
Aus dem Bereich

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

Direktor: Prof. Dr. med. Tim Pohlemann

Einfluss von Amlodipin auf die Frakturheilung im Mausmodell

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

Vorgelegt von: Benedikt Martin Maria Merscher

Geboren am: 09.08.1983 in Saarbrücken

Tag der Promotion: 13.07.2021

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Tina Histing

Prof. Dr. med. Henning Madry

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung / Abstract	3
2	Einleitung	5
2.1	Knochen	5
2.1.1	Morphologie	5
2.1.2	Histologie	5
2.1.3	Physiologie	7
2.2	Frakturheilung	8
2.2.1	Primäre Frakturheilung	8
2.2.2	Sekundäre Frakturheilung	9
2.3	Wachstumsfaktoren	10
2.3.1	BMP (Bone morphogenetic protein)	11
2.3.2	CYR61 (Cysteine-rich angiogenic inducer 61)	12
2.3.3	VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	12
2.3.4	OPG (Osteoprotegerin)	13
2.3.5	RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand)	14
2.4	Frakturmodelle	14
2.4.1	Großtiermodelle	16
2.4.2	Kleintiermodelle	17
2.5	Amlodipin	21
2.5.1	Struktur	21
2.5.2	Wirkmechanismus	21
2.5.3	Pharmakokinetik	22
2.5.4	Indikation und Anwendung	23
2.5.5	Nebenwirkungen	23
2.5.6	Interaktionen	23
2.5.7	Klinische Studien	23
2.6	Zielsetzung	24
2.7	Fragestellung	24
3	Material und Methoden	25
3.1	Methoden	25
3.1.1	Studiendesign	25
3.1.2	Tiermodell	26
3.1.3	Operationsverfahren	27
3.1.4	Medikamentenapplikation	32
3.1.5	Tötung der Tiere	32
3.1.6	Präparation der Knochen	33
3.2	Zielkriterien und Auswertung	33
3.2.1	Radiologie	33
3.2.2	Biomechanik	34
3.2.3	Histologie	35
3.2.4	Western Blot	38
3.3	Statistik	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Radiologie	40

4.2	Biomechanik	41
4.3	Histologie	42
4.4	Western Blot	44
5	Diskussion	48
5.1	Diskussion der Methoden.....	48
5.2	Diskussion der Ergebnisse	53
6	Literaturverzeichnis	59
7	Danksagungen.....	72
8	Publikationen.....	74
9	Lebenslauf	75
10	Abbildungsverzeichnis	77
11	Tabellenverzeichnis	79

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin converting enzym
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
Aq. dest.	Aqua destillata
ap	Anteroposterior
AP-1	Aktivator Protein 1
BMP	Bone morphogenetic protein
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CT	Computertomographie
CYR61	Cysteine-rich angiogenic inducer 61
EPO	Erythropoietin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FGF	Fibroblast growth factor
G	Gauge
g	Gramm
GIG 1	G-CSF-induced gene-1
H	Wasserstoff
h	Stunde
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
IE	Internationale Einheiten
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP10	Insulin-like growth factor binding protein 10
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
kD	Kilodalton
KF	Korrekturfaktor
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
kV	Kilovolt
l	Liter

µm	Mikrometer
MCM	Mineral coated microparticle
mg	Milligramm
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
mol	Mol
MSCs	Mesenchymale Stammzellen (engl. Mesenchymal stem cells)
MW	Mittelwert
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid
OPG	Osteoprotegerin
PAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet-derived growth factor
PECAM-1	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
®	eingetragenes Warenzeichen (engl. Registered Trademark)
RANK	Receptor Activator of NF-κB
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
RUNX 2	Runt related transcription factor 2
RUST	The radiographic union score for tibial fractures
SEM	Standardfehler (engl. Standard Error of the Mean)
s	Sekunden
Tab.	Tabelle
™	Warenzeichen (engl. Trademark)
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TGF-β	Transforming growth factor β
TP	Target-Intensitätspixel
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vs.	Versus

1 Zusammenfassung / Abstract

Einfluss von Amlodipin auf die Frakturheilung im Mausmodell

In verschiedenen Studien wurde bereits gezeigt, dass Kalziumkanalblocker (CCBs), die in der Therapie des arteriellen Bluthochdrucks weit verbreitet sind, einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel haben. Es ist jedoch nicht bekannt, ob Kalziumkanalblocker die Frakturheilung beeinflussen. Daher wurde in dieser Arbeit die Wirkung des Kalziumkanalblockers Amlodipin auf die Knochenheilung in einem etablierten Frakturmodell der Maus untersucht. Die Knochenheilung wurde nach 2 und 5 Wochen radiologisch, biomechanisch, histologisch sowie mittels Western Blot untersucht. Jeweils 20 Mäuse wurden täglich mit einer niedrigen Dosis Amlodipin (1mg/kg/KG), oder einer höheren Dosis (3 mg/kg/KG) Amlodipin behandelt. Die Kontrollgruppe erhielt eine entsprechende Menge NaCl 0,9%, über eine Sonde oral (p.o.). Histologisch war nach Gabe von Amlodipin sowohl in niedriger als auch in höherer Dosis ein signifikant höherer Anteil an Knochengewebe im Kallus im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar. Der Anteil von Knorpel und Fasergewebe war entsprechend verringert. Insgesamt weist dies auf eine Beschleunigung der Frakturheilung hin. Die Western Blot Untersuchungen zeigten zum einen eine erhöhte Expression von Bone Morphogenetic Protein (BMP) 2 und BMP 4 als auch Vascular Endothel Growth Factor (VEGF). Des Weiteren war die Expression von Osteoprotegerin (OPG) sowie die Expression des Rezeptoraktivators des NF- κ B-Liganden (RANKL) deutlich erhöht. Die verstärkte Stimulation von RANKL weist auf eine Stimulation der Osteoklasten hin. Die Ergebnisse zeigen, dass Amlodipin die Frakturheilung beschleunigt, indem es die Knochenbildung, das Remodeling und die Osteoklastenaktivität beeinflusst.

The influence of Amlodipin on fracture healing in mice

Calcium channel blockers (CCBs), which are widely used in treatment of hypertension, have been shown to effect bone metabolism. However, there is no knowledge, whether CCBs, affect fracture healing. Therefore, we studied the effect of the CCB amlodipine on bone healing in a stable closed fracture model in mice. Bone healing was analyzed using radiology, biomechanics, histomorphometric and Western blot analysis at 2 and 5 weeks after fracture healing. Twenty mice each were treated daily with amlodipine low dose (1 mg/kg body weight), amlodipine high dose (3 mg/kg body weight) or vehicle (Ctrl) per os (p.o.) using a gavage. The histomorphometric analysis revealed a significantly increased ratio of bone tissue within the callus of amlodipine low dose- and amlodipine high dose-treated animals, when compared to controls. This was associated with a significantly reduced ratio of cartilaginous and fibrous tissue within the callus, indicating an acceleration of the process of callus remodelling and fracture healing. The Western blot analysis revealed an increased expression of bone morphogenetic protein (BMP)-2, BMP-4 and vascular endothelial growth factor (VEGF). Moreover, we found an enhanced expression of osteoprotegerin (OPG) and a more elevated expression of the receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), indicating osteoclast stimulation. These findings demonstrate that amlodipine accelerates fracture healing by affecting bone formation, callus remodeling and osteoclast activity.

2 Einleitung

2.1 Knochen

2.1.1 Morphologie

Knochen lassen sich bezüglich ihrer Morphologie entsprechend einteilen:

- Kurze Knochen. Hierzu zählen zum Beispiel die Hand- und Fußwurzelknochen.
- Irreguläre Knochen, wie die Wirbelkörper. Diese können verschieden aussehen und lassen sich nicht weiter gliedern.
- Die platten Knochen, wie das Sternum, die Rippen, das Schulterblatt und Knochen des Schädeldachs sowie luftgefüllte Knochen (Nasennebenhöhlen, Paukenhöhlen).

Darüber hinaus gibt es noch die Gruppe der lange Knochen, zu denen auch die Röhrenknochen zählen.

Für die Studie wurde das Femur der Maus verwendet. Beim Menschen ist dieser der stärkste und längste Knochen im Körper und bildet die knöcherne Grundlage des Oberschenkels. Das Femur lässt sich den Röhrenknochen zuordnen.

Das proximale Ende des Femurs endet mit dem Oberschenkelkopf, der einem etwa 135° geneigten Hals aufsitzt. Am distalen Ende des Femurs befinden sich der Condylus medialis und lateralis.

In dem hier angewendeten Mausmodell wurde die Fraktur im Bereich der Diaphyse zur Schaftmitte hin mittels Guillotine erzeugt [10].

2.1.2 Histologie

Die Hauptbestandteile des Knochens sind Knochengrundsubstanz, Knochenzellen, Knochenhülle und Knochenmark.

Die Knochengrundsubstanz lässt sich weiter untergliedern in organische Bestandteile. Hierzu zählen Kollagene, vor allem Kollagen Typ I, sowie Glycoproteine und Proteoglycane. Die anorganischen Bestandteile sind Hydroxylapatit und Calciumsalze, die sich zwischen den Kollagenfibrillen ablagern, sowie Ionen, z.B. Magnesium oder Fluorid [158].

Bei den zellulären Knochenbestandteilen lassen sich Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten unterscheiden.

Bei den, in der Knochenmatrix vorhandenen, Osteozyten handelt es sich um Zellen, die einen übermäßigen Knochenaufbau verhindern. Die Osteoblasten produzieren Knochengrundsubstanz, die noch nicht in den Knochen „eingemauert“ ist. Darüber hinaus steuern sie über viele Zwischenschritte die Mineralisation des Knochens, was zum Heranwachsen von Knochenkristallen und Anlagerung an Kollagenfibrillen führt. Eine weitere Aufgabe ist die Regulation des Knochenumbaus. Osteoklasten sind Fresszellen, die den mineralisierten Knochen abbauen [135].

Die Knochenhülle lässt sich unterteilen in Periost, welches den äußeren Knochen umgibt und das Stratum fibrosum und Stratum osteogenicum, sowie dem Endost, welches alle innenliegenden Strukturen des Knochens überzieht. Dabei ist das Stratum fibrosum die äußere bindegewebige Schicht, von der aus die sogenannten Sharpeyfasern in den Knochen strahlen. Das Stratum fibrosum dient den Muskeln und Bändern als Ansatzpunkt. Das Stratum osteogenicum ist eine mit Gefäßen und Nerven durchsetzte Schicht, die mit Knochenzellen gesäumt ist [29].

Beim histologischen Aufbau des Knochens muss man zwischen dem Lamellenknochen und dem Geflechtknochen differenzieren. Der Geflechtknochen wird auch als primärer Knochen bezeichnet.

Geflechtknochen entsteht, wenn sich innerhalb kurzer Zeit viel Knochensubstanz bildet. Sie sind weniger organisiert und werden entsprechend dem Reifegrad als primäre Knochen bezeichnet. Aufgrund der weniger organisierten extrazellulären Matrix, was vor allem die Ausrichtung der Kollagenfasern und Gefäße betrifft, ist der Geflechtknochen auch weniger mineralisiert. Er entsteht im Rahmen der desmalen Ossifikation während der Embryonalphase oder sekundär im Rahmen einer Frakturheilung. Hier wird der primär entstandene Geflechtknochen in Lamellenknochen umgebaut.

Der Lamellenknochen ist deutlich organisierter als der Geflechtknochen. Im Zentrum besteht er aus der Substantia spongiosa aus trabekulärem Knochen und im Randbereich aus der Substantia compacta aus kortikalem Knochen, welche deutlich festere Strukturen aufweist. Lamellenknochen entsteht nach Umbau aus Geflechtknochen. Dieser sekundäre Knochen besteht aus sich regelmäßig wiederholenden Bauelementen. Grundbaustein ist hier das Osteon, welches auch als Haverssystem bezeichnet wird, und in dessen Mitte der Haverskanal mit den Haversblutgefäßen und Nerven liegt. Die Blutgefäße stehen über Volkmankanäle miteinander in Verbindung. Das System besteht aus Speziallamellen aus kollagenen Fasern Typ I und Osteozyten mit langen Fortsätzen in Knochenkanälchen. Sie sind umgeben von einem perizellulären Spalt. Nach außen abgeschlossen wird jedes

Osteon durch eine Kittlinie. Das Haversssystem hat einen Durchmesser von ca. $300\mu\text{m}$ und eine Länge von durchschnittlich 0,5-1cm [29,158].

Die Knochen der Maus haben im Vergleich zum Menschen einen einfacheren Aufbau. Im murinen Knochen sind keine Haversssysteme vorhanden, sondern lediglich Resorptionskanäle. Von diesen Resorptionskanälen geht die Knochenheilung durch vorhandene Osteoblasten aus [114].

2.1.3 Physiologie

Die Physiologie der Knochen ist mannigfaltig. Zum einen dienen sie der Formgebung als Grundlage für den Phänotyp des menschlichen Körpers. Darüber hinaus sind die Knochen zusammen mit Muskeln, Sehnen, Bändern und Gelenken essenzieller Bestandteil des Bewegungsapparats. Hierbei dient der Knochen vor allem der Kraftübertragung und Kraftweiterleitung.

Eine protektive Funktion besitzt der Knochen zum Schutz innerer Organe. Hier sei beispielhaft der Schädelknochen zum Schutz des Gehirns sowie der knöcherne Thorax zum Schutz der Brusteingeweide genannt. Im Elektrolythaushalt nehmen die Knochen wichtige Funktionen bei der Speicherung von Mineralsalzen wahr. Hier wird v.a. Calcium und Phosphat gespeichert und bei Bedarf wieder freigesetzt [126].

Das Knochenmark als Teil des Knochens ist an der Blutbildung beteiligt und ist, ab ca. dem vierten Monat der Embryonalphase, der Hauptort der Hämatopoese. Zuvor findet die Blutbildung in Blutinseln des Dottersackgewebes statt [152]. Der Ort der Blutbildung ist nahezu ausschließlich das rote Knochenmark. Dieses ist beim Säugling ubiquitär anzutreffen, beim Erwachsenen fast ausschließlich in den platten und kurzen Knochen [152].

Der Knochenumbau wird auch als Modeling bezeichnet. Das bedeutet, dass z.B. Periost und Endost ständige Umbau- und Reparaturprozesse durchführen, um sich ständig an wechselnde Belastungen anzupassen. Dies geschieht über im End- und Periost enthaltene Vorläuferzellen, die Osteoblasten bilden können. Vor allem läuft dieser Vorgang im Zuge des Längenwachstums ab [96]. Durch diese ständigen Auf- und Abbauprozesse des Knochens, welches auch als Remodeling bezeichnet wird, kommt es zu einem kompletten Austausch des menschlichen Skeletts etwa alle 7-10 Jahre. Die Anpassung des Knochens an seine Belastung wurde erstmals am Beispiel der Spongiosaarchitektur im Jahr 1892 gezeigt und als Wolfschesgesetz bezeichnet [160]. Diese Modeling- und Remodelingprozesse entstehen durch ein Zusammenspiel zwischen End-, Periost und dem Haverssystem.

2.2 Frakturheilung

Unter einer Fraktur versteht man eine Kontinuitätsunterbrechung eines Knochens unter Bildung von Fragmenten [124]. Bei einer Knochenfraktur entsteht ein Verlust der mechanischen Integrität und der knöchernen Kontinuität [48]. Eine suffiziente Heilung einer Knochenfraktur kann nur gewährleistet werden, wenn der Knochen mittels Schienung von innen z.B. durch einen Marknagel oder von außen durch einen Gipsverband ruhiggestellt wird. Darüber hinaus ist eine sorgfältige Beachtung der Grundprinzipien hinsichtlich der Biologie, Mechanik und Operationstechnik für eine erfolgreiche Therapie wichtig. Die Art der Frakturheilung wird durch die biomechanischen Einflüsse im Frakturspalt bestimmt [86].

Grundsätzlich lässt sich eine direkte und eine indirekte Knochenheilung unterscheiden. Hierbei bestimmt die Art der Therapie die Art der Knochenheilung. Neben der adäquaten Ruhigstellung der Knochen muss ein ausreichender Knochenkontakt der Fragmente sowie eine ausreichende Vaskularisierung gewährleistet sein, um eine adäquate Knochenheilung zu erreichen [84,86]. Darüber hinaus ist die Heilung einer Fraktur von weiteren Faktoren wie Alter des Patienten, Dauermedikation, Art der Fraktur und Art des Operationsverfahrens abhängig. Augat et. al fassten diese Faktoren als biologische Faktoren, Ernährungsfaktoren, physikalische Einflüsse und genetische Faktoren zusammen [9].

2.2.1 Primäre Frakturheilung

Die primäre Frakturheilung wird auch als direkte Frakturheilung bezeichnet. Zu einer primären Frakturheilung kommt es, wenn zwischen den entstehenden Knochenfragmenten noch ein Kontakt besteht. Hier wird keine äußere Kallusmanschette ausgebildet, und es wird kein Bindegewebe oder Knorpelgewebe im Frakturspalt gebildet. Man differenziert, je nach absoluter Weite des Frakturspalts, zwischen Spaltheilung ($> 0,2$ mm) und Kontaktheilung ($< 0,2$ mm).

Diese Art der Frakturheilung funktioniert nur, wenn eine mechanische Stabilität besteht und eine ausreichende Vaskularisation vorhanden ist.

Dies erkannte Albrecht von Haller bereits im Jahr 1767 aufgrund experimenteller Untersuchungen [166]. Der Erfolg der spontanen Frakturheilung ist daher abhängig von der Breite des Frakturspalts, dem Dislokationsgrad und der damit einhergehenden Schädigung der Weichteile wie Periost und Endost, sowie dem Bewegungsmaß im Frakturspalt bzw. der Ausdehnung der Trümmerzone und dem damit verbundenen Grad der Vaskularisation [48].

Bei der Spalthheilung im Rahmen der primären Frakturheilung wird innerhalb der ersten drei bis vier Wochen der Frakturspalt mit Geschlechtsknochen aufgefüllt und in der Folge in Lamellenknochen umgebaut [3].

Bei der Kontaktheilung kommt es zur Knochenregeneration durch ein longitudinales Einwachsen der Osteone [3].

Hierbei wird zunächst durch kegelförmig angeordnete Osteoklasten ein Resorptionskanal in die Kortikalis des benachbarten Knochenfragments gebohrt. In der Folge kommt es dann zum Einwandern von Osteoprogenitorzellen und Kapillaren in den Kanal [15]. So kommt es zu einer direkten Verbindung der Knochenfragmente untereinander.

In der Praxis kann die primäre Knochenheilung nur durch chirurgische Versorgung mittels Osteosynthese sichergestellt werden, da nur hier gewährleistet ist, dass die Knochen frühzeitig eng adaptiert werden.

2.2.2 Sekundäre Frakturheilung

Die sekundäre Knochenheilung tritt bei der Mehrzahl der Frakturen ein, da hier häufig weniger gut adaptierte und fixierte Bruchenden vorliegen. Diese Art der Frakturheilung vollzieht sich bei konservativer Behandlung. Die Zeit für eine komplette sekundäre Frakturheilung variiert je nach Region [48].

Bei der sekundären Frakturheilung lassen sich verschiedene Phasen unterscheiden:

- Verletzungsphase (Frakturphase mit Hämatombildung)
- Entzündungsphase
- Granulationsphase
- Phase der Kallushärtung
- Modeling und Remodeling

So kommt es unmittelbar nach der Fraktur in der sogenannten Frakturphase oder auch initiale Verletzungsphase zur Ausbildung eines Hämatoms, welches durch die Beteiligung des umliegenden Weichteilgewebes entsteht. In diesem Bereich des Frakturhämatoms kommt es zur Aktivierung einer Entzündungsreaktion, bei der es zu einer überschießenden Kapillarisation und Aktivierung einer Entzündungskaskade kommt. Im Rahmen dieser Prozesse lassen sich Proliferation, Migration und Differenzierung von pluripotenten Stammzellen als Osteoblastenvorläufer, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen nachweisen [3]. Die Rolle der Mastzellen ist in diesem Zusammenhang noch nicht abschließend geklärt. Vermutlich beeinflussen sie die Zellmigration und lokale

Gefäßneubildung durch die Ausschüttung von Heparin und heparinähnlichen Substanzen [14]. Darüber hinaus differenzieren sich die Osteoklasten aus den Mastzellen. Im Weiteren kommt es zur Freisetzung von Zytokinen wie Interleukin-1 und Interleukin-6 aus den Entzündungszellen.

Diese Phase wird auch als Entzündungsphase bezeichnet und beläuft sich auf einen Zeitraum von 3-14 Tagen [110,141,142].

In der sich nun anschließenden Phase der Granulation, die einen Zeitraum von drei bis acht Wochen beansprucht, kommt es durch lokale Wachstumsfaktoren zum Ersatz des Hämatoms durch Granulationsgewebe. Dieses Granulationsgewebe bildet sich aus Lymphozyten, Kapillaren, Fibroblasten und Osteoblasten vom KollagenTyp 1. Neben den Wachstumsfaktoren, wie TGF- β , IGF-1, IGF-2, FGF, PDGF und BMP und den oben beschriebenen zellulären Bestandteilen sind Elektrolyte, Hormone und Vitamine in Form von Kalzium, Parathormon und Vitamin D an der Knochenheilung und Ausbildung des Granulationsgewebes beteiligt. Es kommt zur Ausbildung des weichen Kallus. Von peripher bilden sich zwischen den einzelnen Frakturfragmenten Brücken aus Granulationsgewebe, die den weichen Kallus bilden. Parallel kommt es zum Abbau von avitalen Fragmenten durch die Osteoklasten und zur desmalen Ossifikation durch die Osteoblasten. Chondroblasten bilden den entstehenden Knorpel [110,142].

In der Phase der Kallushärtung, die ungefähr sechs Wochen bis zu vier Monate dauert, kommt es zu einer zunehmenden Mineralisation der Grundsubstanz [142]. Das hierfür benötigte Kalzium stammt aus den Mitochondrien von hypertrophierten Chondrozyten [3].

Dabei erfährt der ausgebildete Geflechtknochen seine Orientierung in Richtung der Belastungsachse [142].

Darauffolgend schließt sich die Remodelingphase an, die einen Zeitraum von ca. ein bis zwei Jahre beansprucht. Hier findet eine funktionelle Adaptation und ein Umbau in Lamellenknochen statt. Es kommt zu einer Rekonstruktion der medullären Gefäße und zum Abbau von überschüssigem Kallus [110].

2.3 Wachstumsfaktoren

Unter Wachstumsfaktoren versteht man Proteine, welche die Zellproliferation und/oder Differenzierung von Vorläuferzellen bzw. Stammzellen zu somatischen Zellen beeinflussen. Bei Knochenauf- und abbau sind verschiedene Wachstumsfaktoren beteiligt. Dieser Arbeit zugrunde liegend wurden die folgend kurz beschriebenen

Wachstumsfaktoren mittels Western Blot analysiert. BMP 2- und 4, Cyr 61, VEGF, OPG und RANKL und β -Actin.

2.3.1 BMP (Bone morphogenetic protein)

BMP's sind multifunktionale Wachstumsfaktoren, die zur Transforming growth factor β (TGF β) Superfamilie gehören und Bestandteil dieses Signalwegs zur interzellulären Kommunikation sind. Die BMP's bezeichnet man auch als parakrine Signalmoleküle, die eine enorme Wichtigkeit für die Kommunikation unter den Zellen besitzen.

Die signalaussendende Zelle schüttet BMP aus. In der signalempfangenden Zelle kommt es zur Bindung an Membranrezeptoren, die das Signal in das Zellinnere übertragen. Im Zellinneren kommt es schließlich durch Unterstützung von weiteren Proteinen zur Übermittlung der Information an den Zellkern. Die Verarbeitung im Zellkern führt zu einer genetischen Veränderung der Zielzelle durch Änderung der Proteinzusammensetzung und den damit verbundenen Eigenschaften.

Es gibt verschiedene BMP Typen, von deren Art die Reaktion des Empfängersignals auf die Zielzelle abhängt. Weitere beeinflussende Faktoren sind Stärke und Dauer des Signals.

Neben der Eigenschaft der Induktion des Knochenwachstums als Wachstumsfaktor besitzen die BMP's je nach Subtyp die Fähigkeit, verschiedene weitere Prozesse zu initiieren [23]. So kann z.B. BMP-2 zusammen mit TGF- β chondrogene Stammzellen zur Differenzierung anregen und so die Bildung von Knorpelgewebe anstoßen [22].

Der Nachweis konnte in verschiedenen tierexperimentellen Studien bereits erbracht werden. Hier wurde z.B. rekombinanter BMP-2 in einem Ratten- Femurmodell injiziert und es zeigte sich im Knochen nach verschiedenen Zeiträumen eine stärkere biomechanische Stabilität [34].

In der Studie von Wei et. al wurde in einem Rattenmodell eine Hydroxylapatit/Kollagen-Paste mit der Fähigkeit, BMPs zu absorbieren, in den Knochen eingebracht. Auch hier war eine verbesserte Frakturheilung nachweisbar [157].

In einer Studie von Orth et al. zeigte sich, dass BMP's die Knochenheilung im Pseudarthrosenmodell verbessern [116].

In einem Frakturmodell mit BMP-2 Knock-Out-Mäusen konnte zudem eine verzögerte Knorpel- und Knochenbildung nachgewiesen werden [102].

Ein Vergleich von BMP-2 und BMP-4 konnte nachweisen, dass BMP-2 eine effektivere Aktivierung von knochenregenerativen Stammzellen induzieren kann als BMP-4 [42].

2.3.2 CYR61 (Cysteine-rich angiogenic inducer 61)

CYR61 ist unter verschiedenen Synonymen bekannt, u.a. CCN1 (cellular communication factor 1). Es gehört somit zur CCN-Proteinfamilie. Weitere Synonyme sind GIG 1 (G-CSF-induced gene-1) und IGFBP10 (Insulin-like growth factor binding protein 10). [167] Die Erstbeschreibung erfolgte 1990 durch O'Brien et al. [115]. Die Arbeitsgruppe brachte den Nachweis von CYR 61 in Mäusefibroblasten. Im Kallus der Fraktur kommt es zur Expressierung, woraufhin die Osteblastenproliferation, Differenzierung sowie Angiogenese angeregt wird [51,148]. Dies wurde in verschiedenen Arbeiten postuliert.

Ali et al. konnten eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von CYR61 und dem RUST-Score (The radiographic union score for tibial fractures) nachweisen, so dass sich daraus folgern ließ, dass eine CYR 61-Expression eine frühe Vorhersage über die Heilungsergebnisse einfacher diaphysärer Tibiafrakturen liefert.

Der Nachweis einer vermehrten Expressierung während der Knorpelbildung im Rahmen der enchondralen Ossifikation gelang Histing et al.. Hier wurde gezeigt, dass eine erhöhte Expression von CYR61 mit einer Zunahme der Knochenbildung einhergeht [64].

Zhang et al. konnten zeigen, dass CCN1 eine wichtige regulatorische Funktion in der Reifung der Knorpelzellen und somit in der Entwicklung des Knorpelgewebes zukommt. Der Nachweis gelang sowohl im embryonalen als auch im postnatalen Knorpel. Eine Überexpression zeigte eine vermehrte Reifung der Chondrozyten, während eine Hemmung der endogenen CYR61 Funktion eine Hemmung der Reifung zeigte [164].

Darüber hinaus beeinflusst CYR61 die Regeneration des Kallus nach einem Trauma nicht nur histologisch und radiologisch, sondern auch biomechanisch. Dies konnten Frey et al. im Tiermodell am Hasen mit offenem Trauma zeigen [38].

2.3.3 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

Der VEGF wird auch als Endothelwachstumsfaktor bezeichnet. VEGF ist ein Protein, das in allen vaskulären Geweben des Menschen anzutreffen ist. Die Erstbeschreibung erfolgte durch Senger im Jahr 1983 im Rahmen der Krebsforschung. Hier fand die

Arbeitsgruppe heraus, dass Tumorzellen einen Faktor sezernieren, der die Gefäßpermeabilität erhöht und die Ansammlung von Aszitisflüssigkeit fördert [137].

Bei diesen Faktoren lassen sich sechs verschiedene Formen mit unterschiedlicher Funktion unterscheiden. Die Hauptaufgabe ist die Angiogenese. Hierbei kommt es VEGF-vermittelt zur Bildung von neuem Endothel durch Einwanderung und Teilung neuer Endothelzellen.

Weitere Aufgaben des VEGF sind, je nach Unterart, die embryonale Angiogenese und die Lymphangiogenese. Neuere Studien zeigen, dass VEGF mehrere zusätzliche Funktionen erfüllt, so z.B. die Aufrechterhaltung von Endothel- und Nervenzellkompartimenten [138].

Im Rahmen der Knochenheilung und Knochenentwicklung kommt VEGF ebenfalls, aufgrund der Induktion einer Neoangiogenese, eine wichtige Funktion zu. Dies konnte von verschiedenen Autoren bereits nachgewiesen werden.

Von Brighton und Hunt konnte bereits 1997 die Wichtigkeit der VEGF-induzierten Neoangiogenese auf die Frakturheilung beschrieben werden [16].

Hu et al. untersuchten die Funktionen von aus Osteoblasten stammendem VEGF bei der Heilung eines Knochendefekts. Hier stellten sie fest, dass VEGF aus Osteoblasten in mehreren Phasen des Heilungsprozesses diese verbessert. An transgenen Mäusen, mit osteoblastenspezifischer Deletion von VEGF, konnte gezeigt werden, dass VEGF als parakriner Faktor die Reifung und Mineralisierung von Osteoblasten verbessert. Im Weiteren kommt es zur Rekrutierung von Blutgefäßen und Osteoklasten sowie zur Förderung der Knorpelresorption an der Reparaturstelle während des periostalen, enchondralen Ossifikationsstadiums [76].

2.3.4 OPG (Osteoprotegerin)

OPG wurde 1997 durch Simonet et al. beschrieben. Die Arbeitsgruppe beschrieb ein neues sekretierendes Glycoprotein, das die Knochenresorption reguliert. Es zählt zur TNF-Rezeptor Superfamilie. In der Arbeit wurde postuliert, dass OPG dem ovariektomie-assoziierten Knochenverlust bei Ratten entgegenwirkt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass OPG als löslicher Faktor eine positive Wirkung auf die Regulation der Knochendichte hat [143].

OPG wird von den Osteoblasten sezerniert und besitzt eine hohe Affinität zu RANKL. OPG verhindert somit die Interaktion zwischen seinem Rezeptor RANK. In der Folge kommt es zur Inhibition der RANKL vermittelten Knochenresorption und

Osteoklastengnese. Eine weitere Funktion von OPG ist die Hemmung des Zelluntergangs von Osteoklasten durch die Bindung an den TNF-related apoptosis-inducing ligand [85].

Eine aktuelle Arbeit von Rochette et al. zeigte, dass während der Osteogenese eine Verbindung zwischen Endothelzelle und Osteoblasten besteht, wodurch ein Zusammenhang zwischen Angiogenese und Osteogenese hergestellt wird. Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass OPG auch einen Einfluss auf die Gefäße hat und somit auch Gegenstand der Forschung bei Gefäßerkrankungen ist [129].

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

Bei RANKL handelt es sich um ein Protein, das als Ligand für den Transmembranrezeptor RANK (Rezeptor activator of NF- κ B) eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Osteoklasten und der Resorption von Knochen spielt.

Es zählt zur Gruppe der Tumornekrosefaktoren. Bereits 1997 berichteten Anderson et al. über die Charakterisierung von RANK (Rezeptor activator of NF- κ B), einem neuen Mitglied der TNFR-Familie, das aus dendritischen Zellen stammt, und die Isolierung seines Liganden (RANKL) durch direktes Expressionsscreening. Es wurde beschrieben, dass RANK und RANKL wichtige Regulatoren der Wechselwirkung zwischen T-Zellen und dendritischen Zellen sind [7,50].

RANKL bindet an den auf der Oberfläche von nicht vollständig entwickelten und ausgereiften Osteoklasten sitzenden Rezeptor RANK. Diese Bindung induziert die Differenzierung der Osteoklasten und steigert die Aktivität. Hierdurch erhöht sich die Knochenresorption [50,161]. Das Zusammenspiel von RANK und RANKL ist ein wichtiger Regulator im Knochenstoffwechsel und sorgt für ein Gleichgewicht zwischen Knochenab- und aufbau [56].

2.4 Frakturmodelle

Die Erkenntnisse über die Frakturheilungsprozesse sind in den vergangenen Jahren durch zahlreiche klinische-, in-vitro- und in vivo-Studien erlangt worden. Hier konnten wichtige physiologische und biochemische Prozesse erkannt werden, um Heilungsstrategien zu entwickeln. Nach Ghasi et al. handelt es sich bei der Knochenheilung um einen physiologisch sehr komplexen Prozess, der sowohl von biologischen als auch mechanischen Aspekte beeinflusst wird. Nach einer Fraktur kommt es zu unzähligen Prozessen, die letztendlich eine Frakturheilung induzieren.

Hierzu zählen Zellmigration, Zell-Gewebedifferenzierung, Gewebesynthese sowie Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die durch die mechanische Umgebung reguliert werden. Durch sehr große Fortschritte im Bereich der Computersimulation ist es in den letzten Jahren gelungen, die Phasen der Frakturheilung zu simulieren und zu untersuchen. Dennoch gibt es keine Simulationsmethode, an der alle möglichen Faktoren dargestellt werden können, so dass die wissenschaftlichen Untersuchungen am Tiermodell nach wie vor eine entscheidende Rolle spielen und unabdingbar sind [46].

Es existieren zahlreiche unterschiedliche Frakturmodelle an verschiedenen Tieren, die je nach Fragestellung ausgewählt werden. In Bezug auf die Frakturheilung ergaben sich häufig Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen von Tiermodellen und klinischen Studien am Menschen [114].

Zu Beginn der tierexperimentellen Studien wurden häufig eher Großtiermodelle eingesetzt, da man annahm, dass diese der menschlichen Anatomie und Physiologie am nächsten kommen würden. In einer Übersichtsarbeit von Martini et al. wurden insgesamt 21500 Studien zur Frakturheilung im Tierexperiment untersucht mit dem Ergebnis, dass im Bereich der Großtiermodelle vor allem Hunde, Primaten, Schafe, Schweine und Katzen verwendet wurden. Im Bereich der Kleintiermodelle waren dies vor allem Ratten, Mäuse, und Hasen. Es wurde darüber hinaus postuliert, dass es kein Tier mit gleichen anatomischen, biologischen, biochemischen und physiologischen Eigenschaften wie beim Menschen gibt [100].

In der vorliegenden Arbeit wurde das Mausmodell benutzt. Beim Mausmodell gibt es eine Vielzahl von transgenen und Knockoutstämmen, die vor allem die Möglichkeit einer Untersuchung der molekularbiologischen Prozesse während der Knochenheilung erlauben.

Eine weitere wichtige Eigenschaft, die bei der Auswahl des Tiermodells beachtet werden sollte, ist das Ansprechen auf verschiedene Medikamente. So wurde beobachtet, dass unterschiedliche Spezies völlig verschiedene Metabolisierungswege von Medikamenten aufwiesen. Dies kann zur Folge haben, dass eine Übertragung der Ergebnisse auf eine andere Spezies, wie den Menschen, nur eingeschränkt möglich ist.

Beispielhaft sei hier auf eine Arbeit von Jones et al. hingewiesen, in der beschrieben wird, dass Haustiere v.a. Hunde und Katzen ein erhöhtes Risiko für eine Intoxikation mit NSAR besitzen [79].

Darüber hinaus spielt das Alter des Versuchstiers eine große Rolle. So hat ein junger, womöglich noch nicht ausgewachsener Knochen, einen schnelleren Heilungsverlauf als ein Knochen von einem älteren Versuchstier [94].

Im Folgenden sind verschiedene Tiermodelle zur Untersuchung der Knochenheilung dargestellt.

2.4.1 Großtiermodelle

2.4.1.1 Schaf

Der Knochenaufbau und die Knochenheilungsrate des Schafes sind vergleichbar mit der des Menschen. Gerade die Tibia weist hier weitgehende Ähnlichkeiten auf [147]. Vor allem Ende der 1980er Jahre und zu Beginn der 1990er Jahre wurden im Rahmen der Entwicklung und Testung von neuen Humanimplantaten häufig Schafe als Tiermodell herangezogen [21,83,127,144].

Aber auch in neueren Arbeiten werden Schafmodelle herangezogen [31,150].

Nach Newman et al. sind Schafe aus verschiedenen Gründen vielversprechende Tiermodelle. Sie sind fügsam, einfach zu handhaben und unterzubringen, relativ kostengünstig und in großer Anzahl erhältlich. Im Vergleich zu Kleintiermodellen sind die Tierhaltung, der Versuchsaufbau und das Osteosynthesematerial jedoch viel kostspieliger und aufwendiger [114]. Einen Vorteil bietet jedoch die vergleichbare Größe gegenüber dem Menschen, so dass z.B. für Studien humane Implantate verwendet werden können [147].

2.4.1.2 Schwein

Das Schwein ist aufgrund seiner anatomischen Nähe zum Menschen auch ein häufig in der Forschung zur Knochenheilung verwendetes Tier. Hierbei werden häufig Minischweine oder Hausschweine eingesetzt, da hier die Haltung und Unterbringung gegenüber dem Mastschwein mit einem geringeren Aufwand verbunden sind. Die Verwendung von Miniaturschweinen in der Forschung hat über Jahrzehnte zugenommen und wird sowohl in der experimentellen Pharmakologie als auch als therapeutisches Modell für menschliche Krankheiten eingesetzt [146].

Am Schweinmodell wurden bereits zahlreiche Arbeiten zur Knochenheilung durchgeführt [109,133,134].

2.4.1.3 Hund

Im Bereich der Veterinärmedizin finden sich Publikationen zur Frakturheilung am Hund. Daher ist die Frakturheilung beim Hund, aufgrund der vielen Untersuchungen, bis jetzt schon sehr gut erforscht [4]. Gerade bei den Stabilisierungstechniken von Frakturen gibt es unzählige Studien und Fallberichte, die am Hund durchgeführt wurden [33,47,119,136,159]. Der Knochenaufbau des Hundes ähnelt dem des Menschen, jedoch sind die Knochenremodelingprozesse verschieden. So bestehen sie aus einer Mischung aus lamellären und plexiformen Knochen, die eine andere biomechanische Eigenschaft aufweisen [87,155].

2.4.2 Kleintiermodelle

2.4.2.1 Kaninchen

Beim Kaninchen handelt es sich ebenfalls um ein Modell, das zur Untersuchung der Frakturheilung geeignet ist. Bei den bisher veröffentlichten Arbeiten zu Frakturen am Kaninchenmodell wurden externe Fixateure, intermedulläre Pins, Plattenosteosynthesen und Verbände eingesetzt. In einer Übersichtsarbeit von Sasai et al. wurden in den Jahren 2007-2015 mehr als 139 Frakturen untersucht und die Ergebnisse zusammengefasst [132]. Im Vergleich zum menschlichen Knochen unterlaufen die Knochen bei Kaninchen einem starken Remodeling und weisen andere Strukturen auf. Gegenüber kleineren Nagern ist jedoch das größere Skelett von Vorteil [104,121,156].

2.4.2.2 Ratte

Untersuchungen zur Frakturheilung an der Ratte gehören schon seit längerer Zeit zu den etablierten Verfahren. Erste Arbeiten zur Frakturheilung bei Ratten wurden bereits im Jahr 1922 durch Pappenheimer beschrieben [120]. In den Folgejahren wurden sehr viele Studien an der Ratte durchgeführt. Hier wurden die verschiedensten Frakturlokalisationen und Implantate untersucht [53,59,118].

Gegenüber Mäusen bietet die Ratte den Vorteil, dass sie aufgrund ihrer Körpergröße für biomechanische Untersuchungen besser geeignet ist und auch die operative Versorgung technisch leichter durchzuführen ist. Im Allgemeinen lassen sich Rattenmodelle mit den Mausmodellen sehr gut vergleichen. Darüber hinaus korreliert der Knochenaufbau und das Remodeling sowohl im kortikalen als auch im spongösen

Bereich sehr gut mit dem des Menschen [104,121]. Bei den anfallenden Kosten ist das Rattenmodell auch als kostengünstiger gegenüber Großtiermodellen anzusehen. Gerade in Bereichen, in denen eine relativ große Anzahl an Tieren erforderlich ist, liegen die ökonomischen Vorteile auf der Seite des Rattenmodells [114].

2.4.2.3 Maus

In dieser Arbeit wurde die Frakturheilung an CD-1 Mäusen untersucht. Genau wie bei Ratten ist dieses Modell kostengünstig und die Tierhaltung einfacher als im Großtiermodell.

Nachdem man in den 1940er Jahren begann viele Studien zur Knochenheilung an Ratten durchzuführen [35,123,153], wurde das Mausmodell erst 20 Jahre später eingeführt [149].

Vor allem bei mikrobiologischen Untersuchungen bietet die Maus einen entscheidenden Vorteil. Bei den Mausmodellen steht eine große Anzahl von Antikörpern und genmanipulierten Tieren zur Verfügung [61]. Das Genom der Maus ist komplett entschlüsselt, daher können die molekularen Mechanismen der Frakturheilung untersucht werden. Es wurden in den letzten Jahren sehr viele Studien sowohl zur physiologischen als auch zur pathologischen Knochenheilung anhand von Mäusen durchgeführt.

Die Versorgung von Frakturen im Mausmodell ist jedoch technisch schwieriger. Die kleinen anatomischen Verhältnisse erfordern spezielle Implantate [61].

Zudem besitzt die Maus einen primitiveren Knochenaufbau als der Mensch. So besitzt die Maus Resorptionskanäle und nicht wie der Mensch ein Haverssystem [114].

Bei den bisher veröffentlichten Frakturmodellen der Maus wurden verschiedene Knochen mit unterschiedlicher Fragestellung untersucht.

Es wurden Untersuchungen an den Rippen der Maus durchgeführt [75,93,108,151], an der Tibia [6,24,41,91,163] und am Femur [40,52,57,71,72,92,117].

Bei den Frakturmodellen der Rippe ist eine biomechanische Testung und Auswertung aufgrund der Anatomie nur sehr begrenzt möglich, so dass diese fast ausschließlich im Rahmen von Genexpressionsanalysen untersucht wurden [49,93,107].

Im Hinblick auf die biochemische Testung sind das Femur und die Tibia wesentlich besser geeignet. Hier weist das Femur gegenüber der Tibia jedoch ebenfalls Vorteile auf. Es handelt es sich bei dem Mäusefemur um einen größeren Knochen im Vergleich zur Tibia. Im Vergleich zu den eher dreieckigen Knochen der Tibia hat das Femur einen

rundlichen, einheitlichen Durchmesser von ca. 2 mm, eine Länge von ca. 15 mm und besitzt eine gute Weichteildeckung [26,62].

Bei den beschriebenen Frakturmodellen am Mausfemur lassen sich geschlossene und offene Frakturmodelle unterscheiden. Die geschlossenen Frakturen werden in der Regel mittels Guillotine mit einem vordefinierten Gewicht erzeugt. Die Beschreibung und Testung dieser Apparatur gelang Bonnarens et al. im Jahr 1984 bei 40 Sprague-Dawley-Ratten. Ziel war es eine vergleichbare standardisierte Fraktur zu erzeugen. Mittels Guillotine und dem vordefinierten Gewicht kann eine reproduzierbare Fraktur erzeugt werden, die nur einen minimalen Weichteilschaden aufweist [12].

Bei den offenen Modellen muss der Knochen frei präpariert werden und gezielt eine Fraktur erzeugt wird. Dies setzt einen größeren operativen, meist lateralen Zugang voraus [26]. Der Vorteil gegenüber dem geschlossenen Modell ist, dass keine unkontrollierten Weichteilschäden entstehen. Die Defektgröße kann bestimmt werden und kann somit standardisiert untersucht werden. Grundsätzlich unterscheidet sich die Osteotomie von einer Fraktur und heilt schlechter. Hier muss auf eine stabile osteosynthetische Versorgung geachtet werden.

Das von Bonnarens 1984 entwickelte Frakturmodell wurde 1993 durch Hiltunen et al. [60] auf die Mäusetibia übertragen und im Jahr 2004 durch Manigrasso et al. [98] am Femur der Maus angewandt. Zudem gibt es auch verschiedene Osteosynthesetechniken wie Nägel, Platten und Schrauben, Fixateure, die verwendet werden können.

Manigrasso et al. verwendeten einen Edelstahldraht mit einem Durchmesser von 0,01 Zoll, der retrograd eingeführt wurde und die Fraktur stabilisierte. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der minimalen Invasivität, dem geringen Gewicht des Osteosynthesematerials und den niedrigen Kosten. Nachteile sind, neben der Verletzung des Markraums beim Einbringen, die mangelnde Rotations- und Achsenstabilität sowie die hohe Dislokationsrate [20,72,104].

Cheung et al. entwickelte einen Fixateur externe. Der Fixateur externe bestand aus zwei Aluminiumblöcken, die durch zwei Stangen verbunden waren. Vier Stifte stellten die Verbindung zum Knochen her.

Der Knochen wird nach Anlage des Fixateurs externe über einen lateralen Zugang osteotomiert [26]. Bei diesem Modell ist die Untersuchung segmentaler Knochendefekte möglich [130]. Ein weiterer Vorteil bildet die hohe Rotations- und

Achsenstabilität. Der externe Fixateur kann weit von der Frakturzone entfernt eingebracht werden. Die Implantate sind jedoch teuer und die chirurgische Prozedur aufwendig. Darüber hinaus besitzt der Fixateur externe ein sehr hohes Gewicht, was das Gangbild der Maus verändern und die Heilung verzögern kann [125].

Zur Untersuchung von segmentalen Defekten bietet sich auch die Plattenosteosynthese an. Bei diesem ebenfalls offenen Verfahren wird eine Platte, die sogenannte Verriegelungsplatte, mit winkelstabilen Schrauben zur Stabilisierung der Fraktur verwendet. Dabei kommt es nach Reposition der Fraktur zur intramembranösen Heilung [63]. Vorteilhaft zeigen sich bei dieser Art der Osteosynthese das geringe Gewicht des Implantats sowie der geringere Einfluss auf den Bewegungsablauf im Vergleich zum externen Fixateur. Nachteile sind jedoch die verhältnismäßig schwierige operative Technik und die hohen Kosten für das Implantat [104,125].

Da der primäre intramedulläre Pin keine Rotations- und Achsenstabilität aufwies, wurden weitere intramedulläre Osteosynthesematerialien entwickelt.

So gelang es Holstein et al. [73], einen Verriegelungsnagel für das murine Femur zu entwickeln. Dieser besteht aus einer modifizierten 24 G Injektionsnadel. Die Rotationsstabilität wurde durch das Abflachen des proximalen und distalen Endes erreicht.

Bei dieser Arbeit wurde die Frakturversorgung mittels MouseSrew™ durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine intramedulläre Kompressionsschraube, bestehend aus einem distalen Konus und einem proximalen Schraubgewinde. Der distale Konus verankert sich in der Femurkondyle [74]. Durch die Anwendung der MouseScrew™ wird eine erhöhte Stabilität der Fraktur erreicht.

Im Vergleich zu anderen intramedullären Implantaten weist die MouseScrew™ eine gute Rotations- und Achsenstabilität auf.

Die Auswertung dieser beschriebenen Osteosyntheseverfahren erfolgte durch radiologische, histologische und torsionsmechanische Tests [98].

2.5 Amlodipin

Bei Amlodipin handelt es sich um einen lang wirkenden lipophilen Calciumkanalblocker aus der Gruppe der Dihydropyridine, der unter der Leitung von Dr. Simon Cambell entwickelt wurde. Er zählt zu den Calciumkanalblockern der 3. Generation, die durch eine Länge Halbwertszeit und eine bessere orale Verfügbarkeit gekennzeichnet sind [55]. Amlodipin wird in der Therapie der arteriellen Hypertonie, der chronisch stabilen Angina Pectoris und der vasospastischen (Prinzmetal-) Angina verwendet. Es gilt als Basistherapeutikum bei arterieller Hypertonie.

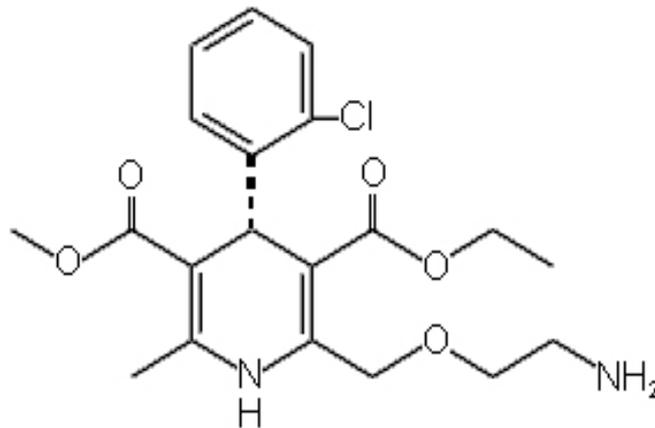


Abbildung 1: Struktur des Amlodipin

2.5.1 Struktur

Amlodipin ($C_{20}H_{25}ClN_2O_5$) hat ein chirales Zentrum und ist ein Racemat. Es liegt in Form des Salzes Amlodipinbesilat vor, welches in Wasser schwer löslich ist. Es existieren 2 Enantiomere, optische Isomere, ein aktives S-(-)- und ein nicht aktives R-(+)-Amlodipin [95].

2.5.2 Wirkmechanismus

Zu den pharmakologischen Eigenschaften von Amlodipin zählen die blutdrucksenkende, die gefäßdilatorische und die antiischämische Wirkung. Nach Gabe kommt es zur Senkung des peripheren Gefäßwiderstands. Dies senkt die Nachlast und in der Folge wird der myokardiale Sauerstoffverbrauch positiv beeinflusst. Formal handelt es sich bei Amlodipin um einen Typ II Calciumkanalantagonist.

Durch Blockade des Calciumkanals kommt es zu einer Verlangsamung des Calciumeinstroms in die glatten Muskelzellen. In der Folge kommt es zu einer Vasodilatation.

Fleckenstein [37] konnte Ende der 1960er Jahre zeigen, dass die Wirkung der Calciumantagonisten über die Blockade von spannungsabhängigen Calciumkanälen zu erklären ist. Diese L-Typ Calciumkanäle sind hauptsächlich für die Steuerung der Kontraktion der glatten Muskelzellen an den Gefäßen und den Myokardzellen am Herz verantwortlich. Durch den Calciumeinstrom kommt es, bei extrazellulär hoher und intrazellulär niedrigerer Konzentration, in diesen Zellen zu einer Kontraktion. Der Einstrom erfolgt über die spannungsabhängigen Calciumkanäle, welche durch Antagonisten wie Amlodipin gehemmt werden und den Einstrom somit verringern [56]. Hieraus resultiert, dass Calcium nicht an Calmodulin binden kann und die Myosinkinase nicht aktiviert wird. Dies führt im Weiteren dazu, dass unphosphoryliertes Myosin nicht an Aktin binden kann und die Kontraktion unterbleibt [56].

2.5.3 Pharmakokinetik

Bei der Pharmakokinetik unterscheidet man die Resorption, die Verteilung (Distribution) und die Plasmaeiweißbindung.

Nach oraler Einnahme von Amlodipin wird es gut im Magen-Darm-Trakt resorbiert, wobei die Spitzenkonzentrationen im Blut nach 6-12 Stunden erreicht werden. Es reichert sich bei einmal täglicher Verabreichung über einen Zeitraum von 1-1,5 Wochen im Steady-State an. Die maximale Bioverfügbarkeit beim Menschen beträgt ca. 64-80%. 97,5% des zirkulierenden Amlodipins ist an Plasmaeiweiße gebunden. Im Gegensatz zu vielen anderen Pharmaka ist die Aufnahme von Amlodipin ins Blut unabhängig von der Nahrungsaufnahme. Mit einer recht hohen Plasmahalbwertszeit von 40-60 Stunden ist eine ausreichende Bioverfügbarkeit bei einmal täglicher Einnahme gewährleistet, was auch die Patientencompliance bei der Einnahme erhöht. Nach Einnahme der Einzeldosis sinkt der Blutdruck allmählich über 4-8 Stunden und kann über 24-72 Stunden langsam zum Ausgangswert zurückkehren. Ein Reboundeffekt ist aufgrund dieser Pharmakokinetik nicht zu beobachten. Die Metabolisierung erfolgt größtenteils in der Leber, wobei der Firstpass-Effekt sehr gering ausfällt. Hier wird das Molekül zu inaktiven Metaboliten abgebaut. Die Ausscheidung erfolgt sehr langsam mit dem Urin. Hierbei werden bis zu 10% der Substanz unverändert ausgeschieden. Eine verlangsamte Elimination ist bei älteren Menschen zu beobachten. Eine Niereninsuffizienz wirkt sich nicht verlängernd auf die Elimination aus [2,36,55,169].

2.5.4 Indikation und Anwendung

Laut Fachinformation ist Amlodipin für die Therapie der arteriellen Hypertonie, der chronisch stabilen Angina pectoris und der vasospastischen (Prinzmetal-) Angina zugelassen. Bei der Prinzmetalangina kommt es zu einer durch vasospasmeninduzierten Ischämie des Myokards. Die genauen Gründe für diese Spasmen sind noch nicht abschließend geklärt, a.e stehen sie jedoch in Zusammenhang mit einer erhöhten Aktivität von Alphaadrenorezeptoren sowie dem Einfluss von vasokonstriktiven Substanzen wie Thromboxan A₂.

Neben den Calciumantagonisten kommen hier Nitrate zum Einsatz.

2.5.5 Nebenwirkungen

Die am häufigsten berichteten Nebenwirkungen von Amlodipin sind periphere Ödeme. Diese lassen sich jedoch verhindern, wenn die Arzneimittelaufnahme vor dem zu Bett gehen erfolgt und niedrigere Dosen verabreicht werden. Weitere unerwünschte Nebenwirkungen sind Schwindel, Müdigkeit, Kopfschmerzen, Herzklopfen und Übelkeit [36]. Weitere Nebeneffekte können Bauchschmerzen, Gingivahyperplasie und Müdigkeit sein.

2.5.6 Interaktionen

In Kombination mit anderen blutdrucksenkenden Medikamenten kann es zu einer überschießenden kreislaufdepressiven Wirkung kommen, so dass der Blutdruck über das gewünschte Maß hinaus abfällt. Grapefruitsaft induziert in der Leber das Cytochrom P 450, im speziellen die CYP 3A4, was dazu führt, dass der Abbau von Amlodipin nur noch verzögert stattfindet und es zu einer Kumulation von Amlodipin kommen kann. Dies ist jedoch bei einer Menge unter einem Liter pro Tag als unkritisch zu sehen. Darüber hinaus kann Amlodipin mit allen Arzneistoffen interagieren, die in ihrer Metabolisierung auf CYP 3A4 angewiesen sind. Hierzu zählen z.B. Hemmer der CYP 3A4 wie Azol-Antimykotika, die zu einem signifikanten Anstieg der Plasmakonzentration von Amlodipin führen [168].

2.5.7 Klinische Studien

In mehreren Vergleichs- und Anwendungsstudien wurde die Wirksamkeit von Amlodipin belegt.

In Vergleichsstudien wurde Amlodipin u.a. mit Diuretika, ACE-Hemmern und Angiotensinrezeptorblockern verglichen.

Im der Camelot Studie von 1991, in der Enalapril mit Amlodipin verglichen wurde, zeigte sich eine deutliche Reduktion für das Risiko eines nichttödlichen Myokardinfarkts und eines apoplektischen Insults bei KHK-Patienten [113].

Eine weitere Studie untersuchte die Wirkung von Lorsartan und Amlodipin auf die linksventrikuläre diastolische Funktion bei Patienten mit arteriellem Hypertonus. Ergebnis dieser Studie war, dass Amlodipin in Bezug auf das myokardiale Remodeling nicht unterlegen war [162].

Auch die ALLHAT (Antihypertensive Lipidsenkende Behandlung zur Verhinderung des Myokardinfarkts) Studie zeigte, dass Amlodipin Thiaziddiuretika oder ACE-Hemmern nicht unterlegen war [80].

2.6 Zielsetzung

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob die Behandlung mit Amlodipin eine Auswirkung auf die Frakturheilung im Mausmodell besitzt.

2.7 Fragestellung

Die Nullhypothese lautet: „Die Frakturheilung im Mausmodell wird durch die Gabe von Amlodipin nicht beeinflusst“.

3 Material und Methoden

3.1 Methoden

3.1.1 Studiendesign

Die unter der Versuchsnummer 24/2014 geführten Versuche wurden von der entsprechenden Behörde (Landesamt für Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittel- und Veterinärwesen- Zentralstelle -, Konrad-Zuse-Straße 11, 66115 Saarbrücken) genehmigt und am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes vom 01.10.1972 durchgeführt.

Die Studie wurde an 60 CD 1 Mäusen durchgeführt. 40 Tiere erhielten täglich Amlodipin, wovon 20 Tiere eine Dosierung von 3mg/kg/KG und 20 Tiere eine Dosierung von 1mg/kg/KG über eine Gastralsonde p.o. erhielten. 20 Tiere erhielten täglich eine äquivalente Menge an Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) p.o.. Die Frakturheilung wurde jeweils nach einem Zeitraum von 2 (n=30) und 5 (n=30) Wochen untersucht. Es wurden radiologische, biomechanische, histomorphometrische und Western Blot Untersuchungen durchgeführt.

Um eine höhere Anzahl an Versuchstieren zu verhindern, wurden die radiologischen, biomechanischen und histomorphometrischen Untersuchungen am selben Tier durchgeführt.

	Amlodipin		Kontrolle	
	2 Wochen	5 Wochen	2 Wochen	5 Wochen
Röntgen	n = 9	n = 10	n = 9	n = 9
Biomechanik	n = 8	n = 8	n = 7	n = 8
Histomorphometrie	n = 9	n = 9	n = 9	n = 5
Western Blot	n = 10		n = 5	

Tab. 1: Studiendesign

3.1.2 Tiermodell

Als Versuchstiere wurde CD 1 Mäuse im Alter zwischen 12 und 16 Wochen verwendet.

Die Mäuse waren alle weiblich und wurde im Institut für Klinisch- Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes gezüchtet. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% und einer Raumtemperatur zwischen 22-24°C gehalten. Der diurnale Rhythmus wurde durch eine 12-stündige Belichtung aufrechterhalten. Es wurden maximal drei Tiere pro Käfig gehalten. Die Ernährung erfolgte durch Standarddiätfutter in Form von Pellets und Aqua ad libitum.

Nach Frakturierung des Femurs erfolgte die ostesynthetische Versorgung mittels intramedullärer Zugschraube aus medizinischem Stahl. (MouseScrew™, RISystem AG, Davos, Schweiz) [74]. Die Schraube mit einer Länge von 17,2 mm und einem Durchmesser von 0,5 mm besitzt distal einen Konus von 0,8 mm, der zur Verankerung der Schraube in den Kondylen des distalen Femurs dient. Ein proximales Gewinde (Länge 4mm, Durchmesser 0,5 mm) mit einer 1mm langen Bohrung zur Aufnahme des Führungsdrahts sorgt für eine Kompression im Frakturspalt. Das Eindrehen der Schraube in den Knochen erfolgt mittels HandDrill (RISystem AG, Davos, Schweiz).

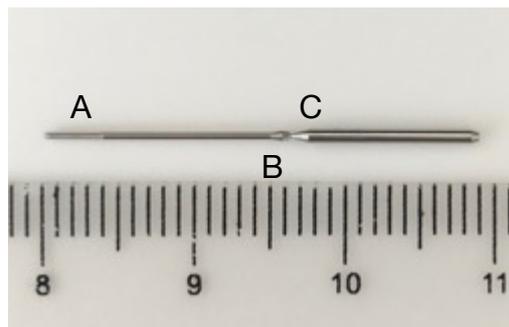


Abb. 2: MouseScrew™ - Gewinde (A), Konus (B), Sollbruchstelle (C); Schraubenlänge: 17,2 mm, Durchmesser: 0,5 mm, Material: medizinischer Stahl.

3.1.3 Operationsverfahren

Die Versuche fanden unter standardisierten Bedingungen im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar statt.

Die Operation der Mäuse erfolgte in Analgosedierung mit Ketamin und Xylazin. Hierbei erfolgte die Injektion von 15mg/kg Körpergewicht (KG) Xylazin (Rompun®2%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) und 75mg/kg KG Ketamin (Ursostamin® 100mg, Serumwerke Bernburg, Bernburg, Deutschland). Zum Schutz der Augen wurden den Mäusen Dexpanthenolsalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH) auf die Hornhaut aufgetragen.

Mittels Elektrorasierer wurden Ober- und Unterschenkel des rechten Beins rasiert und im Anschluss die Resthaare mittels Enthaarungscreme (elca-med®, ASID BONZ GmbH, Herrenberg, Deutschland) entfernt.

Nach erfolgter Enthaarung und Analgosedierung wurde die Maus in Rückenlage auf den Operationstisch gelagert. Danach wurde eine Hautdesinfektion mittels Softasept® N (B, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) durchgeführt. Vor dem Hautschnitt erfolgte durch Auslösen eines Schmerzreizes die Überprüfung der Narkosetiefe. Bei nicht ausreichender Narkosetiefe wurde eine Nachinjektion von Sedativa und Analgetika durchgeführt. Bei den nun erreichten optimalen Voraussetzungen und erneuter Desinfektion mittels Softasept® N wurde die Operation mit dem Hautschnitt begonnen. Dann wurde mit einer Skalpelklinge (Carbon Steel Skalpelklinge #15, Braun Aesculap AG&Co KG, Tuttlingen, Deutschland) verwendet. Dabei wurde das Bein zwischen Zeige und Ringfinger fixiert (Abb. 3) und die Haut medial der Patella auf einer Länge von ca. 6 mm inzidiert (Abb. 4). Im Anschluss wurde die Kniegelenkscapsel eröffnet und die Kniescheibe mittels Wattetupfer nach lateral mobilisiert. Nach Luxation konnte die Femurkondyle dargestellt werden (Abb.5). Nun wurde die Fossa intercondylaris mittels einer 24 G Spritzenkanüle (BD Microlance 3™-24G 1" – Nr. 1, Ø 0,55 x 25 mm- BD Drogheda, Ireland) (Abb. 6) eröffnet und bis in den Markraum retrograd vorgebohrt. Mit einer weiteren Anästhesie-Dentalkanüle mit einem Durchmesser von 27 G (Sterican® Einmalkanüle für die Dentalanästhesie O./U.-Kiefer. Leitungsanästhesie- Größe 30/42- G 27x1,5"/Ø 0,40 x 40 mm, Braun Melsungen, Deutschland) wurde der Markraum durchstoßen.

Durch weiteres Aufbohren wurde der Trochanter major sodann retrograd durchstoßen. Durch die nun einliegende Kanüle wurde ein 0,2 mm dicker Wolfram-Draht (Goodfellow Cambridge Limited, Huntington, England) eingeführt und als Schienung des

Femurknochens belassen, sodass er an beiden Enden ca. 1 cm über den Knochen herausragte. (Abb. 8) Danach wurde die noch einliegende Kanüle entfernt. Nach Überprüfung der intramedullären Lage des Drahts (Abb.9) wurde die Maus in einer Guillotine positioniert und anschließend eine standardisierte geschlossene Fraktur (Typ A2 bis A3 nach AO-Klassifikation [106]) (Abb. 10) erzeugt.

Diese Fraktur wurde anschließend mittels MouseSrew™ [74] durch Implantation einer Zugschraube über den Führungsdraht versorgt (Abb. 11). Nach fester Verankerung im proximalen Femur und sicherer Arretierung des Konus am distalen Femur kam es bei weiterer Drehbewegung zum Brechen der Sollbruchstelle. Die Patella wurde durch ein Wattestäbchen in ihre ursprüngliche Position reponiert und anschließend die Gelenkkapsel mit einem 5.0 Prolene® Faden (Ethicon Inc., Somerville, USA) (Abb. 13) verschlossen. Die Hautnaht erfolgte ebenfalls mit 5.0 Prolene® Nahtmaterial (Abb.14).



Abb. 3: Fixation des rechten Beines während der OP; Patellarsehne transkutan sichtbar.

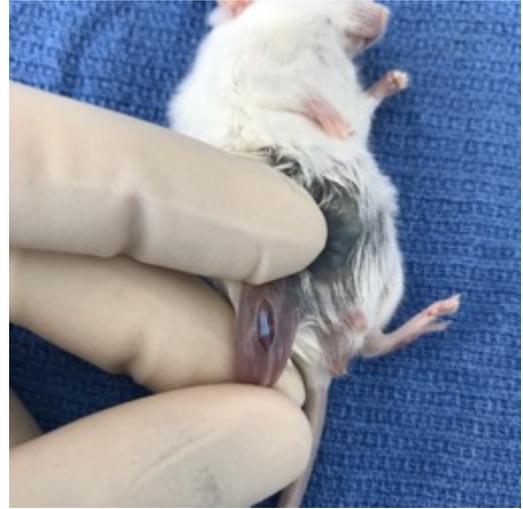


Abb. 4: Senkrechter Hautschnitt medial der Patellarsehne.

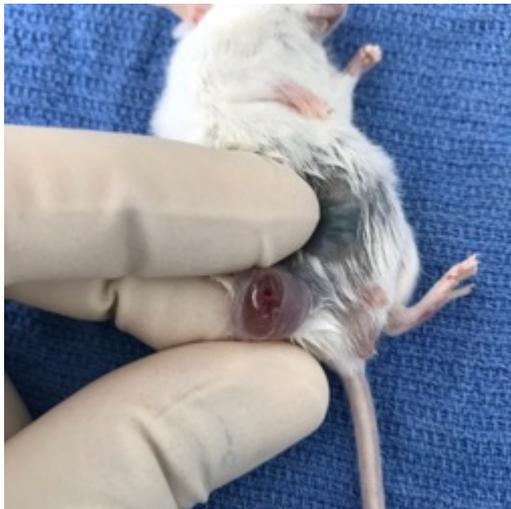


Abb. 5: Nach Luxation der Patellarsehne nach lateral, Sicht auf den Kondylus des Femurs.



Abb.6: Interkondyläres Aufbohren der Femurkortikalis und Einführen der Kanüle 24 G in den Markraum.



Abb. 7: Einführen der Kanüle 27 G in den Markraum und Punction der Rückenhaut.



Abb. 8: Intramedulläre Lage des Führungsdrahtes.



Abb. 9: Röntgenologische Kontrolle der intramedullären Lage des Führungsdrahtes.



Abb. 10: Erzeugung der Fraktur mittels 3-Punkt-Biege-Vorrichtung.



Abb. 11: Einführen der Kompressionsschraube mit dem Schraubendreher.

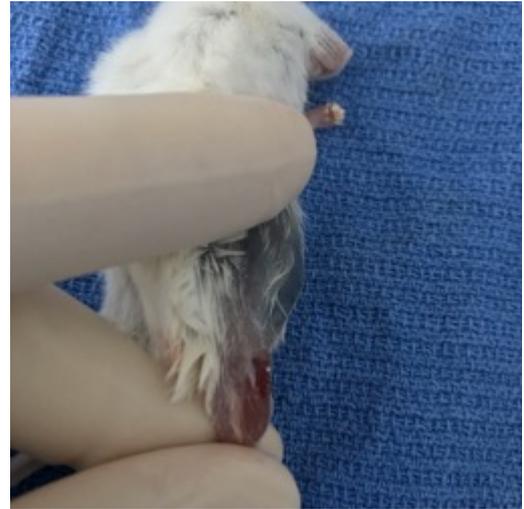


Abb. 12: Abschließende Lage der Kompressionsschraube nach Verankerung.



Abb. 13: Patellarsehennah.

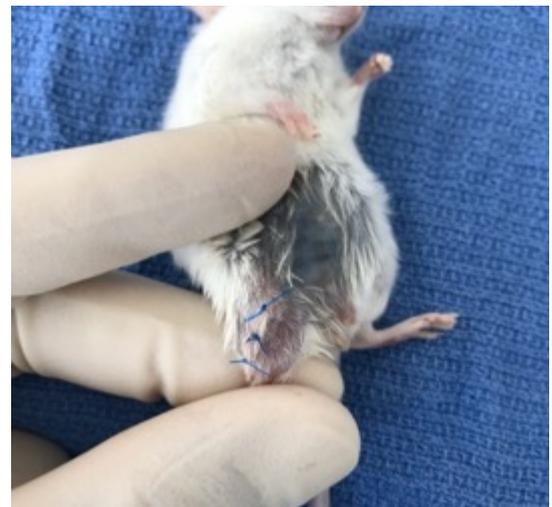


Abb. 14: Hautverschluss mit Einzelknopfnähten.

3.1.4 Medikamentenapplikation

Je nach Gruppe wurden die Mäuse täglich mit Natriumchlorid (Kochsalzlösung 0,9%, Miniplasco connect, B.Braun Melsungen AG, Deutschland), Amlodipin (1A Pharma® 5 mg N) 1mg/kg/KG und 3 mg/kg/KG über fünf bzw. zwei Wochen gefüttert. Die Amlodipinlösung wurde durch Mörsern der Tablette erzeugt. Die Applikation erfolgte mittels Knopfkanüle (Acufirm Knopfkanüle gerade, 1,0 x 40mm, Ernst Kratz GmbH, Deutschland) oral. Hierzu wurde die Maus mit der linken Hand im Nacken und an den Beinen fixiert und mit der rechten Hand die Applikation des Medikaments bzw. der isotonen Kochsalzlösung bei der Kontrollgruppe durchgeführt.

3.1.5 Tötung der Tiere

Nach zwei bzw. fünf Wochen erfolgte eine erneute radiologische Kontrolle des Femurs der Versuchstiere. Hierzu wurde eine Narkose wie beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere mittels Genickbruch getötet und die Femora zur weiteren Untersuchung ausgebaut und asserviert.

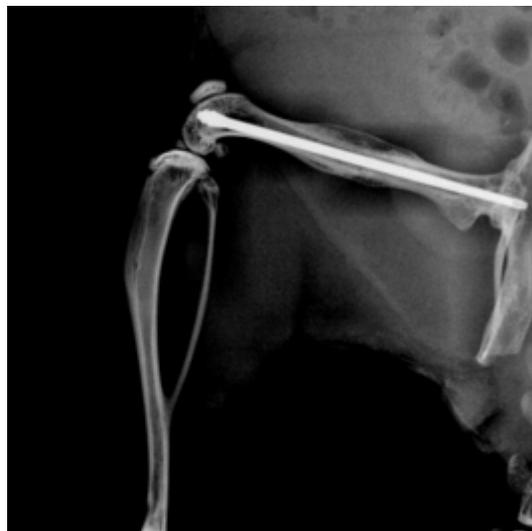


Abb.15 Röntgenbild 5 Wochen postoperativ mit sichtbarer Kallusbildung.

3.1.6 Präparation der Knochen

Um eine weitere Auswertung der Knochen durchführen zu können, mussten beide Femora explantiert werden. Hierzu wurde die tote Maus in Bauchlage verbracht und die Haut auf der kompletten Strecke über den Femora, vom Tibiaplateau bis hin zur Hüfte, eröffnet. Im Anschluss folgte die Durchtrennung der Patellarsehne mittels Skalpell und Präparation des Femurknochens durch Entfernen der Oberschenkelmuskulatur von Tibia bis zum Becken.

Im nächsten Schritt wurde der Femurknochen an der Hüftkapsel exartikuliert, so dass der komplette Femurknochen entfernt werden konnte. Das nun noch am Oberschenkelknochen verbliebene Weichteilgewebe wurde exzidiert. Mit einem Explantationsinstrument wurde aus dem rechten Femur die implantierte Schraube entfernt. Während des kompletten Explantationsvorgangs war ein ständiges Benetzen mit NaCl 0,9% (Isotone Kochsalzlösung, Fa. B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) nötig, um ein Austrocknen zu verhindern.

Nach abgeschlossener Entfernung eines Femurs wurde dieser zunächst in mit NaCl 0,9% befeuchtete Tupfer eingeschlagen, um ein weiteres Austrocknen zu verhindern und, nach Ausbau beider Femora, in Formalin 4% bis zur weiteren Auswertung konserviert und bei -80°C eingefroren.

Für die Western Blot Untersuchung erfolgte das Vorgehen analog. Hier wurde das komplette Kallusgewebe der frakturierten Femora abpräpariert und bis zur Auswertung bei -80°C im Gefrierschrank (MDF-U55V, PHC Europe B.V., Den Haag, Niederlande) kryokonserviert.

3.2 Zielkriterien und Auswertung

3.2.1 Radiologie

Die explantierten Femora wurden nach zwei und fünf Wochen Frakturheilung dorsoventral digital geröntgt. Die Aufnahmen (Abb. 16) wurden mittels Röntgengerät (MX-20-Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, IL, USA) mit einer Belichtungszeit von 10s und einer Spannung von 26kV angefertigt. Die Beurteilung der Knochenheilung erfolgte anhand des Goldbergscores.

Score	
0	fehlende knöcherner Überbauung des Frakturspaltes
1	partielle Überbauung des Frakturspaltes
2	komplette knöcherner Überbauung des Frakturspaltes

Tab. 2: Goldberg-Score



Abb. 16: Röntgenbild zur radiologischen Auswertung

3.2.2 Biomechanik

Die präparierten Femora der Maus wurden je nach Gruppe nach zwei bzw. fünf Wochen der biomechanischen Testung zugeführt. Bei dieser Testung wurde eine 3-Punkt Biegung vorgenommen, ohne den Knochen zu zerstören. Hierbei wurde die Kallussteifigkeit [N/mm] mittels speziell hierfür konstruierter Apparatur (Mini-Zwick Z 2.5 - Zwick GmbH, Ulm, Deutschland) gemessen und schließlich computergestützt

ausgewertet. Die Messung wurde immer im Vergleich zur gesunden Seite des Mausfemurs durchgeführt, um interne Messfehler auszuschließen. Im Anschluss wurde die Steifigkeit der kranken frakturierten Seite mit der gesunden Seite ins Verhältnis gesetzt und sowohl absolut als auch relativ in Prozent ausgewertet. Um standardisierte Bedingung zu erreichen war es nötig, die Knochen immer gleich in die Biegeeinrichtung zu legen. Dies geschah, indem die dorsale Seite des Knochens und die Kondylen kranial zum Bolzen der Biegeeinrichtung zeigten. Der Abstand zwischen den zwei unteren Stempeln betrug konstant 6 mm, die Kraftmessung erfolgte kontinuierlich mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/min. Die Biegefestigkeit wurde im linearen Teil des Kraft-Weg-Diagramms bestimmt.



Abb. 17: Positionierung des Femurs in der 3-Punkt-Biege-Einrichtung.

3.2.3 Histologie

Nach der biomechanischen Auswertung wurden die verheilten Femora für einen Zeitraum von 12-24 h in Zink-Lösung (CH Zinc Fixativ, BD Biosciences Pharmingen™, San Jose, CA, USA) fixiert, anschließend 2 Wochen in 13%iger EDTA Lösung bei einer Temperatur von 4°C entkalkt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 1 Stunde mit 70%, 80%, 90% sowie viermal eine Stunde mit 100% Alkohol) entwässert. Im Anschluss erfolgte eine Behandlung mit Xylol von 3 mal 1 h, um eine Paraffingängigkeit im Gewebe zu erreichen. Danach wurden die Knochen für eine weitere Stunde in heißes Paraffin gegeben und zu Paraffinblöcken „gegossen“. Aus diesen fertigen Blöcken wurden dünne, 5µm dicke Schnitte aus dem Bereich des maximalen Kalluswachstums in longitudinaler und sagitaler Schnittführung angefertigt.

Die anschließende Färbung erfolgte mit der Trichrome Masson Goldner Methode. Die Digitalisierung der histologischen Schnitte nach Mikroskopie (Zeiss Axio Vision 3.1 und Zeiss Axio Cam, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) erfolgte bei einer 1,25-fachen Vergrößerung (Olympus BX 60 Mikroskope, Olympus, Tokio, Japan). Die digitale Auswertung der histologischen Schnitte wurde mittels Bildbearbeitungsprogramm (Image J Analysis System, U.S. National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) durchgeführt. Es wurde folgende Parameter bestimmt:

- Periostale Gesamtkallusfläche [mm²]
- Knöcherner Anteil innerhalb des periostalen Kallus [mm²]
- Knorpeliger Anteil innerhalb des periostalen Kallus [mm²]
- Bindegewebiger Anteil innerhalb des periostalen Kallus [mm²]

Nach Gerstenfeld et al. [44] wurden auf Grundlage der erhobenen Messdaten folgende Zielwerte berechnet:

- Anteil von Knochengewebe an der Gesamtkallusfläche:

$$\frac{\text{Knochenfläche innerhalb der Kallusregion (TOTAr)}}{\text{Gesamtkallusfläche (CAr)}} [\%]$$

- Anteil von Knorpelgewebe an der Gesamtkallusfläche:

$$\frac{\text{Knorpelfläche innerhalb der Kallusregion (CgAr)}}{\text{Gesamtkallusfläche (CAr)}} [\%]$$

- Anteil von Bindegewebe an der Gesamtkallusfläche:

$$\frac{\text{Bindegewebsfläche innerhalb der Kallusregion (FTAr)}}{\text{Gesamtkallusfläche (CAr)}}$$

3.2.3.1 Trichrom-Masson-Goldner-Färbung

Die Trichrom-Masson-Goldner-Färbung ist eine Färbetechnik, bei der die Molekülgröße des Farbstoffs ausschlaggebend für die Färbung ist.

Neben histologischen Präparaten von vielen Organen und Strukturen eignet sich diese Färbemethode besonders gut, um Knochen und umgebende Strukturen darzustellen.

Hierbei imponieren kollagenes Bindegewebe grünlich, der Knochen stellt sich leuchtend grün dar, das Zytosol rötlich, Muskulatur blassrot und die Zellkerne braunschwarz.

Nach der Färbung mit Eisenhämatoxylin nach Weigert werden mehrere disperse Farbstoffe aufgetragen. Hierzu zählen Säurefuchsin, Ponceau de Xyldin, Orange G und Lichtgrün. Diese können simultan oder nacheinander angewendet werden. Die Differenzierung zwischen den einzelnen Färbungsschritten erfolgt mittels Phosphorwolframsäure.

Gewebestruktur	Farbe
Zytoplasma	Hellorange bis rot
Erythrozyten	orangerot
Muskelgewebe	blassrot
Mineralisierter Knochen	Leuchtend grün
Kollagenes Bindegewebe	Grün

Tab. 3: Zelluläres und extrazelluläres Färbeverhalten bei der Trichrom Masson-Goldner-Färbung.

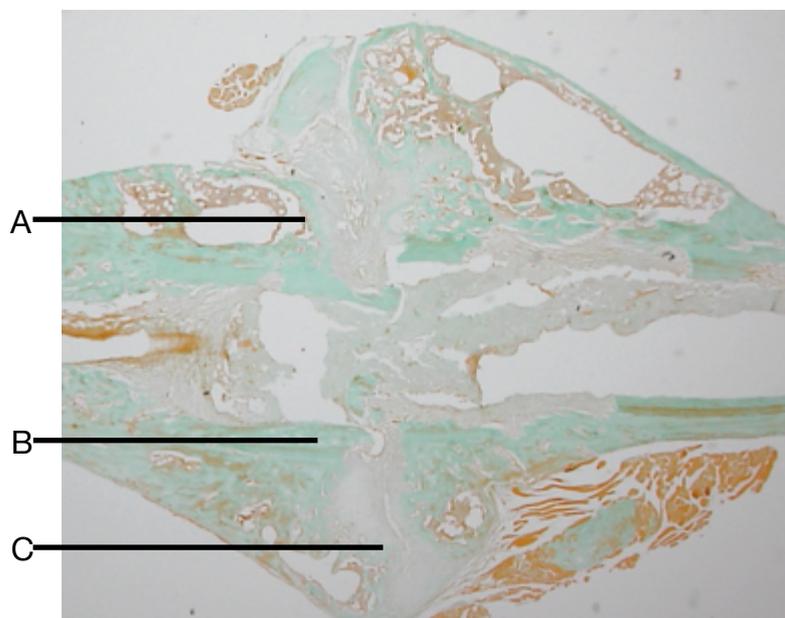


Abb. 18: Sagittaler, longitudinaler Schnitt durch das Femur (Trichrom Masson-Goldner-Färbung): Bindegewebe (A) Knochen (B) Knorpel (C)

3.2.4 Western Blot

Die Proteinexpression innerhalb des Kallusgewebes wurde mittels Western Blot Analyse bestimmt. Die Untersuchungsgruppe für den Western Blot rekrutierte sich aus insgesamt 15 Versuchstieren, 5 in jeder Versuchsgruppe, die nach 2-wöchiger Frakturheilung untersucht wurden.

Nach Entnahme der rechten Femora wurde das gesamte Kallusgewebe (knorpelige und bindegewebige Anteile) isoliert und im Anschluss direkt mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Eine Kryokonservierung erfolgte bis zur Auswertung bei einer konstanten, kontinuierlichen Temperatur von -80°C im Tiefkühlschrank. Bei der Auswertung wurde die Proteinexpression folgender Marker bestimmt:

Morphogenetic protein-2 (BMP-2) und -4 (BMP -4), cytein-rich protein (CYR) 61, vascular endothel growth factor (VEGF), osteoprotegerin (OPG) und receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL).

Zur Bestimmung der Marker wurde in einem ersten Arbeitsschritt das Kallusgewebe in Lysepuffer (10 mM Tris pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5% Triton-X 100, 0,02% NaN_3 , 0,2mM PMSF und Protease Inhibitor Cocktail und Protease Inhibitor Cocktail 2 (je 1:100 v/v; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) homogenisiert. Im Anschluss erfolgte eine 30-minütige Inkubation aus Eis und eine Zentrifugation mit $16000 \times g$ bei 4°C . Eine Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit der Lowry-Methode. Die komplette Proteinprobe (10 μg Protein pro Bahn) wurde diskontinuierlich auf Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel getrennt und auf Polyvinylendifluorid-Membrane übertragen. Danach erfolgte die Blockade von nicht spezifischen Bindungsstellen, bevor die Membranen für 4 Stunden mit den folgenden Antikörpern inkubiert wurden. Rabbit Anti-Mouse BMP-2 und Rabbit Anti-Mouse BMP-4 (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland), Goat Anti-Mouse CYR 61 (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland), rabbit Anti-Mouse VEGF (1:20, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland), Rabbit Anti-Mouse OPG (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) und Mouse Anti-Mouse RANKL (1:300, Abcam, Cambridge, England). In der Folge wurden die Membranen für 15 Stunden mit korrespondierenden Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörpern (1:5000, GE Healthcare Amersham, Freiburg Deutschland) intubiert.

Eine Sichtbarmachung der Proteinexpression erfolgte mittels Verwendung von Luminol-enhanced Chemiluminescence (GE Healthcare Amersham, Freiburg, Deutschland).

Eine densitometrische Beurteilung erfolgte (Quantity one, Geldoc, BioRad, München Deutschland). Um ungleiche Beladung zu korrigieren, erfolgte eine Normalisierung auf

das jeweilige β -Actin-Signal (1: 20.000, anti- α -Tubulin, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland).

Protein	Funktion
BMP-2	Knochenformationsmarker
BMP-4	Knochenformationsmarker
CYR61	Marker der Knochen- und Knorpelbildung sowie Angiogenese
OPG	Inhibition der Osteoklastogenese
RANKL	Stimulation der Osteoklastogenese
VEGF	Stimulation der Angiogenese

Tab.4: Übersicht der in der Western Blot Untersuchung bestimmten Wachstumsfaktoren.

3.3 Statistik

Die in dieser Arbeit vorliegenden statistischen Daten wurden als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Nach primärer Prüfung der Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und F-Test zur Überprüfung der Varianzgleichheit wurde ein Gruppenvergleich mittels Student's t-Test durchgeführt. Wurde keine Normalverteilung erreicht, kam es zur Anwendung des Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Die Statistische Auswertung wurde unter Zuhilfenahme von SigmaPlot 13.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) erstellt. Das Signifikanzniveau lag bei einem p-Wert $< 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Radiologie

Bei der radiologischen Untersuchung zeigte sich im Beobachtungszeitraum von 2- bzw. 5- Wochen, dass der Goldberg-score in beiden Gruppen nach Gabe von Amlodipin höhere Werte im Vergleich zur Kontrolle auswies. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$).



Abb. 19: Röntgenbilder der Femora: Kontrollgruppe: 2 Wochen(A) 5 Wochen (B) postoperativ Amlodipin 1mg/kg/KG 2Wochen (C) 5 Wochen (D) postoperativ, Amlodipin 3mg/kg/KG 2 Wochen (E) 5 Wochen (F) postoperativ

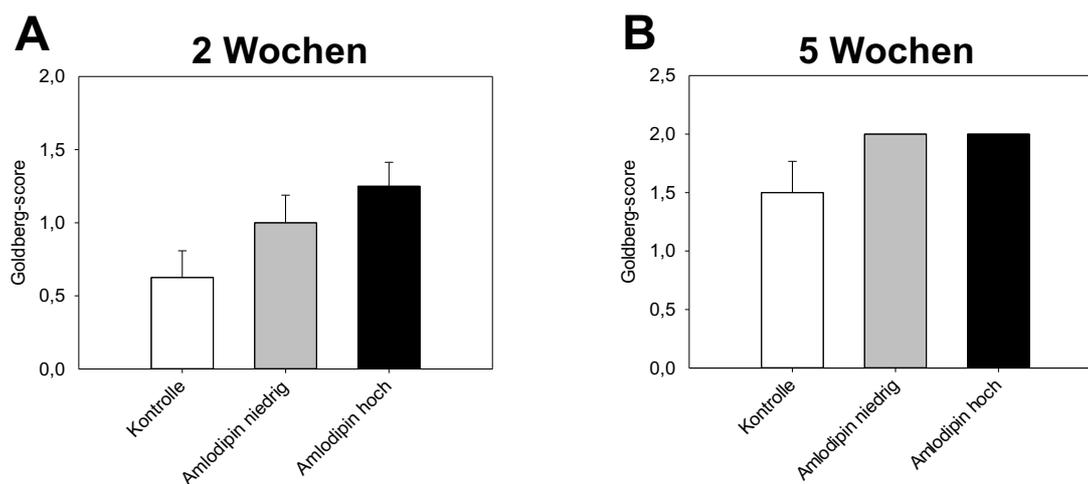


Abb.20: Goldberg-Score: Kontrollgruppe (weiße Skalierung, n=8), Amlodipin niedrige Dosis 1mg/kg/KG (graue Skalierung, n=8), Amlodipin hohe Dosis 3mg/kg/KG (schwarze Skalierung, n=8) nach 2 Wochen (A) und 5 Wochen (B) nach Frakturheilung. MW \pm SEM.

4.2 Biomechanik

Die Biegefestigkeit wurde mittels 3-Punkt-Biegung bestimmt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt sowohl als Absolutwert [N/mm] als auch relativ in Prozent [%] zur nichtfrakturierten Gegenseite. Dies lässt die Berücksichtigung von individuellen Unterschieden zu.

Die biomechanische Analyse der Femora zeigte sowohl nach einem Beobachtungszeitraum von zwei (Abb. 21 A, 22 A), als auch nach fünf Wochen (Abb.21 B, 22 B), eine erhöhte absolute, als auch relative Biegefestigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe. Statistisch war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant.

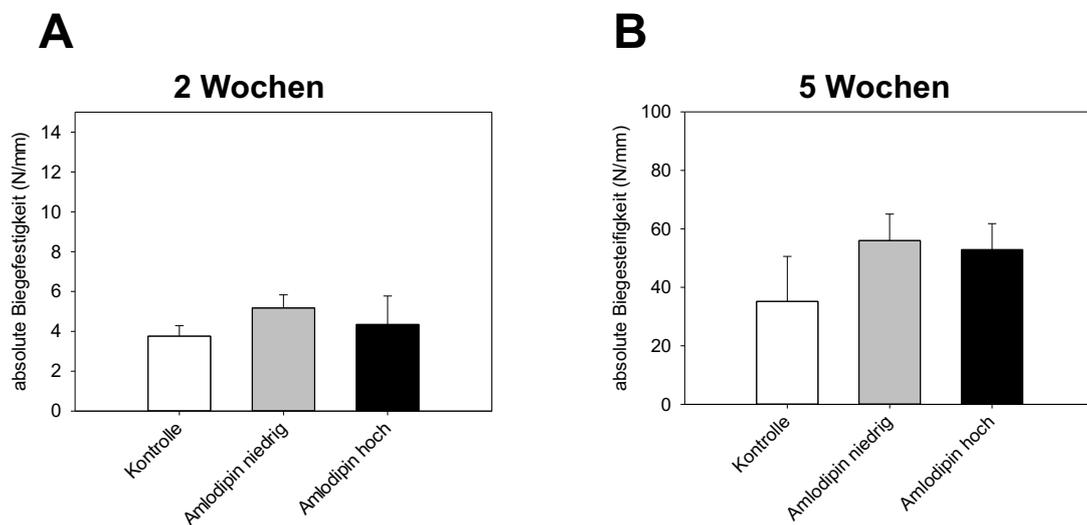


Abb.21: Absolute Biegefestigkeit der frakturierten Knochen. 2 Wochen postoperativ (A) 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM.

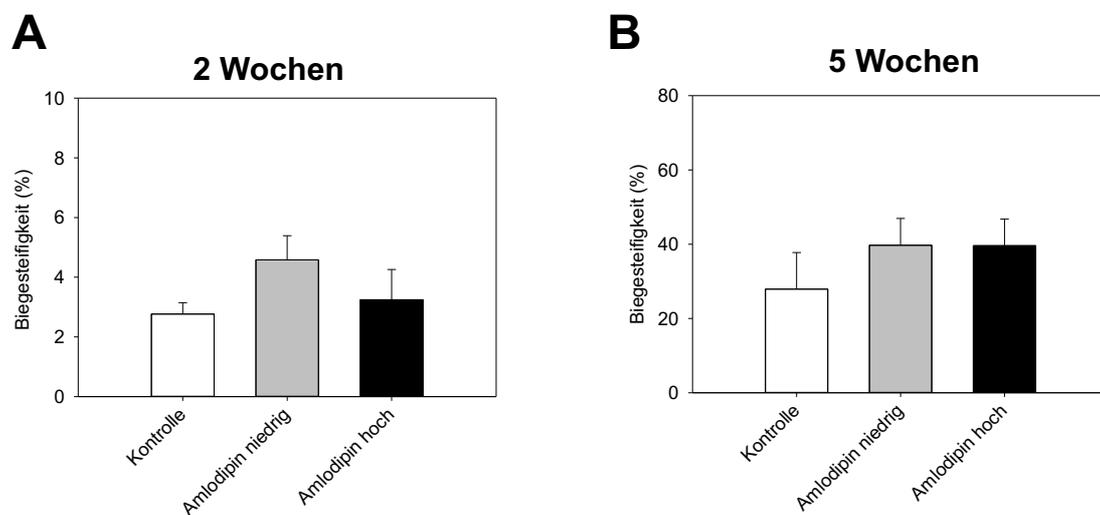


Abb. 22: Relative Biegefestigkeit der frakturierten Knochen. 2 Wochen postoperativ (A). 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM.

4.3 Histologie

Die histologische Analyse des Frakturkallus wurde am sagitalen longitudinalen Schnittpräparat in Höhe des maximalen Kallusdurchmessers durchgeführt.

Die Auswertung zeigte in allen 3 Studiengruppen (hohe Dosis Amlodipin, niedrige Dosis Amlodipin und Kontrollgruppe mit NaCl 0,9%) eine sekundäre Frakturheilung mit hierfür typischer Kallusbildung einschließlich intramembranöser und enchondraler Ossifikation (Abb. 23). Das Knochengewebe war 2 Wochen und auch 5 Wochen postoperativ sowohl in der Gruppe, welche eine hohe Dosierung Amlodipin erhielt, als auch in der Gruppe, die eine geringere Dosis Amlodipin erhielt, signifikant erhöht.

Die Menge an Knorpelgewebe war 2 Wochen postoperativ, im Vergleich zur Kontrolle, in beiden Amlodipingruppen signifikant erniedrigt. 5 Wochen postoperativ zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Nach 5 Wochen war nahezu kein Knorpelgewebe mehr nachweisbar.

Der Bindegewebsanteil unterschied sich 2 Wochen postoperativ nicht signifikant.

5 Wochen postoperativ war sowohl nach Gabe von 1mg/kg/KG als auch bei 3 mg/kg/KG Amlodipin signifikant weniger Bindegewebe nachweisbar.

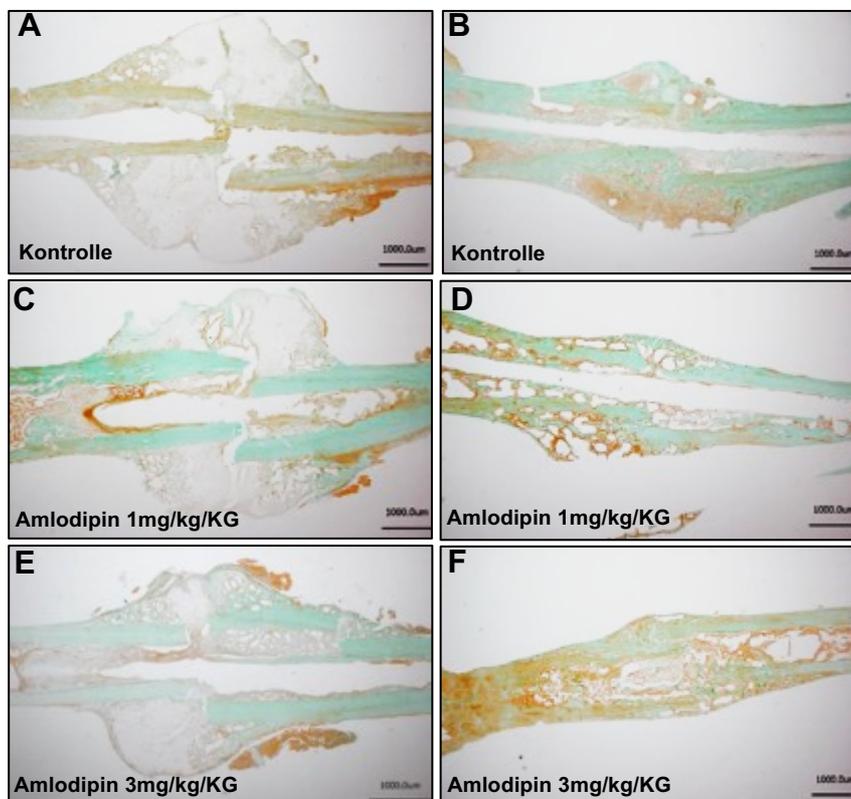


Abb.23: Histologische Schnittpräparate in Trichrom-Masson-Goldner-Färbung: Kontrolle 2 Wochen (A), Kontrolle 5 Wochen (B), Amlodipin 1mg/kg/KG 2 Wochen (C), Amlodipin 1mg/kg/KG 5 Wochen (D), Amlodipin 3mg/kg/KG 2 Wochen (E), Amlodipin 3mg/kg/KG 5 Wochen (F)

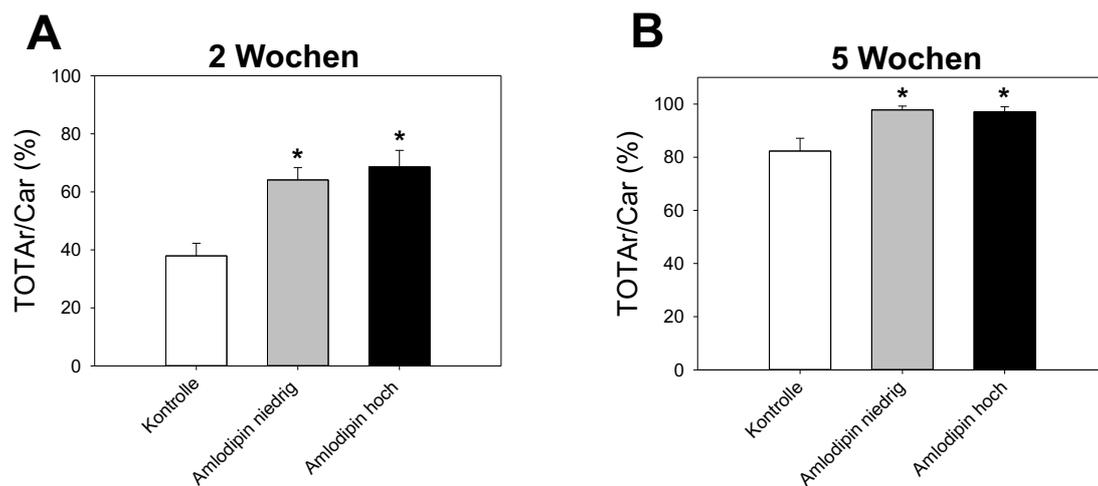


Abb. 24: Knochenanteil im periostalen Kallusgewebe. 2 Wochen postoperativ (A). 5 Wochen postoperativ (B). \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

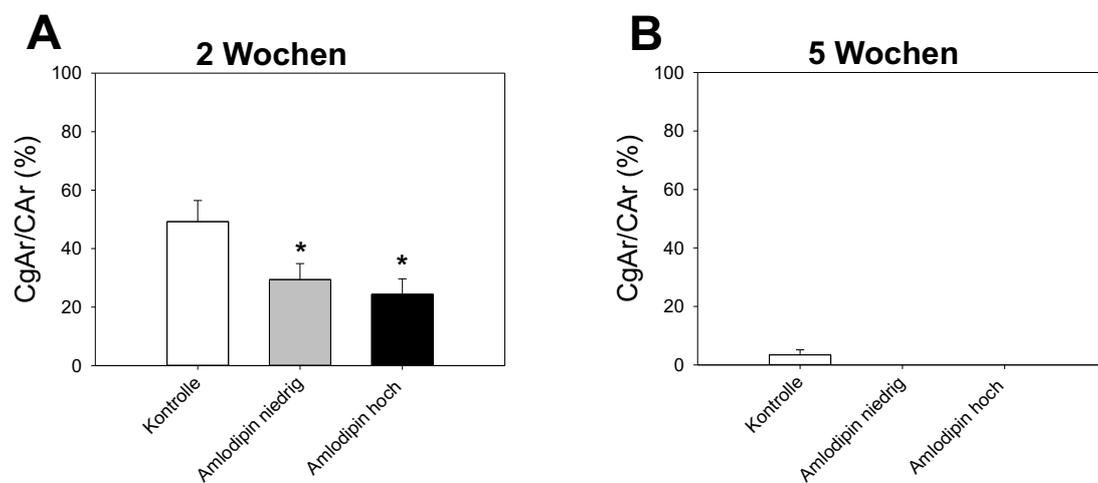


Abb. 25: Knorpelanteil im periostalen Kallusgewebe. 2 Wochen postoperativ (A). 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

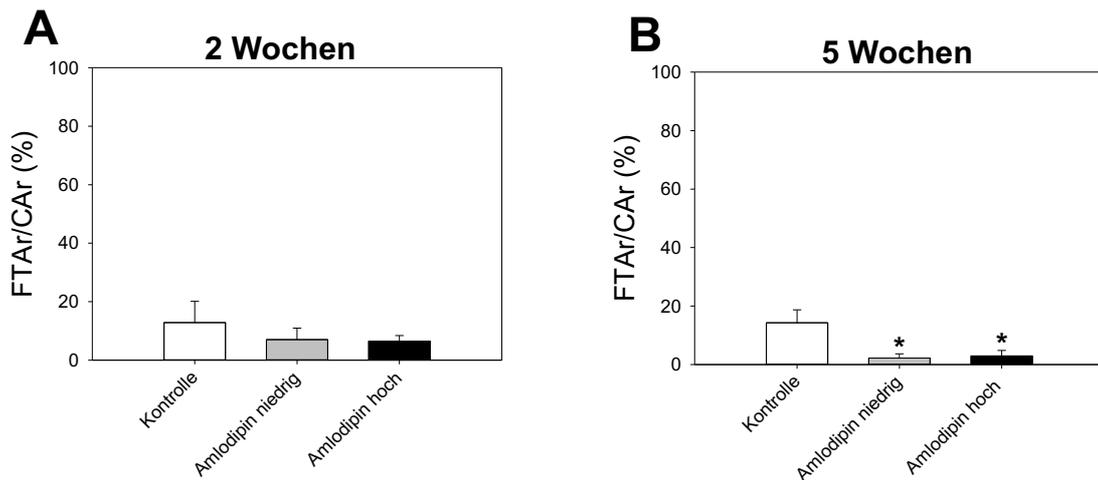


Abb. 26: Bindegewebeanteil im periostalen Kallusgewebe. 2 Wochen postoperativ (A). 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.4 Western Blot

Die Analyse Proteinexpression im Kallusgewebe erfolgte zwei Wochen postoperativ. Hier zeigte sich, dass eine Behandlung mit niedriger und hoher Amlodipindosis zu einer signifikanten Erhöhung der BMP-2 Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe führt. Darüber hinaus war auch eine erhöhte Expression von BMP-4 nach Behandlung von Amlodipin mit hoher und niedriger Dosierung nachweisbar. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Bei der Analyse der Expression von Cyr 61 war ein leichter Anstieg in der Gruppe nach höherer Dosierung gegenüber der niedrigdosierten Gruppe und mit NaCl 0,9% behandelten Tiere zu finden. Dieser war jedoch nicht signifikant. Zudem war die Expression von VEGF zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich.

Die Expression von OPG, einem Inhibitor der Osteoklastengenesese, war bei der niedrigdosierten Gruppe ($12,7 \pm 2,2$) fast zwei- und bei der höherdosierten Gruppe fast vierfach ($32,6 \pm 5,5$) erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe ($7,4 \pm 2,3$). RANKL, ein Stimulator der Osteoklastogenese, war sogar vierfach ($3,1 \pm 0,8$) erhöht bei der niedrigdosierten Amlodipingruppe und achtfach erhöht ($5,7 \pm 1,1$) bei der höherdosierten Gruppe im Vergleich zur Kontrolle ($0,7 \pm 0,1$). Dies führte zu einer Abnahme des OPG/RANKL-Verhältnisses sowohl in der niedrigdosierten als auch in der hochdosierten Amlodipingruppe.

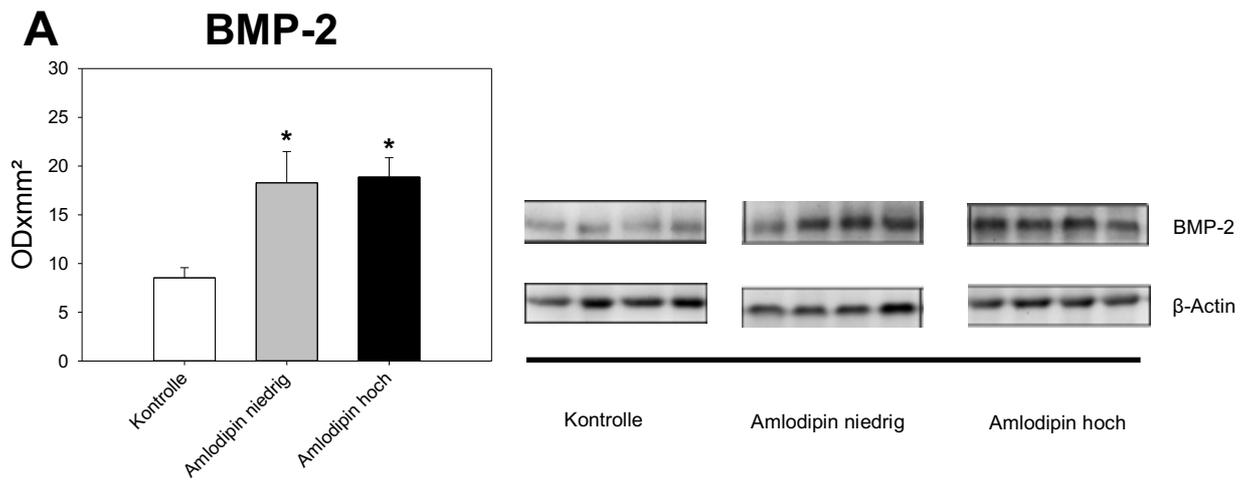


Abb. 27: Western Blot Analyse von BMP-2 (A) vs. Kontrolle. MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

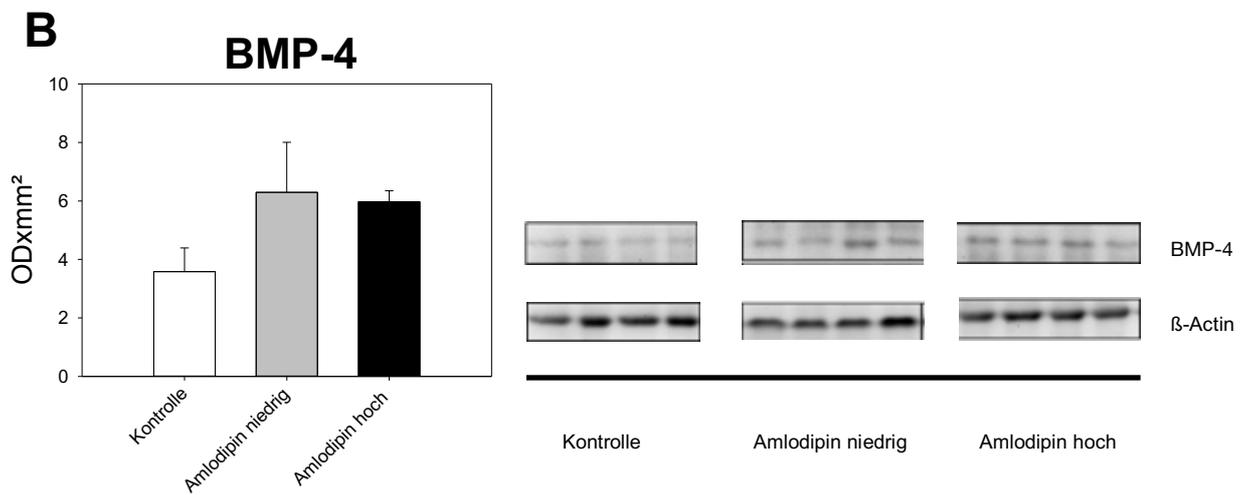


Abb. 28: Western Blot Analyse von BMP-4 (B) MW \pm SEM.

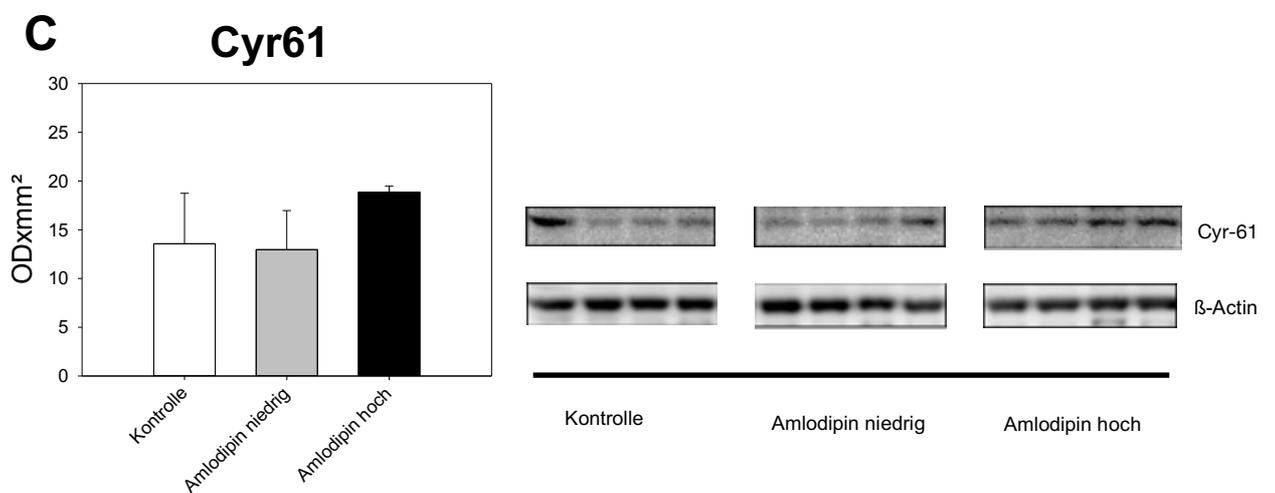


Abb. 29: Western Blot Analyse von Cyr61 (C) MW \pm SEM.

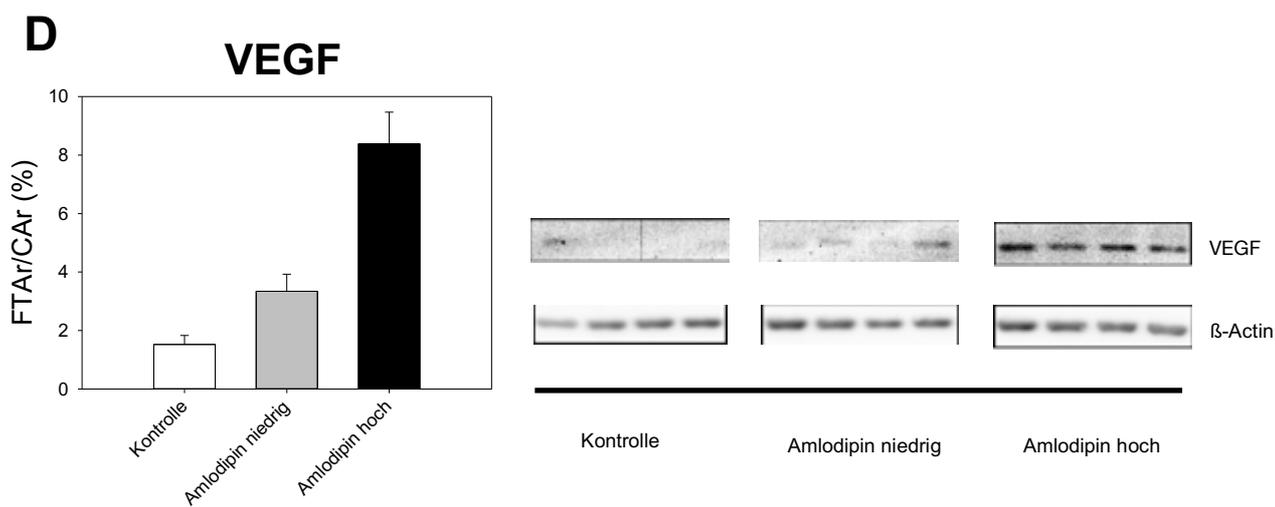


Abb. 30: Western Blot Analyse von VEGF (D) MW \pm SEM.

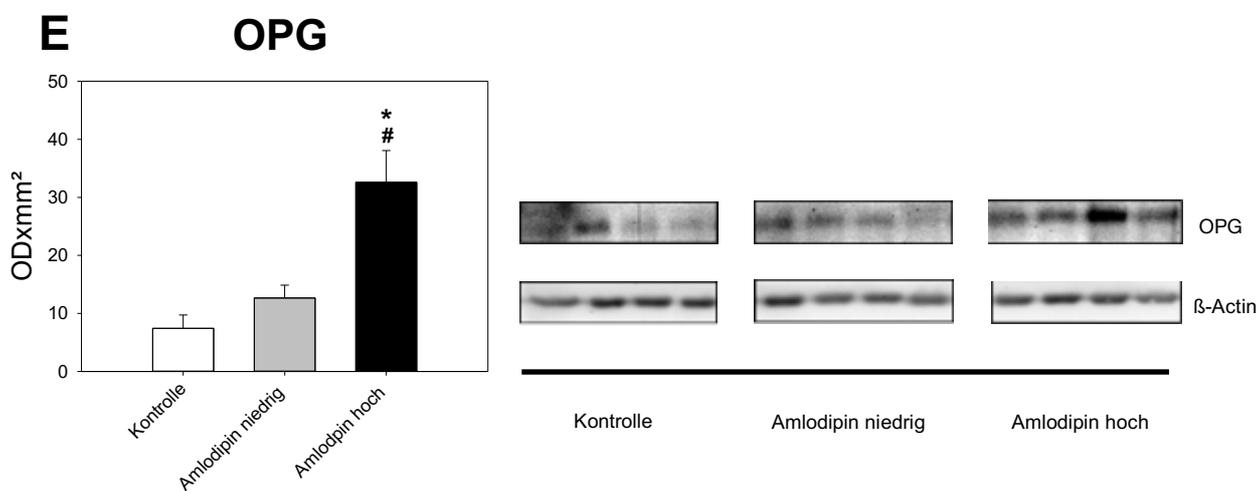


Abb. 31: Western Blot Analyse von OPG (E) MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle. # $p < 0,05$ vs. Amlodipin niedrig.

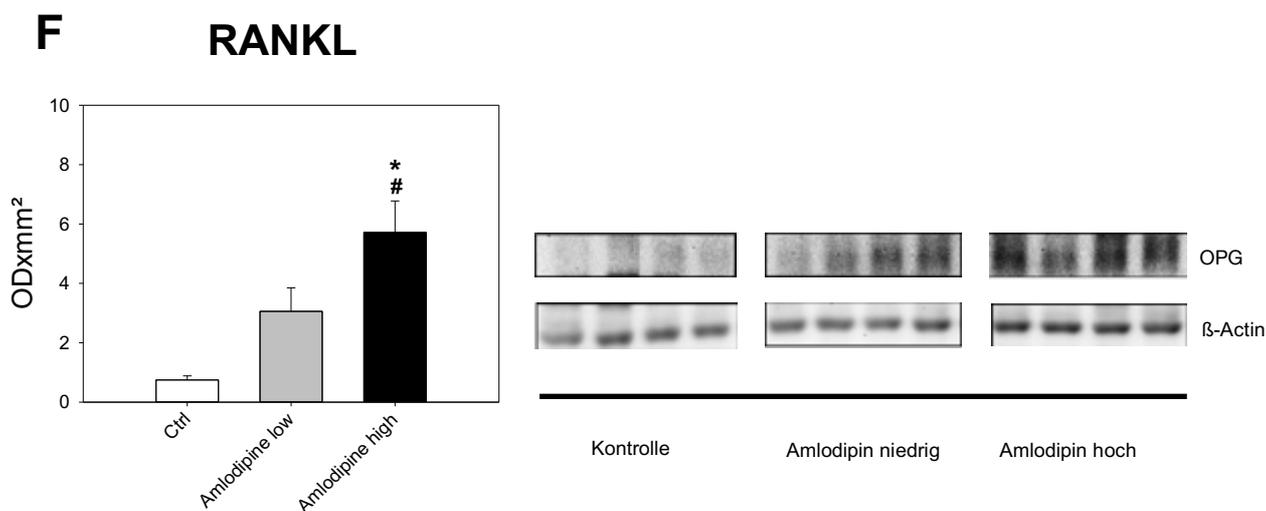


Abb. 32: Western Blot Analyse von RANKL (F) MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle. # $p < 0,05$ vs. Amlodipin niedrig.

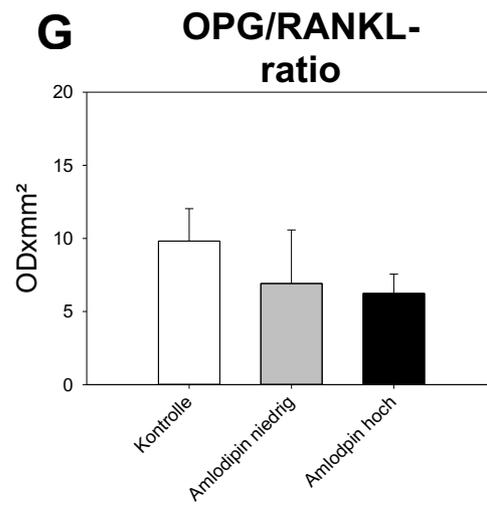


Abb. 33: Western Blot Analyse: Quotient OPG/RANKL (G) MW ± SEM.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

Bis heute sind die sehr komplexen pathophysiologischen und biochemischen Mechanismen der Knochenheilung und Regeneration immer noch nicht vollständig untersucht. Sie sind Gegenstand zahlreicher Studien, um ein besseres Verständnis über die Knochenheilung und somit auch der damit verbundenen Therapie zu erlangen. Die bisher erlangten Erkenntnisse aus dem Bereich der Grundlagenforschung stammen zum größten Teil aus Untersuchungen am lebenden Organismus. Im Tiermodell lässt sich das Zusammenspiel vieler Faktoren von Zellen und Geweben während der Knochenheilung sehr gut analysieren. Trotz zunehmenden Fortschritten in der Entwicklung von Alternativen zur Beurteilung der Knochenheilung, ist es bisher nicht gelungen, alle Schritte und Komponenten dieses hochkomplexen Vorgangs *ex vivo* abzubilden. Es gibt mittlerweile viele Modelle, die auf computergestützter Technik basieren und als Simulationsmodelle im Einsatz sind. Darüber hinaus ist es auch gelungen, die Knochenheilung am 3D Modell mit Hilfe von menschlichem Zellmaterial zu simulieren [77]. Diese „gezüchteten“ knochenähnlichen Gewebe kommen dem physiologischen Gewebe sehr nah. So wird auch ein Frakturhämatom, welches bei Zerreißen von Gefäßen im Rahmen einer Fraktur entsteht, simuliert. Äußere Einflüsse, die auf einen lebenden Organismus wirken, wie z.B. Blutdruck, Herz-Zeit-Volumen oder ähnliches, lassen sich jedoch an *Ex-Vivo*-Modellen kaum darstellen. Vor allem die zu Beginn der Knochenheilung initiierte inflammatorische Phase mit multidimensionalen proteinbiochemischen Prozessen ist nicht in Gänze darstellbar [46]. So ist das Tiermodell bei der Erforschung dieser hochkomplexen, verschiedenartigen biomolekularen Abläufe nach wie vor der Goldstandard und in der weiteren Erforschung der Knochenheilung unverzichtbar [122].

Bei der Wahl der Versuchstiere unterscheidet man prinzipiell 2 Tiermodelle. Zu einem sind dies Großtiere wie Rinder, Schafe, Schweine, Pferde, Hunde und zum anderen Kleintiere wie Kaninchen, Ratten oder Mäuse.

Bei der Auswahl des Versuchstiers müssen die Vor- und Nachteile analysiert werden. So bietet das Großtiermodell oftmals bessere anatomische Gegebenheiten in Bezug auf den Menschen. Damit kann eine operative Versorgung technisch einfacher realisiert werden.

Als nachteilig erweist sich jedoch bei den Großtiermodellen die Anschaffung und der große logistische Aufwand, was die Betreuung, Unterbringung und Versorgung betreffen. Des Weiteren sind vor allem medikamentöse Studien deutlich teurer.

Der entscheidende Vorteil bei Kleintieren ist die in der Regel weniger aufwändige und somit auch kostengünstigere Haltung der Tiere [1]. Somit können auch größere Gruppe untersucht werden.

Der Vorteil des Mausmodells ist der, dass das Genom bereits vollständig entschlüsselt ist. Hierdurch ist es möglich, auch genetisch modifizierte Tiere zu untersuchen. So existieren viele Stämme transgener Mäuse sowie spezifische Antikörper [65].

Diese modifizierten Stämme eignen sich im Besonderen zur Erforschung und Untersuchung von molekularen Mechanismen der biochemischen und pathophysiologischen Prozesse während der Knochenheilung und Regeneration [111,131].

Die Maus besitzt einen dem Menschen sehr ähnlichen Knochenstoffwechsel, was eine Vergleichbarkeit bezüglich diesem erlaubt [65,125].

Als Nachteil erweist sich jedoch der Aufbau des Knochens im Mausmodell. Dieser unterscheidet sich von dem des Menschen, so dass eine Übertragung der Ergebnisse kritisch diskutiert werden muss. Der murine Knochen besitzt kein Haversssystem, sondern so genannte Resorptionshöhlen, die in unmittelbarer Nähe zur Fraktur entstehen und durch Osteoblasten beim Remodellingprozess aufgefüllt werden. Die Funktionsweise ist zwar vergleichbar, jedoch nicht identisch [114].

Darüber hinaus bleibt die Epiphysenfuge der Maus während des kompletten Lebens geöffnet und verschließt sich zu keinem Zeitpunkt. Das Trabekelwerk im Epiphysenbereich ist gegenüber Großtieren und dem Menschen weniger ausgeprägt. Für die Untersuchung der Frakturheilung am Mausmodell wurden bereits vielzählige Frakturmodelle entwickelt [65,104,117,125]. Diese Modelle unterscheiden sich bezüglich der Art, der Lokalisation und der Versorgung der Fraktur [65].

Am murinen Modell wurden hier an Rippen, Tibia und Femur unterschiedliche Untersuchungen vorgenommen [24,78,98].

In der vorliegenden Arbeit wurde das etablierte Frakturmodell des Femurs bei erwachsenen CD 1 Mäusen verwendet.

Ferner ist dieses Modell dadurch gut mit anderen Studien aus der Vergangenheit vergleichbar.

Hierbei wurde das Femur nach Fraktur operativ mittels intramedullärer Zugschraube versorgt.

Das Femur bietet aufgrund seiner homogenen Form gegenüber anderen Knochen und Knochenpartien der Maus, wie z.B. der Tibia deutlich bessere Untersuchungsbedingungen, vor allem biomechanisch.

Obwohl das Frakturmodell der Tibia [60] bereits in sehr vielen Studien verwendet wurde, weist das Mausmodell gewisse Nachteile auf.

So kommt es gerade bei geschlossener Frakturierung der Tibia häufig zu Begleitverletzungen im Sinne einer Fibulafraktur. In der sich anschließenden Knochenheilung bildet sich ein Kallus zwischen beiden Knochen mit Synostose zwischen Fibula und Tibia, so dass eine isolierte Beurteilung der Heilung im Bereich der Tibia nicht erfolgen kann und die biomechanische Untersuchung maßgeblich beeinflusst werden [139].

Darüber hinaus erweist sich die Tibia bei der systematischen biomechanischen Testung aufgrund ihrer morphologischen Konfiguration als nachteilig gegenüber dem gleichmäßigen runden Querschnitt des Femurs. Die Weichteildeckung ist geringer als am Femur, was das Entstehen von Infektionen im Bereich der Fraktur fördern kann und die Heilung beeinträchtigt.

Sowohl bei der Tibia als auch beim Femurknochen im Mausmodell ist aufgrund der kleinen Dimensionen großes handwerkliches Geschick erforderlich [73]. So weist das Femur bei einer Länge von durchschnittlich 15 mm lediglich einen Durchmesser von 1,5 mm auf. Die technische Anfertigung von Osteosynthesematerial stellt sich deshalb als schwierig dar.

Das in dieser Studie verwendete Frakturmodell mittels intramedullärer Schraube wurde 2009 von Holstein et. al. eingeführt [74]. Seitdem wurde die Schraube bereits in vielen Studien zur Untersuchung der Knochenheilung eingesetzt [64,67,68,70,117].

Die verwendete intramedulläre Schraube (Mousescrew®) ist eine Zugschraube. Durch den distalen Konus und das proximale Gewinde erlaubt die Schraube eine Frakturspaltkompression. Somit ist nicht nur eine Rotationsstabilität gewährleistet, sondern auch eine axiale Stabilität [74].

Bei den bereits in der Vergangenheit angewendeten Modellen mit einem Pin oder einer einfachen Kanüle war dies nicht der Fall [73,99]. Bei fehlender Rotationsstabilität lassen sich keine vergleichbaren und standardisierten Untersuchungsbedingungen schaffen. Dies liegt vor allem daran, dass die mechanischen Gegebenheiten im Frakturspalt einen sehr entscheidenden Einfluss auf die Frakturheilung haben [28,61].

Durch die minimale Invasivität beim Einbringen der Schraube und der standardisierten geschlossenen Fraktur mittels Guillotine gehört dieses Verfahren zu den geschlossenen Frakturmodellen [61,74].

Die Beurteilung der Knochenheilung erfolgte nach einem Zeitraum von zwei bzw. fünf Wochen postoperativ.

Die Wahl dieser Beobachtungzeiträume begründet auf bereits durchgeführte Studien. Grundsätzlich läuft die Heilung bei der Maus schneller ab als beim Menschen.

Studien von Mannogrosso und O'Connor beschrieben eine maximale Kallusbildung im Mausmodell nach Marknagelosteosynthese nach zwei Wochen. Eine knöcherne Durchbauung des Kallus war nach knapp vier Wochen und ein Remodelling nach sechs Wochen zu beobachten [99].

Dabei dient der Zeitraum von zwei Wochen dazu, Aussagen über die frühe Frakturheilung zu treffen. Der Zeitpunkt von fünf Wochen gewährleistet eine Aussage über die spätere Frakturheilung.

Auch können hierdurch Rückschlüsse auf einen kurz- und einen langfristigen Effekt der Amlodipintherapie auf die Frakturheilung geschlossen werden.

Ein bis drei Tage postoperativ konnte ein physiologischer Bewegungsablauf ohne Schonen und mit normaler Belastung der betroffenen Extremität bei den Mäusen beobachtet werden. Es zeigten sich keine Wundheilungsstörungen oder Zeichen einer Infektion.

Amlodipin wurde mittels Handmörser zu Pulver verarbeitet, in der Folge in Wasser gelöst, und dann über eine Sonde oral in einer Dosierung von 1mg/kg/KG bzw. 3mg/kg/KG verabreicht. Die Dosierung zur Therapie eines Hypertonus beträgt in der Regel zwischen 5 mg und 10 mg einmal täglich. Dies entspricht einer Dosierung von ca. 0,06-0,13 mg/kg/KG. Bei geriatrischen Patienten beträgt die Dosis 2,5mg einmal täglich. Bei Kindern unter 6 Jahren beträgt die Dosis 0,05-0,2 mg/kg/Kg pro Tag [154]. Somit kam hier eine wesentlich höhere Dosis des Medikaments zum Einsatz, als dies in der Therapie des hypertensiven Krankheitsbilds der Fall ist. Bei anderen tierexperimentellen Studien zur Knochenheilung unter Amlodipin wurden andere Dosierungen des Medikaments genutzt. Bei einer Untersuchung zur Frakturheilung bei Frakturen des Ramus mandibularis im Rattenmodell wurden Dosierungen von ca. 0,16mg/kg/KG eingesetzt. Hier wurde die Dosis jedoch nicht für jedes Tier genau am Gewicht adaptiert, sondern jede Ratte, deren Durchschnittsgewicht 250 g betrug, bekam 0,04mg Amlodipin oral einmal täglich [105].

Bei Untersuchungen zur antireproduktiven Wirkung von Amlodipin bei Ratten wurde ebenfalls eine Dosierung von 0,4mg/d über einen Zeitraum von 30 Tagen verabreicht. Die Applikation erfolgte jedoch s.c., das Durchschnittsgewicht belief sich auf $170,2 \pm 2,3g$ [5].

In einer weiteren Studie von Atalay et al. wurde eine Mischung von Amlodipin und plättchenreichem Plasma auf die Knochenheilung untersucht.

Hier wurde ebenfalls 0,04 mg Amlodipin bei der Ratte mit Tibiadeфекt täglich verabreicht [8].

Die Dosierungen von Amlodipin, wurden anhand von kardiologischen Studien gewählt. So haben Civantos et. al 2004 Untersuchungen nach Gabe von Amlodipin, bei hypertensiven Ratten in einer Dosierung von 1mg/kg/KG am Tag im Trinkwasser untersucht [27].

Im Anschluss an die oben beschriebenen Beobachtungszeiträume wurde die Femora nach Tötung der Tiere mittels Genickbruch zu weiteren radiologischen, biochemischen, histomorphologischen und biomechanischen Untersuchungen asserviert.

Zur Auswertung der Biomechanik können verschiedene Untersuchungen durchgeführt werden. Hierzu zählen u.a. der 3-Punktbiegeversuche, 4-Punkt-Biegeversuche oder auch Rotationstestungen. In der vorliegenden Arbeit wurde die 3-Punkt-Biegung verwendet. Dieses Verfahren stellte eine etablierte Testung zur Untersuchung der Biomechanik ohne Zerstörung des Knochens dar. Die Biegefestigkeit wird in einem Kraft-Weg-Diagramm dargestellt und kann in der Folge ausgewertet werden [61].

Nach Burstein et. al stellt die 4-Punkt-Biegung biomechanisch das beste Testverfahren dar, da hier die Kraft auf eine größere Fläche verteilt wird [17].

Bei einer sehr kurzen Femurlänge im Mausmodell (ca. 15-17 mm) konnte diese Testung nicht angewendet werden [145].

Die Rotationstestung in Bezug auf die Frakturfestigkeit ist ebenfalls ein mögliches Verfahren, um die Stabilität der Fraktur nach der Heilung zu überprüfen.

Der Nachteil der Rotationstestung ist jedoch der, dass der Knochen nicht zerstörungsfrei untersucht werden kann, so dass der Knochen nicht für weitergehende Untersuchungen zur Verfügung steht. Dies hätte zur Folge, dass sich die Anzahl der Versuchstiere deutlich erhöht.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

In dieser Studie wurde die Wirkung von Amlodipin auf die Frakturheilung im murinen Modell untersucht. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass Amlodipin die Heilung verbessert, indem es die Knochenneubildung im Kallusgewebe induziert. Bei der Analyse zeigte sich zudem eine verringerte Menge an Knorpel- und Bindegewebe im Kallus im Vergleich zur Kontrollgruppe, was für eine Beschleunigung des Frakturheilungsprozesses spricht.

Die verbesserte Knochenheilung nach Gabe von Amlodipin war mit einer erhöhten Biegefestigkeit, einer verstärkten Expression der osteogenen Faktoren BMP-2 und BMP-4 sowie einer erhöhten Expression des angiogenen Faktors VEGF verbunden. Die Gewebeverteilung im Kallus unterschied sich hinsichtlich der Dosierung nicht.

Calciumkanalantagonisten sind in der Therapie des arteriellen Hypertonus häufig eingesetzte und weit verbreitete Medikamente. Darüber hinaus finden sie Einsatz bei der Therapie der koronaren Herzkrankheit, vasospastischer, chronischer stabiler Angina pectoris, bei Achalasie, Raynaudsyndrom, pulmonaler Hypertonie und bei Herzrhythmusstörungen.

Klinische und experimentelle Studien bestätigen den Kalziumkanalblockern die Fähigkeit, kardiovaskuläre Ereignisse durch eine effektive Reduktion des Blutdrucks zu senken [27,97].

Man unterscheidet bei den Kalziumkanalblockern drei verschiedene Arten bzw. Typen. Hierzu zählen der Phenylalkyltyp, der Benzothiazepintyp und der Dihydropyridintyp.

Amlodipin gehört zu den Calciumkanalantagonisten vom Dihydropyridintyp.

Dieses Medikament wirkt als Kalziumkanalantagonist hemmend auf den Kalziumeinstrom durch spannungsgesteuerte transmembranäre L-Typ Kalziumkanäle. Dies führt zu einer Abnahme der intrazellulären Kalziumkonzentration und somit zu einer Entspannung der glatten Muskelzellen, v.a. in Gefäßen und an den Herzmuskelzellen. Dies wiederum führt zu einer Abnahme der Schlagkraft (Inotropie), zu einer Reduktion des systemischen Gefäßwiderstandes und somit zu einer Reduktion des Blutdrucks. Im Weiteren ist eine Wirkung auf das Reizleitungssystem beschrieben. Hier kommt es durch die Hemmung spezialisierter Zellen, die für die Erregungsausbreitung und Erregungsleitung am Herzen verantwortlich sind, zu einer Abnahme der Aktivität. Dies führt zu einer Verlangsamung der Überleitung (Dromotropie) [30].

Die Vermittlung dieser Funktion in den spezialisierten Zellen erfolgt vornehmlich über T-Typ Calciumkanäle. Diese sind an der Schrittmacherfunktion im Sinus- und AV Knoten beteiligt [82].

Darüber hinaus haben sie auch Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel. Arbeiten der Arbeitsgruppe Halici et al. 2008 zeigten, dass die Einnahme von Amlodipin protektiv auf den Knochen in ovariectomierten Ratten wirkt. Sowohl in einer niedrigen Dosis (1mg/kg/KG) als auch in einer hohen Dosis (3mg/kg/KG) konnte eine signifikant höhere Calcium- und Phosphatkonzentration gemessen werden [54].

In einer weiteren Arbeit wurde die Wirkung von Kalziumkanalantagonisten auf den Knochen im Rattenmodell nach Ovariectomie und inflammatorisch induzierter Osteoporose untersucht. Es wurde gezeigt, dass die Knochendichte im ovariectomierten Rattenmodell in der Kontrollgruppe signifikant niedriger war im Vergleich zu den Tieren, die einen Kalziumantagonisten erhielten. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit Amlodipin produktiv wirkt und die Expression von Runx 2 um das 3-4-fache steigerte. So konnte postuliert werden, dass Kalziumkanalblocker (Amlodipin und Lavidipin) einen neuen therapeutischen Ansatz in der Therapie der Osteoporose darstellen könnten [81].

Zivna et al. untersuchten die Wirkung von Amlodipin auf den osteopenischen Knochen nach Orchiectomie bei spontan hypertensiven Ratten.

Es wurden verschiedene Knochenmarker, die Knochendichte und die biomechanischen Eigenschaften untersucht. Ergebnis der Untersuchung war, dass Amlodipin keinen negativen Einfluss auf die Knochendichte und den Knochenstoffwechsel hat [165].

In unseren Untersuchungen konnte ebenfalls eine vermehrte Knochenbildung nachgewiesen werden. Sowohl in hoher (3mg/kg/KG) als auch in niedriger Dosierung (1mg/kg/KG). Dies ist wahrscheinlich durch die erhöhte Expression von BMP-2 und BMP-4 bedingt.

Die Bedeutung von BMP 2 auf den Knochenstoffwechsel und den Knochenbau wurde vielfach untersucht.

Bei Knockout Kaninschen konnte gezeigt werden, dass ohne den Effekt von BMP-2 die Knocheneigenschaften und das Wachstum deutlich verschlechtert war. Das Gesamtkörpergewicht war um 20 % reduziert. Bei der Analyse des Knochens der Tibia

zeigte sich eine Verringerung der Größe und des Volumens des kortikalen und spongiosen Anteils. Die biomechanischen Untersuchungen der Tibia zeigte eine 30%ige Verringerung der Kraft gegenüber der Kontrollgruppe. Somit konnte gezeigt werden, dass BMP 2 eine wichtige Rolle für das Wachstum, die Struktur und die Stärke des Skeletts spielt [101].

Nishiya et al. untersuchten bereits im Jahr 2001 den Effekt verschiedener Antihypertensiva auf die Funktion der Osteoblasten und somit auf die Knochenheilung. Grundlage der Studie war die Beobachtung, dass viele Studien einen Zusammenhang zwischen Bluthochdruck und einem erhöhten Risiko für Knochenverlust aufzeigten. Während der Differenzierung exprimieren Osteoblasten Kollagen Typ I, alkalische Phosphatase und andere Knochenmatrixproteine und unterliegen schließlich einer Mineralablagerung. Die Untersuchung erfolgte an klonalen MC3T3-E1 Zellen. Es wurde gezeigt, dass es durch die Gabe von Calciumkanalblockern vom Dihydropyridin-Typ, wie z.B. Amlodipin, zu einer erhöhten Aktivität der alkalischen Phosphatase kam. Darüber hinaus blockierten diese Substanzen den spannungsabhängigen Calciumeinstrom an Calciumkanälen vom L-Typ. Die Kollagenakkumulation wurde nicht beeinflusst. Es wurde gezeigt, dass Amlodipin die In-Vitro Mineralisation erhöhte [112].

Somit lässt sich postulieren, dass in der vorliegenden Untersuchung die verstärkte Expression von BMP's im Kallus eine Stimulation der Osteoblasten ausgelöst hat. BMP-2 induziert die Knochenbildung in vivo durch die Stimulation der Differenzierung von mesenchymalen Stammstellen und Knochenvorläuferzellen zu Osteoblasten [25,103].

Orth et al. untersuchten die Heilung von atrophen Pseudarthrosen. Sie konnten zeigen, dass nach Einbringen von BMP-2 beschichteten Mineral-Coated-microparticles (MCM) eine signifikant höhere Biegefestigkeit nachgewiesen werden konnte. Die histologische Auswertung zeigte ferner, dass der Kallus größer war, mehr Knochengewebe und weniger Bindegewebe enthielt. Nach 10 Wochen war eine vollständige Knochendurchbauung zu sehen. Dies spricht dafür, dass die Anwendung von BMP-2 beschichteten Mineral-Coated-Microparticles die Knochenheilung in Pseudarthrosen verbessert [116].

Rivera et al. konnten bei Untersuchungen an Stammzellen zeigen, dass durch BMP 2 und BMP 4 die Knochenbildung durch Beeinflussung der Zytokinfreisetzung verbessert

war [128]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass BMP 4 die Expression von VEGF stimuliert.

In einem aktuellen Review von Garcia J et al. 2020 wurde gezeigt, dass miRNAs über eine Stimulation von BMPs bei lokalem Einsatz die Knochenbildung fördern [43].

Dubey et al. konnten zeigen, dass bei der Zusammenführung eines 3-D Gerüsts aus makro-/mikroporöser nanofaseriger Cellulose und niedrigdosierten mesenchymalen Mauszellen aus BMP-2 eine verbesserte Sekretion und Reifung der Knochenmatrix gegenüber nicht mit BMP-2 exprimierten Zellen bestand [32].

In der vorliegenden Arbeit konnten wir ebenfalls eine erhöhte Expression von VEGF nach Gabe von Amlodipin nachweisen. VEGF gilt als wichtiger Faktor sowohl für die Gefäßneubildung als auch für die Bildung von Endothel. Weitere wichtige Funktionen sind die stimulierende Wirkung auf Makrophagen und Monozyten. Darüber hinaus ist VEGF auch an der pathologischen Angiogenese beteiligt und mit vielen Tumoren assoziiert [19]. VEGF spielt jedoch auch eine entscheidende Rolle bei der Knochenheilung. Eine ausreichende Vaskularisation ist unabdingbare Voraussetzung für eine suffiziente Knochenheilung und eine ausreichende Nährstoffzufuhr [18].

Eine Hemmung von VEGF und somit der Signalübertragung führt zu einer Beeinträchtigung der Knochenheilung.

So konnten Hausmann et al. 2001 zeigen, dass die Heilung im Rattenmodell nach Gabe eines VEGF-Inhibitors (TNP-470) deutlich verschlechtert war [18].

Li et al. zeigten, dass eine Behandlung mit VEGF bei Frakturen der Tibia zur besseren Heilung führt. Es wurden 3 Gruppen gebildet. Bei der ersten wurde die Fraktur mit VEGF transfundierten Fibroblasten behandelt, bei der zweiten nur mit Fibroblasten und die dritte Gruppe erhielt eine Behandlung mit NaCl 0,9%. Nach einem Beobachtungszeitraum von 12 Wochen war in der VEGF Gruppe eine signifikant höhere Heilung und Ossifikation über den kompletten Defekt nachweisbar.

Diese Ergebnisse zeigten, dass eine zellbasierte Gentherapie mit VEGF einen signifikanten Effekt durch verstärkte Angio- und Osteogenese bei der Heilung eines Segmentdefekts im Tibiaknochen von Kaninchen besitzt [90].

Cyr 61 spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Knochenheilung. So stimuliert dieses Protein die Differenzierung und Proliferation der Osteoblasten und vermittelt somit eine gesteigerte Produktion der Knochensubstanz.

Im Rahmen von Untersuchung des Wnt-Signalwegs konnte bei der osteogenen Differenzierung von pluripotenten Stammzellen gezeigt werden, dass die Stimulation der Stammzellen mit Wnt3A eine vermehrte Expression von Cyr61 und CCN1 aufwies. Ebenso führte der durch RNA-Interferenz vermittelte Abbau der CCN1/Cyr61-Expression zu einer Verringerung der Wnt3A induzierten osteogenen Differenzierung.

Es wurde nachgewiesen, dass exogen exprimiertes CCN1/Cyr 61 zudem die Migration von mesenchymalen Stammzellen förderte [140].

Cyr61 wirkt als extrazelluläres Signalmolekül im menschlichen Knochen. Die Regulation erfolgt durch 1α , 25-Dihydroxyvitamin D(3) [89].

Frey et al. untersuchten die Wirkung von Cyr61 auf die Kallusregeneration nach einem akuten Muskel-Skeletttrauma am Kaninchen. Es konnte gezeigt werden, dass die lokale Therapie von Cyr61 einen positiven Effekt auf die Knochenheilung in diesem Traumamodell beim Kaninchen besitzt. Die Regeneration des Kallus war sowohl in der histologischen als auch in der radiologischen und biomechanischen Analyse besser als in der Kontrollgruppe [39].

In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass durch eine selektive Hemmung von Phosphodiesterase-3 (PDE-3) und PDE-5, eine beschleunigte Heilung nach Knochenfrakturen eintritt. Dies geschieht über einen Cyr61 assoziierten Weg [58,66].

In der vorliegenden Studie fanden wir einen leichten Anstieg der Cyr61-Expression in der Gruppe der Mäuse, die mit hochdosiertem (3mg/kg/KG) Amlodipin behandelt wurden.

RANKL ist ein potenter Aktivator der Knochenresorption durch Bindung an RANK an monozytären Osteoklasten-Progenitorzellen. Dies führt zu einer Differenzierung von Osteoklasten und fördert somit den Knochenab- und umbau. OPG ist der Gegenspieler von RANKL und RANK. So kam es bei einer erhöhten Expression von OPG zu einer verminderten Aktivität der Osteoklastendifferenzierung. Dies geschieht durch eine Hemmung der RANKL/RANK-Bindung durch OPG [88,143].

In einer zahnmedizinischen Untersuchung von Bayer Alinca et al. 2020 zur Untersuchung von Parodontitis verursachten Knochenschäden und deren Reduktion durch Ozon- und Lasertherapie, konnte gezeigt werden, dass der alveoläre

Knochenverlust unter beiden Therapiearten geringer ist. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass dies mit einer signifikant niedrigeren Anzahl an RANKL-positiven Zellen und einer signifikant erhöhten Anzahl an OPG-positiven Zellen assoziiert war [11].

Gerstenfeld et al. konnten zeigen, dass die Knorpelresorption während der Frakturheilung mit einem Peak in der RANKL- und OPG-Expression verbunden ist [45].

Darüber hinaus konnten wir in früheren Studien zeigen, dass die Hemmung von RANKL durch den Einsatz von Pantoprazol und Melatonin den Prozess des Knochenumbaus verzögert und bei Mäusen zu einer Beeinträchtigung der Frakturheilung führt [67,69].

Dies zeigt, dass eine erfolgreiche Knochenheilung eine osteoklastenvermittelte Knorpel- und Knochenresorption erfordert.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine vermehrte Expression von OPG nachgewiesen. Die Expression von RANKL war ebenfalls signifikant erhöht, was sich in einem verminderten OPG/RANKL-Quotient ausdrückt.

Die erhöhte Osteoklastenaktivität ist wahrscheinlich für die beschleunigte Knochenheilung nach Behandlung mit Amlodipin verantwortlich.

6 Literaturverzeichnis

1. Aalami OO, Nacamuli RP, Lenton KA, Cowan CM, Fang TD, Fong KD, Shi YY, Song HJM, Sahar DE, Longaker MT (2004) Applications of a mouse model of calvarial healing: Differences in regenerative abilities of juveniles and adults. *Plast Reconstr Surg* 114:713–720
2. Abernethy DR (1992) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of Amlodipine. *Cardiology* 80:31–36
3. Adams HA, Rüter A, Rüter-Trentz-Wagner (2004) *Unfallchirurgie*. Urban & Fischer
4. AL J, LE S (1988) Morphologic comparison of healing patterns in ethylene oxide-sterilized cortical allografts and untreated cortical autografts in the dog. *Am J Vet Res* 49:101–105
5. Almeida SA, Teofilo JM, Anselmo Franci JA, Brentegani LG, Lamano-Carvalho TL (2000) Antireproductive effect of the calcium channel blocker amlodipine in male rats. *Exp Toxicol Pathol* 52:353–356
6. Alzahrani MM, Rauch F, Hamdy RC (2016) Does Sclerostin Depletion Stimulate Fracture Healing in a Mouse Model? *Clin Orthop Relat Res* 474:1294–1302
7. 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
8. Atalay Y, Bozkurt MF, Gonul Y, Cakmak O, Agacayak KS, Köse I, Hazman O, Keles H, Turamanlar O, Eroglu M (2015) The effects of amlodipine and platelet rich plasma on bone healing in rats. *Drug Des Devel Ther* 9:1973–1981
9. Augat P, Simon U, Liedert A, Claes L (2005) Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. *Osteoporos Int* 16:S36–S43
10. Aumüller G (2010) *Duale Reihe Anatomie*. Thieme
11. Bayer Alinca S, Sağlam E, Zengin Celik T, Hacisalihoglu P, Doğan MA (2020) Is low level laser therapy or ozone therapy more effective for bone healing? Understanding the mechanisms of HIF-1 α , RANKL and OPG. *Biotech Histochem* 95:597–604
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. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and

- activation. *Nature* 423:337–342
15. Braun W, Ruter A (1996) [Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects]. *Unfallchirurg* 99:59–67
 16. Brighton CT, Hunt RM (1997) Early Histologic and Ultrastructural Changes in Microvessels of Periosteal Callus. *J Orthop Trauma* 11:244–253
 17. Burstein AH, Frankel VH (1971) A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech* 4:155–156
 18. Carano RAD, Filvaroff EH (2003) Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 8:980–989
 19. Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249–257
 20. Chanana M, Kumar A, Tyagi SP, Singla AK, Sharma A, Farooq U Bin (2018) End-threaded intramedullary positive profile screw ended self-tapping pin (Admit pin) - A cost-effective novel implant for fixing canine long bone fractures. *Vet World* 11:181–185
 21. Cheal EJ, Mansmann KA, Digioia AM, Hayes WC, Perren SM (1991) Role of interfragmentary strain in fracture healing: Ovine model of a healing osteotomy. *J Orthop Res* 9:131–142
 22. 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
 23. Chen D, Zhao M, Mundy GR (2004) Bone Morphogenetic Proteins. *Growth Factors* 22:233–241
 24. Chen H, Sun X, Yin L, Chen S, Zhu Y, Huang J, Jiang W, Chen B, Zhang R, Chen L, Nie M, Xie Y, Deng Z (2017) PTH 1-34 Ameliorates the Osteopenia and Delayed Healing of Stabilized Tibia Fracture in Mice with Achondroplasia Resulting from Gain-Of-Function Mutation of FGFR3. *Int J Biol Sci* 13:1254–1265
 25. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC (2003) Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Jt Surg - Ser A* 85:1544–1552
 26. 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
 27. Civantos B, Aleixandre A (2004) Blood pressure and α -vascular reactivity in hypertensive rats treated with amlodipine and dietary Ca. *Eur J Pharmacol*

- 489:101–110
28. 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. Lippincott Williams and Wilkins URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9917634/>
 29. Deller T, Kummer W, Welsch U 1940- (2014) Lehrbuch Histologie. Elsevier, Urban et Fischer
 30. Devabhaktuni M, Bangalore S (2009) Fixed combination of amlodipine and atorvastatin in cardiovascular risk management: Patient perspectives. *Vasc Health Risk Manag* 5:377–387
 31. Dozza B, Salamanna F, Baleani M, Giavaresi G, Parrilli A, Zani L, Lucarelli E, Martini L, Fini M, Donati DM (2018) Nonunion fracture healing: Evaluation of effectiveness of demineralized bone matrix and mesenchymal stem cells in a novel sheep bone nonunion model. *J Tissue Eng Regen Med* 12:1972–1985
 32. Dubey S, Mishra R, Roy P, Singh RP (2020) 3-D macro/microporous-nanofibrous bacterial cellulose scaffolds seeded with BMP-2 preconditioned mesenchymal stem cells exhibit remarkable potential for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 167:
 33. Egger EL (1991) Complications of external fixation. A problem-oriented approach. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 21:705–733
 34. Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, Kagel EM, Bouxsein ML, Lurek TJ, Wozney JM (2003) A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Jt Surg - Ser A* 85:1425–1435
 35. Eskklund V, Plum CM (1950) Experimental Investigations Into the Healing of Fractures. *Acta Orthop Scand* 19:433–475
 36. Fares H, DiNicolantonio JJ, O’Keefe JH, Lavie CJ (2016) Amlodipine in hypertension: A first-line agent with efficacy for improving blood pressure and patient outcomes. *Open Hear* 3:1–7
 37. Fleckenstein A (1983) History of calcium antagonists. *Circ Res* 52:
 38. Frey SP, Doht S, Eden L, Dannigkeit S, Schuetze N, Meffert RH, Jansen H (2012) Cysteine-rich matricellular protein improves callus regenerate in a rabbit trauma model. *Int Orthop* 36:2387–2393
 39. Frey SP, Doht S, Eden L, Dannigkeit S, Schuetze N, Meffert RH, Jansen H (2012) Cysteine-rich matricellular protein improves callus regenerate in a rabbit trauma model. *Int Orthop* 36:2387–2393
 40. Furuta T, Miyaki S, Ishitobi H, Ogura T, Kato Y, Kamei N, Miyado K, Higashi Y, Ochi M (2016) Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promote Fracture Healing in a Mouse Model. *Stem Cells Transl Med* 5:1620–1630

41. Gao F, Lv T-R, Zhou J-C, Qin X-D (2018) Effects of obesity on the healing of bone fracture in mice. *J Orthop Surg Res* 13:145
42. Gao X, Usas A, Lu A, Tang Y, Wang B, Chen CW, Li H, Tebbets JC, Cummins JH, Huard J (2013) BMP2 Is superior to BMP4 for promoting human muscle-derived stem cell-mediated bone regeneration in a critical-sized calvarial defect model. *Cell Transplant* 22:2393–2408
43. Garcia J, Delany AM (2020) MicroRNAs regulating TGF β and BMP signaling in the osteoblast lineage. *Bone* 143:115791
44. 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
45. Gerstenfeld LC, Sacks DJ, Pelis M, Mason ZD, Graves DT, Barrero M, Ominsky MS, Kostenuik PJ, Morgan EF, Einhorn TA (2009) Comparison of effects of the bisphosphonate alendronate versus the RANKL inhibitor denosumab on murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 24:196–208
46. Ghiasi MS, Chen J, Vaziri A, Rodriguez EK, Nazarian A (2017) Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. *Bone Reports* 6:87–100
47. Graville TC, Gambino JM, Syrcle JA (2018) Physeal Acetabular Fracture in a Dog Treated with External Fixation. *J Am Anim Hosp Assoc* 54:e54605
48. Grifka, Joachim Kuster M (2011) *Orthopädie und Unfallchirurgie*. Springer Berlin Heidelberg
49. Griveau A, Wiel C, Le Calvé B, Ziegler D V, Djebali S, Warnier M, Martin N, Marvel J, Vindrieux D, Bergo MO, Bernard D (2018) Targeting the phospholipase A2 receptor ameliorates premature aging phenotypes. *Aging Cell* 17:e12835
50. Guerrini MM, Takayanagi H (2014) The immune system, bone and RANKL. *Arch Biochem Biophys* 561:118–123
51. Hadjiargyrou M, Ahrens W, Rubin CT (2000) Temporal expression of the chondrogenic and angiogenic growth factor CYR61 during fracture repair. *J Bone Miner Res* 15:1014–1023
52. Haffner-Luntzer M, Müller-Graf F, Matthys R, Abaei A, Jonas R, Gebhard F, Rasche V, Ignatius A (2017) In Vivo Evaluation of Fracture Callus Development During Bone Healing in Mice Using an MRI-compatible Osteosynthesis Device for the Mouse Femur. *J Vis Exp* 2017:55196–56836
53. Hajizadeh F, Derakhshan B, Peimani A, Abbasi Z (2018) Effect of topical honey on mandibular bone defect healing in rats. *J Contemp Dent Pract* 19:47–51
54. Halici Z, Borekci B, Ozdemir Y, Cadirci E, Suleyman H (2008) Protective effects of amlodipine and lacidipine on ovariectomy-induced bone loss in rats. *Eur J*

- Pharmacol 579:241–245
55. Haria M, Wagstaff AJ (1995) Amlodipine: A Reappraisal of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use in Cardiovascular Disease. *Drugs* 50:560–586
 56. Heinrich PC, Löffler G 1935- (2014) *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer
 57. Herath SC, Lion T, Klein M, Stenger D, Scheuer C, Holstein JH, Mörsdorf P, Rollmann MFR, Pohlemann T, Menger MD, Histing T (2015) Stimulation of angiogenesis by cilostazol accelerates fracture healing in mice. *J Orthop Res* 33:1880–1887
 58. Herath SC, Lion T, Klein M, Stenger D, Scheuer C, Holstein JH, Mörsdorf P, Rollmann MFR, Pohlemann T, Menger MD, Histing T (2015) Stimulation of angiogenesis by cilostazol accelerates fracture healing in mice. *J Orthop Res* 33:1880–7
 59. Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P (1995) An experimental model for non-union in rats. *Injury* 26:681–686
 60. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT (1993) A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res* 11:305–312
 61. 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
 62. 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
 63. 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
 64. 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
 65. 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
 66. 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
 67. 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
68. 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
69. 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
70. 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 Investig Surg* 26:30–35
71. 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* 47:1435–44
72. Histing T, Menger MD, Pohlemann T, Matthys R, Fritz T, Garcia P, Klein M (2016) An Intramedullary Locking Nail for Standardized Fixation of Femur Osteotomies to Analyze Normal and Defective Bone Healing in Mice. *J Vis Exp* 2016:54472
73. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T (2007) Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech* 40:215–219
74. 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
75. Horikiri Y, Shimo T, Kurio N, Okui T, Matsumoto K, Iwamoto M, Sasaki A (2013) Sonic Hedgehog Regulates Osteoblast Function by Focal Adhesion Kinase Signaling in the Process of Fracture Healing. *PLoS One* 8:e76785
76. Hu K, Olsen BR (2016) Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *J Clin Invest* 126:509–526
77. Inglis S, Kanczler JM, Oreffo ROC (2019) 3D human bone marrow stromal and endothelial cell spheres promote bone healing in an osteogenic niche. *FASEB J* 33:3279–3290
78. Ishikawa M, Ito H, Kitaori T, Murata K, Shibuya H, Furu M, Yoshitomi H, Fujii T, Yamamoto K, Matsuda S (2014) MCP/CCR2 signaling is essential for recruitment of mesenchymal progenitor cells during the early phase of fracture healing. *PLoS One* 9:e104954
79. Jones RD, Baynes RE (1992) Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Toxicosis in Dogs and Cats: 240 Cases (1989-1990) - PubMed. *J Am Vet Med Assoc*, 201
80. Juraschek SP, Simpson LM, Davis BR, Beach JL, Ishak A, Mukamal KJ (2019)

- Effects of Antihypertensive Class on Falls, Syncope, and Orthostatic Hypotension in Older Adults: The ALLHAT Trial. *Hypertension* 74:1033–1040
81. Karakus E, Halici Z, Albayrak A, Bayir Y, Demirci E, Aydin A, Ozturk-Karagoz B, Cadirci E, Ayan AK, Sahin A, Unal D (2016) Effects of Administration of Amlodipine and Lacidipine on Inflammation-Induced Bone Loss in the Ovariectomized Rat. *Inflammation* 39:336–346
 82. Karow T (2021) *Pharmakologie und Toxikologie 2021*
 83. Kirker-Head CA, Gerhart TN, Schelling SH, Hennig GE, Wang E HM (1995) Long-term Healing of Bone Using Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2 - PubMed. *Clin Orthop Relat Res* 222–30
 84. Koller T (2020) Wundheilung nach chirurgischen Eingriffen. *Klin Umsetzung der Biomech der Postoper Nachbehandlung, essentials* 11–15
 85. Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM (2000) Osteoprotegerin ligand: A regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today* 21:495–502
 86. Konrads C (2012) Grundlagen der Frakturheilung und Bedeutung für die Osteosynthese. *CHAZ Chir Allg Zeitung* 13:468–470
 87. Kuhn JL, Goldstein SA, Ciarelli MJ, Matthews LS (1989) The limitations of canine trabecular bone as a model for human: A biomechanical study. *J Biomech* 22:95–107
 88. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165–176
 89. Lechner A, Schütze N, Siggelkow H, Seufert J, Jakob F (2000) The immediate early gene product hCYR61 localizes to the secretory pathway in human osteoblasts. *Bone* 27:53–60
 90. Li R, Stewart DJ, Von Schroeder HP, Mackinnon ES, Schemitsch EH (2009) Effect of cell-based VEGF gene therapy on healing of a segmental bone defect. *J Orthop Res* 27:8–14
 91. Lin MC, Hu D, Yang F, Herfat ST, Bahney CS, Marmor M, Maharbiz MM (2017) Using impedance to track fracture healing rates in mice in vivo: A pilot study. *Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc.*
 92. Liu YZ, Akhter MP, Gao X, Wang XY, Wang XB, Zhao G, Wei X, Wu HJ, Chen H, Wang D, Cui L (2018) Glucocorticoid-induced delayed fracture healing and impaired bone biomechanical properties in mice. *Clin Interv Aging* 13:1465–1474
 93. Liu Z, Yamamoto T, Hasegawa T, Hongo H, Tsuboi K, Tsuchiya E, Haraguchi

- M, Abe M, de Freitas PHL, Kudo A, Oda K, Li M, Amizuka N (2016) Immunolocalization of osteocyte-derived molecules during bone fracture healing of mouse ribs. *Biomed Res* 37:141–151
94. Lu C, Miclau T, Hu D, Hansen E, Tsui K, Puttlitz C, Marcucio RS (2005) Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *J Orthop Res* 23:1300–1307
 95. Lukša J, Josić D, Podobnik B, Furlan B, Kremser M (1997) Semi-preparative chromatographic purification of the enantiomers S-(-)-amlodipine and R-(+)-amlodipine. *J Chromatogr B Biomed Appl* 693:367–375
 96. Lüllmann-Rauch R, Asan E 1957-, Georg Thieme Verlag KG Taschenlehrbuch Histologie
 97. Mahfoud, F., Böhm, M., Bosch, R., Bongarth, C.M., Schunkert, H., Stellbrink, C., Kreutz, R., Schmieder, R., Trenkwalder, P., Vonend, O., Weil J (2018) ESC / ESH Pocket Guidelines Management der arteriellen Hypertonie. Börsenverein der Deutschen Banken, Bruckmeier Verlag GmbH
 98. Manigrasso MB, O'Connor JP (2004) Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma* 18:687–695
 99. Manigrasso MB, O'Connor JP (2004) Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma* 18:687–695
 100. Martini L, Fini M, Giavaresi G GR (2001) Sheep Model in Orthopedic Research: A Literature Review. *Comp Med* 51:292–9
 101. McBride SH, McKenzie JA, Bedrick BS, Kuhlmann P, Pasteris JD, Rosen V, Silva MJ (2014) Long bone structure and strength depend on BMP2 from osteoblasts and osteocytes, but not vascular endothelial cells. *PLoS One* 9:e96862
 102. Mi M, Jin H, Wang B, Yukata K, Sheu T-J, Ke H, Tong P, Im H-J, Xiao G, Chen D (2012) Chondrocyte BMP2 signaling plays an essential role in bone fracture healing. *J Bone Joint Surg Am* 512:211–218
 103. Mi M, Jin H, Wang B, Yukata K, Sheu T jen, Ke QH, Tong P, Im HJ, Xiao G, Chen D (2013) Chondrocyte BMP2 signaling plays an essential role in bone fracture healing. *Gene* 512:211–218
 104. Mills LA, Simpson AHRW (2012) *In vivo* models of bone repair. *J Bone Joint Surg Br* 94-B:865–874
 105. Moraes RB, Corrêa L, Luz JGC (2011) Adverse effects of the amlodipine on bone healing of the mandibular fracture: An experimental study in rats. *Oral Maxillofac Surg* 15:93–101
 106. Müller-Mai CM, Ekkernkamp A (2010) Frakturen: Klassifikation und Behandlungsoptionen. Springer
 107. Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y, Oikawa

- S, Ono K, Takaoka K (1994) Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* 9:651–659
108. Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y, Oikawa S, Ono K, Takaoka K (2009) Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* 9:651–659
109. Naujokat H, Seitz J-M, Açil Y, Damm T, Möller I, Gülses A, Wiltfang J (2017) Osteosynthesis of a cranio-osteoplasty with a biodegradable magnesium plate system in miniature pigs. *Acta Biomater* 62:434–445
110. Niethard FU, Pfeil J, Biberthaler P *Orthopädie und Unfallchirurgie*.
111. Ning B, Zhao Y, Buza JA, Li W, Wang W, Jia T (2017) Surgically-induced mouse models in the study of bone regeneration: Current models and future directions (Review). *Mol Med Rep* 15:1017–1023
112. Nishiya Y, Sugimoto S (2001) Effects of various antihypertensive drugs on the function of osteoblast. *Biol Pharm Bull* 24:628–633
113. Nissen SE, Tuzcu EM, Libby P, Thompson PD, Ghali M, Garza D, Berman L, Shi H, Buebendorf E, Topol EJ (2004) Effect of antihypertensive agents on cardiovascular events in patients with coronary disease and normal blood pressure. The CAMELOT study: A randomized controlled trial. *J Am Med Assoc* 292:2217–2226
114. Nunamaker DM (1998) Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 56–65
115. 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
116. Orth M, Kruse NJ, Braun BJ, Scheuer C, Holstein JH, Khalil A, Yu X, Murphy WL, Pohlemann T, Laschke MW, Menger MD (2017) BMP-2-coated mineral coated microparticles improve bone repair in atrophic non-unions. *Eur Cells Mater* 33:1–12
117. 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
118. Oryan A, Alidadi S, Bigham-Sadegh A, Moshiri A (2018) Healing potentials of polymethylmethacrylate bone cement combined with platelet gel in the critical-sized radial bone defect of rats. *PLoS One* 13:e0194751
119. Palmer RH, Aron DN Ellis pin complications in seven dogs. *Vet Surg* 19:440–5
120. Pappenheimer AM (1922) Experimental rickets in rats: VI. the anatomical changes which accompany healing experimental rat rickets, under the influence

- of cod liver oil or its active derivatives. *J Exp Med* 36:335–355
121. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG (2007) Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *Eur Cells Mater* 13:1–10
 122. Peric M, Dumic-Cule I, Grcevic D, Matijasic M, Verbanac D, Paul R, Grgurevic L, Trkulja V, Bagi CM, Vukicevic S (2015) The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies. *Bone* 70:73–86
 123. Pritchard JJ (1946) Repair of fractures of the parietal bone in rats. *J Anat* 80:55-60.2
 124. Pschyrembel W, Pschyrembel-Redaktion des Verlages P-R des, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG (2017) Pschyrembel Klinisches Wörterbuch.
 125. Qi B, Yu J, Zhao Y, Zhu D, Yu T (2016) Mouse fracture models: a primer. *Int J Clin Exp Med* 9:12418–12429
 126. Raue F, Ziegler R (1997) Knochenstoffwechsel und -erkrankungen. *Man Medizin* 35:37–47
 127. Richardson DW ND (1991) Evaluation of Plate Luting, Using an in Vivo Ovine Osteotomy Model. *Am J Vet Res* 52:1468–73
 128. Rivera JC, Strohbach CA, Wenke JC, Rathbone CR (2013) Beyond osteogenesis: An in vitro comparison of the potentials of six bone morphogenetic proteins. *Front Pharmacol* 4:1–7
 129. Rochette L, Meloux A, Rigal E, Zeller M, Cottin Y, Vergely C (2019) The role of osteoprotegerin and its ligands in vascular function. *Int J Mol Sci* 20:705
 130. Röntgen V, Blakytyn R, Matthys R, Landauer M, Wehner T, Göckelmann M, Jermendy P, Amling M, Schinke T, Claes L, Ignatius A (2010) Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator. *J Orthop Res* 28:1456–1462
 131. Rossant J, Nagy A (1995) Genome engineering: The new mouse genetics. *Nat Med* 1:592–594
 132. Sasai H, Fujita D, Seto E, Denda Y, Imai Y, Okamoto K, Okamura K, Furuya M, Tani H, Sasai K (2018) Outcome of limb fracture repair in rabbits: 139 cases (2007–2015). *J Am Vet Med Assoc* 252:457–463
 133. Schaller B, Saulacic N, Beck S, Imwinkelried T, Liu EWY, Nakahara K, Hofstetter W, Iizuka T (2017) Osteosynthesis of partial rib osteotomy in a miniature pig model using human standard-sized magnesium plate/screw systems: Effect of cyclic deformation on implant integrity and bone healing. *J Craniomaxillofac Surg* 45:862–871
 134. Schaller B, Matthias Burkhard JP, Chagnon M, Beck S, Imwinkelried T, Assad M (2018) Fracture Healing and Bone Remodeling With Human Standard-Sized Magnesium Versus Polylactide–Co-Glycolide Plate and Screw Systems Using a

- Mini-Swine Craniomaxillofacial Osteotomy Fixation Model. *J Oral Maxillofac Surg* 76:2138–2150
135. Schulte E, Schünke USM (2011) Schuenke, Michael Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem: 182 Tabellen Prometheus. - Stuttgart: Thieme. Thieme, Stuttgart; Auflage: 3., überarbeitete und erweiterte Auflage.
 136. Seibert RL, Lewis DD, Coomer AR, Sereda CW, Royals SR, Leasure CS (2011) Stabilisation of metacarpal or metatarsal fractures in three dogs, using circular external skeletal fixation. *N Z Vet J* 59:96–103
 137. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Susan Harvey V, Dvorak HF (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* (80-) 219:983–985
 138. Senger DR (2010) Vascular endothelial growth factor: Much more than an angiogenesis factor. *Mol Biol Cell* 21:377–379
 139. Shefelbine SJ, Augat P, Claes L, Beck A (2005) Intact fibula improves fracture healing in a rat tibia osteotomy model. *J Orthop Res* 23:489–493
 140. Si W, Kang Q, Luu HH, Park JK, Luo Q, Song W-X, Jiang W, Luo X, Li X, Yin H, Montag AG, Haydon RC, He T-C (2006) CCN1/Cyr61 Is Regulated by the Canonical Wnt Signal and Plays an Important Role in Wnt3A-Induced Osteoblast Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Mol Cell Biol* 26:2955–2964
 141. Siewert JR (2007) Basiswissen Chirurgie. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
 142. Siewert JR 1940-, Allgöwer M 1917-, Brauer RB, Stein HJ (2012) Chirurgie mit integriertem Fallquiz ; mit 159 Tabellen. Springer-Medizin
 143. 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, Trall 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
 144. Steen H, Fjeld TO, Bjerkreim I, Tevik A, Aldegheri R, Trivella G (1988) Limb lengthening by diaphyseal corticotomy, callus distraction, and dynamic axial fixation. An experimental study in the ovine femur. *J Orthop Res* 6:730–735
 145. Steiner M, Volkheimer D, Meyers N, Wehner T, Wilke HJ, Claes L, Ignatius A (2015) Comparison between different methods for biomechanical assessment of ex vivo fracture callus stiffness in small animal bone healing studies. *PLoS One* 10:e0119603

146. Stricker-Krongrad A, Shoemake CR, Bouchard GF (2016) The Miniature Swine as a Model in Experimental and Translational Medicine. *Toxicol Pathol* 44:612–623
147. Stürmer KM, Schuchardt W (1980) [New aspects of closed intramedullary nailing and marrow cavity reaming in animal experiments. II. Intramedullary pressure in marrow cavity reaming (author's transl)]. *Unfallheilkunde* 83:346–52
148. Su JL, Chiou J, Tang CH, Zhao M, Tsai CH, Chen PS, Chang YW, Chien MH, Peng CY, Hsiao M, Kuo ML, Yen ML (2010) CYR61 regulates BMP-2-dependent osteoblast differentiation through the $\alpha\beta 3$ integrin/integrin-linked kinase/ERK pathway. *J Biol Chem* 285:31325–31336
149. TONNA E, Related EC-CO and, 1963 U 23 The Periosteum: Autoradiographic Studies on Cellular Proliferation and Transformation Utilizing Tritiated Thymidine. journals.lww.com
150. Tufekci P, Tavakoli A, Dlaska C, Neumann M, Shanker M, Saifzadeh S, Steck R, Schuetz M, Epari D (2018) Early mechanical stimulation only permits timely bone healing in sheep. *J Orthop Res* 36:1790–1796
151. Uchida R, Nakata K, Kawano F, Yonetani Y, Ogasawara I, Nakai N, Mae T, Matsuo T, Tachibana Y, Yokoi H, Yoshikawa H (2017) Vibration acceleration promotes bone formation in rodent models. *PLoS One* 12:1–7
152. Ulfig N (2009) *Kurzlehrbuch Embryologie : 9 Tabellen*. Georg Thieme Verlag
153. Urist MR, Mclean FC (1951) Bone repair in rats with multiple fractures. 685–695
154. Wagner L, Kenreigh C (2007) Amlodipine. *xPharm Compr Pharmacol Ref* 1–5
155. Wancket LM (2015) Animal Models for Evaluation of Bone Implants and Devices: Comparative Bone Structure and Common Model Uses. *Vet Pathol* 52:842–50
156. Wancket LM (2015) Animal Models for Evaluation of Bone Implants and Devices: Comparative Bone Structure and Common Model Uses. *Vet Pathol* 52:842–50
157. Wei X, Egawa S, Matsumoto R, Yasuda H, Hirai K, Yoshii T, Okawa A, Nakajima T, Sotome S (2018) Augmentation of fracture healing by hydroxyapatite/collagen paste and bone morphogenetic protein-2 evaluated using a rat femur osteotomy model. *J Orthop Res* 36:129–137
158. Wennemuth G, Urban- & -Fischer-Verlag München. *Taschenbuch Histologie*.
159. Wheaton LG, Hohn RB, Harrison JW (1973) Surgical treatment of acetabular fractures in the dog. *J Am Vet Med Assoc* 162:385–92
160. Wolff J (1991) Wolff, Julius: *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. Schattauer
161. Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ (2009) RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2:56–64

162. Yamamoto K, Ozaki H, Takayasu K, Akehi N, Fukui S, Sakai A, Kodama M, Shimonagata T, Kobayashi K, Ota M, Horiguchi Y, Ebisuno S, Katsube Y, Yamazaki T, Ohtsu H, Hori M (2011) The Effect of Losartan and Amlodipine on Left Ventricular Diastolic Function and Atherosclerosis in Japanese Patients with Mild-to-Moderate Hypertension (J-ELAN) study. *Hypertens Res* 34:325–330
163. Yoneme H, Hatakeyama J, Danjo A, Oida H, Yoshinari M, Aijima R, Murata N, Watanabe T, Oki Y, Kido MA (2015) Milk basic protein supplementation enhances fracture healing in mice. *Nutrition* 31:399–405
164. Zhang Y, Sheu TJ, Hoak D, Shen J, Hilton MJ, Zuscik MJ, Jonason JH, O’Keefe RJ (2016) CCN1 Regulates Chondrocyte Maturation and Cartilage Development. *J Bone Miner Res* 31:549–559
165. Zivna H, Gradošová I, Zivny P, Cermakova E, Palicka V (2018) Effects of Amlodipine on Bone Metabolism in Orchidectomised Spontaneously Hypertensive Rats. *Pharmacology* 102:67–73
166. *Operum anatomici argumenti minorum*, Vol. 2. Lausanne: Francisco Grasset, 1767, S. 460–600
167. CCN1 cellular communication network factor 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. ID 3491
168. CYTOCHROME P450 DRUG INTERACTION TABLE - Drug Interactions. URL: <https://drug-interactions.medicine.iu.edu/MainTable.aspx>
169. (2010) Fachinformation, Beipackzettel Amlodipin

7 Danksagungen

Ich möchte an dieser Stelle gerne allen danken, die mich bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Frau Prof. Dr. med. Tina Histing, meiner Doktormutter, danke ich sehr für die Überlassung des Themas sowie ihre einzigartige Unterstützung und große Hilfe bei der Durchführung der Arbeit. Sie stand mir stets mit hilfreichen Ratschlägen, Motivation und konstruktiver Kritik zur Seite.

Herrn Prof. Dr. med. Michael D. Menger möchte ich für seine Hilfe bei der Durchführung meiner Arbeit, seine Ratschläge und das großzügige Bereitstellen der Räumlichkeiten und Gerätschaften danken.

Herrn Prof. Dr. med. Tim Pohlemann danke ich für die konstruktiven Ratschläge und Anregungen während der Durchführung der Arbeit.

Frau Dr. rer. nat. Claudia Scheuer und Frau Janine Becker möchte ich für die großartige Unterstützung bei der Durchführung der proteinbiochemischen und histologischen Analysen danken.

Frau Dr. med. vet. Monika Frings danke ich für die Unterstützung während der Tierversuche.

Herrn Dr. med. David Osche danke ich im Besonderen für die Unterstützung während der kompletten Arbeit. Durch seinen unterstützenden Antrieb hat er mich auch in lustlosen Phasen stets auf Kurs gebracht und das Voranschreiten der Arbeit forciert.

Herrn Dr. med. Maximilian Menger danke ich sehr für die Hilfe bei der Erstellung der Arbeit und für das Schreiben der Publikation.

Frau Dr. med. Janine Stutz danke ich für die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung während der Durchführung der Tierversuche.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie für das stets angenehme Arbeitsklima.

Herrn Dr. med. David Stenger möchte ich für die großartige Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche sowie für die ständige Präsenz bei Fragen und die immer konstruktiven Anregungen danken.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie, meinen Eltern und Großeltern für die Unterstützung während meines gesamten Studiums sowie darüber hinaus bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit danken.

Tief verbunden und dankbar bin ich meiner Freundin, Frau Dr. med. Katharina Mikulla, für ihre unglaublich hilfreiche Unterstützung und ihr Verständnis bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit. Sie steht mir sowohl privat als auch beruflich mit Rat und Tat zur Seite und unterstützte mich sehr.

8 Publikationen

Die Studie ist zur Veröffentlichung in der Zeitschrift Cells and Materials Journal unter der Manuskript ID eCM-Nov2020-BHSI-0098 eingereicht. Aktuell befindet sich das Manuskript in der minor revision.

Titel:

„Amlodipin accelerates bone healing in a stable closed fracture model in mice“.

9 Lebenslauf

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

10 Abbildungsverzeichnis

1. Strukformel Amlodipin Pharmawiki.ch
2. MouseScrew™
3. Fixation des rechten Beines während der OP Patellarsehne transkutan sichtbar
4. Senkrechter Hautschnitt medial der Patellarsehne
5. Nach Inzision des Bindegewebes medial und Luxation der Patellarsehne nach lateral Sicht auf den Kondylus des Femurs
6. Interkondyläres Aufbohren der Femurkortikalis und Einführen der Kanüle 24 G in den Markraum
7. Einführen der Kanüle 27 G in den Markraum und Punktion der Rückenhaut
8. Intramedulläre Lage des Führungsdrahtes.
9. Röntgenologische Kontrolle der intramedullären Lage des Führungsdrahtes
10. Erzeugung der Fraktur mittels 3-Punkt-Biege-Vorrichtung
11. Einführen der Kompressionsschraube mit dem Schraubendreher.
12. Abschließende Lage der Kompressionsschraube nach Verankerung.
13. Patellarsehnenennaht
14. Hautverschluss mit Einzel-knopfnähten.
15. Röntgenbild 5 Wochen postoperativ mit sichtbarer Kallusbildung
16. Röntgenbild zur radiologischen Auswertung
17. Positionierung des ausgebauten Femurs in der 3-Punkt-Biege-Einrichtung
18. Sagittaler, longitudinaler Schnitt durch das Femur (Trichrome Masson-Goldner-Färbung)
19. Röntgenbilder der Femora: Kontrollgruppe:(A) 2 Wochen (B) 5 Wochen postoperativ Amlodipin 1mg/kg/KG (C) 2Wochen (D) 5 Wochen postoperativ, Amlodipin 3mg/kg/KG (E) 2 Wochen (F) 5 Wochen postoperativ
20. Goldberg-Score
21. Absolute Biegefestigkeit der frakturierten Knochen
22. Relative Biegefestigkeit des frakturierten Knochens
23. Histologische Schnittpräparate in trichromer Masson-Goldner-Färbung
24. Knochenanteil im periostalen Kallusgewebe

25. Knorpelanteil im periostalen Kallusgewebe
26. Bindegewebeanteil im periostalen Kallusgewebe
27. Western Blot Analyse von BMP-2
28. Western Blot Analyse von BMP-4
29. Western Blot Analyse von Cyr61
30. Western Blot Analyse von VEGF
31. Western Blot Analyse von OPG
32. Western Blot Analyse von RANKL
33. Western Blot Analyse: Quotient OPG/RANKL

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Studiendesign

Tabelle 2: Goldbergscore

Tabelle 3: Zelluläres und extrazelluläres Färbeverhalten bei der Trichrom- Masson-
Goldner-Färbung

Tabelle 4: Übersicht der in der Western Blot Untersuchung bestimmten
Wachstumsfaktoren