstumsfaktoren PCNA, RANKL, OPG und eNOS der Kontrolltiere (links) und der Sildenafil-Gruppe (rechts).

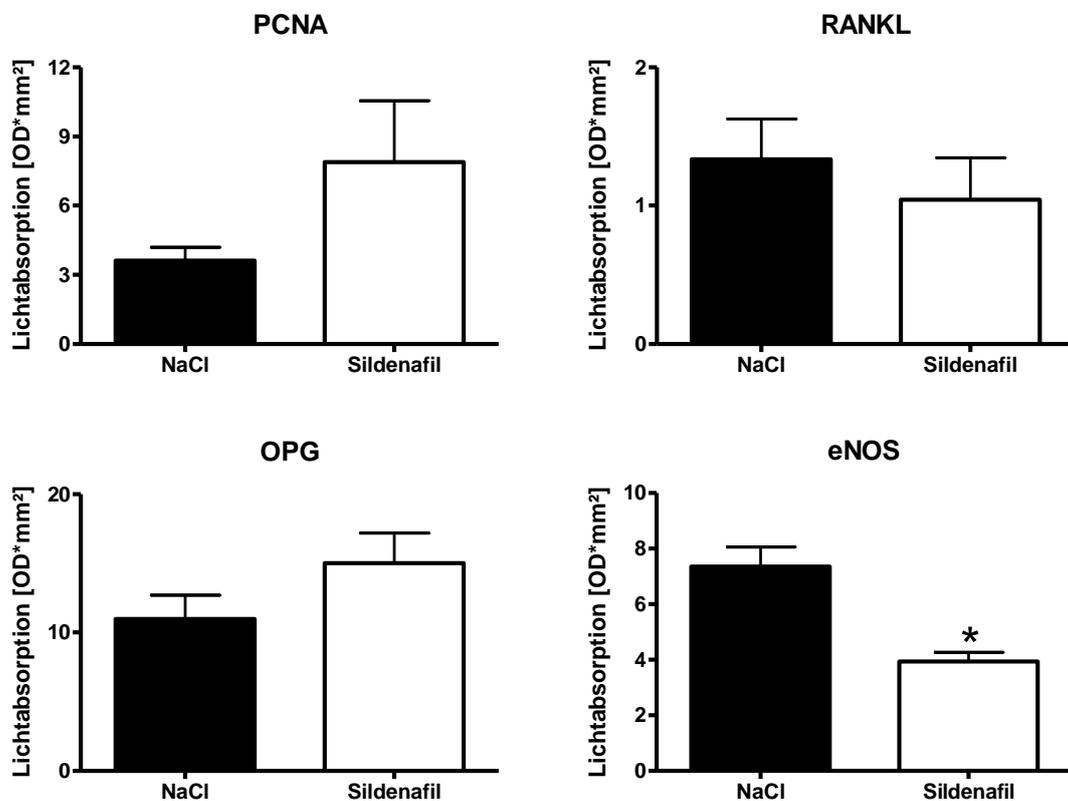


Abb. 55: Quantitative Analyse der Expression von PCNA, RANKL, OPG und eNOS. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. (* $p < 0,05$ versus der Kontrolle).

Interessanterweise war die Expression des angiogenen Wachstumsfaktors eNOS im Kallus der mit Sildenafil behandelten Tiere signifikant vermindert ($3,94 \pm 0,33$ OD*mm²) im Vergleich zur Kontrolle ($7,35 \pm 0,70$ OD*mm²) (Abb. 54 und 55).

5. Diskussion

5.1 Methoden

Die Knochenheilung stellt einen komplexen biologischen Prozess dar, der die Interaktion zahlreicher knochenfremder Gewebetypen erfordert, wie zum Beispiel das den Knochen umgebende Weichteilgewebe, das Periost, das Gefäßsystem oder das Immunsystem (Hankenson et al., 2014). Aufgrund des komplizierten Zusammenspiels der verschiedenen Vorgänge der Frakturheilung und der schlechten Reproduzierbarkeit des ossären „micro-environments“ sind *in vitro* Untersuchungen nicht aussagekräftig. (Friedman et al., 1996; Street et al., 2002). Daher kann der Einfluss von Sildenafil auf die Frakturheilung nur im Tiermodell untersucht werden.

Im Vergleich zum Menschen oder Großtiermodellen besitzen Ratten und Mäuse eine primitivere Knochenstruktur ohne Havers-System. Während der Frakturheilung werden sogenannte Resorptionshöhlen gebildet. Diese werden dann im weiteren Verlauf von Osteoblasten aufgefüllt. Diese Art der Knochenheilung ist allerdings mit dem Remodeling über die Havers-Systeme bei den Menschen vergleichbar (Histing et al., 2011; Numamaker, 1998). Die Vorteile des Mausmodells liegen in der Möglichkeit größere Gruppengrößen kostengünstig zu untersuchen (Histing et al., 2011). Der entscheidende Vorteil ist jedoch, dass das Genom vollständig entschlüsselt ist und somit ein großes Spektrum transgener Stämme und auch eine Vielzahl spezifischer Antikörper zur Verfügung stehen (Houdebine, 2007; Rossant & Nagy, 1995). Dies ermöglicht vor allem die molekularen Mechanismen der Frakturheilung, sowie den Einfluss verschiedener Substanzen auf molekularer Ebene zu untersuchen (Histing et al., 2011; Jacenko et al., 1995).

Die Größe der Maus stellt im Bezug auf die Frakturmodellentwicklung, im Vergleich zu Großtiermodellen, eine große Herausforderung dar. Aufgrund der Knochengröße eignen sich Femur und Tibia am besten zur Beurteilung der Frakturheilung (Hiltunen et al., 1993; Manigrasso & O'Conner 2004).

Die Tibia besitzt bezüglich ihrer Anatomie Nachteile im Vergleich zum Femur der Maus. Die Hauptgründe, die gegen die Verwendung der Tibia sprechen, sind die dreieckige Konfiguration des Knochens, sowie die gekrümmte Achse der Tibia, was die Stabilisierung der Fraktur erschwert. Durch den unregelmäßigen Querschnitt der Tibia sind standardisierte biomechanische Untersuchungen daher äußerst anspruchsvoll. Ein weiterer Nachteil des tibialen Frakturmodells stellt die Fibula dar, die in geschlossenen Frakturmodellen meist unkontrolliert mitfrakturiert, was Einfluss auf die Kallusgröße hat (Hol-

stein et al., 2009a). Der Bruch der Fibula kann die Stabilität der Tibiafixation und damit die Frakturheilung bzw. die Kallusbildung beeinflussen (Shefelbine et al., 2005). Somit ist eine standardisierte Durchführung der geschlossenen Frakturierung nicht möglich (Holstein et al., 2009a). Von Vorteil ist die geringe Weichteildeckung im Bereich der Tibia, was allerdings auch Ursache für eine schlechtere Durchblutung und eine höhere Infektionsgefahr sein kann (Cheung et al., 2003). Somit eignet sich die Tibia nicht, um die Rolle des Weichteilschadens bei der Frakturheilung zu untersuchen (Histing et al., 2011; Holstein et al., 2009a).

Im Gegensatz zur Tibia besitzt das Femur einen homogenen Querschnitt, sodass Untersuchungen standardisiert durchgeführt werden können (Cheung et al., 2003; Holstein et al., 2009a). Zudem eignet sich das Femur aufgrund der größeren Weichteildeckung auch zur Untersuchung des Weichteilschadens im Rahmen der Frakturheilung (Cheung et al., 2003; Histing et al., 2011). Aufgrund der Achse des Femurs ist die Entwicklung von Implantaten zur Frakturstabilisierung im Vergleich zur Tibia leichter zu realisieren (Holstein et al., 2009a).

Grundsätzlich unterscheidet man geschlossene und offene Frakturmodelle (Histing et al., 2011). Für diese Arbeit wurde ein bereits publiziertes geschlossenes Frakturmodell des Femurs verwendet. Bei den geschlossenen Frakturmodellen wird das Femur geschlossen im Sinne einer 3-Punkt-Biegung gebrochen (Gardner et al., 2006; Hiltunen et al., 1993; Holstein et al., 2007a; Holstein et al., 2009b; Li et al., 2005; Manigrasso & O'Connor, 2004; Marsell et al., 2007; Yin et al., 2014).

Der Vorteil ist, dass bei geschlossenen Frakturmodellen das Implantat über einen kleinen Zugang im Bereich des Kniegelenkes eingebracht werden kann. Hingegen wird bei den offenen Frakturmodellen das Femur über einen lateralen longitudinalen Zugang freigelegt und unter Sicht osteotomiert. Der dadurch induzierte Weichteilschaden hat letztendlich Einfluss auf den Prozess der Frakturheilung. Da bei offenen Frakturmodellen auch extramedulläre Implantate, wie z.B. Platten oder Fixateure verwendet werden, ist der erzeugte Markraumschaden geringer (Cheung et al., 2003; Connolly et al., 2003; Garcia et al., 2008b; Isefuku et al., 2004).

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten geschlossenen Frakturmodell wird im Gegensatz zu anderen geschlossenen Modellen der Knochen vor der Einbringung des Implantates frakturiert. Das hat den Vorteil, dass das Implantat durch die Frakturierung nicht verborsten wird.

Die Wahl des Implantates sollte in Abhängigkeit der Fragestellung der Studie und unter Berücksichtigung der Eigenschaften des Implantates gewählt werden (Histing et al., 2011). Für diese Arbeit wurde ein geschlossenes Frakturmodell gewählt, um das Weichteiltrauma und die damit verbundene Beeinflussung der Frakturheilung gering zu halten und um die Wirkung der verabreichten Substanz auf die Frakturheilung zu untersuchen.

Für die Stabilisierung der Fraktur im geschlossenen Frakturmodell stehen verschiedene Implantate zur Verfügung. Die meisten Studien zur Untersuchung der Frakturheilung bedienen sich einfacher intramedullärer Pin-Implantate (Manigrasso & O'Connor, 2004; Timmen et al., 2014). Diese Implantate sind jedoch nicht rotationsstabil und haben damit ein erhöhtes Risiko für eine Implantatdislokation (Beck et al., 2003; Histing et al., 2009; Holstein et al., 2007a; Krischak et al., 2007a und b).

So konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass eine unzureichende Stabilisierung die Frakturheilung maßgeblich beeinflusst. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine unzureichende Stabilisierung zu einer verzögerten Knochenbruchheilung bis hin zur Entstehung einer Pseudarthrose führt. Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Stabilisierung auch Einfluss auf die Expression von angiogenen und osteogenen Wachstumsfaktoren hat (Claes et al., 2002; Lienau et al., 2005; Nomura & Takano-Yamamoto, 2000). Da die mechanischen Gegebenheiten Einfluss auf die Frakturheilung haben (Le et al., 2001; Garcia et al., 2008a), sollten möglichst stabile Osteosynthesetechniken verwendet werden, um biomechanische Einflussfaktoren möglichst gering zu halten (Holstein et al., 2009b).

Um eine stabile Osteosynthese zu gewährleisten, wurde der Verriegelungsnagel entwickelt. Er wird als geschlossenes Frakturmodell nach Frakturierung über einen Führungsdraht in das Femur eingebracht und ist durch die beidseitige Abflachung rotationsstabiler als der herkömmliche Pin (Holstein et al., 2007a). Dennoch zeigt diese Möglichkeit der geschlossenen Frakturstabilisierung keine ausreichende axiale Stabilisierung (Holstein et al., 2009b).

Die MouseScrew gewährleistet durch Kompression der Fragmente sowohl eine Rotationsstabilität als auch axiale Stabilität (Histing et al., 2011). Es wurde bereits in anderen Modellen nachgewiesen, dass durch eine axiale Kompression der Fraktur der Kallus eine höhere Knochendichte aufweist (Augat et al., 2003). Die Rotationssteifigkeit der MouseScrew war im Vergleich zu dem Verriegelungsnagel und dem Pin signifikant höher (Histing et al., 2009). Aufgrund dessen können mit dem MouseScrewTM-Fraktur-

modell an der Maus standardisierte Bedingungen gewährleistet werden. Dieses Modell eignet sich somit zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Substanzen auf den Frakturheilungsprozess. Es wurde bereits publiziert und in verschiedenen Studien erfolgreich verwendet (Claes et al., 2009; Histing et al., 2012; Holstein et al., 2009b).

Der Einfluss von Sildenafil auf die Frakturheilung wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten untersucht. So wurden die Tiere nach 2 und 5 Wochen getötet und die Knochen analysiert.

Die Regeneration des Knochens verläuft bei der Maus schneller als beim Menschen (Bourque et al., 1992). Bei der Maus ist der Prozess der Frakturheilung schon nach 4 Wochen abgeschlossen (Hiltunen et al., 1993). Zur Untersuchung der frühen Phase der Frakturheilung wurde deshalb der Knochen 2 Wochen postoperativ untersucht. Aufgrund einer ungenügenden Härte des Frakturkallus 1 Woche postoperativ eignet sich der Knochen zu diesem Zeitpunkt nicht zur histologischen und biomechanischen Untersuchung (Histing et al., 2011). Die Arbeitsgruppe Manigrasso & O'Connor (2004) konnte zeigen, dass nach 2 Wochen der Kallus seine maximale Größe erreicht. Der beste Zeitpunkt zur Analyse der späten Frakturheilung bei Mäusen liegt zwischen 3 und 5 Wochen, abhängig vom Alter, sowie der Frakturstabilisierung der Versuchstiere (Histing et al., 2011). Zur Untersuchung dieser späten Phase der Frakturheilung wurde in dieser Studie eine Tötung 5 Wochen post operationem gewählt.

Die Tiere wurden mittels intraperitonealer Gabe von Ketaminhydrochlorid und Xylazin narkotisiert. Vorteil der Injektionsnarkose gegenüber der inhalativen Narkose ist die einfachere Durchführbarkeit. Im Weiteren ist die Handhabung bzw. Lagerung der Tiere während des operativen Eingriffes einfacher. Sowohl Ketamine als auch Isofluran können die inflammatorischen Prozesse im Rahmen der Frakturheilung beeinflussen (Histing et al., 2011). So konnte nachgewiesen werden, dass Ketamin die Aktivität des Tumornekrosefaktors α (TNF α) sowie die Endotoxin-assoziierte Mortalität vermindert (Koga et al., 1994).

Die postoperative Schmerztherapie erfolgte in dieser Arbeit mit Carprofen (Rimadyl, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland). Die Wirkung der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAID) basiert auf einer Hemmung der Cyclooxygenase (COX) (Spiro et al., 2010). Zur Verwendung von NSAIDs zur postoperativen Schmerztherapie in tierexperimentellen Studien gibt es kontroverse Ergebnisse und Aussagen bezüglich des Einflusses dieser Medikamentengruppe auf den Prozess der Frakturheilung (O'Connor et al., 2014). Ver-

schiedene Studien konnten zeigen, dass die Gabe von nichtsteroidalen Antiphlogistika keinen signifikanten Einfluss auf die Frakturheilung hat (Mullis et al., 2006; Utvåg et al., 2010). Auf der anderen Seite konnte nachgewiesen werden, dass Parecoxib, Indomethacin und Diclofenac einen negativen Einfluss auf die Biegesteifigkeit des Knochens haben (Beck et al., 2003; Dimmen et al., 2009). So kann letztendlich nicht sicher ausgeschlossen werden, dass durch die Gabe von NSAIDs die Frakturheilung beeinflusst wird (Histing et al., 2011).

Am Ende der Standzeit (2 und 5 Wochen) erfolgte die Tötung der Versuchstiere zur biomechanischen, histologischen und proteinbiomechanischen Untersuchung. Die radiologische Auswertung erfolgte anhand von Röntgenaufnahmen. Röntgenuntersuchungen, sowie 2D- und 3D-Mikro-CT-Untersuchungen stellen Standardverfahren zur radiologischen Beurteilung der Knochenheilung dar (Augat et al., 2005; Garcia et al., 2008b).

Die biomechanische Testung kann mittels 3-Punkt- oder 4-Punkt-Biegung oder mittels Rotationstestung als etablierte Verfahren durchgeführt werden. Prinzipiell ist die 4-Punkt-Biegung aufgrund der besseren Kraftverteilung vorzuziehen, jedoch ist diese Untersuchung aufgrund der geringen Größe des Mausfemurs von nur ca. 15 mm nicht zu realisieren, weshalb in dieser Arbeit die 3-Punkt-Biegemessung verwendet wurde (Burstein & Frankel, 1971; Manigrasso & O'Connor, 2004). Um standardisierte Untersuchungsbedingungen zu schaffen, wurden die Femora in gleicher Weise immer mit der ventralen Seite nach oben auf die beiden Auflagestempel positioniert. Der Abstand der Stempel betrug 6 mm. Die Messung wurde zerstörungsfrei durchgeführt, um eine weitere Analyse des Knochens zu gewährleisten.

Die histomorphometrische Quantifizierung des Kallusgewebes erfolgte nach der Methode von Gerstenfeld et al. (2005). Hierdurch konnten die verschiedenen Gewebeanteile des Frakturkallus beurteilt werden. Diese Messungen wurden durch ein Punktesystem zur Bewertung der Kallusqualität ergänzt. Hierbei wurden beide Kortices im Bereich des Frakturspaltes auf ihre Gewebeart hin analysiert und bewertet (Garcia et al., 2008b). Um reproduzierbare Untersuchungsergebnisse zu erhalten, erfolgte diese Bestimmung gemäß der Empfehlung der American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) anhand sagittaler longitudinaler Schnitte in Höhe des Frakturspaltes im Bereich des maximalen Femurdurchmessers (Parfitt et al., 1987).

Die proteinbiochemische Auswertung erfolgte mittels Western Blot-Analyse ausschließlich an den Tieren 14 Tage postoperativ. Nach 35 Tagen postoperativ kann aufgrund

des bereits laufenden Remodelings nicht mehr genügend Kallusgewebe des Knochens gewonnen werden (Holstein et al., 2007b).

Die derzeitige Dosierung von Sildenafil in Studien am Mausmodell ist wesentlich höher als der aktuelle Behandlungsstandard beim Menschen (Au et al., 2013). Die in dieser Arbeit gewählte Sildenafildosierung von 5 mg/kg/KG ist fünffach höher als die Standarddosis (0,7-1,5 mg/kg/KG). Die Dosierung wurde in Anlehnung der aktuellen Literatur gewählt. Die Metabolisierung bei Nagern ist deutlich schneller als beim Menschen. Die Halbwertszeit des Sildenafils beträgt bei der Maus 1 Stunde. Im Vergleich dazu beträgt die Halbwertszeit beim Menschen 4 Stunden.

Auch andere Studien mit einer Dosierung von 10mg/kg/KG Sildenafil per os konnten einen positiven Effekt, im Sinne einer beschleunigten Frakturheilung, nachweisen (Yaman et al., 2011). Die Arbeitsgruppe Yaman et al. untersuchte den Effekt von Sildenafil auf die Frakturheilung an Wistar-Albino-Ratten. Es wurden zwei Gruppen (n=21) gebildet. Während die Kontroll-Gruppe Standarddiätfutter erhielt, wurden die Tiere der anderen Sildenafil-Gruppe für 30 Tage täglich mit 10mg/kg KG gefüttert. Anschließend wurden Tibiadeфекte von 3x3x2 mm erzeugt. 7 Tiere wurden nach 7 Tagen zur histologischen Untersuchung getötet. Weitere 7 Tiere wurden nach 15 Tagen zur 3D-tomographischen Analyse und die restlichen 7 Tiere nach 30 Tagen zur biomechanischen Untersuchung getötet. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Sildenafil ebenfalls die Frakturheilung vor allem in der inflammatorischen Phase sowie in der Reparaturphase positiv beeinflusst.

5.2 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Arbeit konnten zeigen, dass die Behandlung mit Sildenafil zu einer früheren knöchernen Durchbauung des Frakturspaltes führt und die Biegesteifigkeit der Knochen signifikant erhöht. Zudem war die Kallusfläche bei einem verminderten Anteil an Knorpelgewebe signifikant kleiner. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass Sildenafil in der Lage ist, den Frakturheilungsprozess durch einen beschleunigten Remodelingprozess zu verbessern.

Die verbesserte Heilung durch die Gabe von Sildenafil ist wahrscheinlich über einen CYR61 vermittelten Mechanismus bedingt. Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass CYR61 im Frakturkallus exprimiert wird und die Migration von Endothelzellen, sowie die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten stimuliert (Babic et al., 1998; Hadjiargyrou et al., 2000; Lienau et al., 2006; Schütze et al., 1998; Si et al., 2006).

Hadjiargyrou et al. konnten in einem Frakturmodell der Ratte zeigen, dass die CYR61 Expression mit der Phase der Chondrogenese korreliert. Die Autoren postulieren deshalb, dass CYR61 eine wichtige Rolle während der enchondralen Ossifikation spielt. Allerdings konnten sie auch nachweisen, dass reife Osteozyten im Kallusgewebe ebenfalls CYR61 exprimieren und vermuten, dass verschiedene osteogene Wachstumsfaktoren über Regulation der CYR61 Expression die Frakturheilung beeinflussen. (Hadjiargyrou et al., 2000). Andere Autoren vermuten, dass durch die erhöhte Expression von CYR61 durch die Gabe von 1 Alpha, 25 dihydroxyvitamin D3 (1,25-(OH)2D3), ein potenter Stimulator der Osteoblastendifferenzierung, CYR61 eine wichtige Rolle für die Osteoblastenfunktion spielt (Schütze et al., 1998). So führte eine Hemmung der CYR61 Expression zu einer signifikant verminderten Wnt3A induzierten Differenzierung der Osteoblasten (Si et al., 2006). Dass CYR61 nicht nur eine wichtige Rolle während der enchondralen Ossifikation spielt, konnten Lienau et al. zeigen. Die Arbeitsgruppe untersuchte die Frakturheilung am Schafsmodell nach rigider und weniger rigider Versorgung mittels Fixateur externe und konnte nachweisen, dass in der Gruppe mit der geringeren Stabilität deutlich mehr Knorpelgewebe gebildet wurde und dieses auch länger im Kallusgewebe nachweisbar war. Die CYR61 Expression war allerdings in dieser Studie vermindert. Insgesamt war die Heilung verzögert und die biomechanische Steifigkeit des Kallusgewebes geringer. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die verzögerte Knochenheilung mit der längeren Nachweisbarkeit von Knorpel im Kallusgewebe und einer geringeren Differenzierung der Chondrozyten auf die erniedrigte Expression des CYR61 zurückzuführen sei (Lienau et al., 2006). Möglicherweise führte die erhöhte Expression von CYR61 nach Gabe von Sildenafil zu einem Abbau des Knorpelgewebes im Sinne eines Remodellingprozesses.

Dementsprechend konnten die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass eine erhöhte CYR61 Expression nach Gabe von Sildenafil die Frakturheilung verbessert, was sich in einer signifikant höheren Biegesteifigkeit der Knochen widerspiegelt. Somit ist davon auszugehen, dass CYR61 in der Lage ist, sowohl über eine chondrogene als auch über eine osteogene Regulation die Frakturheilung zu beeinflussen.

Bisher gibt es keine Untersuchungen darüber, ob oder wie Sildenafil die Expression von CYR61 erhöht. Jedoch konnten andere Studien zeigen, dass Sildenafil das cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) genauso wie die CREB Phosphorylierung erhöht (Puerta et al., 2010; Puzzo et al., 2009). Bekannt ist, dass dieses Protein in der Lage ist, den CYR61-Promotor (Han et al., 2003) als auch die CYR61 Expression zu

stimulieren (Meyuhas et al., 2008). Somit ist zu vermuten, dass Sildenafil die CYR61 Expression über einen CREB vermittelten Signalweg erhöht.

Eine signifikante Beeinflussung des RANKL/RANK und OPG-Systems, welche den Knochenauf- und abbau reguliert, konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. RANKL ist in der Lage durch Bindung an RANK in der Zellmembran von Osteoklasten und deren Aktivierung eine Differenzierung der Osteoklasten und damit eine Stimulation der Knochenresorption zu induzieren. OPG hingegen interferiert mit der RANKL/RANK-Bindung und hemmt somit den Knochenabbau (Fardellone et al., 2014; Hofbauer & Heufelder, 2001; Lacey et al., 1998; Simonet et al., 1997). In dieser Arbeit war die Expression von OPG nach Gabe von Sildenafil erhöht, während die Expression von RANKL erniedrigt war. Die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant. Deshalb ist davon auszugehen, dass die beschleunigte Frakturheilung nach Behandlung mit Sildenafil nicht auf die Beeinflussung des RANKL/RANK-OPG-Systems zurückzuführen ist.

Die Vaskularisation des Gewebes ist einer der wichtigsten Einflussfaktoren auf den Prozess der Knochenbruchheilung (Keramaris et al., 2008). Vor allem während der enchondralen Ossifikation spielt die Angiogenese eine wichtige Rolle (Augustin et al., 2007; Harper & Kalgsbrun, 1999). Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass eine Hemmung der Angiogenese während der Frakturheilung zu einer verzögerten Heilung bzw. Pseudarthrose des Knochens führt (Hausman et al., 2001).

Eine Fragestellung der Arbeit war, ob Sildenafil durch den angiogenen Effekt die Frakturheilung verbessert. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass VEGF als proangiogener Wachstumsfaktor die Frakturheilung signifikant verbessert (Colnot et al., 2003; Eckardt et al., 2005; Street et al., 2002; Tarkka et al., 2003) und die osteogene Differenzierung beeinflusst (Clark et al., 2014). Zudem konnte gezeigt werden, dass VEGF einen positiven Effekt auf die CYR61 Expression in Osteoblasten hat (Athanasopoulos et al., 2007). Eine Beteiligung von VEGF an unterschiedlichen Reparationsvorgängen der Knochenbruchheilung konnte bereits 1999 durch Ferguson et al. nachgewiesen werden. Im intakten, nicht frakturierten Knochen lässt sich VEGF allerdings nicht nachweisen (Pufe et al., 2002). In einer humanen Studie von Sarahrudi et al. (2009) konnte gezeigt werden, dass die VEGF-Konzentration bei Patienten mit einer Verzögerung der Frakturheilung erhöht war.

In der hier vorliegenden Studie hatte die Gabe von Sildenafil keinen signifikanten Effekt auf die VEGF-Expression im Frakturkallus.

Die Expression von eNOS war durch die Sildenafilgabe signifikant geringer. Im Gegensatz dazu konnte Salloum et al. (2003) nachweisen, dass Sildenafil zu einer erhöhten Expression von eNOS und iNOS führt. Die Autoren postulierten daher, dass die Wirkung von Sildenafil über einen eNOS/iNOS-abhängigen Mechanismus reguliert wird. Allerdings konnte eine andere Studie zeigen, dass bei eNOS- und iNOS-defizienten Mäusen die Behandlung mit Sildenafil die Angiogenese ebenfalls stimuliert (Senthilkumar et al., 2007).

In einer weiteren Studie wurde der Effekt von Sildenafil auf die Angiogenese bei Apolipoprotein E-defizienten Mäusen untersucht. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass Sildenafil keinen Einfluss auf die NO-Expression bzw. die Expression der Wachstumsfaktoren VEGF und HIF-1alpha hatte (Dussault et al., 2009). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Sildenafil den oxidativen Stress verminderte und die Autoren vermuten daher, dass Sildenafil durch den antioxidativen Effekt die Angiogenese verbessert.

5.3 Schlussfolgerungen

Die Fragestellung dieser Arbeit konnte mit Hilfe dieser tierexperimentellen Studie hinreichend geklärt werden. Sildenafil verbessert die Frakturheilung im Mausmodell. Die Knochen der Tiere, die mit Sildenafil behandelt wurden, zeigten eine frühere knöcherne Durchbauung des Frakturspaltes. Die Biegesteifigkeit war signifikant erhöht und insgesamt war der Remodellingprozess beschleunigt. Anhand der Western-Blot Untersuchungen kann postuliert werden, dass Sildenafil die Frakturheilung über einen CYR61 assoziierten Signalweg stimuliert.

6. Literaturverzeichnis

1. Adams DS, Klevjer-Anderson P, Carlson JL, Mc Guire TC, Gorham JR. (1983). Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am J Vet Res* 44(9):1670-1675
2. Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. (2008). Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res* 87(2):107-118
3. An Y, Friedman RJ, Parent T, Draughn RA. (1994). Production of a standard closed fracture in the rat tibia. *J Orthop Trauma* 8(2):111-115
4. Arnault F, Maitre P, Cachon T, Carozza C, Fau D, Genevois JP, Viguier E. (2011). Treatment of a nonunion, secondary to gunshot fracture, of the distal radius with circular external fixation and rhBMP-2 in a cat. *Vet Comp Orthop Traumatol* 24(4):289-293
5. Aro HT, Wippermann BW, Hodgson SF, Chao EY. (1990). Internal remodeling of periosteal new bone during fracture healing. *J Orthop Res.* 8(2):238-246
6. Ashhurst DE, Hogg J, Perren SM. (1982). A method for making reproducible experimental fractures of the rabbit tibia. *Injury* 14(3):236-242
7. Ashman DF, Lipton R, Melicow MM, Price TD. (1963). Isolation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun* 11:330-334
8. Athanasopoulos AN, Schneider D, Keiper T, Alt V, Pendurthi UR, Lieqibel UM, Sommer U, Nawroth PP, Kasperk C, Chavakis T. (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced up-regulation of CCN1 in osteoblasts mediates proangiogenic activities in endothelial cells and promotes fracture healing. *J Biol Chem* 282(37):26746-26753
9. Au A, Stuyt JG, Chen D, Alagramam K. (2013). Ups and downs of viagra : revisiting ototoxicity in the mouse model. *PLoS One.* 8(11):e79226
10. Augat P, Burger J, Schorlemmer S, Henke T, Peraus M, Claes L. (2003). Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model. *J Orthop Res* 21(6):1011-1017
11. Augat P, Simon U, Liedert A, Claes L. (2005). Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. *Osteoporos Int* 16 Suppl 2:36-43
12. Augustin G, Antabak A, Davila S. (2007). The periosteum. Part 1: anatomy, histology and molecular biology. *Injury* 38(10):1115-1130

13. Bab IA, Haijbi-Yonissi C, Gabet Y, Müller R. (2007). *Micro-Tomographie Atlas of the Mouse Skeleton*. Springer Science and Business Media
14. Babic AM, Kireeva ML, Kolesnikova TV, Lau LF. (1998). CYR61, a product of a growth factor inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(11):6355-6360
15. Bak B, Jensen KS. (1992). Standardization of tibial fractures in the rat. *Bone* 13(4):289-295
16. Banovac K, Renfree K, Makowski AL, Latta LL, Altman RD. (1995). Fracture healing and mast cells. *J Orthop Trauma* 9(6):482-490
17. Beavo JA. (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 75(4):725-748
18. Beck A, Krischak G, Sorg T, Augat P, Farker K, Merkel U, Kinzi L, Claes L. (2003). Influence of diclofenac (group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs) on fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 123(7):327-332
19. Bender AT & Beavo JA. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev.* 58(3):488-520
20. Bonnarens F, Einhorn TA. (1984). Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 2(1):97-101
21. Boolell M, Allen MJ, Ballard SA, Gepi-Attee S, Muirhead GJ, Naylor AM, Osterloh IH, Gingell C. (1996a). Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int J Impot Res.* 8(2):47-52
22. Boolell M, Gepi-Attee S, Gingell JC, Allen MJ. (1996b). Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction. *Br J Urol.* 78(2):257-261
23. Boswell-Smith V, Spina D, Page CP. (2006). Phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol* 147(1):252-257
24. Bourque WT, Gross M & Hall BK. (1992). A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Lab Anim Sci* 42(4): 369-374
25. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423(6937):337-342
26. Brighton CT & Hunt RM. (1997). Early histologic and ultrastructural changes in microvessels of periosteal callus. *J Orthop Trauma* 11(4):244-253
27. Brown ML, Yukata K, Farnsworth CW, Chen DG, Awad H, Hilton MJ, o'Keefe RJ, Xing L, Mooney RA, Zuscik MJ. (2014). Delayed fracture healing and increased callus adiposity in a C57BL/6J murine model of obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *PLoS One* 9(6):e99656

28. Burstein AH & Frankel VH. (1971). A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech* 4(2):155-158
29. Chao EY, Aro HT, Lewallen DG, Kelly PJ. (1989). The effect of rigidity on fracture healing in external fixation. *Clin Orthop Relat Res* 241:24-35
30. Charbonneau H. (1990). *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Function, Regulation and Drug Action* (Beavo J & Houslay MD eds) pp. 267-296, John Wiley & Sons, Inc., New York
31. Cheal EJ, Mansmann KA, DiGioia AM 3rd, Hayes WC, Perren SM. (1991). Role of interfragmentary strain in fracture healing: ovine model of a healing osteotomy. *J Orthop Res* 9(1):131-142
32. Cheitlin MD, Huttler AM Jr, Brindis RG, Ganz P, Kaul S, Russell RO Jr, Zusman RM. (1999). ACC/AHA expert consensus document. Use of sildenafil (Viagra) in patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 33:273-282
33. Cheung KM, Kaluarachi K, Andrew G, Lu W, Chan D, Cheah KS. (2003). An externally fixed femoral fracture model for mice. *J Orthop Res* 21(4):685-690
34. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. (2002). Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 17:513-520
35. Chuang T, Strauss JD, Murphy RA, Steers WD. (1998). Sildenafil, a type-5 cGMP phosphodiesterase inhibitor, specifically amplifies endogenous cGMP-dependent relaxation in Rabbit corpus cavernosum smooth muscle in vitro. *J Urol* 160(1):257-261
36. Claes L, Eckert-Hubner K, Augat P. (2002). The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J Orthop Res* 20(5):1099-1105
37. Claes L, Schmalenbach J, Herrmann M, Olkü I, Garcia P, Histing T, Obeid R, Schorr H, Herrmann W, Pohlemann T, Menger MD, Holstein JH. (2009). Hyperhomocysteinemia is associated with impaired fracture healing in mice. *Calcif Tissue Int* 85(1):17-21
38. Clark D, Wang X, Chang S, Czajka-Jakubowska A, Clarkson BH, Liu J. (2014). VEGF promotes osteogenic differentiation of ASCs on ordered fluorapatite surfaces. *J Biomed Mater Res A* May 5
39. Clark HB Jr. & Hayes PA. (1963). A study of the comparative effects of "rigid" and "semirigid" fixation on the healing of fractures of the mandible in dogs. *J Bone Joint Surg Am* 45-A:731-741

40. Colglazier CL, Sutej PG, O'Rourke KS. (2005). Severe refractory fingertip ulcerations in a patient with scleroderma: successful treatment with sildenafil. *J Rheumatol* 32:2440-2442
41. Colnot C, Thompson Z, Miclau T, Werb Z, Helms JA. (2003). Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development* 130: 4123-4133
42. Connolly CK, Li G, Bunn JR, Mushipe M, Dickson GR, Marsh DR. (2003). A reliable externally fixated murine femoral fracture model that accounts for variation in movement between animals. *J Orthop Res* 21(5):843-849
43. Corbin JD & Francis SH. (1999). Cyclic GMP Phosphodiesterase-5: Target of Sildenafil. *J Biol Chem* 274(20):13729-13732
44. Corbin JD. (2004). Mechanisms of action of PDE5 inhibition in erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 16:4-7
45. Critchlow MA, Bland YS, Ashhurst DE. (1995). The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit. *Bone* 16(5):521-527
46. Danckwardt-Lilliestrom G, Lorenzi GL, Olerud S. (1970). Intramedullary nailing after reaming. An investigation on the healing process in osteotomized rabbit tibiae. *Acta Orthop Scand Suppl* 134:1-78
47. Davy DT & Connolly JF. (1982). The biomechanical behavior of healing canine radii and ribs. *J Biomech* 15(4):235-247
48. Deibert MC, McLeod BR, Smith SD, Liboff AR. (1994). Ion resonance electromagnetic field stimulation of fracture healing in rabbits with a fibular osteotomy. *J Orthop Res* 12(6):878-885
49. Dimmen S, Nordsletten L, Madsen JE. (2009). Parecoxib and indomethacin delay early fracture healing: a study in rats. *Clin Orthop Relat Res* 467:1992-1999
50. Doi Y, Miyazaki M, Yoshiiwa T, Hara K, Kataoka M, Tsumura H. (2011). Manipulation of the anabolic and catabolic responses with BMP-2 and zoledronic acid in a rat femoral fracture model. *Bone* 49(4):777-782
51. Dussault S, Maingrette F, Ménard C, Michaud SE, Haddad P, Groleau J, Turgeon J, Perez G, Rivard A. (2009). Sildenafil increases endothelial progenitor cell function and improves ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. *Hypertension* 54:1043-1049
52. Eckardt H, Ding M, Lind M, Hansen ES, Chritensen KS, Hvid I. (2005). Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. *J Bone Joint Surg Br* 87:1434-1438
53. Egger EL, Gottsauner-Wolf F, Palmer J, Aro HT, Chao EY. (1993). Effects of axial dynamization on bone healing. *J Trauma* 34(2):185-192

54. Einhorn TA. (1998). The cell and molecular biology of fracture healing. *ClinOrthop*: S7-12
55. Fardellone P, Séjourné A, Paccou J, Goëb V. (2014). Bone remodelling markers in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm* 2014:484280
56. Fawcett L, Baxendale R, Stacey P, McGrouther C, Harrow I, Soderling S, Hetman J, Beavo JA, Phillips SC. (2000). Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family:PDE11A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3702-3707
57. Ferreira-Melo SE, Yugar-Toledo JC, Coelho OR, De Luca IM, Tanus-Santos JE, Hyslop S, Irigoyen MC, Moreno H Jr. (2006). Sildenafil reduces cardiovascular remodeling associated with hypertensive cardiomyopathy in NOS inhibitor-treated rats. *Eur J Pharmacol.* 542(1-3):141-147
58. Fisher DA, Smith JF, Pillar JS, St Denis SH, Cheng JB. (1998). Isolation and characterisation of PDE8A, a novel human cAMP-specific phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 246:570-577
59. Fleisch H. (1997). Bisphosphonates: mechanisms of action and clinical use in osteoporosis - an update. *Horm Metab Res* 29:145-150
60. Francis SH & Corbin JD. (2005). Sildenafil: efficacy, safety, tolerability and mechanism of action in treating erectile dysfunction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 1(2):283-293
61. Freilich M, Wen B, Shafer D, Schleier P, Dard M, Pendrys D, Ortiz D, Kuhn L. (2011). Implant-guided vertical bone growth in the mini-pig. *Clin Oral Implants Res* 23(6):751-757
62. Friedman RJ, An YH, Ming J, Draughn RA, Bauer TW. (1996). Influence of bio-material surface texture on bone ingrowth in the rabbit femur. *J Orthop Res* 14(3):455-464
63. Galiè N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, Fleming T, Parpia T, Burgess G, Branzi A, Grimminger F, Kurzyna M, Simonneau G. (2005). Sildenafil Citrate Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* 353:2148-2157
64. Garcia P, Holstein JH, Histing T, Burkhardt M, Culemann U, Pizanis A, Wirbel RJ, Pohlemann T, Menger MD. (2008a). A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: Impact of stability on fracture healing. *J Biomech* 41(8):1689-1696
65. Garcia P, Holstein JH, Maier S, Schaumlöffel H, Al-Marrawi F, Hannig M, Pohlemann T, Menger MD. (2008b). Development of a reliable non-union model in mice. *J Surg Res* 147:84-91

66. Gardner MJ, van der Meulen MC, Demetropoulos D, Wright TM, Myers ER, Bostrom MP. (2006). In vivo cyclic axial compression affects bone healing in the mouse tibia. *J Orthop Res* 24(8):1679-1686
67. Gerstenfeld LC, Sacks DJ, Pellis M, Mason ZD, Graves DT, Barrero M, Ominsky MS, Kostenuik PJ, Morgan EF, Einhorn TA. (2009). Comparison of effects of the biophosphonat alendronate versus the RANKL inhibitor denosumab on murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 24(2):196-208
68. Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA. (2005). Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. *J Bone Miner Res* 20(10):1715-1722
69. Ghofrani HA, Osterloh IH, Grimminger F. (2006). Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nat. Rev Drug Discov* 5(8):689-702
70. Goldberg VM, Powell A, Shaffer JW, Zika J, Bos GD, Heiple KG. (1985). Bone grafting: role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res* 3(4):389-404
71. Goldstein I, Lue TF, Padma-Nathan H, Rosen RC, Steers WD, Wicker PA. (1998). Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. *N Engl J Med* 338:1397-1404
72. González-Torres LA, Gómez-Benito MJ, García-Aznar JM. (2011). Evaluation of residual stresses due to bone callus growth: a computational study. *J Biomech* 44(9):1782-1787
73. Grimes R, Jepsen KJ, Fitch JL, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. (2011). The transcriptome of fracture healing defines mechanisms of coordination of skeletal and vascular development during endochondral bone formation. *J Bone Miner Res* 26(11):2597-2609
74. Gurgel B, Rineiro F, Silva M, Nociti F, Sallum A, Sallum E, Toledo S, Casati MZ. (2005). Selective COX-2 inhibitor reduces bone healing in bone defects. *Braz Oral Res* 19(4):312-316
75. Hadjargyrou M, Ahrens W, Rubin CT. (2000). Temporal expression of the chondrogenic and angiogenic growth factor CYR61 during fracture repair. *J Bone Miner Res.* 15(6):1014-1023
76. Hamet P, Coquil JF. (1978). Cyclic GMP binding and cyclic GMP phosphodiesterase in rat platelets. *J Cyclic Nucleotide Res.* 4(4):281-290
77. Han JS, Macarak E, Rosenbloom J, Chung KC, Chagour B. (2003). Regulation of CYR61/CCN1 gene expression through RhoA GTPase and p38MAPK signaling pathways. *Eur J Biochem* 270:3408-3421

78. Henkenson KD, Zimmerman G, Marcucio R. (2014). Biological perspectives of delayed fracture healing. *Injury Suppl* 2:8-15
79. Hankenson KD, Sishowitz M, Chancellor G, Schenker M. (2011). Angiogenesis in bone regeneration. *Injury, Int J Care Injured* 42:556-561
80. Hansen TB, Meier M, Møller MC, Larsen K, Stilling M. (2011). Primary cup fixation with different designs of trapeziometacarpal total joint trapezium components: a radiostereometric analysis in a pig bone model. *J Hand Surg Eur Vol* 36(4):285-290
81. Harper J, Kalgsbrun M. (1999). Cartilage to bone - angiogenesis leads the way. *Nat Med* 5:617-618
82. Hausman MR, Schaffler MB, Majeska RJ. (2001). Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone* 29(6):560-564
83. Heckman JD, Boyan BD, Aufdemorte TB, Abbott JT. (1991). The use of bone morphogenetic protein in the treatment of non-union in a canine model. *J Bone Joint Surg Am* 73(5):750-764
84. Heino T, Chagin A, Takigawa M, Savendahl L. (2008). Effects of alendronate and pamidronate on cultured rat metatarsal bones: failure to prevent dexamethasone-induced growth retardation. *Bone* 42(4):702-709
85. Henry WB Jr., Schachar NS, Wadsworth PL, Castronovo FP Jr., Mankin HJ. (1985). Feline model for the study of frozen osteoarticular hemijoint transplantation: qualitative and quantitative assessment of bone healing. *Am J Vet Res* 46(8):1714-1720
86. Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P. (1995). An experimental model for non-union in rats. *Injury* 26(10):681-686
87. Hiltunen A, Vuorio E & Aro HT. (1993). A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res* 11:305-312
88. Histing T, Anton C, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger MD. (2012). Melatonin Impairs Fracture Healing by Suppressing RANKL-Mediated Bone Remodeling. *J Surg Res* 173(1):83-90
89. Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke MW, Wehner T, Bindl R, Recknagel S, Stuermer EK, Vollmar B, Wildemann B, Lienau J, Willie B, Peters A, Ignatius A, Pohlemann T, Claes L, Menger MD. (2011). Small animal bone healing models: Standards, tips and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 49(4):591-599
90. Histing T, Garcia P, Matthys R, Leidinger M, Holstein JH, Kristen A, Pohlemann T, Menger MD. (2010). An internal locking plate to study intramembranous bone healing in a mouse femur fracture model. *J Orthop Res* 28(3):397-402

91. Histing T, Holstein JH, Garcia P, Matthys R, Kristen A, Claes L, Menger MD, Pohlemann T. (2009). Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture. *J Orthop Res* 27:1152-1156
92. Ho KW, Gilbody J, Jameson T, Miles AW. (2010). The effect of 4 mm bicortical drill hole defect on bone strength in a pig femur model. *Arch Orthop Trauma Surg* 130(6):797-802
93. Hofbauer LC, Heufelder AE. (2001). Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 79:243-253
94. Holstein JH, Garcia P, Histing T, Kristen A, Scheuer C, Menger MD, Pohlemann T. (2009a). Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration *J Orthop Trauma* 23:31-38
95. Holstein JH, Matthys R, Histing T, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Meier C, Pohlemann T, Menger MD. (2009b). Development of a Stable Closed Femoral Fracture Model in Mice. *J Surg Res* 153(1):71-75.
96. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T. (2007). Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech* 40:215-219
97. Holstein JH, Menger MD, Scheuer C, Meier C, Culemann U, Wirbel RJ, Garcia P, Pohlemann T. (2007b). Erythropoietin (EPO): EPO-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing. *Life Sci.* 80(10):893-900
98. Horikiri Y, Shimo T, Kurio N, Okui T, Marsumoto K, Masahiro I, Sasaki A. (2013). Sonic hedgehog regulates osteoblast function by focal adhesion kinase signaling in the process of fracture healing. *PLoS One* 8(10):e76785
99. Houdebine LM. (2007). Transgenic animal models in biomedical research. *Methods Mol Biol* 360:163-202
100. Hyland R, Roe EG, Jones BC, Smith DA. (2001). Identification of the Cytochrome P450 enzymes involved in the N-demethylation of sildenafil. *Br J Clin Pharmacol.* 51(3):239-248
101. Isefuku S, Joyner CJ, Reed AA, Simpson AH. (2004). Distraction osteogenesis in the *Cbfa-1*^{+/-} mouse. *J Orthop Res* 22(6):1276-1282
102. Jacenko O, Olsen BR. (1995). Transgenic mouse models in studies of skeletal disorders. *J Rheumatol* 43:39-41
103. Jäger M, Ott CE, Grünhagen J, Hecht J, Schell H, Mundlos S, Duda GN, Robinson PN, Lienau J. (2011). Composite transcriptome assembly of RNA-seq data in a sheep model for delayed bone healing. *BMC Genomics* 12:158

104. Johnson AL, Stein LE. (1988). Morphologic comparison of healing patterns in ethylene oxide-sterilized cortical allografts and untreated cortical autografts in the dog. *Am J Vet Res* 49(1):101-105
105. Junqueira LC, Carneiro J, Schiebler TH (Hrsg). (1996). *Histologie*, 4. Aufl. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
106. Junqueira LC, Carneiro J, Gratzl M (Hrsg). (2005). *Histologie*, 6. Aufl. Springer Medizin Verlag Heidelberg
107. Kamata Y, Kamimura T, Iwamoto M, Minota S. (2005). Comparable effects of sildenafil citrate and alprostadil on severe Raynaud's phenomenon in a patient with systemic sclerosis. *Clin Exp Dermatol* 30(4):451
108. Kaplan SJ, Hayes WC, Mudan P, Lelli JL, White AA. (1985). Monitoring the healing of a tibial osteotomy in the rabbit treated with external fixation. *J Orthop Res* 3(3):325-330
109. Kaspar K, Matziolis G, Strube P, Sentürk U, Dormann S, Bail HJ, Duda GN. (2008). A new animal model for bone atrophic nonunion: fixation by external fixator. *J Orthop Res* 26(12):1649-1655
110. Kaspar K, Schell H, Toben D, Matziolis G, Bail HJ. (2007). An easily reproducible and biomechanically standardized model to investigate bone healing in rats, using external fixation. *Biomed Tech (Berl)* 52(6):383-390
111. Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, Schemitsch EH, Giannoudis PV. (2008). Fracture vascularity and bone healing: A systematic review of the role of VEGF. *Injury*, 39S2:45-57
112. Koga K, Ogata M, Takenaka I, Matsumoto T, Shigematsu A. (1994). Ketamine suppresses tumor necrosis factor α activity and mortality in carrageenan-sensitized endotoxin shock model. *Circ Shock* 44:160-168
113. Kolln S, Schottle H, Dallek M, Jungbluth KH. (1983). Functional adaptation of the bones. Animal experiment studies on rats. *Unfallchirurgie* 9(3):120-124
114. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. (2001). Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF- κ B ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 16(6):1004-1014
115. Krischak GD, Augat P, Sorg T, Blakytyn R, Kinzl L, Claes L, Beck A. (2007b). Effects of diclofenac on periosteal callus maturation in osteotomy healing in an animal model. *Arch Orthop Trauma Surg* 127:3-9
116. Krishak GD, Augat P, Blakytyn R, Claes L, Kinzl L, Beck A. (2007a). The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac reduces appearance of osteoblasts in bone defect healing in rats. *Arch Orthop Trauma Surg* 127:453-458

117. Kukreja RC, Ockaili R, Salloum F, Yin C, Hawkins J, Das A, Xi L. (2004). Cardioprotection with phosphodiesterase-5 inhibition – a novel preconditioning strategy. *J Mol Cell Cardiol.* 36(2):165-173
118. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165
119. Le AX, Miclau T, Hu D, Helms JA. (2001). Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures. *J Orthop Res* 19(1):78-84
120. Lenehan TM, Balligand M, Nunamaker DM, Wood FE Jr. (1985). Effect of EHDP on fracture healing in dogs. *J Orthop Res* 3(4):499-507
121. Lettin AW. (1965). The effects of axial compression on the healing of experimental fractures of the rabbit tibia. *Proc R Soc Med* 58:882-886
122. Li G, White G, Connolly C, Marsh D. (2002). Cell proliferation and apoptosis during fracture healing. *J Bone Miner Res* 17(5):791-799
123. Li M, Healy DR, Li Y, Simmons HA, Crawford DT, Ke HZ, Pan LC, Brown TA, Thompson DD. (2005). Osteopenia and impaired fracture healing in aged EP4 receptor knockout mice. *Bone* 37(1):46-54
124. Lienau J, Schell H, Duda GN, Seebeck P, Muchow S, Bail HJ. (2005). Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability. *J Orthop Res* 23(3):639-645
125. Lienau J, Schell H, Epari DR, Schütze N, Jokob F, Duda GN, Bail HJ. (2006). CYR61 (CNN1) protein expression during fracture healing in an ovine tibial model and its relation to the mechanical fixation stability. *J Orthop Res* 24:254-262
126. Liu K, Li D, Huang X, Lv K, Ongodia D, Zhu L, Zhou L, Li Z. (2013). A murine femoral segmental defect model for bone tissue engineering using a novel rigid internal fixation system. *J Surg Res.* 183(2):493-502
127. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-275
128. Manassero M, Viateau V, Matthys R, Deschepper M, Vallefucio R, Bensidhoum M, Petite H. (2013). A novel murine femoral segmental critical-sized defect model stabilized by plate osteosynthesis for bone tissue engineering purposes. *Tissue Eng Part C Methods* 19(4):271-280
129. Manigrasso MB & O'Connor JP. (2004). Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma* 18:687-695

130. Marsell R, Jonsson KB, Cho TJ, Einhorn TA, Ohlsson C, Schipani E. (2007). Mice expressing a constitutively active PTH/PTHrP receptor in osteoblasts show reduced callus size but normal callus morphology during fracture healing. *Acta Orthop* 78(1):39-45
131. Matthys R, Perren SM. (2009). Internal fixator for use in the mouse. *Injury* 40 Suppl 4:103-109
132. Meyuhas R, Pikarsky E, Tavor E, Klar A, Abramovitch R, Hochman J, Lago TG, Honigman A. (2008). A key role for cyclic AMP-responsive element binding protein in hypoxia-mediated activation of the angiogenesis factor CCN1 (CVR61) in tumor cells. *Mol Cancer Res.* 6(9):1397-1409
133. Mittleman MA, Glasser DB, Orazem J. (2003). Clinical trials of Sildenafil citrate (Viagra) demonstrate no increase in risk of myocardial infarction and cardiovascular death compared with placebo. *Int J Clin Pract* 57(7):597-600
134. Moll KJ & Moll M. (2002). *Kurzlehrbuch Anatomie*, 17. Aufl. Urban & Fischer Verlag München, Jena
135. Mountziaris PM, Mikos AG. (2008). Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 14(2):179-186
136. Müller ME, Allgöwer M, Schneider R, Willenegger H. (1991). *Manual of Internal Fixation*. 3. Auflage S.118 ff. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York/Tokyo
137. Muirhead GJ, Rance DJ, Walker DK, Wastall P. (2002). Comparative human pharmacokinetics and metabolism of single-dose oral and intravenous sildenafil. *Br J Clin Pharmacol* 53 Suppl 1:13-20
138. Muller J, Schenk R, Willenegger H. (1968). Experimental studies on the development of reactive pseudarthroses on the canine radius. *Helv Chir Acta* 35(1):301-308
139. Mullis BH, Copland ST, Weinhold PS, Miclau T, Lester GE, Bos GD. (2006). Effect of Cox-2 inhibitors and non-steroidal anti-inflammatory drugs on a mouse fracture model. *Injury* 37(9):827-837
140. Mundy GR. (1992). Cytokines and local factors which affect osteoclast function. *Int J Cell Clon* 10(4):215-222
141. Mundy GR. (1993). Factors which stimulate bone growth in vivo. *Growth Reg* 3(2):124-128
142. Nagatani T, Mori R, Wang Y, Nakai T, Ozoe N, Uchio Y. (2010). Optimum predrilled hole size for bone screws used in osteochondral fixation : in vitro biomechanical study and clinical case. *J Orthop Sci* 15(2):245-250
143. Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirato S, Kitamura Y, Oikawa S, Ono K, Takaoka K. (1994). Transient and localized expression of bone mor-

- phogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* 9(5):651-659
144. Nakata K, Kawai N, Sato M, Cao G, Sahara S, Sonomura T, Takasaka I, Minamiguchi H, Nakai M. (2011). Bone marrow nails created by percutaneous osteoplasty for long bone fracture: comparisons among acrylic cement alone, acrylic-cement-filled bare metallic stent, and acrylic-cement-filled covered metallic stent. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 34(3): 609-614
145. Nakata K, Kawai N, Sato M, Cao G, Sahara S, Tanihata H, Takasaka I, Minamiguchi H, Nakai T. (2010). Percutaneous osteoplasty with a bone marrow nail for fractures of long bones: experimental study. *J Vasc Interv Radiol* 21(9):136-141
146. Newton CD & Zeitlin S. (1977). Avian fracture healing. *J Am Vet Med Assoc* 170(6):620-625
147. Nichols DJ, Muirhead GJ, Harness JA. (2002). Pharmacokinetics of sildenafil citrate after single oral doses in healthy male subjects: absolute bioavailability, food effects and dose proportionality. *Br J Clin Pharmacol* 53 Suppl 1:5-12
148. Niu Z, Wang L, Hu X, Wang H, Ouyang J, Huang W, Yu L, Qiu X. (2011). Promotion effect of nuclear factor kappa B p65 on early fracture healing of rat radius by elevating prostaglandins E2 production and regulating inhibitor of DNA binding 2 protein expression. *Chin J Reparat Reconst Surg* 25(5):569-574
149. Nomura S, Takano-Yamamoto T. (2000). Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol* 19(2):91-96
150. Nunamaker DM & Perren SM. (1979). A radiological and histological analysis of fracture healing using prebending of compression plates. *Clin Orthop Relat Res* 138:167-174
151. Nunamaker DM. (1998). Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* (355 Suppl): 56-65
152. Nunamaker DM, Richardson DW, Butterweck DM. (1991). Mechanical and biological effects of plate luting. *J Orthop Trauma* 5:138-145
153. Ochman S, Doht S, Paletta J, Langer M, Raschke MJ, Meffert RH. (2010). Comparison between locking and non-locking plates for fixation of metacarpal fractures in an animal model. *J Hand Surg Am* 35(4):597-603
154. O'Connor JP, Manigrasso MB, Kim BD, Subramanian S. (2014). *Bonekey Rep* 3:517
155. Oetgen ME, Merrel GA, Troiano NW, Horowitz MC, Kacena MA. (2008). Development of a femoral non-union model in the mouse. *Injury* 39:1119-1126

156. Ohta S, Muramatsu H, Senda T, Zou K, Iwata H, Muramatsu T. (1999). Midkine is expressed during repair of bone fracture and promotes chondrogenesis. *J Bone Miner Res* 14(7):1132-1144
157. Olerud S & Danckwardt-Lillieström G. (1968). Fracture healing in compression osteosynthesis in the dog. *J Bone Joint Surg Br* 50:844-851
158. Oliver JJ, Melville VP, Webb DJ. (2006). Effect of regular phosphodiesterase type 5 inhibition in hypertension. *Hypertension* 48(4):622-627
159. Omori K & Kotera J. (2007). Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res.* 100(3):309-327
160. Parfitt AM. (1988). Bone remodeling. *Henry Ford Hosp Med J.* 36(3):143-144
161. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR histomorphometry nomenclature committee. *J Bone Miner Res* 2(6):595-610
162. Perren SM, Huggler A, Russenberger M, Allgower M, Mathys R, Schenk R, Willenegger H, Muller ME. (1969). The reaction of cortical bone to compression. *Acta Orthop Scand Suppl* 125:19-29
163. Peter CP, Cook WO, Nunamaker DM, Provost MT, Seedor JG, Rodan GA. (1996). Effect of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs. *J Orthop Res* 14(1):74-79
164. Pilla AA, Mont MA, Nasser PR, Khan SA, Figueiredo M, Kaufman JJ, Siffert RS. (1990). Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. *J Orthop Trauma* 4(3):246-253
165. Preininger B, Checa S, Molnar FL, Fratzl P, Duda GN, Raum K. (2011). Spatial-temporal mapping of bone structural and elastic properties in a sheep model following osteotomy. *Ultrasound Med Biol.* 37(3): 474-483
166. Puech B, Cameli M, Chancrin JL, Pierre C, Dufour M, Elizagaray A. (1990). Biointegration of massive bone allografts: imaging and histological studies in cat. *Biomaterials* 11:75-78
167. Puerta E, Hervias I, Barros-Minones L, Jordan J, Ricobaraza A, Cuadrado-Tejedor M, García-Osta A, Aquirre N. (2010). Sildenafil protects against 3-nitropropionic acid neurotoxicity through the modulation of calpain, CREB, and BDNF. *Neurobiol Dis* 38:237-245
168. Pufe T, Wildemann B, Petersen W, Mentlein R, Raschke M, Schmidmaier G. (2002). Quantitative measurement of the splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor in the time flow of fracture healing: a study in the rat. *Cell Tissue Res* 309:387-392

169. Puzzo D, Staniszewski A, Deng SX, Privitera L, Leznik E, Liu S, Zhang H, Feng Y, Palmeri A, Landry DW, Arancio O. (2009). Phosphodiesterase 5 inhibition improves synaptic function, memory, and amyloid-beta load in an Alzheimer's disease mouse model. *J Neurosci* 29(25):8075-8086
170. Rhinelander FW. (1974). Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 105: 34-81
171. Richardson DW & Nunamaker DM. (1991). Evaluation of plate luting, using an in vivo ovine osteotomy model. *Am J Vet Res* 52:1468-1473
172. Rosenkranz S, Caglayan E, Diet F, Karasch T, Weihrauch J, Wassermann K, Erdmann E. (2004). Langzeiteffekte von Sildenafil bei Sklerodermieassoziiierter pulmonaler Hypertonie und Raynaud-Syndrom. *Dtsch Med Wochenschr* 129(33):1736-1740
173. Rossant J & Nagy A. (1995). Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat Med* 1:592-594
174. Roush JK, Wilson JW. (1990). Effects of plate luting on cortical vascularity and development of cortical porosity in canine femurs. *Vet Surg* 19(3):208-214
175. Rueter A, Trentz O, Wagner M. (2003). *Unfallchirurgie*. Urban & Fischer bei Elsevier
176. Russel G, Tucci M, Conflitti J, Graves M, Wingerter S, Woodall J Jr., Ragab A, Benghuzzi H. (2007). Characterization of a femoral segmental nonunion model in laboratory rats: report of a novel surgical technique. *J Invest Surg* 20(4):249-255
177. Sanchez LS, de la Monte SM, Filippov G, Jones RC, Zapol WM, Bloch KD. (1998). Cyclic-GMP-binding, cyclic-GMP-specific phosphodiesterase (PDE5) gene expression is regulated during rat pulmonary development. *Pediatr Res* 43:163-168
178. Sarahrudi K, Thomas A, Braunsteiner T, Wolf H, Vécsei V, Aharinejad S. (2009). VEGF serum concentrations in patients with long bone fractures: a comparison between impaired and normal fracture healing. *J Orthop Res* 27(10):1293-1297
179. Schemitsch EH, Kowalski MJ, Swiontkowski MF, Harrington RM. (1995). Comparison of the effect of reamed and unreamed locked intramedullary nailing on blood flow in the callus and strength of union following fracture of the sheep tibia. *J Orthop Res* 13:382-389
180. Schemitsch EH, Kowalski MJ, Swiontkowski MF, Senft D. (1994). Cortical bone blood flow in reamed and unreamed locked intramedullary nailing: a fractured tibia model in sheep. *J Orthop Trauma* 8:373-382

181. Schenk RK & Willenegger HR. (1977). Histology of primary bone healing: modifications and limits of recovery of gaps in relation to extent of the defect (author's transl). *Unfallheilkunde* 80:155-160
182. Schiebler TH & Korf HW. (2007). *Anatomie*, 10. Aufl. Steinkopff Verlag
183. Schiebler TH & Schmidt W, Zilles K (Hrsg). (1997). *Anatomie*, 7. Aufl. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
184. Schmidmair G, Wildemann B, Meli B, Krummre G, Einhorn TA, Haas NP, Raschke M. (2004). Development and Characterization of a Standard Closed Tibial Fracture Model in the Rat. *Eur J Trauma* 30:35-42
185. Schoen M, Rotter R, Schattner S, Mittlmeier T, Claes L, Vollmar B, Gradl G. (2008). Introduction of a new interlocked intramedullary nailing device for stabilization of critically sized femoral defects in the rat: A combined biomechanical and animal experimental study. *J Orthop Res* 26(2):184-189
186. Schütze N, Lechner A, Groll C, Siggelkow H, Hübner M, Köhrle J, Jakob F. (1998). The human analog of murine cystein rich protein 61 [correction of 16] is a α ,25-dihydroxyvitamin D₂ responsive immediate early gene in human fetal osteoblasts: regulation by cytokines, growthfactors, and serum. *Endocrinology* 139(4):1761-1770
187. Senthilkumar A, Smith RD, Khitha J, Arora N, Veerareddy S, Langston W, Chidlow JH Jr, Barlow SC, Teng X, Patel RP, Lefer DJ, Kevil CG. (2007). Sildenafil promotes ischemia-induced angiogenesis through a PKG-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(9):1947-1954
188. Shefelbine SJ, Augat P, Claes L, Beck A. (2005). Intact fibula improves fracture healing in a rat tibia osteotomy model. *J Orthop Res* 23:489-493
189. Sheu TJ, Zhou W, Fan J, Zhou H, Zuscik MJ, Xie C, Yin G, Berk BC. (2014). Decreased BMP2 signal in GIT1 knockout mice slows bone healing. *Mol Cell Biochem* Aug 20
190. Shinlapawittayatorn K, Chattipakorn S, Chattipakorn N. (2005). Effect of sildenafil citrate on the cardiovascular system. *Braz J Med Biol Res.* 38(9):1303-1311
191. Si W, Kang Q, Luu HH, Park JK, L, Song WX, Jiang W, Luo X, Li X, Yin H, Montaq AG, Haydon RC, He TC. (2006). CNN1/CYR61 is regulated by the canonical Wnt signal and plays an important role in Wnt3A-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Mol Cell Biol* 26(8):2955-2964
192. Siewert JR. (2006). *Chirurgie*, 8. Aufl. Springer Medizin Verlag Heidelberg
193. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HW, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM,

- Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89(2):309-319
194. Slotte C, Lindfors N, Nannmark U. (2011). Surgical reconstruction of peri-implant bone defects with prehydrated and collagenated porcine bone and collagen barriers: case presentations. *Clin Implant Dent Relat Res* 15(5):714-723
195. Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA. (1998). Identification and characterization of a novel family of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Biol Chem* 273:15553-15558
196. Spiro AS, Beil FT, Baranowsky A, Barvencik F, Schilling AF, Nguyen K, Khadem S, Seitz S, Rueger JM, Schinke T, Amling M. (2010). BMP-7-induced ectopic bone formation and fracture healing is impaired by systemic NSAID application in C57BL/6-mice. *J Orthop Res* 28(6):785-791
197. Stafford HJ, Roberts MT, Oni OO, Hay J, Gregg P. (1994). Localisation of bone-forming cells during fracture healing by osteocalcin immunocytochemistry: an experimental study of the rabbit tibia. *J Orthop Res* 12(1):29-39
198. Steen H & Fjeld TO. (1989). Lengthening osteotomy in the metaphysis and diaphysis. An experimental study in the ovine tibia. *Clin Orthop Relat Res* 297-305
199. Steen H, Fjeld TO, Bjerkreim I, Tevik A, Aldegheri R, Trivella G. (1988). Limb lengthening by diaphyseal corticotomy, callus distraction, and dynamic axial fixation. An experimental study in the ovine femur. *J Orthop Res* 6:730-735
200. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH. (2002). Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(15):9656-9661
201. Strong ML, Wong-Chung J, Babikian G, Brody A. (1992). Rotational remodeling of malrotated femoral fractures: a model in the rabbit. *J Pediatr Orthop* 12(2):173-176
202. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. (1992). Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 13(1):66-80
203. Sutherland EW. (1958). Fractionation and characterisation of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* 232:1077-1091
204. Takimoto E, Belardi D, Tocchetti CG, Vahebi S, Cormaci G, Ketner EA, Moens AL, Champion HC, Kass DA. (2007). Compartmentalization of cardiac beta-adrenergic inotropic modulation by phosphodiesterase type 5. *Circulation* 115(16):2159-2167

205. Tarkka T, Sipola A, Jamsa T, Soini Y, Yla-Herttuala S, Tuukkanen J, Hautala T. (2003). Adenoviral VEGF-a gene transfer induces angiogenesis and promotes bone formation in healing osseous tissues. *J Gene Med* 5:560-566
206. Teitelbaum SL& Ross FP. (2003). Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet.* 4(8):638-649
207. Terrett NK, Bell AS, Brown D, Ellis P. (1996). Sildenafil (Viagra), a potent and selective inhibitor of Type 5 cGMP phosphodiesterase with utility for the treatment of male erectile dysfunction. *Bioorg Med Chem Lett* 6: 1819-1824
208. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. (2002). RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol.* 20:795-823
209. Timmen M, Hidding H, Wieskötter B, Baum W, Pap T, Raschke MJ, Schett G, Zwerina J, Stange R. (2014). Influence of antiTNF-alpha antibody treatment on fracture healing under chronic inflammation. *BMC Musculoskelet Disord.* 15(1):184
210. Toombs JP, Wallace LJ, Bjorling DE, Rowland GN. (1985). Evaluation of Key's hypothesis in the feline tibia: an experimental model for augmented bone healing studies. *Am J Vet Res* 46(2):513-518
211. Utvåg SE, Fuskevåg OM, Shegarfi H, Reikerås O. (2010). Short-term treatment with COX-2 inhibitors does not impair fracture healing. *J Invest Surg* 23:257-61
212. Utvåg SE, Grundnes O, Reikerås O. (1994). Healing of segmental and simple fractures in rats. *Acta Orthop Scand* 65(5):559-563
213. Veneroni G, Boccadoro B, Pluchino F. (1962). Fixation of P-32 in the focus of a fracture and in osseous callus in the long bones in rabbits. *Arch Ortop* 75:1338-1341
214. Walker DK, Ackland MJ, James GC, Muirhead GJ, Rance DJ, Wastall P, Wright PA. (1999). *Xenobiotica* 29(3):297-310
215. Wallace DA, Johnston LA, Huston E, Macmaster D, Houslay TM, Cheung YF, Cambell L, Millen JE, Smith RA, Gall I, Knowles RG, Sullivan M, Houslay MD. (2005). Identification and characterization of PDE4A11, a novel, widely expressed long isoform encoded by the human PDE4A cAMP phosphodiesterase gene. *Mol Pharmacol* 67:1920-1934
216. Willie B, Adkins K, Zheng X, Simon U, Claes L. (2009). Mechanical characterization fixator stiffness for a rat femoral fracture model. *J Orthop Res* 27:687-693
217. Windorf CD, Meng W, Lötges TT, MacKenzie CR, Windolf J, Flohé S. (2013). Implant-associated localized osteitis in murine femur fracture by biofilm forming *Staphylococcus aureus*: a novel experimental model. *J Orthop Res.* 31(12):2013-2020

218. Wingerter S, Calvert G, Tucci M, Tsao A, Russell G, Benghuzzi H. (2007). Comparison of two different fixation techniques for a segmental defect in a rat femur model. *J Invest Surg* 20(3):149-155
219. Yamagiwa H, Tokunaga K, Hayami T, Hatano H, Uchida M, Endo N, Takahashi HE. (1999). Expression of metalloproteinase-13 (collagenase-3) is induced during fracture healing in mice. *Bone* 25(2):197-203
220. Yaman F, Atilgan S, Günes N, Agacayak S, Günay A, Ucan MC, Bakir S, Erol B, Kose I, Atalay Y. (2011). Phosphodiesterase-5 inhibitors may facilitate bone defect recovery. *Eur Rev Med pharmacol Sci.* 15(11):1301-1305
221. Yanaka N, Kotera J, Ohtsuka A, Akatsuka H, Imai Y, Michibata H, Fujishige K, Kawai E, Takebayashi S, Okumura K, Omori K. (1998). Expression, structure and chromosomal localization of the human cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase PDE5A gene. *Eur J Biochem.* 255(2):391-399
222. Yathirajan HS, Nagaraj B, Nagaraja P, Bolte M. (2005). Sildenafil citrate monohydrate. *Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online.* 61(2):489-491
223. Yin G, Sheu T-J, Menon P, Pang J, Ho H-C, Shi S, Xie C, Smolock E, Yan C, Zuscik MJ, Berk BC. (2014). Impaired angiogenesis during fracture healing in GPCR kinase 2 interacting protein-1 (GIT1) knock out mice. *PLoS ONE* 9(2): e89127

7. Publikationen

Diese Arbeit wurde in einem Fachjournal publiziert und auf internationalen Kongressen vorgestellt:

Publikation:

Histing T, Marciniak K, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger MD (2011) Sildenafil accelerates fracture healing in mice. J Orthop Res 29(6):867-73

Vorträge:

Marciniak K., Sildenafil accelerates fracture healing in mice. Davos Exchange Meeting, 19.02.2010, Davos, Schweiz

Histing T, Marciniak K, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger MD. Sildenafil accelerates fracture healing in mice. ISFR 12 th Biennial Conference, 25.09.-28.09.2010, London, England

Histing T, Marciniak K, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger MD. Sildenafil accelerates fracture healing in mice. 7th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies, 16.- 20.10.2010, Kyoto, Japan

8. Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Tim Pohlemann, Direktor der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie für die Möglichkeit der Dissertation und Unterstützung.

Des Weiteren danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger, Direktor des Institutes für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, ohne dessen Anregungen und Ideen die Arbeit in dieser Form nicht entstanden wäre. Ich bedanke mich ebenfalls für die Erlaubnis, die Gerätschaften und Räumlichkeiten des Institutes für meine Arbeit nutzen zu dürfen.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für Klinisch-Experimentelle Chirurgie für deren tatkräftige Unterstützung im Labor und bei den Tierversuchen und das nette Arbeitsklima. Besonders möchte ich mich bei Frau J. Becker und Frau Dr. rer. nat. C. Scheuer bedanken, die mich bei der histologischen und der proteinbiochemischen Auswertung tatkräftig unterstützt haben.

Zudem möchte ich mich an dieser Stelle auch bei Frau. E. Gluding und bei Frau K. Jordan für ihre Hilfe bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin und Doktormutter Frau PD Dr. med. Tina Histing für die Bereitstellung des Themas sowie die freundschaftliche Hilfe und Unterstützung bei der Anfertigung meiner Arbeit. Sie stand mir zu jeder Zeit bei Fragen und Problemen zur Seite.

Als letztes möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich oft über normale Grenzen hinaus unterstützen.