
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 murinen Ischämiemodell

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

vorgelegt von: Janine Stutz

geboren am: 02.04.1994 in St. Wendel

Tag der Promotion: 23.11.2020

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Tina Histing

Prof. Dr. med. Henning Madry

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	3
2	Zusammenfassung / Abstract.....	5
3	Einleitung.....	6
3.1	Knochen.....	7
3.1.1	Morphologie	7
3.1.2	Histologie	7
3.1.3	Funktion	8
3.2	Wachstumsfaktoren	8
3.2.1	Osteoprotegerin (OPG)	8
3.2.2	Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL)	8
3.2.3	Bone Morphogenetic Protein 2 und 4 (BMP).....	9
3.2.4	Cystein-rich Protein 61 (Cyr-61)	9
3.3	Frakturheilung.....	9
3.3.1	Primäre Frakturheilung	10
3.3.2	Sekundäre Frakturheilung	10
3.4	Frakturmodelle.....	11
3.4.1	Hund	11
3.4.2	Schaf.....	11
3.4.3	Kaninchen.....	11
3.4.4	Ratte.....	11
3.4.5	Maus	12
3.5	Cilostazol	14
3.5.1	Struktur	14
3.5.2	Wirkmechanismus.....	15
3.5.3	Pharmakokinetik	16
3.5.4	Anwendung und Indikation	17
3.5.5	Nebenwirkungen	18
3.6	Ischämie.....	19
3.7	Zielsetzung.....	19

3.8 Fragestellung.....	20
4 Material und Methoden	20
4.1 Methoden.....	20
4.1.1 Studiendesign.....	20
4.1.2 Tiermodell.....	21
4.1.3 Operationsverfahren	22
4.1.4 Medikamentenapplikation.....	235
4.1.5 Tötung der Tiere.....	25
4.1.6 Präparation der Knochen.....	25
4.2 Zielkriterien und Auswertung.....	26
4.2.1 Radiologie	26
4.2.2 Computertomographie	28
4.2.3 Biomechanik.....	28
4.2.4 Histologie	29
4.2.5 Western Blot.....	31
4.3 Statistik.....	32
5 Ergebnisse	323
5.1 Radiologie.....	33
5.2 Computertomographie	33
5.3 Biomechanik.....	34
5.4 Histologie.....	36
5.5 Western Blot.....	39
6 Diskussion.....	43
6.1 Diskussion der Methoden	43
6.2 Diskussion der Ergebnisse.....	46
7 Literaturverzeichnis	50
8 Danksagung.....	61
9 Publikationen	62
9.1 Vorträge.....	62
9.2 Publikation.....	62
10 Lebenslauf.....	63
11 Abbildungsverzeichnis	64
12 Tabellenverzeichnis	66

1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A1	Adenosin-Rezeptor Typ 1
A2	Adenosin-Rezeptor Typ 2
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ALP	Alkalische Phosphatase
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
AUC	area under the curve
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD 31	Cluster of differentiation 31
CT	Computertomographie
Cyr-61	Cystein-rich Protein 61
EP	Prostaglandin-E-Rezeptor
g	Gramm
G	Gauge
HDL	high density lipoprotein
i.p.	intraperitoneal
IP	Prostazyklin-Rezeptor
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KF	Korrekturfaktor
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht

kV	Kilovolt
LDL	low density lipoprotein
μA	Mikroampère
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
μm	Mikrometer
mg	Milligramm
mm	Millimeter
min	Minute
ms	Millisekunde
MW	Mittelwert
OPG	Osteoprotegerin
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PDE	Phosphodiesterase
PGE	Prostaglandin E
PGI ₂	Prostazyklin 2
PKA	Proteinkinase A
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
ROI	Region of interest
s	Sekunde
SD	Standardfehler
TIP	Target-Intensitätspixel
USA	United States of America
VEGF	Vascular endothelial growth factor
z.B.	zum Beispiel

2 Zusammenfassung / Abstract

Einfluss von Cilostazol auf die Frakturheilung im murinen Ischämiemodell

Cilostazol ist ein selektiver Phosphodiesterase-3-Hemmer und verbessert die Angiogenese durch vermehrte Expression von Vascular endothelial growth factor (VEGF). Des Weiteren reguliert Cilostazol die cyclische Adenosinmonophosphat-Konzentration (c-AMP) und nimmt somit Einfluss auf die Regulation der Vasodilatation, Thrombozytenaggregation und Osteoblastendifferenzierung. Aus diesem Grund ist Cilostazol für die Therapie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) zugelassen. Frühere Studien haben eine verbesserte Frakturheilung unter Cilostazol-Gabe nachgewiesen. Bisher wurde der Einfluss von Cilostazol auf die Frakturheilung im Ischämiemodell nicht untersucht. Ziel dieser Studie war es daher, den Effekt von Cilostazol auf den Frakturheilungsprozess in einem murinen Ischämiemodell durch Ligatur der Arteria profunda femoris in der rechten unteren Extremität zu untersuchen.

Insgesamt wurden für diese Studie 49 CD-1 Mäuse untersucht. Die Femurfraktur wurde mit einer intramedullären Zugschraube stabilisiert. Die Cilostazol-Gruppe (n=25) erhielt eine tägliche Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht p.o. Cilostazol. Die Kontroll-Gruppe (n=24) erhielt täglich eine äquivalente Menge Natriumchlorid p.o.. 2 und 5 Wochen postoperativ wurden radiologische, biomechanische, histomorphometrische und proteinbiochemische Analysen durchgeführt.

2 Wochen postoperativ zeigte sich eine signifikant erniedrigte Biegesteifigkeit in der Cilostazol-Gruppe. Zudem konnten in der computertomographischen Analyse ein erniedrigtes absolutes Knochenvolumen nach 2 Wochen und eine geringere Trabekelanzahl nach 5 Wochen nach der Behandlung mit Cilostazol nachgewiesen werden. Auch in der histomorphometrischen Untersuchung war jeweils 5 Wochen postoperativ der Knochenanteil geringer und der Bindegewebsanteil erhöht. Die Expression des angiogenen Markers Cluster of differentiation 31 (CD31) war in der Cilostazol-Gruppe signifikant erhöht. Des Weiteren zeigte sich eine erhöhte Osteoklasten-Aktivität bei signifikant erhöhter Expression von Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL).

Zusammenfassend zeigte sich eine verzögerte Frakturheilung durch die Gabe von Cilostazol unter Ischämiebedingungen.

Effect of cilostazol on fracture healing under ischemic conditions

Cilostazol is known as a selective phosphodiesterase-3 inhibitor and increases angiogenesis by upregulation expression of vascular endothelial growth factor (VEGF). In addition, cilostazol controls cyclic adenosine monophosphate (c-AMP) concentration regulating vasodilatation, platelet aggregation and the differentiation of osteoblasts. Cilostazol is used for the treatment of peripheral arterial occlusive disease. Previous studies have shown an improved fracture healing in mice when treated with cilostazol. However, there is no information whether cilostazol affects fracture healing in an ischemic murine fracture model. Therefore, the aim of study was to analyze the effect of cilostazol on fracture healing in an ischemic murine model by ligating the deep femoral artery in the right limb.

Femure fracture was created by a blunt guillotine and was stabilized using an intramedullary screw. In this study, a total number of 49 CD-1 mice were used. The animals (n=25) received a daily dose of 5 mg/kg body weight cilostazol p.o.. The control group (n=24) received equivalent amounts of saline solution p.o.. Radiological, biomechanical, histomorphometric and protein biochemical analyses were performed after 2 and 5 weeks.

2 weeks after cilostazol treatment, the bending stiffness was significantly lower compared to controls. This was associated with a reduced bone volume in CT analysis after 2 weeks and a decreased trabecular number after 5 weeks. Histologically, the amount of bone was reduced and the fibrous tissue was increased. In addition, the expression of the angiogenic factor Cluster of differentiation 31 (CD31), and the Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL), a marker of osteoclast activity, were significantly higher after cilostazol treatment.

In conclusion, cilostazol delays fracture healing and prolongs callus remodeling under ischemic conditions.

3 Einleitung

3.1 Knochen

3.1.1 Morphologie

Knochen werden nach ihrer äußeren Form in verschiedene Gruppen eingeteilt: Ossa longa (lange Knochen oder Röhrenknochen, z.B. Humerus, Tibia), Ossa brevia (kurze Knochen, z.B. Hand- und Fußwurzelknochen), Ossa plana (platte Knochen, z.B. Scapula, Sternum, Os coxae), Ossa pneumatica (luftgefüllte Knochen, z.B. Processus mastoideus) sowie Ossa irregularia (unregelmäßige Knochen, z.B. Schädelbasisknochen, Wirbel). Zu den Röhrenknochen wird auch das in dieser Studie verwendete Femur gezählt. Das Femur wird in verschiedene Abschnitte unterteilt: Die Epiphyse stellt das proximale und distale Ende dar. Dazwischen befindet sich die Diaphyse, wo sich die Kortikalis zur Substantia compacta verdickt. Im Inneren besteht der Knochen aus der Substantia spongiosa. Zwischen Diaphyse und der jeweiligen Epiphyse liegt die Metaphyse, die für das Längenwachstum des Knochens verantwortlich ist. Zusätzlich gibt es noch Apophysen, die als Knochenvorsprung einen Ansatzpunkt für Muskeln und Bänder darstellen [7].

3.1.2 Histologie

Mikroskopisch besteht der Knochen aus verschiedenen Zellen, den Osteozyten, sowie der Interzellularsubstanz, die sich wiederum aus organischen (kollagene Fibrillen, Proteoglykane und Glykoproteine) sowie anorganischen (Hydroxylapatit) Anteilen zusammensetzt. Knochen werden histologisch in zwei Arten unterschieden: Lamellenknochen und Geflechtknochen. Geflechtknochen haben einen relativ unregelmäßigen Aufbau mit ungerichteten Kollagenfasern und enthalten viele Knochenzellen. Daher sind sie zug- und biegefest. Bevorzugt kommt er in der Fetalperiode vor und entsteht durch desmale Ossifikation. Beim Erwachsenen findet sich Geflechtknochen lediglich in den Suturen des Schädels, im Labyrinth der Pars petrosa sowie in der Alveolarwand von Ober- und Unterkiefer. Außerdem entsteht Geflechtknochen in der Initialphase der Frakturheilung. Der dadurch gebildete Kallus wird im weiteren Heilungsverlauf zu Lamellenknochen umgebaut. Lamellenknochen zeigen eine sehr regelmäßige Grundstruktur. Zentrales Bauelement ist dabei das sogenannte Osteon oder Havers-System, in dessen Zentrum ein Havers-Kanal liegt. Durch diesen Kanal verlaufen Blutgefäße und Nervenfasern. Konzentrisch um den Havers-Kanal ordnen sich 5-10 µm dicke Lamellen an,

zwischen denen sich wiederum 2-3 μm dicke kollagene Fasern des Typ 1 befinden. Die Havers-Kanäle stehen über sog. Volkmann-Kanäle, die orthograd verlaufen, untereinander in Verbindung. Die Räume zwischen den einzelnen Osteonen sind durch Schaltlamellen aufgefüllt. Die äußere Begrenzung des Knochens stellt das Periost dar, das sich in zwei Schichten unterteilt. Das innenliegende Stratum osteogenicum besteht vorwiegend aus Osteoblasten und ist für die Knochenbildung verantwortlich. Das außen aufliegende Stratum fibrosum setzt sich aus sog. Sharpey-Fasern zusammen, die eine Stabilisierungsfunktion haben und als Befestigungspunkt für Muskeln und Bänder dienen [82]. Im Gegensatz zum menschlichen Knochen ist der Knochen der Maus relativ einfach strukturiert. Resorptionskanäle sind anstelle der menschlichen Havers-Kanäle für die Knochenheilung vorhanden [74].

3.1.3 Funktion

Der Knochen übernimmt zum einen eine Stützfunktion, zum anderen dient er an manchen Körperstellen auch als Schutz für die inneren Organe und das zentrale Nervensystem. Darüber hinaus dient der Knochen als Calciumreservoir und zentraler Ort der Blutbildung ab der Geburt [7].

3.2 Wachstumsfaktoren

Der gesamte Knochenaufbau und Knochenabbau wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren reguliert.

3.2.1 Osteoprotegerin (OPG)

Zum ersten Mal beschrieben wurde OPG im Jahre 1997. Es stellt einen Rezeptorantagonisten von RANKL dar [95]. Als Tumornekrosefaktor hemmt OPG die Osteoklastenaktivität und -entstehung durch Hemmung der Differenzierung der Vorläuferzellen [111].

3.2.2 Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL)

RANKL wurde 1997 entdeckt und gehört ebenfalls zur Gruppe der Tumornekrosefaktoren. Der durch

Osteoblasten sezernierte Ligand aktiviert die Differenzierung von monoklonalen Osteoklasten-Vorläuferzellen zu Osteoklasten und reguliert so die Knochenresorption. Die OPG-Bindung an RANKL am Osteoblasten inhibiert die RANKL-Rezeptor-Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklast-Vorläufern, wodurch die Differenzierung zum Osteoklasten gehemmt wird [5].

3.2.3 Bone Morphogenetic Protein 2 und 4 (BMP)

BMPs wurden bereits 1965 erstmalig beschrieben [101]. Sie nehmen in der Regulation der Frakturheilung eine zentrale Rolle ein und gehören zu der Gruppe der Transforming Growth Factor- β . In unterschiedlichen experimentellen Studien konnte bereits die osteoinduktive Wirkung von BMP nachgewiesen werden [17]. BMP-2 hat in der Osteoblastendifferenzierung eine entscheidende Schlüsselrolle und ist ein wichtiger Bestandteil der Knochenneubildung. BMP-4 fördert die enchondrale Ossifikation und trägt so zur Frakturheilung bei [84].

3.2.4 Cystein-rich Protein 61 (Cyr-61)

1990 wurde Cyr-61 erstmalig in Mäusefibroblasten entdeckt und der Familie der Frühe-Phase-Proteine zugeteilt [76]. In diversen Studien konnte Cyr-61 im Kallus nachgewiesen werden. Es fördert die Osteoblastenproliferation und ist an der Neubildung von Knochen und Knorpel beteiligt. Vor allem in der Phase der Chondrogenese wird Cyr-61 vermehrt exprimiert und nimmt somit eine Schlüsselrolle in der enchondralen Ossifikation ein. Zudem ist Cyr-61 ein wichtiger Angiogenese-Marker und hat einen positiven Einfluss auf die Regeneration des Kallus [52].

3.3 Frakturheilung

Umbauprozesse finden stetig im gesunden Knochen statt. Daran beteiligt sind sowohl Osteoklasten, die den Knochen abbauen sowie Osteoblasten, die neuen Knochen bilden. Dieser Remodeling-Prozess läuft bei der Frakturheilung verstärkt ab. Dabei heilt die Kortikalis in Längsrichtung über die Wanderung der Osteone, die Spongiosa dagegen heilt über eine Überbrückung der Trabekel. Um eine erfolgreiche Frakturheilung zu gewährleisten, müssen drei Voraussetzungen erfüllt sein: ein ausreichender Kontakt der Fragmente, eine angemessene Ruhigstellung und eine intakte Durchblutung. Zu wenig Beweglichkeit zwischen den einzelnen Fragmenten verzögert die Frakturheilung, da der Wachstumsreiz

für die Osteoblasten nicht ausreicht. Zu viel Bewegung wiederum führt zu Pseudarthrosen, da die Osteone nicht fest einwachsen können. Daneben haben außerdem das Lebensalter, der Frakturverlauf sowie die Knochenstruktur einen Einfluss auf die Knochenheilung. Ebenso spielen die Wahl der Therapie bzw. des Operationsverfahrens sowie Interaktionen mit Medikamenten eine Rolle in der Frakturheilung. Prinzipiell lassen sich zwei verschiedene Prinzipien der Frakturheilung unterscheiden: die primäre und die sekundäre Frakturheilung [73].

3.3.1 Primäre Frakturheilung

Diese Form der Frakturheilung wird auch als direkte Frakturheilung bezeichnet, da sie ohne die Bildung von Kallus stattfindet. Voraussetzung für diese Art der Knochenheilung ist ein ausreichender interfragmentärer Kontakt. Durch eine intakte Durchblutung kann sichergestellt werden, dass die Osteone auf direktem Wege den Frakturspalt durchwandern können und die Frakturheilung initiieren können. Bis zum vollständigen Abschluss der primären Frakturheilung vergehen etwa ein bis zwei Jahre [73].

3.3.2 Sekundäre Frakturheilung

Die sekundäre Frakturheilung entspricht dem physiologischen Heilungsprozess und verläuft in einzelnen Schritten: In der initialen Verletzungsphase bildet sich ein Hämatom um die Fraktur. Im nächsten Schritt organisiert sich das Hämatom in der bis zu 14 Tage andauernden Entzündungsphase durch das Einwachsen von Fibroblasten unter Bildung von bindegewebigem Kallus. Nach weiteren Wochen bis Monaten ist die Phase der Härtung des Kallus abgeschlossen. In diesem Zeitraum bildet sich ein knöcherner Kallus über die Bildung von Geflechtknochen aus. Die abschließende Remodelling-Phase dauert bis zu zwei Jahre an. In dieser Zeit findet ein schrittweiser Umbau zu lamellärem Knochen statt, das Gefäßsystem rekonstruiert sich und der überschüssige Kallus wird abgebaut [73].

3.4 Frakturmodelle

3.4.1 Hund

Frakturmodelle am Hund haben vor allem in der Veterinärmedizin einen großen Stellenwert. Die biologischen Frakturheilungsmechanismen des Hundes sind in der Literatur sehr gut beschrieben, da eine Vielzahl von Untersuchungen an Frakturmodellen für interne und externe Stabilisierungstechniken mit und ohne Frakturheilungsstörungen am Hund durchgeführt wurden [11, 35, 64, 72, 81, 103].

3.4.2 Schaf

Da die Anatomie des Schafes die des Menschen sehr ähnelt, wurden diese Modelle bevorzugt für die Entwicklung und Testung von humanen Implantaten genutzt [16]. Die Abläufe der primären Knochenheilung wurden für Schafe bereits sehr detailliert erforscht [90]. Anhand des Schafmodells wurden die Schraubenstabilisierung, Plattenosteosynthesen sowie die intramedulläre Marknagelung untersucht [75, 80, 88, 89]. Aufgrund hoher Kosten für die Tierhaltung ist die Verwendung von solchen Modellen sehr begrenzt.

3.4.3 Kaninchen

Das Kaninchen ist ebenfalls ein gut geeignetes Modell zur Untersuchung der Frakturheilung, da durch seine Größe verschiedene Analysen wie zum Beispiel biomechanische Untersuchungen einfacher als bei Ratten oder Mäusen durchgeführt werden können. Die verschiedensten Implantate wie Platten, Schrauben, Fixateur externe oder Verriegelungsnägel sind in der Herstellung und Implantation vorteilhafter [14, 25, 26, 59]. Die Kosten für Tierhaltung und Medikamentenapplikation sind bedeutend geringer als die Kosten bei Großtieren wie Hund oder Schaf [23].

3.4.4 Ratte

Die Ratte wird bereits seit längerem für die Untersuchung der Frakturheilung verwendet. Diverse Knochen (Tibia, Femur, Schädel, Radius, Ulna, Metatarsale) wurden bereits für Analysen benutzt [3, 4,

8, 43, 99, 102]. Im Vergleich zum Mausmodell sind hier die operativen Verfahren technisch einfacher. Studien mit großer Tieranzahl sind günstiger als im Großtiermodell. Die initial verwendeten instabileren Pin-Osteosynthesen werden immer mehr von stabileren Plattenosteosynthesen und Verriegelungsmarknägeln abgelöst [86, 91, 108].

3.4.5 Maus

Ähnlich wie bei Rattenmodellen sind auch Mausmodelle aufgrund ihrer geringen Haltungs- und Anschaffungskosten ideal für große Tierstudien geeignet. Mittlerweile existieren mehr Publikationen über die Frakturmodelle von der Maus als über die Modelle von der Ratte [47]. Ein Nachteil des Mausmodells liegt darin, dass sich die Knochengrundstruktur vom Menschen in der Hinsicht unterscheidet, dass die Maus statt Havers-Kanälen sogenannte Resorptionskanäle besitzt. Die grundsätzlichen Mechanismen der Knochenbruchheilung unterscheiden sich allerdings nicht [74]. Ein sehr großer Vorteil dagegen stellt die vollständige Entschlüsselung des Genoms der Maus dar, wodurch eine gezielte Untersuchung spezifischer Antikörper zur Analyse der molekularen Mechanismen der Frakturheilungsprozesse möglich ist [85].

Beliebte Knochenmodelle zur Untersuchung an der Maus waren bisher Tibia, Femur und Rippe [13, 19, 44, 56]. Die Genexpression kann sehr gut an Rippen analysiert werden, allerdings eignen sich diese aufgrund ihrer Struktur nur mäßig für biomechanische Testungen [58, 110].

Zur Untersuchung der langen Röhrenknochen existieren für die Maus offene und geschlossene Frakturmodelle. Während bei dem offenen Modell der Knochen über einen lateralen Zugang präpariert und osteotomiert wird, wird die Fraktur beim geschlossenen Modell mittels stumpfer Guillotine erzeugt [47]. Das erste Modell einer geschlossenen Fraktur an der Ratte publizierten Bonnarens und Einhorn 1984 [12]. Auf der Grundlage dieses Modells wurde 1993 von Hiltunen et al. ein geschlossenes Frakturmodell an der Tibia der Maus etabliert. Damit konnte ein transversaler Frakturverlauf ermöglicht werden bei geringem Weichteilschaden [44]. Für das Femur entwickelten Manigrasso und O'Connor 2004 ein ähnliches Modell [67]. Da das Femur einen größeren Weichteilmantel als die Tibia besitzt, können hieran auch Analysen von Weichteiltraumata stattfinden. Darüber hinaus verfügt das Femur über einen homogenen Querschnitt zur einfacheren biomechanischen Testung.

Manigrasso und O'Connor stabilisierten die Fraktur mittels intramedullärem Pin, der meist aus einer 24-Gauge Kanüle gefertigt wurde (Abb. 1A) [67]. Dieser kann über einen Hautschnitt medial der Patella über die interkondyläre Femurnotch in den Markraum implantiert werden. Allerdings bietet dieser Pin keine Rotationsstabilität, weshalb er nicht für standardisierte Untersuchungen verwendbar ist [49].

Zur Verbesserung der Rotationsstabilität wurde ein Verriegelungsnagel entwickelt, der durch eine beidseitige Abflachung der Kanüle eine bessere Verankerung im Markraum ermöglicht (Abb. 1B) [56].

Ein weiterer Verriegelungsnagel gewährleistet durch Pins an den distalen Enden des Nagels eine Rotationsstabilität. Zusätzlich wird über ein Gewinde eine axiale Kompression erreicht. (Abb. 1F) [33]

Die intramedulläre Zugschraube (MouseScrew™) bietet sowohl eine axiale Stabilität als auch eine Rotationsstabilität. Dies wird durch den distalen Konus und ein proximales Gewinde erreicht. Die Zugschraube wird nach geschlossener Frakturierung mittels stumpfer Guillotine über einen Führungsdraht in den Markraum implantiert (Abb. 1D) [55].

Ein weiteres Stabilisierungsverfahren ist der Fixateur externe [18]. Nach Anlage eines externen Fixateurs über einen lateralen Zugang wird der Knochen unter Sicht osteotomiert. Diese Art der Osteosynthese bietet eine gute Rotationssicherung [49]. Der Fixateur externe setzt sich aus vier Schanzschrauben und einem Fixateur-Block zusammen (Abb. 1G). Ein großer Vorteil dieses Modells liegt darin, dass durch Änderung der Spaltbreite auch die Mechanismen der verzögerten Heilung und Pseudarthrose besser untersucht werden können. Allerdings wird durch die extramedulläre Lage sowie die Größe und das Gewicht des Implantats das physiologische Gangbild beeinflusst.

Der Pin-Clip ist eine Kombination aus einem gewöhnlichen Pin und einer extramedullären Klammer, wodurch ebenfalls eine Rotationsstabilität gewährleistet wird. (Abb. 1C) [33, 34]. Auch mit diesem Frakturmodell können Mechanismen der Pseudarthrose untersucht werden.

Eine winkelstabile Platte wurde ebenfalls für die Maus entwickelt. Die Platte wird mit vier Schrauben am Knochen fixiert. (Abb. 1E) [48, 69]. Die winkelstabile Platte ist als starres und flexibles Modell zu verwenden. Mit der Platte kann sowohl die normale als auch die verzögerte Heilung untersucht werden. Aufgrund der Stabilität erlaubt sie die Untersuchung der intramembranösen Frakturheilung.

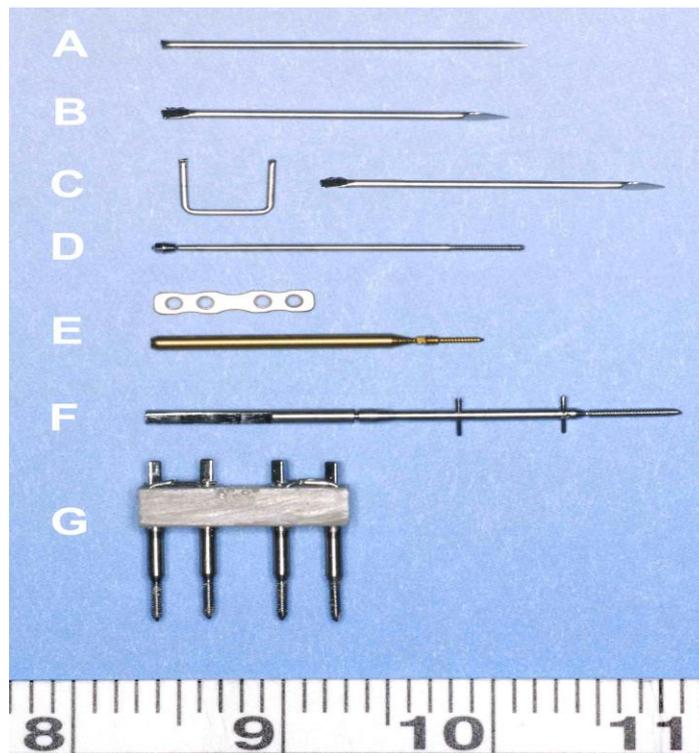


Abbildung 1: Osteosynthesetechniken für das Mausfemur: (A) Intramedullärer Pin (B) Intramedullärer Verriegelungsnagel (C) Pin-Clip (D) MouseScrew™ – intramedulläre Zugschraube (E) Platte mit Schraube (F) Verriegelungsnagel mit Verriegelungsbolzen (G) Fixateur externe

3.5 Cilostazol

Cilostazol ist ein selektiver Phosphodiesterase-3-Inhibitor und wurde im Jahr 1985 entwickelt. Es wurde bereits 1988 in Japan, 1999 in den USA sowie 2007 in Deutschland zur Behandlung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (PAVK) zur Verlängerung der schmerzfreien Gehstrecke zugelassen [60, 61, 62].

3.5.1 Struktur

Cilostazol trägt den IUPAC-Namen 6-[4-(1-Cyclohexyl-1*H*-tetrazol-5-yl)butoxy]-3,4-dihydrochinolin-2-on. Seine Summenformel lautet somit $C_{20}H_{27}N_5O_2$. Die molare Masse beträgt 369,49 g/mol und die Dichte beträgt 1,26 g/cm³. Sein Schmelzpunkt beträgt abhängig vom vorliegenden Polymorph (A, B oder C) zwischen 136°C und 159°C [96, 106].

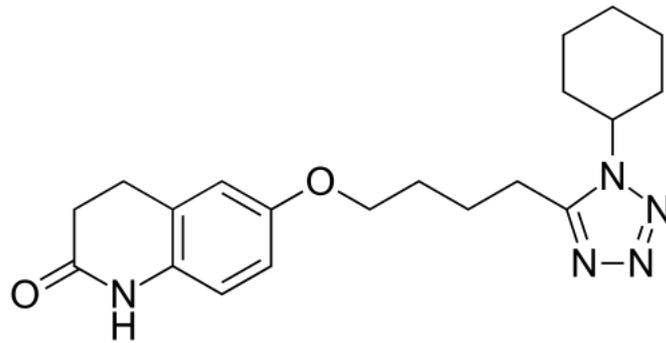


Abbildung 2: Struktur von Cilostazol

3.5.2 Wirkmechanismus

Cilostazol ist ein selektiver Phosphodiesterase-Typ 3A-Inhibitor. Durch die Hemmung des Abbaus von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) kommt es zu einer Erhöhung des zellulären cAMP-Spiegels. Darüber hinaus hemmt Cilostazol die Wiederaufnahme von Adenosin in die Erythrozyten, wodurch der Adenosinabbau vermindert wird. Somit liegt ein erhöhter Adenosin-Spiegel vor, der wiederum am Adenosin-A2-Rezeptor die Bildung von cAMP erhöhen kann [66, 105]. Am A1-Rezeptor in Kardiozyten hat Adenosin eine bradykardisierende Wirkung, deren Bedeutung bisher noch nicht abschließend bekannt ist [22, 92]. Cilostazol ist somit beteiligt an antiinflammatorischen, antiatherogenen und antiproliferativen Effekten. In Thrombozyten hemmt Cilostazol die Thrombozytenaggregation, -adhäsion und -sekretion. Durch zusätzliche Aktivierung der Scherkräfte wird die Wirkung durch Adenosin, Prostaglandine und Prostazyklin verstärkt. Außerdem wird die Bildung von P-Selektinen sowie die Aktivierung des Fibrinogen-Rezeptors (GPIIb/IIIa) vermindert [92]. Die Expression von prothrombotisch und proinflammatorisch wirkenden Adhäsionsmolekülen wird von Cilostazol in Endothelzellen gehemmt. In Leukozyten werden die Expression von MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) sowie die Synthese von Sauerstoffradikalen und P-Selektinen vermindert. Einzelne in-vitro-Ergebnisse zeigen eine apoptotische und angiogenetische Wirkung von Cilostazol [24, 92]. Auf glatte Muskelzellen wirkt Cilostazol relaxierend und antimitogen [92]. Zusätzlich kann Cilostazol das Plasmalipidprofil verbessern. Dies wurde in einer kontrollierten Studie gezeigt, in der Claudicatio intermittens-Patienten nach 12-wöchiger Behandlung mit Cilostazol ein um 15% reduziertes Triglycerid-Niveau sowie eine um 10% erhöhten HDL-Spiegel bei unverändertem LDL- und Gesamtcholesterin-Spiegel aufwiesen [29].

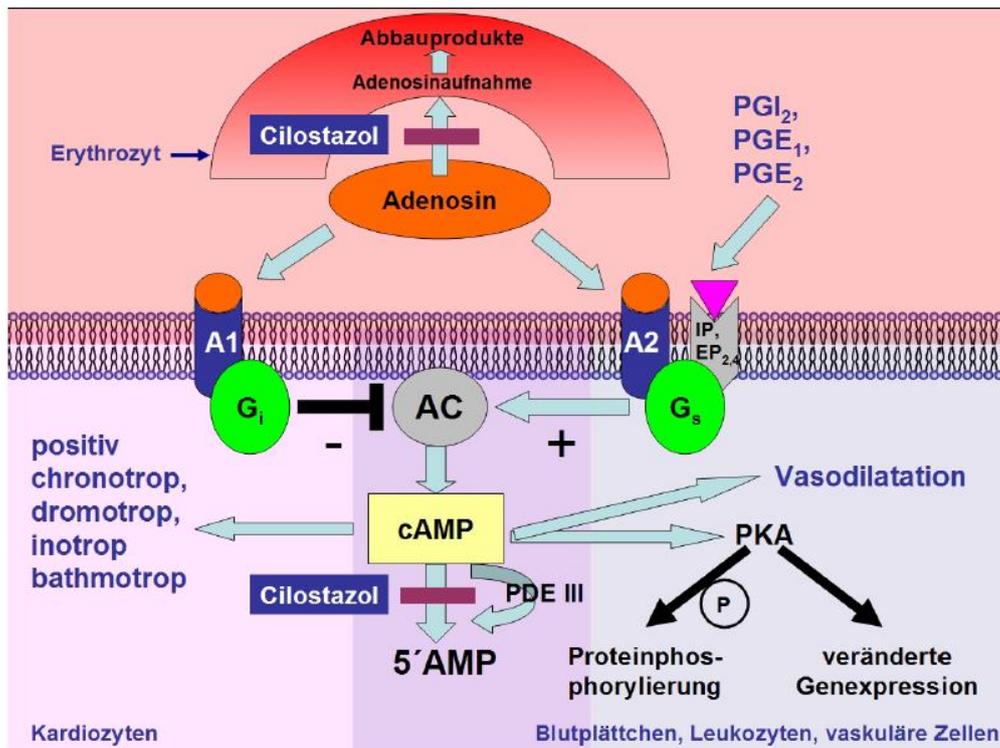


Abbildung 3: Wirkmechanismus von Cilostazol: Cilostazol hemmt die Phosphodiesterase-3 und verhindert somit den Abbau von cAMP, was zu einer Erhöhung des zellulären cAMP-Spiegels führt. Darüber hinaus hemmt Cilostazol die Aufnahme von Adenosin in Erythrozyten und verhindert auf diese Weise den Adenosin-Abbau, wodurch Adenosin in erhöhter Konzentration vorliegt. AC = Adenylatzyklase, cAMP = cyclisches Adenosin-monophosphat, A1 = Adenosinrezeptor Typ 1, A2 = Adenosinrezeptor Typ 2, PDE = Phosphodiesterase, PGI₂ = Prostazyklin, PGE = Prostaglandin E, IP = Prostazyklinrezeptor, EP = PGE-Rezeptor, PKA = Proteinkinase A

3.5.3 Pharmakokinetik

Cilostazol wird zweimal täglich in einer Dosis von je 100 mg oral 30 Minuten vor oder zwei Stunden nach der Mahlzeit eingenommen. Nach vier Tagen wird bei dieser Dosierung der steady state erreicht. Die AUC (area under the curve) verhält sich proportional zur Dosis. Die Eliminationshalbwertszeit von Cilostazol beträgt 10,5 Stunden. Die beiden Hauptmetaboliten von Cilostazol unterscheiden sich in ihrer Wirkstärke. Während Dehydro-Cilostazol 4-7 Mal stärker die Thrombozytenaggregation hemmt als die Ausgangssubstanz, wirkt 4'-trans-Hydroxy-Cilostazol nur ein Fünftel. Cilostazol wird vorwiegend an Albumin gebunden, die Proteinbindung insgesamt beträgt 95-98%. Dehydro-Cilostazol ist zu 97,4% gebunden, 4'-trans-Hydroxy-Cilostazol zu 66%. Über den Cytochrom P-450-Metabolismus durch die Isoenzyme CYP3A4 sowie zu geringeren Anteilen CYP2C19 wird Cilostazol verstoffwechselt und anschließend zum größten Teil renal über den Urin (74%) ausgeschieden. Die restliche Ausscheidung erfolgt über die Faeces. Bei Patienten mit Nieren- oder Leberinsuffizienz wird eine Dosisanpassung empfohlen. Bei einer Kreatininclearance von ≤ 25 ml/min ist Cilostazol kontraindiziert [93].

3.5.4 Anwendung und Indikation

Die Zulassung von Cilostazol basiert auf insgesamt acht multizentrischen randomisierten kontrollierten Studien mit insgesamt 2702 Patienten. Die primären Endpunkte maximale und schmerzfreie Gehstrecke wurden durch unterschiedliche Laufbandtechniken ermittelt. In den verschiedenen Studien wurde Cilostazol in unterschiedlicher Dosis verabreicht, teilweise kombiniert mit Pentoxifyllin, und mit einer Placebo-Gruppe verglichen [27]. Die Studienergebnisse zeigten eindeutig, dass die Einnahme von Cilostazol die schmerzfreie und maximale Gehstrecke verlängert. In einzelnen Fragebögen wie dem WIQ (Walking Impairment Questionnaire) zeigte sich eine Verbesserung der Lebensqualität der Patienten. In sechs von acht Studien konnte eine Verlängerung der Gehstrecke um 44-50% abhängig von der Dosis von Cilostazol gezeigt werden, während die Gehstrecke unter Pentoxifyllin um nur 38% und unter Placebo um nur 21% gesteigert werden konnte [100]. Darüber hinaus wurde in einer Metaanalyse von Regensteiner et al. eine Korrelation zwischen verlängerter Gehstrecke und verbesserter Lebensqualität nachgewiesen [83]. Des Weiteren konnte für Cilostazol eine Dosisabhängigkeit in zwei weiteren klinischen Studien gezeigt werden. Beebe et al. verglichen eine Gruppe mit insgesamt 200 mg Cilostazol täglich mit einer Gruppe mit 100 mg Cilostazol pro Tag. Während unter der höheren Dosis eine Gehstreckenverlängerung um 51% festgestellt wurde, war es unter der geringeren Dosis lediglich eine Verlängerung um 38% [9]. Vergleichbare Ergebnisse zeigte die Studie von Strandness et al., in der unter 200 mg Cilostazol eine Verbesserung der Gehstrecke um 21% erreicht wurde, unter 100 mg Cilostazol eine Verbesserung um 7% [97]. Da in den USA zur Therapie der Claudicatio intermittens bis zu diesem Zeitpunkt Pentoxifyllin verwendet wurde, wurden zwei weitere Studien zum Wirksamkeitsvergleich von Pentoxifyllin gegenüber Cilostazol und Placebo durchgeführt. In der ersten Studie konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. In der zweiten und größeren Studie wurde dann eine Verbesserung der Gehstrecke unter 200 mg Cilostazol pro Tag von 54% im Vergleich zu einer Verbesserung um 30% unter 1200 mg Pentoxifyllin pro Tag entdeckt, wodurch ein signifikanter Unterschied nachgewiesen war [27]. Da Patienten mit pAVK auch ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko haben und daher teilweise mit Thrombozytenaggregationshemmern wie Aspirin und Clopidogrel behandelt werden, könnte möglicherweise ein synergistischer Effekt zwischen Cilostazol und Aspirin bzw. Clopidogrel bestehen. So wurde in Japan eine große placebokontrollierte Studie, die CSPS Studie (Cilostazol Stroke Prevention Study), durchgeführt mit dem primären Endpunkt eines zweiten Schlaganfalls. Dieser war unter Cilostazol im Vergleich zu Placebo um 41,5% vermindert, weshalb Cilostazol in Japan auch zur Sekundärprävention cerebraler Ereignisse zugelassen wurde [39].

3.5.5 Nebenwirkungen

Da bereits andere Phosphodiesterase-3-Hemmer wie Milrinon bei Herzinsuffizienzpatienten im Stadium NYHA III-IV die Mortalität um 34% steigerten, wurde Cilostazol in einer Langzeitstudie über drei Jahre mit dem Endpunkt Mortalität untersucht (CASTLE-Studie) [42, 78]. Hierbei zeigte sich, dass Cilostazol auf die Mortalität keinen Einfluss hat. Zur Untersuchung der Blutungszeit durch die Thrombozytenaggregationshemmer Cilostazol, Aspirin und Clopidogrel wurde eine weitere Studie durchgeführt [107]. Die Blutungszeit war weder unter Monotherapie mit Cilostazol noch unter einer Zweierkombination von Cilostazol und Aspirin bzw. Cilostazol und Clopidogrel signifikant verlängert. Lediglich die Kombination aller drei Medikamente verlängerte im Vergleich zur Zweierkombination aus Aspirin und Clopidogrel die Blutungszeit signifikant. Daher ist eine Therapie mit mehreren Plättchenhemmern möglich, sollte aber engmaschiger überwacht werden. Darüber beeinflusst Cilostazol als Inhibitor von CYP3A4 und CYP2C19 in höheren Dosen als die Standardtherapiedosen den Stoffwechsel. Daher ist eine gleichzeitige Einnahme von Inhibitoren dieser Enzyme kontraindiziert. Die häufigsten Nebenwirkungen von Cilostazol waren Stuhlveränderungen, Kopfschmerzen und Diarrhö [93].

	Häufig	Sehr häufig	Schwerwiegend
Gastrointestinaltrakt	Übelkeit, Erbrechen, Flatulenz	Diarrhö, Stuhlveränderungen	
ZNS	Schwindel	Kopfschmerzen	Paresen
HNO	Rhinitis, Pharyngitis		
Haut	Juckreiz, Hautausschlag		Toxische epidermale Nekrolyse (Lyell- Syndrom)
Herz/Gefäße	Tachykardien, Palpitationen, Arrhythmien, Angina pectoris, ventrikuläre Extrasystolen		Blutbildungsstörungen
Sonstige	Ödeme facial und peripher		
Allgemein	Asthenie, Abdominalschmerzen, Brustschmerzen		

Tabelle 1: Nebenwirkungen von Cilostazol

3.6 Ischämie

Es wurden bereits verschiedene Ischämie Modelle der Maus an der unteren Extremität entwickelt [6, 79, 98]. Diese Modelle wurden vor allem zur Untersuchung der Reperfusion und Gefäßneubildung der unteren Extremität nach Induktion der Ischämie angewandt. Die Frakturheilung wurde bis dato nicht untersucht.

2018 wurde ein Ischämie Modell zur standardisierten Induktion von Gangränen an der unteren Extremität von Parikh et al [79] entwickelt. In dieser Studie wurde die Arteria femoralis in Höhe des Ligamentum inguinale nach dem Abgang der Arteria iliaca interna ligiert. In der Folge kam es reproduzierbar zu einer Gangränbildung an der distalen unteren Extremität.

Tang et al [98] induzierten eine Ischämie durch Resektion der Arteria femoralis zwischen den beiden Ligaturen, die sich direkt distal des Leistenbandes und an der poplitealen Bifurkation befanden. Hierunter zeigten sich postoperativ Nekrosen der unteren Extremität sowie Wundheilungsstörungen.

Um ein geeignetes Ischämie Modell für unsere Studie auszuwählen, haben wir in einer Vorstudie zwei verschiedene Ischämie Modelle untersucht. In Anlehnung an die Studie von Tang et al [98] wurde eine „schwere“ Ischämie durch Resektion der Arteria femoralis distal des Ligamentum inguinale induziert. In der Vergleichsgruppe wurde eine „milde“ Ischämie durch Ligatur der Arteria profunda femoris direkt nach ihrem Abgang aus der Arteria femoralis erzeugt. Das Versorgungsgebiet der Arteria profunda femoris umfasst hauptsächlich den Femurschaft sowie die mediale Muskulatur des Oberschenkels. Die Ausbildung von Kollateralgefäßen nach Ligatur der Arteria profunda femoris ist im Vergleich zu anderen Oberschenkelarterien sehr gering [6]. Postoperativ waren bei der „schweren“ Ischämie vermehrt Wundheilungsstörungen, periphere Nekrosen sowie ein unphysiologisches Gangbild auffällig. Diese Komplikationen konnten bei der „milden“ Ischämie nicht beobachtet werden. Aufgrund dieser Ergebnisse und der bereits vorliegenden Studien entschieden wir uns für die Induktion einer milden Ischämie durch abgangsnahe Ligatur der Arteria profunda femoris.

3.7 Zielsetzung

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, inwieweit die Behandlung mit Cilostazol die Frakturheilung im murinen Ischämie Modell beeinflusst.

3.8 Fragestellung

Die Nullhypothese lautet:

„Die Frakturheilung wird durch Gabe von Cilostazol unter Ischämiebedingungen nicht beeinflusst.“

4 Material und Methoden

4.1 Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die Methoden, die zur Durchführung dieser Arbeit angewandt wurden, beschrieben.

4.1.1 Studiendesign

Die Tierversuche mit der Versuch-Nummer 24/2014 wurden von der Behörde (Landesamt für Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittel- und Veterinärwesen – Zentralstelle –, Konrad-Zuse-Straße 11, 66115 Saarbrücken) genehmigt und nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes am Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Insgesamt wurden für diese Studie 49 Mäuse untersucht. Davon erhielten 25 Tieren täglich Cilostazol per os (p.o.) mit einer Dosierung von 5mg/kg KG und die Kontrollgruppe mit 24 Tieren erhielt täglich eine äquivalente Menge isotone Natriumchloridlösung p.o.. Zwei bzw. fünf Wochen postoperativ (nach Osteosynthese und Ischämie) wurden die Knochen biomechanisch, radiologisch, histomorphometrisch und proteinbiochemisch untersucht (Tabelle 2).

	Cilostazol		Kontrolle	
	2 Wochen	5 Wochen	2 Wochen	5 Wochen
Biomechanik	n = 9	n = 11	n = 8	n = 11
Radiologie	n = 9	n = 11	n = 8	n = 11
Histomorphometrie	n = 9	n = 11	n = 8	n = 11
Western Blot	n = 5	Ø	n = 5	Ø

Tabelle 2: Anzahl der Tiere in den Auswertungsgruppen

4.1.2 Tiermodell

Zur Durchführung der Studie wurden ausgewachsene CD-1 Mäuse mit einem mittleren Gewicht von $33,6 \pm 0,7$ g (Cilostazolgruppe: $34,8 \pm 1,1$ g; Kontrollgruppe $32,3 \pm 0,8$ g) benutzt. Die Tierhaltung erfolgte im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar unter klimatisierten Raumbedingungen (relative Luftfeuchte 60%, Lufttemperatur 22°C bis 24°C) bei 12-stündigem Tag-/Nacht-Rhythmus. Standardfutter (Altromin 1320, Altromin, Lage, Deutschland) in Pelletform sowie Wasser nach individuellem Bedarf wurden bereitgestellt.

Zur Osteosynthese wurde eine intramedulläre Zugschraube aus medizinischem Stahl mit einer Länge von 17,2 mm und einem Durchmesser von 0,5 mm verwendet (MouseScrew™, RISystem AG, Davos, Schweiz) (Abb. 4) [55]. Die Kompression des Frakturspalts erfolgt durch den distalen Konus (Durchmesser 0,8 mm) und das proximale Gewinde (Durchmesser 0,5 mm, Länge 4 mm).

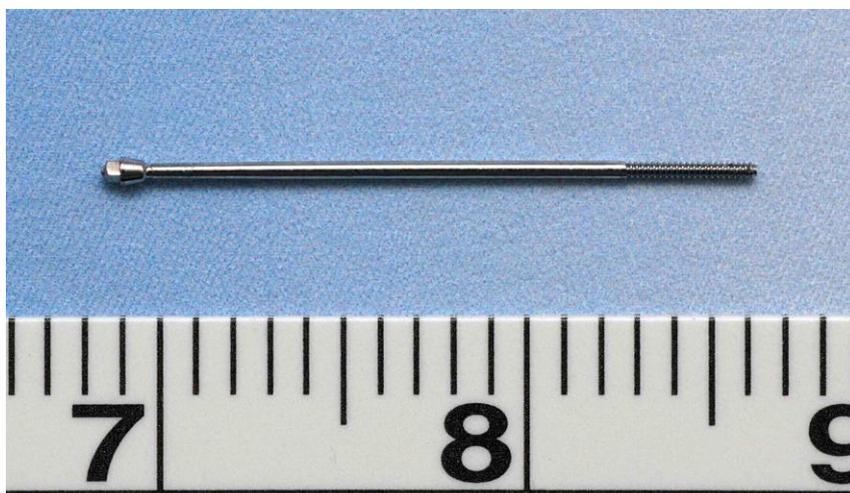


Abbildung 4: MouseScrew™ – Länge 17,2 mm – Durchmesser 0,5 mm

4.1.3 Operationsverfahren

Die Durchführung der Versuche erfolgte in standardisierter Technik im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes.

Die Narkose der Mäuse erfolgte durch eine intraperitoneale Applikation von 75 mg/kg KG Ketamin (Ursostamin® 100 mg – Serumwerke Bernburg, Bernburg, Deutschland) und 15 mg/kg KG Xylazin (Rompun® 2% - Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland). Auf die Hornhaut wurde zum Schutz vor einer Austrocknung Dexpanthenol-Salbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe) aufgetragen. Die Entfernung der Haare am rechten Bein wurde mittels Trockenrasur und Enthaarungsmittel (elca-med® - ASID BONZ GmbH, Herrenberg, Deutschland) durchgeführt.

Das rechte Bein wurde während der Operation mit Hilfe der linken Hand fixiert. Nach ausreichender Hautdesinfektion mit Softasept® N (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurde die Haut mit einer Skalpellklinge (Carbon Steel Skalpellklingen #15 – Braun Aesculap AG & Co KG, Tuttlingen, Deutschland) medial der Patella mit einem 6 mm langen Hautschnitt in Verlaufsrichtung der Arteria femoralis eröffnet. Nach Aufsuchen des Gefäß-Nervenbündels des rechten Beines wurde die Arteria femoralis distal des Leistenbandes von der Vena femoralis und dem Nervus femoralis mit einer stumpfen Sonde separiert. Die Ischämie wurde nun durch eine doppelte Ligatur der Arteria profunda femoris induziert (Abb. 5) [98, 112]. Danach erfolgte die Eröffnung der Kniegelenkkapsel, wodurch die Patella mit einem Wattetupfer sanft mobilisiert und nach lateral luxiert werden konnte zur Darstellung der Femurkondylen (Abb. 6, 7). Der Markraum wurde über der Fossa intercondylaris mittels 24 G Spritzkanüle (BD Microlance 3™ – 24 G 1“ – Nr. 17, Ø 0,55 x 25 mm – BD Drogheda, Ireland) (Abb. 8) eröffnet. Der Trochanter major wurde von dieser Kanüle über den Markraum retrograd durchbohrt. Mit einer 27 G Dental-Anästhesiekanüle (Sterican® Einmalkanüle für die Dental-Anästhesie – O./U.-Kiefer, Leitungsanästhesie – Größe 30/42- G 27 x 1½“ / Ø 0,40 x 40 mm, Braun, Melsungen, Deutschland) wird die Haut retrograd über den Markraum durchstoßen (Abb. 9). Nach Einführen eines Wolfram-Drahtes (Ø 0,2 mm, Goodfellow Cambridge Limited, Huntingdon, England) in diese Kanüle wurde die Kanüle entfernt, während der eingebrachte Draht im Markraum verblieb, dass er sowohl am Rücken als auch interkondylär etwa 1 cm zu sehen war (Abb. 10). Danach wurde das Femur mittels stumpfer Guillotine mit definiertem Gewicht geschlossen frakturiert (Typ A2 bis A3 nach AO-Klassifikation [71]). Die Implantation der MouseScrew™ [55] erfolgte über den bereits eingeführten Draht mit Hilfe eines Schraubendrehers (Abb. 11). Als sich der Konus im Bohrloch interkondylär verhakte und das proximale Schraubenende interkondylär regelrecht verankert war, brach die Schraube an der Sollbruchstelle ab (Abb. 12). Nachdem die Patella reponiert und die Gelenkkapsel mittels 5-0 Prolene®-Faden (Ethicon Inc., Somerville, USA) verschlossen wurde, erfolgte die Hautnaht ebenfalls mit einem 5-0 Prolene®-Faden (Abb. 13). Die Operationsschritte wurden intraoperativ radiologisch kontrolliert. (Abb. 14-16).

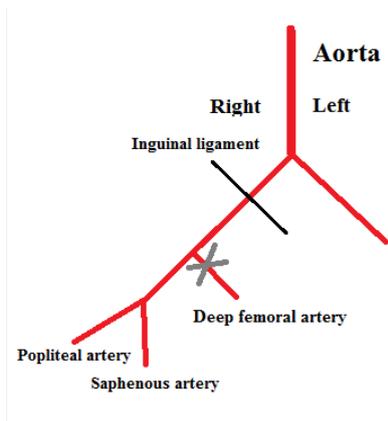


Abbildung 5: Milde Ischämie durch Ligatur der Arteria profunda femoris



Abbildung 6: Darstellung der Patellarsehne nach Ligatur



Abbildung 7: Lateral luxierte Patella, Sicht auf die Kondylen



Abbildung 8: Eröffnung des Markraums

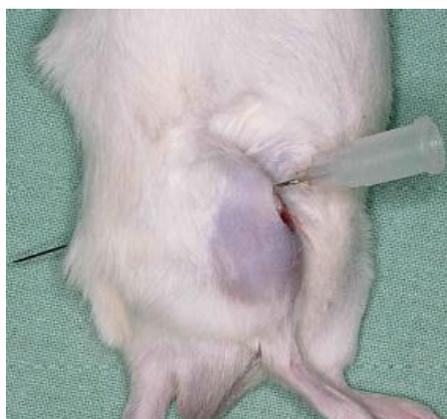


Abbildung 9: Führungskanüle



Abbildung 10: Führungsdraht



Abbildung 11: Implantation
MouseScrew™



Abbildung 12: Implantierte
MouseScrew™



Abbildung 13: Hautnaht



Abbildung 14: Röntgenkontrolle
Führungsdraht



Abbildung 15: Röntgenkontrolle
intraoperativ nach Fraktur



Abbildung 16: Röntgenkontrolle
postoperativ

4.1.4 Medikamentenapplikation

Den Mäusen wurde postoperativ täglich über zwei beziehungsweise fünf Wochen 5mg/kg KG Cilostazol p.o. (Cilostazol® 100mg – STADA, Bad Vilbel, Deutschland) zugeführt. Den Kontrolltieren wurde eine äquivalente Menge isotone Natriumchlorid-Lösung (Isotone Kochsalz-Lösung 0,9%, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) p.o. gegeben.

4.1.5 Tötung der Tiere

Die Mäuse wurden nach zwei beziehungsweise fünf Wochen nochmals narkotisiert gelegt und das rechte Femur wurde geröntgt (Abb. 17). Anschließend erfolgte in Narkose die Tötung der Tiere durch Genickbruch zum Ausbau der Femora.



Abbildung 17: Röntgenbild 2 Wochen postoperativ

4.1.6 Präparation der Knochen

Zur Auswertung wurden beide Femora explantiert. Nach Eröffnung der Haut über dem Tibiaplateau in Verlaufsrichtung des Femurs wurde die Patellarsehne mit einem Skalpell durchtrennt und die angrenzende Muskulatur scharf vom Knochen bis zum Becken abpräpariert. Zur Exartikulation des

Femurs wurde die Hüftkapsel eröffnet. Danach erfolgte die abschließende Resektion der übrigen Weichteile vom Knochen (Abb. 18). Daraufhin wurde die Schraube vorsichtig mit einem entsprechenden Entfernungsinstrument entfernt. Währenddessen wurde der Knochen dauerhaft mit isotoner Kochsalzlösung befeuchtet und nach abgeschlossener Präparation mit einer feuchten Kompresse umschlossen. Bis zur späteren Verarbeitung wurden die Knochen bei -80 °C eingefroren.



Abbildung 18: Explantierter Knochen

4.2 Zielkriterien und Auswertung

4.2.1 Radiologie

2 und 5 Wochen postoperativ wurden von beiden Femora Röntgenbilder im anterior-posterioren Strahlengang angefertigt (Spannung 26kV, Belichtungszeit 10 s) (MX-20 – Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, IL, USA; Faxitron Sr 1.4.1 – Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, IL, USA) (Abb. 19). Es erfolgte eine radiologische Auswertung anhand des Goldberg-Score unter der Verwendung eines Punktesystems, das die knöcherne Überbauung des Frakturspaltes beurteilt (Tab. 3) [38].

Score	Bedeutung
0	Ausbleibende knöcherne Überbauung
1	Partielle knöcherne Überbauung
2	Vollständige knöcherne Überbauung

Tabelle 3: Goldberg-Score

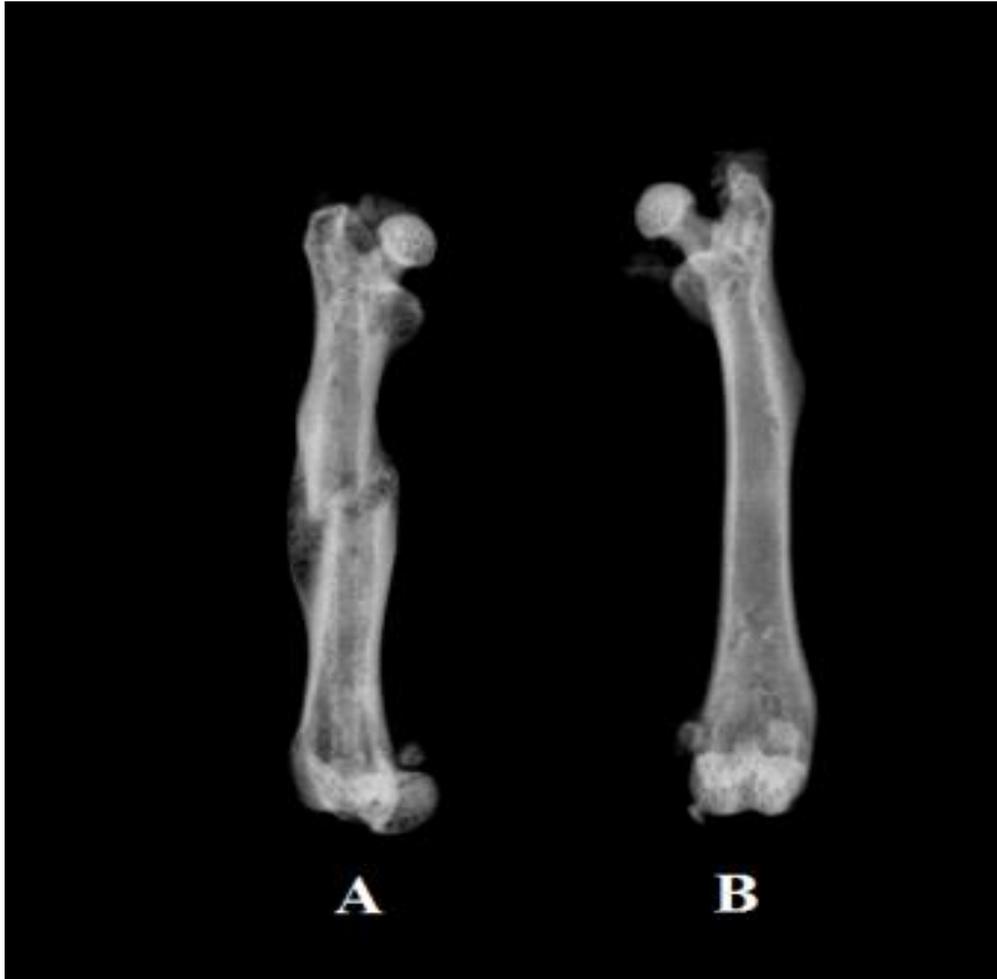


Abbildung 19: Röntgenbild zur radiologischen Auswertung
frakturierter Knochen (A) kontralateraler gesunder Knochen (B)

4.2.2 Computertomographie

Die rechten Femora wurden 2 und 5 Wochen postoperativ mittels Computertomographie mit einer Schichtdicke von 7,5 μm (Skyscan 1172, Bruker, Billerica, MA, USA) gescannt (Röhrenspannung: 50kV; Stromstärke: 200 μA ; Intervalle: 0,4°; Expositionszeit: 2400ms; filter: 0,5mm Aluminium). Die Bilder wurden in dreidimensionalen Arrays gespeichert. Die „Region of interest“ (ROI) entspricht dem Kallus. Um Weichgewebe von Knochen unterscheiden zu können, wurden entsprechende Schwellenwerte definiert (CTAnalyser, Bruker, Billerica, MA, USA). Nach Abschluss dieser Prozedur konnten folgende Parameter des Kallus ausgewertet werden:

- Knöchernes Gesamtvolumen [mm^3] (Bone Volume, BV)
- Gesamtkallusvolumen [mm^3] (Tissue Volume, TV)
- Anteil des Knochenvolumens am Gesamtkallusvolumen [%] (BV/TV)
- Trabekeldicke [mm] (Trabecular thickness, TbTh)
- Trabekelabstand [mm] (Trabecular separation, TbSp)
- Trabekelanzahl [1/mm] (Trabecular number, TbN)

4.2.3 Biomechanik

Nach abgeschlossener Präparation der Femora wurden die Implantate vollständig entfernt. Mittels 3-Punkt-Biegetestung wurde die Biegesteifigkeit des Kallus [N/mm] zerstörungsfrei bestimmt (Mini-Zwick Z 2.5 – Zwick GmbH, Ulm, Deutschland). Als interne Kontrolle diente das gesunde Femur. Somit wurde die Biegesteifigkeit des frakturierten Knochens sowohl absolut als auch relativ in Prozent im Verhältnis zum gesunden Knochen angegeben. Zur Einhaltung der Standardisierung der Versuchsergebnisse wurden die Femora mit der ventralen Seite nach unten in die Prüfvorrichtung positioniert bei einem Stempelabstand von 6 mm. Die Messung erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/min. Im linearen Anteil des Kraft-Weg-Diagramms wurde die Biegesteifigkeit ermittelt (Abb. 20).

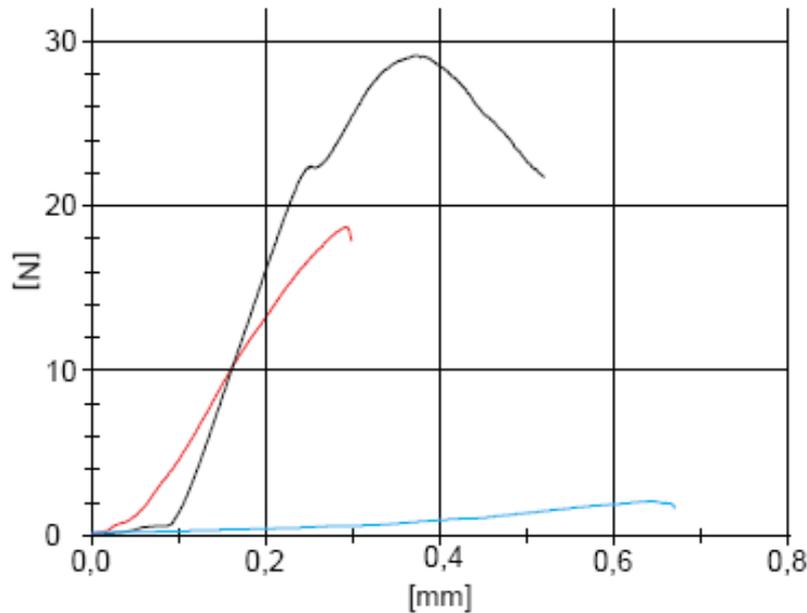


Abbildung 20: Kraft-Weg-Diagramm: kontralaterales, gesundes Femur (schwarz), Cilostazol 5 Wochen postoperativ (rot) und 2 Wochen postoperativ (blau)

4.2.4 Histologie

Zur Analyse der Gewebezusammensetzung und quantitativen Messung der Kallusfläche wurden die Knochen nach der biomechanischen Testung 12 bis 24 Stunden in Zink-Lösung (ICH Zinc Fixative - BD Biosciences Pharmingen™, San Jose, CA, USA) fixiert. Anschließend wurden die Knochen 14 Tage in 13%iger EDTA-Lösung bei 4 °C entkalkt. Daraufhin wurden die entkalkten Knochen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 1 Stunde mit 70 %, 80 %, 90 %, sowie viermal 1 Stunde mit 100 % Alkohol) entwässert. Danach wurden die Proben dreimal für jeweils 1 Stunde mit Xylol behandelt, um das Gewebe paraffingängig zu machen. Abschließend wurden die Proben über den Zeitraum von 1 Stunde in heißem Paraffin eingebettet. Für die histologische Analyse wurden 5 µm dicke Schnitte im Bereich des größten Kallusdurchmessers in longitudinaler sagittaler Schnittführung angefertigt. Anschließend wurden die Präparate nach der Safranin O Methode nach folgendem Schema gefärbt: Zunächst wird das Präparat 10 Minuten mit Weigerts Eisenhämatoxylin zur Färbung der Kerne gefärbt, danach 15 Minuten mit Leitungswasser gespült. Zum Anfärben des Gewebes wird es nun 3 Minuten mit Lichtgrün-Golder III gefärbt und mit 1 %iger Essigsäure abgespült. Zur Färbung des Knorpels wird das Präparat nun 6 Minuten mit wässriger 1 %iger Safranin O Färbung gegengefärbt und im Anschluss nochmals mit 1 %iger Essigsäure gespült zur Differenzierung. Abschließend wird es in 96 %igem vergälltem Ethanol und Isopropanol entwässert, in Xylol geschwenkt und in xylolhaltiges Eindeckmittel eingebettet. Bei der Safranin O Färbung stellen sich die verschiedenen Gewebe folgendermaßen dar:

Gewebeart	Farbe
Knorpel	rot
Knochen	grün
Kerne	schwarz
Bindegewebe	farblos / blass rosa

Tabelle 4: Färbeverhalten bei Safranin O Färbung

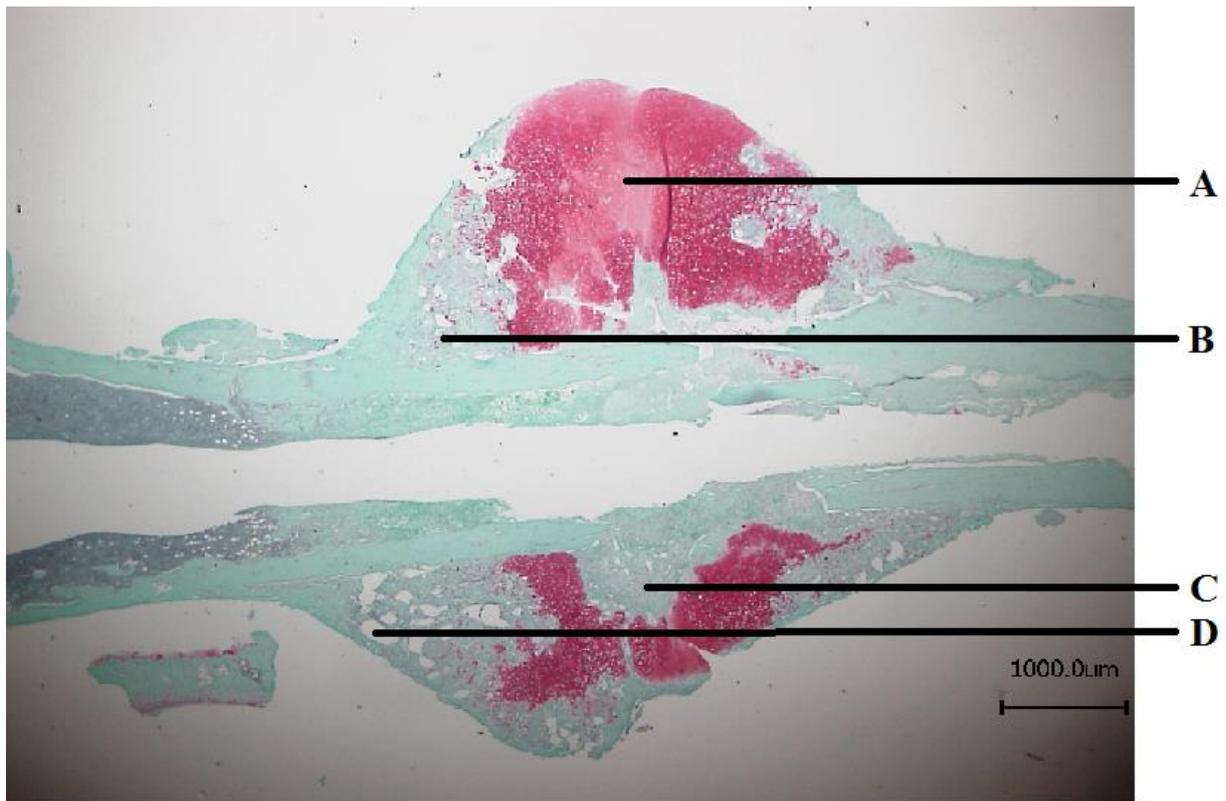


Abbildung 21: Longitudinaler sagittaler Schnitt durch das Femur (Safranin O Färbung): Knorpel (A), Bindegewebe (B), Knochen (C), Artefakte (D)

Bei 1,25 – facher Vergrößerung (Olympus BX60 Microscope – Olympus, Tokio, Japan) erfolgte die Digitalisierung (Zeiss Axio Vision 3.1 und Zeiss Axio Cam – Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) der histologischen Schnitte. Die Analyse der aufgenommenen Bilder erfolgte durch ein Bildbearbeitungsprogramm (ImageJ Analysis System, U.S. National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Folgende Parameter waren Teil der Auswertung:

- Femurdurchmesser in Höhe des Frakturspaltes [mm]
- Kallusdurchmesser in Höhe des Frakturspaltes [mm]

- periostale Kallusfläche [mm²]
- Fläche des knöchernen Anteils innerhalb des periostalen Kallus [mm²]
- Fläche des knorpeligen Anteils innerhalb des periostalen Kallus [mm²]
- Fläche des bindegewebigen Anteils innerhalb des periostalen Kallus [mm²]

Folgende Zielwerte wurden in Anlehnung an Gerstenfeld et al [37] berechnet:

- $\frac{\text{Knochenfläche innerhalb der Kallusregion (TOTAr)}}{\text{Gesamt-Kallusfläche (CAr)}} [\%]$
- $\frac{\text{Knorpelfläche innerhalb der Kallusregion (CgAr)}}{\text{Gesamt-Kallusfläche (CAr)}} [\%]$
- $\frac{\text{Bindegewebsfläche innerhalb der Kallusregion (FTAr)}}{\text{Gesamt-Kallusfläche (CAr)}} [\%]$
- $\frac{\text{Kallusdurchmesser (CDm)}}{\text{Femurdurchmesser (BDm)}}$

4.2.5 Western Blot

Nach zweiwöchiger Frakturheilung wurde die Expression verschiedener Proteine im Kallusgewebe mittels Western Blot Analyse bestimmt. Nach fünfwöchiger Frakturheilung wurde auf eine Proteinexpressionsanalyse verzichtet, da nur noch wenig Kallusgewebe vorhanden ist. Folgende Marker wurden in dieser Studie hinsichtlich ihrer Expression bestimmt: PCNA, RANKL, OPG Monomer, OPG Dimer, BMP-2, BMP-4, VEGF, CD 31, CYR 61 (Tab. 5). Zur Western Blot Analyse wurde den Tieren nach ihrer Tötung nur das frakturierte Femur explantiert. Um das Kallusgewebe zu gewinnen, wurde es vorsichtig nach Resektion des Weichteilgewebes vom übrigen Knochen abgetragen und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C bis zur Analyse konserviert. Das Kallusgewebe wurde in Lysepuffer (10 mM Tris pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA , 0,5 % Triton-X 100, 0,02 % NaN₃, 0,2 mM PMSF, und Protease Inhibitor Cocktail (1:100 v/v; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)) homogenisiert, danach 30 Minuten auf Eis inkubiert und 30 Minuten bei 16000 x g zentrifugiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Methode nach Lowry. Die gesamte Proteinprobe (10 mg Protein je Bahn) wurde diskontinuierlich auf Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel getrennt und auf Polyvinylendifluorid-Membranen übertragen. Nach Blockade der nichtspezifischen Bindungsseite wurden die Membranen für 4 Stunden mit den folgenden Antikörpern inkubiert: Rabbit Anti-Mouse BMP-2 und Rabbit Anti-Mouse BMP-4 (1:100, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland), Goat Anti-Mouse CYR 61 (1:100, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland), Mouse Anti-Mouse PCNA (1:500, Dako Cytomation, Hamburg, Germany), Mouse Anti-Mouse RANKL (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich), VEGF, CD 31. Zum Abschluss wurden sie für 90 Minuten mit corresponding horseradish peroxidase conjugated secondary Antibodies (1:5000, GE Healthcare

Amersham, Freiburg, Deutschland) inkubiert. Die Proteinexpression wurde mittels Luminol-enhanced Chemiluminescence (ECL, GE Healthcare Amersham, Freiburg, Deutschland) sichtbar gemacht. Die Signale wurden densitometrisch gemessen (Quantity one, Geldoc, BioRad, München, Deutschland) und zur Korrektur ungleicher Beladung an das α -tubulin-Signal (1:20,000, anti- α -tubulin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) angepasst.

Protein	Funktion
CD 31	Angiogenesemarker
VEGF	Angiogenesemarker
RANKL	Stimulation der Osteoklastogenese
OPG	Inhibition der Osteoklastogenese
CYR 61	Knochenformationsmarker
BMP-2	Knochenformationsmarker
BMP-4	Knochenformationsmarker

Tabelle 3: Analyierte Proteine und deren Funktion

4.3 Statistik

Die statistischen Daten wurden im gesamten Text als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Der Gruppenvergleich wurde nach Überprüfung der Varianzgleichheit (F-Test) und der Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) mittels Student's t-Test durchgeführt. Falls keine Normalverteilung vorlag, erfolgte der Gruppenvergleich mittels Mann-Whitney-U-Test. Die Statistik wurde mit Hilfe von SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc., San José, California, USA) erstellt. Signifikante Unterschiede werden bei einem festgelegten p-Wert unter 0,05 angezeigt.

5 Ergebnisse

5.1 Radiologie

Die radiologische Auswertung erfolgte mit dem Goldberg-Score. 2 Wochen postoperativ zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Der Frakturspalt war in beiden Gruppen partiell knöchern überbaut (Cilostazol-Gruppe $0,9 \pm 0,1$ versus Kontroll-Gruppe $0,8 \pm 0,1$) (Abb. 22A).

Radiologisch verheilt zeigten sich die Femora der Kontroll-Gruppe 5 Wochen postoperativ ($1,9 \pm 0,1$). Im Vergleich dazu war der Goldberg-Score in der Cilostazol-Gruppe signifikant vermindert ($1,4 \pm 0,2$) (Abb. 22B).

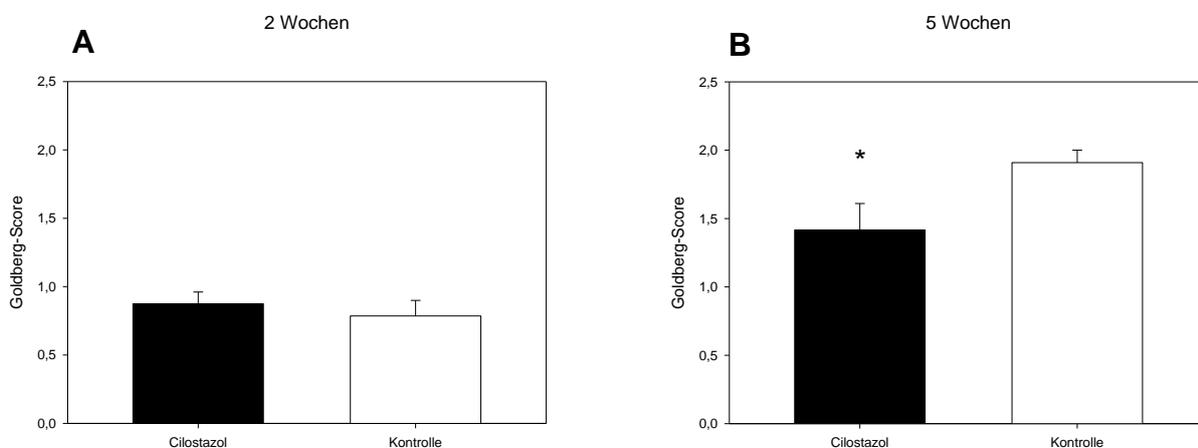


Abbildung 22: Radiologische Auswertung des Goldberg-Score: 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

5.2 Computertomographie

Die Kallusregion wurde bezüglich des Kallusvolumens, des Knochenvolumens und verschiedener Trabekelparameter 2 und 5 Wochen postoperativ analysiert.

Nach 2 Wochen konnte ein signifikant geringerer absoluter Knochenanteil innerhalb des Kallusgewebes nach Cilostazol-Gabe nachgewiesen werden ($2,56 \pm 1,10 \text{ mm}^3$ vs $4,09 \pm 1,67 \text{ mm}^3$) (Abb. 23A). Der relative Knochenanteil unterschied sich allerdings nicht zwischen den beiden Gruppen ($9,04 \pm 5,86 \%$ unter Cilostazol-Gabe vs. $14,29 \pm 9,4 \%$ in der Kontrollgruppe) (Abb. 24A). Die Trabekelanzahl war nach 2 Wochen in der Cilostazol-Gruppe mit $1,94 \pm 1,09$ pro mm erniedrigt (Kontroll-Gruppe $2,83 \pm$

1,05 pro mm) (Abb. 25A), während der Trabekelabstand mit $0,49 \pm 0,19$ mm erhöht war (Kontroll-Gruppe $0,39 \pm 0,12$ mm), jedoch unterschieden sich beide Gruppen nicht signifikant (Abb. 26A). Die Trabekeldicke war in beiden Gruppen vergleichbar (Cilostazol-Gruppe $0,06 \pm 0,05$ mm vs. Kontroll-Gruppe $0,05 \pm 0,05$ mm) (Abb. 27A).

Sowohl das absolute Knochenvolumen als auch der relative Knochenanteil am Gesamtkallus unterschieden sich 5 Wochen postoperativ nicht (Abb. 23B, 24B). Es zeigte sich in der Cilostazol-Gruppe allerdings eine signifikant geringere Trabekelanzahl ($3,51 \pm 0,82$ pro mm vs. $4,51 \pm 1,03$ pro mm) (Abb. 25B). Trabekelabstand sowie Trabekeldicke waren in beiden Gruppen nach 5 Wochen vergleichbar (Cilostazol-Gruppe $0,26 \pm 0,07$ mm und $0,09 \pm 0,02$ mm vs. Kontroll-Gruppe $0,21 \pm 0,06$ mm und $0,09 \pm 0,02$ mm) (Abb. 26B, 27B).

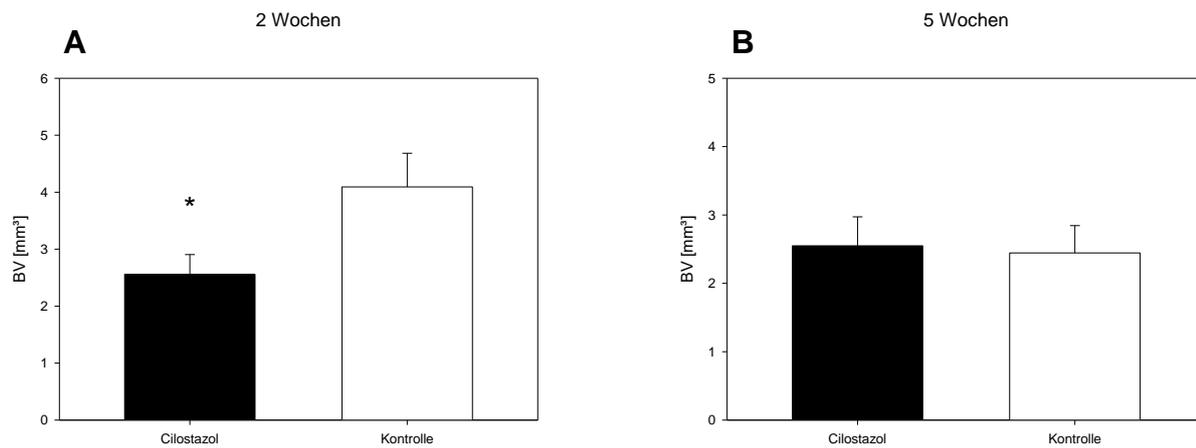


Abbildung 23: Absolutes Knochenvolumen im Kallus. 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

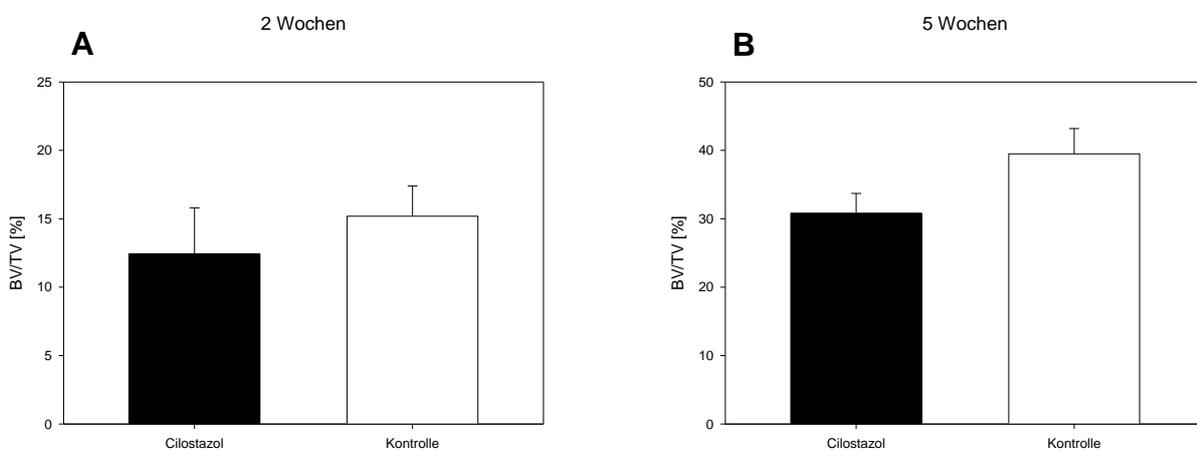


Abbildung 24: Relativer Knochenanteil am Gesamtkallus. 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM.

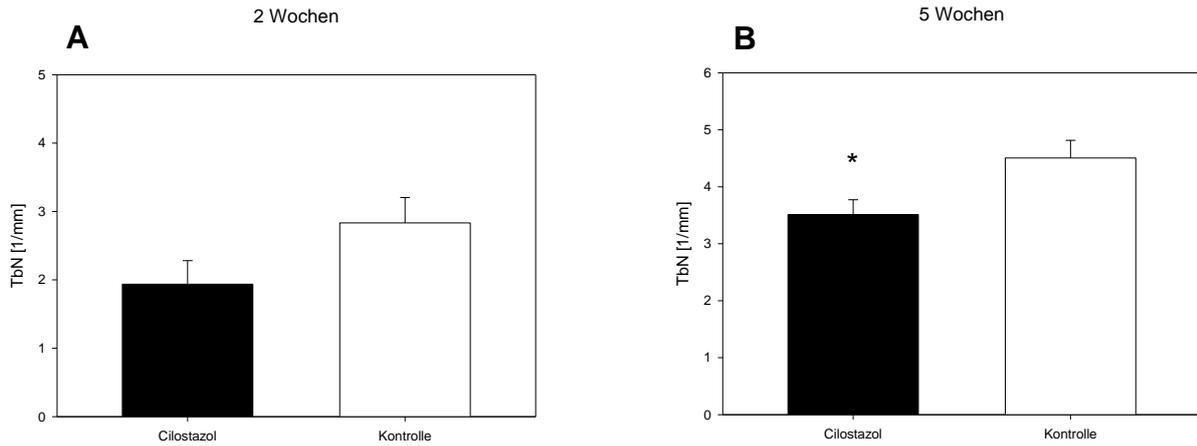


Abbildung 25: Trabekelanzahl. 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

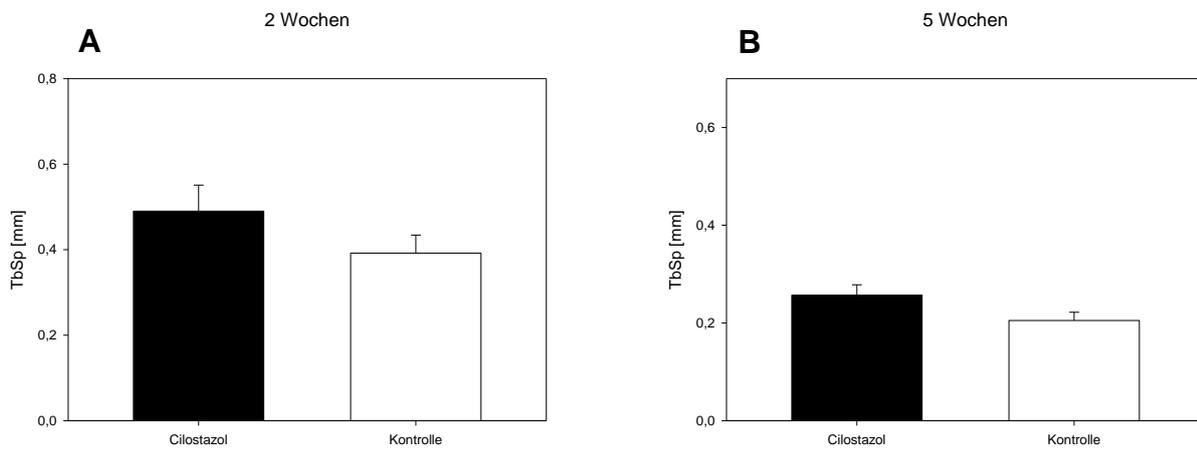


Abbildung 26: Trabekelabstand. 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM.

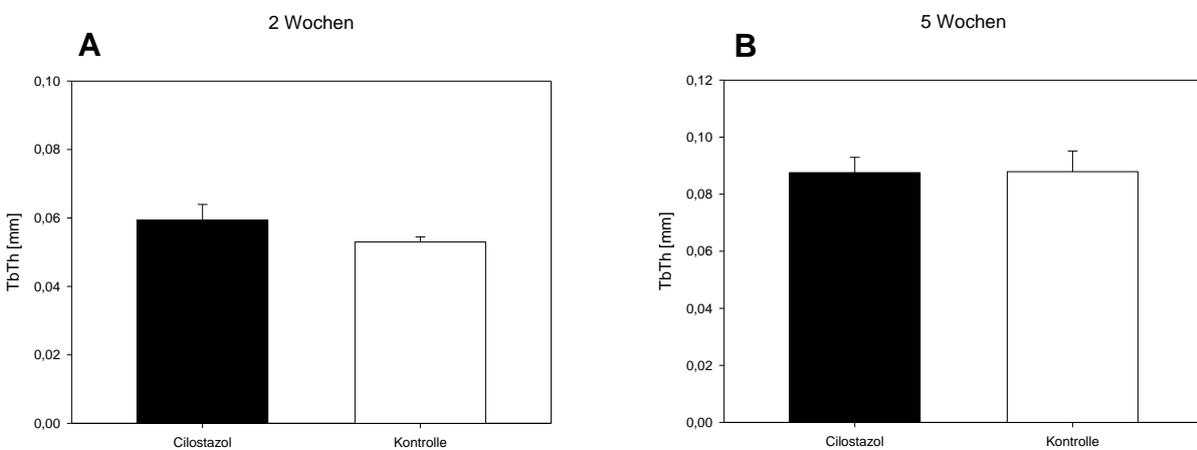


Abbildung 27: Trabekeldicke. 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM.

5.3 Biomechanik

Die Biegesteifigkeit der Femora wurde mit einer 3-Punkt-Biegung ermittelt. Dabei wurden die Ergebnisse sowohl als Absolutwerte [N/mm] als auch relativ zum gesunden kontralateralen Knochen in Prozent [%] dargestellt, um interindividuelle Unterschiede der Versuchstiere zu berücksichtigen.

In der Frühphase der Frakturheilung, 2 Wochen postoperativ, konnte eine signifikant niedrigere absolute ($3,6 \pm 0,5$ N/mm vs. Kontroll-Gruppe $8,9 \pm 1,7$ N/mm) und relative Biegesteifigkeit ($9,8 \pm 2,3$ % vs. Kontroll-Gruppe $3,2 \pm 0,4$ %) unter Therapie mit Cilostazol nachgewiesen werden (Abb. 28A, 29A).

Nach 5 Wochen Frakturheilung zeigte sich eine niedrigere Biegesteifigkeit nach Gabe von Cilostazol im Vergleich zur Kontroll-Gruppe, allerdings ohne Nachweis einer statistischen Signifikanz ($p > 0,05$). Die Cilostazol-Gruppe erreichte eine absolute Biegesteifigkeit von $77,4 \pm 15,0$ N/mm und eine relative Biegesteifigkeit von $67,0 \pm 11,7$ %. Im Vergleich dazu ergaben sich für die Kontroll-Gruppe eine absolute Biegesteifigkeit von $87,8 \pm 9,9$ N/mm und eine relative Biegesteifigkeit von $76,4 \pm 8,7$ % (Abb. 28B, 29B).

Die absolute Biegesteifigkeit der nicht frakturierten Femora unterschied sich in der Cilostazol-Gruppe mit $117,7 \pm 12,1$ N/mm im Vergleich zur Kontroll-Gruppe mit $92,4 \pm 11,6$ N/mm nach 2 Wochen nicht (Abb. 30A). Ebenso konnte kein Unterschied in der Biegesteifigkeit der beiden Gruppen nach 5 Wochen festgestellt werden (Cilostazol $116,1 \pm 9,0$ N/mm vs Kontrolle $118,2 \pm 5,7$ N/mm) (Abb. 30B).

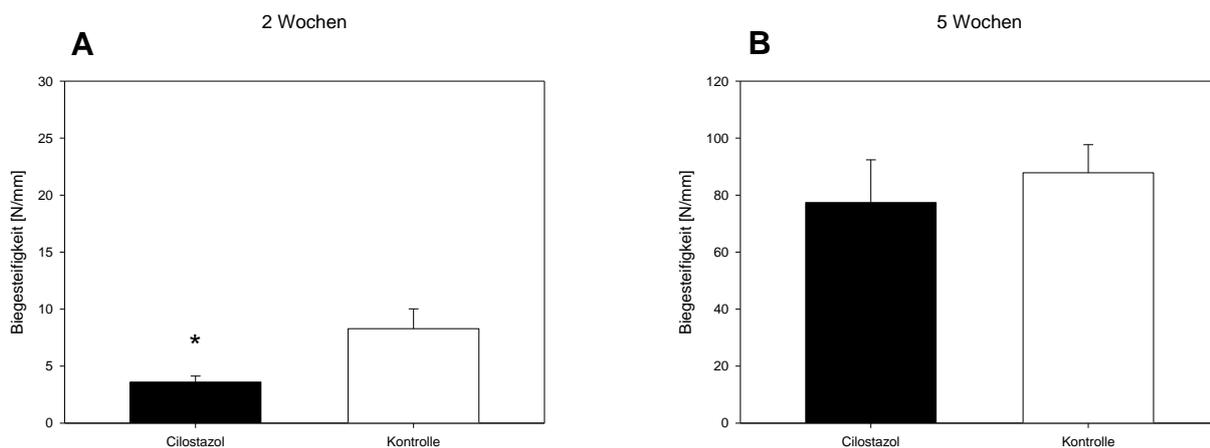


Abbildung 28: Absolute Biegesteifigkeit der frakturierten Femora. 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

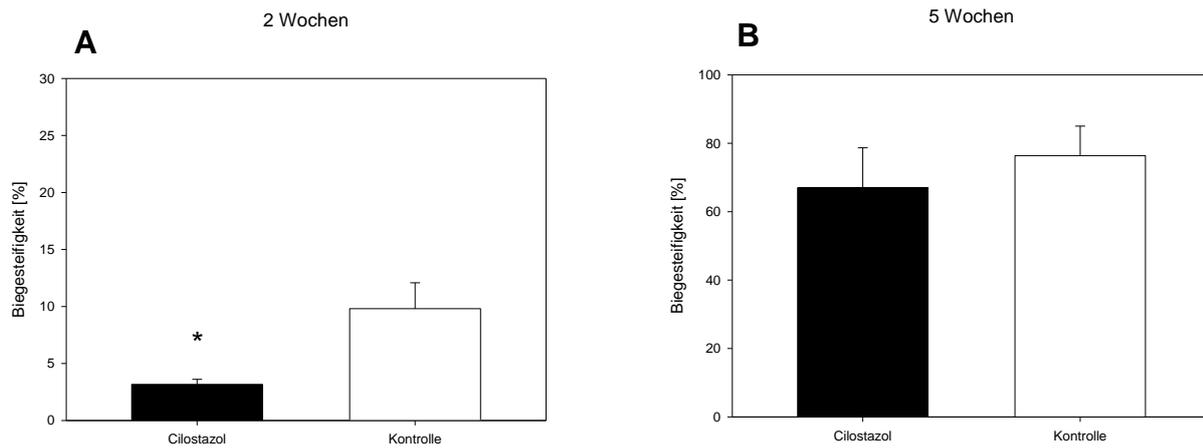


Abbildung 29: Relative Biegesteifigkeit der frakturierten Femora. 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

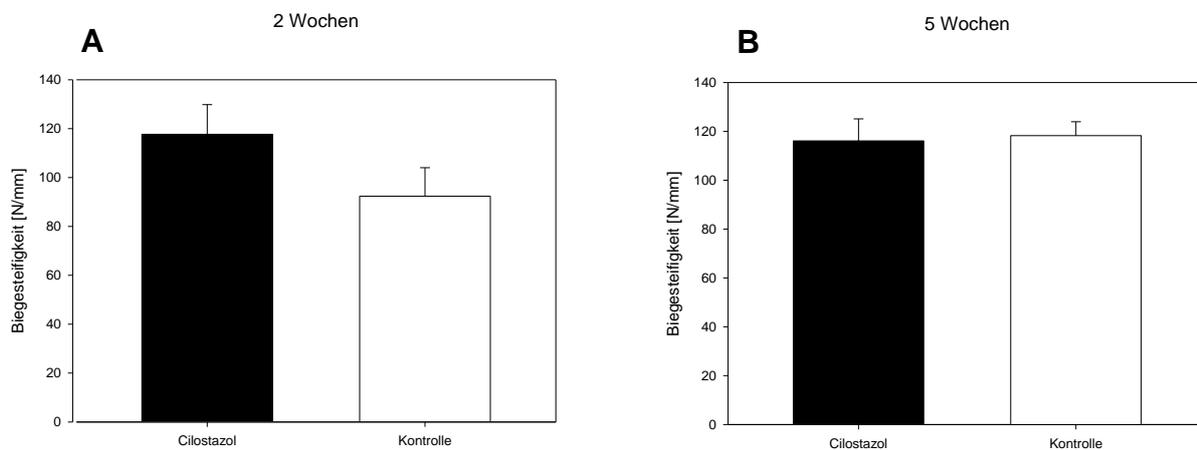


Abbildung 30: Absolute Biegesteifigkeit der unfrakturierten Femora. 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM.

5.4 Histologie

Für die histomorphometrische Analyse des Kallus wurden die Knochen im Bereich des maximalen Kallusdurchmessers untersucht. Die Gesamtkallusfläche war nach Gabe von Cilostazol geringfügig größer, jedoch unterschied sie sich sowohl nach 2 Wochen ($9,2 \pm 1,1 \text{ mm}^2$ vs. Kontroll-Gruppe $8,8 \pm 0,6 \text{ mm}^2$) als auch nach 5 Wochen ($3,9 \pm 0,5 \text{ mm}^2$ vs. Kontroll-Gruppe $3,3 \pm 0,4 \text{ mm}^2$) nicht signifikant (Abb. 31A, 31B).

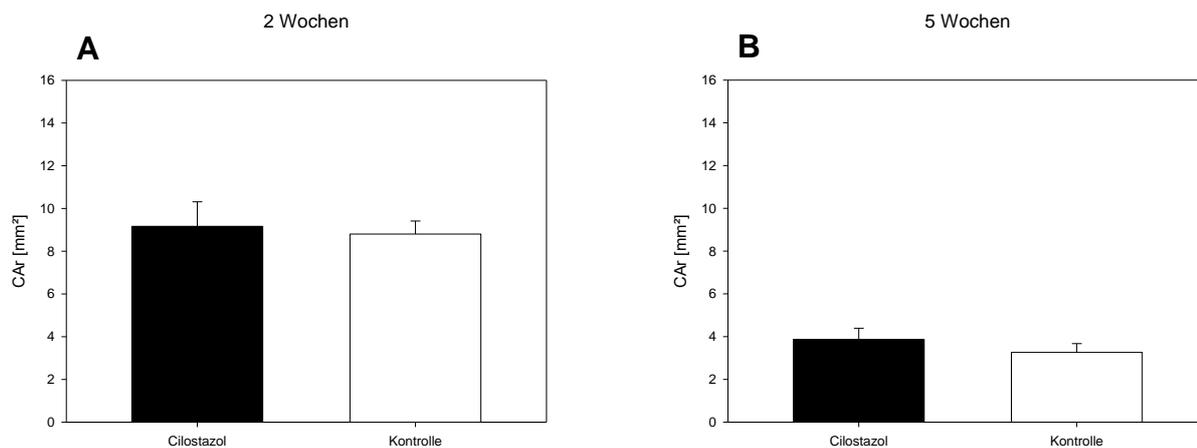


Abbildung 31: Absolute Gesamtkallusfläche. 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM.

Die Gewebeanalyse hinsichtlich des Knochen-, Knorpel- und Bindegewebsanteils unterschied sich in der frühen Phase 2 Wochen postoperativ nicht. Der Knochenanteil war in der Cilostazol-Gruppe $29,4 \pm 1,4$ %. Die Kontroll-Gruppe wies einen Knochenanteil von $34,0 \pm 2,4$ % auf (Abb. 32A). Ebenso gab es keinen Unterschied im Knorpelanteil (Cilostazol-Gruppe $54,8 \pm 1,5$ % vs. Kontroll-Gruppe $53,5 \pm 2,5$ %) (Abb. 33A) sowie im bindegewebigen Anteil (Cilostazol-Gruppe $15,8 \pm 1,7$ % vs. Kontroll-Gruppe $12,4 \pm 1,1$ %) (Abb. 34A).

Nach 5-wöchiger Frakturheilung konnten signifikante Unterschiede im Knochen- sowie Bindegewebsanteil der Gesamtkallusfläche nachgewiesen werden. Während unter Cilostazoltherapie der Knochenanteil signifikant geringer war (Cilostazol-Gruppe $73,7 \pm 3,3$ % vs. Kontroll-Gruppe $86,9 \pm 1,3$ %) (Abb. 32B), zeigte sich der Bindegewebsanteil signifikant erhöht (Cilostazol-Gruppe $21,7 \pm 2,9$ % vs. Kontroll-Gruppe $11,7 \pm 1,4$ %) (Abb. 33B). Der Knorpelanteil unterschied sich in beiden Gruppen nicht (Cilostazol-Gruppe $4,7 \pm 0,9$ % vs. Kontroll-Gruppe $1,5 \pm 0,2$ %) (Abb. 34B).

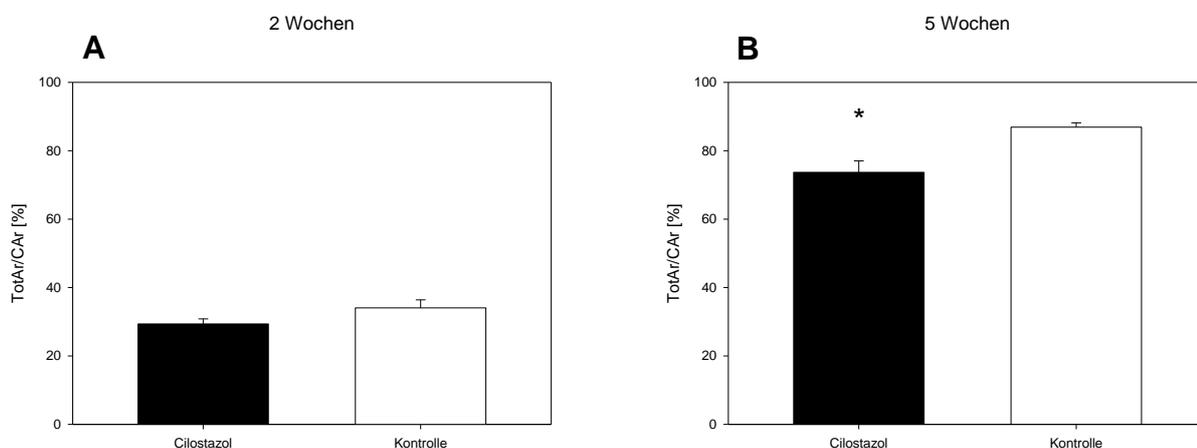


Abbildung 32: Knochenanteil im periostalen Kallus 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM. * p < 0,05 vs. Kontrolle.

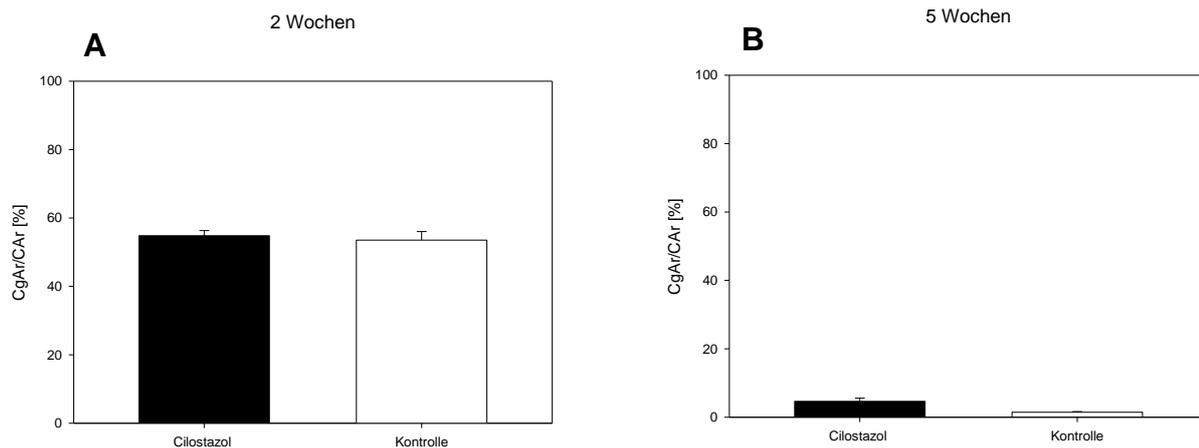


Abbildung 33: Knorpelanteil im periostalen Kallus 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM.

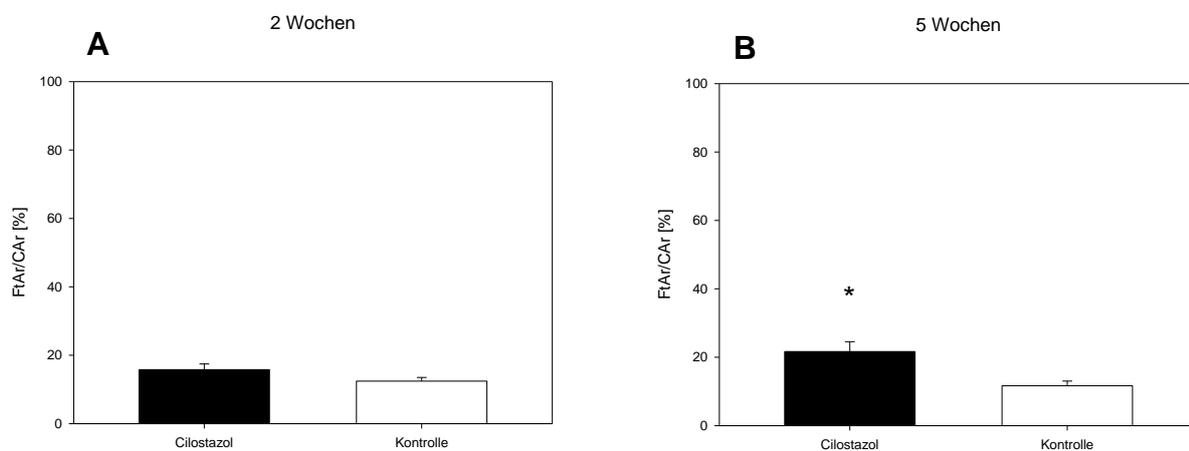


Abbildung 34: Bindegewebsanteil im periostalen Kallus 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

5.5 Western Blot

Die proteinbiochemische Analyse erfolgte 2 Wochen postoperativ.

Die Expression des angiogenen Markers CD31 (PECAM-1) war nach Gabe von Cilostazol signifikant erhöht ($2,44 \cdot 10^6 \pm 2,38 \cdot 10^5$ Targetintensitätspixel (TIP) * Korrekturfaktor (KF) vs $1,70 \cdot 10^6 \pm 7,57 \cdot 10^4$ TIP*KF) (Abb. 35).

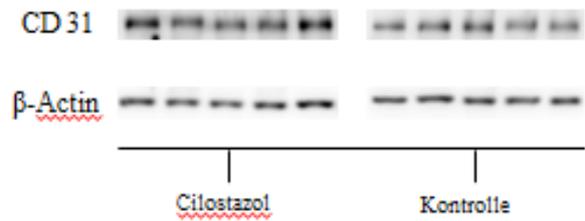
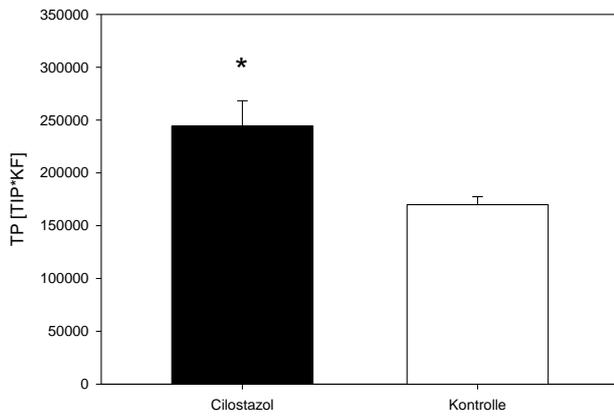


Abbildung 35: Expression von CD 31. MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Die Expression von VEGF war in der Cilostazolgruppe ebenfalls erhöht ($3,67 \cdot 10^4 \pm 7,35 \cdot 10^3$ TIP*KF) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($2,60 \cdot 10^4 \pm 5,68 \cdot 10^3$ TIP*KF), jedoch nicht signifikant. (Abb. 36).

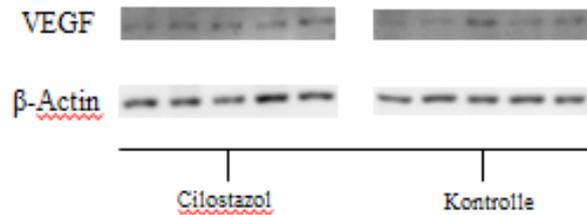
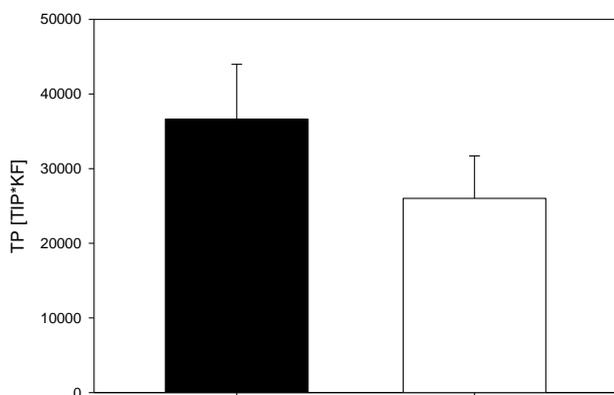


Abbildung 36: Expression von VEGF. MW \pm SEM.

Die Expression von RANKL war im Sinne einer erhöhten Osteoklastogenese in der Cilostazol-Gruppe signifikant erhöht ($2,37 \cdot 10^6 \pm 5,26 \cdot 10^4$ TIP*KF) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($5,21 \cdot 10^4 \pm 8,84 \cdot 10^3$ TIP*KF) (Abb. 37).

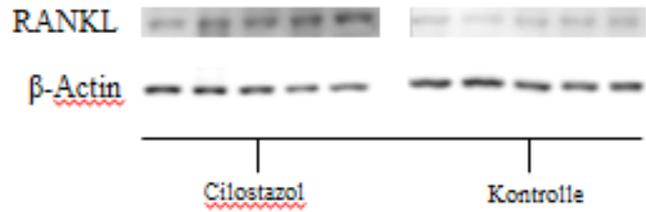
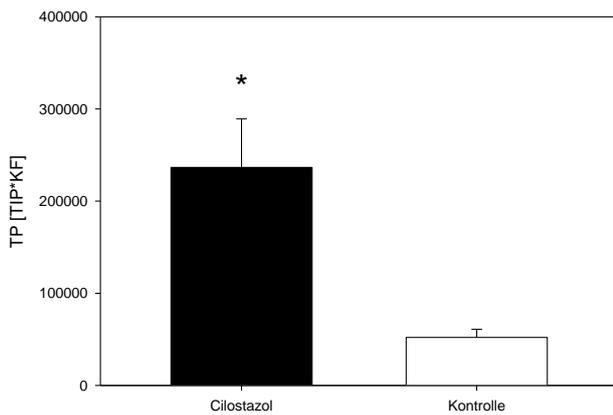


Abbildung 37: Expression von RANKL. MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Die Expression von OPG unterschied sich nicht signifikant (Cilostazol $1,14 \cdot 10^4 \pm 2,83 \cdot 10^3$ TIP*KF vs Kontrolle $6,34 \cdot 10^3 \pm 7,29 \cdot 10^2$ TIP*KF) (Abb. 38).

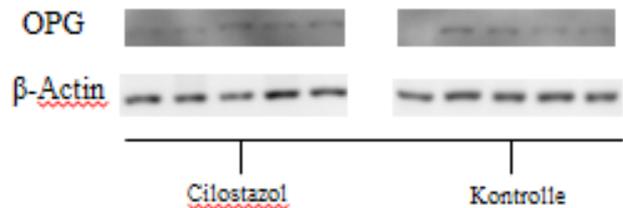
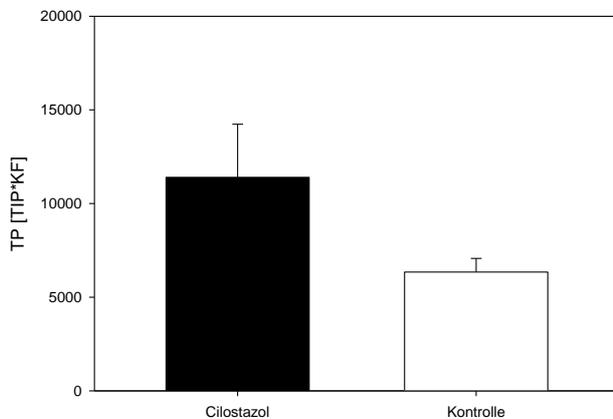


Abbildung 38: Expression von OPG. MW \pm SEM.

Die Knochenformationsmarker CYR-61 (Cilostazol $3,61 \cdot 10^4 \pm 3,35 \cdot 10^3$ TIP*KF vs Kontrolle $2,73 \cdot 10^4 \pm 4,92 \cdot 10^3$ TIP*KF), BMP-2 (Cilostazol $2,42 \cdot 10^6 \pm 1,12 \cdot 10^5$ TIP*KF vs Kontrolle $2,83 \cdot 10^4 \pm 3,78 \cdot 10^3$ TIP*KF) und BMP-4 (Cilostazol $4,63 \cdot 10^4 \pm 1,74 \cdot 10^4$ TIP*KF vs Kontrolle $2,12 \cdot 10^4 \pm 4,41 \cdot 10^3$ TIP*KF) waren zwar erhöht, aber es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p > 0,05$) (Abb. 39, 40, 41).

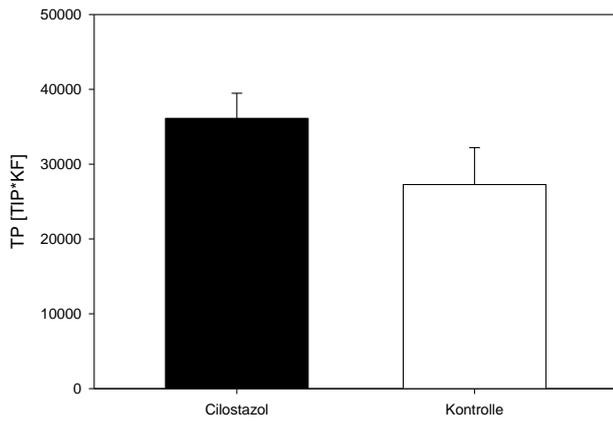
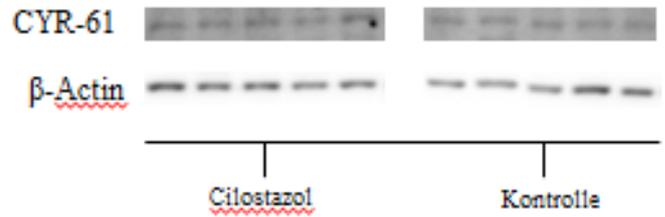


Abbildung 39: Expression von CYR-61. MW \pm SEM.



BMP-2

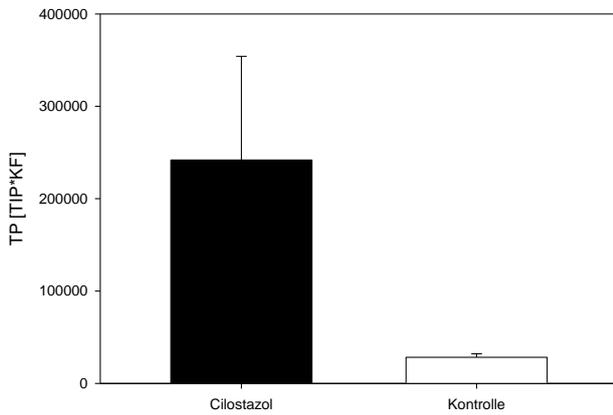
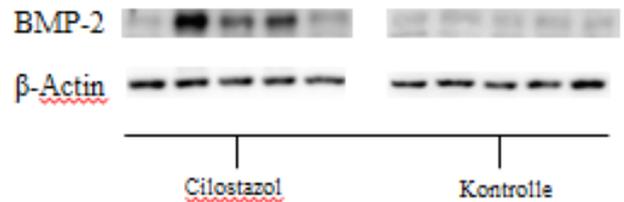


Abbildung 40: Expression von BMP-2. MW \pm SEM.



BMP-4

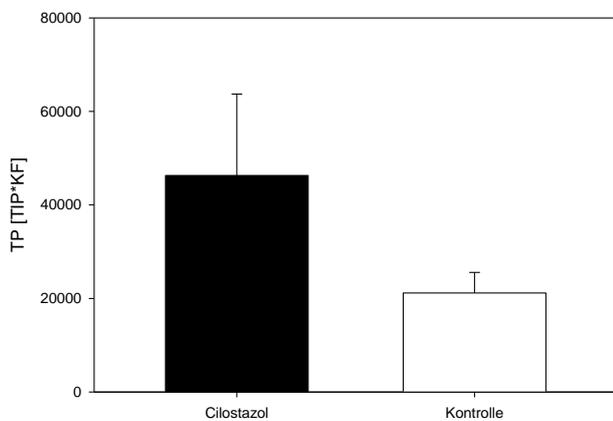
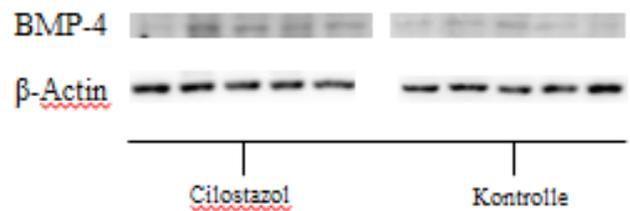


Abbildung 41: Expression von BMP-4. MW \pm SEM.



6 Diskussion

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von Cilostazol auf die Frakturheilung unter Ischämiebedingungen zu untersuchen. Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass Cilostazol den Remodelingprozess verzögert und die Frakturheilung beeinträchtigt.

6.1 Diskussion der Methoden

Die Frakturheilung ist ein komplexer biologischer Prozess, deren Pathophysiologie immer noch Gegenstand intensiver Forschungen ist. Ein Großteil der Erkenntnisse über die Interaktion des Weichteilgewebes, des Gefäßsystems, des Periosts sowie des Immunsystems stammen aus Tierversuchen. Somit ist ein standardisiertes Frakturmodell für die Untersuchung der Knochenbruchheilung unverzichtbar [28]. Da das Genom der Maus vollständig erforscht ist und verschiedene transgene Stämme und spezifische Antikörper für molekulargenetische Untersuchungen zur Verfügung stehen, bietet das Mausmodell optimale Voraussetzungen [85]. Ein weiterer Vorteil liegt in den geringeren Kosten für Anschaffung, Zucht und Haltung im Vergleich zu Großtiermodellen, was eine Untersuchung größerer Gruppen kostengünstig möglich macht. Allerdings unterscheidet sich die Anatomie im Vergleich zum Menschen. Menschen besitzen ein Havers-System, die Maus Resorptionshöhlen, die während der Frakturheilung mit Osteoblasten aufgefüllt werden [74]. Somit ist die Übertragung der Ergebnisse im Mausmodell auf den menschlichen Organismus nicht uneingeschränkt möglich. Die Knochenstruktur, Anatomie und der zeitliche Ablauf der Knochenbruchheilung von Großtiermodellen ist dem des Menschen sehr ähnlich. Allerdings existieren keine genetisch definierten Stämme oder spezifische Antikörper für molekulargenetische Analysen wie in der Maus [30, 59].

Es gibt bereits vielfältige Frakturmodelle für die Maus, die sich in der Frakturlokalisierung, der Frakturierung und der Frakturfixation unterscheiden [47]. Es existieren aus früheren Zeiten auch Frakturmodelle ohne Stabilisierung, die allerdings zeitnah verlassen wurden, da keinerlei mechanische Stabilität gegeben war und somit der Frakturheilungsprozess und die Kallusbildung nicht standardisiert untersucht werden konnte [20].

Die am besten geeigneten Knochen zur Frakturheilungsforschung sind die murinen großen Röhrenknochen wie das Femur und die Tibia [44, 67]. Das bisher meist verwendete Frakturmodell der

Tibia der Maus ist das von Hiltunen et al [44]. Der größte Nachteil dieses Modells besteht im unregelmäßigen, dreieckigen Querschnitt der Tibia, der kaum standardisierte biomechanische Testungen zulässt [18]. Dagegen sind am Femur durch den runden Querschnitt biomechanische Analysen standardisierter durchführbar. Darüber hinaus ist eine kombinierte Fraktur der Tibia und Fibula bei geschlossener Frakturierung möglich. Hierdurch werden die Frakturheilung und die Kallusbildung beeinträchtigt, was wiederum zu Änderungen der biomechanischen Stabilität führen kann. Die Infektionsgefahr ist am Unterschenkel durch die geringere Weichteildeckung von Tibia und Fibula im Vergleich zum Femur erhöht.

Das in dieser Studie angewandte geschlossene Femurfrakturmodell wurde 2009 von Holstein et al publiziert und bereits in verschiedenen Studien verwendet [45, 46, 51, 52, 53, 54, 77]. Das Modell ermöglicht durch das Zugschrauben-Prinzip eine zusätzliche Frakturspaltkompression wodurch neben der Rotationsstabilität auch eine axiale Stabilität gewährleistet werden kann [55].

Die Ergebnisse der früher mehrfach verwendeten Pin-Osteosynthesen sind durch die fehlende Rotationsstabilität weniger standardisiert aufgrund der Instabilität im Bereich des Frakturspalt [49]. Die Frakturierung wurde bei den Pin-Modellen bei einliegendem Implantat durchgeführt, wodurch es zusätzlich durch die Deformierung zu Beeinträchtigungen in der Frakturheilung kommen kann. In dieser Studie erfolgt die Implantation der Schraube erst nach der Frakturierung über einen zu vor eingebrachten Führungsdraht. Durch die Anwendung einer stumpfen Guillotine mit definiertem Gewicht kann eine standardisierte transverse geschlossene Femurfraktur mit geringem Weichteilschaden erzielt werden.

Eine invasivere Methode stellt die offene Frakturierung dar, bei der über einen lateralen Zugang der Knochen offen osteotomiert wird. Der dadurch verursachte Weichteilschaden ist bedeutend höher als bei geschlossener Fraktur und kann somit auch den Knochenheilungsprozess beeinflussen [18]. Offene Frakturmodelle wie die Plattenosteosynthese [48] oder der Fixateur externe [18] haben im Vergleich zu geschlossenen Frakturmodellen eine erhöhte Rotationsstabilität [49]. Nachteile des Fixateur externe sind das Implantatgewicht und die externe Implantatlage, wodurch der physiologische Bewegungsablauf der Maus gestört wird. Die Infektionsgefahr an den Eintrittsstellen der Fixateur-Pins ist durch die externe Lage erhöht [21]. Die Osteotomie nach Plattenosteosynthese heilt intramembranös [50] und ermöglicht die Untersuchung des intramembranösen Heilungsprozesses.

Die Frakturheilung läuft in 2 Phasen ab, einer Früh- und einer Spätphase. Insgesamt ist der Knochenheilungsprozess bei der Maus im Vergleich zum Menschen beschleunigt, sodass das Maximum der Kallusbildung 2 Wochen nach der Frakturierung erreicht ist [67]. Aus diesem Grund wurde dieser Zeitpunkt für weitere Untersuchungen zur Beurteilung der Frühphase der Frakturheilung ausgewählt. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass 4 Wochen postoperativ der Frakturspalt knöchern überbaut war und nach 7 Wochen der Remodeling-Prozess bereits initiiert war. Daher wurde zur Analyse der

Spätphase der Frakturheilung der Zeitpunkt 5 Wochen nach der Operation gewählt. Diese beiden Zeitpunkte wurden in vielzähligen vorangegangenen Studien ebenso verwendet [13, 46, 52, 54, 77].

Zur Induktion einer Ischämie der unteren Extremität der Maus existieren verschiedene Modelle. Diese unterscheiden sich insbesondere in der Ligaturlokalisierung und der Anzahl der Ligaturen [6, 79, 98, 112]. Eine schwere Ischämie wurde meist durch Resektion eines Abschnitts der Arteria femoralis nach proximaler und distaler Ligatur induziert [79, 98]. Dadurch wurde die Entstehung kritischer Ischämien mit Nekrosen und Gangränen gefördert. Durch Ligatur einzelner Arterien ohne Resektion wie die Arteria femoralis, die Arteria femoralis superficialis, Arteria profunda femoris oder die Arteria iliaca [40, 112] wird eine milde Ischämie induziert, sodass zwar eine Minderversorgung der entsprechenden unteren Extremität, aber keine Ulcera oder Gangränen entstehen. In einigen Studien konnte eine ausgeprägte Kollateralbildung im Bereich des Oberschenkels der Maus nachgewiesen werden [6]. Hierbei zeigte sich die Ausbildung von Kollateralen nach Ligatur der Arteria profunda femoris am geringsten im Vergleich zu den anderen Oberschenkelversorgenden Arterien. Das Versorgungsgebiet der Arteria profunda femoris umfasst den Femurschaft sowie die mediale Oberschenkelmuskulatur. Ziel dieser Studie war es, die Frakturheilung unter milden Ischämiebedingungen zu untersuchen, daher wurde zur Ischämie-Induktion eine doppelte Ligatur der Arteria profunda femoris durchgeführt.

Cilostazol wurde in einer Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Diese ist lediglich etwas höher als die Standarddosis von 1,5 mg/kg Körpergewicht bis 3 mg/kg Körpergewicht, die im klinischen Alltag angewandt wird. In den vorhergehenden Studien wurden Cilostazol-Dosen von 30 mg/kg Körpergewicht bis 50 mg/kg Körpergewicht pro Tag verwendet [2, 41].

Der operative Eingriff konnte in einer Schnitt-Naht-Zeit von 25 Minuten durchgeführt werden. Postoperativ kehrten die Mäuse innerhalb von 2-3 Tagen zu einem physiologischen Bewegungsmuster zurück, sodass die rechte untere Extremität voll belastet wurde. Infektionen, Verhaltensauffälligkeiten Nekrosen oder Wundheilungsstörungen konnten während des postoperativen Verlaufs nicht beobachtet werden. Zur Analyse der Frakturheilung wurden radiologische, biomechanische, histomorphometrische und proteinbiochemische Untersuchungen zu bereits vorher definierten Zeitpunkten 2 und 5 Wochen postoperativ durchgeführt. Die zerstörungsfreie 3-Punkt-Biegung wurde als etabliertes Testverfahren auch in dieser Studie zur biomechanischen Analyse angewandt [49]. In diesem Verfahren wird die Biegesteifigkeit mittels Kraft-Weg-Diagramm ermittelt. Ein entscheidender Vorteil dieses Messverfahrens ist, dass die Knochen zur weiteren histomorphometrischen Untersuchung weiterverwendet werden können, sodass die Gesamtzahl an benötigten Studientieren reduziert werden kann. Eine biomechanisch günstigere Messung ist die 4-Punkt-Biegung, bei der die Kraft auf eine größere Fläche verteilt wird [15]. Aufgrund der geringen Femurlänge von 17 mm wurde dieses Verfahren nicht angewandt. Darüber hinaus kann über das Verfahren der Rotationstestung die biomechanische Untersuchung erfolgen. Der größte Vorteil ist die annähernde Nachahmung des Rotationsmechanismus wie bei der Frakturstellung. Der entscheidende Nachteil ist allerdings, dass

dieses Verfahren nicht zerstörungsfrei durchgeführt werden kann und somit die doppelte Anzahl an Tieren für die Studie verwendet werden müsste.

Zur histomorphometrischen quantitativen Untersuchung der Frakturheilung wurde die von Gerstenfeld et al [37] publizierte Methode angewandt. Die Bestimmung der einzelnen Parameter erfolgte an longitudinalen, sagittalen Schnitten im Bereich der maximalen Kallusausgröße zur repräsentativen Auswertung von Kallusfläche und den relativen Gewebeanteilen von Knochen, Knorpel und Bindegewebe innerhalb der Kallusfläche.

Bei der computertomographischen Analyse konnte durch ein Schwellenwertverfahren, das auf die manuell eingetragenen ROI angewandt wurde, eine dreidimensionale Untersuchung des Kallus durchgeführt werden. Die Knochen wurden mit einer Schichtdicke von 7,5 μm gescannt, was eine sehr detaillierte Analyse der Parameter Kallusvolumen, Knochenanteil am Kallusvolumen, Trabekeldicke, Trabekelanzahl und Trabekelabstand ermöglichte [31].

Die proteinbiochemische Untersuchung des Kallus erfolgte nur 2 Wochen postoperativ. Auf die Analyse nach 5 Wochen wurde verzichtet, da aufgrund des bereits intiierten Remodeling-Prozesses nicht genügend Kallusgewebe asserviert werden konnte [57].

6.2 Diskussion der Ergebnisse

In dieser Studie konnte erstmalig gezeigt werden, dass der selektive PDE-3-Hemmer Cilostazol die Frakturheilung unter Ischämiebedingungen beeinträchtigt. 2 Wochen postoperativ war die Biegesteifigkeit in der biomechanischen Testung unter Cilostazol-Behandlung signifikant geringer als in der Kontroll-Gruppe. Zudem konnte in der CT-Analyse ein vermindertes Knochenvolumen und eine verminderte Trabekelanzahl nachgewiesen werden. In der Spätphase der Frakturheilung 5 Wochen postoperativ war der Knochenanteil in den histomorphometrischen Untersuchungen vermindert sowie der Bindegewebsanteil erhöht. Die proteinbiochemische Untersuchung konnte zum einen eine erhöhte Expression von RANKL, zum anderen eine erhöhte Expression von CD31 nachweisen.

Der Einfluss von Cilostazol auf die normale Frakturheilung ist bisher in zwei Studien analysiert worden [2, 41].

Herath et al [41] untersuchten den Einfluss von Cilostazol auf die Frakturheilung unter normalen Bedingungen ohne Erzeugung einer Ischämie mit einer Dosis von 30mg/kg KG Cilostazol bei 48 Mäusen. Interessanterweise war in dieser Studie die Frakturheilung signifikant verbessert. Es zeigte sich eine erhöhte Biegesteifigkeit 5 Wochen postoperativ. Der Knochenanteil war erhöht und der Knorpelanteil erniedrigt im Sinne eines beschleunigten Remodelings. Vergleichbar mit unserer Studie war die Expression von RANKL erhöht. Des Weiteren beeinflusste die Behandlung mit Cilostazol die Expression von CYR61 und BMP-4. Sowohl CYR61 als auch BMP-4 fördern die Osteoblastogenese und könnten somit für die verbesserte Frakturheilung in dieser Studie verantwortlich sein. Somit kann postuliert werden, dass die Ischämie in unserer Studie durch Beeinflussung der Expression der osteogenen Marker die Knochenneubildung negativ beeinflusst.

In einer weiteren Studie von Alic et al [2] wurde ebenfalls der Effekt von Cilostazol auf die normale Frakturheilung ohne Ischämie mit einer Dosis von 50mg/kg KG bei insgesamt 60 Ratten untersucht. Beobachtungszeitpunkte waren hier 1, 2 und 3 Wochen postoperativ. Zu diesen definierten Zeitpunkten wurden histomorphometrische und radiologische Analysen durchgeführt. Proteinbiochemische und biomechanische Untersuchungen wurden in dieser Studie nicht berücksichtigt. Eine Woche postoperativ war nach Cilostazol-Gabe die Gesamtkallusfläche erhöht. In unserer Studie hingegen konnte kein Unterschied in der Gesamtkallusfläche nachgewiesen werden. Nach zwei Wochen war die Kallusfläche in beiden Gruppen vergleichbar. Da in der Frühphase der Frakturheilung eine Woche postoperativ die Kallusbildung nach Cilostazol-Gabe erhöht war, kann eine vermehrte Knochenneubildung und somit eine erhöhte Osteoblastogenese hierfür verantwortlich sein. Insgesamt hatte Cilostazol jedoch in dieser Studie, insbesondere zwei und drei Wochen postoperativ, keinen signifikanten Einfluss auf die normale Frakturheilung.

In unserer Studie konnte nachgewiesen werden, dass Cilostazol die Frakturheilung unter Ischämiebedingungen negativ beeinflusst.

In der CT-Analyse zeigte sich eine signifikant verminderte Trabekelanzahl und ein signifikant vermindertes Knochenvolumen nach Cilostazol-Gabe. Histologisch wurde ebenfalls ein vermindertes Knochenvolumen nachgewiesen. Der Bindegewebsanteil war erhöht. Beide Ergebnisse sprechen für ein verzögertes Remodeling. Die Biegesteifigkeit war in der Frühphase signifikant vermindert. Im Gegensatz dazu konnte in den Untersuchungen von Herath et al [41] eine höhere Biegesteifigkeit ermittelt werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Ischämie einen entscheidenden Einfluss auf den Remodelingprozess hat. Beide Studien können jedoch nicht uneingeschränkt verglichen werden, da die Dosierung in der Studie von Herath et al [41] deutlich höher war.

RANKL ist ein wichtiger Bestandteil der Knochenresorption und Osteoklastenaktivität durch Bindung von RANK an die Osteoklasten. OPG interagiert mit RANKL, indem es die Osteoklastogenese hemmt [63, 95]. Die beiden Faktoren haben also eine antagonistische Wirkung. Während der Frakturheilung

wird die Knorpelresorption durch einen Anstieg der RANKL- und OPG-Expression gesteuert. Gerstenfeld et al [36] konnten zeigen, dass die Hemmung von RANKL die biomechanischen Eigenschaften des Knochens verbessert. In unserer Studie zeigte sich eine erhöhte Expression von RANKL. Die OPG-Expression wurde durch die Gabe von Cilostazol nicht beeinflusst. Vergleichbar zu unseren Ergebnissen war die RANKL-Expression in der Studie von Herath et al [41] ebenfalls erhöht. Die biomechanischen Eigenschaften waren aber wie in der Studie von Gerstenfeld et al [36] verbessert. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten dadurch erklärt werden, dass die Ischämie die Knochenneubildung inhibiert, da die Expression der hier bestimmten osteogenen Marker durch die Gabe von Cilostazol unter Ischämie nicht beeinflusst wurde. In der Studie von Herath et al [41] waren die osteogenen Marker signifikant erhöht.

Neben dem RANKL/OPG-System sind Knochenformationsmarker wie BMP-2 und BMP-4 wichtige Stimulatoren der Frakturheilung. Nach Bildung des weichen Kallus wird dieser durch die Absorption von Knorpel und die Bildung neuen Knochens allmählich zu Knochen geformt [68]. In dieser Phase werden Knochenbildungsmarker bis zu 2-3 Wochen nach Frakturierung exprimiert. Wakabayashi et al [104] wiesen in ihrer Studie eine BMP-4 induzierte erhöhte Aktivität von alkalischer Phosphatase in osteoblastischen Zellen durch Inhibierung von PDE-2, PDE-3 und PDE-4 nach. In unserer Studie war die Expression von BMP-2 und BMP-4 nicht signifikant erhöht. Entsprechend dazu konnten wir einen geringeren Knochenanteil unter ischämischen Bedingungen nachweisen.

Verschiedene Studien konnten zudem nachweisen, dass die Behandlung mit Cilostazol den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöht [104]. Cilostazol hemmt die Wiederaufnahme von Adenosin in den Erythrozyten, wodurch der Adenosinabbau vermindert wird. Daraus resultiert ein erhöhter Adenosin-Spiegel, der am Adenosin-A₂-Rezeptor die Bildung von cAMP erhöhen kann [66, 105]. Ahlstrom et al [1] konnten bereits nachweisen, dass ein erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel mit einer erhöhten knochenbildenden Aktivität verbunden ist. Zudem erhöht die selektive Hemmung von PDE-2, PDE-3 und PDE-4 die BMP-4-induzierte ALP-Aktivität in Osteoblasten [104]. Es ist wiederum anzunehmen, dass die ischämischen Bedingungen einen signifikanten Einfluss auf die Osteoblasten haben.

CYR-61 ist verantwortlich für die Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten [94]. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass sich die Behandlung mit CYR-61 positiv auf die Kallusregeneration auswirkt und zu einer erhöhten Rotationsstabilität führt [32]. Histing et al [52] postulierten, dass Sildenafil, ein selektiver PDE-5-Hemmer, die Frakturheilung über eine Erhöhung der Expression von CYR-61 verbessert. Des Weiteren beeinflusst CYR-61 die Chondrozytenproliferation. Eine Studie von Lienau et al [65] wies eine verminderte Expression von CYR-61 im Kallusgewebe nach, die mit einer längeren Knorpelpersistenz im Frakturkallus einherging. Daraus folgerten die Autoren, dass eine verminderte Expression von CYR-61 die Chondrozytendifferenzierung negativ beeinflusst. In unserer Studie war die Expression von CYR-61 in beiden Gruppen vergleichbar. Es konnte kein

signifikanter Unterschied im Knorpelanteil in den histomorphometrischen Untersuchungen in beiden Gruppen festgestellt werden.

Des Weiteren wurde der Einfluss von Cilostazol auf die Angiogenese untersucht. VEGF fördert sowohl die Bildung neuer Kollateralgefäße unter Ischämiebedingungen als auch die Osteoblastenproliferation [57]. Biscetti et al [10] konnten eine verbesserte Angiogenese durch eine höhere Expression von VEGF im murinen Ischämiemodell nach Gabe von 30mg/kg KG Cilostazol pro Tag feststellen. Dagegen konnten Mendes et al [70] eine verringerte VEGF-Expression in einem Mausmodell für schwamminduzierte Peritonealadhäsion nach Gabe von Cilostazol zeigen. In der hier durchgeführten Studie zeigte sich, dass die VEGF-Expression zwar erhöht war, aber nicht signifikant ($p > 0,05$). Dies deutet auf eine verbesserte Angiogenese nach Cilostazol-Gabe hin. Allerdings hatte die erhöhte VEGF-Expression keinen signifikanten Einfluss auf die Frakturheilung unter Ischämiebedingungen.

CD31 ist ebenfalls ein Angiogenesemarker und hat eine Schlüsselrolle in der Thrombozytenadhäsion. Es wird insbesondere in Endothelzellen exprimiert [110]. Sass et al [87] konnten nachweisen, dass CD31+ Zellen die Knochenbildung in vivo verbessern und die Revaskularisation stimulieren. Xu et al [110] beschreiben ebenfalls eine spezialisierte Untergruppe von CD31+ Zellen, die einen positiven Effekt auf die Knochenneubildung haben. Mäuse mit einer osteoblastenspezifischen Deletion von Schnurri-3 (SHN-3), einem Zinkfingeradapterprotein, die eine deutlich erhöhte Knochenbildung aufwiesen, zeigten einen Anstieg der spezifischen CD31+ Endothelzellen. In unserer Studie konnte eine erhöhte CD31-Expression nach Cilostazol-Gabe nachgewiesen werden. Dies kann auf eine verbesserte Durchblutung durch die Behandlung mit Cilostazol hindeuten. Die Frakturheilung wurde durch die erhöhte CD31-Expression allerdings nicht verbessert.

7 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* 58:1335–1340
2. Alic T, Cirakli A, Sahin Y, Tomak Y (2016) Effects of cilostazol on fracture healing: an experimental study. *Acta Orthop Traumatol Turc* 50:103-110
3. Allen HL, Wase A, Bear WT (1980) Indomethacin and aspirin: effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. *Acta Orthop Scand* 51:595-600
4. An Y, Friedman RJ, Parent T, Draughn RA (1994) Production of a standard closed fracture in the rat tibia. *J Orthop Trauma* 8:111-115
5. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390:175-179
6. Aref Z, de Vries MR, Quax PHA (2019) Variations in Surgical Procedures for Inducing Hind Limb Ischemia in Mice and the Impact of These Variations on Neovascularization Assessment. *Int J Mol Sci* 20:15
7. Aumüller G et al (2010) Duale Reihe Anatomie. S46-51
8. Bassett CA, Valdes MG, Hernandez E (1982) Modification of fracture repair with selected pulsing electromagnetic fields. *J Bone Joint Surg Am* 64:888-895
9. Beebe HG, Dawson DL, Cutler BS, Herd JA, Strandness DE, Jr., Bortey EB, Forbes WP (1999) A new pharmacological treatment for intermittent claudication: results of a randomized, multicenter trial. *Arch Intern Med* 159:2041-2050
10. Biscetti F, Pecorini G, Straface G et al (2013) Cilostazol promotes angiogenesis after peripheral ischemia through a VEGF-dependent mechanism. *Int J Cardiol* 167:910-916
11. Black J, Balligand M, Nunamaker DM, Brighton CT (1985) Electrical Stimulation of fresh fractures: Faradic stimulation of tibial osteotomies in the dog. *Trans Orthop Res Soc* 10:29

12. Bonnarens F, Einhorn TA (1984) Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 2:97-101
13. Bourque WT, Gross M, Hall BK (1992) A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Lab Anim Sci* 42:369-374
14. Brighton CT, Hozack WJ, Brager MD, Windsor RE, Pollack SR, Vreslovic EJ, Kotwick JE (1985) Fracture healing in the rabbit fibula when subjected to various capacitively coupled electrical fields. *J Orthop Res* 3:331-340
15. Burstein AH, Frankel VH (1971) A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech* 4:155-158
16. Cheal EJ, Mansmann KA, DiGioia AM 3rd, Hayes WC, Perren SM (1991) Role of interfragmentary strain in fracture healing: ovine model of a healing osteotomy. *J Orthop Res* 9:131-142
17. Chen D, Harris MA, Rossini G, Dunstan CR, Dallas SL, Feng JQ, Mundy GR, Harris SE (1997) Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 60:283-290
18. Cheung KMC, Kaluarachi K, Andrew G, Lu W, Chan D, Cheah KSE (2003) An externally fixed femoral fracture model for mice. *J Orthop Res* 21:685-690
19. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (2002) Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 17:513-520
20. Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D, Seidl W, Margevicius KJ, Augat P (1998) Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clin Orthop Relat Res* 355 Suppl:S132-147
21. Claes LE, 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* 24:1178-1185

22. Cone J, Wang S, Tandon N, Fong M, Sun B, Sakurai K, Yoshitake M, Kambayashi J, Liu Y (1999) Comparison of the effects of cilostazol and milrinone on intracellular cAMP levels and cellular function in platelets and cardiac cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 34:497-504
23. Critchlow MA, Bland YS, Ashhurst DE (1995) The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit. *Bone* 16:521-527
24. Da Rosa MP, Baroni GV, Portal VL (2006) Cilostazol, a phosphodiesterase III inhibitor: future perspectives in atherosclerosis. *Arq Bras Cardiol* 87:e222-e226
25. Danckwardt-Lillieström G, Lorenzi GL, Olerud S (1970) Intramedullary nailing after reaming. An investigation on the healing process in osteotomized rabbit tibias. *Acta Orthop Scand Suppl* 134:1-78
26. Daum WJ, Chang SL, Simmons DJ, Webster D, Shoenecker PL (1983) Healing of canine femoral osteotomies. Effects of compression plates versus Eggers' plates. *Clin Orthop Relat Res* 180:291-300
27. Dawson DL, Cutler BS, Hiatt WR, Hobson RW, Martin JD, Bortey EB, Forbes WP, Strandness DE, Jr. (2000) A comparison of cilostazol and pentoxifylline for treating intermittent claudication. *Am J Med* 109:523-530
28. Einhorn TA (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 355 Suppl: S7-21
29. Elam MB, Heckman J, Crouse JR, Hunninghake DB, Herd JA, Davidson M, Gordon IL, Bortey EB, Forbes WP (1998) Effect of the novel antiplatelet agent cilostazol on plasma lipoproteins in patients with intermittent claudication. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1942-1947
30. Elmstedt E (1981) Skeletal complications in the renal transplant recipient. A clinical study. *Acta Orthop Scand Suppl* 190:1-44
31. Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W (1999) Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure. *Radiologe* 39:203-212
32. Frey SP, Doht S, Eden L et al (2012) Cysteine-rich matricellular protein improves callus regenerate in a rabbit trauma model. *Int Orthop* 36:2387-2393

33. Garcia P, Holstein JH, Histing T, Burkhardt M, Culemann U, Pizanis A, Wirbel RJ, Pohlemann T, Menger MD (2008) A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: impact of stability on fracture healing. *J Biomech* 41:1689-1696
34. Garcia P, Holstein JH, Maier S, Schaumlöffel H, Al-Marrawi F, Hannig M, Pohlemann T, Menger MD (2008) Development of a reliable non-union model in mice. *J Surg Res* 147:84-91
35. Georgiadis GM, Minster GJ, Moed BR (1990) Effects of dynamization after interlocking tibial nailing: an experimental study in dogs. *J Orthop Trauma* 4:323-330
36. Gerstenfeld LC, Sacks DJ, Pelis M et al (2009) Comparison of effects of the bisphosphonate alendronate versus the RANKL inhibitor denosumab on murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 24:196-208
37. Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA (2005) Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. *J Bone Miner Res* 20:1715-1722
38. Goldberg VM, Powell A, Shaffer JW, Zika J, Bos GD, Heiple KG (1985) Bone grafting: role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res* 3:389-404
39. Gotoh F, Tohgi H, Hirai S, Terashi A, Fukuuchi Y, Otomo E, Shinohara Y, Itoh E, Matsuda T, Sawada T, Yamaguchi T, Nishimaru K, Ohashi Y (2000) Cilostazol Stroke Prevention Study: A placebo-controlled double-blind trial for secondary prevention of cerebral infarction. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 9:147-157
40. Guang L, Zhiwei F, Minglu Y, Weimin L, Yungi Y, Mier J, Yuanming O, Weien Y (2017) Biodegradable Carriers for Delivery of VEGF Plasmid DNA for the Treatment of Critical Limb Ischemia. *Front Pharmacol* 8:528
41. Herath SC, Lion T, Klein M, Stenger D et al (2015) Stimulation of angiogenesis by cilostazol accelerates fracture healing in mice. *J Orthop Res* 33:1880-1887
42. Hiatt WR, Money SR, Brass EP (2008) Long-term safety of cilostazol in patients with peripheral artery disease: The CASTLE study (Cilostazol: A Study in Long-Term Effects). *J Vasc Surg* 47:330-336
43. Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P (1995) An experimental model for non-union in rats. *Injury* 26:681-686

44. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HAT (1993) A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res* 11:305-312
45. Histing T, Andonyan A, Klein M, Scheuer C, Stenger D, Holstein JH, Veith NT, Pohlemann T, Menger MD (2016) Obesity does not affect the healing of femur fractures in mice. *Injury* 47:1435-1444
46. Histing T, Anton C, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger MD (2012) Melatonin impairs fracture healing by suppressing RANKL-mediated bone remodeling. *J Surg Res* 173:83-90
47. Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke MW, Wehner T, Bindl R, Recknagel S, Stuermer EK, Vollmar B, Wildemann B, Lienau J, Willie B, Peters A, Ignatius A, Pohlemann T, Claes L, Menger MD (2011) Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 49:591-599
48. Histing T, Garcia P, Matthys R, Leidinger M, Holstein JH, Kristen A, Pohlemann T, Menger MD (2010) An internal locking plate to study intramembranous bone healing in a mouse femur fracture model. *J Orthop Res* 28:397-402
49. Histing T, Holstein JH, Garcia P, Matthys R, Kristen A, Claes L, Menger MD, Pohlemann T (2009) Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture. *J Orthop Res* 27:1152-1156
50. Histing T, Klein M, Stieger A, Stenger D, Steck R, Matthys R, Holstein JH, Garcia P, Pohlemann T, Menger MD (2012) A new model to analyze metaphyseal bone healing in mice. *J Surg Res* 178:715-721
51. Histing T, Kuntz S, Stenger D, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2013) Delayed fracture healing in aged senescence-accelerated p6 mice. *J Invest Surg* 26:30-35
52. Histing T, Marciniak K, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger MD (2011) Sildenafil accelerates fracture healing in mice. *J Orthop Res* 29:867-873
53. Histing T, Stenger D, Kuntz S, Scheuer C, Tami A, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2012) Increased Osteoblast and Osteoclast Activity in Female Senescence-Accelerated, Osteoporotic SAMP6 Mice During Fracture Healing. *J Surg Res* 175:271-277

54. Histing T, Stenger D, Scheuer C, Metzger W, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2012) Pantoprazole, a proton pump inhibitor, delays fracture healing in mice. *Calcif Tissue Int* 90:507-514
55. Holstein JH, Matthys R, Histing T, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Meier C, Pohlemann T, Menger MD (2009) Development of a stable closed femoral fracture model in mice. *J Surg Res* 153:71-75
56. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T (2007) Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech* 40:215-219
57. Holstein JH, Menger MD, Scheuer C, Meier C, Culemann U, Wirbel RJ, Garcia P, Pohlemann T (2007) Erythropoietin (EPO): EPO-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing. *Life Sci* 80:893-900
58. Ito H, Akiyama H, Shigeno C, Iyama K, Matsuoka H, Nakamura T (1999) Hedgehog signaling molecules in bone marrow cells at the initial stage of fracture repair. *Biochem Biophys Res Commun* 262:443-451
59. Kaplan SJ, Hayes WC, Mudan P, Lelli JL, White AA (1985) Monitoring the healing of a tibial osteotomy in the rabbit treated with external fixation. *J Orthop Res* 3:325-330
60. Kawamura K, Fujita S, Tani T, Kimura Y (1985) Effect of cilostazol, a new antithrombotic drug, on an experimental model of peripheral circulation insufficiency. *Arzneimittelforschung* 35(7A):1154-6
61. Kimura Y, Tani T, Kanbe T, Watanabe K (1985) Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneimittelforschung* 35:1144-9
62. Kumar M, Bhattacharya V (2007) Cilostazol: a new drug in the treatment intermittent claudication. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov.* 2:181-5
63. Lacey DL, Timms E, Tan HL et al (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165-176
64. Lenahan TM, Balligand M, Nunamaker DM, Wood FE Jr (1985) Effect of EHDP on fracture healing in dogs. *J Orthop Res* 3:499-507

65. Lienau J, Schell H, Epari DR et al (2006) CYR61 (CCN1) protein expression during fracture healing in an ovine tibial model and its relation to the mechanical fixation stability. *J Orthop Res* 24:254-262
66. Liu Y, Shakur Y, Yoshitake M, Kambayashi J (2001) Cilostazol (pletal): a dual inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 3 and adenosine uptake. *Cardiovasc Drug Rev* 19:369-386
67. Manigrasso MB, O'Connor JP (2004) Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma* 18:687-695
68. Marsell R, Einhorn TA (2009) The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. *Injury* 40:4-7
69. Matthys R, Perren SM (2009) Internal fixator for use in the mouse. *Injury* 40 Suppl 4:S103-S109
70. Mendes JB, Campos PP, Rocha MA et al (2009) Cilostazol and pentoxifylline decrease angiogenesis, inflammation, and fibrosis in sponge-induced intraperitoneal adhesion in mice. *Life Sci* 84:537-543
71. Müller ME, Nazarian S, Koch P (1987) *AO-Klassifikation der Frakturen*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. S18-21
72. Newton CD, Nunamaker DM (1985) *Textbook of Small Animal Orthopaedics*. J.B. Lippincott Company, Philadelphia. S112-117
73. Niethard FU, Pfeil J, Biberthaler P (2014) *Duale Reihe Orthopädie und Unfallchirurgie*. Thieme. S45-51
74. Nunamaker DM (1998) Experimental model of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 355 Suppl:S56-65
75. Nunamaker DM, Perren SM (1979) A radiological and histological analysis of fracture healing using prebending of compression plates. *Clin Orthop Relat Res* 138:167-174
76. O'Brien TP, Yang GP, Sanders L, Lau LF (1990) Expression of *cyr61*, a growth factor-inducible immediate-early gene. *Mol Cell Biol* 10:3569-3577

77. Orth M, Baudach J, Scheuer C, Osche D, Veith NT, Braun BJ, Rollmann MF, Herath SC, Pohlemann T, Menger MD, Histing T (2019) Erythropoietin does not improve fracture healing in aged mice. *Exp Gerontol* 122:1-9
78. Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, Ivanhoe RJ, DiBianco R, Zeldis SM, Hendrix GH, Bommer WJ, Elkayam U, Kukin ML (1991) Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *N Engl J Med* 325:1468-1475
79. Parikh PP, Castilla D, Lassance-Soares RM, Shao H, Requeiro M, Li Y, Vazquez-Padron R, Webster KA, Liu ZJ, Velazquez OC (2018) A Reliable Mouse Model of Hind Limb Gangrene. *Ann Vasc Surg* 48:222-232
80. Perren SM, Huggler A, Russenberger M, Allgöwer M, Mathys R, Schenk R, Willenegger H, Müller ME (1969) The reaction of cortical bone to compression. *Acta Orthop Scand Suppl* 125:19-29
81. Peter CP, Cook WO, Nunamaker DM, Provost MT, Seedor JG, Rodan GA (1996) Effect of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs. *J Orthop Res* 14:74-79
82. Platzer W (2009) *Taschenatlas Anatomie*. S14-17
83. Regensteiner JG, Ware JE, Jr., McCarthy WJ, Zhang P, Forbes WP, Heckman J, Hiatt WR (2002) Effect of cilostazol on treadmill walking, community-based walking ability, and health-related quality of life in patients with intermittent claudication due to peripheral arterial disease: meta-analysis of six randomized controlled trials. *J Am Geriatr Soc* 50:1939-1946
84. Ronga M, Fagetti A, Canton G, Paiusco E, Surace MF, Cherubino P (2013) Clinical applications of growth factors in bone injuries: experience with BMPs. *Injury* 44 Suppl 1:S34-S39
85. Rossant J, Nagy A (1995) Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat Med* 1:592-594
86. Russell G, Tucci M, Conflitti J, Graves M, Wingerter S, Woodall J Jr, Ragab A, Benghuzzi H (2007) Characterization of a femoral segmental nonunion model in laboratory rats: report of a novel surgical technique. *J Invest Surg* 20:249-255
87. Sass FA, Schmidt-Bleek K, Ellinghaus A et al (2017) CD31+ cells from peripheral blood facilitate bone regeneration in biologically impaired conditions through combined effects on immunomodulation and angiogenesis. *J Bone Miner Res* 32: 902-912

88. Schemitsch EH, Kowalski MJ, Swiontkowski MF, Harrington RM (1995) Comparison of the effect of reamed and unreamed locked intramedullary nailing on blood flow in the callus and strength of union following fracture of the sheep tibia. *J Orthop Res* 13:382-389
89. Schemitsch EH, Kowalski MJ, Swiontkowski MF, Senft D (1994) Cortical bone blood flow in reamed and unreamed locked intramedullary nailing: a fractured tibia model in sheep. *J Orthop Trauma* 8:373-382
90. Schenk RK, Willenegger HR (1977) Die Histologie der primären Knochenheilung im Lichte neuer Konzeptionen über den Knochenumbau. *Unfallheilkunde* 80:155-160
91. Schoen M, Rotter R, Schattner S, Mittlmeier T, Claes L, Vollmar B, Gradl G (2008) Introduction of a new interlocked intramedullary nailing device for stabilization of critically sized femoral defects in the rat: A combined biomechanical and animal experimental study. *J Orthop Res* 26:184-189
92. Schrör K (2007) Cilostazol – ein neuer Ansatz zur Behandlung der pAVK. *Vasomed* 19:112-116
93. Schwarz Pharma Deutschland GmbH, Otsuka Pharmaceutical Europe Ltd. (2007) Pletal 100mg Tabletten. Fachinformation 2007
94. Si W, Kang Q, Luu HH et al (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* 26:2955-2964
95. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309-319
96. Stowell GW, Behme RJ, Denton SM, Pfeiffer I, Sancilio FD, Whittall LB, Whittle RR (2002) Thermally-prepared polymorphic forms of cilostazol. *J Pharm Sci.* 91:2481-8
97. Strandness DE, Jr., Dalman RL, Panian S, Rendell MS, Comp PC, Zhang P, Forbes WP (2002) Effect of cilostazol in patients with intermittent claudication: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Vasc Endovascular Surg* 36:83-91

98. Tang G, Charo DN, Wang R, Charo IF, Messina L (2004) CCR2^{-/-} knockout mice revascularize normally in response to severe hind limb ischemia. *J Vasc Surgery* 40:786-795
99. Thaller SR, Hoyt J, Tesluk H, Stevenson TR (1993) Midfacial fracture repair in the adult rat. *Ann Plast Surg* 31:66-71
100. Thompson PD, Zimet R, Forbes WP, Zhang P (2002) Meta-analysis of results from eight randomized, placebo-controlled trials on the effect of cilostazol on patients with intermittent claudication. *Am J Cardiol* 90:1314-1319
101. Urist MR (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893-899
102. Utvåg SE, Grundnes O, Reikerås O (1994) Healing of segmental and simple fractures in rats. *Acta Orthop Scand* 65:559-563
103. Volpon JB (1994) Nonunion using a canine model. *Arch Orthop Trauma Surg* 113:312-317
104. Wakabayashi S, Tsutsumimoto T, Kawasaki S et al (2002) Involvement of phosphodiesterase isozymes in osteoblastic differentiation. *J Bone Miner Res* 17:249-256
105. Wang S, Cone J, Fong M, Yoshitake M, Kambayashi J, Liu Y (2001) Interplay between inhibition of adenosine uptake and phosphodiesterase type 3 on cardiac function by cilostazol, an agent to treat intermittent claudication. *J Cardiovasc Pharmacol.* 38:775-783
106. Whittall LB, Whittle RR, Stowell GW (2002) Polymorphic forms of cilostazol. *Acta Crystallogr C.* 58:525-7
107. Wilhite DB, Comerota AJ, Schmieder FA, Throm RC, Gaughan JP, Rao AK (2003) Managing PAD with multiple platelet inhibitors: the effect of combination therapy on bleeding time. *J Vasc Surg* 38:710-713
108. Wingerter S, Calvert G, Tucci M, Tsao A, Russell G, Benghuzzi H (2007) Comparison of two different fixation techniques for a segmental defect in a rat femur model. *J Invest Surg* 20:149-155
109. Xu R, Yallowitz A, Qin A, Wu Z, Shin DY, Kim JM, Debnath S, Ji G, Bostrom MP, Yang X, Zhang C, Dong H, Kermani P, Lalani S, Li N, Liu Y, Poulos MG, Wach A, Zhang Y, Inoue K, Di Lorenzo A, Zhao B, Butler JM, Shim JH, Glimcher LH, Greenblatt MB (2018) Targeting skeletal endothelium to ameliorate bone loss. *Nat med.* 24:823-833

110. Yamagiwa H, Tokunaga K, Hayami T, Hatano H, Uchida M, Endo N, Takahashi HE (1999) Expression of metalloproteinase-13 (Collagenase-3) is induced during fracture healing in mice. *Bone* 25:197-203
111. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K (1998) Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 139:1329-1337
112. Yu J, Dardik A (2018) A Murine Model of Hind Limb Ischemia to Study Angiogenesis and Arteriogenesis. *Methods Mol Biol* 1717:135-143

8 Danksagung

Mein Dank gilt folgenden Personen, die mich bei meiner Dissertation unterstützt haben und somit zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Dr. med. David Stenger danke ich für die Überlassung des Themas, für die hervorragende Betreuung bei der Durchführung der Arbeit und die zahlreichen Ratschläge, mit denen er mir jederzeit zur Seite gestanden hat.

Frau Prof. Dr. med. Tina Histing, meiner Doktormutter, gilt ein großer Dank für die konstruktive Kritik sowie für die vielen Anregungen, mit denen sie mir sehr weitergeholfen hat.

Herrn Prof. Dr. med. Tim Pohlemann danke ich für die zahlreichen Ratschläge und seine stetige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. Michael D. Menger möchte ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Geräte sowie für sein konstruktives Feedback danken.

Frau Dr. med. vet. Monika Frings gilt mein Dank für die Unterstützung während der Durchführung der Tierversuche.

Frau Dr. rer. nat. Claudia Scheuer und Frau Janine Becker danke ich für die einzigartige Hilfe bei der Durchführung der proteinbiochemischen und histologischen Analysen.

Herrn Benedikt Merscher und Herrn David Osche danke ich sehr für die sehr angenehme Zusammenarbeit und die ständige gegenseitige Unterstützung während der Durchführung der Tierversuche.

Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich auch bei allen anderen Mitarbeitern des Institutes für klinisch-experimentelle Chirurgie bedanken, die hervorragende und zuverlässige Arbeit geleistet haben und ein sehr angenehmes Arbeitsklima geschaffen haben.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meine Eltern, die mich bereits mein ganzes Leben unterstützt haben und mir dieses Studium ermöglicht haben.

9 Publikationen

Die vorliegende Arbeit wurde auf folgenden Kongressen präsentiert und wie folgt publiziert:

9.1 Vorträge

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, 23.-26. Oktober 2018, Berlin, Deutschland:

Stutz J, Stenger D, Osche D, Bremer P, Rollmann M, Pohlemann T, Menger M, Histing T: Einfluss von Cilostazol auf die Frakturheilung unter Ischämiebedingungen

27. Wissenschaftliche Jahresversammlung der Saarländischen Chirurgen Vereinigung e.V., 16. Januar 2019, Kirkel, Deutschland:

Stutz J, Stenger D, Osche D, Bremer P, Rollmann M, Pohlemann T, Menger M, Histing T: Einfluss von Cilostazol auf die Frakturheilung unter Ischämiebedingungen

9.2 Publikation

Die Studie ist unter dem Titel „Effect of cilostazol on fracture healing under ischemic conditions“ zur Veröffentlichung geplant. Das Manuskript wird überarbeitet und in Kürze zur Publikation eingereicht.

10 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

11 Abbildungsverzeichnis

1	Osteosynthesetechniken für das Mausfemur	14
2	Struktur von Cilostazol	15
3	Wirkmechanismus von Cilostazol	16
4	MouseScrew™	21
5	Milde Ischämie durch Ligatur der Arteria femoralis superficialis	23
6	Darstellung der Patellarsehne nach Ligatur	23
7	Lateral luxierte Patella, Sicht auf die Kondylen	23
8	Eröffnung des Markraums	23
9	Führungskanüle	23
10	Führungsdraht	23
11	Implantation MouseScrew™	24
12	Implantierte MouseScrew™	24
13	Hautnaht	24
14	Röntgenkontrolle Führungsdraht	24
15	Röntgenkontrolle intraoperativ nach Fraktur	24
16	Röntgenkontrolle postoperativ	24
17	Röntgenbild 2 Wochen postoperativ	25
18	Explantierter Knochen	26
19	Röntgenbild zur radiologischen Auswertung	27
20	Kraft-Weg-Diagramm	29
21	Longitudinaler sagittaler Schnitt durch das Femur (Safranin O Färbung)	30

22	Ergebnisse der radiologischen Auswertung des Goldberg-Score	33
23	Absolutes Knochenvolumen im Kallus	34
24	Relativer Knochenanteil am Gesamtkallus	34
25	Trabekelanzahl	35
26	Trabekelabstand	35
27	Trabekeldicke	35
28	Absolute Biegesteifigkeit der frakturierten Femora	36
29	Relative Biegesteifigkeit der frakturierten Femora	37
30	Absolute Biegesteifigkeit der unfrakturierten Femora	37
31	Absolute Gesamtkallusfläche	38
32	Knochenanteil im periostalen Kallus	38
33	Knorpelanteil im periostalen Kallus	39
34	Bindegewebsanteil im periostalen Kallus	39
35	Expression von CD 31	40
36	Expression von VEGF	40
37	Expression von RANKL	41
38	Expression von OPG	41
39	Expression von Cyr-61	42
40	Expression von BMP-2	42
41	Expression von BMP-4	42

12 Tabellenverzeichnis

1	Nebenwirkungen von Cilostazol	18
2	Anzahl der Tiere in den Auswertungsgruppen	21
3	Goldberg-Score	27
4	Färbeverhalten bei Safranin O Färbung	30
5	Analysierte Proteine und deren Funktion	32