
Aus dem Bereich

Unfall-, Hand-, und Wiederherstellungschirurgie der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. med. E. Liodakis

Einfluss von Simvastatin auf die Frakturheilung im murinen Ischämiemodell

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2025

vorgelegt von: Jana Finkler

geboren am: 31.03.2000 in Wadern

Tag der Promotion: 21.08.2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Marcel Orth

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Landgraeber

Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungsverzeichnis	1
2 Zusammenfassung/ Abstract	3
3 Einleitung	6
3.1 Knochen	6
3.1.1 Morphologie	6
3.1.2 Histologie	6
3.1.3 Funktion	8
3.2 Frakturheilung	8
3.2.1 Primäre Frakturheilung	8
3.2.2 Sekundäre Frakturheilung	9
3.3 Wachstumsfaktoren	10
3.3.1 Osteoprotegerin (OPG)	10
3.3.2 Receptor activator of NF- κ B Ligand (RANKL)	10
3.3.3 Bone Morphogenetic Protein 2 und 4 (BMP-2/-4)	10
3.3.4 Cysteine-rich protein 61 (Cyr-61)	11
3.3.5 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	11
3.3.6 Cluster of differentiation 31 (CD31)	11
3.3.7 Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)	12
3.4 Frakturmodelle	12
3.4.1 Großtiermodelle	12
3.4.1.1 Schaf	12
3.4.1.2 Hund	13
3.4.2 Kleintiermodelle	13
3.4.2.1 Kaninchen	13
3.4.2.2 Ratte	14
3.4.2.3 Maus	14
3.5 Simvastatin	17
3.5.1 Struktur	17
3.5.2 Pharmakokinetik	18
3.5.3 Wirkmechanismus und weitere Effekte	18
3.5.4 Indikation und Anwendung	22
3.5.5 Anwendung im Tiermodell	23
3.5.6 Nebenwirkungen	25
3.6 Ischämie	26
3.8 Zielsetzung	27
3.9 Fragestellung	28
4 Material und Methodik	29
4.1 Methoden	29

4.1.1 Studiendesign	29
4.1.2 Tiermodell	29
4.1.3 Operationsverfahren	30
4.1.4 Medikamentenapplikation	36
4.1.5 Tötung der Tiere	36
4.1.6 Präparation der Knochen.....	36
4.2 Zielkriterien und Auswertung.....	37
4.2.1 Biomechanik	37
4.2.2 Röntgen	38
4.2.3 Computertomographie (CT).....	39
4.2.4 Histomorphometrie	40
4.2.5 Western Blot	42
4.3 Statistik	44
5 Ergebnisse	45
5.1 Biomechanik	45
5.2 Röntgen	47
5.3 Computertomographie	48
5.4 Histomorphometrie.....	50
5.5 Western Blot	52
6 Diskussion	57
6.1 Diskussion der Methoden.....	57
6.2 Diskussion der Ergebnisse.....	63
7 Literaturverzeichnis.....	69
8 Abbildungsverzeichnis	86
9 Tabellenverzeichnis.....	88
10 Publikationen	89
11 Danksagung	90
12 Lebenslauf.....	92

1 Abkürzungsverzeichnis

°	Grad
°C	Grad Celcius
μA	Mikroampere
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMD	bone mineral density, engl. für Knochendichte
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD31	Cluster of differentiation 31
cm	Centimeter
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
Cyr-61	Cysteine-rich Protein 61
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
G	Gauge
ggf.	gegebenenfalls
HDL	High Density Lipoprotein
HIF-1α	Hypoxia-Inducible Factor-1α
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzym-A-Reduktase
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KF	Korrekturfaktor
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	koronare Herzkrankheit
kV	Kilovolt

LDL	Low Density Lipoprotein
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP-9	Matrixmetalloproteinase-9
mRNA	messenger ribonucleic acid, engl. für Boten-Ribonukleinsäure
ms	Millisekunde
MW	Mittelwert
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalzlösung
NOV	Nephroblastoma overexpressed gene
OPG	Osteoprotegerin
pAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PDGF	platelet-derived growth factor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
p.o.	per os
SEM	standard error of the mean, engl. für Standardfehler des Mittelwerts
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
ROI	Region of interest
Tab.	Tabelle
TGF- β	Transforming growth factor- β
TIP	Target-Intensitätspixel
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u.a.	unter anderem
USA	United States of America, engl. für Vereinigte Staaten von Amerika
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

2 Zusammenfassung/ Abstract

Einfluss von Simvastatin auf die Frakturheilung im murinen Ischämiemodell

Simvastatin findet als Reduktase-Hemmer des Enzyms 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA) in der Klinik breite Anwendung zur Therapie der Hypercholesterinämie sowie zur Senkung der kardiovaskulären Mortalität. Darüber hinaus hat Simvastatin einen nachgewiesenen antiinflammatorischen, vaskuloprotektiven und angiogenen sowie osteogenen Effekt. Diese Prozesse sind u.a. essentieller Bestandteil während einer Frakturheilung. Der Einfluss von Simvastatin auf die Knochenheilung wurde bisher kontrovers diskutiert. Inwiefern Simvastatin die Frakturheilung unter ischämischen Bedingungen beeinflusst, ist bisher nicht bekannt. Das Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von Simvastatin auf die Frakturheilung in einem murinen Ischämiemodell zu untersuchen.

Bei 47 CD-1 Mäusen wurde durch Ligatur der Arteria profunda femoris eine milde Ischämie der rechten unteren Extremität induziert. Nach geschlossener Frakturierung wurde das Femur mit einer intramedullären Zugschraube osteosynthetisch versorgt. Die Mäuse der Simvastatingruppe (n=22) erhielten nachfolgend täglich 30 mg/kg Körpergewicht (KG) Simvastatin per os. Der Kontrollgruppe (n=25) wurde eine äquivalente Menge isotone Natriumchloridlösung per os täglich appliziert. 2 und 5 Wochen postoperativ wurden nach Explantation der Femora biomechanische, röntgenologische, computertomographische, histomorphometrische und proteinbiochemische Untersuchungen durchgeführt.

In der biomechanischen und röntgenologischen Untersuchung zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen. In der Computertomographie war 2 und 5 Wochen postoperativ in der Simvastatingruppe ein signifikant erniedrigtes absolutes Knochenvolumen und ein erniedrigter relativer Knochenanteil mit gleichzeitig verminderter Trabekelanzahl feststellbar. Korrespondierend dazu war nach 2 Wochen der Trabekelabstand signifikant erhöht und nach 5 Wochen die Trabekeldicke signifikant erniedrigt. In der histomorphometrischen Analyse ergab sich nach 5 Wochen in der Simvastatingruppe eine signifikant erniedrigte Gesamtkallusfläche. In der proteinbiochemischen Analyse erwies sich die Expression von Cluster of differentiation 31 (CD31) und Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) im Rahmen einer stimulierten Angiogenese und Proliferation signifikant erhöht. Die Expression des Osteogenesemarkers Bone Morphogenetic Protein (BMP)-2 zeigte sich signifikant erniedrigt. Die Expressionen von Osteoprotegerin (OPG) und Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) ergaben keine signifikanten Unterschiede.

Zusammenfassend zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass Simvastatin die Frakturheilung unter ischämischen Bedingungen am Mausmodell beeinträchtigt ohne jedoch die Knochenheilung insgesamt zu verhindern. Dieser Effekt ist am ehesten auf ein Missverhältnis angiogener und osteogener Expressionsmarker im Kallusgewebe zurückzuführen. Darüber hinaus ergeben sich Hinweise, dass die Wirkung von Simvastatin auf die Frakturheilung dosisabhängig ist, sodass künftig weitere Studien den Effekt von Simvastatin und neuester Derivate hiervon auf ihr osteoanaboles Potenzial unter hypoxischen Bedingungen noch weiter untersuchen sollten.

Effects of Simvastatin on fracture healing in a murine ischemia model

As a reductase inhibitor of the enzyme 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase (HMG-CoA), Simvastatin is widely used in the clinic to treat hypercholesterolemia and to reduce cardiovascular mortality. In addition, Simvastatin has a proven antiinflammatory, vasculoprotective, angiogenic and osteogenic effect. These processes are essential components during fracture healing. The influence of Simvastatin on bone healing has been the subject of controversial debate. The extent to which Simvastatin influences fracture healing under ischemic conditions is not yet known. The aim of this study was to investigate the influence of Simvastatin on fracture healing in a murine ischemia model.

Mild ischemia of the right lower limb was induced in 47 CD-1 mice by ligation of the profunda femoris artery. After closed fracturing, the femur was osteosynthesized with an intramedullary screw. The mice in the Simvastatin group (n=22) subsequently received 30 mg/kg body weight of Simvastatin per os daily. The control group (n=25) received an equivalent amount of isotonic sodium chloride solution per os daily. Biomechanical, radiographic, computed tomographic, histomorphometric and protein biochemical examinations were performed 2 and 5 weeks postoperatively after explantation of the femora.

There were no differences between the groups in the biomechanical and radiographic examinations. Computed tomography showed a significantly reduced absolute bone volume and a reduced relative bone proportion in the Simvastatin group at 2 and 5 weeks postoperatively, with a simultaneous reduction in the number of trabeculae. Correspondingly, the trabecular spacing was significantly increased after 2 weeks and the trabecular thickness was significantly reduced after 5 weeks. The histomorphometric analysis revealed a significantly reduced total callus area in the Simvastatin group after 5 weeks. In the protein biochemical analysis, the expression of cluster of differentiation 31 (CD31) and

phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) was found to be significantly increased in the context of stimulated angiogenesis and proliferation. The expression of the osteogenesis marker bone morphogenetic protein (BMP)-2 was significantly decreased. The expressions of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) showed no significant differences.

In summary, the data of the present study show that simvastatin impairs fracture healing under ischemic conditions in the mouse model without, however, preventing bone healing altogether. This effect is most likely due to an imbalance of angiogenic and osteogenic expression markers in callus tissue. In addition, there are indications that the effect of simvastatin on fracture healing is dose-dependent, so that further studies should continue to investigate the effect of simvastatin and its latest derivatives on their osteoanabolic potential under hypoxic conditions.

3 Einleitung

3.1 Knochen

3.1.1 Morphologie

Knochen besitzen abhängig von der Art und Größe der mechanischen Beanspruchung eine unterschiedliche Struktur und Form. Zum einen gibt es die Ossa longa (lange Knochen), die man wiederum in lange Röhrenknochen, wie z.B. das Femur, und kurze Röhrenknochen, wie z.B. die Mittelhandknochen, unterteilen kann. Diese Röhrenknochen bestehen jeweils zum proximalen und distalen Gelenkende hin aus einer Epiphyse, welche über die Metaphyse mit der Diaphyse, dem Knochenschaft, verbunden ist [23]. Im Bereich der Metaphyse befindet sich auch die Epiphysenfuge. Dies ist der Bereich, in dem Längenwachstum stattfinden kann [23]. Neben den Ossa longa gibt es noch die Ossa brevia (kurze Knochen, z.B. Fuß- und Handwurzelknochen), Ossa plana (platte Knochen, z.B. Brustbein und Schulterblatt), Ossa pneumatica (lufthaltige Knochen z.B. die Nasennebenhöhlen) und Ossa irregularia (unregelmäßige Knochen), die man keiner genauen Gruppe zuordnen kann, wie z.B. Wirbelkörper [23]. Grundsätzlich findet sich an jedem Knochen die äußere Knochenhaut, das Periost, welche direkt der Kortikalis anliegt. Im Bereich der Diaphyse von Röhrenknochen, wozu auch das in der Studie verwendete Femur zählt, verdickt sich die Kortikalis zur sogenannten Kompakta. Im Inneren des Knochens liegt die Spongiosa, wo sich zwischen dem Trabekelnetzwerk und in der Markhöhle das Knochenmark befindet [55].

3.1.2 Histologie

Embryonal liegt im Rahmen der desmalen bzw. membranären oder auch direkten Ossifikation der primäre Knochen in Form von Geflechtknochen vor [23]. Dessen Zug- und Biegefestigkeit wird dadurch gewährleistet, dass dieser, neben der geflechtartig angeordneten Grundsubstanz und den vielen Zellen, weniger mineralisiert ist und einen erhöhten Wasseranteil aufweist. Im adulten menschlichen Skelett findet man Geflechtknochen noch im Bereich der Schädelnähte, in der Pars petrosa des Os temporale und in der Alveolarwand von Unter- und Oberkiefer. Im Rahmen der Frakturheilung besteht das initial gebildete Kallusgewebe aus Geflechtknochen, welcher im Verlauf dann zu Lamellenknochen umgebaut wird. Ebenso wird der in der Fetalperiode gebildete Geflechtknochen ab dem zweiten Lebensjahr durch sekundären Knochen ersetzt [23] [55]. Gemäß dem Namen unterscheidet man verschiedene Arten von schichtweise aufgebauten Lamellen [23]. Zum einen Generallamellen, die die innere und äußere Zirkumferenz im Knochenschaft umfassen und zum anderen flach aufeinanderliegende Lamellen der Spongiosabälkchen. Zudem werden die zentralen Blutgefäße des Knochens, auch Havers Kanäle genannt, von sogenannten konzentrischen Speziallamellen umgeben und bilden somit gemeinsam ein Osteon, welche in einer Vielzahl

vor allem in der Kompakta zu finden sind. Zwischen diesen Osteonen liegen die Schaltlamellen. Die senkrecht dazu verlaufenden Blutgefäßkanäle nennt man Volkmann-Kanäle [23]. Die Knochengrundsubstanz besteht einerseits zu 65 % aus einer anorganischen Matrix, die größtenteils aus Hydroxylapatit besteht, aber auch aus Kalzium, Phosphat und anderen Mineralien. Die organische Matrix hingegen enthält Kollagenfasern Typ1, adhäsive Glykoproteine und Proteoglykane und macht 35 % der Knochengrundsubstanz aus. Zusätzlich finden sich neben dieser extrazellulären Matrix auch viele verschiedene Zellen im Knochen [16]. Progenitor- und Vorläuferzellen befinden sich als niedrig differenzierte Mesenchymzellen im Periost und dienen der Proliferation [16] [55]. Aus diesen können durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren wie z.B. BMP-2, die für den Knochenauf- und -umbau wichtigen Zellen, die Osteoblasten, hervorgehen. Dies sind kubische Zellen, die epithelartig auf der Knochenoberfläche angeordnet sind. Sie sind für die Sekretion und Aufnahme der organischen Knochenmatrix, dem Osteoid, verantwortlich. Wenn sie sich im Laufe dieses Prozesses selbst einmauern, so werden sie nach Abschluss dieses Prozesses als Osteozyten bezeichnet. Diese liegen in Knochenhöhlen, den Lacunae osseae, und sind über zahlreiche Fortsätze und Gap Junctions in den Knochenkanälchen (Canaliculi osseae) miteinander verbunden [23]. Im Kontrast zu diesen knochensubstanzerhaltenden Zellen stehen die vielkernigen Riesenzellen, auch Osteoklasten genannt, die aus Monozyten hervorgehen und somit zum mononukleären Phagozytensystem gehören. Diese liegen der Knochengrundsubstanz in Howship-Lakunen an und sind für den Knochenumbau und -abbau verantwortlich. Daran beteiligt sind H^+ -ATPasen zur Säurebildung und zahlreiche Lysosomen und ihre Proteine wie z.B. Cathepsin K. Die abgebauten Matrixanteile werden über Endozytose aufgenommen und nach weiterem Abbau über Transzytose in Kapillaren abgegeben [23]. Die außen anliegende Knochenhaut besteht zum einen aus einer äußeren Schicht, dem Stratum fibrosum, welche geflechtartiges, straffes Bindegewebe enthält und zur Verankerung von Sehnen und Bändern dient. Von dort strahlen Kollagenfasern (Sharpey-Fasern) in die innere Schicht, das Stratum osteogenicum, ein und schaffen somit eine Verbindung zwischen Periost und Knochensubstanz. Das Stratum osteogenicum wird auch als Kambium bezeichnet, da es viele Zellen enthält, die unter anderem (u.a.) für das Dickenwachstum verantwortlich sind. Zudem ist das Periost gut vaskularisiert und innerviert, sodass es sehr schmerzempfindlich ist [16] [55]. Das Endost bedeckt die Innenflächen des Trabekelwerks, der Kompakta und der Havers-Kanäle. Die dort befindlichen Lining-cells sind ruhende Osteoklasten und Osteoblasten, die aktiviert werden, wenn Bedarf in Rahmen von Umbau und Regeneration besteht [16] [55].

Im Gegensatz zum Menschen besitzen Mäuse allerdings keine Havers-Kanäle, sondern äquivalent dazu, ein einfacheres System mit Resorptionskanälen, das für die suffiziente Durchblutung des Knochengewebes sorgt [67].

3.1.3 Funktion

Knochengewebe ist eines der härtesten Gewebe des Menschen. Aufgrund der daraus resultierenden Druck-, Zug-, Biege-, und Verdrehungssteifigkeit kommt den Knochen vor allem eine große Bedeutung als Stütze im Körper zu [23] [55]. Neben der Stützfunktion besitzen sie auch eine Schutzfunktion, da z.B. der knöcherne Thorax und das Becken die inneren Organe schützen oder auch weil Wirbelkörper und Schädel Teile des zentralen Nervensystems schützen [23]. Des Weiteren dienen die Knochen aufgrund ihres hohen Kalziumgehalts als Kalziumreservoir, da dort 99 % des Kalziums im Körper gebunden ist. Zusätzlich findet ab der Geburt im roten Knochenmark ein Großteil der Blutbildung statt [23] [55].

3.2 Frakturheilung

Nach einem stattgehabten Knochenbruch erfolgt die Heilung im Gegensatz zu anderen Geweben nicht über die Bildung eines biomechanisch instabileren Narbengewebes, sondern über die Bildung eines originären Knochengewebes [16]. Der auch im gesunden Knochen ständig stattfindende Knochenumbau wird im Rahmen einer Fraktur deutlich angeregt. Ausgehend von Endost, Periost und Havers-Kanälen werden vor allem Osteoblasten und Osteoklasten aktiviert, die für Auf- und Abbau verantwortlich sind. Dabei gibt es einen Unterschied zwischen Kortikalis und Spongiosa. Ersteres heilt durch Aufeinander zuwachsen von Osteonen in Längsrichtung, während Spongiosa dadurch heilt, dass die Trabekel überbrückt werden. Wichtig für eine suffiziente Heilung einer Fraktur sind eine intakte Durchblutung der Fragmente, ausreichender Knochenkontakt und Ruhigstellung der Fraktur. Dementsprechend kann zu viel Bewegung das Einwachsen von Osteonen verhindern und somit die Entstehung von Pseudarthrosen begünstigen [103]. Zu wenig Bewegung hingegen kann aufgrund fehlender physiologischer Reize die Knochenbildung verlangsamen [30]. Es lassen sich zwei Heilungsarten unterscheiden, die primäre und sekundäre Frakturheilung [30] [103].

3.2.1 Primäre Frakturheilung

Die primäre Frakturheilung, auch direkte Knochenheilung genannt, erfolgt durch direkten Kontakt der Fragmente zueinander und ohne Bildung von Kallusgewebe. Dementsprechend muss vorausgesetzt sein, dass die Fragmente durch eine Osteosynthese stabil fixiert und gut durchblutet sind, sodass die Osteone direkt aufeinander zuwachsen können [30] [168]. Bei dieser desmalen bzw. membranären Ossifikation differenzieren sich mesenchymale Stammzellen auf der Oberfläche von Periost und Endost direkt zu Osteoblasten und produzieren Knochensubstanz [135] [184]. Generell ähnelt der Prozess dem des Remodelings, bei dem letztlich Lamellenknochen entsteht [91]. Falls doch noch minimale Spalten zwischen den Knochenfragmenten verbleiben, so werden diese im Rahmen der Spaltheilung mit Kallus aufgefüllt. Dabei entsteht Lamellenknochen im Spalt, der senkrecht zur

longitudinalen Knochenachse orientiert ist [103]. Insgesamt ist ein solcher Prozess nach ungefähr ein bis zwei Jahren vollständig abgeschlossen [91].

3.2.2 Sekundäre Frakturheilung

Die sekundäre bzw. indirekte Frakturheilung erfolgt in vier Phasen und tritt dann auf, wenn die oben genannte vollständige Fixierung der Fragmente ohne relevante Spaltbildung nicht gewährleistet ist. Das ist z.B. bei konservativer Behandlung der Fall oder bei Fixierung mit einer intramedullären Nagelosteosynthese [103]. Diese chondrale Ossifikation entspricht daher dem natürlichen Heilungsprozess [103]. In der initialen Verletzungsphase wird ein Frakturhämatom ausgebildet, welches bewirkt, dass verschiedene Wachstumsfaktoren wie Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) aus den Blutplättchen zur Knochenbildung bereitgestellt werden [30]. Neben diesen spielen auch unterschiedliche Matrixproteine wie z.B. Osteocalcin, Osteogenin, BMPs und Interleukine eine wichtige Rolle. Das umgebende Milieu ist durch einen geringen Sauerstoffgehalt, hohe Azidität durch Laktat und Zelldetritus gekennzeichnet [97]. Neutrophile Granulozyten sind dabei die ersten Zellen, die schon innerhalb weniger Stunden im Hämatom nachweisbar sind, später gefolgt von Monozyten, Lymphozyten und Makrophagen, die die inflammatorische Phase kennzeichnen [53] [79]. Diese zweite Phase beginnt nach ungefähr drei Tagen und dauert circa (ca.) 2 Wochen an [91] [103]. In dieser Phase wachsen auch Fibroblasten in das Hämatom ein und ein bindegewebiger Kallus, auch Fixationskallus genannt, entsteht. Durch pro-regenerative Makrophagen werden Progenitorzellen dazu angeregt, sich zu Zellen der osteogenen Linie zu differenzieren [135]. Parallel dazu erfolgt die durch VEGF und Angiopoietin angeregte Angiogenese [103]. In den darauffolgenden Wochen und Monaten folgt die dritte Phase der Kallushärtung, in der sich der Kallus zunächst zu Knorpel und weiterhin zu Geflechtknochen differenziert. Hierbei werden die Chondrozyten zunächst hypertroph und beginnen dann damit, die umgebende Matrix zu mineralisieren. Entweder gehen die Chondrozyten dann in Apoptose und werden durch Osteoprogenitorzellen ersetzt oder sie transdifferenzieren sich selbst zu Osteoblasten [82] [190]. Zum Schluss erfolgt innerhalb von ein bis zwei Jahren die vierte Phase, das Remodeling. Hier wird der Geflechtknochen zu Lamellenknochen umgebaut, das Gefäßsystem wird rekonstruiert und überschüssiges Kallusgewebe wird abgebaut [53].

Der Prozess der Frakturheilung hängt von verschiedenen Faktoren ab, darunter die Distanz der Fragmente, die Viabilität des Periosts und die Stabilität des Osteosyntheseverfahrens [51]. Es hat sich gezeigt, dass besonders stabile externe Osteosyntheseverfahren wie starre Platten oder ein Fixateur externe primär über desmale Ossifikation zur Heilung führen, während intramedulläre Implantate eher etwas instabiler sind und damit zusätzlich noch die enchondrale Ossifikation stimulieren [30] [54] [61] [184]. Gibt es einen zu großen

Bewegungsspielraum zwischen den Knochenfragmenten, so bildet sich vermehrt Bindegewebe und Knorpel anstatt Knochen, was mit einer geringen Biegesteifigkeit einhergeht. Zudem kann die Angiogenese gestört werden und Wachstumsfaktoren aus dem Gleichgewicht geraten [67].

3.3 Wachstumsfaktoren

3.3.1 Osteoprotegerin (OPG)

Das 1997 entdeckte Osteoprotegerin gehört zur Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie und ist ein sekretorisches Glykoprotein, das von Osteoblasten, Stammzellen und Endothelzellen produziert wird [152]. Es inhibiert die Differenzierung von Osteoklasten, indem es als kompetitiver Rezeptorantagonist Receptor activator of NF- κ B Ligand (RANKL) fungiert. Demnach ist OPG ein Köderrezeptor, der statt an Receptor activator of NF- κ B (RANK), an den RANK-Liganden bindet und somit die Aktivierung von Osteoklasten verhindert [147]. Zudem dient OPG als Rezeptor für Tumornekrosefaktor- (TNF) -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), dessen Bindung in einer gegenseitigen Hemmung der jeweiligen Funktion beider Proteine resultiert [33].

3.3.2 Receptor activator of NF- κ B Ligand (RANKL)

Der ebenfalls zur Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie gehörende RANK-Ligand wird von Osteoblasten sezerniert und bindet an den RANK-Rezeptor auf Osteoklasten. Diese Interaktion regt Osteoklastenvorläuferzellen zur Differenzierung zu reifen Osteoklasten an. Damit wird sowohl die Resorption von Knochensubstanz gesteigert als auch die Lebensdauer der Osteoklasten verlängert [149].

3.3.3 Bone Morphogenetic Protein 2 und 4 (BMP-2/-4)

Die Bone Morphogenetic Proteine 2 (BMP-2) und 4 (BMP-4) gehören einer großen Subklasse innerhalb der Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Familie an. Diese binden an Serin-Threonin-Kinasen und haben insbesondere eine wichtige Rolle in der Embryogenese [119]. Die potenten osteoinduktiven Eigenschaften von BMP-2 sind bereits lange bekannt [174]. Insbesondere BMP-2 und BMP-4 haben pleiotrope Funktionen u.a. in der skelettalen Organogenese durch die Stimulation von Knochenbildung und Regeneration [18] [146]. BMP-2 besitzt außerdem einen immunmodulatorischen Effekt, wodurch Zytokine für die Stimulation von mesenchymalen Stammzellen und Angiogenese hochreguliert werden [174]. Grundsätzlich werden BMPs aufgrund ihrer Eigenschaft knochenbildende Zellen zu Läsionen im Knochen zu rekrutieren bereits im klinischen Kontext eingesetzt, z.B. bei der Therapie von tibialen Pseudarthrosen. Insgesamt üben sie also einen positiven Effekt auf die Frakturheilung aus [148].

3.3.4 Cysteine-rich protein 61 (Cyr-61)

Die CCN Familie setzt sich aus den namensgebenden Proteinen Cysteine-rich protein 61 (Cyr-61), Connective Tissue Growth Factor (CTGF) und Nephroblastoma Overexpressed gene (NOV) zusammen und enthält noch drei weitere regulatorische Proteine [15]. Erstgenanntes geht auf das gleichnamige *cyr61* Gen zurück, welches in Mäusefibroblasten entdeckt wurde. Dieses wird in der embryonalen Entwicklung vor allem in kartilaginären Anteilen exprimiert und spielt vor allem eine Rolle in der Chondrogenese und damit in der Entwicklung des Skeletts [125]. Des Weiteren hat es einen positiven Effekt auf die Frakturheilung, was zum einen einem angiogenen Effekt zuzuschreiben ist, zum anderen stimuliert es die Differenzierung der Osteoblasten und fördert die Expression von BMP-2 [189].

3.3.5 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Bereits 1989 wurde VEGF entdeckt und gleichzeitig mit der Funktion in Verbindung gebracht, die Angiogenese zu induzieren [87]. In seiner Rolle als Cytokin reguliert es die Differenzierung, Proliferation und das Überleben von mikrovaskulären Endothelien. Sowohl im Tumorwachstum als auch in der Embryogenese fördert VEGF die Bildung von Gefäßen und auch deren Wachstum. Des Weiteren bewirkt es eine erhöhte Permeabilität der Gefäße, womit vermehrt Plasmamoleküle und Entzündungszellen in umgebende Gewebe gelangen können [110]. Sowohl die gesteigerte Angiogenese als auch die Extravasation von Makromolekülen und Zellen können einen positiven Einfluss auf die Bildung von neuem Knochengewebe haben und somit auch auf die Frakturheilung. VEGF wurde auch in Knochengewebe entdeckt und spielt in verschiedenen Stadien der Frakturheilung eine wichtige Rolle. Es ist zudem verantwortlich für die Verbindung von Angiogenese und Osteogenese miteinander. Vor allem das von Osteoblasten abgeleitete VEGF wirkt über parakrine Mechanismen auf Osteoklasten, Pericyten und Chondrozyten [70]. Das von Osteoblastenvorläuferzellen im Perichondrium gebildete VEGF stimuliert zusätzlich die Osteoblastendifferenzierung [71]. Zudem reagieren Osteoblasten auf Hypoxie, indem sie den Hypoxia-Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) aktivieren, der wiederum VEGF steigert [181].

3.3.6 Cluster of differentiation 31 (CD31)

Cluster of differentiation 31 (CD31), auch Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1) genannt, ist ein transmembranäres Glykoprotein, das zur Immunglobulin-Superfamilie gehört und auf der Oberfläche von Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten sowie an der Zell-Zell-Grenze von Endothelzellen exprimiert wird. Einerseits hat es die Funktion eines Adhäsivmoleküls, andererseits aber auch die eines Signalmodulators [86] [94]. Es moduliert die vaskuläre Integrität, die Zellmigration und das Zellüberleben u.a. über die Beeinflussung der Aktivität von Integrinen und weiteren zellulären Signalwegen [121]. Im Rahmen von immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern kann PECAM-1 dazu

beitragen, Blutgefäße im Kallus einer Fraktur sichtbar zu machen. So kann der Zusammenhang zwischen Angiogenese und Osteogenese während der Frakturheilung sichtbar gemacht werden. Aufgrund dessen kann man PECAM-1 als Angiogenesemarker betrachten [94].

3.3.7 Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)

Das Enzym Phosphatidylinositol-3-Kinase reguliert durch Phosphorylierung und den damit entstehenden Produkten diverse Mechanismen in Zellen. Dementsprechend korreliert die Aktivität dieses Enzyms mit der Antwort der Zelle auf Wachstumsfaktoren und Onkoproteine und spielt in der Krebsforschung und Therapie eine große Rolle [38]. Zum einen ist PI3K wichtig, um die Homöostase im Knorpel aufrechtzuerhalten. Es konnte gezeigt werden, dass PI3K bei Osteoarthritis geringer exprimiert wird und vor allem Apoptose und Überleben von Chondrozyten reguliert [161]. Des Weiteren fördert PI3K u.a. im Bereich des subchondralen Knochens die Differenzierung von Knochenzellen und die Proliferation von Osteoblasten und trägt so positiv zur Knochenbildung bei [161] [180].

3.4 Frakturmodelle

3.4.1 Großtiermodelle

Ein Vorteil von Großtiermodellen gegenüber Kleintiermodellen ist, dass die Anatomie und Physiologie vor allem in Hinsicht auf Knochenstoffwechsel, Größe und mechanische Belastung dem Menschen mehr ähnelt. Zudem sind aufgrund der vergleichbaren Größe einige Geräte zur Auswertung wie z.B. Röntgen oder Computertomographie (CT) leichter zugänglich. Andererseits sind sie in der Tierhaltung aufwändiger und teurer, vor allem auch der Einsatz von Medikamenten ist kostspieliger. Des Weiteren gibt es weniger analytische Möglichkeiten, da die Anzahl an transgenen Tieren geringer ist und auch molekulare Analysen, u.a. mit Antikörpern, sind limitiert [54].

3.4.1.1 Schaf

Makroskopisch gleicht der Knochen von Schafen dem des Menschen. Mikroskopisch lässt sich jedoch feststellen, dass die Kortikalis vor allem aus primären Geflechtknochen besteht [141]. Das Remodeling, welches von den Haverskanälen ausgeht, wird größtenteils erst durch ein Trauma stimuliert oder später im Alter hervorgerufen [120] [123]. Damit gilt auch die primäre Frakturheilung als gut erforscht. Zusätzlich ist die Knochendichte in Schafen höher als bei Menschen [141]. Schafe werden vor allem genutzt, um Osteosyntheseverfahren, wie Platten, Schrauben und intramedulläre Marknägel zu untersuchen. Aufgrund der vergleichbaren Größe können Implantate für Menschen auch hier verwendet werden und umgekehrt können humane Implantate weiterentwickelt werden [123]. Osteoporosemodelle am Schaf erweisen sich als komplexer, da eine alleinige Ovariectomie nicht ausreicht und weitere Behandlungen

eingeleitet werden sollten, um einen suffizienten Verlust an Knochendichte zu induzieren [54]. Schafe zeigen zudem in ihrem postoperativen Verhalten die Neigung zu einem zügigen belasten der Extremität mit vollem Körpergewicht [26].

3.4.1.2 Hund

Die Knochenstruktur in Hunden ähnelt sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch sehr der des Menschen [26]. Dieser besteht aber aus einem sogenannten plexiformen Knochen. So findet man in der Kortikalis eine Mischung aus primären und sekundären lamellären Knochenanteilen. Zusätzlich sind die Knochen von Hunden stärker mineralisiert [28] [141]. Da die Frakturheilung bei Hunden auch im Interesse der orthopädischen Veterinärmedizin liegt, gibt es eine Vielzahl an Quellen, die die Frakturversorgung und die biologischen Prozesse am Hund beschreiben. Dementsprechend wurden in diesem Bereich bereits viele interne und externe Osteosyntheseverfahren entwickelt und angewandt. Zudem sind Hunde gut handhabbar und zutraulich, was aber auch gleichzeitig ethische Fragen aufwirft, weshalb es sozial eher inakzeptabel ist, Hunde zu Forschungszwecken zu verwenden [123] [141].

3.4.2 Kleintiermodelle

Kleintiere sind generell günstiger, platzsparender und leichter in der Handhabung. Sie sind auch aufgrund ihres kurzen Reproduktionszyklus besser verfügbar [53]. So ist es auch leichter, größere Gruppen in Studien einzuschließen [67]. Außerdem verläuft die Knochenheilung zügiger als in Großtiermodellen, was mit einer verkürzten experimentellen Studiendauer einhergeht. Zudem bietet die Möglichkeit der Verwendung von genetisch modifizierten transgenen Tieren und die hohe Verfügbarkeit von spezifischen Antikörpern zur Analyse von molekularen Frakturheilungsprozessen vielseitige Anwendungsgebiete in der Forschung. Auch die Verwendung von Medikamenten ist aufgrund der geringeren Dosierung günstiger. Zudem existieren bereits etablierte Kleintiermodelle zur standardisierten Knochen- und Frakturheilungsforschung. Nachteilig ist jedoch, dass das geringe Körpergewicht und somit die Belastung von Knochen und Fraktur anders ist als beim Menschen. Des Weiteren gibt es deutliche Größenunterschiede, die auch die OP Technik und die Frakturversorgung an kleinen Knochen wie bei der Maus erschweren. Dies hat die Entwicklung speziesspezifischer, standardisierter OP Techniken und individuelle Osteosyntheseverfahren erforderlich gemacht [54].

3.4.2.1 Kaninchen

Grundsätzlich ist die Knochenstruktur von Kaninchen weniger mit dem Menschen vergleichbar als die von größeren Tieren. Das Skelett von Kaninchen unterscheidet sich makroskopisch deutlich von dem des Menschen. Auch finden sich mikroskopische Unterschiede, z.B. in Form primärer longitudinal vaskularisierter Knochenstrukturen bei Kaninchen, die parallel zur Knochenachse verlaufen und dazwischen gelagerte Osteone [141]. Aufgrund dieser

Unterschiede eignen sie sich weniger gut für hier vorliegende experimentelle Studien als andere Kleintiere [141]. Zudem gilt für Kaninchen ebenso wie für größere Tiere, dass es eine geringere Verfügbarkeit transgener Tiere und monoklonaler Antikörper gibt [61]. Kaninchen kamen dennoch aufgrund ihrer geeigneten Größe und guten Handhabbarkeit sowohl in biophysikalischen Experimenten als auch in der Erforschung von Osteosyntheseverfahren, darunter Fixateur externe, Platten und Schrauben, häufig zum Einsatz [123] [141].

3.4.2.2 Ratte

Ebenso wie für andere Kleintiere, gilt für Ratten, dass diese eine relativ primitive Knochenstruktur mit Resorptionskanälen besitzen, wobei die Knochenheilung trotzdem ebenso effektiv wie die des Menschen ist. Außerdem reift das Skelett der Ratte auch über die sexuelle Reife hinaus, teilweise sogar ein Leben lang [74] [182]. Seit den frühen 1940er Jahren werden Ratten als Modelle in der Frakturforschung genutzt [61]. Aufgrund dessen konnten schon zahlreiche standardisierte Prozeduren entwickelt werden. Häufig sind dabei vor allem Frakturen des Femurs und der Tibia und unterschiedliche Stabilisierungstechniken, darunter intramedulläre Nägel und Pins, Kompressionsschrauben, Platten oder externe Fixateure [123]. Zudem findet sich eine zunehmende Zahl an Stämmen, die genetische Veränderungen im Knochengewebe und Stoffwechsel aufweisen, sodass verschiedenste Konstellationen der Knochenheilung untersucht werden können [182]. Es stehen auch unterschiedliche Krankheitsmodelle zur Verfügung, die die klinische Situation von Krankheiten in Verbindung mit verzögerter Frakturheilung untersuchen. Dazu gehört zum einen die verlangsamte Heilung von Knochen im Alter aber auch bei Mangel an Wachstumshormonen [165] [182]. Häufig zum Einsatz kommt die Ratte aber vor allem in Osteoporosemodellen [85] [182] [185]. Durch Ovariectomie wird eine postmenopausale Situation unter Östrogenmangel hergestellt, welche nach einiger Zeit zu Osteopenie bzw. Osteoporose führt. Dies ist eine etablierte und reproduzierbare Methode, anhand der man auch den Einfluss von therapeutischen oder präventiven Mitteln auf Osteoporose untersuchen kann [74] [185].

3.4.2.3 Maus

Aufgrund der zuvor genannten Vorteile von Kleintiermodellen hat sich in den letzten Jahren insbesondere die Maus als Modell in der Frakturforschung durchgesetzt, da diese hervorragenden Möglichkeiten bietet, neue Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen der Frakturheilung zu untersuchen [61]. Ebenso wie bei der Ratte, konnten auch bei der Maus Modelle entwickelt werden, die den Einfluss von verschiedenen Komorbiditäten auf die Frakturheilung untersuchen. Damit können klinisch relevante Zusammenhänge z.B. zwischen Osteoporose oder Diabetes mellitus und einer verzögerten Knochenheilung beobachtet werden [53] [54]. Trotz histologischer Unterschiede zwischen menschlichen und murinen Knochen, ähnelt sich der Prozess der Frakturheilung dennoch sehr [184]. Mäuse besitzen zur

Blutversorgung des Knochens anstatt des Haverssystems ein System von Resorptionskanälen [123]. Eine Kombination aus membranärer und chondraler Ossifikation und anschließendem Remodeling bewirken, dass es zur Vereinigung von Knochenfragmenten kommt. Während dieser Prozess in gesunden Menschen bis zu 3 Monate dauert, so erfolgt die vollständige Heilung in der Maus schon nach ca. 5 Wochen [184]. Vor diesem Hintergrund ist es allerdings auch wichtig auf das Alter der Mäuse zu achten. Je älter diese sind, desto länger dauert auch die Frakturheilung, da neben einer eingeschränkten Kallusmineralisation auch eine gesteigerte Aktivität der Osteoklasten vorliegt [61].

Vor allem größere Knochen kommen in murinen Frakturmodellen zum Einsatz, darunter z.B. Tibia und Femur. Insbesondere diese beiden sind für biomechanische Testungen gut zugänglich [51] [67]. Allerdings sollten bei der Wahl zwischen Tibia und Femur einige Vor- und Nachteile beachtet werden. Aufgrund des dünnen Weichteilmantels lässt sich an der Tibia leicht eine Fraktur induzieren. Gleichzeitig sollte jedoch die vorteilhafte Rolle des Weichteilmantels an der Frakturheilung nicht unterschätzt werden. Die longitudinal gebogene Form und der trianguläre Querschnitt der Tibia erschweren die Entwicklung von passenden Knochenimplantaten und die Genauigkeit in der biomechanischen Testung. Zudem kann auch eine gleichzeitige Fakturierung der Fibula hinzukommen, was die Standardisierung des Modells einschränkt [67]. Im Gegensatz dazu lassen sich am Femur leichter standardisierte diaphysäre Frakturen mit einem vergleichbaren Kallus induzieren, da dieses einen röhrenförmigen Querschnitt und einen weitestgehend konstanten Durchmesser besitzt. Auch die Stabilisierung mit Implantaten ist aufgrund der in Relation zur Tibia geradlinigeren Achse leichter. Diese Gegebenheiten begünstigen auch eine einheitlichere biomechanische Testung. Gegensätzlich zur Tibia, besitzt das Femur einen ausgeprägteren Weichteilmantel, der einerseits zwar die Frakturinduktion erschweren kann, jedoch das Risiko für Störungen in der Frakturheilung reduziert. Aufgrund dessen ist das Femur besser für Frakturmodelle geeignet als die Tibia [67]. Letztlich sollte auch die Lokalisation der Fraktur in Betracht gezogen werden. Diaphysäre Frakturmodelle sind häufiger zu finden als metaphysäre, da die Stabilisierung dort einfacher standardisiert zu induzieren ist [61] [63].

Des Weiteren bestehen auch einige Unterschiede, je nachdem, ob ein offenes oder geschlossenes Frakturmodell gewählt wird. 1984 entwickelten Bonnarens und Einhorn ein geschlossenes Frakturmodell am Femur der Ratte, welches 2004 von Manigrasso und O'Connor auf die Maus übertragen wurde [14] [51] [101]. In diesem Modell wird mittels einer Dreipunktbiegung eine standardisierte Querfraktur herbeigeführt. Die dabei entstandenen Frakturen sind nicht immer ganz einheitlich, dennoch spiegelt der Prozess der Dreipunktbiegung durch die stumpfe Guillotine am ehesten die mechanischen Vorgänge von klinisch relevanten Frakturen wider [184]. Mit Hilfe eines parapatellären Zugangs kann diese dann mit intramedullären Osteosyntheseverfahren stabilisiert werden. Während das

Weichteiltrauma dabei eher gering ausfällt, kann die intramedulläre Stabilisierung zu Schäden an Endost und Knochenmark führen und damit die physiologischen Heilungsprozesse einschränken [67]. Im Gegensatz dazu bringen offene Frakturmodelle ein größeres Weichteiltrauma mit sich. Hierbei wird über einen lateralen Zugang das Femur meist in seiner Länge von den Kondylen bis zum Trochanter freigelegt, um dann im Rahmen einer Osteotomie die Fraktur zu induzieren [20]. Dies führt zu einer einheitlichen Lokalisation und Geometrie der Verletzung und findet oft Anwendung in Pseudarthrosenmodellen [184]. Das Weichteiltrauma kann die Vaskularisation des Femurs erheblich einschränken. Ein Vorteil jedoch ist, dass hier extramedulläre Osteosyntheseverfahren zum Einsatz kommen können, die das Endost und Knochenmark schonen [67]. Grundsätzlich ist die Wahl eines geeigneten Osteosyntheseverfahrens unabdingbar. Intramedulläre Implantate haben den Vorteil, dass sie günstiger und etwas leichter in der Anwendung sind, was auch die Operationsdauer verkürzt [184].

Manigrasso und O'Connor wählten dazu einen intramedullären Pin, der distal verkeilt wurde um eine Dislokation zu verhindern. Die Fraktur wurde nachträglich mit Dreipunktbiegung induziert. Insgesamt ist dieses Modell eine Methode, deren Stabilisierung wenig Axial- und Rotationsstabilität bietet [67] [101].

In einem ähnlichen Verfahren wird stattdessen ein Pin verwendet, der an den Enden abgeflacht ist und so die Rotationsstabilität erhöht [66].

Ebenfalls suffiziente Stabilität kann durch eine intramedulläre Kompressionsschraube gewährleistet werden, die durch einen distalen Konus und ein proximales Gewinde axiale Kompression auf den Knochen ausübt und ebenso rotationsstabil ist. Bei diesem Verfahren wird zuvor noch ein Führungsdraht in den Markraum des Femurs eingeführt. Danach erfolgt erst die Fraktur mittels stumpfer Guillotine. Dadurch werden eine Dislokation der Fragmente und eine Deformierung des Implantats verhindert [67] [68].

Weiterhin gibt es auch einen für die Maus entwickelten Fixateur externe, der ebenso für Stabilität sorgt und dabei das Endost und Knochenmark weniger schädigt als intramedulläre Verfahren. Dieser kann allerdings aufgrund seiner externen Lage und Größe die physiologische Aktivität und das Gangmuster der Mäuse stören [20] [67].

Durch Kombination eines intramedullären Pins und einer extramedullären Klammer lässt sich ein beliebig großer Frakturspalt stabilisieren. Mit diesem Pin-Clip können somit Pseudarthrosemodelle und verzögerte Frakturheilung genauer untersucht werden [40] [41] [67].

Zuletzt kann auch eine externe Platte zur Stabilisierung genutzt werden. Diese wird mit vier Schrauben im Knochen verankert. Durch die externe Überbrückung des Frakturspalts wird die

Kallusbildung allerdings eingeschränkt. Dies kann umgangen werden, indem der steife mittlere Teil der Platte durch flexible Drähte ersetzt wird. Durch die hohe Stabilität kann damit vor allem die desmale Ossifikation untersucht werden [60] [67] [104].

3.5 Simvastatin

Neben Lovastatin wurde im Jahr 1986 Simvastatin als potenziell neues Medikament in der Therapie zur Lipidsenkung erfolgreich getestet [111]. Die Wirkweise der Statine beruht dabei auf einer kompetitiven Inhibition des Enzyms 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA). Die Erstzulassung durch die Firma Merck & Co erfolgte in den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) im Jahre 1991. Daraufhin wurde Simvastatin im Laufe der Jahre weltweit zu einem der meist verordneten Medikamente überhaupt [108]. Nachdem der Markt im weiteren Verlauf durch Generika ergänzt wurde, verlor Simvastatin diesen Stellenwert. Laut Arzneiverordnungsreport hat 2021 die Zahl der Verordnungen von Statinen inklusive Simvastatin insgesamt bis zum Jahr 2020 immer weiter zugenommen [98]. Simvastatin gilt als das am meisten untersuchte Statin in Tiermodellen und in der Knochenforschung [114].

3.5.1 Struktur

Simvastatin ist ein synthetisches Derivat von Lovastatin, welches selbst wiederum ein Fermentationsprodukt des *Aspergillus terreus* darstellt [80]. Sie gehören zur Gruppe der Hexahydronaphthalene. Dabei sieht die Grundstruktur einer substituierten 3,5-Dihydroxycarbonsäure-Kette aus 5 C-Atomen einem HMG-Molekül ähnlich (Abbildung (Abb.) 1). Der 2-Methylbutyrat-Ester Rest von Lovastatin in Simvastatin wurde durch eine 2,2-dimethylbutyrat-Ester Gruppe ersetzt, wodurch Simvastatin einen stärkeren inhibitorischen Effekt aufweist. Typ I Statine wie Lova-, Prava-, und Simvastatin besitzen einen ungesättigten Decalin-Ring [43] [58]. Die International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) -Formel von Simvastatin lautet [(1*S*,3*R*,7*S*,8*S*,8*aR*)-8-[2-[(2*R*,4*R*)-4-hydroxy-6-oxooxan-2-yl]ethyl]-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8*a*-hexahydronaphthalen-1-yl] 2,2-dimethylbutanoate und die Summenformel $C_{25}H_{38}O_5$. Es besitzt eine molare Masse von 418 g/ Mol. Der Aggregatzustand von Simvastatin ist fest und der Schmelzpunkt liegt bei 135-138 °C [144]. Simvastatin liegt als Lacton-Prodrug vor. Aufgrund dieser Lactongruppe ist es weniger wasserlöslich als andere Statine, was sich allerdings eher gering auf die Bioverfügbarkeit auswirkt [80].

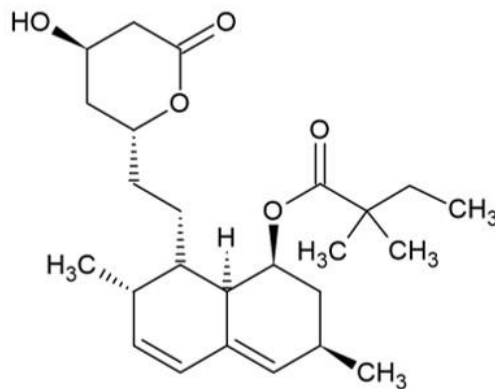


Abb. 1: Strukturformel von Simvastatin

3.5.2 Pharmakokinetik

Simvastatin wird als Einzeldosis abends oral in Tablettenform eingenommen, da in der Nacht die endogene Cholesterinproduktion am größten ist. Die Dosierung variiert dabei zwischen 5 mg - 80 mg je nach Bedarf. Diese wird je nach Therapieziel oder Komplikation angepasst. Simvastatin wird als Prodrug in Form eines inaktiven Lactons eingenommen und gut aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert. Danach durchläuft es einen ausgeprägten First-Pass-Effekt in der Leber, welche auch gleichzeitig das Zielorgan darstellt [3] [43]. Es wird entweder durch den OATP1B1 Transporter aktiv in die Hepatozyten aufgenommen oder aufgrund seiner lipophilen Eigenschaft durch passive Diffusion. In der Leber erfolgt die Hydrolyse in den aktiven Hauptmetaboliten Betahydroxysäure und vier weitere aktive Metaboliten. Durch dieses hohe Extraktionsverhältnis der Leber landen letztendlich nur 5 % des aktiven Metaboliten im systemischen Kreislauf [44] [167]. Die maximale Plasmakonzentration wurde dabei nach 1 - 2 Stunden gemessen und bei mehrfacher Gabe des Medikaments zeigte sich keine Akkumulation der aktiven Metaboliten. Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften liegen diese im Plasma zu mehr als 95 % an Plasmaproteine gebunden vor. Simvastatin ist ein Substrat von Cytochrom P450 3A4 (CYP3A4), was zu Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln führen kann und bei Komedikation beachtet werden sollte. Nach 96 Stunden zeigt sich, dass Simvastatin zu 60 % in den Faeces und zu 13 % im Urin nachgewiesen werden kann, und so größtenteils biliär ausgeschieden wird [3] [58].

3.5.3 Wirkmechanismus und weitere Effekte

Durch Simvastatin, bzw. durch seine aktiven Metaboliten, wird die HMG-CoA-Reduktase kompetitiv gehemmt, welche ein Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese in der Leber darstellt. Dieses katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, nämlich die Umwandlung von HMG-CoA zu Mevalonat. Dadurch ist die endogene Synthese von Cholesterin eingeschränkt [3]. Gleichzeitig hat die Inhibition eines so frühen Schritts in der Synthese auch den Vorteil, dass es nicht zur Akkumulation von zahlreichen Ausgangsstoffen

kommt, die potenziell toxisch sein könnten. Mevalonat dient nicht nur als Vorläufermolekül von Cholesterin, sondern auch von Ubichinon und Dolichol, was mitunter für die Toxizität von HMG-CoA-Reduktase-Hemmern in hohen Dosen in Tierstudien verantwortlich war [44] [100]. Aufgrund des Cholesterinmangels in der Leber, wird die Transkription des Low Density Lipoprotein (LDL)-Rezeptorgens gesteigert, sodass mehr LDL-Cholesterin aus dem Plasma in die Leber aufgenommen wird (Abb. 2) [58] [69]. Bereits in frühen Studien aus den Jahren 1989 und 1991 konnte u.a. von McDowell et al. gezeigt werden, dass mit Simvastatin das LDL-Cholesterin um 39 % gesenkt werden konnte. Das Gesamtcholesterin ist dabei um 32 % gesunken und Very Low Density Lipoprotein (VLDL)-Cholesterin um 43 %. Somit ist auch der sinkende Anteil von VLDL-Cholesterin, aus dem LDL-Cholesterin entsteht, für die Abnahme von LDL-Cholesterin im Plasma verantwortlich. Triglyceride und Apolipoprotein B sinken beide um 33 %, während High Density Lipoprotein (HDL)-Cholesterin um 23 % ansteigt [3] [105]. Auch Walker et al. und Stalenhoef et al. konnten eine ähnliche Wirksamkeit von Simvastatin zeigen [158] [178]. Patienten, die allerdings an kombinierten Hyperlipidämien leiden, benötigen meist noch eine verstärkte Absenkung der Triglyceride. Daher werden Statine oft noch mit weiteren lipidsenkenden Medikamenten kombiniert [112]. Insgesamt bewirkt Simvastatin eine Veränderung der Lipidverhältnisse im Plasma.

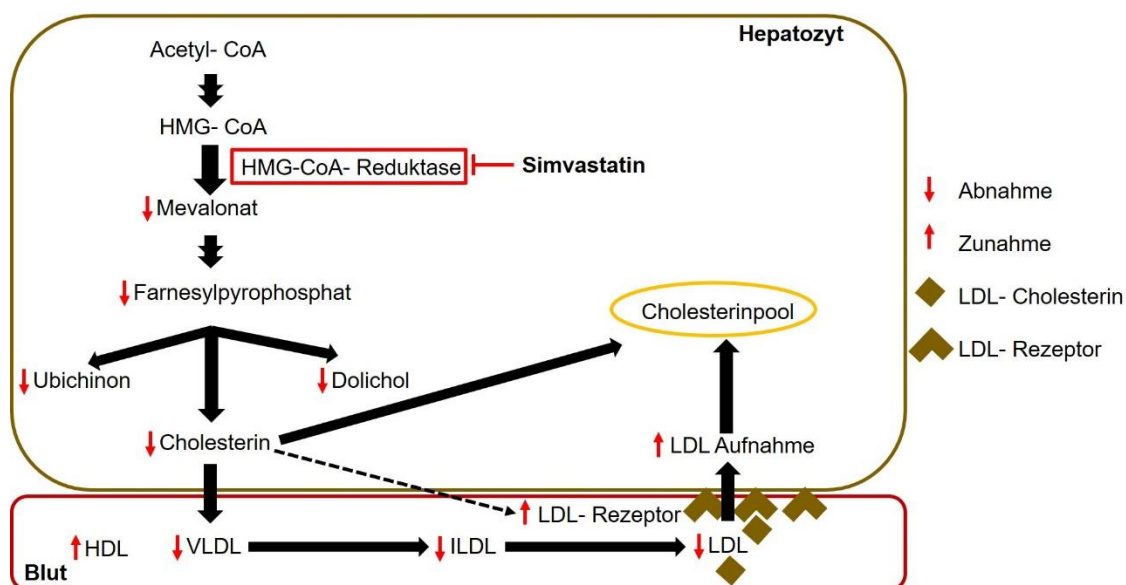


Abb. 2: Schema des Wirkmechanismus von Simvastatin in Anlehnung an Horiuchi et al. [69]

Neben dieser Wirkung auf den Lipidstoffwechsel zeigt Simvastatin noch zahlreiche pleiotrope Effekte. Diese sind allerdings meist unabhängig von der cholesterinsenkenden Wirkung, sondern beruhen auf dem Eingriff in den Mevalonatstoffwechsel. Durch die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase entstehen weniger Zwischenprodukte in diesem Stoffwechselweg,

sogenannte Isoprenoide. Diese sind u.a. für die Modifikation diverser Zellfunktionen und das Zellwachstum verantwortlich, wodurch die Entstehung der pleiotropen Effekte erklärt werden kann [49]. Statine können den Schaden reduzieren, der im Rahmen eines Myokardinfarkts unter ischämischen Bedingungen entsteht. Die kardioprotektive Wirkung von Simvastatin auf die kontraktile Funktion des Herzens während der Reperfusionsphase eines Infarkts, konnte Szárszoi et al. im Tierexperiment zeigen. Dieser protektive Effekt gilt aber nur für den akuten Einsatz von Simvastatin und nicht unter chronischer Behandlung [162]. In einer weiteren Tierstudie wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit Simvastatin, bezogen auf Muskelschwund und Kardioprotektivität, bei einer Tumorkachexie von Vorteil ist [136]. Des Weiteren besitzt Simvastatin einen deutlich antiinflammatorischen Effekt, der an der Reduzierung von Entzündungsmarkern, insbesondere von C-reaktivem Protein (CRP), im Blutplasma ersichtlich wird [50] [122]. Dabei werden vor allem proinflammatorische Zytokine, die von Monozyten abgegeben werden, inhibiert. Diese Eigenschaften tragen neben der Cholesterinsenkung auch dazu bei, die Bildung von atherosklerotischen Plaques zu mindern [36]. Zudem ist bekannt, dass Simvastatin antioxidativ wirkt [6]. Es dämpft oxidativen Stress und fördert antioxidative Abwehrmechanismen. Dies beruht auf verschiedenen Mechanismen. Zum einen werden freie Radikale entfernt oder deren Produktion durch Inhibition der NADPH-Oxidase gehemmt. Zum anderen bewirkt Simvastatin eine Wiederherstellung von enzymatisch und nicht-enzymatischen antioxidativen Systemen [6] [109]. Zusätzlich stimulieren Statine über einen Rho-GTPase abhängigen Weg und durch Aktivierung der Proteinkinase Akt die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) und wirken somit vaskuloprotektiv [52]. Durch die gesteigerte NO-Synthese haben Statine außerdem eine vasodilatative Funktion [177]. Des Weiteren haben Statine auch einen biphasischen Einfluss auf die Angiogenese [186]. Dieser ist allerdings Cholesterin-unabhängig, sondern wird über die Isoprenylierung und Modulierung von G-Proteinen vermittelt. Bei geringen therapeutischen Dosen zeigt sich eine angiogene Wirkung, bei sehr hohen Dosen allerdings eine angiostatische Wirkung [183]. Zusätzlich unterliegt dieser Effekt der Modellierung durch angiogene Stimuli und insbesondere der Mikroumgebung. Unter hypoxischen Bedingungen wird HIF-1 α vermindert abgebaut, womit die Expression von VEGF gefördert wird und somit die Angiogenese stimuliert wird. Gleichzeitig kann VEGF auch über die zuvor erwähnte Proteinkinase Akt gefördert werden. Im Gegensatz dazu werden die Proteinkinase Akt und eNOS unter inflammatorischen Bedingungen gehemmt. Zusätzlich bewirkt auch TNF- α direkt, dass Statine unter proinflammatorischen Umständen negativ auf die Angiogenese wirken [191]. Zudem zeigen Statine einen antikoagulativen Effekt, u.a. durch Hemmung der Thrombozytenaggregation [11]. Darüber hinaus wirkt Simvastatin positiv auf die Endothelfunktion und die Vasomotion. In eher hohen Konzentrationen verbessert es die Barrierefunktion des Endothels [173]. In Verbindung damit besitzt Simvastatin auch die Fähigkeit, den Blutdruck zu verringern. Dies

beruht auf dem Zusammenspiel der Hemmung von oxidativem Stress und von der entzündungshemmenden Fähigkeit in Kombination mit einem Anstieg der NO-Produktion [1].

Simvastatin hat zudem einen nachgewiesenen, bis dato jedoch kontroversen Effekt auf den Knochenstoffwechsel. Einerseits steigert Simvastatin die Viabilität und Differenzierung von Osteoblasten [19]. Zudem nutzt Simvastatin knochenanabole Signalwege des Östrogenrezeptors- α und scheint hemmenden Einfluss auf Osteoklasten zu haben [32] [37] [47] [88]. Jedoch finden sich auch Arbeiten, die einen hemmenden Effekt von Statinen z. B. durch erschwerte Rekanalisation und Angiogenese aufgrund reduzierter Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) beschreiben [167] [169]. Diese und weitere Effekte von Simvastatin auf den Knochenstoffwechsel werden nachfolgend in einer Übersicht zusammengefasst (Tabelle (Tab.) 1).

Effekte	Mechanismen
Effekte auf den Lipidstoffwechsel	↑ LDL-Rezeptoren
	↓ LDL-, VLDL-Cholesterin, Triglyceride, Apolipoprotein B im Serum
	↑ HDL-Cholesterin
Antiatherosklerotische Effekte	↓ Makrophagenwachstum, Akkumulation von Cholesterin in Makrophagen
	↓ Zelladhäsion, Thrombozytenaggregation
	↓ Migration und Proliferation von Myozyten
	↑ eNOS Aktivität
	↑ Fibrinolyse
Pleiotrope Effekte	Kardioprotektivität
	Antiinflammatorisch: ↓ CRP, ↓ Proinflammatorische Zytokine
	Antioxidativ: ↓ Freie Radikale ↓ NADPH-Oxidase
	Modellierung der Angiogenese
	Antiproliferativ
	Antikoagulativ
	Vaskuloprotektiv
	Vasodilatativ
Effekte auf den Knochenstoffwechsel	↑ Viabilität und Differenzierung von Osteoblasten

	↑ Differenzierung und Rekrutierung von Stammzellen
	↑ BMP-2, ↑ Östrogenrezeptor- α , ↑ Alkalische Phosphatase, ↑ Osteocalcin, ↑ OPG
	↓ Apoptose der Osteoblasten
	↓ Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten
	↓ Anzahl und Proliferation von Zellkolonien
	↓ RANKL, ↓ MMP-9
	↑ Knochendichte

Tab. 1: Effekte von Simvastatin

3.5.4 Indikation und Anwendung

Simvastatin wird meist als pharmakologische Ergänzung bei Patienten benutzt, die an einer primären Hypercholesterinämie oder kombinierten Dyslipidämien leiden und bei denen eine Ernährungsumstellung, Gewichtsreduktion und körperliches Training nicht ausreichend sind [3] [58]. Eine weitere Indikation stellt auch die homozygote familiäre Hypercholesterinämie dar [3]. Des Weiteren soll es von Patienten eingenommen werden, für die erhöhte Cholesterinwerte ein besonderes Risiko darstellen, da sie an manifester atherosklerotischer Herzerkrankung oder Diabetes mellitus leiden [3]. Dabei senkt Simvastatin die kardiovaskuläre Mortalität und Morbidität [3]. Bereits 1994 wurde in der Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) der Effekt von Simvastatin auf die Gesamtmortalität von Patienten untersucht, die an einer koronaren Herzerkrankung (KHK) und erhöhten Cholesterinwerten litten [142]. Dies war eine multizentrische, randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte Studie, an der 4 444 Patienten teilnahmen. Nach ungefähr 5 Jahren zeigte sich im Vergleich zwischen Simvastatin- und Placebogruppe eine Senkung des Mortalitätsrisikos mit Simvastatin um 30 %. Schwere koronare Ereignisse konnten um 34 % reduziert werden und die KHK-Mortalität um 42%. Auch das Risiko für einen Schlaganfall oder eine transitorisch ischämische Attacke (TIA) konnte um 28 % gesenkt werden. Dabei wurde gezeigt, dass das Gesamtcholesterin um 25 % und das LDL-Cholesterin um 35 % sinken und das HDL-Cholesterin um 8 % ansteigt [142]. In die 2002 veröffentlichten Heart-Protection-Study (HPS) wurden 20 536 Probanden eingeschlossen, die an KHK, Diabetes mellitus oder anderen arteriellen Verschlusskrankheiten litten [56]. Auch hier konnte die KHK-Mortalität nach 5 Jahren täglicher Simvastatin-Gabe um 18 % gesenkt werden. Ebenso konnte eine Risikoreduktion für die erwähnten kardialen oder zerebralen Ereignisse bestätigt werden. Zudem vermindert

Simvastatin das Risiko für makrovaskuläre Komplikationen für Patienten mit Diabetes Mellitus. Zuletzt wurde 2007 in der SEARCH Studie (Study of the Effectiveness of Additional Reductions in Cholesterol and Homocysteine) der Einfluss von zwei unterschiedlichen Dosierungen von Simvastatin auf 12 064 Teilnehmer untersucht [151]. Die Probanden hatten in ihrer Vergangenheit einen Myokardinfarkt erlitten und Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, inwiefern sich die Einnahme von 20 mg bzw. 80 mg Simvastatin auf das Auftreten schwerer vaskulärer Ereignisse auswirkt. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Dosierungen. Bloß die Häufigkeit für das Auftreten von Nebenwirkungen, insbesondere einer Myopathie, war in der Gruppe von Probanden, die 80 mg Simvastatin einnahmen, erhöht. Außerdem konnte durch die Verwendung von Simvastatin die Zahl von koronaren Interventionen wie Gefäßdilataationen und Bypass-Operationen gesenkt werden [142] [151]. In diesen Studien wurde auch eine deutliche Senkung des LDL-Cholesterins beobachtet, was mit den zahlreichen weiteren pleiotropen Effekten die positive Wirkung von Simvastatin in der kardiovaskulären Therapie erklärt [78]. Damit wirkt Simvastatin auch stabilisierend auf atherosklerotische Plaques [78]. Letztlich konnten all diese Effekte von Statinen im Jahre 2010 in einer großen Metaanalyse mit 170 000 Probanden aus 26 Studien nochmals bestätigt werden [22].

3.5.5 Anwendung im Tiermodell

Im Jahre 1999 untersuchten Mundy et al. die Wirkung der primär fettensenkenden Statine auf den Knochen. Dies geschah mit Hinblick darauf, dass Osteoporose ein schwerwiegendes Problem in unserem heutigem Gesundheitssystem darstellt. Dazu wurden u.a. Lovastatin und Simvastatin, sowohl in vitro als auch in vivo, murinen Schädelkalotten zugeführt. Es ergab sich eine vermehrte Expression von BMP-2 mit Anstieg der Knochenbildung sowie ein erhöhtes Volumen des spongiösen Knochens in Ratten [115]. Diese Ergebnisse ergaben eine neue Medikamentengruppe auf dem Markt, die hinsichtlich ihrer Wirkung auf den Knochen vielversprechend erscheint. Neben in vitro Studien folgten somit auch zahlreiche in vivo Untersuchungen [21] [102] [114] [133].

Dabei wurde Simvastatin systemisch appliziert, das heißt per os (p.o.), intraperitoneal, subcutan oder intramuskulär. Dieses wird allerdings über die Leber verstoffwechselt, was zu einer sinkenden Bioverfügbarkeit führt. Aufgrund dessen sollte eine regelmäßige Applikation erfolgen, damit der Plasmaspiegel konstant bleibt [131]. Einerseits wurde dies in Osteoporosemodellen angewandt, in denen vorrangig Ratten zum Einsatz kamen. Bereits 2001 untersuchten Maritz et al. den Effekt unterschiedlicher Dosen Simvastatin an ovariectomierten Ratten [102]. Hierbei wurde eine Abnahme der Knochendichte (bone mineral density (BMD)) festgestellt, und je nach Dosis des Statins eine negative oder positive Wirkung auf die Knochenneubildung [102]. Solch kontroverse Ergebnisse zeigten sich auch in weiteren

Osteoporosestudien [117] [133] [159] [176]. Zudem wurden auch Studien durchgeführt, die sich auf die Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie übertragen lassen [75] [76] [118]. Ein besonderer Schwerpunkt lag darüber hinaus auf Modellen der orthopädischen Chirurgie an Tibiae, Femora, Hüften und Wirbelsäulen unterschiedlicher Nagetiere. Bereits im Jahre 2001 untersuchten Oxlund et al. nach oraler Gabe den Einfluss von Simvastatin auf Wirbelkörper in Ratten. Dabei zeigte sich eine Steigerung des spongiösen Knochens und eine erhöhte Druckbelastbarkeit der Wirbelkörper in der Simvastatingruppe [132]. In weiteren Studien wurden frakturierte Femora nach osteosynthetischer Versorgung auf die Wirkung von Simvastatin untersucht [73] [150] [153]. Insgesamt zeigten sich dabei an osteoporotischen Femora [73], aber auch unter physiologischen Bedingungen, positive Effekte auf die Frakturheilung und die Knochenformation [150] [153]. Im Jahre 2010 hingegen zeigten Chissas et al. einen negativen Effekt von Simvastatin auf die Frakturheilung im Kaninchenmodell. Dabei zeigte sich zum einen eine verminderte BMD, zum anderen eine verminderte Knorpelbildung im Kallus und damit einhergehend ein vergrößerter Frakturspalt [21].

Neben systemischer Applikation sind auch Modelle mit lokaler Verabreichung von Simvastatin durchgeführt worden. Die Applikation erfolgte hierbei durch wiederholte lokale Injektionen, mittels Trägermaterialien beispielsweise (bspw.) Scaffolds, zur kontinuierlichen lokalen Abgabe von Simvastatin [35] [187]. Andere Studien nutzten Gelatine-Schwämme oder Kollagen-Schwämme kombiniert mit Simvastatin, um diese lokal in einen Knochendefekt einzubringen [17] [134]. So applizierten Vaziri et al. im Jahr 2007 im Rahmen eines Peridontitismodells Simvastatin subperiostal in die bukkale Falte von Ratten und fanden daraufhin nach 4 Wochen ein erhöhtes Kallusvolumen und eine erhöhte BMD [175]. Die Studien ergaben kontroverse Effekte von Simvastatin auf die BMD und die Knochenheilung [17] [34]. In anderen Modellen erfolgt die lokale Bereitstellung von Simvastatin im Knochendefekt auf unterschiedlichste Art und Weise, zum Beispiel (z.B.) über lokal eingelegte Katheter, beschichtetes Osteosynthesematerial, Scaffolds, Gele, Mikrosphären oder Knochentransplantat vom Rind [39] [72] [137] [139] [154] [163]. Insgesamt wurden dabei ebenfalls kontroverse Effekte von Simvastatin auf die Knochenheilung beobachtet. Moshiri et al. kamen in ihrem Review zu dem Ergebnis, dass die Erfolgsrate einer Anwendung von Simvastatin in orthopädischen Studien im Hinblick auf Knochenregeneration und -heilung, unabhängig vom Applikationsweg, bei 82,85 % lag, und somit einen positiven Effekt von Simvastatin zeigten [114].

Trotz dieser Vielzahl an verschiedenen Tiermodellen wurde Simvastatin interessanterweise bis dato noch nicht in einem Ischämiemodell hinsichtlich der Frakturheilung untersucht.

3.5.6 Nebenwirkungen

Neben der Wirksamkeit von Simvastatin wurden in den beiden großen Studien 4S und HPS bereits in frühen Jahren auch damit einhergehende unerwünschte Arzneimittelwirkungen untersucht [56] [142]. Grundsätzlich sind Statine gut verträgliche Medikamente mit Nebenwirkungen, die als selten ($< 1/1000$) oder sehr selten ($< 1/10000$) eingestuft werden (Tab. 2). Allgemein zählen dazu u.a. Kopfschmerzen, Schwindel, Übelkeit und Obstipation. Spezifischer sind hingegen die in den großen Studien berichteten ansteigende Leberwerte im Rahmen einer Erhöhung der Serum-Transaminasen. Dies ist meist zu Beginn einer Therapie sichtbar, aber nach Dosisreduktion oder Absetzen des Statins rückläufig. Wahrscheinlich beruht dies auf der Reaktion der Leber auf den lipidsenkenden Effekt [3] [8]. Des Weiteren wurde nach regelmäßiger Simvastatineinnahme der Anstieg der Creatinkinase (CK) im Serum beobachtet und damit einhergehend eine Myopathie mit entsprechenden Muskelschmerzen. Grundsätzlich konnte aber für das Auftreten von Myalgien in der HPS-Studie zwischen Simvastatin und Placebo kein signifikanter Unterschied festgestellt werden [56]. Begleitend zu einer bis zu 40-fach über der Norm erhöhten CK-Konzentration ist meist eine Rhabdomyolyse. Diese ist eine lebensbedrohliche Komplikation mit stark erhöhten Myoglobinwerten, Myoglobinurie und schließlich akutem Nierenversagen. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten ist dosisabhängig und somit insbesondere bei hohen Dosen wie 80 mg erhöht. Aufgrund der Verstoffwechselung von Simvastatin über CYP3A4 besteht ein großes Interaktionsrisiko mit anderen Medikamenten und damit einhergehend auch ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Nebenwirkungen. Die gleichzeitige Anwendung von potenten CYP3A4-Inhibitoren wie z.B. Fibraten, Erythromycin, Ketoconazol und HIV-Protease-Inhibitoren ist kontraindiziert, da dadurch die Konzentration von Simvastatin erhöht wird und letztlich vor allem Myopathien und Rhabdomyolyse vermehrt auftreten. Daraus ergeben sich als Kontraindikation für die Einnahme von Statinen Muskelerkrankungen, Schäden der Leber und akute Unverträglichkeitsreaktionen. Zudem ist es in der Schwangerschaft und Stillzeit kontraindiziert. Trotz mangelnder Studienlage wird davon ausgegangen, dass mit Einnahme von Simvastatin wichtige Metaboliten der Cholesterinsynthese im Fötus vermindert vorkommen und damit die Entwicklung beeinträchtigt wird [3] [8].

	Selten ($< 1/1000$)	Sehr selten ($< 1/10000$)
Blut und Immunsystem	Anämie	Anaphylaxie
ZNS und Psyche	Kopfschmerzen, Parästhesien, Schwindel, periphere Neuropathie, kognitive Beeinträchtigung, Sehverschlechterung	Schlaflosigkeit, Amnesien

Gastrointestinaltrakt und Leber	Obstipation, Bauchschmerzen, Flatulenz, Dyspepsie, Diarrhö, Übelkeit, Erbrechen, Pankreatitis Hepatitis, Ikterus Erhöhung der Serum- Transaminasen und der alkalischen Phosphatase	Leberversagen
Haut	Hautausschlag, Pruritus, Alopezie	Lichenoide Arzneimittlexantheme, Gynäkomastie
Skelettmuskel und Bindegewebe	Myopathie mit Myositis, Myalgie, Muskelkrämpfe, Rhabdomyolyse mit/ohne Nierenversagen, Erhöhung der CK-Werte	Muskelriss
Stoffwechsel	Erhöhung von HbA1c und Nüchternglucosespiegel, Gefahr für metabolisches Syndrom und Diabetes mellitus	

Tab. 2: Nebenwirkungen von Simvastatin

3.6 Ischämie

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) der unteren Extremität besitzt mit 202 Millionen betroffenen Menschen weltweit (Stand 2017) eine hohe Prävalenz in der Bevölkerung [2]. Dies wird beeinflusst durch die alternde Bevölkerung und damit zusammenhängend durch das vermehrte Auftreten von Komorbiditäten wie Bluthochdruck und Diabetes mellitus. Mit der pAVK einhergehende Endpunkte sind dabei meist Myokardinfarkte und cerebrovaskuläre Ereignisse [2]. Aber auch eine suffiziente Frakturheilung ist von einer ausreichenden arteriellen Blutversorgung abhängig. So gilt eine verminderte Blutzufuhr und damit einhergehenden ischämischen Verhältnissen mit Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen als Risikofaktor für die Entstehung von Pseudarthrosen [53]. Es wurde schon relativ früh festgestellt, dass ein arterieller Verschluss in Patienten mit Tibiafraktur zu einer schlechteren Heilung führt [29]. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass Patienten mit insuffizienter

Frakturheilung und Pseudarthrose von einer angiographischen Revaskularisation profitierten [27].

Um die Mechanismen der Frakturheilung unter ischämischen Bedingungen besser zu verstehen, wurden Untersuchungen im Tiermodell durchgeführt. Lu et al. haben Mäuse unterschiedlichen Alters im Rahmen eines Tibia Frakturmodells miteinander verglichen. Dabei wurde gezeigt, dass die Knochenbildung und das Remodeling bei älteren Mäusen (18 Monate) eingeschränkt war, sowie dass eine verzögerte Zelldifferenzierung und -invasion stattfinden [93]. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die Gruppe der älteren Mäuse eine verminderte Reaktion auf angiogene Reize aufwiesen und dies die eingeschränkte Frakturheilung beeinflussen könnte [96]. In einem weiteren Modell von Lu et al. wurde ein ischämisches Milieu durch Resektion der Femoralarterie erzeugt und dann die Heilung einer Tibiafraktur untersucht. Dabei ergab sich eine verminderte Kallusgröße mit geringerer Knochen- und Knorpelmatrix [95]. Die zuvor beschriebene Resektion der Arterie führt zu einer abrupten schwerwiegenden Ischämie, die in dieser Form im klinischen Alltag kaum zu finden ist. Die durch pAVK induzierte Ischämie ist eine chronisch milde Ischämie, die erst mit der Zeit zu hypoxischen Bedingungen im Gewebe führt [24] [107]. Eine Reihe von verschiedenen chirurgischen Verfahren, um eine milde Extremitätenischämie zu induzieren, wurde bereits von Aref et al. in einem Review dargestellt [7]. Allerdings wurde dabei nicht der Einfluss auf die Frakturheilung beschrieben. Aus diesem Grund haben Menger et al. ein Mausmodell mit milder Ischämie durch eine abgangsnahе doppelte Ligatur der Arteria (A.) profunda femoris und nachfolgend geschlossener Frakturierung des Femurs entwickelt [107].

Die A. profunda femoris erweist sich dabei als geeignet, da sie hauptsächlich den Femurschaft und die mediale Oberschenkelmuskulatur versorgt. Gleichzeitig kommt es zu einer geringeren Ausbildung von Kollateralen im Vergleich zur Ligatur von anderen Oberschenkelarterien [7]. In der Studie von Menger et al. zeigte sich 5 Wochen postoperativ eine verminderte Biegesteifigkeit zusammen mit einem verminderten Knochenanteil im Kallus und einem verzögerten Remodelingprozess [107]. Anhand dieses Modells konnte gezeigt werden, dass es durch die hypoxischen Bedingungen zu einer eingeschränkten Frakturheilung kommt. Dieses Modell gilt als Grundlage für die vorliegende Studie zur Untersuchung der bislang unbekannten Wirkung von Simvastatin auf die Frakturheilung in einem Ischämiemodell.

3.8 Zielsetzung

Das Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, ob die systemische Applikation von Simvastatin Einfluss auf die Frakturheilung in einem murinen Ischämiemodell hat.

3.9 Fragestellung

Die durchgeführten tierexperimentellen Studien sollten die Frage beantworten, inwieweit die Applikation von Simvastatin die Frakturheilung gegenüber der Applikation eines Vehikels in einem etablierten Ischämiemodell an der Maus beeinflusst.

Trotz des dargestellten breiten Einsatzes von Simvastatin im klinischen Alltag, liegen bislang keine Informationen bezüglich der Wirkung von Simvastatin auf die Frakturheilung unter ischämischen Bedingungen vor.

Die Nullhypothese lautet:

„Die Frakturheilung wird durch systemische Applikation von Simvastatin unter Ischämiebedingungen im Mausmodell im Vergleich zu Tieren ohne Applikation von Simvastatin (Kontrollen) nicht beeinflusst.“

4 Material und Methodik

4.1 Methoden

4.1.1 Studiendesign

Die Studie mit der Tierversuchsnummer 35/2020 wurde am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar durchgeführt. Sie erfüllt die Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes und wurde von der Behörde (Landesamt für Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittel- und Veterinärwesen - Zentralstelle, Konrad-Zuse-Straße 11, 66115 Saarbrücken) genehmigt.

Bei diesen Untersuchungen kamen insgesamt 47 Tiere zum Einsatz. Davon wurde 22 Tieren Simvastatin in einer Dosierung von 30 mg/kg KG p.o. verabreicht. Äquivalent dazu bekamen 25 Tiere die entsprechende Menge isotone Kochsalzlösung (NaCl) ebenfalls p.o.. An Tag 0 wurde mittels eines standardisierten Operationsverfahrens eine Ischämie sowie eine Fraktur induziert und mittels Osteosynthese stabilisiert. Je nach Gruppenzuordnung erfolgte die Auswertung nach 2 oder 5 Wochen. Untersucht wurden die extrahierten Proben dann biomechanisch, radiologisch mittels Röntgen und Computertomographie (CT), histomorphometrisch und proteinbiochemisch in Form eines Western Blots (Tab. 3).

	Simvastatin		Kontrolle	
	2 Wochen	5 Wochen	2 Wochen	5 Wochen
Biomechanik	n = 8	n = 9	n = 10	n = 10
Radiologie	n = 8	n = 9	n = 10	n = 10
Histomorphometrie	n = 7	n = 9	n = 10	n = 10
Western Blot	n = 5	X	n = 5	X

Tab. 3: Studiendesign

4.1.2 Tiermodell

Die 3 bis 6 Monate alten CD-1 Mäuse wurden in der Tierhaltung ebenfalls am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie an der Universität des Saarlandes gehalten. Dabei wurde auf klimatisierte Bedingungen mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 % und einer Lufttemperatur von 22 °C bis 24 °C sowie auf einen 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus geachtet. Die Tiere erhielten Standardfutter (Altromin 1320, Altromin, Lage, Deutschland) in Pelletform und Wasser stand ihnen frei zur Verfügung. Das mittlere Gewicht der Mäuse belief

sich auf $37,46 \text{ g} \pm 5,46 \text{ g}$ (Simvastatingruppe: $36,98 \text{ g} \pm 5,59 \text{ g}$, Kontrollgruppe: $38,01 \text{ g} \pm 5,26 \text{ g}$)

Zur osteosynthetischen Versorgung wurde eine intramedulläre Zugschraube (MouseScrew™, RISystem AG, Davos, Schweiz) gewählt (Abb. 3), die aus medizinischem Stahl besteht. Die Schraube misst eine Länge von 17,2 mm und einen Durchmesser von 0,5 mm. Zur proximalen Verankerung besitzt die Schraube ein Gewinde mit 0,5 mm Durchmesser und 4 mm Länge. Distal befindet sich ein Konus mit 0,8 mm Durchmesser. Durch diesen Aufbau wird vor allem axiale Kompression als auch Rotationsstabilität gewährleistet. Zusätzlich befindet sich am Konus ein 1,3 mm langes Verlängerungsteil, welches in den Schraubendreher eingespannt wird und nach korrekter Position der Schraube im Femur bei einem definierten Drehmoment an der Sollbruchstelle abbricht.

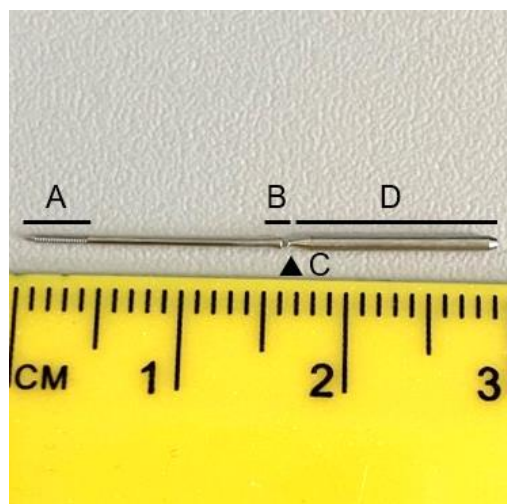


Abb. 3: MouseScrew™ (RISystem AG)-Länge 17,2 mm, Durchmesser 0,5 mm - Gewinde (A), Konus (B), Sollbruchstelle (C), Verlängerungsteil (D)

4.1.3 Operationsverfahren

Die Versuchsdurchführung erfolgte ebenso am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes. Dabei wurden stets standardisierte Bedingungen eingehalten.

Zu Beginn erfolgte die Narkotisierung der Mäuse über eine intraperitoneale Applikation von 100 mg/kg KG Ketamin (Ursostamin® 100 mg – Serumwerke Bernburg, Bernburg, Deutschland) und 12 mg/kg KG Xylazin (Rompun® 2 % - Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland). Um die Augen vor Austrocknung zu schützen wurde eine Dexapanthenol-Salbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH) aufgetragen. Die Haare am gesamten rechten Bein, in der rechten Leiste und ein Teil der Rückenbehaarung an der rechten Flanke wurden mit Hilfe eines kleinen elektrischen Rasierers abrasiert. Danach wurde

eine Enthaarungscreme (elca-med® - ASID BONZ GmbH, Herrenberg, Deutschland) aufgetragen, die nach ungefähr einminütiger Einwirkzeit wieder sorgfältig abgewaschen wurde, sodass das Operationsgebiet nun vollständig von Haaren befreit war.

Nachdem die Maus in Rückenlage auf dem Operationstisch platziert wurde, wurde die Haut gründlich mit einem Desinfektionsmittel (Softasept® N, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Das rechte Bein wurde entweder mit einem Fixierpflaster (Leukotape classic®, BSN Medical, Hamburg, Deutschland) auf der Unterlage oder je nach Operationsschritt mit der linken Hand fixiert. Dabei ist das Bein leicht außenrotiert und extendiert. Nach Bestätigung einer ausreichenden Narkosetiefe über Schmerzreflexe wie z.B. mit dem toe pinch reflex, erfolgte der 8 mm lange Hautschnitt mit einer Skalpellklinge (Carbon Steel Skalpellklingen #11 – Braun Aesculap AG & Co KG, Tuttlingen, Deutschland) medial der Patella. Dabei wurde darauf geachtet, dem bereits von außen sichtbarem Verlauf des femoralen Gefäß-Nerven-Bündels zu folgen, dennoch aber den Schnitt lateral davon zu setzen, um dieses nicht zu schädigen (Abb. 4). Nach Inzision der Haut wurde das femorale Gefäß-Nerven-Bündel aufgesucht und nach proximal zum Leistenband verfolgt. Nun wurde distal des Inguinalbandes nach medial der Abgang der A. profunda femoris mit einer spitzen Pinzette und einer stumpfen Sonde freipräpariert (Abb. 5-6). Unter der Arterie wurden nun zwei 0,7 mm dicke Seidenfäden (RESORBA, Nürnberg, Deutschland) durchgefädelt (Abb. 7) und jeweils einzeln verknotet, um so die doppelte Ligatur der A. profunda femoris und damit die ischämischen Bedingungen zu induzieren (Abb. 8-9).

Im nächsten Schritt erfolgte ein ungefähr 5 mm langer vertikaler Schnitt am medialen Rand der Patellarsehne am Übergang zur Kniegelenkscapsel (Abb. 10), um darauffolgend mit einem Wattetupfer die Patella nach lateral zu luxieren. Nun eröffnete sich der Blick auf die Femurkondylen (Abb. 11). Mit der linken Hand wurde das Bein in Flexionsstellung gehalten, damit mittels einer 24 Gauge (G) Spritzkanüle (BD Microlance 3TM - 24 G 1" - Nr. 17, Durchmesser 0,55×25 mm, B. Braun, BD Drogheda, Ireland) zentral in der Fossa intercondylaris die Kortikalis des Femurs bis auf den Markraum eröffnet werden konnte (Abb. 12). Danach wurde in das entstandene Loch in der Kortikalis eine 27 G Spritzkanüle (BD Microlance 3TM - 27 G ¾ - Nr. 20, Durchmesser: 0,4 × 19 mm, B. Braun) eingeführt, die das Femur in seiner ganzen Länge retrograd bis zum Bereich des Trochanter major durchbohrt (Abb. 13). Die Kortikalis am proximalen Femur wurde nun ebenfalls durchstoßen. Nach Entfernen der Kanüle wurde in den Bohrkanal ein ca. 10 cm langer Wolframdraht mit einem Durchmesser von 0,2 mm (Goodfellow Cambridge Limited, Huntingdon, England) eingeführt (Abb. 14), dessen Ende proximal an einer kleinen Inzision in der Rückenhaut nach außen tritt. Dieser kam im Femur nun so zu liegen, dass das distale und proximale Ende einige Zentimeter über dem Knochenniveau ragten. Nach röntgenologischer Verifizierung der korrekten Lage des Drahtes (Abb. 15) und einer weiterhin suffizienten Narkosetiefe erfolgte die geschlossene

Fakturierung des Femurs mittels Dreipunktbiegung (Abb. 16). Dazu wurde das rechte Bein in einer stumpfen Guillotine positioniert und durch Herunterfallen eines spezifischen Gewichts standardisiert die Fraktur induziert [61] [68]. In der Röntgenkontrolle war nun in der seitlichen Ebene eine diaphysäre Schräg- bzw. Querfraktur nachweisbar (Abb. 17), die dem Typ A2 bis A3 der AO-Klassifikation entspricht [57]. Darauf folgend wurde eine intramedulläre Zugschraube (MouseScrew™, RISystem AG) mit ihrem Verlängerungsteil in den Schraubendreher eingespannt. Die Maus lag hierbei auf ihrer linken Seite und mit Zeigefinger, Mittelfinger und Daumen der linken Hand wurde das rechte Bein so fixiert, dass es in einer möglichst stabilen flektierten Seitenlage verbleibt. Mit dem Mittelfinger wurden die Weichteile nach proximal gezogen, um freie Sicht auf die Femurkondylen zu garantieren. Der Mittelfinger lag in der Fossa poplitea um das Bein optimal zu beugen, während dabei Daumen und Mittelfinger den Unterschenkel fixieren. Die Zugschraube wurde nun auf das Ende des Führungsdrahtes gesteckt, welches am distalen Ende des Femurs hinausragt. Mit gleichmäßiger Drehbewegung im Uhrzeigersinn und leichtem Druck wurde die Schraube entlang des Führungsdrahtes retrograd in den Bohrkanal eingebracht (Abb. 18). Nachdem sich das Gewinde im proximalen Femur und der Konus distal zwischen den Kondylen verankerten, brach das Verlängerungsteil der Schraube an der Sollbruchstelle ab und der Draht konnte durch die kleine Hautinzision dorsal entfernt werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schraube so tief eingebracht wurde, dass ihr Konus vollständig in der Fossa intercondylaris versenkt war (Abb. 19). Um die korrekte Lage der Schraube und der Knochenfragmente zu verifizieren, wurde erneut eine röntgenologische Kontrolle in Seitenlage durchgeführt (Abb. 20). Danach wurde die Patella reponiert und die Patellarsehne und Gelenkkapsel mit Einzelknopfnahntechnik mit 5-0 Prolene®-Faden (Ethicon Inc., Somerville, USA) in Extensionslage des Beines refixiert (Abb. 21). Darauf wurde durch passives Beugen und Strecken des Beines überprüft, ob der Bewegungsumfang des Kniegelenks, dem der Ausgangslage entspricht. Zum Schluss wurde die Haut mit drei Hautnähten ebenfalls mit 5-0 Prolene®-Faden verschlossen (Abb. 22). Zum Ausgleich des Flüssigkeitsverlustes während der Operation wurde der Maus 10 ml/kg KG Natriumchloridlösung subkutan in die Nackenfalten appliziert.



Abb. 4: Hautschnitt medial der Patella an der Oberschenkelinnenseite

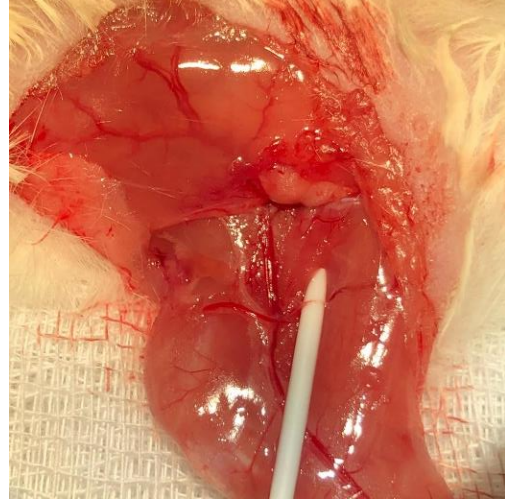


Abb. 5: Darstellung der A. profunda femoris am Tierkadaver

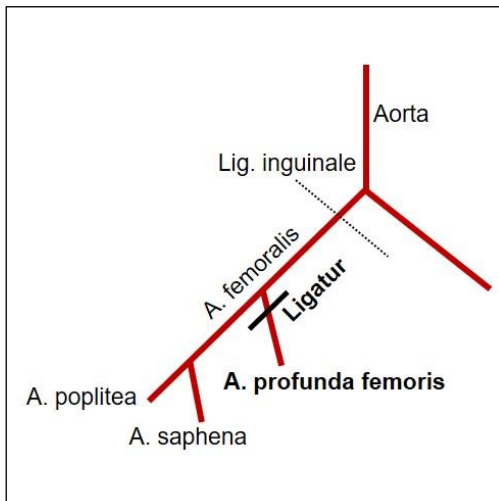


Abb. 6: Schematische Darstellung der Lokalisation der Ligatur



Abb. 7: Durchzug der Ligaturfäden unter der A. profunda femoris



Abb. 8: Doppelte Ligatur der A. profunda femoris am Tierkadaver



Abb. 9: Ligatur zur Induzierung einer milden Ischämie



Abb. 10: Darstellung der Patellarsehne



Abb. 11: Nach lateral luxierte Patella, Blick auf die Femukondylen



Abb. 12: Eröffnung der Kortikalis mit einer 24 G Kanüle



Abb. 13: 27 G Kanüle zur Durchbohrung des Markraums



Abb. 14: Führungsdraht



Abb. 15: Lage des Führungsdrahts im Röntgen

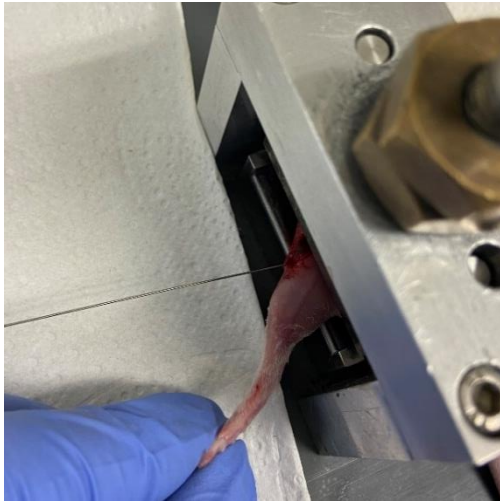


Abb. 16: Geschlossene Frakturierung des Femurs

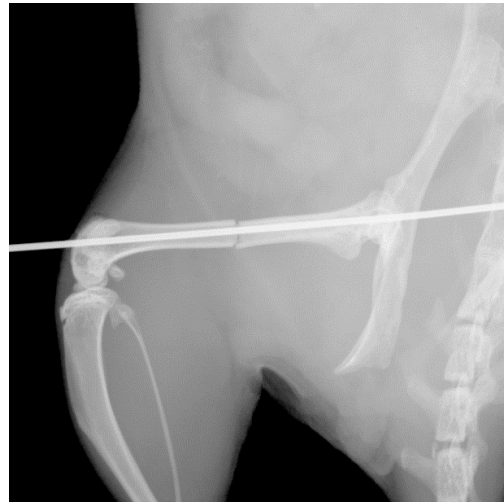


Abb. 17: Röntgenologische Kontrolle der Femurfraktur



Abb. 18: Implantation der MouseScrew™ (RISystem AG) mittels Schraubendreher



Abb. 19: Konus der Zugschraube interkondylär versenkt

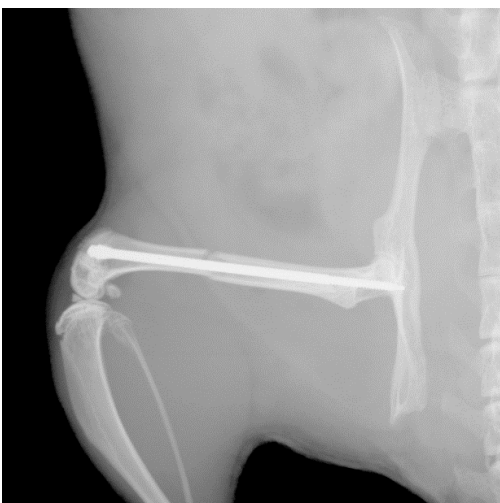


Abb. 20: Röntgenologische Kontrolle der Lage der Zugschraube



Abb. 21: Refixation der Patellarsehne durch Einzelknopfnah



Abb. 22: Hautnaht

4.1.4 Medikamentenapplikation

Die Applikation von 30 mg/kg KG Simvastatin (SimvaHEXAL® - HEXAL AG, Holzkirchen, Deutschland) bzw. von einer äquivalenten Menge NaCl (0,9 % Isotone Kochsalz-Lösung, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) erfolgte p.o. mit Hilfe einer Schlundsonde jeweils täglich, beginnend am Tag der Operation. Dies erfolgte je nach Gruppenzugehörigkeit 2 oder 5 Wochen lang.

4.1.5 Tötung der Tiere

Nach 2 bzw. 5 Wochen wurden die Mäuse zunächst narkotisiert, um eine seitliche Röntgenaufnahme des rechten Femurs anzufertigen (Abb. 23). Daraufhin erfolgte die Tötung durch Genickbruch, um die Femora zu extrahieren.

4.1.6 Präparation der Knochen

Nach Tötung der Tiere erfolgte die Explantation beider Femora zur weiteren Auswertung. Dazu erfolgte der Hautschnitt beginnend am Tibiaplateau entlang des Femurs bis zur Hüfte mit einer Skalpellklinge (Carbon Steel Skalpellklingen #15 – Braun Aesculap AG & Co KG). Die Patellarsehne und weitere stabilisierende Bänder wurden horizontal abgetrennt, um Tibia und Femur voneinander zu separieren. Am Femurschaft wurde möglichst knochenah nach proximal präpariert. Nach Durchtrennung der Hüftgelenkscapsel und der zugehörigen Bänder erfolgte die Exartikulation des Femurkopfes. Die explantierten Femora werden nun bestmöglich vom angrenzenden Weichteilmantel befreit. Die intramedulläre Zugschraube wurde mithilfe eines Entfernungsinstruments aus dem vormals frakturierten Femur vollständig entfernt. Währenddessen wurden beide Femora ständig mit Natriumchloridlösung feucht gehalten und in feuchte Kompressen eingewickelt. Nach der biomechanischen Analyse wurden die Femora in Formalinlösung (4 %) konserviert (Abb. 23).

Die Tötung und Präparation der Versuchstiere in der Western Blot Gruppe erfolgte auf die gleiche Weise, jedoch wurde dabei nur das rechte Femur explantiert. Im Anschluss wurde bei diesen Proben das Kallusgewebe, das sich nach zwei Wochen gebildet hatte, abgetragen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C kryokonserviert.



Abb. 23: Explantiertes Femur nach Einlage in Formalin

4.2 Zielkriterien und Auswertung

4.2.1 Biomechanik

Zunächst erfolgte anschließend an die Röntgenanalyse die biomechanische Analyse beider explantierter Femora 2 und 5 Wochen postoperativ. Dazu wurden diese einer 3-Punkt-Biege-Testung unterzogen (Mini-Zwick Z 2.5, Zwick GmbH, Ulm, Deutschland) (Abb. 24). Hierbei wird die Biegesteifigkeit [N/mm] gemessen, ohne die Knochen zu zerstören. Das gesunde kontralaterale Femur wurde ebenfalls einer Messung unterzogen, um die Biegesteifigkeit des frakturierten Femurs zusätzlich zu absoluten auch in relativen Werten im Verhältnis zur gesunden Gegenseite angeben zu können. Dies diente zusätzlich als interne Kontrolle. Um standardisierte Bedingungen zu gewährleisten, wurden die Knochen stets mit der ventralen Seite nach unten positioniert. Der Stempelabstand betrug 6 mm und die Geschwindigkeit der Messung erfolgte mit 1 mm/min. So kann die Biegesteifigkeit in dem dabei entstandenen linearen Anteil des Kraft-Weg-Diagramms abgelesen werden. Nach der Testung wurden die Femora in Formalinlösung bis zur weiteren Auswertung konserviert.

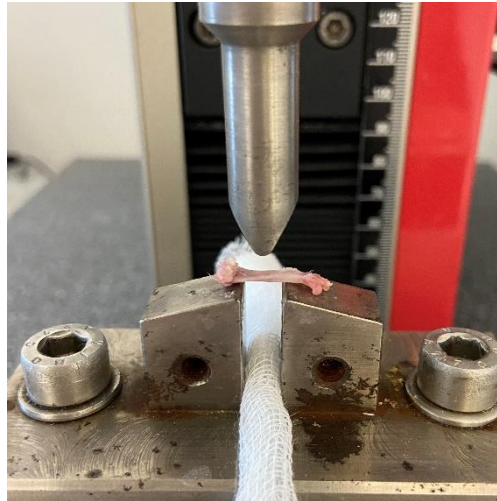


Abb. 24: Positionierung eines gesunden Femurs in der 3-Punkt-Biegevorrichtung

4.2.2 Röntgen

Jeweils nach 2 und 5 Wochen erfolgte eine röntgenologische Analyse beider explantierter Femora (Abb. 25). Die Bilder wurden mit einer Spannung von 24 kV und einer Belichtungszeit von 10 Sekunden im anterior-posterioren Strahlengang angefertigt (MX-20- Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, IL, USA; Faxitron Sr 1.4.1 - Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, IL, USA). Zur weiteren Auswertung wurde der Goldberg-Score genutzt [48]. Anhand dieses Schemas konnte beurteilt werden, inwieweit eine knöcherne Überbauung des Frakturspalts stattgefunden hat (Tab. 4).

Punkte	Bedeutung
0	Keine knöcherne Überbauung
1	Partielle knöcherne Überbauung
2	Vollständige knöcherne Überbauung

Tab. 4: Schema Goldberg-Score je Kortikalis in seitlicher Röntgenaufnahme

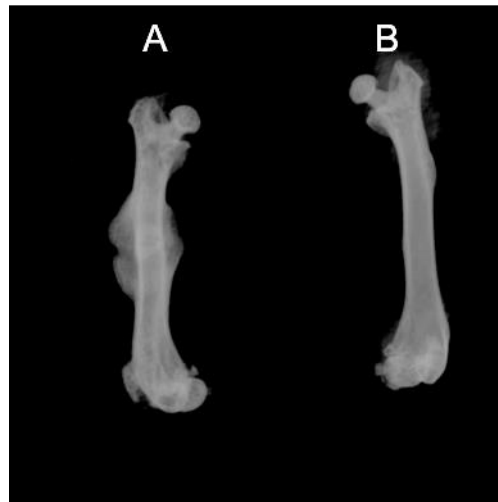


Abb. 25: Röntgenaufnahme beider Femora nach Explantation: frakturierter Knochen nach 2 Wochen (A) und gesunder kontralateraler Knochen (B)

4.2.3 Computertomographie (CT)

Die konservierten Femora der 2 und 5 Wochen Gruppen wurden daraufhin einer computertomographischen Analyse ex vivo unterzogen. Die rechten Femora wurden in einer Micro-CT (Skyscan 1172, Bruker, Billerica, MA, USA) mit einer Schichtdicke von $7,5\ \mu\text{m}$ eingescannt (Stromstärke: $200\ \mu\text{A}$, Röhrenspannung $50\ \text{kV}$, Intervalle: $0,4^\circ$, Expositionszeit: $2400\ \text{ms}$, Filter: $0,5\ \text{mm}$ Aluminium). Die Bilder wurden dann in dreidimensionaler Form rekonstruiert und abgespeichert. Zur Analyse wurde eine Computersoftware CTAnalyser verwendet (Bruker, Billerica, MA, USA) verwendet. Zunächst wurde eine Region of interest (ROI) proximal und distal definiert, die das gesamte Kallusgewebe umfasste. Danach wurde von Bild zu Bild in der transversalen Ebene der Kallus unter Aussparung des Markraums und des ursprünglich gesunden Knochengewebes markiert und die ROI damit präzise konturiert. Um Knochen und Weichteile voneinander zu unterscheiden, wurden durch die Software bestimmte Schwellenwerte gemäß Vorarbeiten festgelegt [126] [128]. Anhand der nun generierten ROI erfolgte die Auswertung der Daten. Untenstehende Parameter wurden hierzu ermittelt (Tab. 5).

Micro-CT Parameter
Gesamtvolumen Kallus [mm ³] (Tissue Volume, TV)
Gesamtvolumen Knochen [mm ³] (Bone Volume, BV)
Verhältnis des Knochenvolumens (BV) zum Kallusvolumen (TV) [%], (BV/TV)
Trabekeldicke [mm] (Trabecular thickness, TbTh)
Trabekelabstand [mm] (Trabecular separation, TbSp)
Trabekelanzahl [1/mm] (Trabecular number, TbN)

Tab. 5: Parameter der computertomographischen Analyse

4.2.4 Histomorphometrie

Nach der CT wurden von den in Formalin eingelegten Femora der rechten Seite histologische Präparate angefertigt. Hierzu wurden diese zunächst für 12-24 Stunden in eine Zinklösung (ICH Zinc Fixative, BD Biosciences Pharmingen™, San Jose, CA, USA) eingelegt und damit fixiert. Zur Entkalkung wurden die Knochen 2 Wochen bei 4 °C in eine 13-prozentige Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) -Lösung gelegt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 % für jeweils eine Stunde und 100 % Alkohol für jeweils viermal eine Stunde) entwässert. Im Anschluss wurden die Femora dreimal für jeweils eine Stunde mit Xylol behandelt, sodass das Gewebe paraffingängig wurde. Die anschließende Einbettung in heißes Paraffin dauerte ungefähr eine Stunde. Aus den Paraffinblöcken wurden dann im Bereich des größten Kallusdurchmessers Schnitte mit einer Schichtdicke von 5 µm in longitudinaler sagittaler Schnittrichtung hergestellt. Die fertigen Schnitte wurden anschließend nach der etablierten Safranin-O-Färbetechnik angefärbt.

Hierzu wurden die Präparate zunächst eine Minute (min) mit einer Eisenhämatoxylinlösung nach Weigert behandelt und mit destilliertem Wasser abgespült. Daraufhin erfolgte die Differenzierung der Präparate mit Salzsäure und Alkohol und das Bläuen für 5 min in Leitungswasser. Nach dem erneuten Spülen mit Wasser erfolgte die Färbung mit 0,02 % Fast Green. Nach 4 min wurde diese mit Essigsäure 1 % abgespült und dann 0,1 % Safranin O Färbung für 5 min aufgetragen. Durch dieses Gegenfärben erhält Knorpelgewebe schließlich rote Farbe und wurde erneut mit 1-prozentige Essigsäure gespült. Zuletzt erfolgte die Entwässerung mit 96-prozentigem Ethanol und Isopropanol. Das Präparat wird abschließend noch in Xylol zur Entfernung des Paraffins geschwenkt und dann in xylolhaltigem Lösemittel eingebettet. In der Safranin-O-Färbung sind Zellkerne schwarz und das Zytoplasma grau-grün. Von rotem Knorpelgewebe lassen sich grünes Knochengewebe und grau-rosafarbenes Bindegewebe somit gut abgrenzen (Abb. 26).

Die nun fertigen histologischen Schnitte wurden mit einem Mikroskop (Keyence Fluoreszenzmikroskop Biozero BZ 8100E, Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) unter 1,25-facher Vergrößerung (Plan Apo Objektiv 2x/0.10, Nikon, Amsterdam, Niederlande) mikroskopiert und mit einer Software digitalisiert (Zeiss Axio Vision 3.1 und Zeiss Axio Cam - Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Mithilfe einer weiteren Software (ImageJ Analysis System, U.S. National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) konnten dann die Parameter der verschiedenen Gewebeanteile ermittelt werden (Tab. 6).

Messparameter
Periostale Gesamtkallusfläche [mm ²] (CAr)
Knorpeliger Anteil innerhalb der Gesamtkallusfläche [mm ²] (CgAr)
Knöcherner Anteil innerhalb der Gesamtkallusfläche [mm ²] (TOTAr)
Bindegewebiger Anteil innerhalb der Gesamtkallusfläche [mm ²] (FTAr)

Tab. 6: Histomorphometrische Parameter

Auf der Grundlage der oben genannten Parameter (Tab. 6) konnten dann in Anlehnung an die Methode von Gerstenfeld et al. [45] folgende Daten berechnet werden (Tab. 7):

Parameter	Berechnung
Anteil von Knorpelgewebe an der Gesamtkallusfläche [%]	$\frac{\text{Knorpeliger Anteil innerhalb Gesamtkallusfläche (CgAr)}}{\text{Gesamtkallusfläche (CAr)}}$
Anteil von Knochengewebe an der Gesamtkallusfläche [%]	$\frac{\text{Knöcherner Anteil innerhalb Gesamtkallusfläche (TOTAr)}}{\text{Gesamtkallusfläche (CAr)}}$
Anteil von Bindegewebe an der Gesamtkallusfläche [%]	$\frac{\text{Bindegewebiger Anteil innerhalb Gesamtkallusfläche (FTAr)}}{\text{Gesamtkallusfläche (CAr)}}$

Tab. 7: Berechnung histomorphometrischer Daten



Abb. 26: Femur im longitudinalen sagittalen Schnitt (Safranin-O Färbung): Knochen(A), Knorpel (B), Artefakte (C), Bindegewebe (D)

4.2.5 Western Blot

Nach 2 Wochen wurde in einer separaten Versuchstiergruppe die Proteinexpression im Kallusgewebe mittels Western Blot unter äquivalentem Einfluss von Simvastatin bzw. in Tieren der Kontrollgruppe analysiert. Dabei wurden folgende Marker bestimmt: OPG, RANKL, BMP-2/-4, Cyr-61, VEGF, CD31, PI3K (Tab. 8). Auf eine Analyse von Kallusgewebe nach 5 Wochen wurde verzichtet, da zu diesem Zeitpunkt die Durchbauung des Frakturspalts mit Knochengewebe schon zu weit fortgeschritten ist, sodass bei der Probenentnahme nicht standardisiert zwischen Kallusgewebe und originärem Knochengewebe unterschieden werden kann.

Protein	Funktion
OPG	Inhibition der Osteoklastogenese
RANKL	Stimulation der Osteoklastogenese
BMP-2	Knochenformationsmarker
BMP-4	Knochenformationsmarker
Cyr-61	Knochenformations- und Angiogenesemarker
VEGF	Angiogenesemarker
CD31	Angiogenesemarker
PI3K	Proliferations- und Differenzierungsmarker

Tab. 8: Proteine und ihre generelle Funktion, deren Expression mittels Western Blot in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden

Nach der oben beschriebenen Kryokonservierung der Proben wurden diese im Lysepuffer (ca. 500 µl pro 100 mg Probengewebe) (Mengenangaben für 10 ml Lysepuffer: 100 µl Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) 1M pH 7,5, 20 µl NaCl 5M, 4 µl EDTA 250 mM, 500 µl Triton-X-100 10 %, 50 µl NaN₃, mit destilliertem Wasser auf 10 ml aufgefüllt) und mit Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) Protease Inhibitor Cocktail 100 mM (Verhältnis zum Endvolumen 1:500) und Phosphatase Inhibitor Cocktail Cell Signaling (Verhältnis zum Endvolumen 1:100) auf Eis für 20 Sekunden homogenisiert (Micra Mini Batch Homogenisator, Micra GmbH, Heitersheim, Deutschland). Anschließend wurde die Lösung 30 min auf Eis inkubiert und danach weitere 30 min mit einer Zentrifuge bei 16000 Umdrehungen pro min und 4 °C Umgebungstemperatur zentrifugiert. Das entstandene Lysat wurde nach Überführung in neue Reaktionsgefäße auf -20 °C Eis gelagert. Mit dem Probenpuffer nach Lämmli wurde ein Teil des Lysats denaturiert und zur Beladung genutzt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Lowry angewandt [92]. Die Proteinextrakte mit 5 µg Protein pro Bande wurden zur Trennung diskontinuierlich auf einem Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel getrennt und danach auf Membranen aus Polyvinylendifluorid übertragen. Bevor die Membranen für 4 Stunden bei Raumtemperatur mit spezifischen Primärantikörpern inkubiert wurden, erfolgte zunächst eine Blockierung der unspezifischen Bindungsseite der Proteine mit Milchpulver. Folgende Antikörperserien wurden verwendet:

- **OPG:** Ratten-IgG Antikörper (OPG MAB4591 Monoclonal Antibody, 1 µg/µl, R&D Systems, Minneapolis, USA)
- **RANKL:** Hasen-IgG Antikörper (Anti-sRANKL antibody ab62516, 0,25-0,5 µg/ml, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich)

- **BMP-2** und **BMP-4**: Ziegen-IgG Antikörper (Human BMP-2/BMP-4 Antibody R&D AF355, 0,1 µg/ml, R&D Systems)
- **Cyr-61**: Schaf-IgG Antikörper (R&D AF4055, 1 µg/ml, R&D Systems)
- **VEGF**: Hasen-IgG Antikörper (Anti-VEGFA antibody ab46154, 1 µg/ml, Abcam)
- **CD31**: Hasen-IgG Antikörper (Cell signaling 77699, 1:1000, Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt am Main, Deutschland)
- **PI3K**: Ziegen-IgG Antikörper (R&D AF2998, 1 µg/ml, R&D Systems)

Danach erfolgte die Inkubation mit folgenden Sekundärantikörpern:

- goat- α -rabbit IgG HRP (HAF008, 1:500, R&D Systems)
- goat- α -mouse IgG HRP (P0447, 1:1500, Dako Agilent Technologies, California, USA)
- goat- α -rat IgG HRP (HAF005, 1:500, R&D Systems)
- rabbit- α -goat IgG HRP (P0449, 1:1000, Dako Agilent Technologies)
- rabbit- α -sheep IgG HRP (P0163, 1:1000, Dako Agilent Technologies)

Als interne Kontrolle dienten β -Aktin-Signale (Sc-47778 β -Aktin HRP, 1:1000 1,5h RT, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland), anhand derer ungleiche Beladungen korrigiert werden konnten, sodass normierte Daten zur Auswertung verwendet werden konnten. Abschließend erfolgte die Detektion der Signale mit Chemilumineszenz. Dazu wurden je 250 µl ECL Detection Reagenz 1 und 2 (Biorad 170-5060) pro Membran gemischt und 1 min inkubiert. Die Proben wurden dann im ChemoCam Imager entwickelt.

4.3 Statistik

Mit Hilfe der Software SigmaPlot 13.0 (Systat Software, Inc., San José, California, USA) wurden die Daten statistisch ausgewertet. Diese werden dabei im Folgenden als Mittelwert (MW) $\pm$ Standardfehler (SEM, Standard error of the mean) angegeben. Zunächst wurde die Varianzgleichheit mit dem Brown-Forsythe-Test und die Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test innerhalb der beiden Gruppen ermittelt. War diese Bedingung erfüllt, so konnte der Student's-t-Test zum Vergleich der beiden Gruppen angewandt werden. Konnte die Normalverteilung hingegen nicht erfüllt werden, so wurde stattdessen der Mann-Whitney-Rangsummentest verwendet. Signifikante Unterschiede bestanden in der vorliegenden Arbeit bei einem p-Wert unter 0,05.

5 Ergebnisse

5.1 Biomechanik

Bei der Auswertung der 2 Wochen Gruppe fand sich in der mit Simvastatin behandelten Gruppe eine absolute Biegesteifigkeit von $3,03 \pm 0,43$ N/mm, während die Kontrollgruppe Werte von $5,01 \pm 1,46$ N/mm aufwies ($p > 0,05$) (Abb. 27A). Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der relativen Biegesteifigkeit (Simvastatin: $2,96 \pm 0,44$ %; Kontrolle: $4,64 \pm 1,92$ %; $p > 0,05$) (Abb. 28A).

In der Spätphase der Frakturheilung 5 Wochen postoperativ zeigten sich sowohl in der absoluten Biegesteifigkeit (Simvastatin: $48,99 \pm 12,45$ N/mm; Kontrolle: $51,29 \pm 12,68$ N/mm; $p > 0,05$) (Abb. 27B) als auch in der relativen Biegesteifigkeit (Simvastatin: $41,28 \pm 9,78$ %; Kontrolle: $42,86 \pm 11,47$ %; $p > 0,05$) (Abb. 28B) keine Unterschiede.

Bei Betrachtung der nicht frakturierten Femora der kontralateralen Seite konnte 2 Wochen postoperativ eine signifikant niedrigere absolute Biegesteifigkeit in Tieren mit Simvastatinbehandlung nachgewiesen werden. Diese betrug $102,11 \pm 5,94$ N/mm im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe mit $144,47 \pm 7,92$ N/mm ($p < 0,05$) (Abb. 29A). Nach 5 Wochen wurde zwischen den Gruppen kein Unterschied gefunden (Simvastatin: $124,79 \pm 9,37$ N/mm; Kontrolle: $123,13 \pm 7,86$ N/mm; $p > 0,05$) (Abb. 29B).

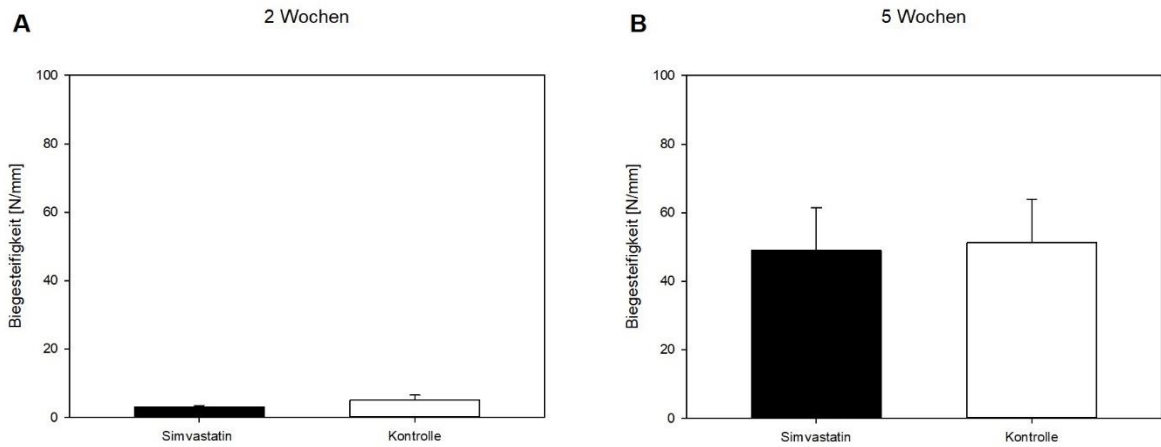


Abb. 27: Absolute Biegesteifigkeit der frakturierten Femora. (A) 2 Wochen postoperativ, (B) 5 Wochen postoperativ. MW ± SEM.

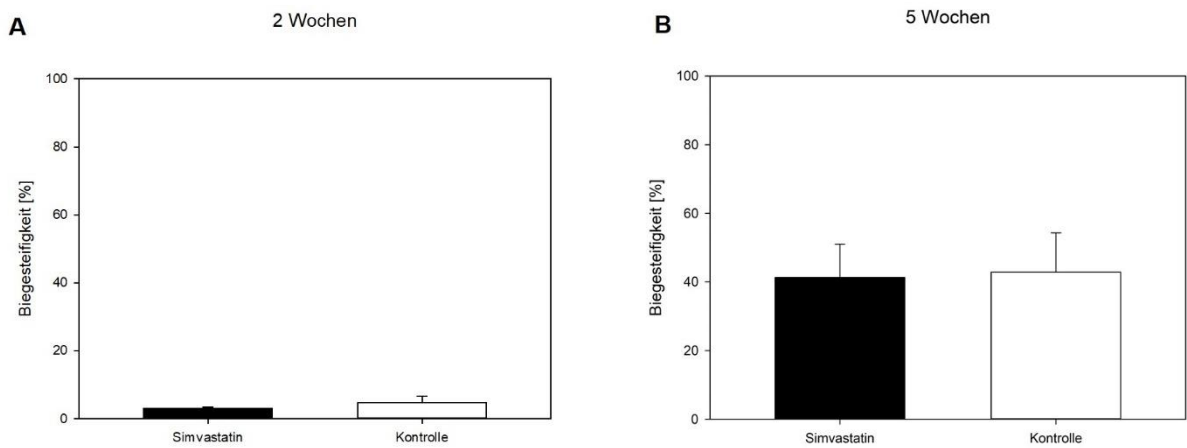


Abb. 28: Relative Biegesteifigkeit der frakturierten Femora. (A) 2 Wochen postoperativ, (B) 5 Wochen postoperativ. MW ± SEM.

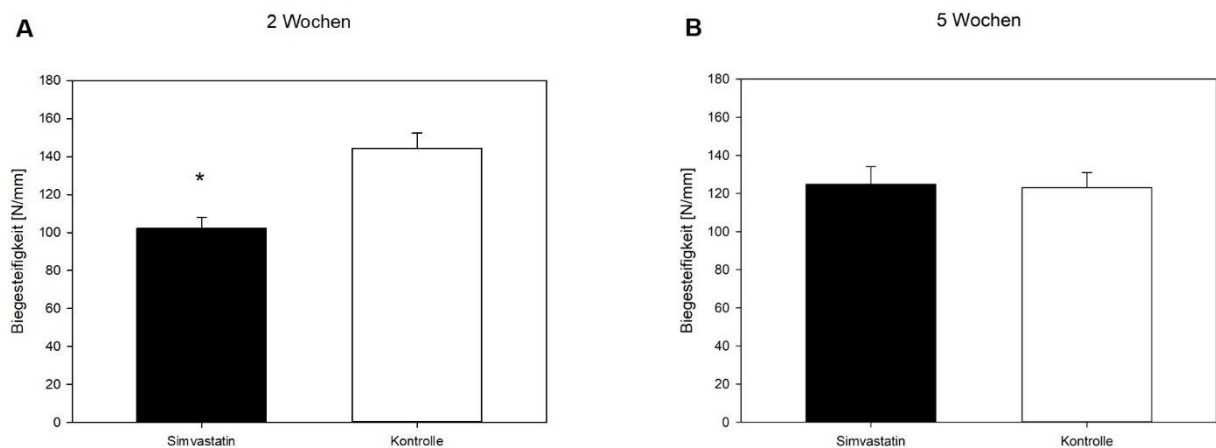


Abb. 29: Absolute Biegesteifigkeit der unfrakturierten Femora. (A) 2 Wochen postoperativ, (B) 5 Wochen postoperativ. MW ± SEM. * p < 0,05 vs. Kontrolle

5.2 Röntgen

Der Goldberg-Score zeigte nach 2 Wochen zwischen Tieren der Simvastatin- und der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied. Mit einem Wert von $1,25 \pm 0,16$ in der Simvastatingruppe und von $0,78 \pm 0,15$ in der Kontrollgruppe ($p > 0,05$), deutet dies in beiden Gruppen bereits auf eine partielle knöcherne Überbauung zu diesem frühen postoperativen Zeitpunkt hin (Abb. 30A).

5 Wochen postoperativ ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied, da sowohl in Tieren der Simvastatingruppe als auch der Kontrollgruppe (Simvastatin: $1,56 \pm 0,24$; Kontrolle: $1,75 \pm 0,16$; $p > 0,05$) der Frakturspalt im Röntgen fast vollständig knöchern überbaut war (Abb. 30B) (Abb.31).

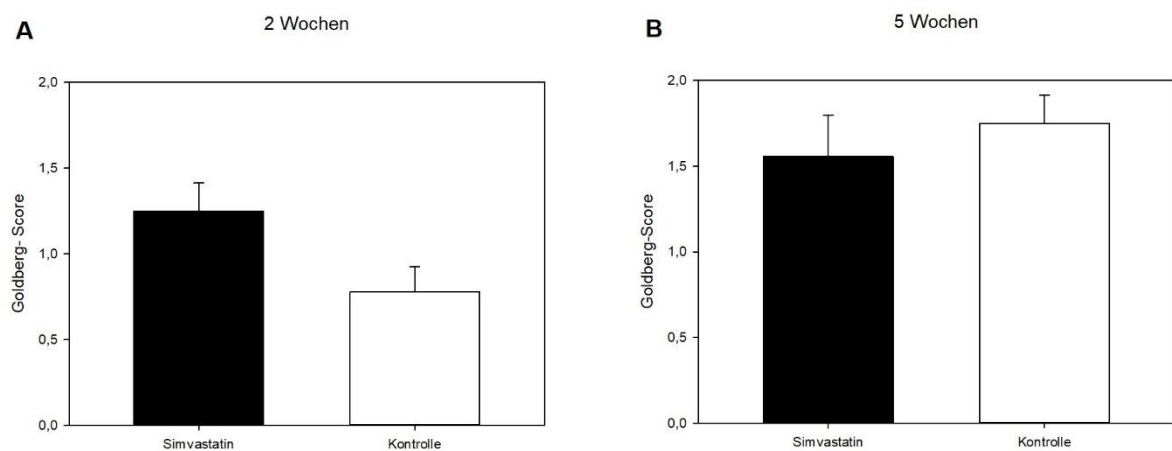


Abb. 30: Röntgenologische Auswertung anhand des Goldberg-Scores. (A) 2 Wochen postoperativ, (B) 5 Wochen postoperativ. MW $\pm$ SEM.

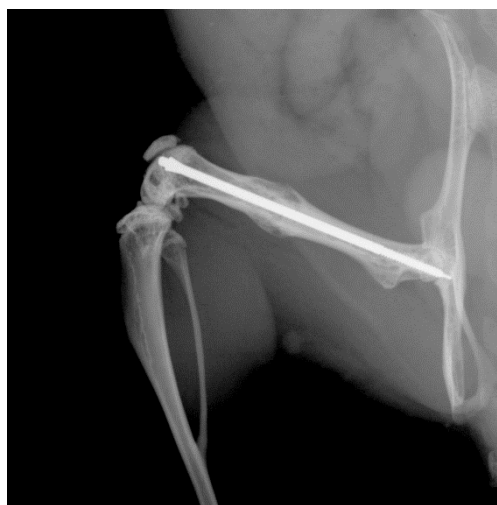


Abb. 31: Röntgenaufnahme 5 Wochen postoperativ

5.3 Computertomographie

2 Wochen postoperativ zeigte sich ein signifikant erniedrigtes absolutes Knochenvolumen im Kallus von Tieren der Simvastatingruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Simvastatin: $3,3 \pm 0,37 \text{ mm}^3$; Kontrolle: $6,41 \pm 0,92 \text{ mm}^3$; $p < 0,05$) (Abb. 32A). 5 Wochen postoperativ erwies sich das absolute Knochenvolumen in Tieren der Simvastatingruppe ebenfalls als signifikant niedriger als in Tieren der Kontrollgruppe (Simvastatin: $4,08 \pm 0,89 \text{ mm}^3$; Kontrolle: $8,75 \pm 1,48 \text{ mm}^3$; $p < 0,05$) (Abb. 32B).

Ähnlich spiegelt sich dies auch im relativen Knochenanteil am Gesamtkallusvolumen nach 2 Wochen (Simvastatin: $10,82 \pm 1,7 \%$; Kontrolle: $24,02 \pm 2,63 \%$; $p < 0,05$) (Abb. 33A) und nach 5 Wochen (Simvastatin: $33,37 \pm 1,89 \%$; Kontrolle: $55,84 \pm 3,58 \%$; $p < 0,05$) (Abb. 33B) wider. Dieses zeigte sich in beiden Endpunkten nach Simvastatin-Gabe jeweils signifikant erniedrigt im Vergleich zur Kontrolle.

Ebenso signifikant geringer war die Trabekelanzahl 2 Wochen postoperativ in Tieren mit Simvastatinbehandlung $0,92 \pm 0,08$ pro mm im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe $2,14 \pm 0,37$ pro mm ($p < 0,05$) (Abb. 34A). 5 Wochen postoperativ zeigte sich ebenfalls eine signifikant niedrigere Trabekelanzahl nach Behandlung mit Simvastatin (Simvastatin: $1,99 \pm 0,14$ pro mm; Kontrolle: $3,14 \pm 0,37$ pro mm; $p < 0,05$) (Abb. 34B).

Damit einhergehend war der Trabekelabstand nach Simvastatin-Gabe nach 2 Wochen signifikant erhöht (Simvastatin: $0,72 \pm 0,06 \text{ mm}$; Kontrolle: $0,5 \pm 0,06 \text{ mm}$; $p < 0,05$) (Abb. 35A). Nach 5 Wochen zeigte sich ebenfalls ein erhöhter Trabekelabstand in der Gruppe mit Simvastatin-Gabe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Simvastatin: $0,37 \pm 0,07 \text{ mm}$; Kontrolle: $0,27 \pm 0,04 \text{ mm}$; $p > 0,05$) (Abb. 35B).

Die Trabekeldicke zeigte sich nach 2 Wochen ohne Unterschied (Simvastatin: $0,12 \pm 0,02 \text{ mm}$; Kontrolle: $0,12 \pm 0,01 \text{ mm}$; $p > 0,05$) (Abb. 36A). Nach 5 Wochen war diese in Tieren der Simvastatingruppe jedoch signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Simvastatin: $0,18 \pm 0,003 \text{ mm}$; Kontrolle: $0,2 \pm 0,01 \text{ mm}$; $p < 0,05$) (Abb. 36B).

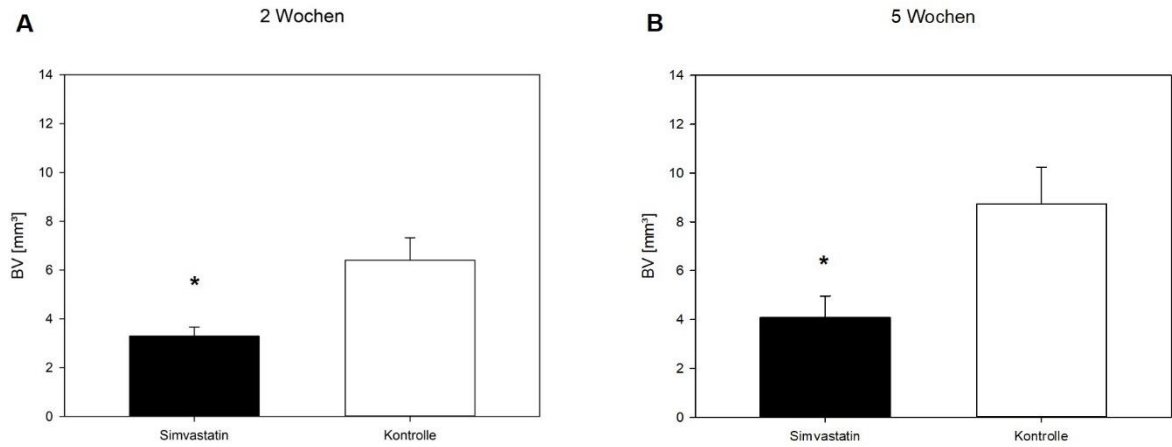


Abb. 32: Absolutes Knochenvolumen im Kallus. (A) 2 Wochen postoperativ, (B) 5 Wochen postoperativ. MW $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

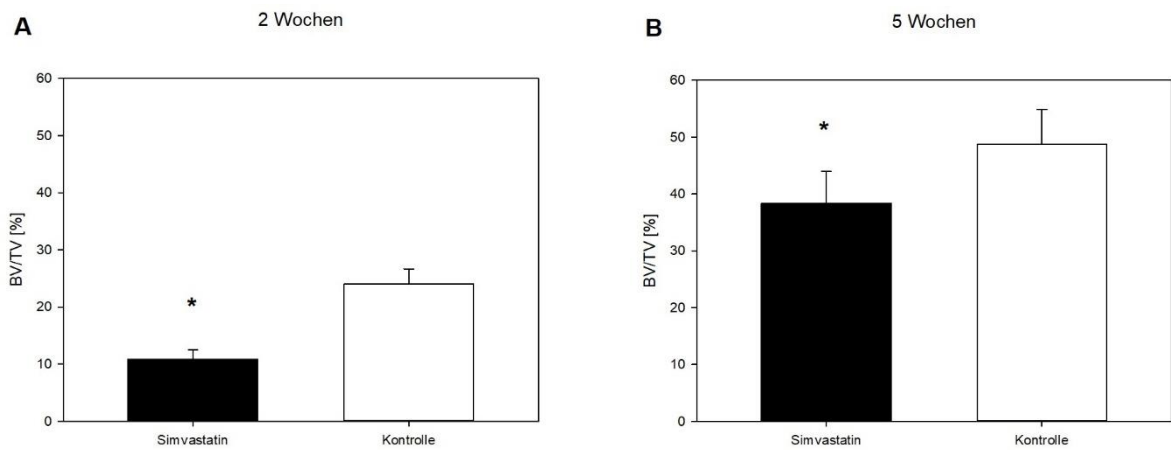


Abb. 33: Relativer Knochenanteil am Gesamtkallusvolumen. (A) 2 Wochen postoperativ, (B) 5 Wochen postoperativ. MW $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

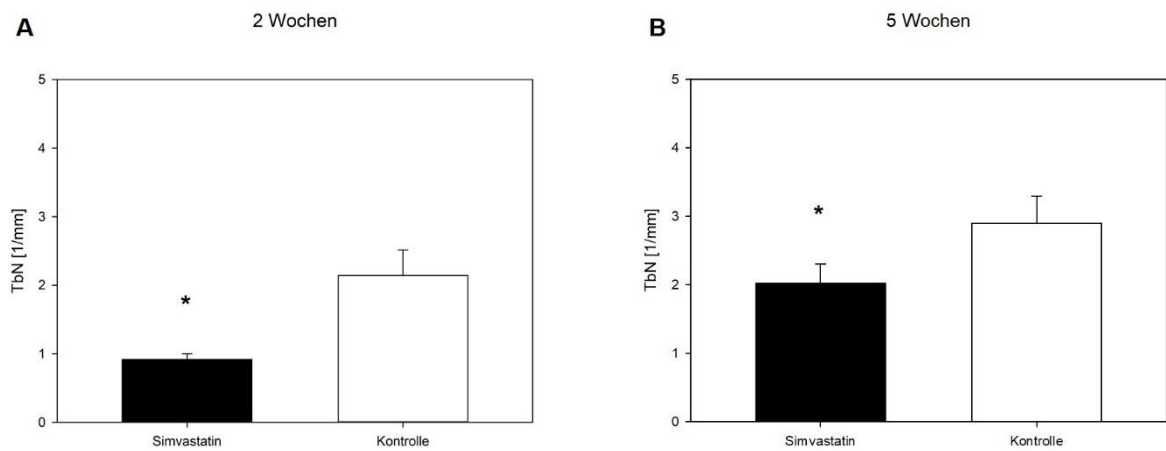


Abb. 34: Trabekelanzahl. (A) 2 Wochen postoperativ, (B) 5 Wochen postoperativ. MW $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

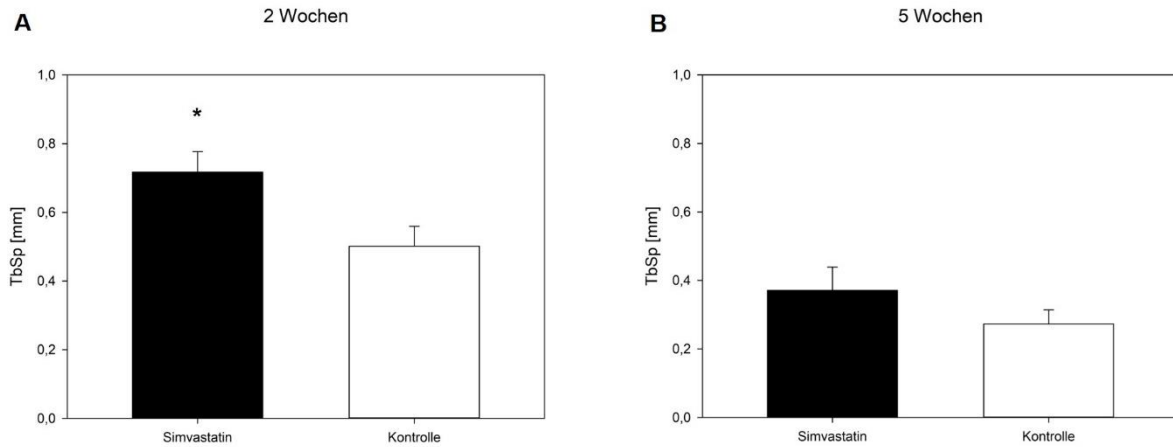


Abb. 35: Trabekelabstand. (A) 2 Wochen postoperativ, (B) 5 Wochen postoperativ. MW $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

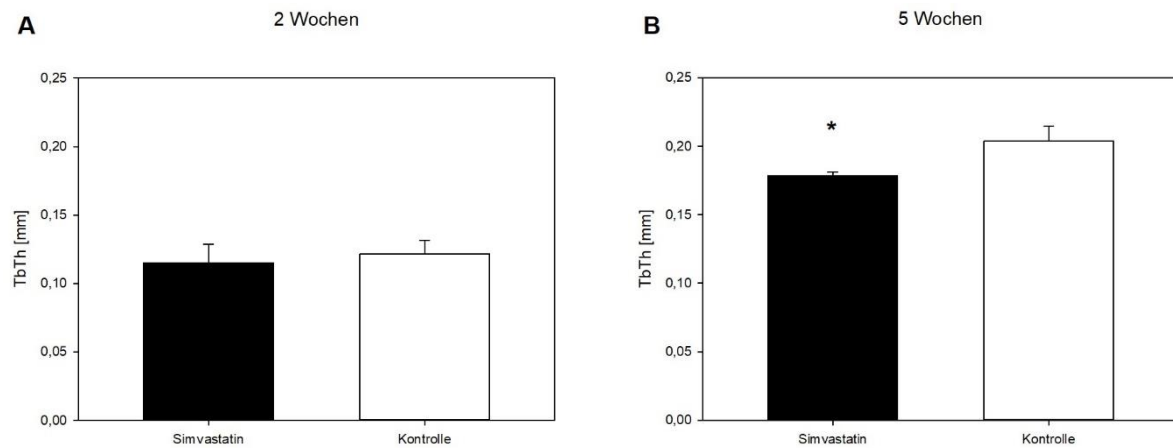


Abb. 36: Trabekeldicke. (A) 2 Wochen postoperativ, (B) 5 Wochen postoperativ. MW $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

5.4 Histomorphometrie

Die Gesamtkallusfläche war 2 Wochen postoperativ in der Gruppe mit Simvastatinbehandlung mit $8,1 \pm 0,69 \text{ mm}^2$ erniedrigt im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $9,22 \pm 0,59 \text{ mm}^2$ ($p > 0,05$) (Abb. 37A). 5 Wochen postoperativ hingegen war der Unterschied in der Gesamtkallusfläche zwischen den beiden Gruppen signifikant (Simvastatin: $4,58 \pm 0,25 \text{ mm}^2$; Kontrolle: $6,45 \pm 0,29 \text{ mm}^2$; $p < 0,05$) (Abb. 37B).

Hinsichtlich des Knochenanteils am Gesamtkallus ergaben sich 2 Wochen postoperativ keine signifikanten Unterschiede (Simvastatin: $14,22 \pm 2,98 \%$; Kontrolle: $25,12 \pm 5,26 \%$; $p > 0,05$) (Abb. 38A). Nach 5 Wochen zeigte sich ebenfalls kein Unterschied am relativen Anteil des Knochengewebes im Kallus (Simvastatin: $47,27 \pm 7,13 \%$; Kontrolle: $50,19 \pm 4,62 \%$; $p > 0,05$) (Abb. 38B).

Der Knorpelanteil betrug nach 2 Wochen in der Gruppe Simvastatin $27,18 \pm 5,23$ % und in der Gruppe Kontrolle $23,03 \pm 6,21$ % ($p > 0,05$) (Abb. 39A). Erwartungsgemäß fand sich 5 Wochen postoperativ nur noch sehr wenig Knorpelgewebe im Kallus. Zu diesem späten Zeitpunkt der Frakturheilung ergab sich auch kein Unterschied an Knorpelanteilen zwischen den Untersuchungsgruppen (Simvastatin: $1,01 \pm 0,27$ %; Kontrolle: $1,12 \pm 0,36$ %; $p > 0,05$) (Abb. 39B).

Ähnlich zu den relativen Anteilen von Knochen und Knorpel war auch der Anteil des Bindegewebes am Gesamtkallus 2 Wochen postoperativ (Simvastatin: $58,66 \pm 4,81$ %; Kontrolle: $51,87 \pm 5,98$ %; $p > 0,05$) und 5 Wochen postoperativ (Simvastatin: $51,72 \pm 7,21$ %; Kontrolle: $48,48 \pm 4,88$ %; $p > 0,05$) ohne signifikante Unterschiede zwischen beiden Untersuchungsgruppen (Abb. 40).

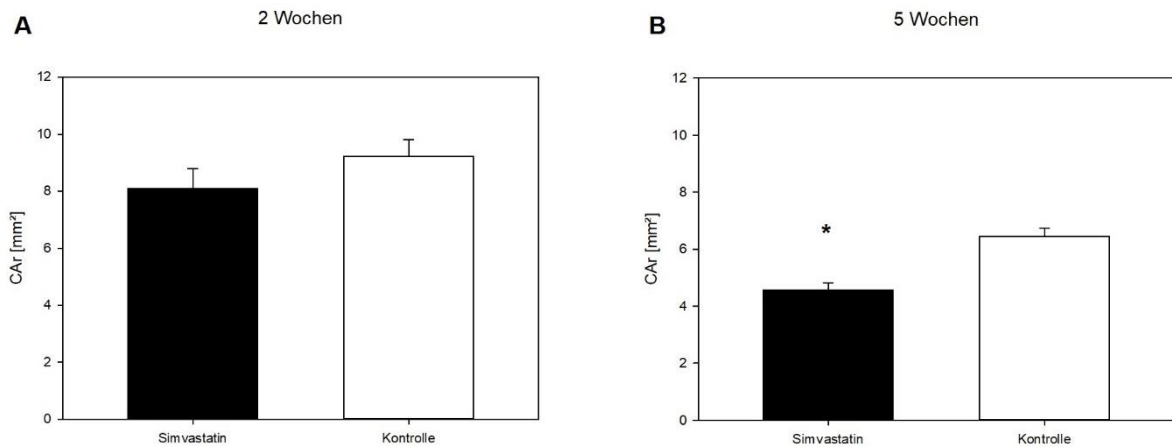


Abb. 37: Gesamtkallusfläche. (A) 2 Wochen postoperativ, (B) 5 Wochen postoperativ. MW $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

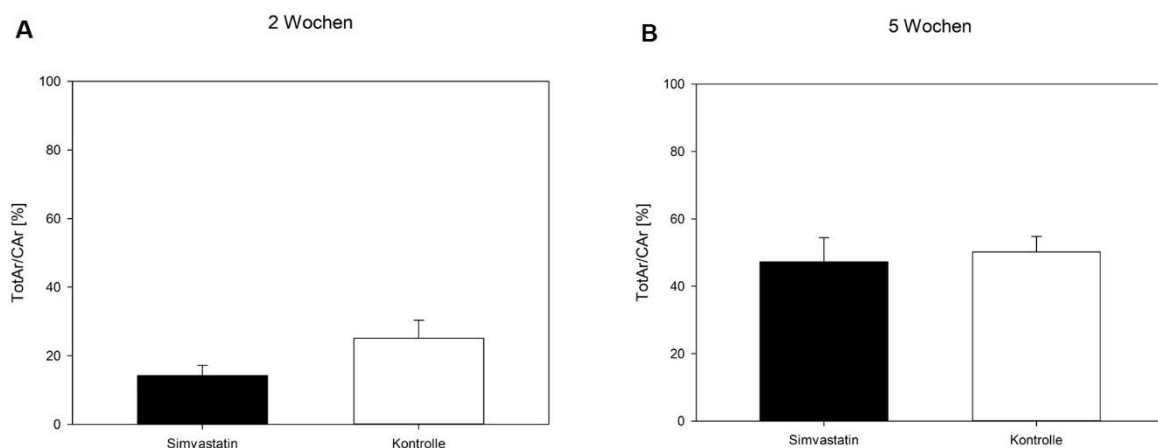


Abb. 38: Knochenanteil am Gesamtkallus. (A) 2 Wochen postoperativ, (B) 5 Wochen postoperativ. MW $\pm$ SEM.

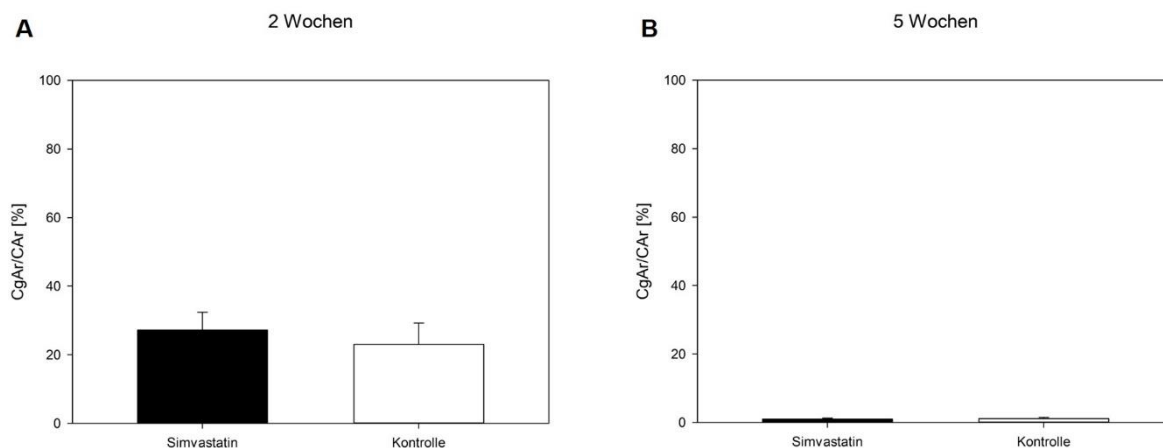


Abb. 39: Knorpelanteil am Gesamtkallus. (A) 2 Wochen postoperativ, (B) 5 Wochen postoperativ. MW $\pm$ SEM.

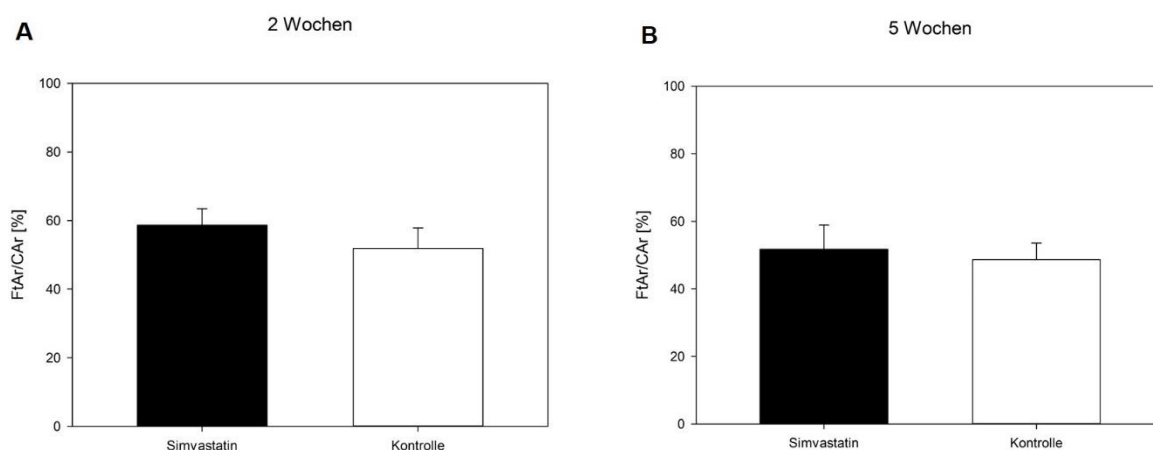


Abb. 40: Bindegewebsanteil am Gesamtkallus. (A) 2 Wochen postoperativ, (B) 5 Wochen postoperativ. MW $\pm$ SEM.

5.5 Western Blot

Die Proteinanalyse im Kallus erfolgte mittels Western Blot im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ.

Bezüglich der Angiogenesemarker ergab sich im Kallus der Gruppe Simvastatin eine signifikant erhöhte Expression von CD31 (PECAM-1) mit $28 \times 10^4 \pm 4,91 \times 10^4$ Targetintensitätspixel (TIP) $\times$ Korrekturfaktor (KF) im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $13,8 \times 10^4 \pm 2,28 \times 10^4$ TIP $\times$ KF ($p < 0,05$) (Abb. 41). VEGF war nach Simvastatin-Gabe ebenfalls erhöht (Simvastatin: $13,5 \times 10^4 \pm 5,89 \times 10^4$ TIP $\times$ KF; Kontrolle: $8,55 \times 10^4 \pm 5,1 \times 10^4$ TIP $\times$ KF; $p > 0,05$) (Abb. 42).

Im Rahmen der Osteoklastogenese war die RANKL Expression in der Simvastatingruppe tendenziell höher als in der Kontrollgruppe (Simvastatin: $1,88 \times 10^4 \pm 0,652 \times 10^4$ TIP $\times$ KF;

Kontrolle: $0,973 \times 10^4 \pm 0,3 \times 10^4$ TIP×KF; $p > 0,05$) (Abb. 43). Als Marker der Osteoblasten zeigte sich OPG nach Simvastatin-Gabe ebenfalls tendenziell erhöht (Simvastatin: $27,5 \times 10^4 \pm 15,6 \times 10^4$ TIP×KF; Kontrolle: $11,5 \times 10^4 \pm 10,5 \times 10^4$ TIP×KF; $p > 0,05$) (Abb. 44). Jedoch lag für beide Proteine jeweils keine Signifikanz vor.

Die Expression des Knochenformationsmarkers BMP-2 erwies sich im Kallusgewebe der Simvastatingruppe mit $0,978 \times 10^4 \pm 0,128 \times 10^4$ TIP×KF als signifikant erniedrigt im Vergleich zu Kallusgewebe der Kontrollgruppe mit $3,51 \times 10^4 \pm 0,0879 \times 10^4$ TIP×KF ($p < 0,05$) (Abb. 45). Hinsichtlich BMP-4 (Simvastatin: $7,62 \times 10^4 \pm 1,85 \times 10^4$ TIP×KF; Kontrolle: $7,4 \times 10^4 \pm 2,17 \times 10^4$ TIP×KF; $p > 0,05$) (Abb. 46) und Cyr-61 (Simvastatin: $7,43 \times 10^4 \pm 2,19 \times 10^4$ TIP×KF; Kontrolle: $6,06 \times 10^4 \pm 1,75 \times 10^4$ TIP×KF; $p > 0,05$) (Abb. 47) zeigten sich jeweils keine signifikanten Unterschiede.

Als Proliferations- und Differenzierungsmarker ergab sich eine signifikant erhöhte Expression von PI3K nach Simvastatin-Gabe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Simvastatin: $15,7 \times 10^4 \pm 2,07 \times 10^4$ TIP×KF; Kontrolle: $6,49 \times 10^4 \pm 2,3 \times 10^4$ TIP×KF, $p < 0,05$) (Abb. 48).

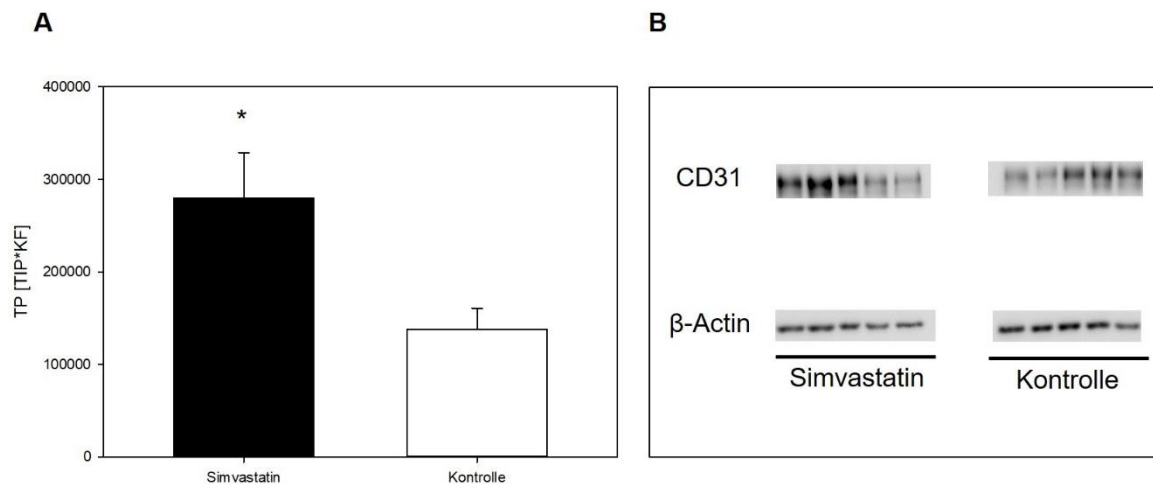


Abb. 41: (A) Expression von CD31 im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ, (B) Blots der jeweiligen Gruppen inklusive β -Actin als Korrekturfaktor. MW $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

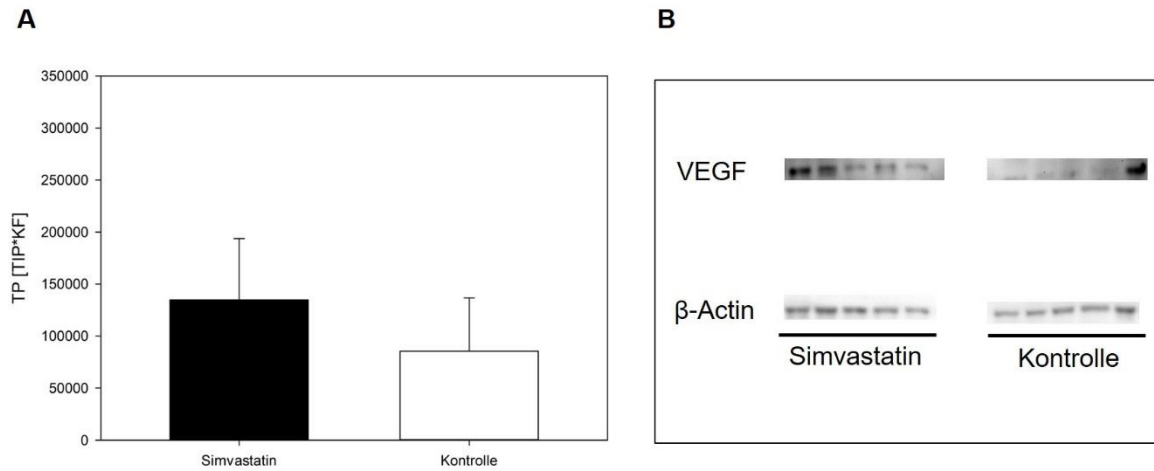


Abb. 42: (A) Expression von VEGF im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ, (B) Blots der jeweiligen Gruppen inklusive β -Actin als Korrekturfaktor. MW $\pm$ SEM.

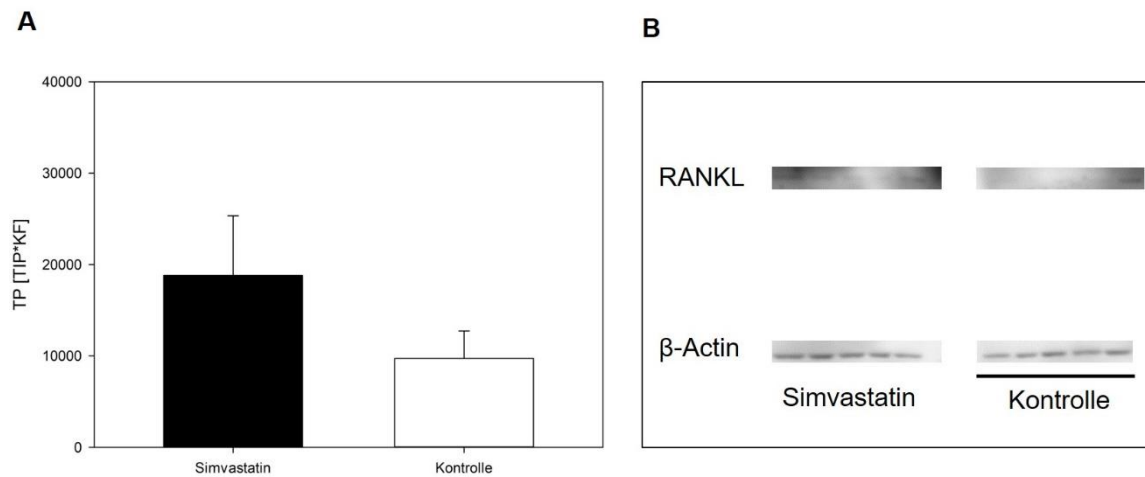


Abb. 43: (A) Expression von RANKL im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ, (B) Blots der jeweiligen Gruppen inklusive β -Actin als Korrekturfaktor. MW $\pm$ SEM.

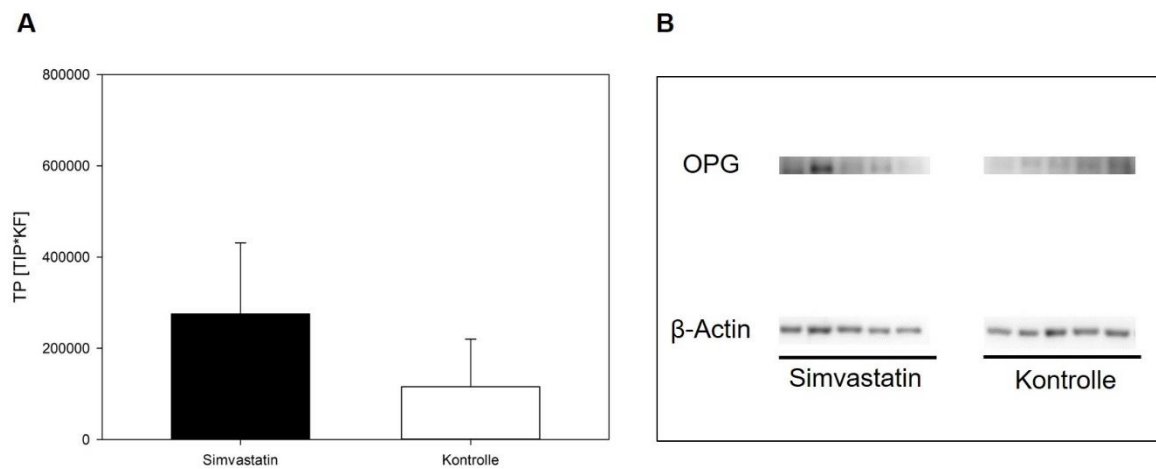


Abb. 44: (A) Expression von OPG im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ, (B) Blots der jeweiligen Gruppen inklusive β -Actin als Korrekturfaktor. MW $\pm$ SEM.

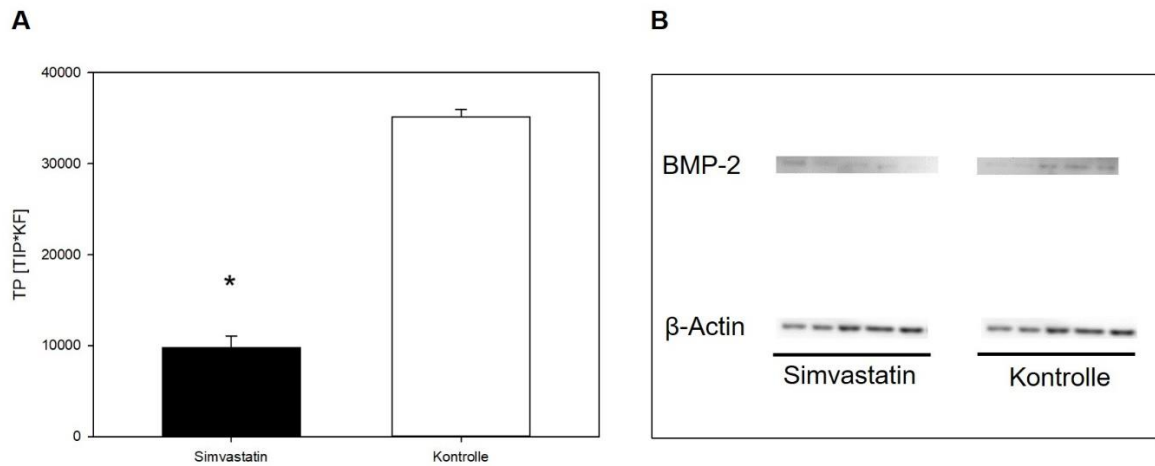


Abb. 45: (A) Expression von BMP-2 im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ, (B) Blots der jeweiligen Gruppen inklusive β -Actin als Korrekturfaktor. MW $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

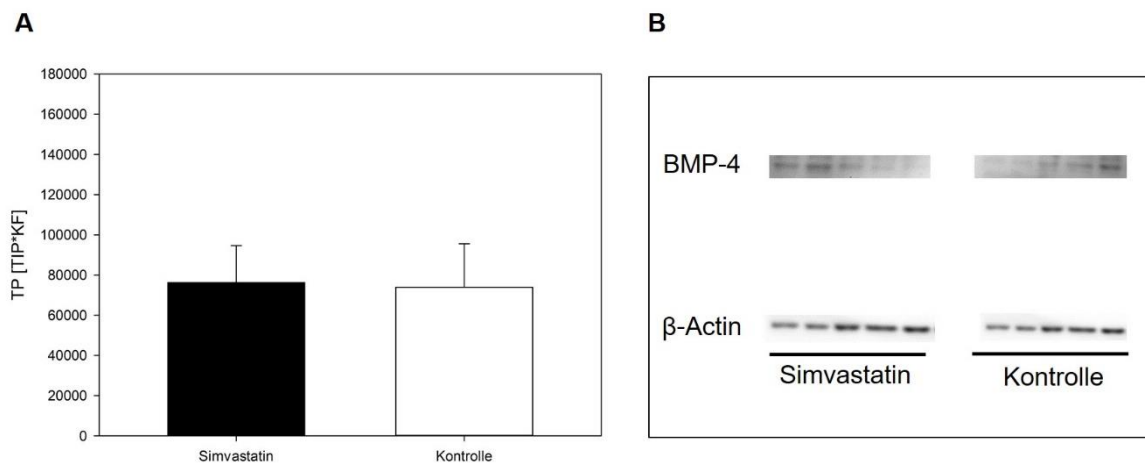


Abb. 46: (A) Expression von BMP-4 im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ, (B) Blots der jeweiligen Gruppen inklusive β -Actin als Korrekturfaktor. MW $\pm$ SEM.

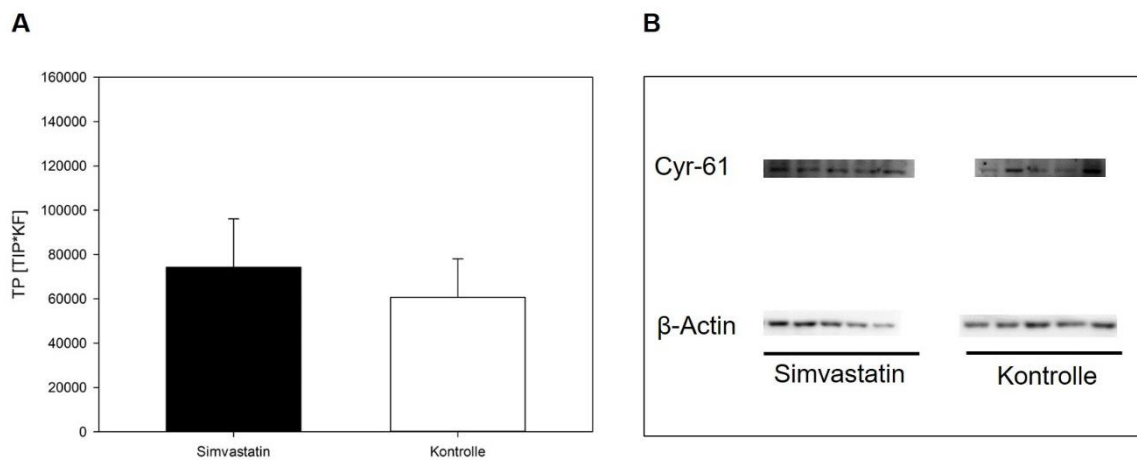


Abb. 47: (A) Expression von Cyr-61 im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ, (B) Blots der jeweiligen Gruppen inklusive β -Actin als Korrekturfaktor. MW $\pm$ SEM.

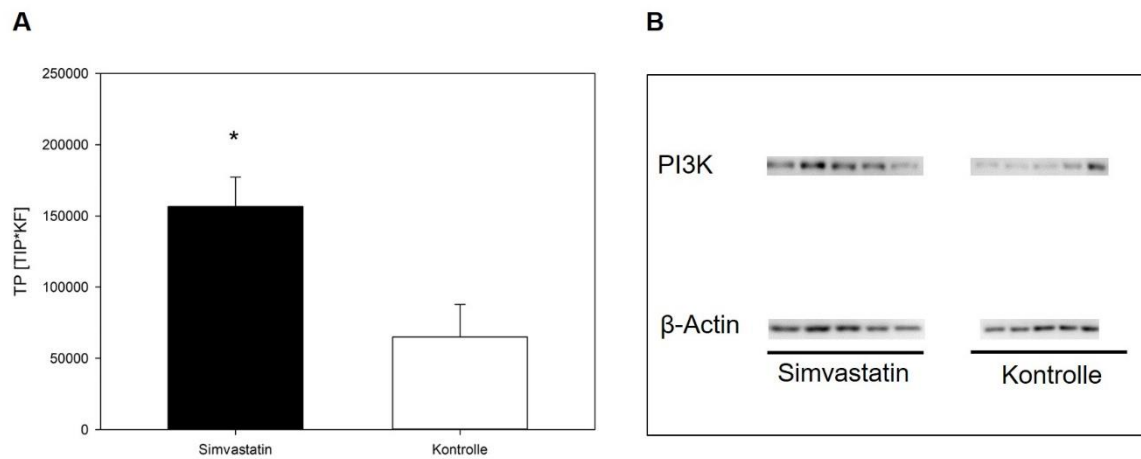


Abb. 48: (A) Expression von PI3K im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ, (B) Blots der jeweiligen Gruppen inklusive β -Actin als Korrekturfaktor. MW $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

6 Diskussion

6.1 Diskussion der Methoden

Der Vorgang der Frakturheilung ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener physiologischer Abläufe, darunter biologische Prozesse wie Zellmigration, Differenzierung und Synthese von Geweben. Diese werden zum einen durch Wachstumsfaktoren gesteuert, aber auch die mechanische Umgebung beeinflusst den Heilungsprozess. Aufgrund der Komplexität dieses Prozesses bedarf es verschiedene Simulationen und Modelle, um die Vorgänge möglichst genau zu untersuchen und zu verstehen. Dies alles mit dem Ziel, positive und negative Einflussfaktoren und Szenarien im Rahmen der Knochenheilung zu evaluieren und auf klinische Fragestellungen zu übertragen [46]. Zwei generelle Ansätze zur Untersuchung der Frakturheilung stellen Computersimulationen und experimentelle Methoden dar. In einer Übersichtsarbeit von Ghiasi et. al (2017) werden diese beiden Ansätze beschrieben und miteinander verglichen [46]. Im Rahmen von Computersimulationen können qualitativ konzeptionelle, quantitativ mathematische Modelle und biologische Modelle beschrieben werden, die zusammen als mechanobiologisches Modell die ablaufenden Prozesse versuchen bestmöglich zu beschreiben. Gleichzeitig wurden Computersimulationen genutzt, da sie die Limitationen von experimentellen Methoden überwinden, wie z.B. spezielle Ausstattung, höhere Kosten oder Störvariablen. Dennoch sind diese in ihrer klinischen Anwendung begrenzt, da die Ergebnisse nur begrenzt auf reale Szenarien übertragbar sind und dienen somit vor allem dazu, physiologische Prozesse u.a. auf molekularer Ebene genauer zu verstehen. Experimentelle Methoden hingegen, vor allem Tiermodelle, liegen näher an der Realität, sodass diese insbesondere nützlich sind, um klinische Fragestellungen zu beantworten und diese auf den Menschen zu übertragen [46]. Aufgrund dessen kamen im Laufe der Jahre in experimentellen Studien vermehrt Tiermodelle zum Einsatz. In diesem Kontext wurde daher auch in der vorliegenden Arbeit ein tierexperimenteller Ansatz gewählt.

Die meisten Informationen über die Frakturheilung im Menschen basieren auf Untersuchungen an Tieren, die durch zusätzliche klinische und epidemiologische Studien unterstützt werden. Zur Anwendung kommen vor allem Kleintiermodelle mit Mäusen, Ratten und Kaninchen, aber auch Großtiermodelle wie Hunde, Katzen, Schafe, Ziegen und sogar Pferde und Primaten [123].

Großtiermodelle sind in dieser Hinsicht vorteilhaft, da Physiologie und mechanische Belastung der Knochen eher dem menschlichen Organismus ähneln. Außerdem sind Anatomie und Größe der anatomischen Strukturen besser vergleichbar. Somit können auch leichter zugängliche Geräte aus Kliniken wie z.B. Röntgen oder CT zur Anwendung kommen [54]. Mäuse hingegen unterscheiden sich in ihrer Anatomie zum Menschen durch eine veränderte

Durchblutung und verändertes Remodeling des Knochens, das nicht über Havers-Kanäle erfolgt, sondern über Resorptionshöhlen [123]. Trotz dieser histologischen Unterschiede ist die Frakturheilung in ähnliche Phasen gegliedert wie beim Menschen [101]. Zudem zeigen Mäuse große Vorteile hinsichtlich eines breiten Angebots genetisch modifizierter Stämme sowie eine große Anzahl verfügbarer spezifischer Antikörper, die eine ausführliche Analyse der Moleküle während des Frakturheilungsprozesses erlauben. Zudem sind Mäuse günstiger und praktikabler in ihrer Haltung als Großtiermodelle [54]. Daher haben wir uns in der vorliegenden Studie für die Verwendung von Mäusen als Versuchstiere entschieden.

Zu beachten ist das Alter und die damit verbundene Dauer der Frakturheilung bei Mäusen. Viele Prozesse wie z.B. der Prozess der Frakturheilung verläuft bei jungen Tieren schneller als in älteren Tieren [123]. Grundsätzlich haben Manigrasso und O'Connor in ihrer Studie gezeigt, dass die Kallusgröße bei Mäusen bereits nach 2 Wochen ihren Höhepunkt erreicht und auch die knöcherne Überbauung des Frakturspalts nach ca. 21 Tagen kennzeichnet eine deutlich schneller ablaufende Frakturheilung [101]. Dieser beschleunigte Prozess erlaubt im Übrigen eine leichtere Studienplanung mit kürzeren Zeiträumen und weniger Kosten. Um die Frakturheilung in der Frühphase der Maus zu beurteilen, zeigte sich vorab, dass das Kallusgewebe nach 1 Woche noch zu weich ist, um es einer standardisierten histologischen Analyse zu unterziehen [61]. Hingegen ist dies 2 Wochen postoperativ möglich gewesen. Somit rechtfertigen sich die Endpunkte dieser Studie, bei denen nach 2 Wochen die Frühphase und nach 5 Wochen die Spätphase der Frakturheilung beurteilt wurden. Diese beiden Zeitpunkte wurden auch in zahlreichen weiteren Studien verwendet [62] [64] [106] [128].

Um übertragbare und zuverlässige Ergebnisse zu bekommen, ist es wichtig, dass man auf ein reproduzierbares und standardisiertes Frakturmodell zurückgreift. Die in der Literatur vorhandenen Studien unterscheiden sich in der Art der Frakturierung, der Lokalisation und Fixierung der Fraktur.

Offene Frakturmodelle des Femurs benötigen einen lateralen Zugang, was zusätzlichen Weichteilschaden bedeutet und die Vaskularisation während der Frakturheilung beeinflussen kann [67]. Geschlossene Frakturmodelle, wie die Dreipunktbiegung von Bonnarens und Einhorn [14], verursachen minimalen Weichteilschaden und sind gut reproduzierbar. Allerdings sind die dabei entstandenen Frakturen oftmals variabel und können dislozieren, was die osteosynthetische Versorgung und standardisierte Analyse der Frakturheilung erschwert [51]. Manigrasso und O'Connor haben diesbezüglich das Modell optimiert und haben vor Frakturierung einen Führungsdraht longitudinal retrograd in das Femur eingebracht, um die Dislokation der Fragmente zu minimieren und die spätere osteosynthetische Stabilisierung zu erleichtern, da über den vorab eingebrachten Draht intramedulläre Implantate eingebracht werden können [101]. An intramedullär verfügbaren Implantaten für das Femur der Maus übt

die MouseScrew™ aufgrund des Gewindes und des Konus eine longitudinale Kompression auf das Femur aus und bietet die größte Axial- und Rotationsstabilität [51]. Diese zuverlässige Stabilität gewährleistet, dass möglichst wenig externe biomechanische Faktoren den Ablauf von Osteogenese und Angiogenese während der Frakturheilung stören [67]. Das von Holstein et al. entwickelte Modell der MouseScrew™ (RISystem AG) hat in einigen Vorstudien Anwendung gefunden und zeigte auch in der vorliegenden Studie reproduzierbare, standardisierte Ergebnisse [65] [68] [106] [107] [128]. Es ist daher als geeignet für die vorliegende Fragestellung der Studie zu bewerten.

Die Art der Frakturierung des Mäuseknochens kann offen in Form einer Osteotomie oder geschlossen erfolgen. Während eine Osteotomie keine Frakturierung im eigentlichen Sinn darstellt, wurde sich für eine geschlossene Frakturierung in der vorliegenden Arbeit entschieden. Eine geschlossene Fraktur kann an Tibia oder Femur erzeugt werden. Primär wurde die Frakturierung der Tibia mittels 3-Punkt-Biegung durch Hiltunen et al. entwickelt [59]. Im Gegensatz zum Femur ist die Tibia in ihrem Querschnitt jedoch dreieckig und gebogen konfiguriert und besitzt einen nach distal abnehmendem Durchmesser. Zusätzlich ist die Nähe zur Fibula nachteilig für eine isolierte Frakturierung der Tibia, da die ebenfalls frakturierte Fibula die Frakturheilung beeinflusst [67]. Das Femur ist aufgrund der kontinuierlich tubulären Konfiguration vorteilhaft und erlaubt im Gegensatz zur Tibia eine standardisierte Anwendung spezifischer Osteosynthesen sowie eine besser replizierbare Frakturierung und biomechanische Testung [51] [67]. Letztlich ist sowohl die Frakturierung, als auch dessen Stabilisierung, an der Diaphyse leichter als an der Metaphyse [61].

Im Rahmen ischämischer Bedingungen werden vermehrt Transkriptions- und Wachstumsfaktoren wie HIF1 α und VEGF exprimiert, die die Angiogenese stimulieren. Um ein geeignetes Modell für die Induktion einer Ischämie der unteren Extremität bei der Maus zu finden, wurden einige Studien durchgeführt. An welcher Position die Arterie ligiert wird ist insofern von Bedeutung, da sich u.a. aufgrund der Ausbildung möglicher Kollateralen, Unterschiede im Blutfluss und der Neovaskularisation ergeben [7]. Als erstes beschrieben haben Couffinhal et al. die Ligatur der A. femoralis proximal und der A. saphena distal, sodass die A. femoralis exzidiert werden konnte. Nachteilig dabei war allerdings die erschwerte Ausbildung von Kollateralen, da präformierte Kapillarbetten mitreseziert wurden [25]. Auch in weiteren Studien wurde die A. femoralis reseziert, um so eine Ischämie zu induzieren. Hierbei handelt es sich stets um eine schwere Ischämie, die im Verlauf die Entstehung von Nekrosen und Gangränen begünstigt [95] [166]. Weiterhin besteht neben der Ligatur auch die Möglichkeit der Elektrokoagulation, wobei beide gleichwertig sind. Die am häufigsten angewandte Methode ist die Ligatur der A. femoralis distal des Abgangs der A. profunda femoris [7] [90] [157]. Da in der vorliegenden Studie vornehmlich das Femur mit direkt umgebender Muskulatur ischämischen Bedingungen ausgesetzt werden sollte, stellt die

Ligatur der A. profunda femoris die Methode der Wahl dar. Diese versorgt Femur und umgebende Muskulatur an der frakturierten Stelle, während gleichzeitig die Perfusion der distalen Extremität noch gewährleistet wird. Diese Methode wurde von Menger et al. entwickelt und in Hinblick auf die Frakturheilung untersucht [107]. Durch doppelte Ligatur der A. profunda femoris möglichst proximal nach Abgang aus der A. femoralis wird eine milde Ischämie induziert und somit zuvor erwähnte Komplikationen minimiert. Den Einfluss dieser Ischämie auf die Frakturheilung wurde dann im Rahmen eines Femurfrakturmodells mit Schraubenosteosynthese untersucht. Insbesondere die biomechanische Analyse mittels 3-Punkt-Biegung ergab 5 Wochen postoperativ in der Ischämiegruppe eine signifikant verminderte Biegesteifigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe. Damit korrelierend zeigte sich ein verzögertes Remodeling und ein verminderter Knochenanteil im Kallus. Grund dafür könnte die durch Ischämie induzierte vermehrte Chondrogenese sein [116], die nachfolgend einen vermehrten Abbau des Knorpelgewebes bewirken kann und somit die weitere Knochenbildung und das Remodeling hinauszögert [107]. Grundsätzlich erweist sich das Modell von Menger et al. somit als geeignet, um den Einfluss weiterer Faktoren auf die Frakturheilung unter ischämischen Bedingungen zu untersuchen.

In der hier vorliegenden Studie wurde Simvastatin in einer Dosis von 30 mg/kg KG oral täglich verabreicht. Grundsätzlich beruht dies auf vergleichbaren Studien, die Simvastatin in einer Dosis von 5 mg/kg KG bis zu 120 mg/kg KG an Nagetiere verabreichten und dabei am ehesten einen knochenwirksamen Effekt unter nicht-ischämischen bzw. physiologischen Bedingungen oder im Rahmen von Osteoporose Studien feststellen konnten [21] [31] [42] [73] [102] [132] [150] [153]. Generell wird Simvastatin diesbezüglich ein dosisabhängiger Effekt zugesprochen. Während Chissas et al. in einem Frakturmodell am Kaninchen mit einer Dosis von 10 mg/kg KG p.o. keine Auswirkungen finden konnten, so zeigten sich bei einer Dosis von 30 mg/kg KG negative anabole Effekte [21]. Darunter fand sich eine verminderte BMD, Biegesteifigkeit und reduzierte Kallusbildung. Die Autoren beschrieben damit grundsätzlich konträre Ergebnisse zu der Studie von Skoglund et al., in der aber mit 120 mg/kg KG deutlich höhere Dosen verwendet wurden [153]. Damit betonten Chissas et al., dass Unterschiede in der Methodik wie Applikationsweg, Behandlungsdauer und Dosis für die gegensätzlichen Ergebnisse verantwortlich sein könnten. In einer weiteren Studie an Tibiae von Ratten verglichen Garip und Severcan die Effekte von 20 mg/kg KG Simvastatin und 50 mg/kg KG auf molekularer Ebene mittels Spektroskopie [42]. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass eine geringere Dosis Simvastatin im Vergleich sicherer ist und den Knochen effektiver stärkt. Im Jahre 2015 untersuchten Issa et al. den Einfluss von 5 mg/kg KG und 20 mg/kg KG Simvastatin p.o. auf frakturierte Femora in osteoporotischen Ratten [73]. Hierbei zeigten sich hauptsächlich in der höher dosierten Gruppe positive Effekte auf die Knochenheilung. Des Weiteren untersuchten Maritz et al. die Auswirkungen von 1, 5, 10, und 20 mg/kg KG Simvastatin p.o. in

ovarektomierten Ratten [102]. In niedrigen Dosen zeigte sich hierbei eine verminderte Knochenbildung und gesteigerte Osteoklastogenese, während höhere Dosen hingegen einen insgesamt gesteigerten Knochenumsatz bewirkten. Allerdings lassen sich all die Studien nicht problemlos vergleichen, da zumeist Unterschiede in der Gesamtdosierung während der Studiendauer bestehen. Selbst wenn Simvastatin in der gleichen Tagesdosis verabreicht wurde, so unterscheiden sich die Studien oft in der Standzeit und Behandlungsdauer, womit sich die Gesamtdosierung ändert und somit ursächlich für die eben beschriebenen dosisabhängigen Effekte sein könnten. Zudem ist zu beachten, dass zur Untersuchung in Tieren eine deutlich höhere oral verabreichte Dosis benötigt wird, um ähnliche Wirkungen wie beim Menschen hervorzurufen [42]. Im klinischen Alltag kommen in der Regel Dosierungen von 20 bis 40 mg pro Tag normiert auf ein durchschnittliches Körpergewicht von 80 kg zum Einsatz [3]. Nach systemischer Gabe von Simvastatin unterliegt dieses einem ausgeprägten First-Pass-Metabolismus in der Leber, wodurch bereits nach kurzer Zeit die Konzentration und Bioverfügbarkeit des Medikaments sinken. Zudem besitzt Simvastatin eine nur geringe Affinität zu knöchernem Gewebe, weshalb fraglich ist, wie viel des Medikaments letztendlich am Knochengewebe wirkt. Dies könnte eine Erklärung für die kontroversen Ergebnisse von den genannten Studien darstellen. Um also einen therapeutischen Effekt auf die Knochenheilung zu bewirken, müssen deutlich höhere Dosierungen zum Einsatz kommen, welche allerdings mit vermehrten Nebenwirkungen einhergehen. Das Risiko für Leberversagen, Myopathien und Rhabdomyolyse würde ansteigen, sodass dies in der klinischen Anwendung nicht geeignet ist [114] [131]. Daher und auch weil die vorliegende Arbeit einen klinischen Hintergrund der Fragestellung aufweist, wurde sich für eine Dosis entschieden, die eine Dosierung im klinischen Alltag nachahmt. Insgesamt wurde Simvastatin in präklinischen Studien an Tieren gut toleriert, und auch in dieser Studie ergab sich kein Anhalt für Simvastatin-assoziierte Nebenwirkungen [44].

Um systemische Auswirkungen von Simvastatin zu umgehen und trotzdem den Effekt auf die Knochenheilung zu beobachten, ist es denkbar, Simvastatin lokal an die Frakturstelle einzubringen. Dies erfolgt z.B. über Injektionen nahe der Frakturstelle [9] [84] [154]. Dies bedarf jedoch zur Aufrechterhaltung einer konstanten Konzentration einer täglichen Injektion, was zu Irritationen und/oder Infektionen des umliegenden Gewebes führen kann und somit den Heilungsverlauf beeinträchtigen kann. Eine weitere Möglichkeit der lokalen Applikation sind Scaffolds bzw. Trägermaterialien, die in den Frakturspalt eingebracht werden können oder mit Simvastatin beschichtete Osteosynthesen [72] [137] [139] [163]. Der Vorteil hierbei ist die kontinuierliche Abgabe von Simvastatin in den Frakturspalt und somit die Aufrechterhaltung konstanter Konzentrationslevel. Die Frakturheilung, welche ebenfalls einen kontinuierlichen Prozess darstellt, wird somit effektiver beeinflusst. Außerdem kommen hierbei niedrigere Dosierungen im Bereich von 1 µg bis 50 mg zum Einsatz, womit Nebenwirkungen

minimiert werden können [131]. Da diese Formen jedoch nicht dem klinischen Alltag entsprechen, wurde statt einer lokalen Applikationsform eine systemische Gabe von Simvastatin bevorzugt.

Nach der jeweiligen Zeit erfolgte die Tötung der Tiere und Explantation der Femora zur weiteren Analyse. Zur biomechanischen Testung wurde die Biegesteifigkeit mittels 3-Punkt-Biegung ermittelt. Dieses Verfahren ist abhängig von der Positionierung des Knochens auf den Biegestempeln und deren Abstand zueinander. In der vorliegenden Arbeit wurde sichergestellt, dass die Ausrichtung des Knochens und der Aufbau bei allen Knochen identisch war. Alternativ wäre eine 4-Punkt-Biegung möglich gewesen, da die Auflagefläche des Stempels auf der gesunden Kortikalis lokalisiert ist. Dabei erfolgt eine Messung über eine definierte Strecke und nicht auf einem einzelnen Punkt. Allerdings sind murine Femora mit einer durchschnittlichen Länge von 17 mm für diese Testung zu kurz. Andere Verfahren wie Torsionstestungen bieten die Analyse weiterer biomechanischer Parameter und haben sich auch als standardisierte Verfahren erwiesen [160]. Die Torsionstestung erlaubt jedoch keine zerstörungsfreie Testung, sodass die Proben für die weiteren Analysen nicht hätten wiederverwendet werden können und somit mehr Tiere nötig gewesen wären. Die 3-Punkt-Biegung stellt hingegen ein etabliertes Verfahren dar, das den Vorteil aufweist, dass die Femora durch die Analyse nicht zerstört werden und somit noch zur weiteren histomorphometrischen und radiologischen Analyse zur Verfügung stehen [62] [64] [106] [107] [128].

Die radiologische Analyse mithilfe des Goldberg-Scores ist ein standardisiertes Verfahren und liefert vor allem Informationen über die knöcherne Überbauung im kortikalen Knochen [48]. Die Schnittbildgebung mittels CT erlaubt zudem eine detailliertere quantifizierbare Analyse. Die hierbei verwendeten Untersuchungsparameter des CTs sind etabliert und lieferten auch in der vorliegenden Studie eine adäquate Grundlage um das genaue Kallusvolumen und die Beschaffenheit und Qualität der knöchernen Durchbauung zu beurteilen [113] [126] [127] [129] [130].

Die histomorphometrische Analyse erfolgte an sagittalen, longitudinalen Schnitten an der Stelle des maximalen Kallusdurchmessers. Diese stellt in Anlehnung an Gerstenfeld et al. eine standardisierte Methode dar [45]. Aus der heterogenen, dreidimensionalen Knochenstruktur können somit reproduzierbare histologische Schnitte angefertigt werden. Die genaue Analyse erfolgte dann softwaregestützt am Computer. In Ergänzung zur CT und zum Röntgen können hierbei auch nicht-röntgendichte Strukturen besser berücksichtigt werden.

Mit Hilfe des Western Blots konnten proteinbiochemische Analysen angefertigt werden. Dies erfolgte allerdings nur 2 Wochen postoperativ, da zu diesem Zeitpunkt der Kallus ein Maximum erreicht und so genügend Gewebe zur Analyse asserviert werden konnte. 5 Wochen

postoperativ kann bei knöchern überbrückter Fraktur bei der praktischen Entnahme von isoliertem Kallusgewebe kaum zwischen Kallusgewebe und originärem Knochen unterschieden werden. Daher wurde nach 5 Wochen, und bereits eingesetztem Remodeling, auf eine proteinbiochemische Analyse verzichtet. Hierdurch wurde eine standardisierte Analyse sichergestellt.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

In der hier vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Simvastatin die Frakturheilung unter ischämischen Bedingungen negativ beeinflusst. Computertomographisch waren sowohl 2 als auch 5 Wochen postoperativ das absolute Knochenvolumen im Kallus, der relative Knochenanteil und die Trabekelanzahl signifikant erniedrigt. Passend hierzu war der Trabekelabstand nach 2 Wochen vergrößert und die Trabekeldicke in der 5 Wochen Gruppe vermindert. In der histomorphometrischen Untersuchung erwies sich darüber hinaus die Gesamtkallusfläche 5 Wochen postoperativ signifikant vermindert. Diese computertomographischen und histomorphometrischen nachgewiesenen Veränderungen gingen jedoch nicht mit einer veränderten Biegesteifigkeit im Frakurbereich einher, jedoch zeigten nicht frakturierte Knochen von Tieren mit Simvastatin-Behandlung eine verminderte Stabilität. In der proteinbiochemischen Analyse zeigte sich eine signifikant vermehrte Expression des angiogenen Markers CD31 und des Proliferations- und Differenzierungsmarkers PI3K. Der Osteogenesemarker BMP-2 hingegen wurde vermindert exprimiert, die Expression der OPG/RANKL-Achse war nicht unterschiedlich. Die Nullhypothese der Arbeit ist daher zu verwerfen.

Der Einfluss von Simvastatin auf den Knochenstoffwechsel und die Frakturheilung unter nicht-ischämischen Bedingungen wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht [31] [102] [137] [150] [153] [154] [171] [176]. Beginnend im Jahre 1999 fanden Mundy et al. nach subkutaner Injektion von Simvastatin eine vermehrte Knochenbildung an Mäuseschädeln und nach oraler Gabe ein erhöhtes spongiöses Knochenvolumen in Ratten [115]. Weitere Studien zur Wirkung von Simvastatin auf die Frakturheilung haben gezeigt, dass Simvastatin osteogen wirkt [19]. Dies erfolgt u.a. über den Eingriff in den Mevalonat Stoffwechsel. Dieser Wirkmechanismus ähnelt dem von Bisphosphonaten, da durch die verminderte Synthese von Farnesyl und Geranyl eine Modulation von kleinen G-Proteinen stattfindet, die für verschiedene Signalkaskaden wichtig sind. Bisphosphonate hemmen in Osteoklasten die Farnesylpyrophosphat-Synthase und haben eine wichtige Rolle in der Osteoporose-Therapie, da die Aktivität von Osteoklasten und damit einhergehend die Resorption von Knochensubstanz gehemmt wird [32] [37] [114]. Die hemmende Wirkung von Statinen auf Osteoklasten wird darüber hinaus auf eine Unterdrückung der Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten zurückgeführt. Dies geschieht über den Östrogenrezeptor- α , nach dessen

Aktivierung die Expression von RANKL reduziert und die Expression von OPG gesteigert wird [88] [114]. Zudem bewirkt Simvastatin einen Anstieg der OPG-messenger ribonucleic acid (mRNA) Expression und führt zu einer Abnahme der Expression von RANKL-mRNA. Dadurch verschiebt sich das Verhältnis zugunsten von OPG [4] [77]. Die durch RANKL induzierte Aktivierung von NFκB wird folglich gehemmt und somit die Differenzierung von Osteoklasten unterdrückt [4]. In der vorliegenden Studie war jedoch die Expression von RANKL und OPG nicht signifikant unterschiedlich zwischen Kallusgewebe der Simvastatingruppe und der Kontrollgruppe. Daher scheint die OPG/RANKL-Achse als Signalkaskade unter ischämischen Bedingungen nicht durch Simvastatin verändert zu werden.

Gemäß Vorstudien bewirkt Simvastatin eine Hemmung der Apoptose von Osteoblasten über die TGFβ/Smad3 Signalkaskade, steigert die Viabilität und Differenzierung von Osteoblasten und fördert somit die Osteogenese [10] [19] [114] [155]. Zudem bewirkt Simvastatin eine Rekrutierung von autologen osteogenen Stammzellen und endothelialen Vorläuferzellen zum Ort einer Läsion [187]. Außerdem konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass Simvastatin die BMD erhöht [99] [171]. Darüber hinaus ist MMP-9 ein weiterer Marker, der von Simvastatin beeinflusst wird. MMP-9 präpariert die Knochenoberfläche vor Beginn der Resorption durch Osteoklasten. Hierdurch wird die Rekanalisation des Knochens erleichtert und das Einwachsen neuer Gefäße im Rahmen der Neovaskularisation gefördert. Simvastatin bewirkt, dass MMP-9 herunterreguliert wird, was in Hinblick auf die Knochenformation daher nachteilig ist [167] [169]. Somit hat Simvastatin nicht bloß positive Effekte auf den Knochenmetabolismus. Insgesamt besteht bis dato ein Effekt von Simvastatin auf den Knochenstoffwechsel und die Frakturheilung, der kontrovers diskutiert wird und durch die Verwendung unterschiedlicher Dosierungen, Spezies, Zelllinien oder Statintypen noch schwieriger zu beurteilen ist [102] [156] [176]. So konnte zum Beispiel in der Studie von Baek et al., in der es zwar zu einer verstärkten Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen kam, gezeigt werden, dass durch Simvastatin gleichzeitig die Anzahl und Proliferation der Zellkolonien geringer wird [10]. Staal et al. konnten zeigen, dass Statine, ähnlich wie Bisphosphonate, in den Mevalonat Stoffwechselweg eingreifen [156]. Allerdings zeigte sich eine Hemmung der Knochenresorption nur in vitro, in vivo konnte ein Einfluss auf die Osteoklastenaktivität nicht detektiert werden. Diese Diskrepanz erklärt sich durch die Kompensationsmechanismen in vivo, die eine Hochregulation der HMG-CoA-Reduktase zur Folge haben [5] [12]. Aufgrund dessen ist es möglich, dass Statine, so auch Simvastatin in der vorliegenden Studie, trotz des Eingriffs in den Mevalonat Stoffwechsel, keinen hemmenden Einfluss auf die Resorption von Knochensubstanz haben, da in den Osteoklasten eine kompensatorische Hochregulierung der beteiligten Enzyme erfolgt. Somit konnten einige in vivo Studien den anabolen Effekt von Statinen, der in vitro beschrieben wurde, nicht zeigen [21] [156] [176]. Von Stechow et al. publizierten eine Osteoporosestudie, in der ovariectomierte

Mäuse über einen Zeitraum von 8 Wochen mit oralem Simvastatin behandelt wurden [176]. Zudem wurde über eine Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie die Anwesenheit des aktiven Metaboliten von Simvastatin (β -hydroxy-Simvastatin) im Serum validiert und somit die Effektivität der oralen Administration bestätigt. Dabei konnte kein anaboler Effekt des Simvastatins auf den Knochen und keine Aktivierung der Osteoblasten festgestellt werden. Auch in klinischen Studien gibt es Untersuchungen, die den positiven Effekt von Statinen auf die BMD nicht bestätigen können [13] [145]. Zahlreiche weitere Studien haben einen negativen Effekt von Simvastatin beschrieben. So nutzten Pauly et al. retrograde Marknägels in Ratten um den Einfluss von niedrig- und hochdosiertem Simvastatin auf die Implantatintegration zu beobachten und konnten nachweisen, dass sich in einigen Tieren eine Osteolyse entlang des Implantats, welches mit hochdosiertem Simvastatin beschichtet war, fand. Die Knochenbildung war erniedrigt, sodass die Autoren daraus schlossen, dass die lokale Applikation von Simvastatin die Implantatintegration beeinträchtigt [140]. Chissas et al. untersuchten den Effekt von Simvastatin in zwei verschiedenen oralen Dosierungen auf die Frakturheilung nach einer ulnaren Osteotomie an Kaninchen. Dosierungen von 10 mg/kg KG pro Tag zeigten dabei weder einen signifikant positiven, noch negativen Effekt. Simvastatin in einer Dosis von 30 mg/kg KG – analog zur vorliegenden Studie – bewirkte jedoch eine verminderte BMD, Biegesteifigkeit und Kallusbildung [21]. Maritz et al. untersuchten den Einfluss von verschiedenen oralen Dosierungen von Simvastatin auf die BMD an ovariectomierten Ratten. Dabei zeigte sich ebenso eine verminderte Knochendichte und nach eher niedrig dosierten Gaben eine geringe Knochenbildung sowie ein Anstieg der Knochenresorption [102]. Alle drei letztgenannten Studien begründeten ihr Ergebnis mit der Vermutung, dass Osteoblasten und Osteoklasten sich in ihrer Sensitivität bezüglich bestimmter Substanzen unterscheiden [21] [102] [131] [140]. Maritz et al. wiesen auch darauf hin, dass manche Bisphosphonate ebenfalls einen dosisabhängigen Effekt zeigten und in sehr geringen Dosen die Osteoklasten Funktion steigern konnten [102] [172]. Auch die Freisetzung von VEGF unter Stimulation mit Simvastatin zeigte in einer in vivo Studie mit Ratten einen dosisabhängigen Effekt [138] [164]. Zudem ist bereits bekannt, dass verschiedene Knochenmarkzellen eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Lovastatin besitzen [102]. Es wäre daher möglich, dass Osteoklasten sensibler für Simvastatin sind und geringere Dosierungen unabhängig von der OPG-/RANKL Signalkaskade verstärkt stimulierend auf Osteoklasten und somit auf knochenabbauende Prozesse wirken. Osteoblasten hingegen benötigen ggf. höhere Dosierungen an Simvastatin, um aktiviert zu werden. Um einen generellen Knochenumsatz mit vermehrter Knochenbildung und gesteigerter Resorption, zu stimulieren und damit den Frakturheilungsprozess zu beschleunigen, empfehlen einige der Autoren eine höhere Dosis Simvastatin [114] [131] [138]. Die signifikanten computertomographischen Ergebnisse sowie die histomorphometrisch nachgewiesene

reduzierte Gesamtkallusfläche in der vorliegenden Studie könnten daher durch einen ähnlichen dosisabhängigen Effekt ausgelöst worden sein, sodass vornehmlich Osteoklasten und nicht Osteoblasten stimuliert wurden. Dieser Effekt scheint jedoch nicht die Frakturheilung insgesamt verhindert zu haben, da die orientierenden biomechanischen und röntgenologischen Untersuchungen, die eine stabile Überbrückung der Frakturspalts testen, keinen Anhalt für eine Pseudarthrose bzw. ausbleibende Frakturheilung ergeben. Der Effekt einer Simvastatin-Behandlung scheint vielmehr die Frakturheilung zu behindern, jedoch im gewählten Tiermodell trotzdem die Frakturheilung nicht zu verhindern. Es ist möglich, dass in Modellen mit größeren knöchernen Defekten (sogenannte critical-size Modelle) eine Frakturheilung nach Simvastatin-Gabe ausbleiben könnte. Neuesten Entwicklungen von Simvastatin-Derivaten wie z. B. KMHHC-01 wird ein knochenanaboler Effekt bei gleichzeitiger Reduktion von Nebenwirkungen zugesprochen [83]. Solche Präparate könnten in Zukunft eventuell höhere Dosierungen dieses Wirkstoffes ermöglichen ohne ein erhöhtes Risikoprofil für Nebenwirkungen tolerieren zu müssen und sollten in diesem Kontext daher auch hinsichtlich ihres osteoanabolen Potenzials untersucht werden.

Interessanterweise hat trotz dieser bereits umfassenden Datenlage zur Wirkung von Simvastatin auf die Frakturheilung bisher keine Studie die Wirkung von Simvastatin auf die Frakturheilung unter ischämischen Bedingungen untersucht.

Durch Induktion einer Ischämie verändern sich die physiologischen Mechanismen der Frakturheilung [95] [107]. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das Zellüberleben als auch die Proliferation unter Ischämie vermindert sind [95]. Außerdem zeigte sich eine veränderte Zelldifferenzierung mit der vermehrten Bildung von adipogenen und bindegewebigen Anteilen im Kallus. Damit ergibt sich insgesamt eine verminderte Kallusbildung und kann damit einhergehend zu einer inkompletten knöchernen Überbauung führen [95]. Die Anwendung eines ischämischen Tiermodells, das demnach per se zu Veränderungen der Kalluszusammensetzung führt, könnte daher erklären, warum die histomorphometrische Analyse in der vorliegenden Studie keine Änderungen in den relativen Gewebeanteilen detektiert. Künftige Studien sollten daher neben verschiedenen Dosierungen von Simvastatin während der Frakturheilung und Osteoklasten- bzw. Osteoblasten-spezifischen Untersuchungen auch dem relevanten Effekt ischämischer Bedingungen Rechnung tragen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zur Wirkung von Simvastatin auf die Frakturheilung werden auch durch Studien gestützt, die eine lokale Wirkung von Statinen auf Knochen untersuchten. In einer Studie von Calixto et al. wurde die Wirkung von lokalem Simvastatin auf Defekte in der Schädelkalotte von Ratten untersucht [17]. Dazu wurden Kollagenschwämme mit Simvastatin in den Knochenspalt eingebracht und nach 30 bzw. 60 Tagen radiographisch und histomorphometrisch untersucht. In der niedrig dosierten Simvastatingruppe zeigte sich

nach 60 Tagen eine signifikant verminderte Knochenbildung und eine geringere Knochendichte. Daraus schlossen die Autoren, dass Simvastatin eine schädliche Wirkung auf die Heilung der Knochendefekte hat. Lima et al. untersuchten ebenfalls den lokalen Effekt von Simvastatin in der gleichen Dosierung wie Calixto et al. an Defekten der Schädelkalotte [89]. Dabei wurde die Gruppe mit Simvastatinlösung mit einer Gruppe, bei der demineralisierte Rinderknochenmatrix in den Spalt appliziert wurde, verglichen. Sowohl nach 30 als auch nach 60 Tagen zeigte sich eine geringere Knochendichte und Knochenbildung unter Simvastatin. Die Autoren gaben zudem an, dass niedrige Dosierungen an Simvastatin keinen Effekt zeigten, während zu hohe lokale Dosen eine Inflammation begünstigen können. Durch die rasche Absenkung des Cholesterinlevels können Statine auch zytotoxisch wirken, da Cholesterin ein wichtiger Membranbestandteil ist und somit die Membranintegrität von Zellen geschwächt wird [89]. Beide zuvor erwähnten Studien beobachteten unter hohen Dosierungen an Simvastatin teilweise eine starke inflammatorische Lokalreaktion mit Ödem, Nekrose und Krustenbildung. Eine solche Entzündung der Weichteile durch Simvastatin konnte auch in weiteren Studien beobachtet werden [124] [170]. Während Thylin et al. unter dieser lokalen Entzündungsreaktion einen positiven Effekt von Simvastatin beobachteten [170], so fanden Calixto und Lima einen negativen Effekt [17] [89]. Diese widersprüchlichen Ergebnisse spiegeln am ehesten das empfindliche Gleichgewicht, welches für eine optimale Knochenheilung bzw. den Knochenstoffwechsel vorliegen muss, wider. In der vorliegenden Studie mit systemischer Applikation konnte keine unmittelbar auf Simvastatin zurückzuführende Lokalreaktionen am Knochen beobachtet werden. Es ist jedoch denkbar, dass die reduzierte Biegesteifigkeit gesunder Femora in Tieren 2 Wochen nach Beginn der Behandlung mit Simvastatin sowie die erhöhte Expression des Proliferationsmarkers PI3K auf die genannte veränderte Inflammationsreaktion zurückzuführen ist.

Neben PI3K waren auch BMP-2 und CD-31 im Kallusgewebe von Tieren mit Simvastatin Behandlung im Vergleich zu Kallusgewebe von Kontrolltieren signifikant unterschiedlich exprimiert. Mundy et al. wiesen erstmals eine Wirkung von Simvastatin auf BMP-2 im Rahmen der Frakturheilung nach [115]. Sie fanden eine erhöhte Expression von BMP-2 nach Simvastatin-Gabe, jedoch fand die Messung in der Frühphase der Frakturheilung nach ca. 2-5 Tagen statt. In anderen Vorstudien wurde ebenfalls nachgewiesen, dass Simvastatin die Expression von BMP-2 über bestimmte molekulare Signalwege fördern kann [19] [47]. Im Gegensatz dazu konnten Zhang et al. in einer Untersuchung zur Knochenbildung an Ratten nachweisen, dass kein signifikanter Unterschied in der Expression von BMP-2 durch Gabe von Simvastatin bestand [188]. Die proteinbiochemischen Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen eine Wirkung von Simvastatin auf BMP-2 vermuten, jedoch findet sich unter ischämischen Bedingungen im angewandten Tiermodell im Gegensatz zu Studien ohne ischämische Bedingungen eine verminderte Expression von BMP-2. Diese Ergebnisse heben

den Effekt ischämischer Bedingungen auf den präzise orchestrierten Prozess der Frakturheilung hervor und unterstreichen wie unterschiedlich die Wirkung von Simvastatin auf die Frakturheilung unter diesen hypoxischen Bedingungen ausfällt.

Im Gegensatz zu BMP-2 war CD-31 als Marker für Angiogenese und Vaskularisation im betreffenden Gewebe nach Gabe von Simvastatin signifikant stärker exprimiert. Hieraus resultiert ein deutlich verschobenes Verhältnis von Markern der Angiogenese und der Osteogenese (Angiogenese / Osteogenese Verhältnis). In Vorstudien zeigte sich interessanterweise, dass das Verhältnis von Angiogenese und Osteogenese essentiell für den Prozess der Frakturheilung ist [127] [130] [179]. Orth et al. konnten zeigen, dass sich eine im Verhältnis überproportional stimulierte Angiogenese, negativ auf die Knochenbildung auswirken kann und sogar eine Frakturheilung unter ansonsten physiologischen Bedingungen verhindern kann [127]. Darüber hinaus konnte in einer Studie mit Applikation von VEGF- und BMP-2-transfizierten Stammzellen aus Fettgewebe in knöcherne Schädeldefekte von Mäusen nachgewiesen werden, dass ein Verhältnis von 1:9 für VEGF / BMP-2 als jeweilige Vertreter angio- bzw. osteogener Marker optimal zur Förderung der Knochenbildungsprozesse ist [81]. Auch andere Studien deuten darauf hin, dass das Verhältnis von Angiogenese / Osteogenese zu Gunsten der Osteogenese ausfallen sollte, um die Frakturheilung nicht zu gefährden bzw. Pseudarthrosen erfolgreich zu behandeln [130]. In einer weiteren Studie von Orth et al. mit VEGF und BMP-2 beschichteten Mikropartikeln zeigte sich ein Verhältnis von 1:2 für VEGF / BMP-2 als förderlich für die Knochenheilung im Pseudarthrosemodell [130]. Auch Peng et al. zeigten, dass ein niedrigeres Verhältnis von VEGF zu BMP-2 unterstützend für die Knochenheilung ist [143]. Obwohl eine suffiziente Angiogenese durch Lieferung von Sauerstoff und Nährstoffen sicherlich essentiell für die Frakturheilung ist, so ist es möglich, dass die Kombination aus Simvastatin und hypoxischen Bedingungen zu einer Überstimulation der Angiogenese bei gleichzeitig verminderter Expression von BMP-2 und somit zu einem Missverhältnis von Angiogenese / Osteogenese in der vorliegenden Studie geführt hat und hierdurch letztlich die Frakturheilung funktionell beeinträchtigt wurde.

Zusammenfassend zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass Simvastatin die Frakturheilung unter ischämischen Bedingungen am Mausmodell beeinträchtigt ohne jedoch die Knochenheilung insgesamt zu verhindern. Dieser Effekt ist am ehesten auf ein Missverhältnis angiogener und osteogener Expressionsmarker im Kallusgewebe zurückzuführen. Darüber hinaus ergeben sich Hinweise, dass die Wirkung von Simvastatin auf die Frakturheilung dosisabhängig ist, sodass künftig weitere Studien den Effekt von Simvastatin und neuester Derivate hiervon auf ihr osteoanaboles Potenzial unter hypoxischen Bedingungen noch weiter untersuchen sollten.

7 Literaturverzeichnis

1. Abdel-Zaher AO, Elkoussi AEA, Abudahab LH, Elbakry MH, Elsayed EA-E (2014) Effect of simvastatin on the antihypertensive activity of losartan in hypertensive hypercholesterolemic animals and patients: Role of nitric oxide, oxidative stress, and high-sensitivity C-reactive protein. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 28:237–248
2. Aboyans V, Ricco J-B, Bartelink M-LEL, Björck M, Brodmann M, Cohnert T, Collet J-P, Czerny M, De Carlo M, Debus S, Espinola-Klein C, Kahan T, Kownator S, Mazzolai L, Naylor AR, Roffi M, Röther J, Sprynger M, Tendera M, Tepe G, Venermo M, Vlachopoulos C, Desormais I, ESC Scientific Document Group (2018) 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur Heart J* 39:763–816
3. AbZ (2021) Fachinformation: Simvastatin AbZ Filmtabletten. 7:1–17
4. Ahn KS, Sethi G, Chaturvedi MM, Aggarwal BB (2008) Simvastatin, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, suppresses osteoclastogenesis induced by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand through modulation of NF-kappaB pathway. *Int J Cancer* 123:1733–1740
5. Akira E, Yoshio T, Masao K, Kazuhiko T (1979) Effects of ML-236B on cholesterol metabolism in mice and rats: Lack of hypocholesterolemic activity in normal animals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 575:266–276
6. Al-Rasheed NM, Al-Rasheed NM, Hasan IH, Al-Amin MA, Al-Ajmi HN, Mohamad RA, Mahmoud AM (2017) Simvastatin Ameliorates Diabetic Cardiomyopathy by Attenuating Oxidative Stress and Inflammation in Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2017:1092015
7. Aref Z, de Vries MR, Quax PHA (2019) Variations in Surgical Procedures for Inducing Hind Limb Ischemia in Mice and the Impact of These Variations on Neovascularization Assessment. *Int J Mol Sci* 20:E3704
8. Armitage J (2007) The safety of statins in clinical practice. *Lancet* 370:1781–1790
9. Ayukawa Y, Yasukawa E, Moriyama Y, Ogino Y, Wada H, Atsuta I, Koyano K (2009) Local application of statin promotes bone repair through the suppression of osteoclasts and the enhancement of osteoblasts at bone-healing sites in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 107:336–342

10. Baek KH, Lee WY, Oh KW, Tae HJ, Lee JM, Lee EJ, Han JH, Kang MI, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK (2005) The effect of simvastatin on the proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Korean Med Sci* 20:438–444
11. Bellostà S, Fed N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A (2000) Non-lipid-related effects of statins. *Annals of Medicine* 32:164–176
12. Bensch WR, Ingebritsen TS, Diller ER (1978) Lack of correlation between the rate of cholesterol biosynthesis and the activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in rats and in fibroblasts treated with ML-236B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 82:247–254
13. Bone HG, Kiel DP, Lindsay RS, Lewiecki EM, Bolognese MA, Leary ET, Lowe W, McClung MR (2007) Effects of atorvastatin on bone in postmenopausal women with dyslipidemia: a double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *J Clin Endocrinol Metab* 92:4671–4677
14. Bonnarens F, Einhorn TA (1984) Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 2:97–101
15. Brigstock DR, Goldschmeding R, Katsube K, Lam SC-T, Lau LF, Lyons K, Naus C, Perbal B, Riser B, Takigawa M, Yeger H (2003) Proposal for a unified CCN nomenclature. *Mol Pathol* 56:127–128
16. Buck DW, Dumanian GA (2012) Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plast Reconstr Surg* 129:1314–1320
17. Calixto JC, Lima CEV de C, Frederico L, Lima RP dos S de C, Anbinder AL (2011) The influence of local administration of simvastatin in calvarial bone healing in rats. *J Craniomaxillofac Surg* 39:215–220
18. Cao X, Chen D (2005) The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene* 357:1–8
19. Chen P-Y, Sun J-S, Tsuang Y-H, Chen M-H, Weng P-W, Lin F-H (2010) Simvastatin promotes osteoblast viability and differentiation via Ras/Smad/Erk/BMP-2 signaling pathway. *Nutrition Research* 30:191–199
20. 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
21. Chissas D, Stamatopoulos G, Verettas D, Kazakos K, Papalois A, Agrogiannis G, Papaeliou A, Agapitos E, Balanika A, Papadopoulou E, Anastopoulos G, Ntagiopoulos PG, Asimakopoulos A (2010) Can low doses of simvastatin enhance fracture healing? An experimental study in rabbits. *Injury* 41:687–692

22. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration, Baigent C, Blackwell L, Emberson J, Holland LE, Reith C, Bhala N, Peto R, Barnes EH, Keech A, Simes J, Collins R (2010) Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet* 376:1670–1681
23. Clarke B (2008) Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 3 Suppl 3:S131-139
24. Conte SM, Vale PR (2018) Peripheral Arterial Disease. *Heart Lung Circ* 27:427–432
25. Couffinhal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witzenbichler B, Isner JM (1998) Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol* 152:1667–1679
26. Decker S, Reifenrath J, Omar M, Krettek C, Müller CW (2014) Non-Osteotomy and Osteotomy Large Animal Fracture Models in Orthopedic Trauma Research. *Orthop Rev (Pavia)* 6:5575
27. Deitz DM, Taylor LM, Beals RK, Porter JM (1989) Role of revascularization to treat chronic nonhealing fractures in ischemic limbs. *J Vasc Surg* 10:535–541
28. Dias IR, Camassa JA, Bordelo JA, Babo PS, Viegas CA, Dourado N, Reis RL, Gomes ME (2018) Preclinical and Translational Studies in Small Ruminants (Sheep and Goat) as Models for Osteoporosis Research. *Curr Osteoporos Rep* 16:182–197
29. Dickson K, Katzman S, Delgado E, Contreras D (1994) Delayed unions and nonunions of open tibial fractures. Correlation with arteriography results. *Clin Orthop Relat Res* 189–193
30. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV (2005) Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 36:1392–1404
31. Du Z, Chen J, Yan F, Xiao Y (2009) Effects of Simvastatin on bone healing around titanium implants in osteoporotic rats. *Clin Oral Implants Res* 20:145–150
32. Edwards CJ, Russell RG, Spector TD (2001) Statins and bone: myth or reality? *Calcif Tissue Int* 69:63–66
33. Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR (1998) Osteoprotegerin Is a Receptor for the Cytotoxic Ligand TRAIL. *Journal of Biological Chemistry* 273:14363–14367

34. Ezirganlı Ş, Kazancıoğlu HO, Mihmanlı A, Aydın MŞ, Sharifov R, Alkan A (2014) The effect of local simvastatin application on critical size defects in the diabetic rats. *Clin Oral Implants Res* 25:969–976
35. Ferreira LB, Bradaschia-Correa V, Moreira MM, Marques NDM, Arana-Chavez VE (2015) Evaluation of bone repair of critical size defects treated with simvastatin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres in rat calvaria. *J Biomater Appl* 29:965–976
36. Ferro D, Parrotto S, Basili S, Alessandri C, Violi F (2000) Simvastatin inhibits the monocyte expression of proinflammatory cytokines in patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 36:427–431
37. Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM, Luckman SP, Hughes DE, Masarachia PJ, Wesolowski G, Russell RG, Rodan GA, Reszka AA (1999) Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:133–138
38. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT (2017) The PI3K pathway in human disease. *Cell* 170:605–635
39. Fukui T, Li M, Shoji T, Matsumoto T, Mifune Y, Kawakami Y, Akimaru H, Kawamoto A, Kuroda T, Saito T, Tabata Y, Kuroda R, Kurosaka M, Asahara T (2012) Therapeutic effect of local administration of low-dose simvastatin-conjugated gelatin hydrogel for fracture healing. *J Bone Miner Res* 27:1118–1131
40. Garcia P, Holstein JH, Maier S, Schaumlöffel H, Al-Marrawi F, Hannig M, Pohlemann T, Menger MD (2008) Development of a Reliable Non-Union Model in Mice. *Journal of Surgical Research* 147:84–91
41. Garcia P, Holstein JH, Histing T, Burkhardt M, Culemann U, Pizanis A, Wirbel RJ, Pohlemann T, Menger MD (2008) A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: Impact of stability on fracture healing. *Journal of Biomechanics* 41:1689–1696
42. Garip S, Severcan F (2010) Determination of simvastatin-induced changes in bone composition and structure by Fourier transform infrared spectroscopy in rat animal model. *J Pharm Biomed Anal* 52:580–588
43. Germershausen JI, Hunt VM, Bostedor RG, Bailey PJ, Karkas JD, Alberts AW (1989) Tissue selectivity of the cholesterol-lowering agents lovastatin, simvastatin and pravastatin in rats in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 158:667–675

44. Gerson RJ, Macdonald JS, Alberts AW, Kornbrust DJ, Majka JA, Stubbs RJ, Bokelman DL (1989) Animal safety and toxicology of simvastatin and related hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. *The American Journal of Medicine* 87:S28–S38
45. 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
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 Rep* 6:87–100
47. Ghosh-Choudhury N, Mandal CC, Choudhury GG (2007) Statin-induced Ras Activation Integrates the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signal to Akt and MAPK for Bone Morphogenetic Protein-2 Expression in Osteoblast Differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 282:4983–4993
48. Goldberg VM, Powell A, Shaffer JW, Zika J, Bos GD, Heiple KG (1985) Bone grafting: role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res* 3:389–404
49. Goldstein JL, Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343:425–430
50. Grosso AF, de Oliveira SF, Higuchi M de L, Favarato D, Dallan LA de O, da Luz PL (2014) Synergistic anti-inflammatory effect: simvastatin and pioglitazone reduce inflammatory markers of plasma and epicardial adipose tissue of coronary patients with metabolic syndrome. *Diabetol Metab Syndr* 6:47
51. Gunderson ZJ, Campbell ZR, McKinley TO, Natoli RM, Kacena MA (2020) A comprehensive review of mouse diaphyseal femur fracture models. *Injury* 51:1439–1447
52. Haendeler J, Hoffmann J, Zeiher AM, Dimmeler S (2004) Antioxidant Effects of Statins via S-Nitrosylation and Activation of Thioredoxin in Endothelial Cells. *Circulation* 110:856–861
53. Haffner-Luntzer M, Hankenson KD, Ignatius A, Pfeifer R, Khader BA, Hildebrand F, van Griensven M, Pape H-C, Lehmcke M (2019) Review of Animal Models of Comorbidities in Fracture-Healing Research. *Journal of Orthopaedic Research* 37:2491–2498
54. Haffner-Luntzer M, Ignatius A (2020) Animal models for studying metaphyseal bone fracture healing. *Eur Cell Mater* 40:172–188

55. Hart NH, Newton RU, Tan J, Rantalainen T, Chivers P, Siafarikas A, Nimphius S (2020) Biological basis of bone strength: anatomy, physiology and measurement. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 20:347–371
56. Heart Protection Study Collaborative Group (2002) MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 360:7–22
57. Heinrichs G, Paech A, Schulz AP, Kaiser MM (2010) *Frakturen auf einen Blick: Oberschenkelchaft*. Springer, Berlin, Heidelberg
58. Hess DC, Fagan SC (2001) Pharmacology and clinical experience with simvastatin. *Expert Opin Pharmacother* 2:153–163
59. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT (1993) A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res* 11:305–312
60. 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
61. 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
62. 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
63. Histing T, Klein M, Stieger A, Stenger D, Steck R, Matthys R, Holstein JH, Garcia P, Pohlemann T, Menger MD (2012) A new model to analyze metaphyseal bone healing in mice. *J Surg Res* 178:715–721
64. 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
65. Histing T, Andonyan A, Klein M, Scheuer C, Stenger D, Holstein JH, Veith NT, Pohlemann T, Menger MD (2016) Obesity does not affect the healing of femur fractures in mice. *Injury* 47:1435–1444

66. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T (2007) Development of a locking femur nail for mice. *Journal of Biomechanics* 40:215–219
67. Holstein JH, Garcia P, Histing T, Kristen A, Scheuer C, Menger MD, Pohlemann T (2009) Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration. *J Orthop Trauma* 23:S31-38
68. 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. *Journal of Surgical Research* 153:71–75
69. Horiuchi N, Maeda T (2006) Statins and bone metabolism. *Oral Dis* 12:85–101
70. Hu K, Olsen BR (2016) The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone* 91:30–38
71. Hu K, Olsen BR (2016) Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *J Clin Invest* 126:509–526
72. Huang X, Huang Z, Li W (2014) Highly efficient release of simvastatin from simvastatin-loaded calcium sulphate scaffolds enhances segmental bone regeneration in rabbits. *Mol Med Rep* 9:2152–2158
73. Issa JPM, Ingraci de Lucia C, Dos Santos Kotake BG, Gonçalves Gonzaga M, Tocchini de Figueiredo FA, Mizusaki Iyomasa D, Macedo AP, Ervolino E (2015) The effect of simvastatin treatment on bone repair of femoral fracture in animal model. *Growth Factors* 33:139–148
74. Jee WS, Yao W (2001) Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1:193–207
75. Jin J, Machado ER, Yu H, Zhang X, Lu Z, Li Y, Lopes-Virella MF, Kirkwood KL, Huang Y (2014) Simvastatin inhibits LPS-induced alveolar bone loss during metabolic syndrome. *J Dent Res* 93:294–299
76. Junqueira JC, Mancini MNG, Carvalho YR, Anbinder AL, Balducci I, Rocha RF (2002) Effects of simvastatin on bone regeneration in the mandibles of ovariectomized rats and on blood cholesterol levels. *J Oral Sci* 44:117–124
77. Kaji H, Kanatani M, Sugimoto T, Chihara K (2005) Statins modulate the levels of osteoprotegerin/receptor activator of NFkappaB ligand mRNA in mouse bone-cell cultures. *Horm Metab Res* 37:589–592

78. Kapur NK, Musunuru K (2008) Clinical efficacy and safety of statins in managing cardiovascular risk. *Vasc Health Risk Manag* 4:341–353
79. Kovtun A, Bergdolt S, Wiegner R, Radermacher P, Huber-Lang M, Ignatius A (2016) The crucial role of neutrophil granulocytes in bone fracture healing. *Eur Cell Mater* 32:152–162
80. Ledet̃i I, Vlase G, Vlase T, Ŗuta L-M, Todea A, Fuliăș A (2015) Selection of solid-state excipients for simvastatin dosage forms through thermal and nonthermal techniques. *J Therm Anal Calorim* 121:1093–1102
81. Lee E, Ko J-Y, Kim J, Park J-W, Lee S, Im G-I (2019) Osteogenesis and angiogenesis are simultaneously enhanced in BMP2-/VEGF-transfected adipose stem cells through activation of the YAP/TAZ signaling pathway. *Biomater Sci* 7:4588–4602
82. Lee FY, Choi YW, Behrens FF, DeFouw DO, Einhorn TA (1998) Programmed removal of chondrocytes during endochondral fracture healing. *J Orthop Res* 16:144–150
83. Lee T-C, Chen H-T, Tai I-C, Kao L-T, Hung M-H, Chen C-H, Fu Y-C, Wang Y-H, Kao C-M, Chang J-K, Ho M-L (2022) Anabolic Effects of a Novel Simvastatin Derivative on Treating Rat Bone Defects. *Biomedicines* 10:1915
84. Lee Y, Schmid MJ, Marx DB, Beatty MW, Cullen DM, Collins ME, Reinhardt RA (2008) The effect of local simvastatin delivery strategies on mandibular bone formation in vivo. *Biomaterials* 29:1940–1949
85. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA (2008) The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med* 58:424–430
86. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ (2016) Endothelial functions of PECAM-1 (CD31). *Curr Opin Hematol* 23:253–259
87. Leung DW, Cachianes G, Kuang W-J, Goeddel DV, Ferrara N (1989) Vascular Endothelial Growth Factor Is a Secreted Angiogenic Mitogen. *Science* 246:1306–1309
88. Li X, Song Q-S, Wang J-Y, Leng H, Chen Z-Q, Liu Z-J, Dang G-T, Song C-L (2011) Simvastatin induces estrogen receptor- α expression in bone, restores bone loss, and decreases ER α expression and uterine wet weight in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab* 29:396–403
89. Lima CEV de C, Calixto JC, Anbinder AL (2011) Influence of the association between simvastatin and demineralized bovine bone matrix on bone repair in rats. *Braz Oral Res* 25:42–48

90. Limbourg A, Korff T, Napp LC, Schaper W, Drexler H, Limbourg FP (2009) Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nat Protoc* 4:1737–1746
91. Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin T, Yao Z, Goodman SB (2016) Inflammation, fracture and bone repair. *Bone* 86:119–130
92. Lowry O, Rosebrough N, Farr AL, Randall R (1951) PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry* 193:265–275
93. 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
94. Lu C, Marcucio R, Miclau T (2006) Assessing Angiogenesis during Fracture Healing. *Iowa Orthop J* 26:17–26
95. Lu C, Miclau T, Hu D, Marcucio RS (2007) Ischemia Leads to Delayed-union during Fracture Healing: A Mouse Model. *J Orthop Res* 25:51–61
96. Lu C, Hansen E, Sapozhnikova A, Hu D, Miclau T, Marcucio RS (2008) Effect of age on vascularization during fracture repair. *J Orthop Res* 26:1384–1389
97. Lu C, Saless N, Hu D, Wang X, Xing Z, Hou H, Williams B, Swartz HM, Colnot C, Miclau T, Marcucio RS (2011) Mechanical Stability Affects Angiogenesis during Early Fracture Healing. *J Orthop Trauma* 25:494–499
98. Ludwig W-D, Mühlbauer B, Seifert R, Herausgeber (2021) *Arzneiverordnungs-Report 2021*. Springer, Berlin, Heidelberg
99. Lupattelli G, Scarponi AM, Vaudo G, Siepi D, Roscini AR, Gemelli F, Pirro M, Latini RA, Sinzinger H, Marchesi S, Mannarino E (2004) Simvastatin increases bone mineral density in hypercholesterolemic postmenopausal women. *Metabolism* 53:744–748
100. MacDonald JS, Gerson RJ, Kornbrust DJ, Kloss MW, Prahalada S, Berry PH, Alberts AW, Bokelman DL (1988) Preclinical evaluation of lovastatin. *The American Journal of Cardiology* 62:J16–J27
101. Manigrasso MB, O'Connor JP (2004) Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma* 18:687–695
102. Maritz FJ, Conradie MM, Hulley PA, Gopal R, Hough S (2001) Effect of Statins on Bone Mineral Density and Bone Histomorphometry in Rodents. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21:1636–1641
103. Marsell R, Einhorn TA (2011) The biology of fracture healing. *Injury* 42:551–555

104. Matthys R, Perren SM (2009) Internal fixator for use in the mouse. *Injury* 40 Suppl 4:S103-109
105. McDowell IF, Smye M, Trinick T, Shortt JA, Archibald MP, Trimble ER, Nicholls DP (1991) Simvastatin in severe hypercholesterolaemia: a placebo controlled trial. *Br J Clin Pharmacol* 31:340–343
106. Menger MM, Bremer P, Scheuer C, Rollmann MF, Braun BJ, Herath SC, Orth M, Später T, Pohlemann T, Menger MD, Histing T (2020) Pantoprazole impairs fracture healing in aged mice. *Sci Rep* 10:22376
107. Menger MM, Stutz J, Ehnert S, Nussler AK, Rollmann MF, Herath SC, Braun BJ, Pohlemann T, Menger MD, Histing T (2022) Development of an ischemic fracture healing model in mice. *Acta Orthop* 93:466–471
108. Merck & Co (2010) Annual Report For The Fiscal Year.
109. Mohamadin AM, Elberry AA, Abdel Gawad HS, Morsy GM, Al-Abbasi FA (2011) Protective Effects of Simvastatin, a Lipid Lowering Agent, against Oxidative Damage in Experimental Diabetic Rats. *J Lipids* 2011:167958
110. Möhle R, Green D, Moore MAS, Nachman RL, Rafii S (1997) Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:663–668
111. Mol MJTM, Leuven JAG, Erkelens DW, Schouten TA, Stalenhoef AFH (1986) Effects of Synvinolin (MK-733) on plasma lipids in familial hypercholesterolaemia. *The Lancet* 328:936–939
112. Mölgaard J, Lundh BL, von Schenck H, Olsson AG (1991) Long-term efficacy and safety of simvastatin alone and in combination therapy in treatment of hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 91 Suppl:S21-28
113. Morgan EF, Mason ZD, Chien KB, Pfeiffer AJ, Barnes GL, Einhorn TA, Gerstenfeld LC (2009) Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone* 44:335–344
114. Moshiri A, Sharifi AM, Oryan A (2016) Role of Simvastatin on fracture healing and osteoporosis: a systematic review on in vivo investigations. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 43:659–684
115. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G (1999) Stimulation of Bone Formation in Vitro and in Rodents by Statins. *Science* 286:1946–1949

116. Murphy CL, Polak JM (2004) Control of human articular chondrocyte differentiation by reduced oxygen tension. *Journal of Cellular Physiology* 199:451–459
117. Nakashima Y, Haneji T (2013) Stimulation of osteoclast formation by RANKL requires interferon regulatory factor-4 and is inhibited by simvastatin in a mouse model of bone loss. *PLoS One* 8:e72033
118. Nassar PO, Nassar CA, Guimarães MR, Aquino SG, Andia DC, Muscara MN, Spolidorio DMP, Rossa C, Spolidorio LC (2009) Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res* 44:479–488
119. Natsume T, Tomita S, Iemura S, Kinto N, Yamaguchi A, Ueno N (1997) Interaction between Soluble Type I Receptor for Bone Morphogenetic Protein and Bone Morphogenetic Protein-4 *. *Journal of Biological Chemistry* 272:11535–11540
120. Newman E, Turner AS, Wark JD (1995) The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone* 16:277S-284S
121. Newman PJ, Newman DK (2003) Signal Transduction Pathways Mediated by PECAM-1. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23:953–964
122. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Crowe T, Sasiela WJ, Tsai J, Orazem J, Magorien RD, O'Shaughnessy C, Ganz P (2005) Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352:29–38
123. Nunamaker DM (1998) Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 355:56–65
124. Nyan M, Sato D, Oda M, Machida T, Kobayashi H, Nakamura T, Kasugai S (2007) Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. *J Pharmacol Sci* 104:384–386
125. O'Brien TP, Lau LF (1992) Expression of the growth factor-inducible immediate early gene *cyr61* correlates with chondrogenesis during mouse embryonic development. *Cell Growth & Differentiation* 3:645
126. 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 Cell Mater* 33:1–12
127. Orth M, Altmeyer MAB, Scheuer C, Braun BJ, Holstein JH, Eglin D, D'Este M, Histing T, Laschke MW, Pohlemann T, Menger MD (2018) Effects of locally applied adipose

- p>tissue-derived microvascular fragments by thermoresponsive hydrogel on bone healing.
- Acta Biomaterialia*
- 77:201–211
128. 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
 129. Orth M, Shenar AK, Scheuer C, Braun BJ, Herath SC, Holstein JH, Histing T, Yu X, Murphy WL, Pohlemann T, Laschke MW, Menger MD (2019) VEGF-loaded mineral-coated microparticles improve bone repair and are associated with increased expression of epo and RUNX-2 in murine non-unions. *Journal Orthopaedic Research* 37:821–831
 130. Orth M, Fritz T, Stutz J, Scheuer C, Ganse B, Bullinger Y, Lee JS, Murphy WL, Laschke MW, Menger MD, Pohlemann T (2022) Local Application of Mineral-Coated Microparticles Loaded With VEGF and BMP-2 Induces the Healing of Murine Atrophic Non-Unions. *Front Bioeng Biotechnol* 9:809397
 131. Oryan A, Kamali A, Moshiri A (2015) Potential mechanisms and applications of statins on osteogenesis: Current modalities, conflicts and future directions. *J Control Release* 215:12–24
 132. Oxlund H, Dalstra M, Andreassen TT (2001) Statin given perorally to adult rats increases cancellous bone mass and compressive strength. *Calcif Tissue Int* 69:299–304
 133. Oxlund H, Andreassen TT (2004) Simvastatin treatment partially prevents ovariectomy-induced bone loss while increasing cortical bone formation. *Bone* 34:609–618
 134. Ozeç I, Kiliç E, Gümüş C, Göze F (2007) Effect of local simvastatin application on mandibular defects. *J Craniofac Surg* 18:546–550
 135. Pajarinen J, Lin T, Gibon E, Kohno Y, Maruyama M, Nathan K, Lu L, Yao Z, Goodman SB (2019) Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. *Biomaterials* 196:80–89
 136. Palus S, von Haehling S, Flach VC, Tschirner A, Doehner W, Anker SD, Springer J (2013) Simvastatin reduces wasting and improves cardiac function as well as outcome in experimental cancer cachexia. *International Journal of Cardiology* 168:3412–3418
 137. Papadimitriou K, Karkavelas G, Vouros I, Kessopoulou E, Konstantinidis A (2015) Effects of local application of simvastatin on bone regeneration in femoral bone defects in rabbit. *J Craniomaxillofac Surg* 43:232–237

138. Park J-B (2009) The use of simvastatin in bone regeneration. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 14:e485-488
139. Pauly S, Luttosch F, Morawski M, Haas NP, Schmidmaier G, Wildemann B (2009) Simvastatin locally applied from a biodegradable coating of osteosynthetic implants improves fracture healing comparable to BMP-2 application. *Bone* 45:505–511
140. Pauly S, Back DA, Kaeppler K, Haas NP, Schmidmaier G, Wildemann B (2012) Influence of statins locally applied from orthopedic implants on osseous integration. *BMC Musculoskelet Disord* 13:208
141. Pearce A, Richards R, Milz S, Schneider E, Pearce S (2007) Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *eCM* 13:1–10
142. Pedersen T, Kjekshus J, Berg K (1994) Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 344:1383–1389
143. Peng H, Usas A, Olshanski A, Ho AM, Gearhart B, Cooper GM, Huard J (2005) VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J Bone Miner Res* 20:2017–2027
144. PubChem (2022) Simvastatin Compound Summary.
145. Rejnmark L, Buus HN, Vestergaard P, Heickendorff L, Andreasen F, Larsen LM, Mosekilde L (2004) Effects of Simvastatin on Bone Turnover and BMD: A 1-Year Randomized Controlled Trial in Postmenopausal Osteopenic Women. *Journal of Bone and Mineral Research* 19:737–744
146. Riley EH, Lane JM, Urist MR, Lyons KM, Lieberman JR (1996) Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res* 39–46
147. Rochette L, Meloux A, Rigal E, Zeller M, Malka G, Cottin Y, Vergely C (2019) The Role of Osteoprotegerin in Vascular Calcification and Bone Metabolism: The Basis for Developing New Therapeutics. *Calcif Tissue Int* 105:239–251
148. Ronga M, Fagetti A, Canton G, Paiusco E, Surace MF, Cherubino P (2013) Clinical applications of growth factors in bone injuries: Experience with BMPs. *Injury* 44:34–39
149. Roux S, Orcel P (2000) Bone loss: Factors that regulate osteoclast differentiation - an update. *Arthritis Res* 2:451–456
150. Saraf SK, Singh A, Garbyal RS, Singh V (2007) Effect of simvastatin on fracture healing--an experimental study. *Indian J Exp Biol* 45:444–449

151. SEARCH Study Collaborative Group, Bowman L, Armitage J, Bulbulia R, Parish S, Collins R (2007) Study of the effectiveness of additional reductions in cholesterol and homocysteine (SEARCH): characteristics of a randomized trial among 12064 myocardial infarction survivors. *Am Heart J* 154:815–823, 823.e1–6
152. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang M-S, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan H-L, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell* 89:309–319
153. Skoglund B, Forslund C, Aspenberg P (2002) Simvastatin improves fracture healing in mice. *J Bone Miner Res* 17:2004–2008
154. Skoglund B, Aspenberg P (2007) Locally applied Simvastatin improves fracture healing in mice. *BMC Musculoskelet Disord* 8:98
155. Song C, Guo Z, Ma Q, Chen Z, Liu Z, Jia H, Dang G (2003) Simvastatin induces osteoblastic differentiation and inhibits adipocytic differentiation in mouse bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 308:458–462
156. Staal A, Frith JC, French MH, Swartz J, Güngör T, Harrity TW, Tamasi J, Rogers MJ, Feyen JH (2003) The Ability of Statins to Inhibit Bone Resorption Is Directly Related to Their Inhibitory Effect on HMG-CoA Reductase Activity. *Journal of Bone and Mineral Research* 18:88–96
157. Stabile E, Burnett MS, Watkins C, Kinnaird T, Bachis A, la Sala A, Miller JM, Shou M, Epstein SE, Fuchs S (2003) Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation* 108:205–210
158. Stalenhoef AFH, Mol MJTM, Stuyt PMJ (1989) Efficacy and tolerability of simvastatin (MK-733). *The American Journal of Medicine* 87:39–43
159. Starnes JW, Neidre DB, Nyman JS, Roy A, Nelson MJ, Gutierrez G, Wang X (2013) Synergistic effect of exercise and statins on femoral strength in rats. *Exp Gerontol* 48:751–755
160. Steiner M, Volkheimer D, Meyers N, Wehner T, Wilke H-J, Claes L, Ignatius A (2015) Comparison between different methods for biomechanical assessment of ex vivo fracture callus stiffness in small animal bone healing studies. *PLoS One* 10:e0119603

161. Sun K, Luo J, Guo J, Yao X, Jing X, Guo F (2020) The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in osteoarthritis: a narrative review. *Osteoarthritis and Cartilage* 28:400–409
162. Szárszoi O, Malý J, Ošťádal P, Netuka I, Bešík J, Kolář F, Ošťádal B (2008) Effect of acute and chronic simvastatin treatment on post-ischemic contractile dysfunction in isolated rat heart. *Physiol Res* 57:793–796
163. Tai I-C, Fu Y-C, Wang C-K, Chang J-K, Ho M-L (2013) Local delivery of controlled-release simvastatin/PLGA/HAp microspheres enhances bone repair. *Int J Nanomedicine* 8:3895–3904
164. Takenaka M, Hirade K, Tanabe K, Akamatsu S, Dohi S, Matsuno H, Kozawa O (2003) Simvastatin stimulates VEGF release via p44/p42 MAP kinase in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 301:198–203
165. Takeuchi T, Suzuki H, Sakurai S, Nogami H, Okuma S, Ishikawa H (1990) Molecular mechanism of growth hormone (GH) deficiency in the spontaneous dwarf rat: detection of abnormal splicing of GH messenger ribonucleic acid by the polymerase chain reaction. *Endocrinology* 126:31–38
166. Tang G, Charo DN, Wang R, Charo IF, Messina L (2004) CCR2-/- knockout mice revascularize normally in response to severe hindlimb ischemia. *J Vasc Surg* 40:786–795
167. Tang QO, Tran GT, Gamie Z, Graham S, Tsialogiannis E, Tsiridis E, Linder T, Tsiridis E (2008) Statins: under investigation for increasing bone mineral density and augmenting fracture healing. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 17:1435–1463
168. Thompson Z, Miclau T, Hu D, Helms JA (2002) A model for intramembranous ossification during fracture healing. *J Orthop Res* 20:1091–1098
169. Thunyakitpisal PD, Chaisuparat R (2004) Simvastatin, an HMG-CoA Reductase Inhibitor, Reduced the Expression of Matrix Metalloproteinase-9 (Gelatinase B) in Osteoblastic Cells and HT1080 Fibrosarcoma Cells. *Journal of Pharmacological Sciences* 94:403–409
170. Thylin MR, McConnell JC, Schmid MJ, Reckling RR, Ojha J, Bhattacharyya I, Marx DB, Reinhardt RA (2002) Effects of simvastatin gels on murine calvarial bone. *J Periodontol* 73:1141–1148
171. Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, Cucherat M, Perret G-Y (2007) Effects of statins on bone mineral density: A meta-analysis of clinical studies. *Bone* 40:1581–1587

172. van der Pluijm G, Binderup L, Bramm E, van der Wee-Pals L, De Groot H, Binderup E, Löwik C, Papapoulos S (1992) Disodium 1-hydroxy-3-(1-pyrrolidinyl)-propylidene-1,1-bisphosphonate (EB-1053) is a potent inhibitor of bone resorption in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 7:981–986
173. van Nieuw Amerongen GP, Vermeer MA, Nègre-Aminou P, Lankelma J, Emeis JJ, van Hinsbergh VW (2000) Simvastatin improves disturbed endothelial barrier function. *Circulation* 102:2803–2809
174. Vantucci CE, Krishan L, Cheng A, Prather A, Roy K, Guldborg RE (2021) BMP-2 Delivery Strategy Modulates Local Bone Regeneration and Systemic Immune Responses to Complex Extremity Trauma. *Biomaterials science* 9:1668
175. Vaziri H, Naserhojjati-Roodsari R, Tahsili-Fahadan N, Khojasteh A, Mashhadi-Abbas F, Eslami B, Dehpour AR (2007) Effect of simvastatin administration on periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. *J Periodontol* 78:1561–1567
176. von Stechow D, Fish S, Yahalom D, Bab I, Chorev M, Müller R, Alexander JM (2003) Does simvastatin stimulate bone formation in vivo? *BMC Musculoskelet Disord* 4:8
177. Wagner AH, Köhler T, Rückschloss U, Just I, Hecker M (2000) Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:61–69
178. Walker JF (1989) Simvastatin: The clinical profile. *The American Journal of Medicine* 87:S44–S46
179. Wang F, Qian H, Kong L, Wang W, Wang X, Xu Z, Chai Y, Xu J, Kang Q (2021) Accelerated Bone Regeneration by Astragaloside IV through Stimulating the Coupling of Osteogenesis and Angiogenesis. *Int J Biol Sci* 17:1821–1836
180. Wang T, Zhang X, Bikle DD (2017) Osteogenic Differentiation of Periosteal Cells During Fracture Healing. *J Cell Physiol* 232:913–921
181. Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, Bouxsein ML, Faugere M-C, Guldborg RE, Gerstenfeld LC, Haase VH, Johnson RS, Schipani E, Clemens TL (2007) The hypoxia-inducible factor α pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest* 117:1616–1626
182. Weber B, Lackner I, Haffner-Luntzer M, Palmer A, Pressmar J, Scharffetter-Kochanek K, Knöll B, Schrezenemeier H, Relja B, Kalbitz M (2019) Modeling trauma in rats: similarities to humans and potential pitfalls to consider. *J Transl Med* 17:305

183. Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, Cooke JP (2002) Statins Have Biphasic Effects on Angiogenesis. *Circulation* 105:739–745
184. Williams JN, Li Y, Valiya Kambrath A, Sankar U (2018) The Generation of Closed Femoral Fractures in Mice: A Model to Study Bone Healing. *J Vis Exp* 138:58122
185. Yousefzadeh N, Kashfi K, Jeddi S, Ghasemi A (2020) Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide. *EXCLI J* 19:89–107
186. Yu W-L, Sun T-W, Qi C, Zhao H-K, Ding Z-Y, Zhang Z-W, Sun B-B, Shen J, Chen F, Zhu Y-J, Chen D-Y, He Y-H (2017) Enhanced osteogenesis and angiogenesis by mesoporous hydroxyapatite microspheres-derived simvastatin sustained release system for superior bone regeneration. *Sci Rep* 7:44129
187. Yueyi C, Xiaoguang H, Jingying W, Quansheng S, Jie T, Xin F, Yingsheng X, Chunli S (2013) Calvarial defect healing by recruitment of autogenous osteogenic stem cells using locally applied simvastatin. *Biomaterials* 34:9373–9380
188. Zhang L, Liu X, Tian F, Zhang H, Han D (2011) Effects of simvastatin on bone formation relative factors of trabecular bone and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in young rats. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery* 25:155–159
189. Zhao G, Huang B-L, Rigueur D, Wang W, Bhoot C, Charles KR, Baek J, Mohan S, Jiang J, Lyons KM (2018) CYR61/CCN1 Regulates Sclerostin Levels and Bone Maintenance. *J Bone Miner Res* 33:1076–1089
190. Zhou X, von der Mark K, Henry S, Norton W, Adams H, de Crombrughe B (2014) Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice. *PLoS Genet* 10:e1004820
191. Zhu X-Y, Daghini E, Chade AR, Lavi R, Napoli C, Lerman A, Lerman LO (2008) Disparate effects of simvastatin on angiogenesis during hypoxia and inflammation. *Life Sci* 83:801–809

8 Abbildungsverzeichnis

1	Strukturformel von Simvastatin.....	18
2	Schema des Wirkmechanismus von Simvastatin in Anlehnung an Horiuchi et al.	19
3	MouseScrew™ (RISystem AG)	30
4	Hautschnitt medial der Patella an der Oberschenkelinnenseite.....	33
5	Darstellung der A. profunda femoris am Tierkadaver.....	33
6	Schematische Darstellung der Lokalisation der Ligatur	33
7	Durchzug der Ligaturfäden unter der A. profunda femoris.....	33
8	Doppelte Ligatur der A. profunda femoris am Tierkadaver.....	33
9	Ligatur zur Induzierung einer milden Ischämie.....	33
10	Darstellung der Patellarsehne.....	34
11	Nach lateral luxierte Patella, Blick auf die Femukondylen.....	34
12	Eröffnung der Kortikalis mit einer 24 G Kanüle.....	34
13	27 G Kanüle zur Durchbohrung des Markraums.....	34
14	Führungsdraht.....	34
15	Lage des Führungsdrahts im Röntgen.....	34
16	Geschlossene Frakturierung des Femurs.....	35
17	Röntgenologische Kontrolle der Femurfraktur.....	35
18	Implantation der MouseScrew™ (RISystem AG) mittels Schraubendreher.....	35
19	Konus der Zugschraube interkondylär versenkt.....	35
20	Röntgenologische Kontrolle der Lage der Zugschraube.....	35
21	Refixation der Patellarsehne durch Einzelknopfnah.....	35
22	Hautnaht.....	36
23	Explantiertes Femur nach Einlage in Formalin.....	37
24	Positionierung eines gesunden Femurs in der 3-Punkt-Biegevorrichtung.....	38
25	Röntgenaufnahme beider Femora nach Explantation.....	39
26	Femur im longitudinalen sagittalen Schnitt (Safranin-O Färbung).....	42
27	Absolute Biegesteifigkeit der frakturierten Femora.....	46
28	Relative Biegesteifigkeit der frakturierten Femora.....	46
29	Absolute Biegesteifigkeit der unfrakturierten Femora.....	46
30	Röntgenologische Auswertung anhand des Goldberg-Scores.....	47

31	Röntgenaufnahme 5 Wochen postoperativ.....	47
32	Absolutes Knochenvolumen im Kallus.....	49
33	Relativer Knochenanteil am Gesamtkallusvolumen.....	49
34	Trabekelanzahl.....	49
35	Trabekelabstand.....	50
36	Trabekeldicke.....	50
37	Gesamtkallusfläche.....	51
38	Knochenanteil am Gesamtkallus.....	51
39	Knorpelanteil am Gesamtkallus.....	52
40	Bindegewebsanteil am Gesamtkallus.....	52
41	Expression von CD31 im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ.....	53
42	Expression von VEGF im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ.....	54
43	Expression von RANKL im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ.....	54
44	Expression von OPG im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ.....	54
45	Expression von BMP-2 im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ.....	55
46	Expression von BMP-4 im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ.....	55
47	Expression von Cyr-61 im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ.....	55
48	Expression von PI3K im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ.....	56

9 Tabellenverzeichnis

1	Effekte von Simvastatin.....	21
2	Nebenwirkungen von Simvastatin.....	25
3	Studiendesign.....	29
4	Schema Goldberg-Score je Kortikalis in seitlicher Röntgenaufnahme.....	38
5	Parameter der computertomographischen Analyse.....	40
6	Histomorphometrische Parameter.....	41
7	Berechnung histomorphometrischer Daten	41
8	Proteine und ihre generelle Funktion, deren Expression mittels Western Blot in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.....	43

10 Publikationen

Die vorliegende Arbeit wurde auf untenstehenden Kongressen präsentiert und ist als Abstract veröffentlicht:

Vorträge:

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, 24.-27. Oktober 2023, Berlin, Deutschland:

Finkler J, Stutz J, Fritz T, Bullinger Y, Pohlemann T, Laschke M W, Menger M, Orth M:
Einfluss von Simvastatin auf die Frakturheilung im murinen Ischämiemodell

141. Deutscher Chirurgie Kongress 2024, 24.-26. April 2024, Leipzig, Deutschland:

Stutz J, **Finkler J**, Fritz T, Bullinger Y, Pohlemann T, Laschke M W, Menger M, Orth M:
Einfluss von Simvastatin auf die Frakturheilung im murinen Ischämiemodell

11 Danksagung

Nachfolgend möchte ich meinen Dank aussprechen an alle, die mich beim Anfertigen dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. med. Marcel Orth, meinem Doktorvater, danke ich für die Vermittlung der Arbeit und der guten und ausführlichen konstruktiven Kritik, die mir sehr weitergeholfen hat.

Herrn Prof. Dr. med. Tim Pohlemann danke ich für die zahlreichen Ratschläge, insbesondere in Hinblick auf die Präsentation meines Themas.

Herrn Prof. Dr. med. Emmanouil Liodakis danke ich ebenfalls für seinen guten Rat und seine Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. Michael D. Menger und Herrn Prof. Dr. med. Matthias Laschke danke ich für die hilfreichen Tipps und für das Bereitstellen der Räumlichkeiten und Geräte zur Anfertigung meiner Arbeit.

Dr. med. Janine Stutz, meiner Betreuerin, danke ich für die Überlassung dieses Themas sowie der sehr guten Unterstützung und der ständigen Erreichbarkeit. Sie hat mir mit viel Geduld, die Methoden nähergebracht und war mir in allen Bereichen eine sehr große Hilfe.

Frau Dr. med. vet. Monika Frings und Frau Dr. med. vet. Christina Körbel danke ich für die Unterstützung und Beratung bezüglich der Umsetzung der Tierversuche.

Frau Dr. rer. med. Jeannette Rudzitis-Auth danke ich für ihre Hilfe vor allem beim Umgang mit technischen Gerätschaften.

Frau Janine Becker, Frau Sandra Hans und Frau Caroline Bickelmann danke ich für die einzigartige Zusammenarbeit bei der Erstellung der Western Blot Analyse und der histologischen Analyse.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie für die großartige Unterstützung, die geleistet wurde. Auch für die zahlreichen Tipps und insbesondere für das sehr angenehme Arbeitsklima bin ich dankbar.

Herrn Christian Schönbeck und Herrn Lukas Keller danke ich sehr für den regen Austausch von Erfahrungen sowie der großartigen Unterstützung und Zusammenarbeit. Beide waren stets eine große Hilfe.

Zuletzt ein großes Dankeschön an meine Familie. An meine Eltern dafür, dass sie mir dieses Studium ermöglicht haben und mich in jeder Phase meines Lebens unterstützen. Und an meine Schwester und meinen Schwager, die mir ebenfalls eine große Hilfe waren.

12 Lebenslauf

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