
Aus dem Bereich

Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Medizinischen Fakultät der Universität
des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. med. Tim Pohlemann

Einfluss von Cilostazol auf die Frakturheilung im Mausmodell

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2016

vorgelegt von: Thorsten Lion

geboren am: 31.08.1985 in Merzig

Tag der Promotion:

Dekan:

Prof. Dr. med. M.D. Menger

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:



“If having a soul means being able to feel love and loyalty and gratitude, then animals are better off than a lot of humans.”

(James Herriot)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Zusammenfassung / Summary	3
2. Einleitung	
2.1 Knochen	5
2.1.1 Morphologie.....	5
2.1.2 Histologie.....	6
2.1.2.1 Periost.....	6
2.1.2.2 Kompakta.....	7
2.1.2.3 Spongiosa.....	7
2.1.2.4 Knochenmark.....	7
2.1.2.5 Zellen der Knochenbildung.....	8
2.1.2.6 Hormonelle Steuerung.....	11
2.1.2.7 Formen der Knochenbildung.....	11
2.1.3 Physiologie des Knochens.....	13
2.1.3.1 Modeling.....	14
2.1.3.2 Remodeling.....	14
2.2 Frakturheilung.....	14
2.2.1 Primäre Frakturheilung.....	15
2.2.2 Sekundäre Frakturheilung.....	15
2.3 Wachstumsfaktoren.....	17
2.3.1 Cystein-rich Protein 61 (Cyr61)	17

2.3.2 Bone Morphogenetic Protein (BMP)	18
2.3.3 Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)	18
2.3.4 Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS)	18
2.3.5 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	19
2.3.6 Receptor Activator of NF- κ B (RANK), Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) und Osteoprotegerin (OPG) ..	19
2.4 Frakturmodelle.....	20
2.5 Cilostazol.....	23
2.5.1 Wirkmechanismus.....	23
2.5.2 Pharmakokinetik.....	24
2.5.3 Indikation.....	25
2.5.4 Nebenwirkungen.....	26
2.6 Ziel der Arbeit.....	26
2.7 Arbeitshypothese.....	26

3. Material und Methoden

3.1 Versuche	27
3.1.1 Studienprotokoll.....	27
3.1.2 Tiermodell.....	28
3.1.3 Implantat.....	29
3.1.4 Operationsverfahren.....	29
3.1.5 Medikamentenapplikation.....	37
3.1.6 Entnahme der Femora.....	37
3.2 Auswertung.....	38
3.2.1 Biomechanik.....	38

3.2.2 Radiologie.....	39
3.2.3 Histologie.....	40
3.2.3.1 Trichrome Masson-Goldner-Färbung.....	43
3.2.3.2 Tartrat-resistent Acid-Phosphatase-Färbung (TRAP)	43
3.2.4 Western Blot.....	44
3.3. Statistik.....	45
4. Ergebnisse	
4.1 Biomechanik.....	46
4.2 Radiologie.....	48
4.3 Histologie.....	50
4.3.1 TRAP-Färbung.....	53
4.4 Western Blot.....	55
5. Diskussion	
5.1 Diskussion der Methoden.....	59
5.2 Diskussion der Ergebnisse.....	62
6. Literaturverzeichnis.....	67
6.1 Abbildungsverzeichnis.....	79
6.2 Tabellenverzeichnis.....	83
7. Danksagung.....	85
8. Publikationen.....	87

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
ATPase	Adenosintriphosphatase
BRU	Bone Remodeling Unit
BMP	Bone Morphogenetic Protein
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
Cyr61	Cystein-rich Protein 61
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
H ⁺	Wasserstoffion
h	Stunde
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IL	Interleukin 1-6
IP3	Inositoltriphosphat
i.p.	intraperitoneal
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
i.v.	intravenös
K ⁺	Kalium
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt

l	Liter
µm	Mikrometer
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
mg	Milligramm
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mol	Mol
MW	Mittelwert
N	Newton
NO	Stickstoffmonoxid
OPG	Osteoprotegerin
PDE	Phosphodiesterase
PGF	Placental Growth Factor
PTH	Parathormon
RANK	Receptor Activator of NF-kB
RANKL	Receptor Activator of NF-kB Ligand
SEM	Standardfehler (engl. Standard Error of the Mean)
s	Sekunden
Tab.	Tabelle
TGF-beta	Transforming Growth Factor-beta
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
vs.	Versus

Kapitel 1 Zusammenfassung

Cilostazol beschleunigt die Frakturheilung im Mausmodell

Cilostazol, ein Phosphodiesterase-III-Inhibitor, steuert die Konzentration des cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP). Durch die Hemmung der Phosphodiesterase III steigt die cAMP-Konzentration, was zur Dilatation der Gefäße führt. Zudem stimuliert Cilostazol die Angiogenese durch eine Hochregulierung proangiogentischer Faktoren. Ob Cilostazol die Knochenheilung beeinflusst, ist bis dato nicht geklärt. Ziel der Arbeit war es, den Einfluss von Cilostazol auf die Kallusbildung, das Remodeling und die biomechanischen Eigenschaften des gebildeten Frakturkallus zu untersuchen. Die Knochenheilung wurde an einem Femurfrakturmodell der Maus untersucht. Die Fraktur wurde durch eine intramedulläre Schraube stabilisiert. Die Frakturheilung wurde radiologisch, biomechanisch, histomorphometrisch, histochemisch sowie mittels Western Blot Analyse nach 2 sowie 5 Wochen postoperativ untersucht. 25 Mäuse erhielten täglich 30 mg/kg Körpergewicht Cilostazol per os. Die Kontrollgruppe (n = 24) erhielt eine äquivalente Menge NaCl-Lösung. Die mit Cilostazol behandelten Tiere zeigten radiologisch eine Verbesserung der Frakturheilung mit einer beschleunigten ossären Überbrückung des Frakturspalts im Vergleich zur Kontrollgruppe. Histologisch konnte ein höherer Anteil an Knochengewebe sowie ein verringerter Anteil an Knorpelgewebe im Kallus nachgewiesen werden. Die Western Blot Analysen zeigten eine erhöhte Expression von Cystein-rich Protein 61 (Cyr61), Bone Morphogenetic Protein (BMP-4) und Receptor Activator of NF- κ B-Ligand (RANKL). 5 Wochen postoperativ zeigte sich bei den mit Cilostazol behandelten Tieren eine erhöhte Biegesteifigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass Cilostazol die Knochenheilung durch eine Beschleunigung der Knochenbildung und des Remodelings signifikant verbessert.

Kapitel 1 Summary

Cilostazol accelerates fracture healing in mice

Cilostazol, a selective phosphodiesterase-3 inhibitor, is known to control cyclic adenosine monophosphate (c-AMP) and to stimulate angiogenesis through upregulation of pro-angiogenic factors. There is no information, however, whether cilostazol affects fracture healing. We therefore studied the effect of cilostazol on callus formation and biomechanics during fracture repair. Bone healing was analyzed in a murine femur fracture model stabilized with an intramedullary screw. Radiological, biomechanical and histomorphometric, histochemical and protein biochemical analyses were performed at 2 and 5 weeks after fracture. Twenty-five mice received 30 mg/kg body weight cilostazol p.o. daily. Controls (n=24) received equivalent amounts of vehicle. In cilostazol-treated animals radiological analysis at 2 weeks showed an improved healing with an accelerated osseous bridging compared to controls. This was associated with a significantly higher amount of bony tissue and a smaller amount of cartilage tissue within the callus. Western blot analysis showed a higher expression of cysteine-rich protein 61 (Cyr61), bone morphogenetic protein (BMP-4) and receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL). At 5 weeks improved fracture healing after cilostazol treatment was indicated by biomechanical analyses, demonstrating a significant higher bending stiffness compared to controls. Thus, cilostazol improves fracture healing by accelerating both bone formation and bone remodeling.

Kapitel 2 - Einleitung

2.1 Knochen

2.1.1 Morphologie

Morphologisch lassen sich lange (Röhrenknochen), kurze (Handwurzelknochen) sowie platte Knochen (knöchernes Schädeldach) unterscheiden. Knochen, die sich in ihrem Aufbau keiner der genannten Gruppen zuordnen lassen (Knochen der Schädelbasis, Rippen) werden als unregelmäßige oder irreguläre Knochen bezeichnet. Das Femur der Maus, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, zählt aufgrund seines Aufbaus zu den langen Röhrenknochen (Abb. 2.1). Hierbei können folgende Anteile unterschieden werden:

- Epiphyse (bilden die jeweiligen Enden des Röhrenknochens, der Gelenkanteil ist mit hyalinem Knorpel überzogen)
- Diaphyse (Mittelteil des Röhrenknochens)
- Metaphyse (zwischen Diaphyse und Epiphyse)

In der kindlichen Entwicklung findet das Längswachstum des Röhrenknochens in der Epiphysenfuge (Wachstumsfuge) statt^[76]. In dieser Arbeit wurde die Diaphyse eines Mausfemurs frakturiert.

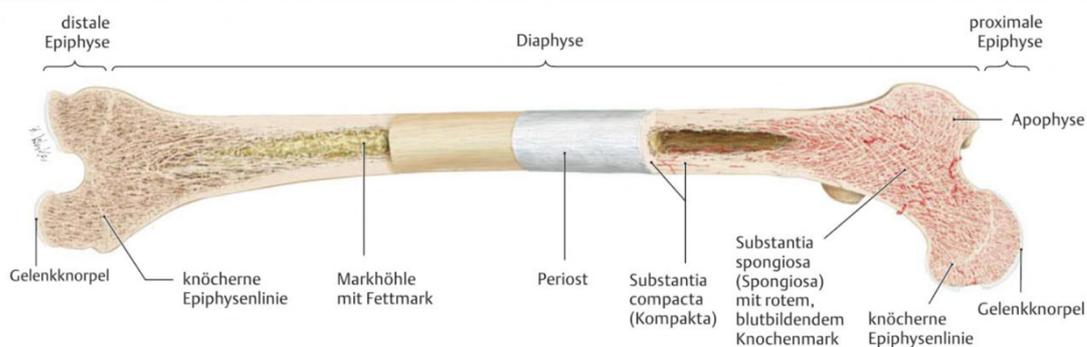


Abbildung 2.1: Aufbau eines typischen Röhrenknochens am Beispiel des Femurs (Quelle: Prometheus LernAtlas, 3. Auflage. Thieme Verlag.)

2.1.2 Histologie

Histologisch lässt sich die äußere Knochenhaut, das Periost, von der Knochensubstanz abgrenzen. Die Knochensubstanz selbst kann wiederum in eine äußere Substantia compacta und eine innere Substantia spongiosa unterschieden werden. Die schwammartigen Trabekel aus feinsten Knochenbälkchen beherbergen das für die Blutbildung wichtige Knochenmark^[4].

Die Knochenmatrix weist einen 20-prozentigen Wasseranteil auf. Die Festbestandteile der Knochenmatrix bestehen aus 70% anorganischen (Hydroxylapatit) und 30% organischen Substanzen (Kollagen Typ I)^[77].

2.1.2.1 Periost

Das Periost ist die bindegewebige Haut, die den gesamten Knochen, mit Ausnahme der Gelenkflächen, überzieht. Die Knochenhaut besteht aus einer äußeren Kollagenschicht, dem Stratum fibrosum, sowie einer inneren Schicht, dem Stratum osteogenicum. Das Stratum fibrosum dient als Verbindungselement zwischen Knochen und Sehnen einzelner Muskelgruppen. Durch die Aufteilung inserierender Faserzüge im Stratum fibrosum ist eine gleichmäßige Zugkräfteverteilung gewährleistet^[76]. Die Faserschicht selbst ist über elastische Sharpey-Fasern mit dem Knochen verankert.

Das Stratum osteogenicum (auch Kambium) liegt als innere Periostschicht dem Knochen direkt auf. Sie übernimmt in der Wachstumsphase das Dickenwachstum und ist maßgeblich an der Frakturheilung beteiligt. Dies wird durch dort ansässige Knochenvorläuferzellen ermöglicht, die sich zu Osteoblasten ausdifferenzieren können. Die hohe Schmerzempfindlichkeit des Periosts erklärt sich durch die im Stratum osteogenicum verlaufenden Nervenfasern. Die ebenfalls vorhandenen Gefäß- und Kapillarstraßen versorgen die Knochensubstanz mit den notwendigen Nährstoffen^[77].

2.1.2.2 Kompakta

Die Substantia compacta (kompakte Substanz) hat, wie der Name schon vermuten lässt, eine hohe Substanzdichte und beinhaltet damit fast 80% des Knochengewebes. Sie besteht aus verschiedenen Knochenlamellen, wie den Speziallamellen (Osteon) und den Schaltlamellen (interstitielle Lamellen).

Das Grundbauelement der Kompakta ist das Osteon. Im Zentrum des Osteons befindet sich der Havers-Kanal um den konzentrisch 5-20 Speziallamellen angelegt sind. In dem ca. 20-100 µm breiten, vertikalen Kanal verlaufen Blutgefäße und Nervenfasern, die horizontal über Volkmannkanäle mit anderen Havers-Kanälen in Verbindung stehen^[77]. Durch den ständigen Auf- und Abbau wird die Osteonanordnung kontinuierlich verändert (Abb. 2.2).

Die Osteonzwischenräume bestehen daher aus Schaltlamellen, die überbaute Speziallamellen früherer Osteone sind. Mikroskopisch lassen sich Lakunen (unregelmäßige Einbuchtungen im Osteon) erkennen, in denen Osteoklasten alte Knochensubstanz abbauen. Die entstandene Lücke wird anschließend durch Osteoblasten neu überbaut^[4].

2.1.2.3 Spongiosa

Der innere Anteil der Knochensubstanz wird durch Spongiosa ausgekleidet. Hierbei handelt es sich um ein schwammartiges Trabekelsystem aus kleinen Knochenbälkchen. Diese sind entlang der wichtigsten Belastungslinien des Knochens angeordnet. Das Trabekelsystem reagiert ebenfalls auf veränderte Bedingungen und kann zug- und druckbelastungsabhängig umgebaut werden^[49]. Anders als in der Kompakta ist das Osteon nicht zylindrisch, sondern wabenförmig aufgebaut. Diese entstehenden Leerräume bieten Raum für das Knochenmark^[77].

2.1.2.4 Knochenmark

Die Hämatopoese findet ab dem 6. Fetalmonat im roten Knochenmark statt. Während sich beim Säugling noch in allen Knochen rotes Mark finden lässt, wandelt sich mit steigendem Alter das rote Mark in den Röhrenknochen in gelbes Knochenmark (Fettmark) um.

Damit verschiebt sich die Hämatopoese beim Erwachsenen auf die kurzen und platten Knochen (Brustbein, Rippen).

Die inneren Hohlräume des Markraums sind mit Endost ausgekleidet, von dem aus retikuläres Bindegewebe einsprießt. Die Ernährung dieser Struktur erfolgt durch spezielle Sinusoide der Vasa nutritiae (Gefäßsinusoide), die den neugebildeten Zellen die Möglichkeit gibt, ins Blut überzutreten^[78].

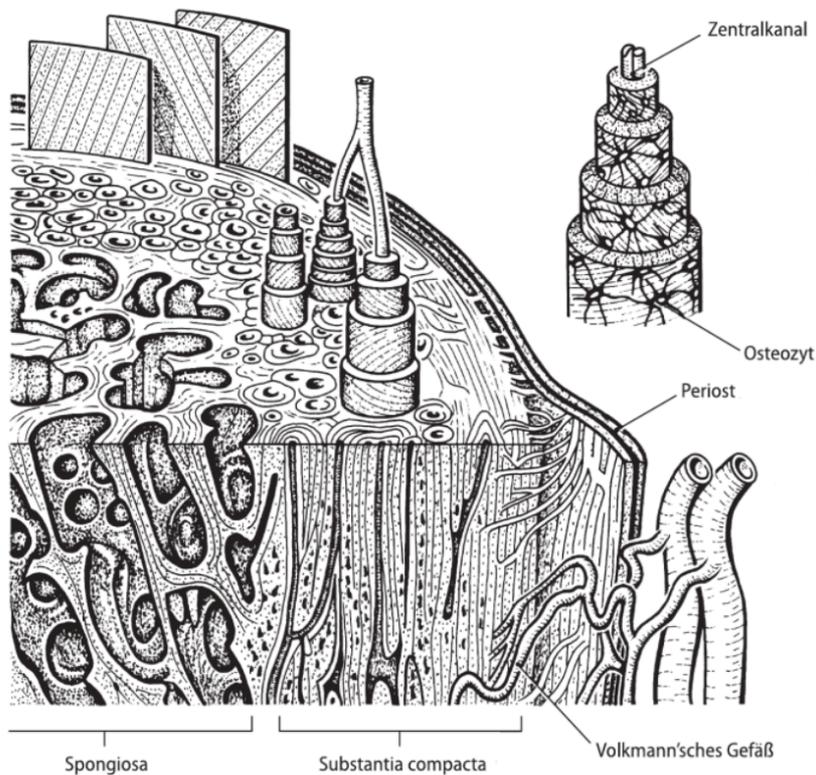


Abbildung 2.2: Aufbau eines Lamellenknochens (Quelle: Appell: Funktionelle Anatomie. 4. Auflage. Springer Verlag.)

2.1.2.5 Zellen der Knochenbildung

Knochengewebe befindet sich im kontinuierlichen Umbauprozess durch ein Gleichgewicht an Auf- und Abbauprozessen. Die hierfür verantwortlichen Zellen sind die Osteoblasten (Knochenaufbau) und die Osteoklasten (Knochenabbau). Unterschieden werden Geflecht- und Lamellenknochen. Geflechtknochen stellen eine primär unreife Knochenform da, bei welcher die Knochenmatrix nicht ausgerichtet, sondern stark miteinander verflochten ist.

Der hohe Zellreichtum sowie die geringen anorganischen Anteile des Knochens zeichnen den Geflechtknochen aus. Dieser im Embryonalstadium gebildete Knochen, welcher sich im Wachstum an der Kapillarausrichtung orientiert, wird postnatal durch den stabileren

Lamellenknochen ersetzt^[111]. Dieser weist eine hohe Zug- sowie Druckbelastbarkeit auf, die durch ein kraftlinienorientiertes Wachstum sowie parallel ausgerichtete Kollagenfasern eine optimale Belastungsadaptation gewährleistet^[106].

Osteoblasten sind Zellen mesenchymaler Herkunft. Sie leiten sich ebenso wie Osteozyten oder Knochenbelegzellen von lokalen Progenitorzellen ab^[98]. Diese basophilen, plasmareichen Zellen regulieren den Knochenaufbau, indem sie dem Knochen Osteoid anlagern und zugleich Osteoklasten aktivieren. Das Osteoid (Knochenmatrix bestehend aus Kollagen Typ I) ist in diesem Zustand weich und nicht mineralisiert. Durch Einlagerung von anorganischen Substanzen (Hydroxylapatit) kommt es zur Aushärtung. Dieser Vorgang dauert beim Menschen ungefähr 35 Tage. Nachdem das Osteoid den Osteoblasten vollkommen umlagert und eingeschlossen hat, spricht man von einem Osteozyten (Abb. 2.3). Osteozyten machen mit ca. 95% den größten Anteil aller Knochenzellen aus^[92]. Lokalisiert sind diese in den Zwischenräumen der Knochenhöhlen (Lakunen). Kontakt haben die einzelnen Osteozyten über Gap-Junctions, was ihnen ein Austausch von Nährstoffen ermöglicht (Canaculi ossei)^[63]. Ebenso erfüllen Membranrezeptoren in diesen Canaculi mechanorezeptive Aufgaben, indem sie die tangentielle Bewegung der Kanäle bei Belastung messen können^{[7], [79]}.

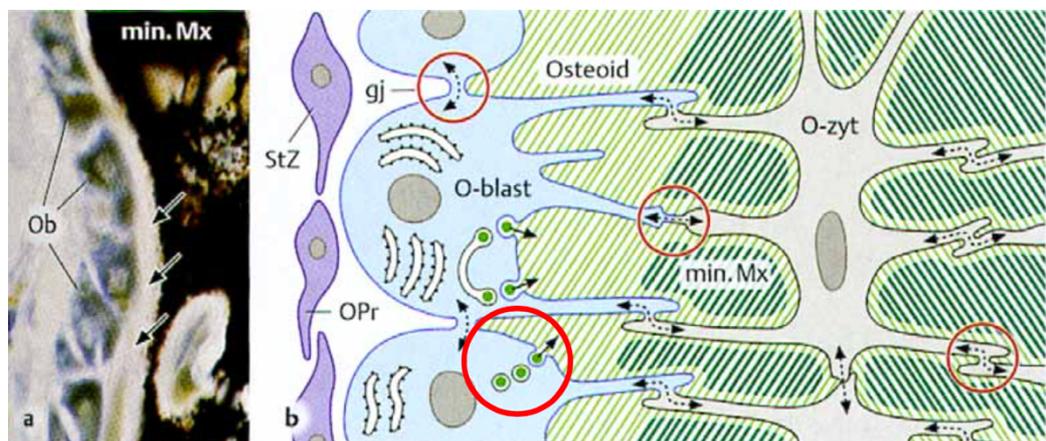


Abbildung 2.3: Osteoblasten (O-blast, Ob) sezernieren Osteoid (hellgrün). Sie sind untereinander mit Gap junctions (gj, roter Kreis) verbunden. Mineralisierte Matrix (dunkelgrün), Osteoprogenitorzellen (OPr), mesenchymale Stammzellen (StZ) (Quelle: Lüllmann-Rauch. Histologie. 3. Auflage. Thieme Verlag)^[78]

Osteoklasten entwickeln sich, anders als Osteoblasten, nicht aus mesenchymalen Progenitorzellen, sondern aus Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems^[108]. Ihre Ausdifferenzierung wird durch die Interaktion mit den Osteoblasten über das „Receptor Activator of NF- κ B“ (RANK) – „Receptor Activator of NF- κ B Ligand“ (RANKL) - System gesteuert.

Hierbei wird von Osteoblasten RANKL sezerniert, der an das passende Transmembranprotein RANK bindet. RANK wird von Osteoklastenvorstufen exprimiert und löst bei Kontakt mit RANKL die Differenzierung von Makrophagen zu Osteoklasten aus. Diese, durch die Fusion einkerniger Vorläuferzellen entstandenen, mehrkernigen Riesenzellen liegen im aktivierten Zustand der Knochenmatrix direkt an. Durch Auflösung der Calciumverbindung mit Hilfe eines sauren pH-Milieus (pH ca. 4,5) sowie lysosomalen Enzymen (Cathepsin K, etc.) erfolgt die Knochenresorption.

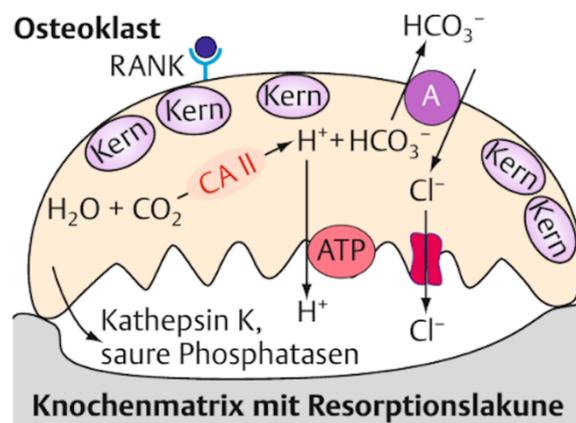


Abbildung 2.4: Mechanismen der osteoklastischen Knochenresorption (Quelle: Graefe. Pharmakologie und Toxikologie. Duale Reihe. Thieme Verlag)

Die pH-Senkung im Bereich des Knochenabbaus erreicht der Osteoklast über eine dichte Anbindung (β 3-Integrine)^[84] an die Knochensubstanz (Versiegelungszone) und eine membranständige H^+ -Adenosintriphosphatase (H^+ -ATPase), die Protonen in die Lakune pumpt (Abb. 2.4). Die freiwerdenden Knochenbausteine werden phagozytiert und am rückseitigen Pol des Osteoklasten ausgeschleust (Transozytose). Die entstandene Lücke wird im Zuge des Knochenumbaus von Osteoblasten wieder aufgefüllt. Dabei entspricht die umgesetzte Menge eines Osteoklasten der Menge Knochensubstanz, die ca. 100 Osteoblasten produzieren können^{[45], [70], [79]}.

2.1.2.6 Hormonelle Steuerung

Die Steuerung von Osteoklasten und Osteoblasten unterliegt einer hormonellen Steuerung, die der Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase dient. Dies geschieht mit Hilfe der Peptidhormone Calcitonin und Parathormon. Calcitonin wird in den C-Zellen der Schilddrüse gebildet und senkt den Anteil des Gesamtkörper-Calciums. Dies geschieht durch eine Calcitoninrezeptor-vermittelte Aktivierung der osteoklastischen cyclische Adenosinmonophosphatase-Proteinkinase A (cAMP-Proteinkinase A) und führt zur Inhibition der Osteoklastenaktivität^[129].

Das Parathormon, welches in der Nebenschilddrüse gebildet wird, wird bei niedrigem Gesamtcalcium sezerniert und stellt somit den Gegenspieler des Calcitonins dar. Die durch calciumsensitive Rezeptoren^[123] gemessene Gesamtcalciummenge führt bei einer Erniedrigung zur Senkung der cytoplasmatischen Inositoltriphosphatkonzentration (IP₃) und damit zu einer erhöhten Parathormonsekretion (PTH). Das PTH bindet nicht direkt an Osteoklasten, sondern an spezifische Rezeptoren der Osteoblasten (G_s und G_q gekoppelt), die daraufhin die OPG-Ausschüttung drosseln. Ebenfalls wird dadurch der Makrophagen-Kolonien-stimulierende Faktor (M-CSF – Stimuliert die Bildung von Osteoklastenvorläuferzellen) sezerniert sowie die Expression von RANKL ausgelöst. Durch Interaktion mit RANK wird hierbei die Osteoklastenausdifferenzierung gefördert^[67].

2.1.2.7 Formen der Knochenbildung

Bei der Knochenbildung kann zwischen chondraler Ossifikation und desmaler Ossifikation unterschieden werden. Einzig die primäre Geflechtknochenbildung, sowie die anschließende Umwandlung in den stabileren Lamellenknochen ist bei beiden Knochenbildungsprozessen gleich^[79].

Die desmale Ossifikation beschreibt den Vorgang der Knochenentstehung (Schädelknochen, Clavicula) aus vaskularisiertem Mesenchym. Hierbei bilden sich aus pluripotenten Mesenchymalzellen Osteoblasten, welche die Produktion von Osteoid in einem kollagenreichen Proteinnetz übernehmen. Das Wachstum geschieht durch Anlagerung der Knochensubstanz von außen (appositionelles Wachstum)^[111].

Bei der chondralen Ossifikation (indirekte Ossifikation) erfolgt die Knochenbildung über die Zwischenstufe eines Knorpelgerüsts. Anders als bei der desmalen Ossifikation differenzieren sich durch eine Mesenchymverdichtung Chondroblasten aus, welche hyalinen Knorpel bilden^[39]. Dieser hyaline Knorpel stellt praktisch ein Modell des zu bildenden Knochens dar.

Diaphyse

Nach der Modellanlage durch hyalinen Knorpel entsteht in der Peripherie ein Perichondrium, in welchem sich Osteoblasten ausdifferenzieren, die eine kurze Knochenmanschette um die spätere Diaphyse anlegen (s. perichondrale Ossifikation). Das Perichondrium entwickelt sich im späteren Verlauf zum Periost. Die im Inneren ruhenden Chondrozyten hypertrophieren im Verlauf (Blasenknorpel)^[32] und veranlassen die Mineralisation der Knorpelmatrix. Anschließend sprossen Gefäße in die Knorpelmatrix ein, die die Einwanderung von Mesenchym zur Folge haben. Die Differenzierung zu Chondroklasten führt zu einer Teilresorption der Knorpelmatrix, bei der die primäre Markhöhle entsteht. Der übriggebliebene Teil der vorherigen Knorpelmatrix dient den eingewanderten Osteoblasten als Gerüst zur Ablagerung von Knochenmatrix (primäre Spongiosa). Das Längswachstum des Röhrenknochens schreitet nach beiden Enden fort, wobei der Übergang von Diaphyse zu Epiphyse als Epiphysenfuge bezeichnet wird. Hier bleibt der hyaline Knorpel postnatal erhalten und sichert das Wachstum^[78].

Epiphyse

Im Gegensatz zur Diaphyse besitzt die Epiphyse schon im knorpeligen Zustand Blutgefäße. Die Bildung von Knochen unterscheidet sich vor allem zeitlich und geometrisch (Wachstumsrichtung). Dabei geht die Ossifikation vom Zentrum der Epiphyse aus und verläuft zentrifugal bis der Knorpel vollständig in Knochen umgewandelt ist. Im Gegensatz zur Diaphyse erfolgt dies erst Monate bis Jahre nach der Geburt^[78].

Die perichondrale Ossifikation stellt eine Sonderform dar, bei der im Zuge der Röhrenknochenentwicklung im Perichondrium (bindegewebige Knorpeloberfläche) des Knorpelmodells ebenfalls desmale Ossifikation stattfindet. Hierbei wird eine Knochenmanschette gebildet, die den Schaft des Knorpelmodells umgibt (spätere Diaphyse).

Der innenliegende Knorpel wird später durch enchondrale Ossifikation in Knochengewebe umgewandelt (Abb. 2.5)^[47].

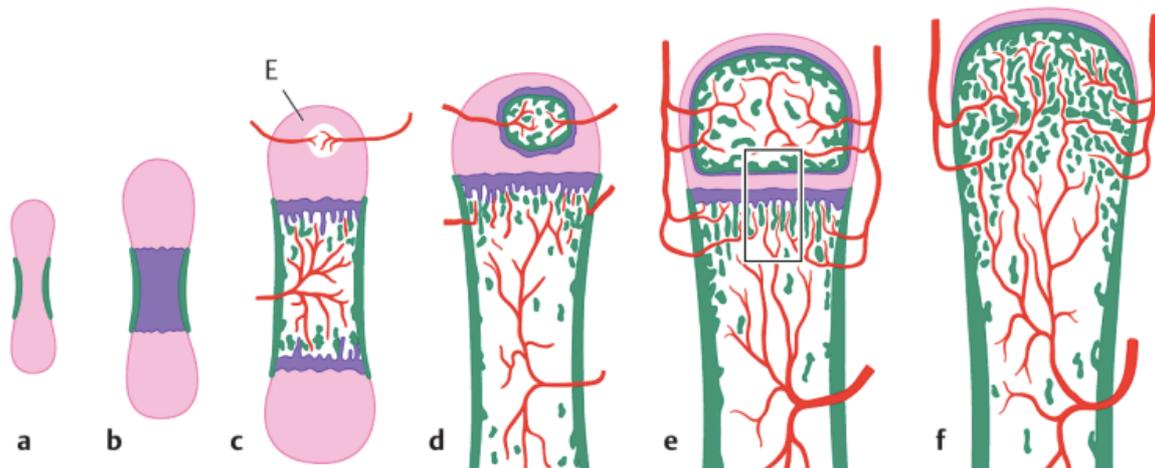


Abbildung 2.5: Chondrale Osteogenese. Entwicklung vom Knorpelmodell (a) bis zum ausgewachsene Knochen (f). Knorpel (rosa), Knochen (grün), mineralisierte Knorpelmatrix (violett), Blutgefäße (rot). (Quelle: Lüllmann-Rauch. Histologie. 3. Auflage. Thieme)^[78]

2.1.3 Physiologie des Knochens

Die Funktionen des Knochens im Organismus gehen weit über die Stützfunktion hinaus. Schädel, Becken und Rippen erfüllen eine Schutzfunktion für die Organe und erhalten gleichzeitig die physiologische Form des Körpers. Durch die Sehnenansätze dient das stabile Knochengestütze weiter der Mobilität. Ebenso dient es der Speicherung von Mineralien (Calcium) und nimmt aktiv an der Hämatopoese teil.

Um diese Aufgaben zuverlässig durchführen zu können, befindet sich der Knochen in einem kontinuierlichen Auf- und Abbauprozess. Dabei kann zwischen Modeling (Aufbau) und Remodeling (Umbau) unterschieden werden^[93].

2.1.3.1 Modeling

Das Modeling des Knochens passt die vorhandene Knochenstruktur an vorherrschende, mechanische Belastung an und wird somit auch als funktionelle Adaption bezeichnet. Auf- und Abbauvorgänge laufen hier an getrennten Orten ab^[103]. Diese Anpassung über das Modeling findet hauptsächlich während der Wachstumsphase statt, kann aber auch noch im Erwachsenenalter vorkommen^[102]. Im Gegensatz zum Größenwachstum des Knochens stellt das Modeling eine Vergrößerung des Kortikalisdurchmessers und des Knochenumfangs dar^[36].

2.1.3.2 Remodeling

Das Remodeling bezeichnet eine belastungsunabhängige Umbauung des Knochens, bei welcher Auf- und Abbauprozesse an einem Ort vereint sind^[90]. Damit schafft es der Knochen, trotz hormoneller Einflüsse (Calcium, Phosphat) und Mikrofrakturen, seine Funktionalität zu bewahren^[15]. Das Remodeling ist ein lebenslanger Prozess, bei dem der Knochen nicht an Volumen zunimmt. Die dafür genutzte Einheit aus Osteoklasten und Osteoblasten wird auch als Bone Remodeling Unit (BRU) bezeichnet und deren gekoppelter Umbau als „Coupling“.

Hierbei wird die Knochensubstanz durch Osteoklasten abgebaut und innerhalb der BRU wieder durch Osteoblasten aufgefüllt^[95]. In der Substantia compacta formen die BRUs einen zur Knochenachse parallel angelegten Kanal, wohingegen die Substantia spongiosa durch die Anlage von Resorptionslakunen remodeliert wird. Die Anzahl der BRUs als auch die Aktivität der Osteoklasten und Osteoblasten in den einzelnen Units bestimmt dabei die Menge der Knochenneubildung^[94].

2.2 Frakturheilung

Grundsätzlich unterschieden wird in der Frakturheilung zwischen der primären (direkt) und der sekundären Frakturheilung (indirekt)^[37]. Die Art der Knochenheilung wird von dem Frakturtyp, der Größe des Frakturspalts sowie der Stabilität beeinflusst^[17]. Da Knochen ein regenerationsfähiges Gewebe ist, kann eine Fraktur ohne Narbenbildung vollständig ausheilen^[26].

2.2.1 Primäre Frakturheilung

Die primäre oder direkte Frakturheilung findet, im Gegensatz zur sekundären Frakturheilung, ohne Anlage einer Kallusmanschette statt. Voraussetzung dafür ist ein stabiler Frakturspalt mit einer maximalen Breite von 0,5 Millimetern, sowie eine ausreichende Vaskularisation des Frakturspalts^{[83], [101]}. Unterschieden werden kann hierbei die Kontakt- von der Spaltheilung^[83].

Bei der Kontaktheilung haben beide Knochenfragmente einen direkten Kontakt ($< 0,01\text{mm}$)^[97]. Dies ermöglicht ein direktes Einwachsen der gegenüberliegenden Osteone über den Frakturspalt in die gegenüberliegende Kortikalis. Bei diesem Vorgang legen Osteoklasten Kanäle an, die von Gefäßschlingen durchzogen werden. Somit wird es den Osteoblasten ermöglicht, den Resorptionskanal mit Knochensubstanz aufzufüllen^[100].

Von der Spaltheilung wird bei einer Frakturspaltbreite von 0,2mm – 0,5mm gesprochen^[107]. Hierbei dringen vom Periost und Endost Kapillaren sowie fibroblastenreiches Bindegewebe in den Frakturspalt ein. Bei diesem Zwischenschritt bilden Osteoblasten den primären Geflechtknochen, der später durch längsaxial angelegten Lamellenknochen ersetzt wird. Seine endgültige Stabilität erreicht der Knochen erst nach ca. 3 bis 8 Wochen^[81].

2.2.2 Sekundäre Frakturheilung

Weitaus häufiger als die primäre ist die sekundäre Frakturheilung, die sich durch die Ausbildung eines periostalen und endostalen Kallus auszeichnet^[30]. Ursächlich dafür ist neben einem zu großen Frakturspalt vor allem eine nicht ausreichende Stabilisierung der Frakturenenden (interfragmentäre Beweglichkeit). Der Kallusmanschette kommt in diesem Fall eine frakturstabilisierende Aufgabe zu^[83]. Die Größe des Kallus korreliert hierbei mit der Instabilität der Fraktur^[21]. Während des Heilungsprozesses verändert sich der Gewebeanteil des Kallusgewebes (Knochen, Knorpel, Bindegewebe) und beeinflusst somit die mechanische Stabilität des periostalen Kallus^[81].

Die bei der sekundären Frakturheilung beteiligten Mechanismen der Kallusbildung sind die desmale und enchondrale Ossifikation (siehe 2.1.2.7). Die Phasen der Frakturheilung können in 5 Stadien nach Einhorn^[30] unterschieden werden.

1. Ausbildung eines Frakturhämatoms

Bei der Frakturierung des Knochens werden neben der Knochensubstanz auch das nutritive Periost und das umliegende Weichteilgewebe verletzt^[115]. Das Zerreißen von medullären Gefäßen führt hierbei zur zeitnahen Ausbildung des Frakturhämatoms und Austritt von entzündlichem Exsudat^[13]. Die Entstehung des Hämatoms wird als Quelle verschiedener Signalmoleküle vermutet, die die folgende entzündliche Reaktionskaskade der Frakturheilung in Gang setzen^[41].

2. Entzündungsphase

Die unmittelbar nach der Hämatomentstehung einwandernden Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten sezernieren Interleukine (IL-1, IL-6, IL-11 und IL-18) als auch Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha). Diese Triggern die Rekrutierung mesenchymaler Zellen und regen die Gefäßeinsprossung (Angiogenese) an^[2]. IL-6 nimmt hier eine Hauptrolle ein, indem es die Differenzierung von Osteoblasten sowie die Angiogenese über Induktion von VEGF auslöst. Die Zellteilungsrate erreicht dabei 24 Stunden nach Fraktur ihren Höhepunkt^[81].

3. Granulationsphase

Das primär entstandene Hämatom wird in der Granulationsphase schrittweise durch Granulationsgewebe ersetzt^[14]. Dadurch wird eine fibrocartilaginäre Gewebebrücke, mit nur mäßiger Biegesteifigkeit, zwischen beiden Frakturrenden gebildet (weicher Kallus). Eingewanderte Chondrozyten beginnen mit der Überbrückung des Frakturspaltes. Dabei dient die Dehnung des interfragmentären Gewebes als wichtigster Stimulus für die Kallusbildung^[83].

Die Dynamik im Knochenspalt ist von großer Bedeutung. Dabei liegt der optimale Bereich laut Wolf et al.^[126] für interfragmentäre Beweglichkeit von 200-1000 µm (axial), laut Stürmer (1996)^[118] bei 500-1000 µm (axial sowie quer). Bei größeren Bewegungen wird zwar mehr Kallus gebildet, dieser ist aber von schlechter, struktureller Qualität^[23]. Daher bleibt eine Überbrückung des Frakturspaltes hierbei aus.

4. Phase der Kallushärtung

Die knorpelige Kallusstruktur (weicher Kallus) wird in dieser Phase in den knöchernen Kallus umgewandelt. Dazu werden die hypertrophen Chondrozyten abgebaut und über einwandernde mesenchymale Stammzellen Osteoblasten ausdifferenziert, die mit der Osteoidbildung beginnen^[81]. Die Kalzifizierung der extrazellulären Matrix geschieht mit Hilfe mitochondrialen Calciums aus den Chondrozyten^[82].

5. Umbau (Remodeling)

In der letzten Phase der Knochenheilung kommt es zum Remodeling. Dabei wird die gebildete Kallusstruktur, bestehend aus Geflechtknochen, durch BRU zu Lamellenknochen umgebaut und überflüssige Kallusstruktur abgebaut. Hiermit wird die adäquate Funktion unter den gegebenen mechanischen Bedingungen gewährleistet sowie die Steifigkeit und Stärke des heilenden Knochens gesteigert^[27]. Der Vorgang des Remodelings beginnt drei bis vier Wochen nach der Fraktur und kann Monate bis Jahre andauern^[93].

2.3 Wachstumsfaktoren

2.3.1 Cystein-rich Protein 61 (Cyr61)

Das Frühe-Phase-Protein Cyr61 gehört der CCN-Familie an. Dieses Akronym leitet sich aus den Namen der 3 Proteine dieser Gruppe ab; Cyr61 (CCN1), connective tissue growth factor (CTGF (CCN2)) sowie nephroblastoma overexpressed (NOV (CCN3)). Cyr61 spielt eine große Rolle bei der Proliferation, Adhäsion, Migration und Differenzierung von inflammatorischen Zytokinen sowie der Angiogenese über die Anbindung an pro-angiogenetische Integrine.

Damit nimmt es eine entscheidende Position in der Wundheilung ein^[62]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass es im Kallusgewebe die Proliferation von Osteoblasten anregt^{[56],[116]}.

2.3.2 Bone Morphogenetic Protein (BMP)

Die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) sind Wachstums- sowie Differenzierungsfaktoren aus der Gruppe der Transforming Growth Factor- β Superfamily (TGF- β). Dieser Gruppe aus 20 Zytokinen wurde eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Morphogenese verschiedener Gewebe und Organe nachgewiesen^[86].

Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) ist in der Lage über zahlreiche Interaktionen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren die Produktion von Chondrozyten und Osteoblasten zu induzieren^[122].

Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP-4) spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Bildung von Knochen- und Knorpelgewebe während der Frakturheilung. Es ist speziell wichtig für den Beginn der enchondralen Ossifikation^[40].

2.3.3 Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)

Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) ist ein Protein, welches die in der S-Phase stattfindende Proliferation der DNA in eukaryotischen Zellen gewährleistet. Daher kann das PCNA-Protein als Marker der Zellproliferation herangezogen werden^[71].

2.3.4 Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS)

Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) ist Bestandteil der Familie der NO-Synthasen. Es transferiert Elektronen von NADPH in sein Häm-Zentrum, wo L-Arginin zu L-Citrullin und Stickstoffmonoxid (NO) oxidiert werden. Durch die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) wird die lösliche Guanylatcyclase aktiviert, die durch eine Erhöhung des cyclischen Guanosinmonophosphates (cGMP) eine Erschlaffung der glatten Muskulatur auslöst. Da ein endothelialer, bioaktiver NO-Mangel mit Atherosklerose und Hypertension assoziiert werden kann, besitzt eNOS eine gefäßprotektive Wirkung^[33].

Zudem konnte gezeigt werden, dass NO in der Frakturheilung eine Rolle spielt, indem es als Mediator die Entzündungsphase (siehe 2.2.2) beschleunigt und somit zur Kallusbildung beiträgt^[6].

2.3.5 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

VEGF ist neben verschiedener proangiogener Faktoren einer der wichtigsten Stimulatoren der Angiogenese. Zur Familie der VEGF-Signalmoleküle gehören VEGF A-F sowie placental growth factor (PlGF). Alle wirken über die Anbindung an einen spezifischen Tyrosinkinase-Rezeptor (VEGF-Rezeptor).

Zelluläre Hypoxie erhöht reflektorisch die Konzentration an VEGF. Verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine wie z.B. Interleukin 1 (IL-1), Fibroblast Growth Factor (FGF), Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) führen ebenfalls zu einem Anstieg der VEGFs^[130].

Im Gefäßendothel fördert VEGF die Produktion von NO und führt zur Gefäßdilatation^[50].

2.3.6 Receptor Activator of NF-κB (RANK), Receptor Activator of NF-κB Ligand (RANKL) und Osteoprotegerin (OPG)

Der Receptor Activator of NF-κB (RANK) wird an der Osteoklastenoberfläche exprimiert und von Receptor Activator of NF-κB Ligand (RANKL) gebunden.

Dadurch wird die Entwicklung und Differenzierung reifer Osteoklasten angeregt und Osteoklasten aktiviert. RANKL wird von Osteoblasten gebildet und gehört, wie Osteoprotegerin (OPG), zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF). RANKL kann aufgrund seiner Schlüsselrolle im Knochenstoffwechsel als Marker für die Osteoklastenaktivität verwendet werden^{[11],[125]}.

Osteoprotegerin (OPG) stellt den Gegenspieler des Receptor Activator of NF-κB-Ligand dar und kann die Aktivierung von Osteoklasten durch Bindung und Deaktivierung von RANKL hemmen. OPG wird wie RANKL in den Osteoblasten gebildet und kann aufgrund seiner RANKL-hemmenden Wirkung als Marker der Osteoblastenaktivität genutzt werden^[11].

2.4 Frakturmodelle

In der heutigen Frakturheilungsforschung ist die Verwendung von Tiermodellen unabdingbar geworden. In-vitro können verschiedene zelluläre Interaktionen zwar reproduziert, aber dennoch nicht im Ganzen erfasst werden. Zudem kann vor allem der Einfluss biomechanischer Faktoren in der Heilungsphase schlecht simuliert werden^[54]. So konnte z.B. im Tiermodell gezeigt werden, dass die Knochenheilung durch biomechanische Faktoren signifikant beeinflusst wird^[23].

Im Verlauf der letzten Jahrzehnte wurden verschiedene Tiermodelle zur Frakturheilungsforschung genutzt^[87]. Vorzugsweise handelte es sich hierbei um Großtiermodelle wie Kaninchen^[44], Hunde^[24] oder Schafe^[18].

Diese Modelle verfügen wie der Mensch über Havers-Kanäle und machen damit den Prozess der Frakturheilung vergleichbar. Ebenso können Osteosynthesematerialien sowie Eingriffstechniken aufgrund der ähnlichen Größenverhältnisse direkt in die klinische Praxis übertragen werden^[87]. Nachteile von Großtiermodellen sind neben der Notwendigkeit von adäquaten Haltungsbedingungen auch die enormen Kosten was eine Limitierung der Fallzahlen zur Folge hat. Aufgrund dieser Limitierungen hat die Anzahl der Studien mit Kleintiermodellen über die Jahre hin zugenommen (s. Abbildung 2.6)^[54]. Ausschlaggebend sind dabei die günstigeren Haltungs- und Zuchtbedingungen, die größere Gruppengrößen ermöglichen. Zudem ist das Genom der Maus vollkommen entschlüsselt, was die Untersuchung einer Vielzahl transgener Stämme und spezifischer Antikörper zur Analyse molekularbiologischer Prozesse ermöglicht^[61]. Der große Nachteil der Kleintiermodelle besteht jedoch darin, dass Ratten und Mäusen keine Havers-Systeme besitzen. Sie benutzen im Gegensatz zu größeren Tieren Resorptionshöhlen für das Knochen-Remodeling. Diese sind zwar mit dem Havers-System vergleichbar, dennoch sind die Ergebnisse nicht uneingeschränkt übertragbar^[87].

Des Weiteren erschweren anatomische Bedingungen die osteosynthetische Versorgung^[58]. In früheren Studien wurde daher sogar auf die Stabilisierung der Fraktur im Kleintiermodell verzichtet^[25].

Das 1984 von Bonnarens und Einhorn beschriebene Modell der Frakturversorgung mittels eines intramedullären Pins bei Ratten^[10] findet mittlerweile in der Mehrzahl der Studien mit geschlossenem Frakturmodell Anwendung. Dieses standardisierte Verfahren wurde vom Femur der Ratte erst auf deren Tibia und später auf die Maus (Femur, Tibia) übertragen^[80]. Hiermit konnte durch eine vereinfachte Osteosynthese mittels Pin die Stabilisierung nach geschlossener Frakturierung im Kleintiermodell gewährleistet werden^{[5],[10]}. Ein großer Nachteil des intramedullären Pins ist neben einer erhöhten Dislokationsgefahr vor allem die fehlende axiale und rotatorische Stabilität^[57].

Um eine Rotationsstabilität zu gewährleisten, wurde der Verriegelungsnagel entwickelt. Dazu wurden die Enden einer Kanüle abgeflacht, so dass dieser sich besser im Knochen verankert^[57].

Mit der Entwicklung der intramedullären Zugschraube (MouseScrew, Research Implant System (RIS), Davos, Schweiz) konnte eine ganz neue Osteosynthesetechnik für Frakturmodelle in der Maus entwickelt werden. Durch das proximale Gewinde und den distalen Konus kann die Fraktur sowohl rotationsstabil, als auch mit einer gewissen axialen Stabilität versorgt werden^[59]. Die intramedulläre Zugschraube (MouseScrew) wurde zur Frakturversorgung in dieser Studie verwendet.

Im Gegensatz zum geschlossenen Frakturmodell, bei dem die Fraktur durch eine stumpfe Guillotine erzeugt wird, wird bei dem offenen Frakturmodell eine Osteotomie mittels Gigly-Säge am freiliegenden Knochen durchgeführt^[19].

Ein Nachteil des offenen Frakturmodells ist der Weichteilschaden, da der Knochen vor der Osteotomie freipräpariert werden muss. Dieser beeinträchtigt die Vaskularisation des Femurs. Zusätzlich kann es bei der Nutzung extramedullärer Implantate zur Verletzung des Periost kommen, was die Frakturheilung ebenfalls beeinträchtigen kann (s. 2.1.2.1)^[58].

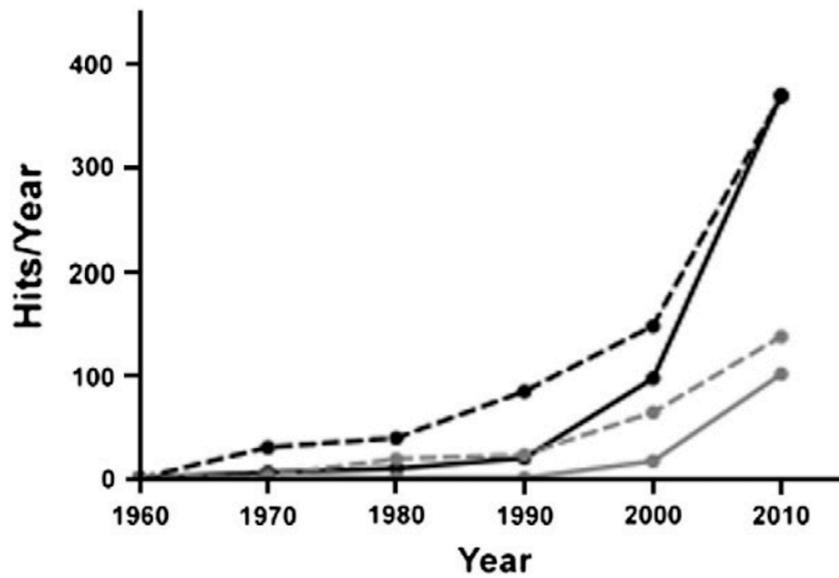


Abbildung 2.6: Publikationsanzahl pro Jahr zwischen 1960 und 2010 mit den Suchbegriffen: „bone repair and mice“ (schwarze Kurve), „fracture healing and mice“ (graue Kurve), „bone repair and rats“ (gestrichelte schwarze Kurve), „fracture healing and rats“ (gestrichelte, graue Kurve). (Quelle: Histing T., Garcia P. et al. (2011). Small animal bone healing models: Standards, tips and pitfalls, results of a consensus meeting. Bone 49, S. 591-599 ^[54])

2.5 Cilostazol

Cilostazol ist ein 2-Oxoquinolon Derivat mit der Summenformel $C_{20}H_{27}N_5O_2$ (CAS-Nummer 73963-72-1) und einer molaren Masse von $369,46 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Der IUPAC-Name von Cilostazol lautet 6-[4-(1-Cyclohexyl-1H-tetrazol-5-yl)butoxy]-3,4-dihydrochinolin-2-on.

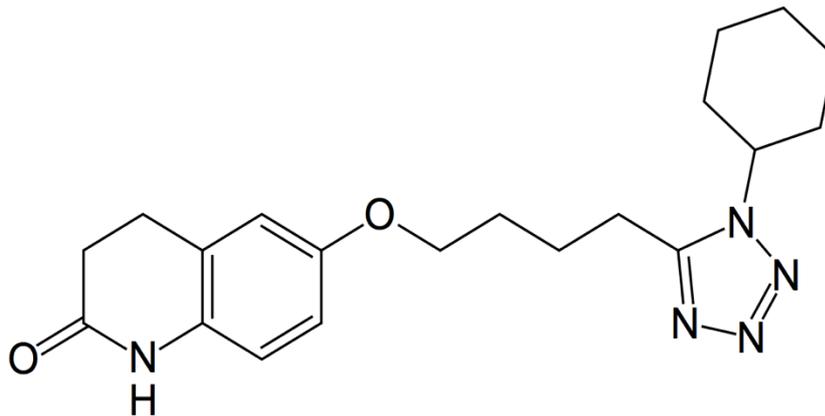


Abbildung 2.7: Strukturformel Cilostazol

2.5.1 Wirkmechanismus

Cilostazol inhibiert selektiv die Phosphodiesterase III (PDE-III), welche hauptsächlich in Thrombozyten, Herzmuskelzellen und der glatten Muskulatur vorkommt. Die Phosphodiesterase III baut intrazellulär zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ab und senkt so dessen Spiegel. Durch die Inhibierung der PDE-III steigt intrazellulär die cAMP-Konzentration an, was in den glatten Muskelzellen über die cAMP-abhängige Proteinkinase zum Absinken der intrazellulären Calcium-Konzentration führt. Mechanismen sind dabei die Calcium-Pumpen-Aktivierung des sarkoplasmatischen Retikulums sowie der Verschluss zellulärer Calcium-Kanäle^{[68],[120]}. Der Calciumabfall führt zur Dephosphorylierung der Myosin leichten Ketten und somit zu einer Vasodilatation des Endothels mit Perfusionsverbesserung. Parallel dazu hat Cilostazol auch einen Effekt auf die Thrombozytenaggregation^[68].

2.5.2 Pharmakokinetik

Die empfohle Tagesdosis beträgt beim Menschen zweimal täglich 100 mg^[8]. Dabei erhöht fettreiche Nahrung die Absorption und damit die Konzentration um 90%, sowie die AUC („area under the curve“ – Bioverfügbarkeit in Relation zur i.v.-Gabe) um 25%^[12]. Die genaue Bioverfügbarkeit ist aber bis jetzt unbekannt. Die Verstoffwechslung erfolgt über Cytochrom P450 Isoenzym 3A4 und im geringen Ausmaß über Isoenzym 2C19 in der Leber. Die Dosisspitze von Cilostazol wird nach 3 Stunden ab Einnahme erreicht. Die Halbwertszeit liegt bei 11 Stunden. Nach Absetzen von Cilostazol normalisiert sich die Thrombozytenaggregation innerhalb von 48-96 Stunden ohne Rebound^{[38],[110]}. Bei einer experimentellen Dosiserhöhung wurde eine geringe antiparallele Serumkonzentrationserhöhung im Blut festgestellt. Eine Exkretion über den Harn konnte in Studien ausgeschlossen werden. Bramer et al. nimmt weiterhin an, dass aufgrund der relativ geringen Plasma Clearance und großvolumigen Distribution von Cilostazol von einem geringen First-Pass-Effekt ausgegangen werden kann^[38]. Cilostazol unterliegt einem zirkadianen Schwankungspotential und wird gerade am Morgen schneller und besser resorbiert als zur Abendstunde. Saisonale Unterschiede in der Pharmakokinetik von Cilostazol wurden ebenfalls in einer Studie festgestellt^[74].

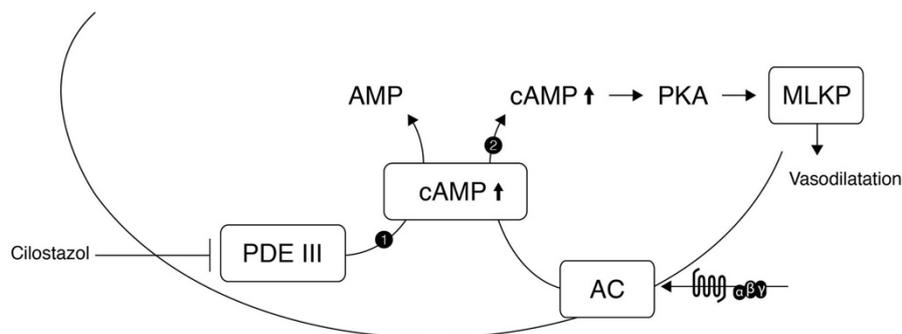


Abbildung 2.8: Cilostazol Wirkschema: PDE-III senkt den intrazellulären cAMP-Spiegel (1) durch dessen Abbau. Über eine Hemmung der PDE-III durch Cilostazol kommt es daher zu einem cAMP-Anstieg (2). Dieser aktiviert die Proteinkinase A welche wiederum die Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase aktiviert. Die dadurch einsetzende Dephosphorylierung des Myosins sorgt für eine Relaxation der glatten Muskulatur.

2.5.3 Indikationen

Vor der Zulassung in den USA 1999 und Europa 2007 wurden acht doppelblinde, placebokontrollierte Phase-III-Studien über 12-24 Wochen durchgeführt. Nach der Zulassung wurden zwei weitere Phase IV-Studien beendet (PACE-, CASTLE-Studie)^[51]. Dabei wurde eine erhöhte Mortalität unter Cilostazol ausgeschlossen (CASTLE). Sechs weitere Studien untersuchten die Wirksamkeit von Cilostazol anhand der Veränderung der maximalen Gehstrecke als primärer Endpunkt^[28]. Eine Metaanalyse dieser Studien ergab, dass die Gehstrecke der Probanden hoch-signifikant länger war, als die der Kontrollgruppe unter Placebogabe^[8].

Der Wirkstoff Cilostazol ist Mittel der Wahl bei Fontaine Stadium II der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit^{[91],[96]}. Ziel ist eine Wiederherstellung von Lebensqualität und eine Verlängerung der Gehstrecke. Da Cilostazol ebenfalls einen Effekt auf die primäre und sekundäre Phase der Plättchenaggregation hat, wird es in Kombination mit Aspirin als mögliche Alternative zur Kombination von Aspirin/Clopidogrel diskutiert^{[69], [131]}. Schleinitz et al. konnten zeigen, dass zwischen der Therapie mit den Thrombozytenaggregationshemmern Ticlopidin und Clopidogrel und dem Phosphodiesterasehemmer Cilostazol kein signifikanter Unterschied liegt^[109]. Die Kombination von Cilostazol mit der üblichen dualen Aspirin/Clopidogrel-Therapie nach perkutaner transluminaler Angioplastie mit Stentimplantation war in Studien mit einer signifikanten Riskioreduktion für Restenosierungen vergesellschaftet^{[119],[132]}. Angedacht wird Cilostazol auch für die Therapie des Long-QT-Syndroms. Man nimmt an, dass über eine Erhöhung von L-Typ Calcium Kanälen Episoden ventrikulärer Tachykardien reduziert werden könnten^[113]. Weitere Studien haben auch gezeigt, dass Cilostazol bei stressinduzierten Magenschleimhautläsion in Ratten zu einer signifikanten Verbesserung der Beschwerden führt^[89].

2.5.4 Nebenwirkungen

Cilostazol, im Dosisbereich von 50 - 100 mg, hat sich im klinischen Alltag sowie in diversen Studien als nebenwirkungsarm gezeigt^{[88],[117]}. Lediglich leichte Beschwerden wie Durchfall, Kopfschmerzen und Schwindel wurden angegeben. Eher selten kam es zu Brustschmerzen, Palpitationen und Übelkeit^[73].

Die Applikation eines P450-inhibierenden Medikamentes parallel zur Cilostazolgabe hatte in Studien keinen Effekt auf die Schwere oder Häufigkeit der Nebenwirkungen^[89].

Da es im Zusammenhang mit anderen Phosphodiesterase-III-Hemmern bei Patienten mit Herzinsuffizienzen zu arrhythmogenen Episoden kam, ist hier eine Gabe von Cilostazol kontraindiziert. Darunter fallen auch Patienten mit anamnestisch bekannten ventrikulären Tachykardien, Kammerflimmern sowie multifokalen ventrikulären Ektopien. Eine Cochrane Meta-Analyse beschreibt ein Anstieg der Mortalität bei PDE-III-Inhibitor-Gabe und bekannter Herzerkrankung^[3].

2.6 Ziel der Arbeit

In der Studie soll geklärt werden, ob Cilostazol, ein Phosphodiesterase-III-Inhibitor, die Frakturheilung im Mausmodell beeinflusst.

2.7 Arbeitshypothese

Nullhypothese:

„Cilostazol hat keinen Einfluss auf die Frakturheilung im Mausmodell“

Kapitel 3 - Material und Methoden

3.1 Versuche

3.1.1 Studienprotokoll

Die für diese Studie (Versuchsnummer 47/2012) notwendigen Tierversuche wurden vom Landesamt für Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittel- und Veterinärwesen (Zentralstelle – Konrad-Zuse-Straße 11, 66115 Saarbrücken) genehmigt und in den Räumlichkeiten des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie am Universitätsklinikum Homburg/Saar, unter Berücksichtigung geltender Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes, durchgeführt.

Für die Studie wurden ausgewachsene CD-1 Mäuse (Alter zwischen 12-16 Wochen) mit einem Durchschnittsgewicht von 33,5 g Körpergewicht (KG) verwendet. (Kontrollgruppe: $32,5 \pm 0,5$ g ; Cilostazolgruppe: $33,5 \pm 0,8$ g)

Die Unterbringung der Tiere erfolgte durch die Tierhaltung der Klinisch-Experimentellen Chirurgie der Universität des Saarlandes. Die Mäuse wurden bei 12-stündigem Tag-/Nachtrhythmus, klimatisierten Räumlichkeiten (Lufttemperatur 22°C, Luftfeuchtigkeit 50%) und Versorgung mit Standarddiätfutter (Altromin 1320, Altromin, Lage, Deutschland) ad libidum in Kleintierkäfigen gehalten.

Die Gesamtpopulation der Studie umfasste 50 Mäuse, die zu gleichen Teilen in eine Kontroll- sowie Interventionsgruppe eingeteilt wurden. Beide Gruppen erhielten eine tägliche Fütterung p.o. über einen Zeitraum von 2 bzw. 5 Wochen. Die Interventionsgruppe erhielt 30 mg/kg KG Cilostazol (gelöst in 1 ml 0,9% - Natriumchloridlösung). Die Kontrollgruppe erhielt eine äquivalente Menge Natriumchlorid-Lösung.

Die Einteilung beider Gruppen (Kontrollgruppe, Interventionsgruppe) erfolgte in 2 Untergruppen, so dass die Frakturheilung in einer frühen Phase (2 Wochen) und späten Phase (5 Wochen) untersucht werden konnte. Jeweils 10 Tiere aus beiden Gruppen wurden somit nach 2 Wochen getötet und die explantierten Femora röntgenologisch, biomechanisch und histologisch untersucht. Zusätzlich wurden bei 5 Tieren aus beiden Gruppen Kallusgewebe entnommen, das daraufhin mittels Western-Blot-Analyse untersucht wurde. Die restlichen Tiere beider Gruppen wurden nach 5 Wochen getötet und ebenfalls röntgenologisch, biomechanisch und histologisch untersucht. Auf eine Western-Blot-Analyse wurde, aufgrund des unzureichenden Kallusgewebes der 5-Wochen-Tiere, verzichtet. In der Kontrollgruppe verstarb ein Tier (n=9) aufgrund einer Überdosis des verabreichten Narkosemittels.

	Kontrolle		Cilostazol	
	2 Wochen	5 Wochen	2 Wochen	5 Wochen
Biomechanik	n = 9	n = 10	n = 10	n = 10
Radiologie	n = 9	n = 10	n = 10	n = 10
Histologie	n = 9	n = 10	n = 10	n = 10
Western-Blot	n = 5	∅	n = 5	∅

Tabelle 3.1 Studienprotokoll

3.1.2 Tiermodell

In dieser Studie wurde ein geschlossenes Frakturmodell der Maus verwendet. Die Fraktur wurde geschlossen mittels Guillotine erzeugt. Anschließend wurde die Fraktur osteosynthetisch mittels intramedullärer Zugschraube versorgt.

3.1.3 Implantat

Bei der verwendeten MouseScrew™ der Firma RISystems AG (Davos, Schweiz) handelt es sich um eine aus medizinischem Stahl gefertigte intramedulläre Zugschraube. Die Schraube verfügt über ein proximales Gewinde (Länge: 4 mm), einen Schaft (Länge: 12,4 mm) und einem distalen Konus (Länge: 0,8 mm) zur Verankerung in den Kondylen des distalen Femurs. Die Gesamtlänge der Schraube beträgt somit 17,2 mm; der Durchmesser 0,5 mm (Konusdurchmesser: 0,8 mm).

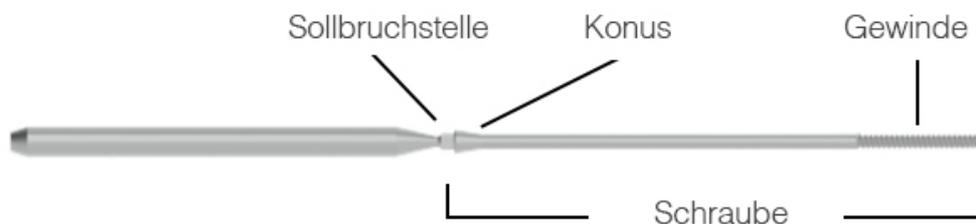


Abbildung 3.1: MouseScrew, RISystems AG, Davos, Schweiz

3.1.4 Operationsverfahren

Alle im Zuge dieser Arbeit durchgeführten operativen Eingriffe wurden in den Räumlichkeiten des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes durchgeführt. Die hier beschriebene, standardisierte Vorgehensweise wurde bei allen Operationen eingehalten. Die Narkotisierung der Tiere erfolgte i.p., wobei die erforderliche Dosierung anhand des Körpergewichtes ermittelt wurde. Zur Narkotisierung wurde Ketamin (Ursostamin® 100 mg – Serumwerke Bernburg, Deutschland) mit einer Dosierung von 75 mg/kg Körpergewicht und Xylazin (Rompun® 2% - BayerVital GmbH, Leverkusen, Deutschland) in einer Dosierung von 15mg/kg als Injektion appliziert. Als Augenpflege wurde Dexpanthenol-Salbe (Bepanthen® BayerVital GmbH, Leverkusen, Deutschland) auf die Kornea aufgetragen um einer intraoperativen Austrocknung vorzubeugen. Die lokale Enthaarung des Operationsgebietes wurde mit einem elektrischen Rasier durchgeführt.

Eine sekundäre, gründliche Enthaarung wurde durch das anschließende, separate Auftragen von Elca-Med®-Enthaarungscreme (ASID BONZ GmbH, Herrenberg, Deutschland) gewährleistet.

Zu Beginn des operativen Eingriffs befand sich die Maus in Rückenlage. Das rechte Bein wurde durch den in der Fossa poplitea positionierten Ringfinger, den Daumen auf der vorderen Tibiakante und den Zeigefinger auf dem Femur, in Position gehalten. Anschließend wurde die Region über der Patella mit Softasept® N (B. Braun AG, Melsungen, Deutschland), unter der Berücksichtigung der Einwirkzeit, desinfiziert. Erst danach erfolgte die Inzision medial der Patella (Länge: ca. 5 mm) in kraniokaudaler Schnittrichtung. Die Patella konnte mit einer Pinzette atraumatisch mobilisiert und lateral luxiert werden.

Die damit dargestellte Fossa intercondylaris diente anschließend als Zugang zum femoralen Markraum. Die Eröffnung des Markraums erfolgte mit einem Akkubohrer (0,3 mm). Über den nun komplett eröffneten Markraum wurde eine 27 G Dental-Anästhesiekanüle (Sterican® Einmalkanüle Dentale-Anästhesie-Ober/Unterkiefer, Größe 30/42 – G 27 x 1,5/Durchmesser 0,4 x 40 mm, Braun, Melsungen, Deutschland) über den Zugang am distalen Femur eingeführt und posterior über den Trochanter major mit Durchspießung der Haut ausgeleitet. Anschließend erfolgte die seitliche Umlagerung der Maus auf die linke Seite und das Sichern der korrekten Lage der eingeführten Kanüle. Über die sichtbare Spitze der Nadel wurde ein 0,2 mm dicker Wolfram-Draht (Goodfellow Cambridge Limited, Huntingdon, England) eingeführt, der nach der Entfernung der Kanüle im Markraum verblieb. Eine Röntgenkontrolle des liegenden Drahtes überprüfte die korrekte Lage. Anschließend wurde die Maus in Rückenlage in einer 3-Punkt-Biege-Apparatur positioniert und das rechte Femur geschlossen frakturiert.

Mit Hilfe des noch liegenden Wolfram-Drahtes konnte daraufhin die MouseScrew™ eingebracht werden. Die Sollbruchstelle am distalen Teil der MouseScrew™ brach nach Verankerung des Gewindes im Trochanter major sowie des Konus in der Fossa intercondylaris ab. Eine anschließende Röntgenkontrolle (Röntgenanlage MX-20, Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, Illinois, USA) kontrollierte die korrekte Lage sowie die Konfiguration der Fraktur. Durch Extension des rechten Beins konnte die Patella wieder in physiologische Position reponiert werden.

Die Patella wurde mittels 5-0 Prolene® (Ethicon, Johnson & Johnson, New Jersey, USA) Naht refixiert. Die Hautnaht wurde nach einer Funktionsprüfung des rechten Beines ebenfalls mit 5-0 Prolene® Faden durchgeführt.



Abbildung 3.2: Hautschnitt medial der Patella



Abbildung 3.3: Luxation der Patella und Darstellung der Femurkondylen



Abbildung 3.4: Eröffnung des Markraums



Abbildung 3.5: Kanüle intramedullär vor Einbringung des Führungsdrahtes



Abbildung 3.6: Einliegender Führungsdraht

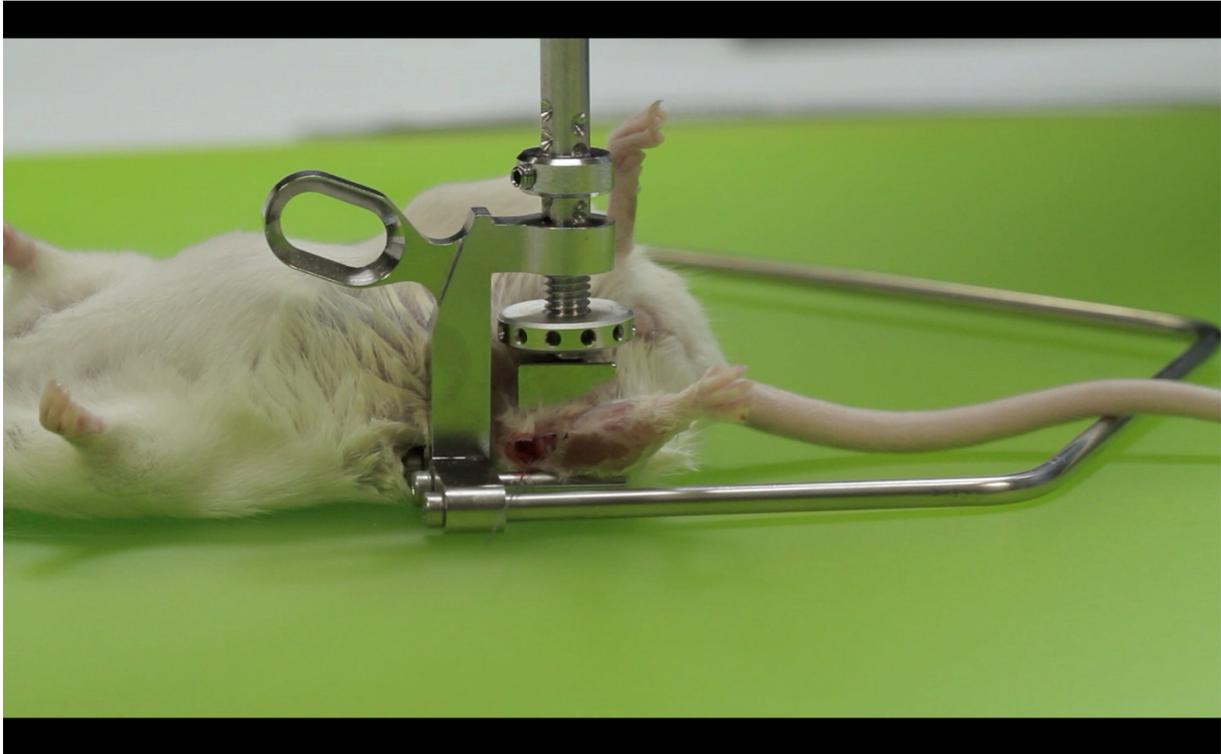


Abbildung 3.7: Frakturierung des rechten Mausfemurs mit der Guillotine



Abbildung 3.8: Einbringen der MouseScrew in das frakturierte Femur



Abbildung 3.9: Sicht auf die Fossa intercondylaris nach Abbrechen der Schraube im Bereich der Sollbruchstelle



Abbildung 3.10: Reposition der Patella



Abbildung 3.11: Refixation der Patella



Abbildung 3.12: Hautnaht

3.1.5 Medikamentenapplikation

Die Tiere wurden täglich für eine Dauer von 2 bzw. 5 Wochen per os mit Cilostazol (Pletal®) oder der entsprechenden Kontrolllösung (NaCl 0,9%, B. Braun, Melsungen, Deutschland), je nach Gruppenzugehörigkeit, gefüttert. Dazu wurde die Tablette Cilostazol in 0,9% NaCl gelöst und mit einer Spritze aufgezogen. Für die Fütterung wurden die Mäuse über einen Genickgriff einzeln aus den Käfigen genommen und die Spritze mit einem Aufsatz vorsichtig in den Mund vorgeschoben. Bei der reflexartig einsetzenden Trinkbewegung wurde der Maus langsam die Cilostazoldosis von 30 mg/kg Kg bzw. die entsprechende Menge der Kochsalzlösung appliziert. So konnte sichergestellt werden, dass jede Maus die exakte Dosis des gelösten Wirkstoffes erhalten hatte. Die Durchmischung des Wirkstoffes wurde vor jeder Applikation durch erneutes Aufziehen sichergestellt.

3.1.6 Entnahme der Femora

Die Tiere wurden nach 2 bzw. 5 Wochen erneut narkotisiert. Nach der Röntgenuntersuchung und der Blutentnahme über die V. cava wurden die Tiere mit einem Genickbruch getötet. Anschließend erfolgte die Explantation beider, sowohl des frakturierten als auch des kontralateralen, gesunden, Femurs. Die Knie- sowie Hüftregion wurden mit einer Präparationsschere großflächig eröffnet und die knöchernen Strukturen vorsichtig freipräpariert.

Die Exartikulation erfolgte im Bereich des Articulatio genu sowie coxae. Anschließend wurde das Weichteilgewebe vorsichtig reseziert und die Schraube über den Konus mit Hilfe eines Nadelhalters entfernt. Die explantierten Femora wurden zum Schutz vor Austrocknung kontinuierlich mit 0,9% NaCl-Lösung befeuchtet und in mit Kochsalzlösung getränkte Kompressen eingebettet, bevor sie bei -80 °C eingefroren wurden.

3.2 Auswertung

3.2.1 Biomechanik

Getestet wurden beide Femora, sowohl das frakturierte als auch das nicht-frakturierte Femur der Maus. Die Steifigkeit des Kallus [N/mm], konnte durch eine 3-Punkt-Biege-Testung (Mini-Zwick Z 2.5, Zwick GmbH, Ulm, Deutschland) zerstörungsfrei gemessen werden. Angegeben wurde die absolute Steifigkeit in [N/mm] sowie in Prozent in Relation zum gesunden, kontralateralen Femur [%]. Das Auflegen der Femora auf die zwei Stempel (Abstand 6 mm) der Prüfvorrichtung wurde standardisiert mit der ventralen Seite nach unten durchgeführt.

Die Messungsgeschwindigkeit betrug konstant 1mm/min. Die gemessenen Werte wurden in ein Kraft-Weg-Diagramm übertragen. Anschließend wurde die Biegesteifigkeit im linearen Anteil anhand der Steigung bestimmt.

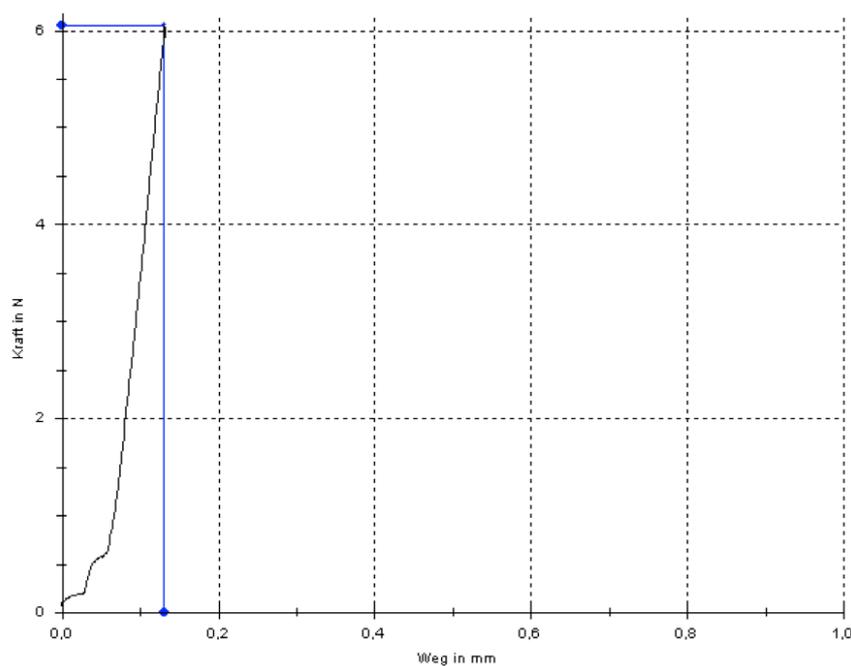


Abbildung 3.13: Kraft-Weg-Diagramm zur Bestimmung der Biegesteifigkeit

3.2.2 Radiologie

Um eine radiologische Bewertung der Frakturheilung durchführen zu können, wurden bei allen Femora digitale, dorso-ventrale Röntgenbilder angefertigt (Röntgenanlage MX-20 (Faxitron-X-Ray Coporation, Wheeling, Illinois, USA)). Mit Hilfe der Röntgenbilder konnte die Lage des Führungsdrahtes (A), sowie die korrekte Einbringung der Schraube intraoperativ (B), kontrolliert und die beiden explantierten Femora nach Schraubenentfernung (2 bzw. 5 Wochen postoperativ) verglichen werden (Abb. 3.15).

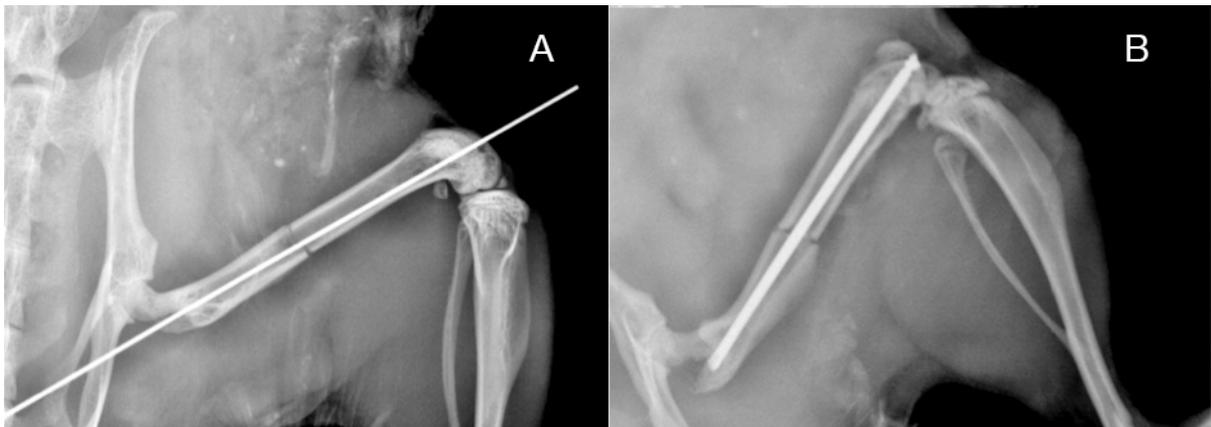


Abbildung 3.14: Lage des Führungsdrahtes (A), Lage der eingebrachten Schraube (B)

Anhand der postoperativen Aufnahme der Femora (Abb. 3.15) erfolgte die Bewertung der Frakturheilung mittels Goldberg-Score (siehe Tabelle 3.2).

Score	Kriterium
1	keine knöcherne Überbauung des Frakturspalts
2	partielle Überbauung des Frakturspalts
3	komplette Überbauung des Frakturspalts

Tabelle 3.2 Goldberg-Score



Abbildung 3.15: Darstellung eines nach 2 Wochen postoperativ explantierten Femurs der Kontrollgruppe mit partieller Überbauung des Frakturspaltes (Goldberg-Score 2)

3.2.3 Histologie

Nach dem Abschluss aller Messungen wurden die Knochen für eine Dauer von 12-24 Stunden in eine Zink-Lösung (ICH Zinc Fixative – BD Bioscience Pharmingen™, San Jose, USA) fixiert, um danach für 14 Tage bei 4°C mit Hilfe einer 10%igen EDTA-Lösung entkalkt zu werden. Eine Entwässerung der Knochen wurde durch eine in Konzentration prozentual-aufsteigende Alkoholreihe (jeweils stündlich steigend von 70 %, 80 %, auf 90 %, sowie 4 malig 100%) durchgeführt. Vor der endgültigen Paraffinbettung (3 x je 1 Stunde) wurden die Proben dreimal einstündig mit Xylol behandelt, um die Gewebe paraffingängig zu machen. Die histologischen Schnittpräparate wurden im Bereich des größten Kallusdurchmessers in sagittal-longitudinaler Schnittführung, mit einer Schnittdicke von 2 µm angefertigt. Als Färbung diente die Trichrome Masson-Goldner Methode.

Die Bilddigitalisierung der gefärbten Präparate erfolgte mittels Zeiss Axio Vision 3.1® und Zeiss Axio Cam® (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) unter 1,25-facher Vergrößerung. Die weitere Auswertung erfolgte mit Hilfe von ImageJ (ImageJ Analysis Systems, Bethesda, USA)

Folgende Parameter wurden bestimmt:

- Femurdurchmesser BDm [mm]

- Kallusdurchmesser [mm]

- Periostale Kallusfläche CAr [mm²]

- Fläche knöcherner Anteil innerhalb des periostalen Kallus TOTAr [mm²]

- Fläche knorpeliger Anteil innerhalb des periostalen Kallus CgAr [mm²]

- Fläche bindegewebiger Anteil innerhalb des periostalen Kallus FTAr [mm²]

In das Verhältnis wurden folgende, gemessene Werte gesetzt:

$$- \frac{\text{TOTAr}}{\text{CAr}} [\%]$$

$$- \frac{\text{CgAR}}{\text{CAr}} [\%]$$

$$- \frac{\text{FTAr}}{\text{CAr}} [\%]$$

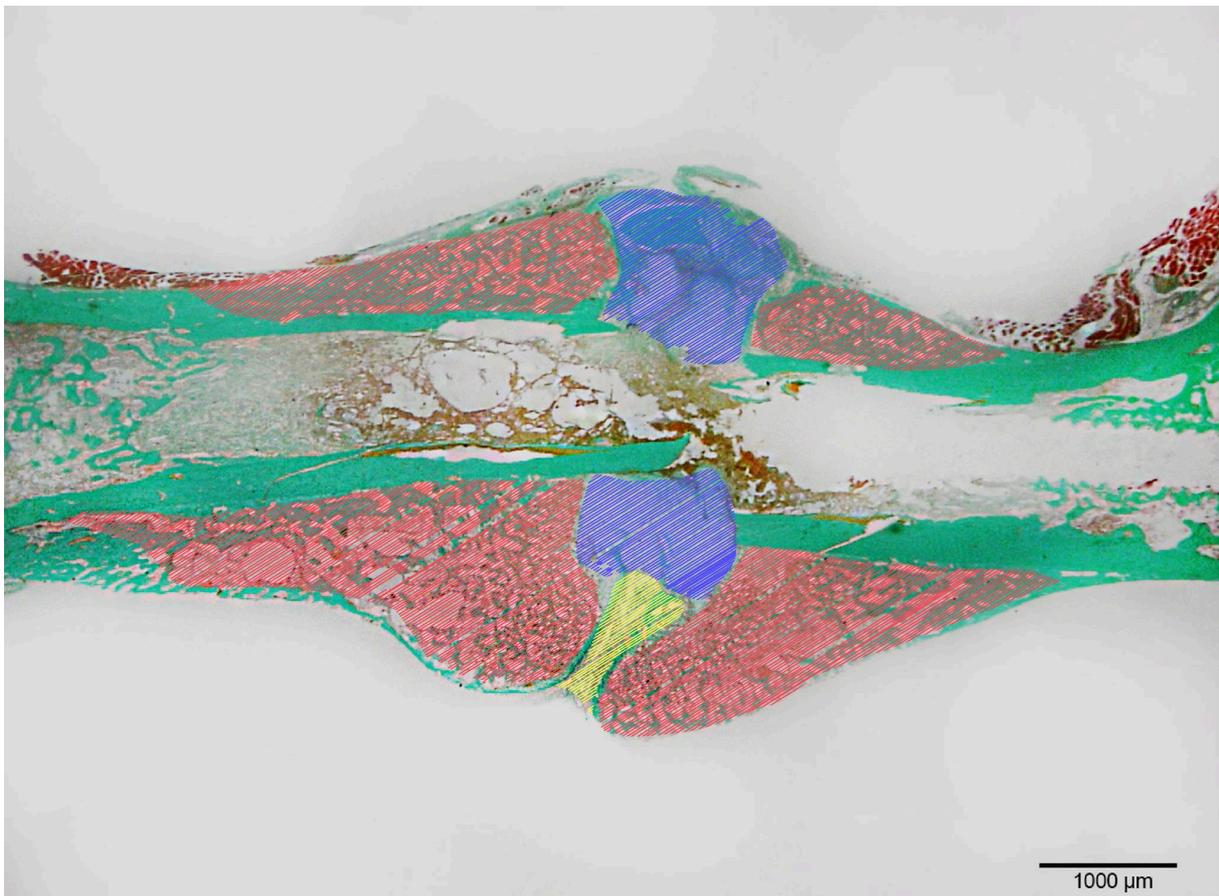


Abbildung 3.16: Histologisches Schnittbild des Kallusgewebes, eingezeichnet sind Knochen- (rot), Knorpel- (blau) sowie Bindegewebsfraktion (gelb).

3.2.3.1 Trichrome Masson-Goldner-Färbung

Aufgrund ihres breiten Farbspektrums erlaubt die Trichrome Masson-Goldner-Färbung eine gute Identifizierung einzelner Kallusbestandteile. Die Durchführung der Präparatseinfärbung wird im Folgenden beschrieben:

Mit Hilfe von Weigerts Eisenhämatoxylin wird das vorbereitete Präparat 1 bis 2 Minuten gefärbt und anschließend 10 bis 15 Minuten unter fließendem Wasser gespült. Der zweite Färbungsschritt sieht eine Anfärbung mit Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin für 5 bis 7 Minuten vor, die daraufhin mit 1%iger Essigsäure abgespült und in Molybdato-phosphorsäure-Orange bis zur kompletten Entfärbung des Bindegewebes eingelegt wird. Es erfolgt erneut eine kurze Abspülung mit 1%iger Essigsäure bevor man das Präparat mit Lichtgrün für 5 Minuten gegenfärbt. Die letzten Schritte umfassen eine weitere Auswaschung mit Essigsäure, Entwässerung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe, sowie Inkubation in Xylol zur Aufnahmesteigerung des Paraffins und die Eindeckung mit einem xylollöslichen Eindeckmittel. Farblich stellen sich mineralisierter Knochen als leuchtend grün, Kollagene als grün, Muskelgewebe als blassrot und Zytoplasma als hellrot/orange dar.

3.2.3.2 Tartrat-resistent Acid-Phosphatase-Färbung (TRAP)

Zur quantitativen Erfassung der Osteoklasten wurde postoperativ eine Tartrat-resistent Acid-Phosphatase-Färbung (TRAP) durchgeführt. Die entparaffinierten Schnittpräparate wurden in einer Lösung aus 5 mg Naphthol AS-MX Phosphate (3-Phosphonooxy-N-(2,4-dimethylphenyl)-2-naphtalenecarboxamide) und 11 mg Fast Red TR Salt (4-Chloro-2-methylbenzenediazonium) in 10 ml 0,2 M Natriumacetatpuffer (pH 5,0) bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Die anschließende Gegenfärbung erfolgte mittels Methylgrün. Abschließend wurden die Präparate mit Glyceringelatine eingedeckt.

In der 2-Wochen-Versuchstiergruppe wurden 10 High-Power-Fields (HPFs) definiert und bei einer 400fachen Vergrößerung ausgezählt. Aufgrund des reduzierten Kallusgewebes der 5-Wochen-Versuchsgruppe wurden hier lediglich 6 HPFs definiert. Alle TRAP-positiven Zellen mit >3 Zellkernen wurden gezählt.

3.2.4 Western Blot

Um die Proteinexpression im Kallusgewebe zu bestimmen wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Bei dieser werden die Proteine erst über eine Gelelektrophorese (Polyacrylamidgel) voneinander, entsprechend ihres Molekulargewichtes, getrennt und danach geblottet. Dazu werden die Banden der Proteine mit einer zweiten Elektrophorese vom Gel auf eine Protein-bindende Membran übertragen. Über eine Licht-emittierende Enzym-Substrat-Reaktion kann die Höhe der Proteinexpression bestimmt werden. Dabei wird das emittierte Licht über einen Röntgenfilm detektiert. Zu denen in dieser Studie analysierten Proteinen gehören neben BMP-2, BMP-4, Cyr61, PCNA, OPG auch RANKL, VEGF und eNOS (s. 2.3).

Einzelne Präparationsschritte nach Entnahme:

Das entnommene Kallusgewebe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei einer Temperatur von -80°C konserviert. Zur Proteinextraktion wurde die entnommene Probe in einem Lysepuffer (10 mM Tris pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 0,5% Triton-X 100, 10 mM NaCl, 0,2mM PMSF, 0,02% NaN_3 sowie Protease Inhibitor-Cocktail (1:100 v/v, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)) homogenisiert bevor sie für 30 Minuten auf Eis inkubiert und bei $16000 \times g$ (13000 Umdrehungen/min) zentrifugiert wurde. Die gesamte Proteinprobe wurde auf einem Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel getrennt und anschließend auf eine Polyvinylendifluorid-Membran transferiert. Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde die Methode nach Lowry verwendet. Bevor die Antikörper zur Inkubation dazugegeben wurden, mussten die unspezifischen Bindungsseiten der Membran blockiert werden.

Die Inkubation für 4 Stunden erfolgte mit folgenden Antikörpern: VEGF (1:10 über Nacht 4°C + 1:100, 3,5 h RT; A20, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland), BMP2/4 (1:25 über Nacht 4°C + 1:100 3,5 h RT; Santa Cruz Biotechnology), Cyr61 (1:25 über Nacht 4°C + 1:75 3,5 h RT; Santa Cruz Biotechnology), eNOS (1:100 über Nacht 4°C + 1:500 3,5 h RT; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland), OPG (1:25 über Nacht 4°C + 1:300 3,5 h RT; Bioss Inc, Biozol Diagnostica, Eching, Deutschland), RANKL (1:50 über Nacht 4°C + 1:300 3,5 h RT; Abcam, Cambridge, England) sowie PCNA (1:500 über Nacht 4°C + 1:1000 3,5h RT; Dako, Hamburg, Deutschland).

Zusätzlich wurden noch für eine Dauer von 1,5 h RT mit corresponding horseradish peroxidase conjugated secondary Antibodies (1:5000, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) inkubiert. Die über Luminol-enhanced Chemiluminescence sichtbar gemachten Signale wurden densitometrisch gemessen und auf das alpha-tubulin-Signal (1:20000, Sigma Aldrich) angepasst, um eine ungleiche Beladung zu korrigieren.

3.3 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SigmaPlot (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland). Alle geführten, statistischen Daten werden als Mittelwert (MEAN) \pm Standardfehler (SEM) im Fließtext angegeben. Nach der Varianztestung (F-Test) und Überprüfung der Normalverteilung, wurden beide Gruppen mittels t-Test verglichen. Bei fehlender Normalverteilung erfolgte die Auswertung mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von 0,05 definiert.

Kapitel 4 - Ergebnisse

4.1 Biomechanik

Die biomechanische Auswertung erfolgte mittels 3-Punkt-Biege-Testung. Die Biegesteifigkeit wurde anhand der Steigungsdreiecke ermittelt. Die Messwerte sind als Relativwerte in Prozent [%] zum kontralateralen Knochen sowie als Absolutwerte in [N/mm] angegeben.

Die Auswertung der biomechanischen Daten der absoluten Biegesteifigkeit der 2-Wochen Tiere ergab einen höheren Mittelwert (MW) von $15,9 \pm 3,0$ N/mm nach der Behandlung mit Cilostazol verglichen mit einem MW von $10,0 \pm 1,6$ N/mm in der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse zeigten jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p > 0,05$). Des Weiteren ergab die relative Biegesteifigkeit in Relation zum gesunden Knochen in der Cilostazolgruppe einen MW von $11,0 \pm 2,5$ %. In der Kontrollgruppe wurde ein MW von $6,7 \pm 1,2$ % erhoben. Eine statistische Signifikanz lies sich auch hier nicht nachweisen ($p > 0,05$).



Abbildung 4.1: Absolute und relative Biegesteifigkeit der 2-Wochen-Tiere der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM

5 Wochen postoperativ lagen die Werte der absoluten Biegesteifigkeit bei den mit Cilostazol behandelten Tieren im Mittel bei $145,3 \pm 9,5$ N/mm. Die Biegesteifigkeit der Kontrollgruppe ergab einen Mittelwert von $101,6 \pm 6,9$ N/mm. Beim Vergleich der relativen Biegesteifigkeit ergab sich in der Cilostazolgruppe ein MW von $93,8 \pm 7,9$ %. Der Mittelwert in der Kontrollgruppe lag bei $65,6 \pm 4,0$ %. Die Unterschiede waren statistisch signifikant.

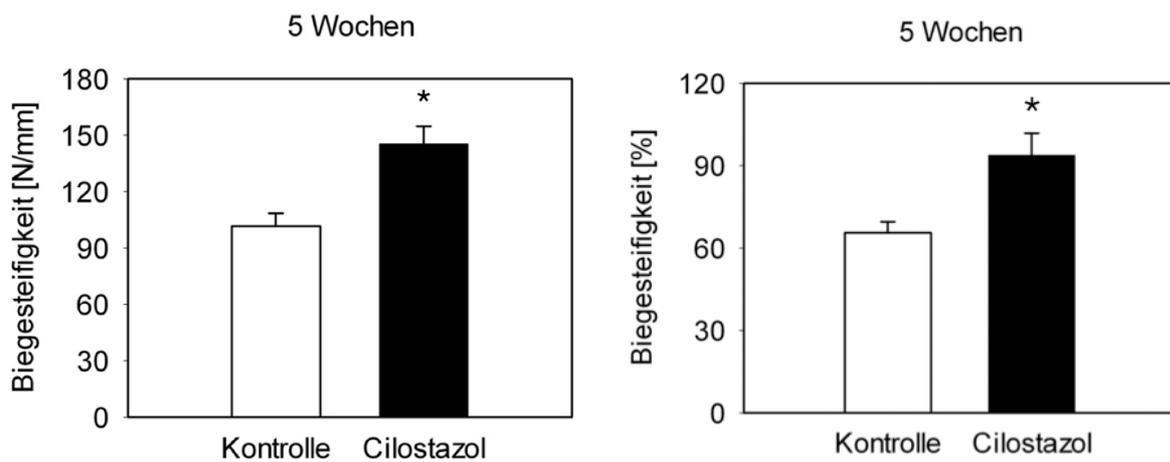


Abbildung 4.2: Absolute und relative Biegesteifigkeit der 5-Wochen-Tiere der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Die kontralateralen Knochen wurden ebenfalls nach 2 sowie 5 Wochen biomechanisch getestet, um den Einfluss von Cilostazol auf das gesunde, nicht frakturierte Femur zu untersuchen. Sowohl nach 2 Wochen als auch nach 5 Wochen war die ermittelte Biegesteifigkeit zwischen beiden Gruppen vergleichbar (Cilostazol $152,2 \pm 6,8$ N/mm vs. Kontrolle $152,4 \pm 6,0$ N/mm, 2 Wochen; Cilostazol $158,5 \pm 6,6$ N/mm vs. Kontrolle $155,8 \pm 6,7$ N/mm, 5 Wochen). Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Behandlung mit Cilostazol keinen signifikanten Einfluss auf die Steifigkeit des gesunden Knochens hat.

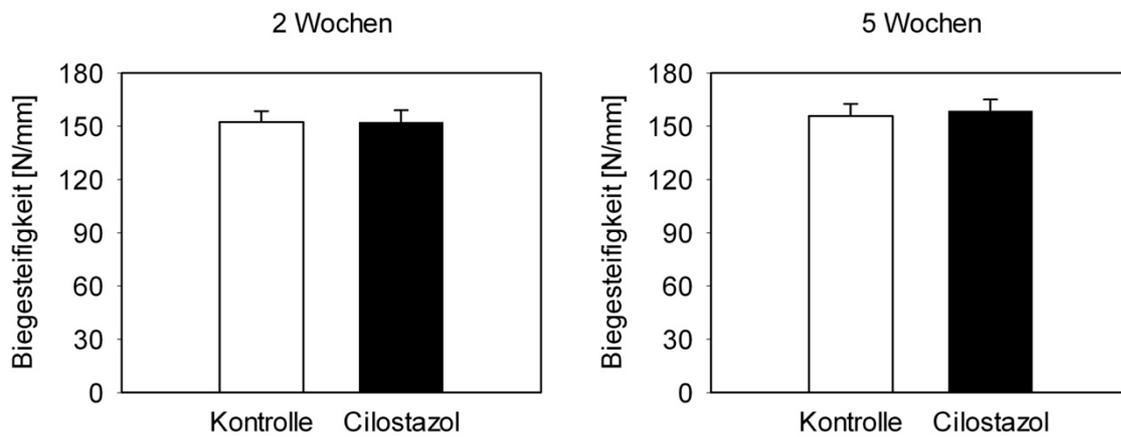


Abbildung 4.3: Absolute Biegesteifigkeit der gesunden Knochen der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM

4.2 Radiologie

Die Auswertung der digitalisierten Röntgenbilder erfolgte 2 und 5 Wochen postoperativ nach Frakturierung und operativer Versorgung.

Zur Bewertung wurde der Goldberg-Score herangezogen. Die Auswertung der 2-Wochen-Tiere zeigte eine signifikant bessere, knöcherner Überbauung des Frakturspalts in der Cilostazolgruppe (MW $1,4 \pm 0,2$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($1,0 \pm 0,0$).

Die Auswertung der 5 Wochen Tiere ergab keinen signifikanten Unterschied. Radiologisch waren zu diesem späten Zeitpunkt nahezu alle Knochen verheilt. In beiden Gruppen konnte eine Score von $1,9 \pm 0,1$ ermittelt werden

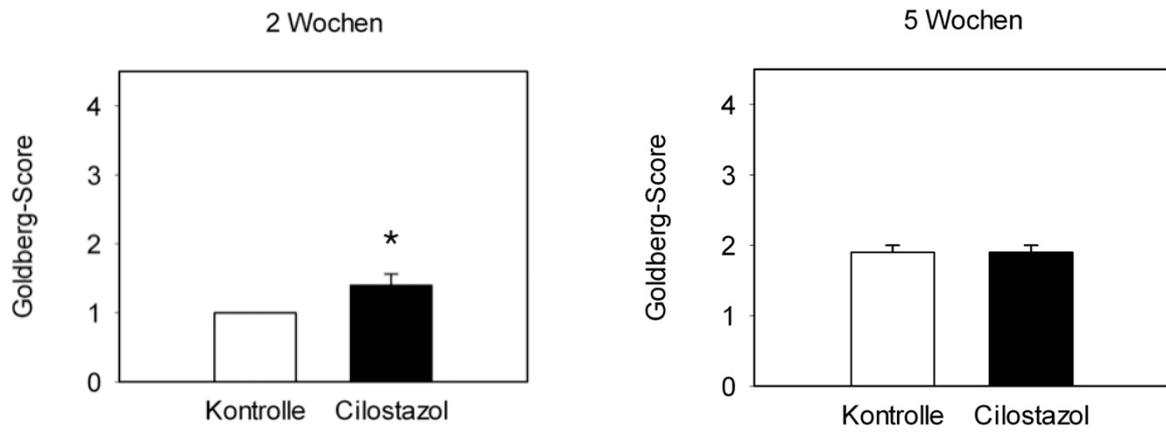


Abbildung 4.4: Goldberg-Score der 2-Wochen und 5-Wochen Tiere der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

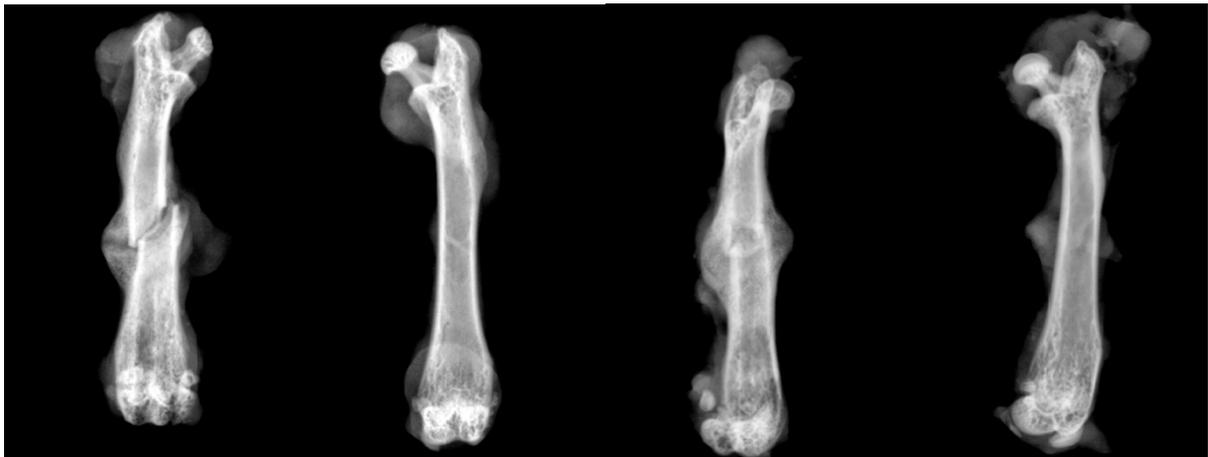


Abbildung 4.5: Röntgenbilder des frakturierten und des kontralateralen, gesunden Knochens nach Explantation der Femora. 2 Wochen postoperativ der Kontrollgruppe (links) und der Cilostazolgruppe (rechts)



Abbildung 4.6: Röntgenbilder des frakturierten und des kontralateralen, gesunden Knochens nach Explantation der Femora. 5 Wochen postoperativ der Kontrollgruppe (links) und der Cilostazolgruppe (rechts)

4.3 Histologie

Zur Beurteilung des Kallusgewebes wurden Sagittalschnitte des Femurs angefertigt und folgende Parameter bestimmt: Femurdurchmesser (BDm; bone diameter), Kallusfläche (CAr; callus area) sowie die Relation Kallusfläche zu Femurdurchmesser (CAr/BDm). Zusätzlich wurden die Gewebeanteile im Kallus ermittelt: Knochengewebe (TOTAr; total osseous tissue area), Knorpelgewebe (CgAr; cartilaginous area) sowie Bindegewebe (FTAr; fibrous tissue callus area). Die Gewebeanteile wurden in Relation zur Kallusfläche angegeben. (TOTAr/CAr; CgAr/CAr; FTAr/CAr).

Es zeigten sich nach 2 Wochen signifikante Unterschiede in der Kalluszusammensetzung der Cilostazol-behandelten Tiere gegenüber der Kontrollgruppe. Der MW des Knochenanteils der Cilostazolgruppe lag bei $75,5 \pm 3,8 \%$. Im Vergleich dazu war der Anteil in der Kontrollgruppe signifikant niedriger ($57,0 \pm 4,9 \%$). Der Anteil des Knorpelgewebes war in der Cilostazolgruppe signifikant niedriger ($20,7 \pm 3,2 \%$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($39,7 \pm 5,0 \%$). Dies spricht insgesamt für einen beschleunigten Remodelingsprozess.

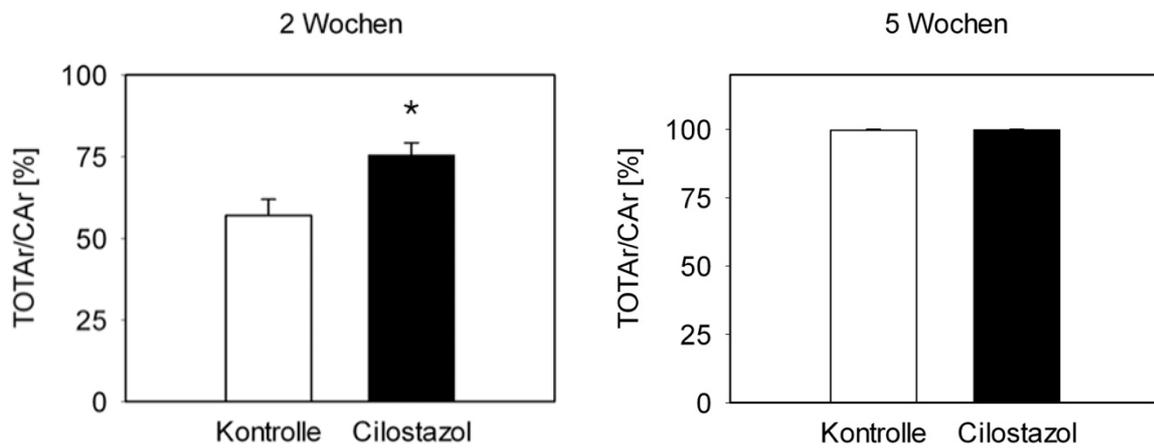


Abbildung 4.7: Knochenanteil in Relation zur Gesamt-Kallusfläche der 2-Wochen und 5-Wochen Tiere der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

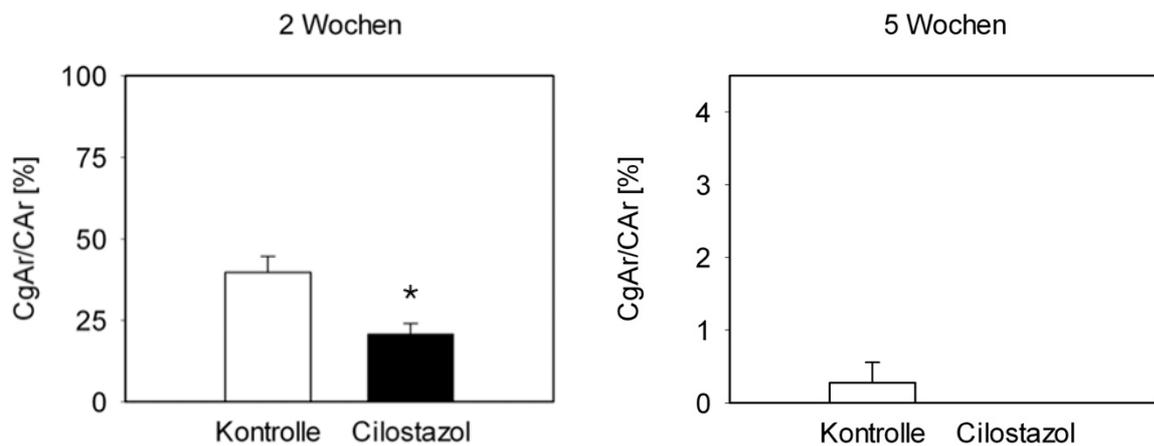


Abbildung 4.8: Knorpelanteil in Relation zur Gesamt-Kallusfläche der 2-Wochen und 5-Wochen Tiere der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

5 Wochen postoperativ war der Knochenanteil in beiden Gruppen nahezu 100% (Cilostazolgruppe $99,7 \pm 0,2$ % vs. Kontrollgruppe $99,7 \pm 0,3$ %). In der Kontrollgruppe konnte im Mittel ein Knorpelanteil von $0,3 \pm 0,3$ % nachgewiesen werden. In der Cilostazolgruppe war kein Knorpelgewebe mehr nachweisbar.

Der Bindegewebsanteil 2 Wochen postoperativ in der Cilostazolgruppe lag bei $3,8 \pm 1,0$ %. In der Kontrollgruppe konnte ein Bindegewebsanteil von $3,3 \pm 0,5$ % ermittelt werden. 5 Wochen postoperativ waren nur noch geringe Anteile an Bindegewebe nachweisbar. Bei den Tieren aus der Kontrollgruppe konnte kein Bindegewebe mehr nachgewiesen werden. Bei den Tieren aus der Cilostazolgruppe war noch ein geringer Anteil von $0,3 \pm 0,3$ % nachweisbar. Ein signifikanter Unterschied lag weder bei den 2 noch bei den 5-Wochen-Tieren vor ($p > 0,05$).

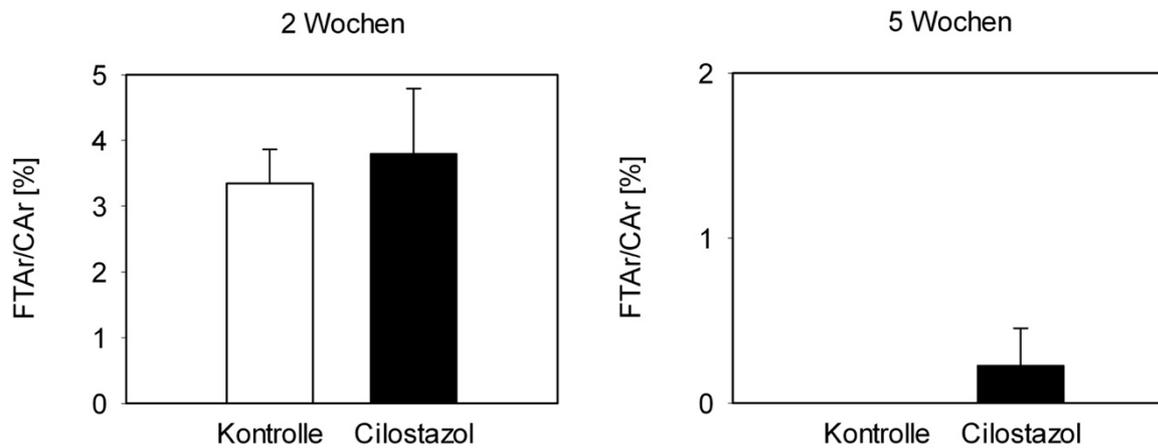


Abbildung 4.9: Bindegewebsanteil in Relation zur Gesamt-Kallusfläche der 2-Wochen und 5-Wochen Tiere der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM

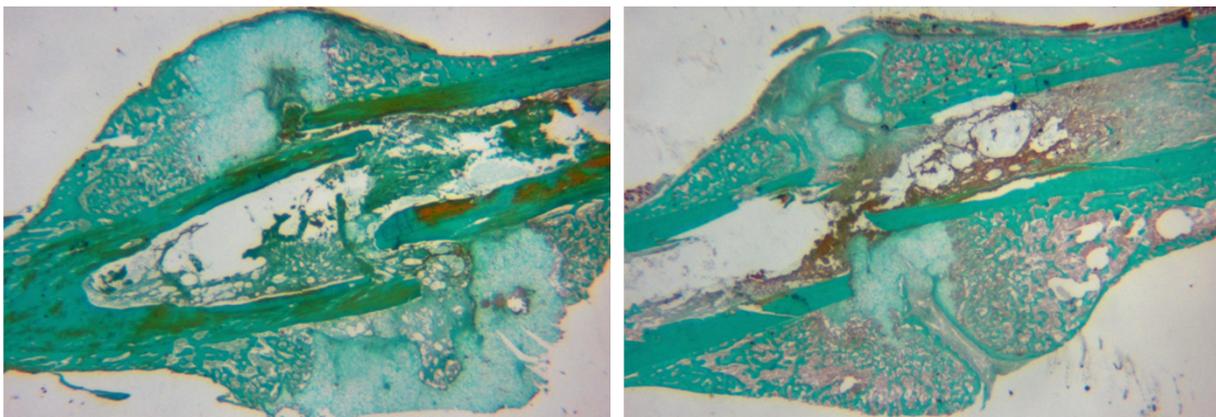


Abbildung 4.10: Histologisches Schnittpräparate der Kontrollgruppe 2 Wochen postoperativ (links) und der Cilostazolgruppe 2 Wochen postoperativ (rechts). Dargestellt ist der erhöhte Knorpelanteil (CgAr) der Kontrollgruppe im Vergleich zur Cilostazolgruppe

4.3.1 TRAP-Färbung

Die Analyse mittels TRAP-Färbung zeigte, dass 2 Wochen postoperativ der Osteoklastenanteil in der Cilostazolgruppe signifikant erhöht war. 5 Wochen postoperativ war der Anteil an Osteoklasten in der Cilostazolgruppe zwar noch höher, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant.

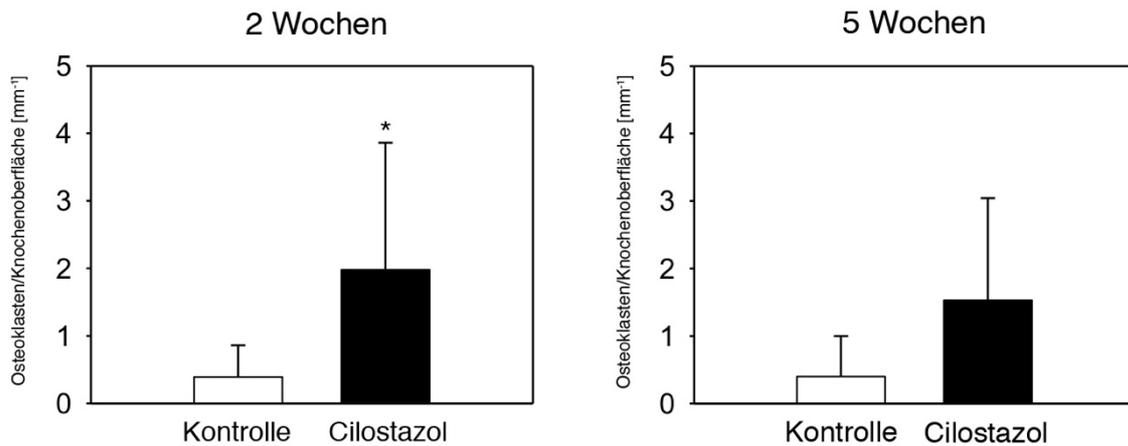


Abbildung 4.11: Anzahl der Osteoklasten zur Knochenoberfläche [mm⁻¹] der 2-Wochen und 5-Wochen Tiere der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

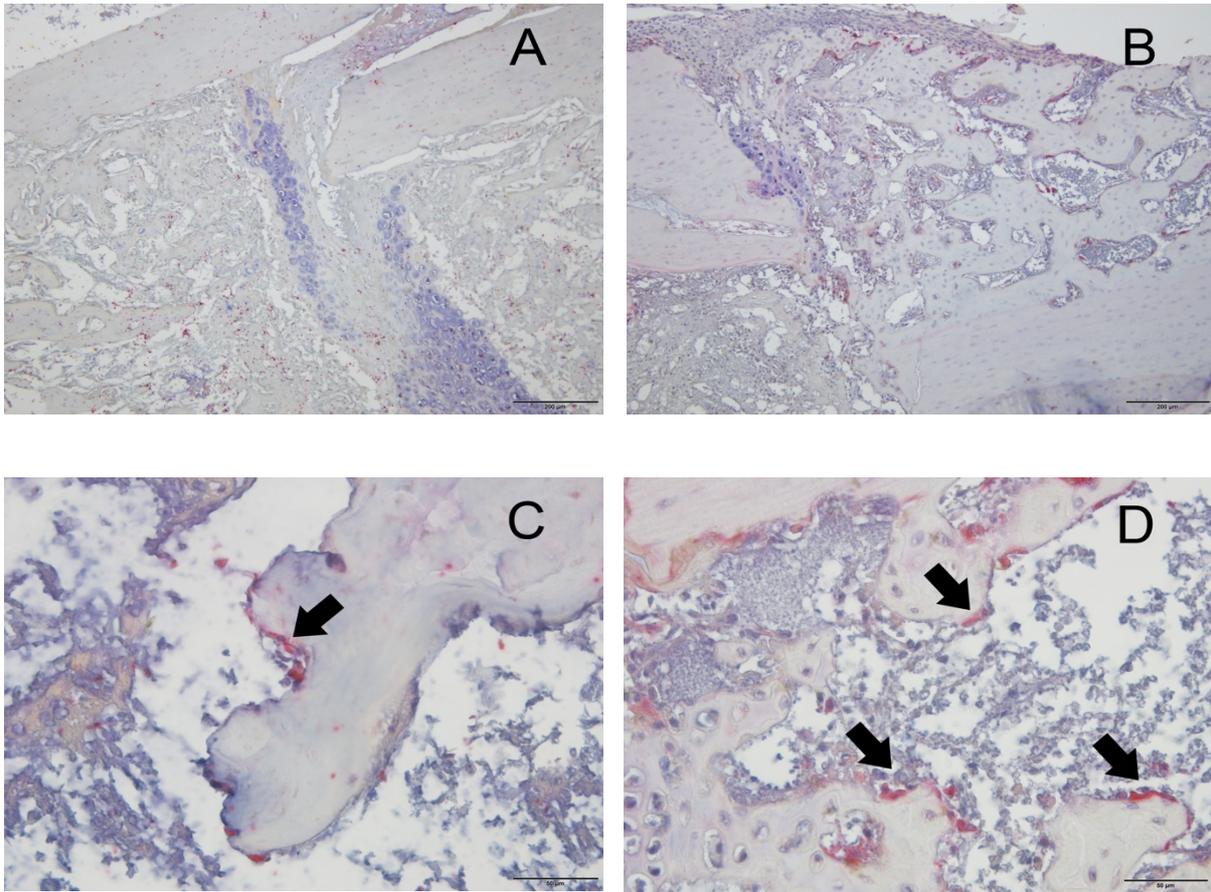


Abbildung 4.12: Histochemische Färbung der TRAP-positiven Osteoklasten (Pfeile) 2 Wochen postoperativ der Kontroll- (A und C) sowie der Cilostazolgruppe (B und D)

4.4 Western Blot

Die Western Blot Analyse erfolgte 2 Wochen postoperativ. Im Kallusgewebe wurde die Expression von BMP-2, BMP-4, RANKL, OPG, Cyr61, VEGF, eNOS und PCNA untersucht. β -Aktin wurde als Referenzprobe verwendet.

Die Expression von RANKL war bei den mit Cilostazol behandelten Tieren signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle ($12,8 \pm 1,6$ OD x mm^2 vs. $7,7 \pm 1,2$ OD x mm^2). Die Expression von OPG war in der Cilostazolgruppe geringfügig höher als in der Kontrollgruppe ($14,9 \pm 0,9$ OD x mm^2 vs. $12,5 \pm 1,0$ OD x mm^2). Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

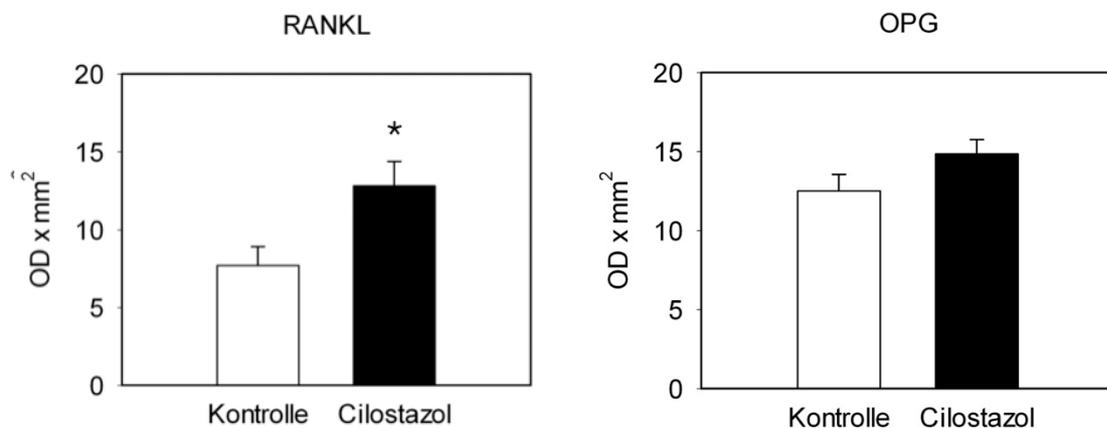


Abbildung 4.13: Western Blot Analyse von RANKL und OPG in der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

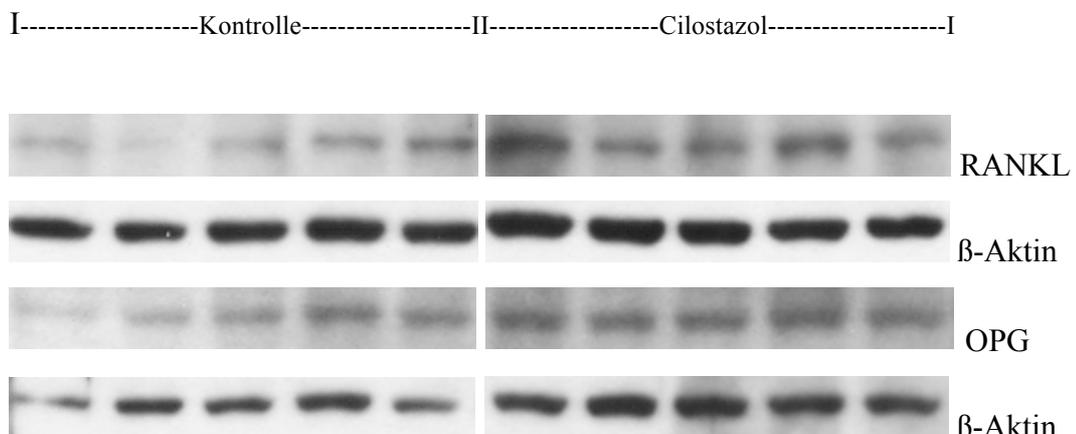


Abbildung 4.14: Western Blot Analyse der RANKL und OPG Expression

Die Expressionen von BMP-2 waren in beiden Gruppen vergleichbar ($12,4 \pm 2,0$ OD x mm^2 vs. $12,1 \pm 1,8$ OD x mm^2). Die Expression von BMP-4 war jedoch in der Cilostazolgruppe signifikant erhöht ($12,8 \pm 1,8$ OD x mm^2 vs. $6,5 \pm 0,8$ OD x mm^2).

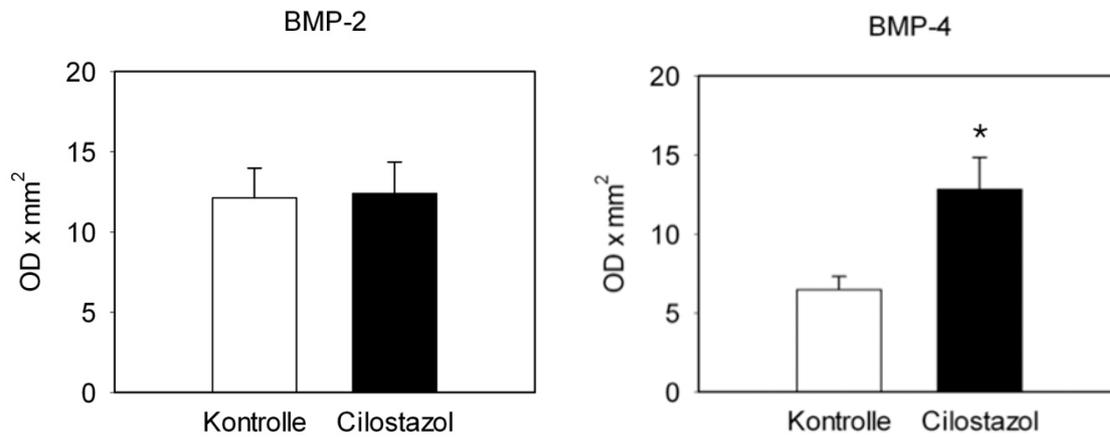


Abbildung 4.15: Western Blot Analyse von BMP-2 und BMP-4 in der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

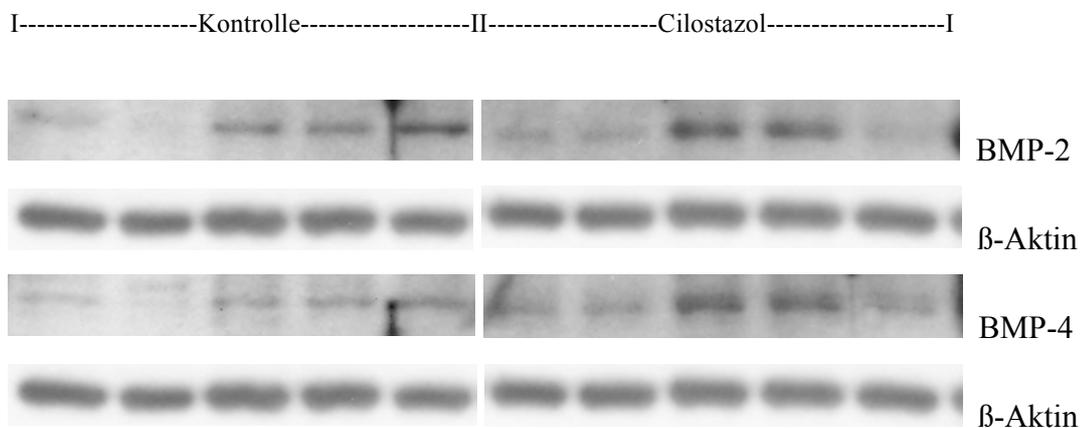


Abbildung 4.16: Western Blot Analyse der BMP-2 und BMP-4 Expression

Die Analyse der beiden angiogenen Marker Cyr61 und VEGF zeigte, dass die Tiere der Cilostazolgruppe eine signifikant höhere Expression von Cyr61 aufwiesen ($17,1 \pm 0,7$ OD x mm^2 vs. $8,8 \pm 0,5$ OD x mm^2). Die VEGF-Expression unterschied sich nicht signifikant ($11,8 \pm 1,2$ OD x mm^2 vs. $12,5 \pm 1,3$ OD x mm^2).

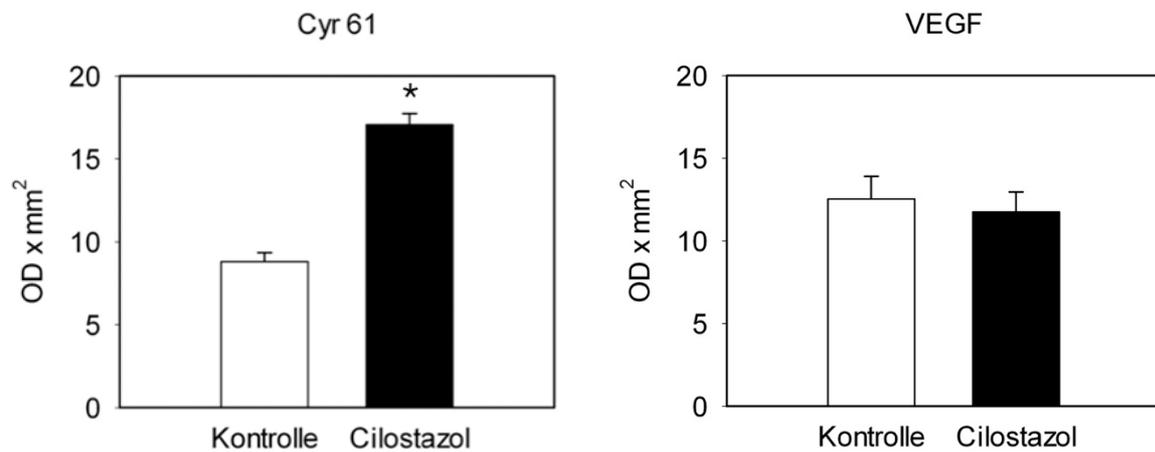


Abbildung 4.17: Western Blot Analyse von Cyr61 und VEGF in der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

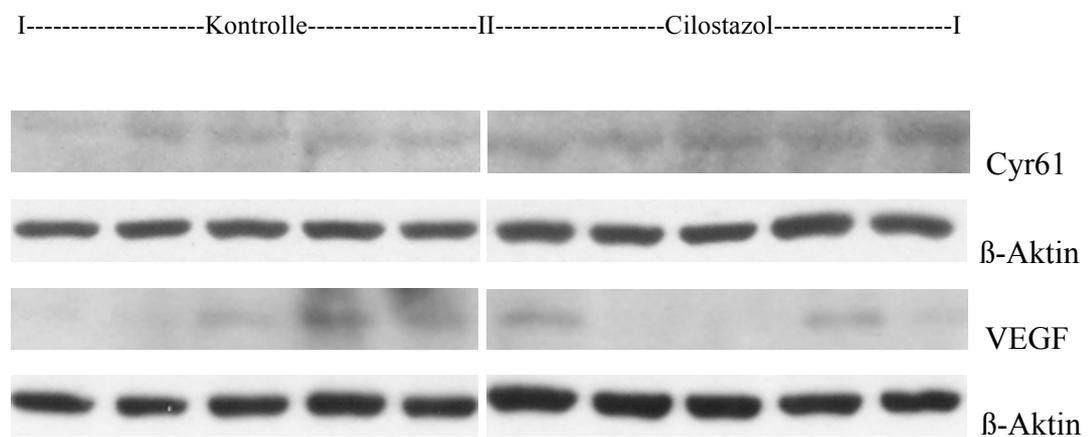


Abbildung 4.18: Western Blot Analyse der Cyr61 und VEGF Expression

Die Expression des Proliferationsmarkers PCNA war in der Cilostazolgruppe höher im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die Expression von eNOS unterschied sich in beiden Gruppen ebenfalls nicht.

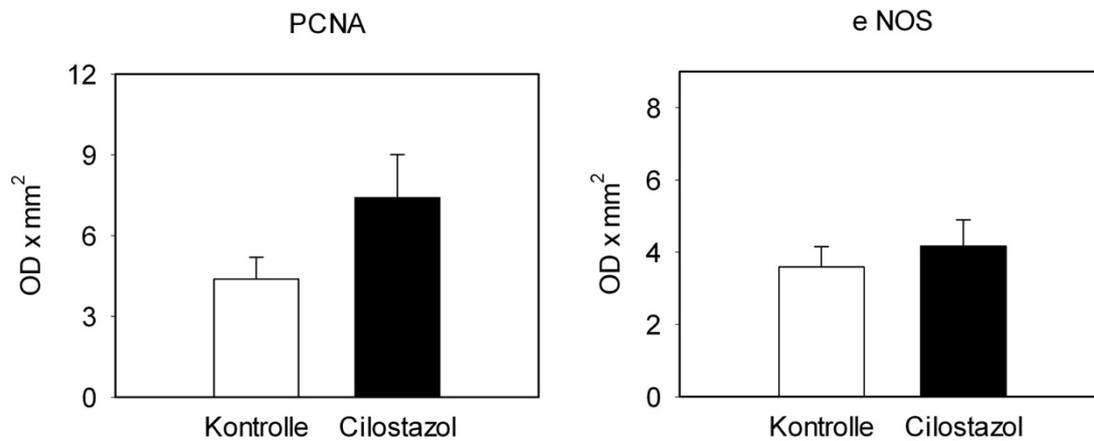


Abbildung 4.19: Western Blot Analyse von PCNA und eNOS in der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM

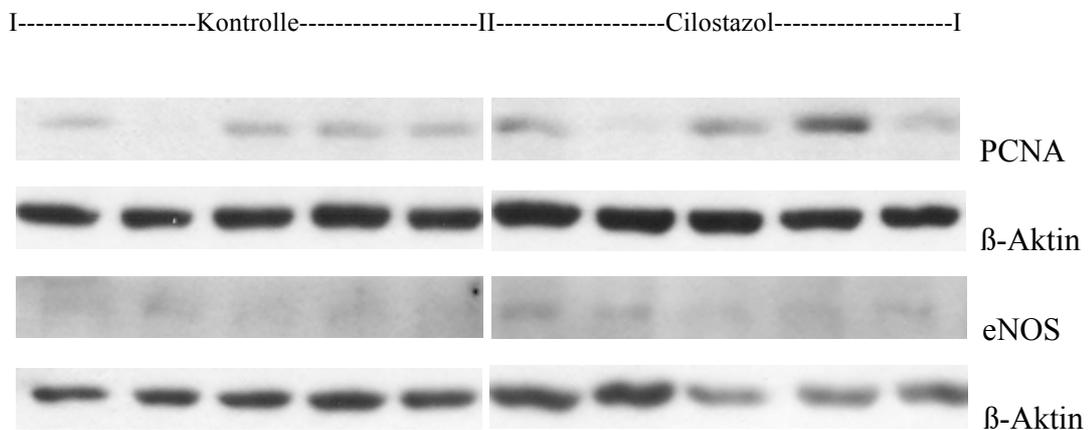


Abbildung 4.20: Western Blot Analyse der PCNA und eNOS Expression

Kapitel 5 - Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

In dieser Studie sollte geklärt werden, ob die Behandlung von Mäusen mit Cilostazol die Frakturheilung beeinflusst. Hierfür wurde die Untersuchung in einem Tiermodell durchgeführt, da sich in-vitro-Untersuchungen aufgrund der komplexen Abläufe im knöchernen Heilungsprozess sowie schlechter Reproduzierbarkeit als nur wenig aussagekräftig zeigten^{[35],[54]}.

Sowohl Groß- als auch Kleintiermodelle verfügen über Vor- und Nachteile. Ein großer Vorteil des Großtiermodells ist die Anatomie und Knochenstruktur, die vergleichbar mit der des Menschen sind. Aufgrund der Größenverhältnisse können zudem humane Implantate zur Untersuchung der Knochenbruchheilung verwendet werden^[87]. Nachteilig sind die hohen Kosten für die Anschaffung, Tierpflege und der Unterhalt. Dadurch können oftmals nur kleine Gruppengrößen untersucht werden.

Der entscheidende Vorteil von Kleintiermodellen wie der Maus ist, dass das Genom vollständig entschlüsselt und bekannt ist. Dadurch können vor allem molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt werden. Zusätzlich stehen eine Vielzahl von speziellen Antikörpern sowie transgene Stämme zur Verfügung^[61]. Des Weiteren sind durch die geringen Haltings- sowie Zuchtkosten größere Gruppengrößen realisierbar, was die Aussagekraft von Untersuchungen am Kleintiermodell erhöht^[54]. Eine generelle Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen muss letztendlich jederzeit kritisch diskutiert werden. Hier muss vor allem das Remodeling über sogenannte Resorptionshöhlen genannt werden, dessen Bedeutung für die Frakturheilung, im Vergleich zu Havers-Kanälen im Großtiermodell, noch nicht vollständig geklärt ist.

Zur Untersuchung der Knochenbruchheilung im Mausmodell kann sowohl das Femur als auch die Tibia verwendet werden. Nachteil der Tibia ist jedoch die unregelmäßige Form im Vergleich zum Femur, das eher einen homogenen Querschnitt aufweist^[80]. Aufgrund dessen ist das Femur vor allem für biomechanische Untersuchungen besser geeignet. Zusätzlich muss bei Verwendung der Tibia berücksichtigt werden, dass die Stabilität der Fibula die Frakturheilung entscheidend mitbeeinflusst^[112].

Um standardisierte Untersuchungsbedingungen der Frakturheilung zu gewährleisten, stehen mittlerweile eine Vielzahl von etablierten Frakturmodellen zur Verfügung. Man unterscheidet grundsätzlich zwischen offenen und geschlossenen Frakturmodellen. Vorteil des offenen Frakturmodells ist die kontrollierte Osteotomie unter Sicht nach Präparation des Knochens über einen lateralen Zugang. Durch eine definierte Größe des Osteotomiespaltes können so auch die Mechanismen der verzögerten Heilung bzw. Pseudarthrose untersucht werden. Von Nachteil ist jedoch die höhere Invasivität, bedingt durch den Weichteilschaden, der durch die Präparation des Knochens entsteht. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass ein zusätzlicher Weichteilschaden die Frakturheilung beeinträchtigen kann^{[22],[46],[127]}. Aktuelle Studien konnten sogar zeigen, dass die offene Osteotomie im Vergleich zur geschlossenen Frakturierung im Mausmodell zu einer Verzögerung der Frakturheilung führt^[66].

Beim geschlossenen Frakturmodell wird der Knochen über eine stumpfe Guillotine geschlossen frakturiert. Durch diese Methode kann auf eine Präparation des Knochens verzichtet werden, was den Weichteilschaden minimiert^[29]. Nachteil ist jedoch die schlechtere Reproduzierbarkeit der Frakturkonfiguration. In dieser Studie konnte jedoch nach Vorversuchen ein standardisierter transverser Frakturverlauf erzeugt werden.

Als offene Frakturmodelle stehen mittlerweile Plattenosteosynthesen^{[53],[104]}, Marknagelosteosynthesen^[54] und die Stabilisierung mittels Fixateur externe^[105] zur Verfügung. Diese Modelle gewährleisten eine hohe Stabilität und induzieren dadurch eine intramembranöse Frakturheilung^[53] im Vergleich zur enchondralen Frakturheilung bei weniger stabilen Modellen.

Als geschlossenes Frakturmodell wurde früher häufig ein intramedullärer Pin verwendet^[10]. Dieses Stabilisierungsverfahren ist aber aufgrund der fehlenden Rotationsstabilität zur standardisierten Untersuchung der Frakturheilung nicht geeignet^[55]. In dieser Studie wurde daher eine intramedulläre Schraubenosteosynthese mittels MouseScrew verwendet. Durch ein proximales Gewinde und einen distalen Konus kann die Fraktur komprimiert werden und ist damit rotationsstabiler versorgt^[58].

Die Frakturheilung bei Mäusen verläuft deutlich schneller als beim Menschen. Der Heilungsprozess ist nach 4-5 Wochen abgeschlossen^[52]. Zur Analyse der frühen Phase der Frakturheilung eignet sich der 2 Wochen Zeitpunkt, da in dieser Phase das meiste Kallusgewebe zur weiteren Analyse gewonnen werden kann. Ein früherer Zeitpunkt macht zudem eine biometrische Testung unmöglich.

Der 5 Wochen Zeitpunkt wurde als Endpunkt definiert, um zu klären, ob die Fraktur verheilt ist oder ob eine verzögerte Heilung oder gar eine Pseudarthrose vorliegt^[80].

Die anschließende Auswertung erfolgte nach Ausbau der Femora röntgenologisch mittels Goldberg-Score, bei dem über ein Punktesystem von 0-2 die knöcherne Konsolidierung des Frakturspalts beurteilt wird. Dieser Score wurde schon in zahlreichen Studien verwendet. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass der Knochen nur zweidimensional abgebildet ist und die Aussagekraft im Vergleich zu einer computertomographischen Untersuchung eingeschränkt ist.

Die biomechanische Untersuchung der Knochen kann durch eine 3-Punkt-Biegung, 4-Punkt-Biegung oder Rotationstestung erfolgen. Bei der 3-Punkt-Biegung wird im Gegensatz zur 4-Punkt-Biegung die Kraft auf einem Punkt erzeugt, wohingegen die 4-Punkt-Biegung die aufgetragene Kraft gleichmäßig verteilt^[54]. Aufgrund der geringen Größe der Maus-Femora wurde für diese Studie die 3-Punkt-Biegung gewählt. Dabei wurde eine zerstörungsfreie Messung durchgeführt, um die Knochen für weitere Untersuchungen zu verwenden^[16].

Die Knochen wurden anschließend histologisch untersucht. Dabei wurden neben der Kallusgröße und dem Durchmesser auch die Knochen-, Knorpel- sowie Bindegewebeanteile im Frakturkallus bestimmt.

Nachteil dieser Methode ist sicherlich, dass der Knochen nur 2-dimensional und nicht 3-dimensional untersucht werden kann. Letztendlich ist die von Gerstenfeld et al. publizierte Untersuchungsmethodik^[43] gut etabliert und wird wohl am häufigsten zur histologischen Auswertung verwendet.

Bei der Verabreichung des Klasse-III-Phosphodiesterase-Hemmers Cilostazol wird eine tägliche Dosis von 2x 100 mg für den Menschen empfohlen. Für die hier beschriebene Untersuchung wurde eine Dosis von 30 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Die gewählte Dosierung wurde anhand zahlreicher Literaturangaben gewählt und mit anderen tierexperimentellen Studien verglichen^[9].

5.2 Diskussion der Ergebnisse

In dieser Studie konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Behandlung mit Cilostazol die Frakturheilung signifikant verbessert. Radiologisch zeigte sich eine frühere knöcherne Überbauung des Frakturspaltes nach Gabe von Cilostazol. Zudem war der Anteil an Knochengewebe im Frakturkallus erhöht und der Anteil an Knorpelgewebe signifikant erniedrigt. Durch das beschleunigte Kallusremodeling war die Biegesteifigkeit nach Cilostazol Behandlung 5 Wochen postoperativ signifikant höher. Die verbesserte Knochenheilung war assoziiert mit einem signifikanten Anstieg der angiogenen und osteogenen Wachstumsfaktoren Cyr61 und BMP-4 sowie einer Stimulation der Osteoklastogenese bei erhöhter Expression von RANKL.

Molekulargenetische Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass Cyr61 während der Osteoblastogenese exprimiert wird. Si et al., 2006 konnten nachweisen, dass die Expression von Cyr61 durch Stimulation der Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 3A (Wnt-3A) regulierten Osteoblastendifferenzierung von mesenchymalen Stammzellen signifikant gesteigert wird^[114]. Des Weiteren konnte eine Arbeitsgruppe zeigen, dass Cyr61 durch 1-alpha, 25-dihydroxyvitamin D(3) reguliert wird^[72]. Aufgrund der nachgewiesenen Signalwege kann postuliert werden, dass Cyr61 eine entscheidende Rolle im Knochenmetabolismus und während der Frakturheilung spielt.

So konnte Frey et al. in einem offenen Frakturmodell im Kaninchen zeigen, dass Cyr61 die Kallusregeneration positiv beeinflusst. Die Cyr61-beschichtete Kollagenmatrix im Osteotomiespalt führte zu einer gesteigerten Knochenbildung und verbesserten Rotationsstabilität während der Knochendistraktion^[34]. In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe wurde der Einfluss von Sildenafil, einem Phosphodiesterase-5 Inhibitor, auf die Frakturheilung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Sildenafil den Frakturheilungsprozess beschleunigt. Dies war ebenfalls mit einer erhöhten Expression von Cyr61 im Frakturkallus assoziiert^[56].

Cilostazol beeinflusst nicht nur die Osteoblastogenese, sondern auch die Chondrogenese. Lienau et al. untersuchte den Einfluss der mechanischen Stabilität auf die Expression von Cyr61. In einem Schafsmodell wurde die Osteotomie dabei entweder mit einem sehr rigiden oder mit einem semirigiden Fixateur externe stabilisiert.

Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von Cyr61 bei geringer Stabilität der Osteosynthese vermindert war.

Zudem war bei geringer Stabilität die Knorpelresorption vermindert und die Heilung damit verlangsamt. Die Autoren schlussfolgerten, dass eine verminderte Expression von Cyr61 die Chondrozytendifferenzierung negativ beeinflusst^[75]. In der vorliegenden Arbeit fanden wir einen signifikant geringeren Knorpelanteil im Frakturkallus nach Gabe von Cilostazol. Dies ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass die erhöhte Expression von Cyr61 die Knorpeldifferenzierung positiv beeinflusst und die Knorpelresorption beschleunigt.

Ein weiterer Wirkmechanismus von Cilostazol ist die Erhöhung des intrazellulären cAMPs durch Hemmung der Phosphodiesterase^{[48],[120],[124]}. Verschiedene in vitro-Studien konnten zeigen, dass eine Elevation des intrazellulären cyclischen AMPs in Osteoblasten eine knochenbildende Aktivitätssteigerung zur Folge hat^[65]. Civitelli et al. und Ahlstrom et al. konnten in-vitro nachweisen, dass der positive Effekt von Parathormon auf die Osteoblastenproliferation und Differenzierung durch eine Erhöhung des intrazellulären cAMP bedingt ist^{[1],[20]}. Aufgrund der Ergebnisse ist davon auszugehen, dass eine erhöhte cAMP-Konzentration durch die Gabe von Cilostazol die Frakturheilung positiv beeinflussen kann^[31].

In einer 2002 durchgeführten Studie von Wakabayashi S et al. wurden die Einflüsse von selektiven Phosphodiesterasehemmern auf die osteoblastische Differenzierung untersucht. Dazu wurden osteoblastische Zelllinien analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von PDE-II, PDE-III sowie PDE-IV zu einer Erhöhung der BMP-4 induzierten alkalischen Phosphatase (ALP) führt^[124]. Vergleichbare Ergebnisse konnte in einer Studie von Tsutsumimoto et al. nachgewiesen werden. Die Autoren konnten zeigen, dass eine nicht-selektive Hemmung der Phosphodiesterase mittels Pentoxifyllin die osteogene Wirkung von BMP-4 verbessert^[121]. In der vorliegenden Arbeit führte die Hemmung der PDE-III durch die Behandlung mit Cilostazol zu einem signifikanten Anstieg der BMP-4-Expression während der Frakturheilung. Dies könnte ebenfalls durch eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration bedingt sein.

Um zu klären, welchen Einfluss die Behandlung von Cilostazol auf die Angiogenese und Vaskularisation während der Frakturheilung hat, wurde die Expression der angiogenen Faktoren VEGF und eNOS im Frakturkallus analysiert. In einer früheren Studie von Biscetti et al. wurde in einem Ischämiemodell der Maus der Einfluss von Cilostazol auf die Angiogenese und Perfusion untersucht. Die Mäuse erhielten, wie in der vorliegenden Studie, 30 mg/kg Körpergewicht Cilostazol.

Die verbesserte Perfusion sowie gestiegene VEGF- sowie G-CSF-Konzentrationen nach Gabe von Cilostazol zeigte den positiven Einfluss der Cilostazol Behandlung auf die Angiogenese.

Eine aktive Inhibierung des VEGF's führte zu einer signifikanten Abnahme der Cilostazol-induzierten Angiogenese^[9].

Im Gegensatz dazu konnte eine Studie von Mendes et al. niedrigere VEGF Konzentrationen in einem peritonealen Adhäsionsmodell der Maus nach Gabe von Cilostazol im Vergleich zur Kontrolle nachweisen. Die verabreichte Dosis von Cilostazol lag bei 40 mg/kg sowie 400 mg/kg Körpergewicht. Gemessen wurde eine Abnahme der VEGF um ca. 40%. Des Weiteren konnten gezeigt werden, dass nach Gabe von Cilostazol die peritonealen Adhäsionen bei einem reduzierten Anteil an fibrovaskulärem Gewebe deutlich geringer waren^[85]. Die Behandlung mit Cilostazol hatte in der hier vorliegenden Studie keinen Einfluss auf die VEGF-Expression. Der Unterschied der Ergebnisse könnte gegebenenfalls in der unterschiedlichen Dosis der verabreichten Menge an Cilostazol liegen.

Hori et al. untersucht die Revaskularisation in einem Ischämiemodell der Maus. In dieser Studie wurde eine geringere Dosierung von Cilostazol mit 20 mg/kg Körpergewicht gewählt. Nach einer 14-tägigen Gabe wurde die Neovaskularisation bestimmt. Hierbei zeigte sich eine signifikant erhöhte Vaskularisation sowie eine beschleunigte Neovaskularisation. Des Weiteren konnte eine erhöhte eNOS-Konzentration im untersuchten Gewebe nachgewiesen werden. Eine eNOS-Inhibierung mittels N-nitro-L-Arginin Methylester zeigte, dass die positive Wirkung von Cilostazol aufgehoben war, weshalb von einem eNOS-abhängigen Signalweg bei der Neovaskularisation im ischämischen Gewebe ausgegangen werden kann^[60].

Vergleichbare Ergebnisse konnten Hashimoto et al. in einer in-vitro-Untersuchung nachweisen. Es konnte gezeigt werden, dass nach Gabe von Cilostazol die eNOS-Konzentration in kultivierten Endothelzellen erhöht war^[48]. Im Gegensatz dazu konnten Kim et al. bei Mäusen mit fokaler, zerebraler Ischämie unter Therapie mit Cilostazol keine erhöhte Expression von eNOS in dem untersuchten Gewebe nachweisen^[64].

Die Western-Blot Untersuchungen dieser Arbeit konnten ebenfalls keinen Effekt auf die eNOS Expression im Kallusgewebe nach Gabe von Cilostazol nachweisen. Letztendlich kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass die Behandlung mit Cilostazol zu einem früheren oder späteren Zeitpunkt die Expression der angiogenen Marker VEGF und eNOS beeinflusst, da in der vorliegenden Arbeit die Expression nur an einem Zeitpunkt untersucht wurde.

Zur Beurteilung des Remodelings sowie der Osteoklastenaktivität wurde die Expression von RANKL und OPG bestimmt. RANKL ist ein potenter Aktivator der Osteoklastogenese durch Bindung an RANK in der Zellmembran der Osteoklasten. Im Gegensatz dazu hemmt OPG die Osteoklastogenese.

Gerstenfeld et al. konnten zeigen, dass während der Knorpelresorption die RANKL Expression erhöht ist und eine Inhibierung von RANKL den Frakturheilungsprozess verzögert^[42].

In der vorliegenden Studie war die Expression von OPG nur geringfügig erhöht, wohingegen die Expression von RANKL durch die Behandlung mit Cilostazol signifikant gesteigert war. Zudem konnte ein signifikant höherer Anteil an TRAP-positiven Zellen im Kallus nachgewiesen werden. Die Aktivierung der Osteoklasten durch die gesteigerte RANKL-Expression hat zu einem beschleunigten Remodeling des Frakturkallus geführt.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass der PDE-III-Inhibitor Cilostazol den Prozess der Frakturheilung verbessert. Die gesteigerte Knochenbildung und der beschleunigte Remodelingprozess sind mit einer gesteigerten Expression von Cyr61, BMP-4 und RANKL assoziiert.

Kapitel 6 - Literaturverzeichnis

- [1] Ahlstrom M., Lamberg-Allardt C. (1999). Regulation of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) accumulation in UMR-106 osteoblast-like cells: role of cAMP-phosphodiesterase and cAMP efflux. *Biochem Pharmacol.* 58(8):1335–1340.
- [2] Al-Aql Z., Alagl A., Graves D., Gerstenfeld L., Einhorn T. (2008). Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res.* 87(2):107-118.
- [3] Amsallem E., Kasparian C., Haddour G., Boissel J.P., Nony P. (2005). Phosphodiesterase III inhibitors for heart failure. *Cochrane Database Syst Rev.* (1):CD002230.
- [4] Aumüller G., Aust G. (2013). *Anatomie.* Verlag Thieme. 3. Auflage:75-81.
- [5] Baker R., Tseng L., Iannolo M., Oest M., Henderson J. (2015). Self-deploying shape memory polymer scaffolds for grafting and stabilizing complex bone defects: A mouse femoral segmental defect study. *Biomaterials.* 76:388-398.
- [6] Baldik Y., Diwan A., Appleyard R., Fang Z., Wang Y., Murrell G. (2005). Deletion of iNOS gene impairs mouse fracture healing. *Bone.* 37(1):32-36.
- [7] Beaupré G., Orr T., Carter D. (1990). An approach for time-dependent bone modeling and remodeling – theoretical development. *J Orthop Res.* 8(5):651-661.
- [8] Bedenis R., Stewart M., Cleanthis M., Robless P., Mikhailidis D., Stansby G. (2014). *Cochrane Database Syst. Rev.* 10:CD003748.
- [9] Biscetti F., Pecorini G., Straface G., Arena V., Stigliano E., Rutella S., Locatelli F., Angelini F., Ghirlanda G., Flex A. (2013). Cilostazol promotes angiogenesis after peripheral ischemia through a VEGF-dependent mechanism. *Int J Cardiol.* 167(3):910–916.
- [10] Bonnarens F., Einhorn T. (1984). Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res.* 2(1):97-101.

- [11] Boyce B., Xing L. (2007). Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther.* 9(1):1.
- [12] Bramer S.L., Forbes W.P. (1999). Relative bioavailability and effects of a high fat meal on single dose cilostazol pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 37(2):13–23.
- [13] Brand R., Rubin C. (1987). The Scientific Basis of Orthopaedics. Brand RA, Albright, JA:325-345.
- [14] Braun W., Ruter A. (1996). Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects. *Unfallchirurg.* 99(1):59-67.
- [15] Burr D. (2002). Mini-Review: Targeted and Nontargeted Remodeling. *Bone.* 30(1):2-4.
- [16] Burstein A., Frankel V. (1971). A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech.* 4(2):155-158.
- [17] Carter D., Beaupré G. (2007). Skeletal function and form. Cambridge University Press. 1. Auflage: 25-28.
- [18] Cheal E., Mansmann K., DiGirola A. 3rd, Hayes W., Perren S. (1991). Role of interfragmentary strain in fracture healing: ovine model of a healing osteotomy. *J. Orthop. Res.* 9(2):131-142.
- [19] Cheung K.M., Kaluarachi K., Andrew G., Lu W., Chan D., Cheah K. (2003). An externally fixed femoral fracture model for mice. *J Orthop Res.* 21(4):685-690.
- [20] Civitelli R., Bacskai B., Mahaut-Smith M., Adams S., Avioli L., Tsien R. (1994). Single-cell analysis of cyclic AMP response to parathyroid hormone in osteoblastic cells. *J Bone Miner Res.* 9(9):1407–1417.
- [21] Claes L., Augat P., Suger G., Wilke H. (1997). Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. *J Orthop Res.* 15(4):577-584.
- [22] Claes L., Maurer-Klein N., Henke T., Gerngross H., Melnyk M., Augat P. (2006). Moderate soft tissue trauma delays new bone formation only in the early phase of fracture healing. *J Orthop Res.* 24(6):1178-1185.
- [23] Claes L., Wolf S., Augat P. (2000). Mechanische Einflüsse auf die Callusheilung. *Chirurg.* 71(9):989-994.

- [24] Clark H. Jr., Hayes P. (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.* 45:731-741.
- [25] Colnot C., Thompson Z., Miclau T., Werb Z., Helms J. (2003). Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development* 130(17):4123-4133.
- [26] Cornell C., Lane J. (1992). Newest factors in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 277:297-311.
- [27] Cruess R., Dumont J. (1975). Fracture healing. *Can J Surg.* 18(5):403-413.
- [28] Dawson D., Cutler B., Meissner M., Strandness D. (1998). Cilostazol has beneficial effects in treatment of intermittent claudicatio: results from a multicenter, randomized, prospective, double-blind-trial. *Circulation.* 98(7):678-686.
- [29] Drissi H., Paglia D. (2015). Surgical Procedures and Experimental Outcomes of Closed Fractures in Rodent Models. *Methods Mol Biol.* 1226:193-211.
- [30] Einhorn T. (1998). The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 355:7-21.
- [31] Farndale R. W., Sandy J.R., Atkinson S.J., Pennington S., Meghji S., Meikle C. (1988). Parathyroid hormone and prostaglandin E2 stimulate both inositol phosphates and cyclic AMP accumulation in mouse osteoblast cultures. *Biochem J.* 252(1):263–268.
- [32] Ford J., Robinson D., Scammell B. (2003). The fate of soft callus chondrocytes during long bone fracture repair. *J Orthop Res.* 21(1):54-61.
- [33] Förstermann U. (2006). Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biol Chem.* 387(12):1521-1533.
- [34] Frey S.P., Doht S., Eden L., Dannigkeit S., Schuetze N., Meffert R., Jansen H. (2012). Cysteine-rich matricellular protein improves callus regenerate in a rabbit trauma model. *Int Orthop.* 36(11):2387–2393.
- [35] Friedman R., An Y., Ming J., Draughn R., Bauer T. (1996). Influence of biomaterial surface texture on bone ingrowth in the rabbit femur. *J Orthop Res.* 14(3):455-464.

- [36] Frost H. (1985). The New Bone: Some Anthropological Potentials. *Yearb Phys Anthropol.* 28(6):211-226.
- [37] Frost, H. M. (1989). The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II. *Clin Orthop Relat Res.* 248:294-309.
- [38] Fu C., Tata P., Okada K., Bramer S.L. (1999). Simultaneous quantitative determination of cilostazol and its metabolites in plasma by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 728(2):251–262.
- [39] Fukai A., Kawamura N., Saito T., Oshima Y., Ikeda T., Kugimiya F., Higashikawa A., Yano F., Ogata N., Nakamura K., Chung U.I., Kawaguchi H. (2010). Akt1 in murine chondrocytes controls cartilage calcification during endochondral ossification under physiologic and pathologic conditions. *Arthritis Rheum.* 62(3):826-836.
- [40] Furushima K., Tanaka T., Nakajima T., Maeda S., Nobukuni T., Harata S., Inoue I. (2002). Association of molecular variants in BMP-4 with ossification of the posterior longitudinal ligament. 48th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Poster No.: 0766.
- [41] Gerstenfeld L., Cullinane D., Barnes G., Graves D., Einhorn T. (2003). Fracture Healing as a post-natal development process: molecular, spatial and temporal aspects of its regulation. *J. Cell Biochem.* 88(5):873-884.
- [42] Gerstenfeld L., Sacks D., Pelis M., Mason Z., Graves D., Barrero M., Ominsky M., Kostenuik P., Morgan E., Einhorn T. (2009). Comparison of effects of the bisphosphonate alendronate versus the RANKL inhibitor denosumab on murine fracture healing. *J Bone Miner Res.* 24(2):196–208.
- [43] Gerstenfeld L., Wronski T., Hollinger J., Einhorn T. (2005). Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. *J Bone Miner Res.* 20(10):1715-1722.
- [44] Gothman L. (1960). Arterial changes in experimental fractures of the rabbit's tibia treated with intramedullary nailing. *Acta Chir Scand.* 120:289-232.
- [45] Graefe K., Lutz W., Bönisch H. (2011). *Pharmakologie und Toxikologie.* 1. Auflage. Verlag Thieme:430-438.

- [46] Guda T., Labella C., Chan R., Hale R. (2014). Quality of bone healing: Perspectives and assesment techniques. *Wound Repair Regen.* 22(1):39-49.
- [47] Hartmann M. et al. (2009). *Zytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie.* Verlag Facultas. 4. Auflage:35-39.
- [48] Hashimoto A., Miyakoda G., Hirose Y., Mori T. (2006). Activation of endothelial nitric oxide synthase by cilostazol via a cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt-dependent mechanism. *Atherosclerosis.* 189(2):350–357.
- [49] Heinzeller T., Büsing C. (2001) *Histologie, Histopathologie und Zytologie.* Verlag Thieme. 1. Auflage:84-87.
- [50] Henry T., Annex B., McKendall G., Azrin M., Lopez J., Giordano F., Shah P., Willerson J., Benza R., Berman D., Gibson C., Bajamonde A., Rundle A., Fine J., McCluskey E. (2003). The VIVA Trial: Vascular endothelial growth factor in ischemia for vascular angiogenesis. *Circulation.* 107(10):1359-1365.
- [51] Hiatt W., Money S., Brass E. (2007). Long-term safety of cilostazol in patients with peripheral artery disease: the CASTLE study. *J Vasc Surg.* 47(2):330-336.
- [52] Hiltunen A., Aro H., Vuorio E. (1993). Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice. *Clin Ortop Relat Res.* 297:23-27.
- [53] Histing T., Garcia P., Matthys R., Leidinger M., Holstein J., Kristen A., Pohlemann T., Menger M.D. (2010). An internal locking plate to study intramembranous bone healing in a mouse femur fracture model. *J Orthop Res.* 28(3):397-402.
- [54] Histing T., Garcia P., Holstein J., Klein M., Matthys R., Nuetzi R., Steck R., Laschke M.W., Wehner T., Bindl R., Recknagel S., Stuermer E.K., Vollmar B., Wildemann B., Lienau J., Willie B., Peters A., Ignatius A., Pohlemann T., Claes L., Menger M.D. (2011). Small animal bone healing models: Standards, tips and pitfalls, results of a consensus meeting. *Bone.* 49(4):591-599.
- [55] Histing T., Holstein J., Garcia P., Matthys R., Kristen A., Claes L., Menger M.D., Pohlemann T. (2009). Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture. *J Orthop Res.* 27(9):1152-1156.

- [56] Histing T., Marciniak K., Scheuer C., Garcia P., Holstein J., Klein M., Matthys R., Pohlemann T., Menger M.D. (2011). Sildenafil accelerates fracture healing in mice. *J Orthop Res.* 29(6):867-873.
- [57] Holstein J., Menger M.D., Culemann U., Meier C., Pohlemann T. (2007). Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech.* 40(1):215-219.
- [58] Holstein J., Garcia P., Histing T., Kristen A., Scheuer C., Menger M.D., Pohlemann T. (2009). Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration. *J Orthop Trauma.* 23(5):31-38.
- [59] Holstein J., Matthys R., Histing T., Becker S., Fiedler M., Garcia P., Meier C., Pohlemann T., Menger M.D. (2009). Development of a stable closed femoral fracture model in mice. *J Surg Res.* 153(1):71-75.
- [60] Hori A., Shibata R., Morisaki K., Murohara T., Komori K. (2012). Cilostazol stimulates revascularisation in response to ischaemia via an eNOS-dependent mechanism. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 43(1):62–65.
- [61] Jacenko O., Olsen B (1995). Transgenic mouse models in studies of skeletal disorders. *J Rheumatol Suppl.* 43:39-41.
- [62] Jiang W., Watkins G., Fodstad O., Douglas-Jones A., Mokbel K., Mansel R. (2004). Differential expression of the CCN family members Cyr61, CTGF and Nov in human breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 11(4):781-791.
- [63] Kamioka H., Honjo T., Takano-Yamamoto T. (2001). A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. *Bone* 28(2):145-149.
- [64] Kim J., Park S., Bae S., Hong K., Kim Y., Park K., Choi B., Shin H. (2011). Combinatorial effect of probucol and cilostazol in focal ischemic mice with hypercholesterolemia. *J Pharmacol Exp Ther.* 338(2):451–457.
- [65] Kinoshita T., Kobayashi S., Ebara S., Yoshimura Y., Horiuchi H., Tsutsumimoto T., Wakabayashi S., Takaoka K. (2000). Phosphodiesterase inhibitors, pentoxifylline and rolipram, increase bone mass mainly by promoting bone formation in normal mice. *Bone.* 27(6):811–817.

- [66] Klein M., Stieger A., Stenger D., Scheuer C., Holstein J., Pohlemann T., Menger M., Histing T. (2015). Comparison of healing process in open osteotomy model and open fracture model; Delayed healing of osteotomies after intramedullary screw fixation. *J Orthop Res.* 33(7):971-978.
- [67] Klinke R., Silbernagl S. (2003). *Lehrbuch der Physiologie.* Thieme Verlag. 4. Auflage:36-38.
- [68] Kohda N., Tani T., Nakayama S., Adachi T., Marukawa K., Ito R., Ishida K., Matsumoto Y., Kimura Y. (1999). Effect of cilostazol, a phosphodiesterase III inhibitor, on experimental thrombosis in the porcine carotid artery. *Throm Res.* 96(4):261-268.
- [69] Kunishima T., Musha H., Eto F., Iwasaki T., Nagashima J., Masui Y., So T., Nakamura T., Oohama N., Murayama M. (1997). A randomized trial of aspirin versus cilostazol therapy after successful coronary stent implantation. *Clin Ther.* 19(5):1058 – 1066.
- [70] Kurihara N., Chenu C., Miller M., Civin C., Roodman G. (1990). Identification of committed mononuclear precursors for osteoclast-like cells in long term human marrow cultures. *Endocrinology.* 126(5):2733-2741.
- [71] Lavia P., Jansen-Dürr P. (1999). E2F target genes and cellcycle checkpoint control. *Bioessays.* 21(3):221-230.
- [72] Lechner A., Schütze N., Siggelkow H., Seufert J., Jakob F. (2000). The immediate early gene product hCYR61 localizes to the secretory pathway in human osteoblasts. *Bone.* 27(1):53–60.
- [73] Lee C., Nelson P. (2014). Effect of cilostazol prescribed in a pragmatic treatment program for intermittent claudication. *Vasc Endovascular Surg.* 48(3):224-229.
- [74] Lee D., Son H., Lim L., Park K. (2014). Population pharmacokinetic analysis of diurnal and seasonal variations of plasma concentrations of cilostazol in healthy volunteers. *Ther Drug Monit.* 36(6):771-780.
- [75] Lienau J., Schell H., Epari D., Schütze N., Jakob F., Duda G., Bail H. (2006). CYR61 (CCN1) protein expression during fracture healing in an ovine tibial model and its relation to the mechanical fixation stability. *J Orthop Res.* 24(2):254–262.
- [76] Lippert (2010). *Anatomie.* Verlag Elsevier. Band 8:34-42.

- [77] Lüllmann-Rauch (2009), Histologie. Verlag Thieme. 3. Auflage :144-165.
- [78] Lüllmann-Rauch (2009), Histologie. Verlag Thieme. 3. Auflage :155-165.
- [79] Lüllmann-Rauch (2009), Histologie. Verlag Thieme. 3. Auflage :277-286.
- [80] Manigrasso M.B., O'Connor J. (2004). Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma*. 18(10):687-695.
- [81] Marsell R., Einhorn T. (2011). The biology of fracture healing. *Injury*. 42(6):551-555.
- [82] Martin J., Matthews J. (1969). Mitochondrial Granules in Chondrocytes. *Calc Tiss Res*. 3(2):184-193.
- [83] McKibbin B. (1978). The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg*. 60(2):150-162.
- [84] McHugh K., Hodivala-Dilke K., Zheng M., Namba N., Lam J., Novack D., Feng X., Ross F., Hynes R., Teitelbaum S. (2000). Mice lacking $\beta 3$ integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J Clin Invest*. 105(4):433-440.
- [85] Mendes J., Campos P., Rocha M., Andrade S. (2009). Cilostazol and pentoxifylline decrease angiogenesis, inflammation, and fibrosis in sponge-induced intraperitoneal adhesion in mice. *Life Sci*. 84(15-16):537–543.
- [86] Nilsson E., Skinner M. (2003). Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod*. 69(4):1265-1272.
- [87] Nunamaker D. (1998). Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*. 355:56-65.
- [88] O'Donnell M., Badger S., Sharif M., Young I., Lee B., Soong C. (2009). The vascular and biochemical effects of cilostazol in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg*. 49(5):1226-1234.
- [89] Ohba R., Otaka M., Odashima M., Jin M., Komatsu K., Konishi N., Wada I., Horikawa Y., Matsushashi T., Oyake J., Hatakeyama N., Watanabe S. (2006). Effect of cilostazol, a selective type-III phosphodiesterase inhibitor, on water immersion stress-induced gastric mucosal injury in rats, *J Gastroenterol*. 41(1):34–40.

- [90] Paiva K., Granjeiro J. (2014). Bone tissue remodeling and development: Focus on matrix metalloproteinase functions. *Arch Biochem Biophys.* 561:74-87.
- [91] Pande R., Hiatt W., Zhang P., Hittel N., Creager M. (2010). A pooled analysis of the durability and predictors of treatment response of cilostazol in patients with intermittent claudication. *Vasc Med.* 15(3):181–188.
- [92] Parfitt A. (1977). The cellular basis of bone turnover and bone loss: a rebuttal of the osteocytic resorption - bone flow theory. *Clin Orthop Relat Res.* 127:236-247
- [93] Parfitt A. (1988). Bone remodeling. *Henry Ford Hosp Med J.* 36(3):143-144.
- [94] Parfitt A., Mundy G., Roodman G., Hughes D., Boyce B. (1996). A new model of the regulation of bone resorption with particular referenceds to the effects of bisposphonates. *J Bone Miner Res.* 11(2):150-159.
- [95] Parfitt A. (2003). New concepts of bone remodeling: a unified spatial and temporal model with physiological and pathophysiological implications. *Bone Loss and Osteoporosis: An Anthropological Perspective.* Springer US. 1. Auflage:3-17.
- [96] Pearce L., Ghosh J., Counsell A., Serracino-Inglott F. (2008). Cilostazol and peripheral arterial disease. *Expert Opin Pharmacother.* 9(15):2683-2690.
- [97] Perren, S.M. (1979). Physical and biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation. *Clin Orthop Relat Res.* 138:175-196.
- [98] Pittenger M., Mackay A., Beck S., Jaiswal R., Douglas R., Mosca J., Moorman M., Simonetti D., Craig S., Marshak D. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411):143-147.
- [99] Pratt C.M. (2001). Analysis of the cilostazol safety database. *Am J Cardiol.* 87(12A):28-33.
- [100] Rahn B., Gallinaro P., Baltensperger A., Perren S. (1971). Primary bone healing. An experimental study in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am.* 53(4):783-786.
- [101] Rhinelander F. W. (1974). Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin Orthop Rel Res.* 105:34-81.

- [102] Robling A., Stout S. (2000) Histomorphometry of Human Cortical Bone: Applications to Age Estimation. *Biological Anthropology of the Human Skeleton*. John Wiley & Sons Inc., USA. Second Edition:187-212.
- [103] Robling A., Castillo A., Turner C. (2006). Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng.* 8:455-498.
- [104] Rochford E., Sabaté Brescó M., Zeiter S., Kluge K., Poulsson A., Ziegler M., Richards R., O'Mahony L., Moriarty T. (2015). Monitoring immune response in a mouse model of fracture fixation with and without *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Bone.* 83:82-92.
- [105] Röntgen V., Blakytyn R, Matthys R. Landauer M., Wehner T., Göckelmann M., Jermendy P., Amling M., Schinke T., Claes L., Ignatius A. (2010). Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator. *J Orthop Res.* 28(11):1456-1462.
- [106] Ruchholtz S., Wirtz D. (2011). *Orthopädie und Unfallchirurgie*. Verlag Thieme. 1. Auflage:3-15.
- [107] Schenk R (1986). Histophysiology and bone remodeling and bone repair. *Perspectives on biomaterials*. Elsevier Verlag. 1. Auflage:75-94.
- [108] Scheven B., Visser J., Nijweide P. (1986). In vitro osteoclast generation from different bone marrow fractions, including a highly enriched haematopoietic stem cell population. *Nature.* 321(6065):79-81.
- [109] Schleinitz M., Olkin I., Heidenreich P. (2004). Cilostazol, clopidogrel or ticlopidine to prevent sub-acute stent thrombosis: a meta-analysis of randomized trials. *Am Heart J.* 148(6):990–997.
- [110] Schrör K. (2002) The pharmacology of cilostazol. *Diabetes Obes Metab.* 4(2):14–19.
- [111] Schünke M. (2000). *Topographie und Funktion des Bewegungssystems*. Verlag Thieme. 1. Auflage:27-40.
- [112] Shefelbin S., Augat P., Claes L., Simon U. (2005). Trabecular bone fracture healing simulation in finite element analysis and fuzzy logic. *J Biomech* 38(12):2440-2450.

- [113] Shimizu W., Aiba T., Antzelevitch C. (2005). Specific therapy based on the genotype and cellular mechanism in inherited cardiac arrhythmias. Long QT syndrome and Brugada syndrome. *Curr Pharm Des.* 11(12):1561-72.
- [114] Si W., Kang Q., Luu H., Park J., Luo Q., Song W., Jiang W., Luo X., Li X., Yin H., Montag A.G., Haydon R.C., He T.C. (2006). CCN1/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.
- [115] Simmons D. (1985). Fracture healing perspectives. *Clin Orthop Relat Res.* 200:100-113.
- [116] Stegen S., van Gastel N., Carmeliet G. (2015). Bringing new life to damaged bone: the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone.* 70:19-27.
- [117] Strandness D. Jr, Dalman R., Panian S., Rendell M., Comp P.C., Zhang P., Forbes W.P. (2002). Effect of cilostazol in patients with intermittent claudication: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Vasc Endovascular Surg.* 36(2):83-91.
- [118] Stürmer K. (1996). Elastic plate osteosynthesis, biomechanics, indications and technique in comparison with rigid osteosynthesis. *Unfallchirurg.* 99(11):816-829.
- [119] Tamhane U., Meier P., Chetcuti S., Chen K., Rha S., Grossman M., Gurm H. (2009). Efficacy of cilostazol in reducing restenosis in patients undergoing contemporary stent based PCI: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Eurointervention.* 5(3):384–393.
- [120] Tanaka T., Ishikawa T., Hagiwara M., Onoda K., Itoh H., Hidaka H. (1988). Effects of cilostazol, a selective cAMP phosphodiesterase inhibitor on the contraction of vascular smooth muscle. *Pharmacology.* 36(5):313-320.
- [121] Tsutsumimoto T., Wakabayashi S., Kinoshita T., Horiuchi H., Takaoka K. (2002). A phosphodiesterase inhibitor, pentoxifylline, enhances the bone morphogenetic protein-4 (BMP-4)-dependent differentiation of osteoprogenitor cells. *Bone.* 31(3):396–401.
- [122] Urist, M.R. (1965). Bone formation by autoinduction. *Science.* 150(3698):893-899.

- [123] Vezzoli G., Tanini A., Ferrucci L., Soldati L., Bianchin C., Franceschelli F., Malentacchi C., Porfirio B., Adamo D., Terranegra A., Falchetti A., Cusi D., Bianchi G., Brandi M.L. (2002), Influence of calcium-sensing Receptor Gene on Urinary Calcium Excretion in Stone-Forming Patients. *J Am Soc Nephrol.* 13(10):2517-2523.
- [124] Wakabayashi S., Tsutsumimoto T., Kawasaki S., Kinoshita T., Horiuchi H., Takaoka K. (2002). Involvement of phosphodiesterase isozymes in osteoblastic differentiation. *J Bone Miner Res.* 17(2):249–256.
- [125] Walsh M., Choi Y. (2014). Biology of the RANKL-RANK-OPG system in immunity, bone and beyond. *Front Immunol.* 5:511.
- [126] Wolf S., Janousek A., Pfeil J., Veith W., Haas F., Duda G., Claes L. (1998). The effects of external mechanical stimulation on the healing of diaphyseal osteotomies fixed by flexible external fixation. *Clin Biomech.* 13(4-5):359-364.
- [127] Xing D., Ma X., Ma J.X., Wang J., Chen Y., Yang Y., Zhu S.W., Ma B.Y., Feng R. (2013). Biomechanical Study on open fracture model with plate fixation compared with closed fracture model with intramedullary nail fixation in rats. *Zhongguo Gu Shang.* 26(8):676-680.
- [128] Yamaguchi A., Ishizuya T., Kintou N., Wada Y., Katagiri T., Wozney J.M., Rosen V., Yoshiki S. (1996). Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochem Biophys Res Commun.* 220(2):366-371.
- [129] Yamamoto Y., Noguchi T., Takahashi N. (2005). Effects of calcitonin on osteoclasts. *Clin Calcium.* 15(3):147-151.
- [130] Ylä-Herttuala S., Rissanen T., Vajanto I., Hartikainen J. (2007). Vascular Endothelial Growth Factors. *Am J Cardiol.* Vol. 49(10):1015-1026.
- [131] Yoon Y., Shim W., Lee D., Pyun W.B., Kim I.J., Jang Y., Cho S.Y. (1999). Usefulness of cilostazol versus ticlopidine in coronary artery stenting. *Am J Cardiol.* 84(12):1375–1380.
- [132] Zheng X., Chen K., Liu T., Xu L., Che J., Rha S., Li G. (2015). Low-dose adjunctive cilostazol in patients with complex lesions undergoing percutaneous coronary intervention. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 43(1):29-33

6.1 Abbildungsverzeichnis

2.1	Aufbau eines typischen Röhrenknochens am Beispiel des Femurs (Quelle: Prometheus LernAtlas, 3. Auflage. Thieme Verlag).....	5
2.2	Aufbau eines Lamellenknochens (Quelle: Appell: Funktionelle Anatomie. 4. Auflage. Springer Verlag.)	8
2.3	Osteoblasten (O-blast, Ob) sezernieren Osteoid (hellgrün). Sie sind untereinander mit Gap junctions (gj, roter Kreis) verbunden. Mineralisierte Matrix (dunkelgrün), Osteoprogenitorzellen (OPr), mesenchymale Stammzellen (StZ) (Quelle: Lüllmann-Rauch. Histologie. 3. Auflage, Thieme Verlag) ^[78]	9
2.4	Mechanismen der osteoklastischen Knochenresorption (Quelle: Graefe. Pharmakologie und Toxikologie. Duale Reihe. Thieme Verlag).....	10
2.5	Chondrale Osteogenese. Entwicklung vom Knorpelmodell (a) bis zum ausgewachsenen Knochen (f). Knorpel (rosa), Knochen (grün), mineralisierte Knorpelmatrix (violett), Blutgefäße (rot). (Quelle: Lüllmann-Rauch. Histologie. 3. Auflage. Thieme) ^[78]	13
2.6	Publikationsanzahl pro Jahr zwischen 1960 und 2010 mit den Suchbegriffen:“ bone repair and mice“ (schwarze Kurve), „fracture healing and mice“ (graue Kurve), „bone repair and rats“ (gestrichelte schwarze Kurve), „fracture healing and rats“ (gestrichelte, graue Kurve). (Quelle: Histing T., Garcia P. et al. (2011). Small animal bone healing models: Standards, tips and pitfalls, results of a consensus meeting. Bone 49, S. 591-599 ^[54]).....	22
2.7	Strukturformel Cilostazol	23

2.8	Cilostazol Wirkschema: PDE-III senkt den intrazellulären cAMP-Spiegel (1) durch dessen Abbau. Über eine Hemmung der PDE-III durch Cilostazol kommt es daher zu einem cAMP-Anstieg (2). Dieser aktiviert die Proteinkinase A welche wiederum die Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase aktiviert. Die dadurch einsetzende Dephosphorylierung des Myosins sorgt für eine Relaxation der glatten Muskulatur.....	24
3.1	MouseScrew, RISystems AG, Davos, Schweiz.....	29
3.2	Hautschnitt medial der Patella.....	31
3.3	Luxation der Patella und Darstellung der Femurkondylen.....	32
3.4	Eröffnung des Markraums.....	32
3.5	Kanüle intramedullär vor Einbringung des Führungsdrahtes.....	33
3.6	Einliegender Führungsdraht.....	33
3.7	Frakturierung des rechten Mausfemurs mit der Guillotine.....	34
3.8	Einbringen der MouseScrew in das frakturierte Femur.....	34
3.9	Sicht auf die Fossa intercondylaris nach Abbrechen der Schraube im Bereich der Sollbruchstelle.....	35
3.10	Reposition der Patella.....	35
3.11	Refixation der Patella.....	36
3.12	Hautnaht.....	36
3.13	Kraft-Weg-Diagramm zur Bestimmung der Biegesteifigkeit.....	38
3.14	Lage des Führungsdrahtes (A), Lage der eingebrachten Schraube (B).....	39

3.15	Darstellung eines nach 2 Wochen postoperativ explantierten Femurs der Kontrollgruppe mit partieller Überbauung des Frakturspalts (Goldberg-Score 2)	40
3.16	Histologisches Schnittbild des Kallusgewebes, eingezeichnet sind Knochen- (rot), Knorpel- (blau) sowie Bindegewebsfraktionen (gelb)	42
4.1	Absolute und relative Biegesteifigkeit der 2-Wochen-Tiere der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM	46
4.2	Absolute und relative Biegesteifigkeit der 5-Wochen-Tiere der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle	47
4.3	Absolute Biegesteifigkeit der gesunden Knochen der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM	48
4.4	Goldberg-Score der 2-Wochen und 5-Wochen Tiere der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle	49
4.5	Röntgenbilder des frakturierten und des kontralateralen, gesunden Knochens nach Explantation der Femora. 2 Wochen postoperativ der Kontrollgruppe (links) und der Cilostazolgruppe (rechts)	49
4.6	Röntgenbilder des frakturierten und des kontralateralen, gesunden Knochens nach Explantation der Femora. 5 Wochen postoperativ der Kontrollgruppe (links) und der Cilostazolgruppe (rechts)	50
4.7	Knochenanteil in Relation zur Gesamt-Kallusfläche der 2-Wochen und 5-Wochen Tiere der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle	51

4.8	Knorpelanteil in Relation zur Gesamt-Kallusfläche der 2-Wochen und 5-Wochen Tiere der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM. *p<0,05 vs. Kontrolle.....	51
4.9	Bindegewebsanteil in Relation zur Gesamt-Kallusfläche der 2-Wochen und 5-Wochen Tiere der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM.....	52
4.10	Histologisches Schnittpräparate der Kontrollgruppe 2 Wochen postoperativ (links) und der Cilostazolgruppe 2 Wochen postoperativ (rechts). Dargestellt ist der erhöhte Knorpelanteil (CgAr) der Kontrollgruppe im Vergleich zur Cilostazolgruppe.....	52
4.11	Anzahl der Osteoklasten zu Knochenoberfläche [mm ⁻¹] der 2-Wochen und 5-Wochen Tiere der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM. *p<0,05 vs. Kontrolle.....	53
4.12	Histochemische Färbung der TRAP-positiven Osteoklasten (Pfeile) 2 Wochen postoperativ der Kontroll- (A und C) sowie der Cilostazolgruppe (B und D)	54
4.13	Western Blot Analyse von RANKL und OPG in der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM. *p<0,05 vs. Kontrolle.....	55
4.14	Western Blot Analyse der RANKL und OPG Expression.....	55
4.15	Western Blot Analyse von BMP-2 und BMP-4 in der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM. *p<0,05 vs. Kontrolle.....	56
4.16	Western Blot Analyse der BMP-2 und BMP-4 Expression.....	56

4.17	Western Blot Analyse von Cyr61 und VEGF in der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.....	57
4.18	Western Blot Analyse der Cyr61 und VEGF Expression.....	57
4.19	Western Blot Analyse von PCNA und eNOS in der Kontroll- (weiße Balken) sowie der Cilostazol-Gruppe (schwarze Balken). Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.....	58
4.20	Western Blot Analyse der PCNA und eNOS Expression.....	58

6.2 Tabellenverzeichnis

3.1	Studienprotokoll.....	28
3.2	Goldberg-Score.....	39

Kapitel 7 – Danksagung

Ohne Unterstützung wäre diese Forschungsarbeit nicht realisierbar gewesen. Daher möchte ich mich an dieser Stelle bei allen Personen bedanken, die mich tatkräftig unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt hier vor allem meiner Doktormutter PD Dr. med. Tina Histing, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Ihre vielseitige Unterstützung von der Themenfindung bis zur Korrektur der Arbeit war mir stets eine große Hilfe.

Für die Bereitstellung aller Gerätschaften, Räumlichkeiten sowie der Themenfindung für diese experimentelle Arbeit möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Michael Menger und Prof. Dr. med. Tim Pohlemann bedanken.

Für die histologische und biochemische Probenaufbereitung bedanke ich mich bei Janine Becker und Dr. rer. med. Claudia Scheuer. Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. med. Steven Herath für die Unterstützung bei der Ergebnisinterpretation. Herrn Joshua Schier danke ich für seine Assistenz bei der biomechanischen Datenerhebung. Frau Christine Thull und Frau Christina Klein danke ich für die Korrektur der verfassten Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Klinisch-Experimentelle Chirurgie für die große Hilfsbereitschaft und das freundlichen Arbeitsklima.

Ich danke meiner Familie und meiner Freundin Karina für ihre liebevolle Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Kapitel 8 – Publikation

Die Ergebnisse dieser experimentellen Arbeit wurden auf einem Kongress vorgestellt und in einem Fachjournal publiziert:

Vortrag

Herath S, Lion T, Stenger D, Scheuer C, Holstein J, Mörsdorf P, Rollmann M, Pohlemann T, Menger M, Histing T (2015). Cilostazol beschleunigt die Frakturheilung in der Maus. Preisträgersitzung, Grundlagenforschung. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, 20.10.-23.10.2015, Berlin, Deutschland.

Auszeichnung

Erhalt des Wilhelm-Roux-Preis 2015 der Sektion für Grundlagenforschung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie e.V., Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2015, Berlin, Deutschland.

Publikation

Herath S, Lion T, Stenger D, Scheuer C, Holstein J, Mörsdorf P, Rollmann M, Pohlemann T, Menger M, Histing T (2015). Stimulation of angiogenesis by cilostazol accelerates fracture healing in mice. J Orthop Res. 33(12):1880-1887.

