

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie

Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. med. Matthias Laschke

**Der Einfluss von Sildenafil und Cilostazol auf die Frakturheilung
in der alten Maus**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2025

vorgelegt von Maximilian Anton Emmerich,
geboren am 18.02.1997 in Freiburg im Breisgau

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Zusammenfassung	7
2. Summary	9
3. Einleitung	11
3.1. Knochen	11
3.1.1. Physiologie	11
3.1.2. Morphologie	12
3.1.3. Histologie	12
3.2. Frakturheilung	16
3.2.1. Primäre Frakturheilung	17
3.2.2. Sekundäre Frakturheilung	18
3.3. Auswirkungen von Alter auf die Frakturheilung	18
3.3.1. Auswirkungen von Alter auf die Osteogenese	19
3.3.2. Auswirkungen von Alter auf die Inflammation	20
3.3.3. Auswirkungen von Alter auf die Vaskularisierung	21
3.4. Sildenafil	22
3.4.1. Struktur	22
3.4.2. Anwendungsgebiete	22
3.4.3. Wirkungsweise	23
3.4.4. Pharmakokinetik	23
3.4.5. Nebenwirkungen und Kontraindikationen	24
3.4.6. Potenzial für die Frakturheilung	24
3.5. Cilostazol	25
3.5.1. Struktur	25
3.5.2. Anwendungsgebiete	26
3.5.3. Wirkungsweise	26
3.5.4. Pharmakokinetik	26
3.5.5. Nebenwirkungen und Kontraindikationen	27
3.5.6. Potenzial für die Frakturheilung	27
3.6. Fragestellung und Ziel der Studie	28

4. Material und Methoden	29
4.1. Versuchsprotokoll	29
4.2. MouseScrew TM	31
4.3. Chirurgischer Eingriff	31
4.4. Medikamentengabe	34
4.5. Tötung der Tiere	34
4.6. Abschließendes Röntgenbild	34
4.7. Entnahme und Konservierung der Femora	34
4.8. Biomechanik	35
4.9. μ CT	35
4.10. Histologie und Histomorphometrie	36
4.11. Immunhistochemie	38
4.12. Western Blot	39
4.13. Statistische Analyse	40
5. Ergebnisse Sildenafil	41
5.1. Röntgen	41
5.2. Biomechanik	42
5.3. μ CT	43
5.4. Histologie und Histomorphometrie	48
5.5. Immunhistochemie	52
5.6. Western Blot	55
6. Ergebnisse Cilostazol	59
6.1. Röntgen	59
6.2. Biomechanik	59
6.3. μ CT	61
6.4. Histologie und Histomorphometrie	66
6.5. Immunhistochemie	71
6.6. Western Blot	74

7. Diskussion	77
7.1. Diskussion der Methoden	77
7.2. Diskussion der Ergebnisse Sildenafil	82
7.3. Diskussion der Ergebnisse Cilostazol	85
8. Schlussfolgerungen	88
9. Literaturverzeichnis	89
10. Originalarbeiten zur Promotionsarbeit	99
11. Danksagung	100
12. Lebenslauf	101

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius
μA	Mikroampere
μCT	Mikrocomputertomographie
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
BMP-4	Bone morphogenetic protein 4
BMP-2	Bone morphogenetic protein 2
BMU	Basic multicellular unit
CaHA	Kalziumhydroxylapatit
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD31	Cluster of Differentiation 31
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
cm ³	Kubikzentimeter
CYR61	cysteinreiches Protein 61
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dB	Dezibel
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPO	Erythropoetin
et al.	et alteri
g	Gramm
G	Gauge
HDL	High Density Lipoprotein
HIF-1α	Hypoxie-induzierter Faktor-1α
HO-1	Hämoxygenase-1
HPF	High power field
IGF	Insulin-like growth factor
IgG	Immunglobulin G
i.p.	intraperitoneal
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kV	Kilovolt
mg	Milligramm

MHz	Megahertz
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mm ³	Kubikmillimeter
mM	Millimol
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MPO	Myeloperoxidase
ms	Millisekunde
MW	Mittelwert
n	Anzahl
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
OP	Operation
OPG	Osteoprotegerin
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PDGF	Platelet-derived growth factor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PTH	Parathormon
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
ROI	Region of interest
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
TGF	Transforming growth factor
TRAP	Tartratesistente saure Phosphatase
Tab.	Tabelle
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VOI	Volume of interest
z.b.	zum Beispiel

1 Zusammenfassung

Der demografische Wandel unserer Gesellschaft bedingt, dass die Medizin der Zukunft noch stärker von älteren Patienten geprägt sein wird, als dies schon in der Gegenwart der Fall ist. Da im Alter eine geringere Heilungskapazität besteht und Frakturen mit einer höheren Mortalität assoziiert sind, ist es von besonderem Interesse, diese fachgerecht behandeln zu können. Viele Faktoren können zur Verschlechterung der Knochenregeneration im Alter beitragen, darunter eine verringerte Angiogenese, eine beeinträchtigte Entzündungsregulierung sowie weitere negative Auswirkungen des Alters auf eine Vielzahl molekularer und zellulärer Prozesse. In der vorliegenden Studie werden zum ersten Mal die Auswirkungen von Sildenafil und Cilostazol auf die Frakturheilung bei älteren Mäusen unter Verwendung eines Modells für geschlossene Femurfrakturen untersucht.

Sildenafil hemmt die Phosphodiesterase-5 und wird sehr häufig bei erektiler Dysfunktion eingesetzt. Zudem ist es auch zur Therapie der pulmonalarteriellen Hypertonie zugelassen. Darüber hinaus konnte in vorherigen Studien gezeigt werden, dass Sildenafil die Angiogenese und die Knochenneubildung fördert.

Cilostazol ist ein Hemmstoff der Phosphodiesterase-3 und für die Therapie der pAVK im Stadium II zugelassen. Der Wirkstoff besitzt unter anderem thrombozytenaggregationshemmende Eigenschaften und hat, ähnlich wie Sildenafil, in präklinischen Studien proangiogene und proosteogene Wirkungen gezeigt.

Für die Studie wurde bei alten CD-1-Mäusen (Alter: 16-18 Monate) in Narkose mithilfe einer Guillotine eine geschlossene Fraktur des Femurs verursacht und diese durch Einbringen der Mouse ScrewTM osteosynthetisch versorgt.

Für den ersten Studienabschnitt wurde eine Sildenafilgruppe (n=21) und eine Kontrollgruppe (n=21) gebildet. Die Tiere erhielten postoperativ täglich in der Sildenafilgruppe 5 mg/kg KG Sildenafil und in der Kontrollgruppe 0,9%ige NaCl-Lösung über eine Magensonde oral verabreicht.

Für den zweiten Studienabschnitt wurde eine Cilostazolgruppe (n=21) und eine Kontrollgruppe (n=21) gebildet. Die Tiere erhielten postoperativ täglich in der Cilostazolgruppe 30 mg/kg KG Cilostazol und in der Kontrollgruppe 0,9%ige NaCl-Lösung über eine Magensonde oral verabreicht.

Nach 2 und 5 Wochen Versuchszeit wurden die Tiere getötet und ihre Femora für röntgenologische, biomechanische, mikrocomputertomographische, histologische und immunhistochemische

Untersuchungen verwendet. Zudem wurden nach 2 Wochen proteinbiochemische Analysen mittels Western Blot durchgeführt.

Die durchgeführten Analysen zeigen, dass bei den mit Sildenafil behandelten Mäusen das Knochenvolumen und das Verhältnis von Kallus zu Durchmesser des Femurs 5 Wochen nach der Fraktur im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant zunahm. Dies ging mit einer verringerten Anzahl von Osteoklasten sowie einer erhöhten Expression von Osteoprotegerin (OPG) und einer verringerten Expression des Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) einher. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Sildenafil die Frakturheilung im Alter nicht verbessert, sondern den Prozess des Knochenumbaus verzögert, was höchstwahrscheinlich auf eine geringere Anzahl und Aktivität von Osteoklasten im Kallusgewebe zurückzuführen ist.

Bei den mit Cilostazol behandelten Tieren zeigen die Ergebnisse im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikant erhöhte Biegesteifigkeit nach 2 Wochen und eine verstärkte Knochenbildung nach 5 Wochen. Dies ging mit einer höheren Anzahl neu gebildeter CD31-positiver Mikrogefäße sowie einer erhöhten Expression von Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) im Kallusgewebe einher. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cilostazol die Frakturheilung bei alten Mäusen beschleunigt, indem es die Angiogenese und die Expression von PI3K und RUNX2 stimuliert. Daher könnte Cilostazol ein vielversprechender Wirkstoff zur Förderung der Knochenheilung nach Frakturen im Alter sein.

2 Summary

The demographic changes in our society lead to a steadily increasing number of geriatric patients. Lower bone healing capacity and fractures in aged are associated with higher mortality when compared to young adults. Therefore, geriatric patients represent a major challenge for our health care system. Many factors may contribute to the deterioration of bone regeneration in the elderly, including reduced angiogenesis, impaired inflammatory regulation and other negative effects of age on a variety of molecular and cellular processes. In our study, we investigated the effects of sildenafil and cilostazol on fracture healing in old mice using a model of closed femur fractures.

Sildenafil is a phosphodiesterase-5 inhibitor. It is commonly used for treating erectile dysfunction and is also approved for the treatment of pulmonary arterial hypertension. In addition, previous experimental studies have shown that sildenafil promotes angiogenesis and bone formation.

Cilostazol is a phosphodiesterase-3 inhibitor and is approved for the treatment of stage II peripheral artery disease. Moreover, the drug has antiplatelet properties and demonstrates pro-angiogenic and pro-osteogenic effects in preclinical studies.

For the present study, a fracture of the femur was induced in aged CD-1 mice (age: 16-18 months) under anesthesia using a 3-point bending device. The fracture was stabilized by inserting a MouseScrewTM-Implant.

In the first part of the study, the sildenafil group (n=21) was compared with a control group (n=21). After fracture, the animals received 5 mg/kg body weight sildenafil in the sildenafil group and 0.9% NaCl solution in the control group orally by gavage daily.

In the second part of the study, the cilostazol group (n=21) was compared with a control group (n=21) respectively. After fracture, the animals received 30 mg/kg bodyweight cilostazol in the cilostazol group and 0.9% NaCl solution in the control group orally by gavage daily.

At 2 and 5 weeks after surgery, the animals were sacrificed and the femora were used for radiological, biomechanical, microcomputertomographic, histologic and immunohistochemical examinations. In addition, proteinbiochemical analyses were performed at 2 weeks after surgery by Western blotting.

The analysis of the first part of the study revealed a significantly increased bone volume and higher ratio of callus to femora bone diameter at 5 weeks after fracture in sildenafil-treated mice when compared to controls. This was associated with a reduced number of osteoclasts as well as an elevated expression of

osteoprotegerin (OPG) and a reduced expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). These findings indicate that sildenafil does not improve fracture healing in the elderly but delays the process of bone remodeling, most likely due to a reduced number and activity of osteoclasts within the callus tissue.

The analysis of the second part of the study showed a significantly increased bending stiffness at 2 weeks and an increased bone formation at 5 weeks after surgery in cilostazol-treated animals compared with controls. This was associated with a higher number of newly formed CD31-positive microvessels and an increased expression of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and runt-related transcription factor 2 (RUNX2) within the callus tissue. These results suggest that cilostazol accelerates fracture healing in aged mice by stimulating angiogenesis and the expression of PI3K and RUNX2. Therefore, cilostazol may be a promising agent to promote bone healing after fractures in the elderly.

3 Einleitung

3.1 Knochen

3.1.1 Physiologie

Menschlicher Knochen zeichnet sich durch seine hohe Festigkeit bei gleichzeitig geringer Elastizität, vergleichsweise geringem Bedarf an Nährstoffen sowie erstaunlich niedrigem Gewicht aus. Durch das geringe Gewicht von Knochengewebe müssen wir bei Bewegungen verhältnismäßig wenig Kraft aufwenden, was vor allem durch die spezielle Bauweise von Lamellenknochen ermöglicht wird. Hierbei sind die einzelnen Trabekel nach den Spannungslinien der größten Zugbelastung und Druckbelastung angeordnet [4].

Das Knochengewebe erfüllt vielfältige Aufgaben: Die Knochen werden dem passiven Bewegungsapparat zugerechnet und übernehmen wichtige Stützfunktionen im Körper. Sie sind dabei untereinander durch Bindegewebelemente verbunden und werden vom aktiven Bewegungsapparat, den Skelettmuskeln, bewegt. Verschiedene Organe des Thorax sind durch Rippen sowie das Gehirn durch Schädelknochen geschützt.

Auch bei der Hämatogenese spielen die Knochen eine wichtige Rolle. Bei Erwachsenen erfolgt die Blutbildung größtenteils im roten (blutbildenden) Knochenmark. Während im Kindesalter ausschließlich rotes Knochenmark vorhanden ist, wird dieses später in den meisten Knochen durch gelbes (fettspeicherndes) Mark ersetzt. Enthalten ist rotes Knochenmark bei Erwachsenen beispielsweise noch in den Rippen, in den Wirbelkörpern, im Sternum oder im Os ilium [76].

Knochen stellt darüber hinaus das wichtigste Kalziumdepot des menschlichen Körpers dar, so sind im Knochen etwa 99% des Kalziums gespeichert [57]. Darüber hinaus spielt Knochengewebe auch eine Rolle beim Speichern sowie bei der Abgabe von Wachstumshormonen [9].

Knochen ist in der Lage seine Form zu ändern und dadurch auf wechselnde Belastungen zu reagieren, was einer funktionellen Adaption entspricht und auch als Modeling bezeichnet wird. Veränderungen durch Modeling entstehen größtenteils während des Wachstums und sind mit zunehmendem Alter rückläufig [24]. Das Remodeling ist entscheidend für eine Anpassung des Knochens an veränderte biomechanische Belastungen, wie sie durch vermehrte sportliche Betätigung oder eine Zunahme an Körpergewicht entstehen können. Beim Menschen kommt es pro Jahr zu einem Umbau von etwa 10% des Knochengewebes, der gesamte Prozess dauert dabei mehrere Monate [129].

3.1.2 Morphologie

Folgende verschiedene Knochenformen werden unterschieden:

- Röhrenknochen = Ossa longa, z.b. Os humeri (Oberarmknochen)
- kurze Knochen = Ossa brevia, z.b. Ossa carpi (Handwurzelknochen)
- platte Knochen = Ossa plana, z.b. Cranium (Schädelknochen)
- belüftete Knochen = Ossa pneumatica, z.b. Cavum tympani (Paukenhöhle)
- unregelmäßige Knochen = Ossa irregularia, z.b. Corpus vertebrae (Wirbelkörper)

Bei den Röhrenknochen (Ossa longa) lassen sich unterschiedliche Abschnitte voneinander abgrenzen: Die gelenknahen Anteile bilden proximal und distal die Epiphysen, welche über die Metaphysen mit der Diaphyse verbunden sind (siehe Abb. 1). In den metaphysären Arealen besitzt der Knochen die Fähigkeit, in die Länge zu wachsen. Im Inneren der Diaphyse findet man die Markhöhle des Knochens [4].

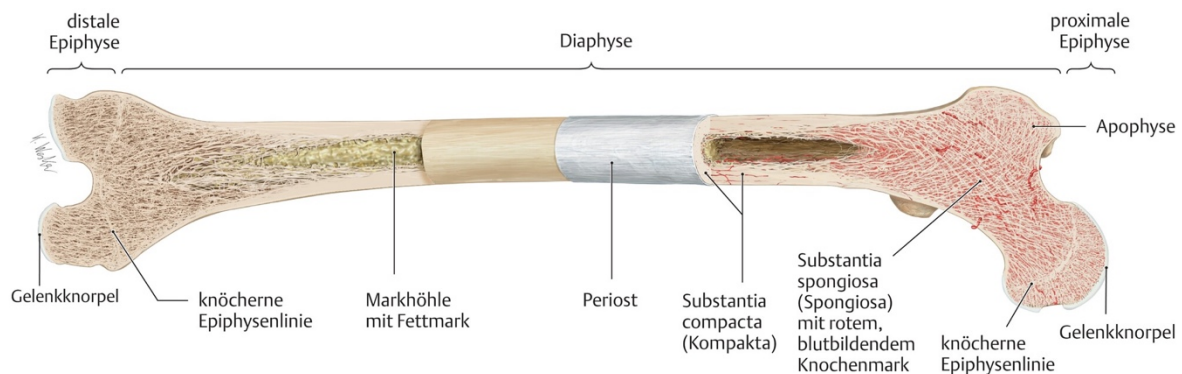


Abb. 1: Aufbau eines typischen Röhrenknochens am Beispiel des Femurs; aus: Schünke M, Schulte E, Schumacher U (2014) Prometheus LernAtlas der Anatomie, 4th ed., Thieme, Stuttgart

Unter den menschlichen Knochen verfügt das Femur über die größte Länge und Stärke. Die Gesamtgröße eines Menschen wird zu etwa einem Viertel von der Länge des Femurs bestimmt. Am häufigsten frakturieren die Femora von Jungen, die jünger als 10 Jahre alt sind sowie die Femora von Frauen, die bereits älter als 80 Jahre sind [72]. Weitere Analysen der Bauweise konnten zeigen, dass zwischen den Femora von Mäusen und den Femora von Menschen große Ähnlichkeiten bestehen [5].

3.1.3 Histologie

Knochen ist an den Außenseiten mit Ausnahme der Gelenkflächen durch das Periost (Knochenhaut) bedeckt, welches sich in ein äußeres Stratum fibrosum und ein inneres Stratum osteogenicum unterteilen

lässt. Das Periost ist gefäßreich und zeichnet sich aufgrund seiner Innervation durch eine ausgesprochene Schmerzempfindlichkeit aus. Von innen wird Knochen durch Endost ausgekleidet, welches eine Begrenzung für die Knochenkanälchen und Spongiosabälkchen darstellt [4]. Das Stratum fibrosum des Periosts ist über Kollagenfaserbündel, die auch als Sharpey-Fasern bezeichnet werden, mit der Substantia compacta des Knochens verbunden. Gleichzeitig sind Knochenanteile über das Stratum fibrosum mit den Sehnen von Muskeln verbunden [68,56]. Der Knochen lässt sich makroskopisch in eine außen gelegene Substantia compacta (auch Substantia corticalis), die sich innen an das Periost anschließt, und eine innen gelegene Substantia spongiosa unterteilen. Die Substantia compacta besteht aus Lamellen und Osteonen. Die Substantia spongiosa ist ein schwammartiges System aus kleinen Knochenbalken, hier findet sich in den Zwischenräumen Platz für das Knochenmark [128].

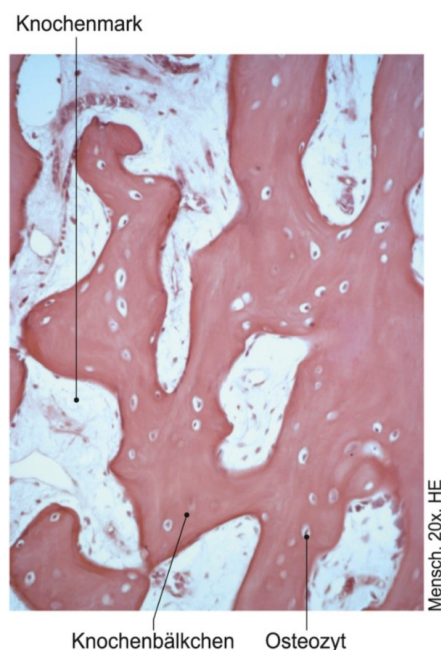


Abb. 2: Geflechtknochen; aus: Wennemuth G (2017) Taschenbuch Histologie., 2nd ed., Elsevier, München

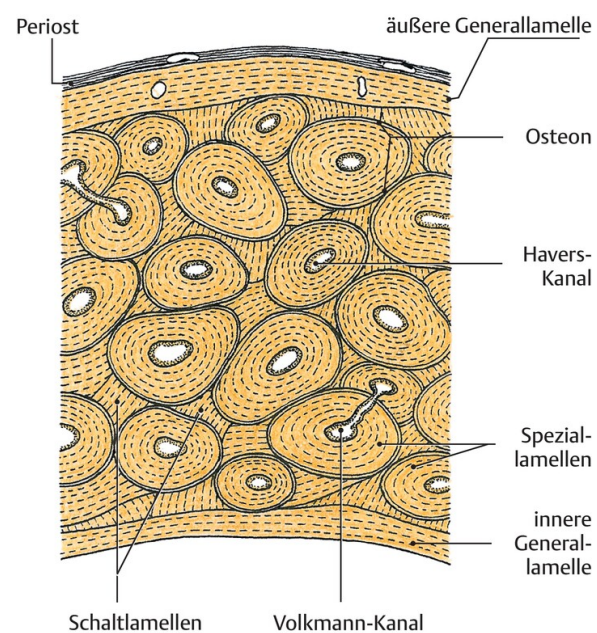


Abb. 3: Schematischer Aufbau des Lamellenknochens aus: Ulfig N (2017) Kurzlehrbuch Histologie, 5th ed., Thieme, Stuttgart

Es lassen sich mit Geflechtknochen und Lamellenknochen zwei Knochenarten unterscheiden. Der Geflechtknochen (siehe Abb. 2) wird auch als primärer oder unreifer Knochen bezeichnet und zeigt eine ungeordnete Bauweise mit einer großen Anzahl an Zellen. Diese Knochenart entwickelt sich in der Fetalzeit ausgehend von mesenchymalem Bindegewebe sowie während des Knochenwachstums durch desmale Ossifikation aus der Knochenhaut. Wenn ein Knochen bricht, kommt es zunächst zur Ausbildung von Geflechtknochen, welcher dann im Laufe der Zeit durch Lamellenknochen ersetzt wird. Der Lamellenknochen oder sekundäre Knochen entwickelt sich dabei durch Remodeling im Anschluss nach dem Abbau des Geflechtknochens [4]. Für das Remodeling verantwortlich sind die basic multicellular units. Diese enthalten Endothelzellen zur Orchestrierung des Umbaus, Osteoklasten zur Etablierung eines Bohrkanals sowie Osteoblasten zur Produktion von Osteoid, woraus neue Osteone

gebildet werden. Der Lamellenknochen (siehe Abb. 3) ist durch eine besondere Formation der Kollagenfibrillen in verschiedenen Lamellensystemen gekennzeichnet. Hier unterscheidet man Generallamellen, Speziallamellen und Schaltlamellen. Die Generallamellen verlaufen parallel zur Oberfläche. Die äußere Generallamelle liegt an der Grenze zum Periost, wohingegen die innere Generallamelle am Übergang zur Substantia spongiosa liegt. Die Schaltlamellen enthalten keine Blutgefäße und bestehen aus Resten von älteren Osteonen. Die Speziallamellen sind als Komponenten der Osteone zu verstehen, während die Schaltlamellen zwischen den Osteonen liegen. Ein Osteon setzt sich zusammen aus einem mittig gelegenen Havers-Kanal, der Blutgefäße enthält, und ringförmig um diesen Kanal verlaufenden 4 bis 30 Speziallamellen aus sich schraubenförmig hinziehenden Kollagenfibrillen. Die Osteone sind nach Außen durch eine Kittlinie begrenzt, die viele Proteoglykane enthält. Zwischen den Lamellen befinden sich die Lakunen, in denen die Zellkörper der Osteozyten liegen. Die Lakunen sind über eine Vielzahl von kleinen Canaliculi, die die Zellfortsätze der Osteozyten enthalten, mit den Lamellen und den Havers-Kanälen verbunden. Die Havers-Kanäle erstrecken sich in der Regel wie die zugehörigen Osteone längs zum Knochen. Demgegenüber verbinden quer führende Volkmann-Kanäle die Gefäße der Havers-Kanäle untereinander sowie mit den Gefäßen der Knochenhaut [124]. Knochen setzt sich zusammen aus etwa 30% organischer Knochensubstanz und etwa 70% anorganischer Knochensubstanz sowie Zellen mit verschiedenen Funktionen. Der organische Anteil besteht dabei zu 95% aus Kollagen Typ 1 und zu 5% aus nichtkollagenen Proteinen. Die anorganische Knochensubstanz besteht zu 95% aus Hydroxylapatit sowie zu 5% aus Magnesiumfluoriden, Natriumfluoriden, Kaliumfluoriden und Chloriden [23]. Unter den verschiedenen Zelltypen des Knochengewebes unterscheidet man Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten.

Die Osteoblasten entwickeln sich aus mesenchymalen Progenitorzellen und sind für die Neubildung von Knochen verantwortlich, indem sie Kollagenfibrillen produzieren und die Mineralisation regulieren. Auch sind Osteoblasten in der Lage, die Aktivität der Osteoklasten zu steuern. Die Osteoblasten liegen den Knochenbälkchen auf und produzieren unverkalkte Knochengrundsubstanz, das Osteoid [129]. Die Mineralisation und Aushärtung des Osteoids wird anschließend durch die Einlagerung von Hydroxylapatitkristallen im Zusammenspiel mit alkalischer Phosphatase und weiteren Proteinen vermittelt [56]. Während ein Großteil der Osteoblasten nach abgeschlossener Produktion von Knochengrundsubstanz durch Apoptose abgebaut wird, werden einige inaktiviert oder differenzieren zu Osteozyten, wenn sie sich durch das andauernde Sezernieren von Osteoid eingemauert haben [77]. Die Osteozyten stellen den mit Abstand häufigsten Zelltyp unter den Knochenzellen dar und können untereinander über gap junctions ihrer in den Canaliculi verlaufenden Zellfortsätze miteinander kommunizieren. Bestehen neue mechanische Reize oder sind Reparaturen benötigt, werden die dafür notwendigen Prozesse durch Osteozyten herbeigeführt. Die Osteoklasten sind Bestandteil des mononukleären Phagozytensystems und dafür zuständig, Knochenmatrix abzubauen. Sie besitzen teilweise über 10 Kerne und eine große Anzahl an Lysosomen, in denen die knochenmatrixabbauenden

Enzyme gespeichert sind. Sie sind auffallend azidophil und enthalten viele Mitochondrien. Aktivierte Osteoklasten befinden sich auf von ihnen abzubauenen Knochensubstanz und verursachen dort Defekte, die in der Substantia compacta als Bohrkanäle und in der Substantia spongiosa als Howship-Lakunen bezeichnet werden [129]. Die Osteoklasten stammen von hämatopoetischen Stammzellen ab und können einen Durchmesser von bis zu 100 µm aufweisen [77].

Die Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten wird mithilfe der Peptidhormone Calcitonin und Parathormon reguliert. Calcitonin entsteht in den parafollikulären C-Zellen der Schilddrüse und führt zu einer Erniedrigung des Calciumspiegels im Blut. Bei den Osteoklasten wird calcitoninrezeptorvermittelt deren cAMP-Proteinkinase A aktiviert, was zu einer Hemmung der Aktivität der Osteoklasten führt [131]. Außerdem werden die Osteoblasten durch Calcitonin angeregt, in den Knochen Calciumphosphatsalze einzufügen. Das Parathormon wird von den Epithelkörperchen der Nebenschilddrüsen sezerniert, wenn es zu einer Erniedrigung des Calciumspiegels im Blut kommt. Durch Aktivierung eines Faktors, der zur Differenzierung der Osteoklasten beiträgt, werden diese in ihrer Aktivität gesteigert und lösen vermehrt Calciumsalze aus dem Knochen heraus, wodurch der Calciumspiegel im Blut wieder ansteigt. Da es durch die Osteoklastenaktivität über einen längeren Zeitraum zu einem zu starken Knochenabbau kommen würde, regt das Parathormon die Freisetzung von Calcitriol an, was wiederum eine verstärkte Mineralisation des Knochens zur Folge hat [53].

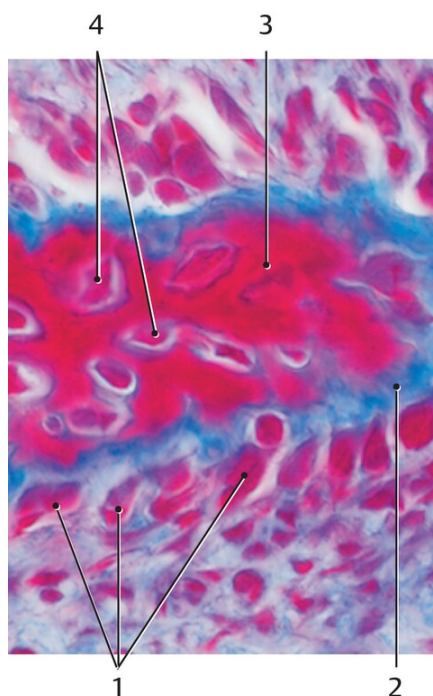


Abb. 4: Desmale Ossifikation (Azan) mit Osteozyten (1), unverkalktem Osteoid (2), verkalktem Osteoid (3) und eingemauerten Osteozyten (4); aus: Ulfing N (2017) Kurzlehrbuch Histologie, 5th ed., Thieme, Stuttgart

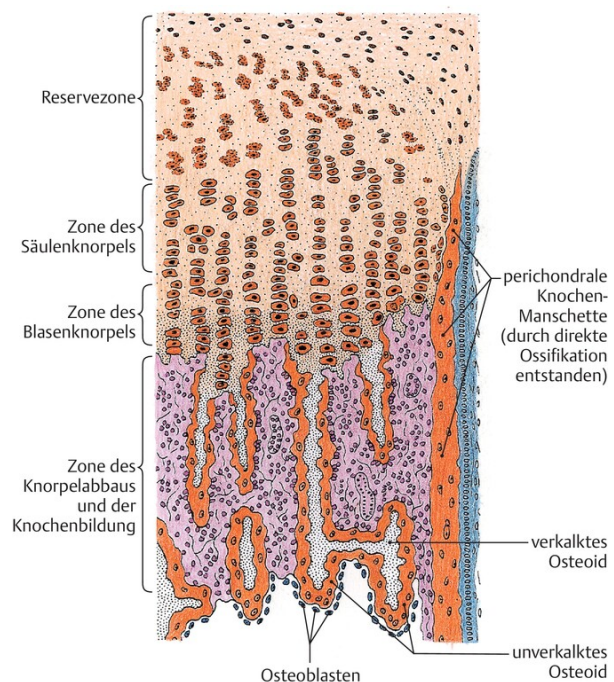


Abb. 5: Schema der enchondralen Ossifikation; aus: Ulfing N (2017) Kurzlehrbuch Histologie, 5th ed., Thieme, Stuttgart

Es existieren zwei unterschiedliche Arten der Knochenbildung, nämlich die desmale (direkte) und die chondrale (indirekte) Ossifikation. Im Rahmen der desmalen Ossifikation (siehe Abb. 4) entwickelt sich der Knochen direkt aus mesenchymalen Zellen. Hierbei entwickeln sich die mesenchymalen Zellen über eine Zwischenstufe, die Vorläuferzellen, zu Osteoblasten. Die Osteoblasten produzieren Osteoid, sodass nach anschließend erfolgreicher Mineralisation neues Knochengewebe entsteht. Der Knochen wächst dadurch, dass sich außen an neu gebildetes Knochengewebe wieder Osteoblasten anlagern, die dort wiederum Osteoid produzieren. Diese Form des Wachstums bezeichnet man auch als appositionelles Wachstum. Bei der chondralen Ossifikation entsteht zunächst ein Gerüst aus Knorpelgewebe, welches im Verlauf durch Knochengewebe ersetzt wird. Man differenziert im Rahmen der chondralen Ossifikation zwischen zwei sich zeitlich überlappenden Prozessen, der außen stattfindenden perichondralen Ossifikation und der innen stattfindenden enchondralen Ossifikation.

Im Rahmen der perichondralen Ossifikation entwickeln sich in der Diaphyse perichondrale Zellen zu Osteoblasten, welche eine knöcherne Manschette um die noch aus Knorpel bestehende Diaphyse formen. Dieser Prozess ähnelt somit der desmalen Ossifikation [124]. Während der enchondralen Ossifikation hypertrophieren die Knorpelzellen im Inneren des Knorpelgerüsts und es entstehen Verkalkungsherde, in die Blutgefäße einwachsen. Mit den Blutgefäßen kommt es auch zur Einwanderung von mesenchymalen Zellen in die Verkalkungsherde, die sich zu Osteoblasten, Osteoklasten oder Chondroklasten entwickeln. Während die Osteoklasten mit dem Abbau von Verkalkungsherden beschäftigt sind, tragen die Osteoblasten zur Knochenbildung bei [124]. Im Bereich zwischen Diaphyse und Epiphyse befindet sich die Umbauzone der enchondralen Ossifikation (siehe Abb. 5), wobei sich hier ausgehend von der Epiphyse verschiedene Zonen unterscheiden lassen: Die Reservezone enthält hyaline Knorpelzellen. In der Proliferationszone befinden sich Knorpelzellen, die sich mit hoher Frequenz teilen und sich längs zur Verlaufsrichtung des Knochens in Säulen anordnen. Die Resorptionszone (auch Hypertrophiezone) enthält große Blasenknorpelzellen sowie einzelne Kalkeinlagerungen. In der Eröffnungszone kommt es zum Abbau von Knorpelgewebe durch Chondroklasten, gleichzeitig sterben Knorpelzellen ab und es entstehen Verkalkungen. In der Verknöcherungszone liegen Osteoblasten auf verkalkten Knorpelbälkchen auf und sorgen dort für die Entstehung von neuem Knochengewebe [111].

3.2 Frakturheilung

Damit die Frakturheilung ungehindert ablaufen kann, ist es wichtig, dass die Bruchstücke gut durchblutet sind. Außerdem sind Ruhigstellung sowie eine adäquate Berührung der Knochenfragmente untereinander unerlässlich für eine suffiziente Frakturheilung. Besteht ein zu großes Maß an interfragmentärer Bewegung, können Pseudoarthrosen entstehen. Demgegenüber steht bei zu geringer

Bewegung zwischen den Bruchstücken bedingt durch fehlenden physiologischen Reiz die Möglichkeit einer verlangsamten Frakturheilung. Man unterscheidet die direkte (primäre) Frakturheilung von der indirekten (sekundären) Frakturheilung [95].

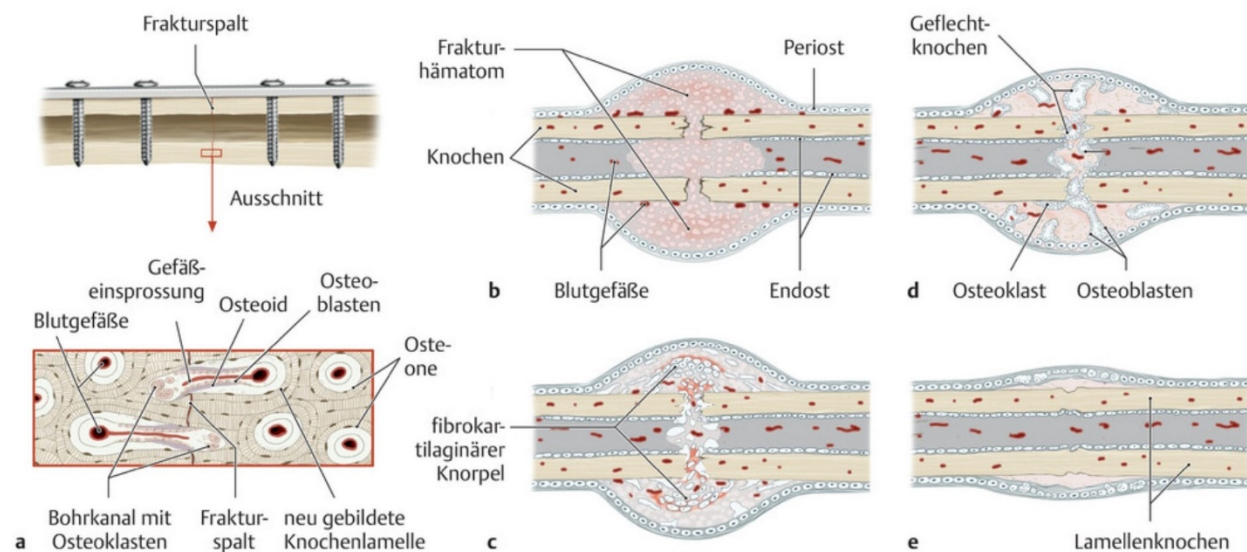


Abb. 6: Direkte (a) und indirekte Frakturheilung (b-e) mit initialer Verletzungsphase (b), Entzündungsphase (c), Phase der Kallushärtung (d) und Remodeling-Phase (e); aus: Niethard F, Pfeil J, Biberthaler P (2022) Duale Reihe Orthopädie und Unfallchirurgie, 9th ed., Thieme, Stuttgart

3.2.1 Primäre Frakturheilung

Im Rahmen der direkten (primären) Frakturheilung (siehe Abb. 6 a) läuft die Knochenheilung ohne Bildung von Kallus ab. Dafür besteht die Notwendigkeit einer konstanten Fixierung der Knochenbruchstücke, wodurch die Osteone in der Lage sind, den Bruchspalt direkt zu überbrücken. Im Rahmen der direkten Frakturheilung unterscheidet man die Spaltheilung von der Kontaktheilung. Von Spaltheilung spricht man hier, wenn zwischen den Bruchstücken kleine Defekte mit Geflechtknochen gefüllt werden. Nachdem sich in diesen Defekten Geflechtknochen entwickelt hat, wird dieser langsam zu Lamellenknochen umgebaut und damit die ursprüngliche Knochenstruktur wiederhergestellt. Demgegenüber steht die Kontaktheilung, die möglich ist für den Fall, dass der Abstand zwischen den Knochenbruchstücken eine Länge von 0,01 mm nicht überschreitet. Durch den geringen Abstand sind die Osteone in der Lage durch direkte Bildung von Lamellenknochen in das gegenüberliegende Knochenbruchstück einzusprießen und so die Kontinuität des Knochens wiederherzustellen [33,79]. Die direkte Frakturheilung findet man beispielsweise bei Fissuren oder bei einer Frakturbehandlung mittels Plattenosteosynthesen.

3.2.2 Sekundäre Frakturheilung

Die indirekte (sekundäre) Frakturheilung (siehe Abb. 6 b-e) findet weitaus häufiger statt als die primäre Frakturheilung und tritt beispielsweise bei einer Behandlung von Knochenbrüchen mit Fixateur externe oder Marknagelosteosynthese auf. Hierbei entsteht zu Beginn in der Verletzungsphase (siehe Abb. 6 b) ein Frakturhämatom. In der anschließenden Entzündungsphase (siehe Abb. 6 c), die etwa 3 bis 14 Tage dauert, wachsen Fibroblasten in das Hämatom ein und es bildet sich ein Kallus aus Bindegewebe. Zusätzlich kommt es zur Einwanderung von Monozyten, Granulozyten und Mastzellen sowie zur Sezernierung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die für die spätere Gefäßneubildung und Zellentwicklung von großer Bedeutung sind.

An der Kallusentwicklung sind Wachstumsfaktoren beteiligt wie beispielsweise insulin-like growth factor (IGF), bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) platelet-derived growth factor (PDGF) oder transforming growth factor (TGF). Zusätzlich spielt die Sezernierung von Matrixproteinen durch Makrophagen eine wichtige Rolle sowie der Umstand, dass sowohl Fibroblasten als auch Osteoblasten vermehrt Kollagen Typ 1 bilden. Anschließend folgt die Phase der Kallushärtung (siehe Abb. 6 d), hier bildet sich innerhalb von Wochen bis Monaten ein Kallus aus Geflechtknochen, der den vorher bestehenden bindegewebigen Kallus ersetzt. In der abschließenden Phase des Remodeling (siehe Abb. 6 e) wird der Geflechtknochen über eine Dauer von etwa 1 bis 2 Jahren zu Lamellenknochen umgebaut. Dies geht mit Wiederherstellung der medullären Gefäße, der Anpassung der Knochenstruktur an die mechanischen Belastungen und dem Abbau von überflüssigem Kallusgewebe einher [95,105,115].

3.3 Auswirkungen von Alter auf die Frakturheilung

Die Gesellschaft in Deutschland wird immer älter, bedingt vor allem durch die geburtenstarken Jahrgänge von 1955 bis 1969 und die steigende Lebenserwartung [64]. Aufgrund dieser Entwicklung wird die Medizin in Zukunft mit deutlich mehr älteren Patienten und ihren Gesundheitsbedürfnissen konfrontiert sein. Darum ist ein besseres Verständnis der mit dem Altern einhergehenden physiologischen Veränderungen und medizinischen Besonderheiten wichtig. Im Alter können verschiedene Veränderungen zu einer schlechteren Frakturheilung beitragen (siehe Abb. 7). Knochenbrüche werden bei älteren Menschen häufig beobachtet, und Frakturen sind mit einer hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrate verbunden [13,130].

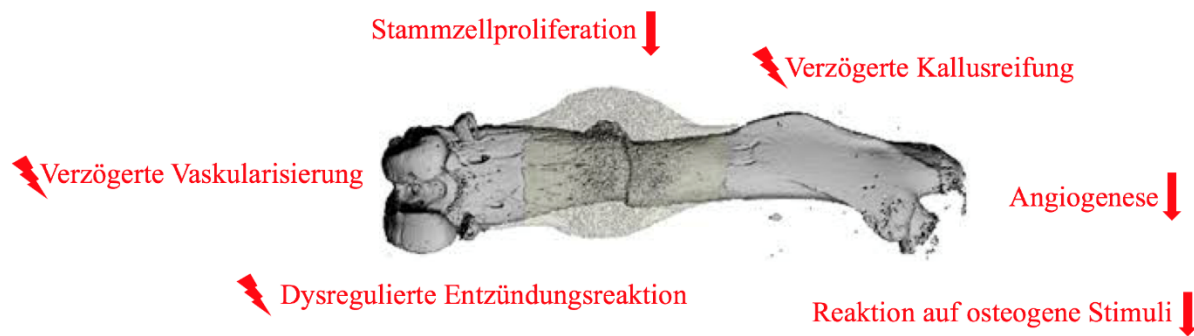


Abb. 7: Ausgewählte Auswirkungen von Alter auf die Frakturheilung, modifiziert nach <https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSrSMcJ27YtZpyCFXv79m4xX688g8NNNPYOQw&usqp=CAU>, zuletzt aufgerufen am 10.3.2024

Bei den meisten gesunden Erwachsenen beeinträchtigt die mit der Frakturheilung verbundene Immobilität die Lebenserwartung der Patienten nicht wesentlich, bei älteren Patienten ist im Gegensatz dazu die für die Frakturheilung erforderliche Rekonvaleszenzzeit eine wesentliche Ursache für die Morbidität und Mortalität nach einem Trauma [30,104]. Ältere Menschen haben nicht nur ein höheres Risiko für Knochenbrüche und weisen eine höhere Mortalität auf, sondern besitzen auch geringere Fähigkeiten zur Knochenregeneration [13,86]. Dies kann zu einer verzögerten Knochenheilung sowie zur Bildung von Pseudoarthrosen führen, was für die betroffenen Patienten mit einem erheblichen Funktionsverlust und umfangreichen Revisionseingriffen verbunden ist [85]. Forschung über den Heilungsprozess von Knochenbrüchen in höherem Alter ist somit von großer Wichtigkeit. Mit fundiertem Verständnis darüber, wie sich der Prozess der Frakturheilung mit dem Alter verändert, lassen sich neue therapeutische Optionen entwickeln, die zur Verbesserung der Frakturheilung bei älteren Menschen genutzt werden können. Findet man Möglichkeiten, wie sich die Frakturheilung bei älteren Menschen verbessern und beschleunigen lässt, lassen sich so auch die Morbiditäts- und Mortalitätsraten senken.

3.3.1 Auswirkungen von Alter auf die Osteogenese

In zahlreichen Studien mit Mausmodellen wurde bereits über eine verzögerte Frakturheilung bei älteren Tieren berichtet. Dies ging mit einer verringerten Knorpel- und Knochenbildung, einer verzögerten Knorpelresorption und einer langsameren Mineralisierung innerhalb des Kallus einher [7,73,90]. Die verzögerte Knochenheilung kann auch mit altersbedingten Veränderungen der osteochondralen Stammzellen in Verbindung gebracht werden. So konnte nachgewiesen werden, dass eine Abnahme der osteochondralen Stammzellproliferation mit einer signifikanten Erniedrigung des Knochen- und Knorpelgehalts innerhalb des Frakturkallus von gealterten Mäusen im Vergleich zu jungen Tieren einhergeht [73]. In alten Mäusen konnte im Vergleich zu jungen Mäusen eine geringere Anzahl an

mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden, zudem zeigten die Stammzellen der alten Tiere auch eine reduzierte Proliferationsfähigkeit [94]. Frühere Studien haben gezeigt, dass das Alter bei Tieren einen entscheidenden Einfluss auf den Heilungsprozess von Knochenbrüchen hat und dass die für die Heilung erforderliche Zeit mit dem Alter zunimmt. Bei der Untersuchung des Einflusses von Alter auf Volumen, Mikrostruktur und Mineralisierung des Frakturkallus während der Knochenheilung bei Ratten wurde eine verzögerte Kallusreifung bei älteren Tieren festgestellt. Dies ging mit einer beeinträchtigten Kallusüberbrückung einher und wirkte sich negativ auf Mikrostruktur und Mineralisierung des Kallus aus. Außerdem ließ sich eine erhöhte Knochenresorption aufgrund einer höheren Anzahl von Osteoklasten feststellen [81]. Bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass Osteoblasten bei älteren Tieren eine verminderte Reaktion auf osteogene Stimuli zeigen und dass eine Verzögerung bei der Differenzierung und Reifung von Chondrozyten zu einer verzögerten endochondralen Ossifikation führt [74].

3.3.2 Auswirkungen von Alter auf die Inflammation

Altersbedingte Veränderungen wirken sich auf eine Vielzahl der biologischen Prozesse aus, die an der Frakturheilung beteiligt sind, so auch auf die Entzündungsreaktion. Wichtige Zellen der Entzündungsreaktion wie Makrophagen, T-Zellen und mesenchymale Stammzellen haben altersbedingte Veränderungen gezeigt, die die Frakturheilung beeinflussen könnten [17]. Gealterte Makrophagen scheinen sich negativ auf den Heilungsprozess auszuwirken. Wenn die Rekrutierung von Makrophagen an der Frakturstelle blockiert wird, zeigen ältere Mäuse eine bessere Frakturheilung. Im Gegensatz dazu hatte die Blockierung der Makrophagenrekrutierung an der Frakturstelle bei jungen Mäusen im selben Experiment einen negativen Effekt auf die Frakturheilung [117].

Mit zunehmendem Alter ist eine Abnahme der Thymusfunktion und der T-Zell-Produktion zu beobachten. Das Fehlen einer ausreichenden Menge an T-Zellen, die vom Thymus produziert werden, wirkt sich negativ auf die Fähigkeit aus, eine wirksame Immunreaktion einzuleiten. Darüber hinaus schränkt der Mangel an T-Zellen die Verfügbarkeit von regulatorischen T-Zellen ein, die benötigt werden, um die ausgelöste Immun- und Entzündungsreaktion zu beheben [38,119].

Die inflammatorische Phase ist ein wesentlicher Bestandteil der Frakturheilung, da mesenchymale Stammzellen in dieser Phase zur Frakturstelle geleitet werden [80]. Eine Störung der inflammatorischen Phase der Frakturheilung kann sich nachteilig auf das Ergebnis des Heilungsprozesses auswirken [36]. Dies zeigt sich bei älteren Patienten, die höhere Werte an zirkulierenden proinflammatorischen Zytokinen aufweisen, was zu einem chronisch erhöhten Entzündungsstatus führt, der auch als "inflamm-

aging" bezeichnet wird [25]. Altersbedingte Veränderungen der mesenchymalen Stammzellen könnten die gestörte Heilung bei älteren Menschen und Tieren als Folge einer dysregulierten Entzündungsreaktion erklären. In Proben von älteren Menschen finden sich beispielsweise vermehrt Marker für oxidative Schäden an mesenchymalen Stammzellen. Bei Studien in Tiermodellen konnte ein Nutzen der therapeutischen Verabreichung von mesenchymalen Stammzellen aus jungen Tieren für die Wundheilung gezeigt werden, während die Gabe von gealterten mesenchymalen Stammzellen ohne positiven Effekt blieb [20].

3.3.3 Auswirkungen von Alter auf die Vaskularisierung

Gestörte Frakturheilung bei älteren Menschen ist wesentlich mit einer altersbedingten Dysfunktion des vaskulären Systems des Knochens verbunden, was eine verzögerte Vaskularisierung an der Frakturstelle zur Folge hat [17]. Es zeigte sich, dass ein höheres Alter die Expression von Faktoren verringert, die die vaskuläre Invasion des Frakturkallus regulieren und folglich Angiogenese und Vaskularisierung während der Frakturheilung beeinflussen. So fanden sich bei jüngeren Mäusen früher als bei älteren Mäusen Transkripte des proangiogenen Hypoxie-induzierter Faktor-1 α -Proteins (HIF-1 α) und des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), die den Prozess der Angiogenese positiv beeinflussen. Außerdem fanden sich bei den jüngeren Tieren eine stärkere Expression der Matrix-Metalloproteinasen 9 und 13, die an der Einwanderung von Endothelzellen ins Gewebe beteiligt sind. Da das angiogene Potenzial während der Frakturheilung mit dem Alter abnimmt, scheint eine Steigerung der Angiogenese eine vielversprechende Option bei der Heilung von Knochenbrüchen im Alter zu sein [75]. Eine ausreichende Blutversorgung ist sehr wichtig für die Frakturheilung. Der Beitrag des Gefäßsystems zur Frakturheilung umfasst dabei die Bereitstellung der Blutversorgung für den Transport von Nährstoffen, Sauerstoff und Zellen, die lokal angiogene und osteogene Signalmoleküle exprimieren.

Die Abnahme der Vaskularisierung zum Zeitpunkt der Fraktur kann die Angiogenese während der Frakturheilung verzögern. Bei jungen Mäusen weist der Frakturkallus zu frühen Heilungszeitpunkten eine höhere Oberflächendichte der Blutgefäße auf als bei älteren Mäusen [36,55,75]. Mit zunehmendem Alter werden Störungen der Knochenbruchheilung mit altersbedingten Funktionsstörungen des Knochengefäßsystems und seiner Regenerationsfähigkeit bei der Heilung in Verbindung gebracht. Im Allgemeinen nimmt die vaskuläre Durchblutung des Skeletts mit dem Alter ab [101]. Vaskularisierung und Angiogenese sind bei der Frakturheilung älterer Menschen beeinträchtigt und osteochondrale Zellen sowie ihre Vorläuferzellen zeigen eine verminderte Aktivität und Menge im Kallus. Die Beiträge dieser Veränderungen erklären jedoch nicht vollständig die schlechteren Heilungsergebnisse und die erhöhte Morbidität, die bei älteren Patienten beobachtet werden, sodass zusätzliche Forschung auf diesem Themengebiet wichtig ist [17].

3.4 Sildenafil

3.4.1 Struktur

Sildenafil ist auch unter dem strukturellen Namen 1-{[3-(1-Methyl-7-oxo-3-propyl-6,7-dihydro-1H-pyrazolo[4,3-d] pyrimidin-5-yl)-4-ethoxyphenyl]sulfonyl}-4-methylpiperazin bekannt (siehe Abb. 8) und hat die Summenformel $C_{22}H_{30}N_6O_4S$.

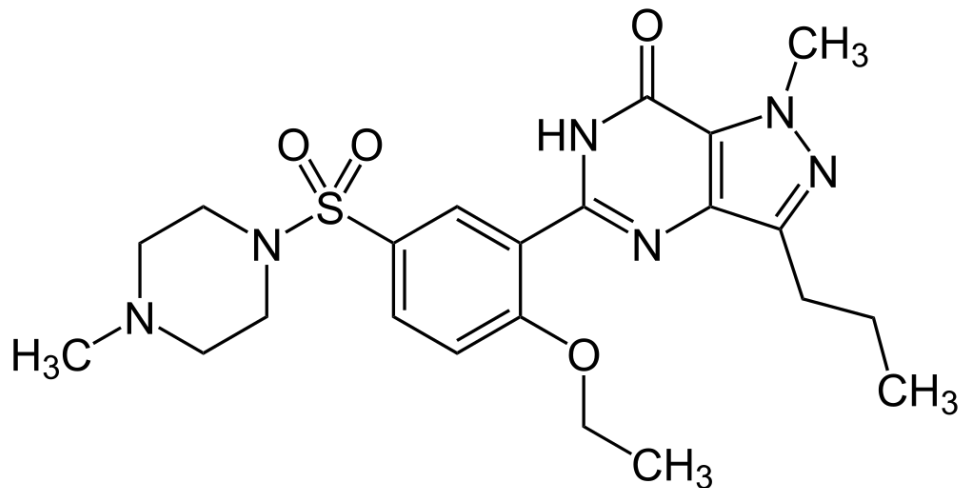


Abb. 8: Strukturformel Sildenafil, <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sildenafil.svg>, Autor: Yikrazuul, (Pypaertv), erstellt am 21.8.2009, zuletzt aufgerufen am 19.1.2022

3.4.2 Anwendungsgebiete

Die Fähigkeit von Sildenafil, sich begünstigend auf Erektionen auszuwirken, wurde im Rahmen einer Studie zufällig entdeckt. Diese hatte eigentlich zum Ziel, ein neues Medikament zur Vasodilatation zu entwickeln. Durch seine erektionsfördernde Wirkung erlangte Sildenafil nach seiner Zulassung im Jahre 1998 unter dem Namen Viagra® schnell große Berühmtheit und Beliebtheit, sicherlich auch weil die orale Einnahme deutlich angenehmer war als andere derzeitige Alternativen wie beispielsweise die Injektion von Papaverin in die Corpora cavernosa.

Sildenafil ist heute für zwei Indikationen zugelassen, zum einen zur Behandlung der erektilen Dysfunktion und zum anderen unter dem Namen Revatio® zur Behandlung der pulmonalen arteriellen Hypertonie [1].

3.4.3 Wirkungsweise

Sildenafil ist ein Hemmstoff der Phosphodiesterase-5, einem Enzym, das cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) durch Hydrolyse abbauen kann. Sildenafil hat eine ähnliche Struktur wie cGMP und hemmt die Phosphodiesterase-5, indem es die Bindungsstellen der cGMP blockiert. Da cGMP bedeutsam an der Relaxierung der glatten Muskulatur beteiligt ist, bewirkt eine Hemmung der Phosphodiesterase-5 und damit eine Erhöhung der Konzentration von cGMP durch Sildenafil eine verstärkte Dilatation der glatten Gefäßmuskulatur. Die Erektion beim Mann wird über parasympathische Neurone vermittelt, die in den Corpora cavernosa Stickstoffmonoxid (NO) freisetzen. Durch NO wird die Bildung von cGMP gesteigert. Sildenafil entfaltet seine erektionsbegünstigende Wirkweise nur im Zusammenspiel mit sexueller Stimulierung, da hierfür die parasympathische NO-vermittelte vermehrte Bildung von cGMP nötig ist [26].

Darüber hinaus erniedrigt Sildenafil den pulmonalarteriellen Widerstand und führt auch zu einer Senkung des Tonus in den Widerstandsgefäßen des großen Blutkreislaufs. Sildenafil ist Substrat von CYP3A4 und unterliegt nach oraler Einnahme der metabolischen Elimination. Die empfohlene Einzeldosis liegt zur Behandlung erektiler Dysfunktion bei 50 mg und sollte etwa 30 bis 60 Minuten vor dem Sexualverkehr eingenommen werden. Zur Behandlung von pulmonalarterieller Hypertonie beträgt die Einzeldosis zunächst 20 mg, diese kann allerdings im Verlauf auf bis zu 80 mg gesteigert werden [32].

3.4.4 Pharmakokinetik

Sildenafil wird nach oraler Verabreichung schnell resorbiert, wobei die absolute Bioverfügbarkeit bei 40 % liegt. Die Plasmakonzentration von Sildenafil erreicht innerhalb von 30 bis 120 Minuten nach der oralen Einnahme im nüchternen Zustand ihren Höchstwert, der Median liegt dabei bei 60 Minuten. Sildenafil wird in erster Linie durch mikrosomale Cytochrom-P450-Isoenzyme in der Leber verstoffwechselt, die es in einen aktiven N-Desmethyl-Metaboliten umwandeln, der noch etwa 50 % der Phosphodiesterase-5-Hemmkraft des Ausgangsstoffes besitzt.

Sildenafil und sein aktiver Metabolit sind beide zu etwa 96% an Plasmaproteine gebunden und ihre Halbwertszeit beträgt jeweils 4 Stunden. Sildenafil wird in Form von Metaboliten größtenteils mit dem Stuhl und zu einem geringeren Anteil mit dem Urin ausgeschieden. Die Plasmaspiegel von Sildenafil sind möglicherweise stark erhöht bei Patienten mit Funktionsstörungen der Leber, schweren

Funktionsstörungen der Nieren sowie bei gleichzeitiger Anwendung von Cytochrom P450 3A4-Inhibitoren (z. B. Makrolid-Antibiotika wie Erythromycin) [15].

3.4.5 Nebenwirkungen und Kontraindikationen

Unter den unerwünschten Nebenwirkungen von Sildenafil kommen Kopfschmerzen, gastrointestinale Beschwerden und Flush-Symptomaten mit einer Häufigkeit von jeweils über 10% am öftesten vor. Zu 1% bis 10% treten Sehstörungen, Myalgien oder Rhinitiden auf. Bei weniger als 1% der Einnahmen kommt es zu Nebenwirkungen wie Hypoglykämie, Hyperglykämie, Anämie, Erbrechen, Leukopenie, Tremor, Tinnitus oder Vertigo. Bei weniger als 0,01% der Einnahmen kommt es zu Krampfanfällen und Priapismus. Sehr selten beobachtet man kritische kardiovaskuläre Folgeereignisse wie plötzlichen Herztod, Myokardinfarkt, instabile Angina pectoris, ventrikuläre Arrhythmien oder Hirnblutungen [112].

Die vorübergehenden Sehstörungen, die insbesondere bei hohen oralen Dosen auftreten, sind ursächlich aller Wahrscheinlichkeit nach auf die schwache, aber vorhandene Wirkung von Sildenafil auf die Phosphodiesterase-6 zurückzuführen, die die Signaltransduktionswege in den Photorezeptoren der Netzhaut reguliert [15].

Zu den Kontraindikationen der Einnahme von Sildenafil zählen schwere Herzinsuffizienz, schwere Leberinsuffizienz, unlängst durchgemachte Schlaganfälle und Myokardinfarkte, die Einnahme von potenten CYP3A4-Inhibitoren sowie von Proteasehemmern wie Ritonavir oder Indinavir, ein systolischer Blutdruck von weniger als 90 mmHg sowie einige Erkrankungen der Retina. Insbesondere bei der Einnahme von NO-Donatoren ist die Gabe von Phosphodiesterase-5-Hemmern wie Sildenafil strengstens kontraindiziert, da diese Kombination zu drastischen Senkungen des Blutdrucks führen kann. Da Sildenafil über CYP3A4 abgebaut wird, kann es zu Wechselwirkungen mit Medikamenten kommen, die als CYP3A4-Induktoren oder CYP3A4-Inhibitoren wirken [32].

3.4.6 Potenzial für die Frakturheilung

In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Sildenafil in der Lage ist, stimulierend auf die Angiogenese zu wirken [18,62,102,125]. Dies ist von besonderem Interesse, da die Angiogenese für eine erfolgreiche Frakturheilung von großer Wichtigkeit ist. In einer weiteren Studie hat sich gezeigt,

dass durch Sildenafil der Prozess der Frakturheilung bei Mäusen beschleunigt werden kann, was mit einer signifikant höheren Expression des proangiogenen und osteogenen cysteinreichen Proteins 61 (CYR61) und einer Beschleunigung der Knochenbildung einherging [44].

Unklar ist bisher allerdings, ob diese Beschleunigung der Frakturheilung durch Sildenafil auch bei alten Mäusen erreicht werden kann. Daher wurden in der vorliegenden Studie zum ersten Mal die Auswirkungen von Sildenafil auf die Frakturheilung bei alten Mäusen unter Anwendung eines geschlossenen Femurfrakturmodells untersucht. Die für diese Studie gewählte Sildenafil-Dosis (5 mg/kg) ist dabei ungefähr fünfmal höher als die derzeit beim Menschen verwendete Standarddosis (0,7 bis 1,5 mg/kg). Dies berücksichtigt die höhere Metabolisierungsrate von Sildenafil bei Nagetieren mit einer Eliminationshalbwertszeit von einer Stunde bei Mäusen im Vergleich zu vier Stunden beim Menschen [127].

3.5 Cilostazol

3.5.1 Struktur

Cilostazol trägt den strukturellen Namen 6-[4-(1-Cyclohexyl-1H-tetrazol-5-yl)butoxy]-3,4-dihydrochinolin-2-on (siehe Abb. 9) und besitzt die Summenformel $C_{20}H_{27}N_5O_2$.

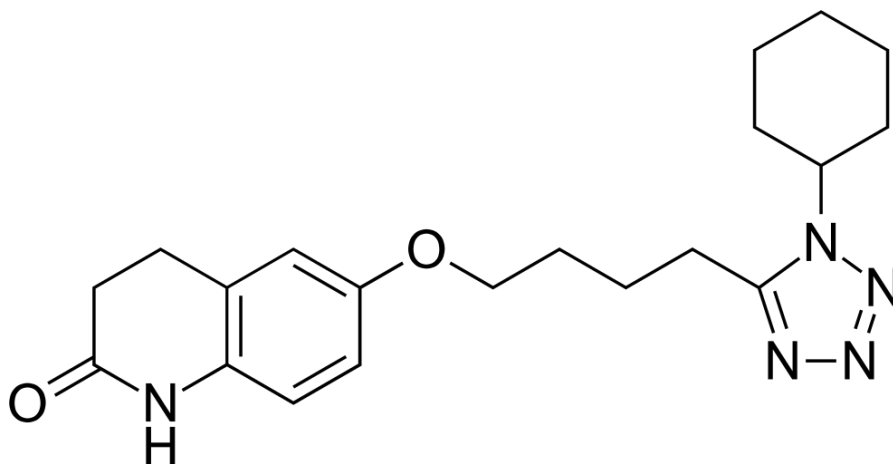


Abb. 9: Strukturformel von Cilostazol, <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cilostazol.svg>, Autor: Fvasconcellos, erstellt am 30.4.2007, zuletzt aufgerufen am 19.1.2022

3.5.2 Anwendungsgebiete

Cilostazol (Pletal®) ist zugelassen zur Behandlung von Claudicatio intermittens (Stadium II nach Fontaine) im Rahmen einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und bewirkt bei den Patienten eine Verlängerung der Gehstrecke [41]. In einer Metaanalyse wurden die Wirkungen von Cilostazol bei 2702 Patienten mit stabiler, mittelschwerer bis schwerer Claudicatio intermittens untersucht, die an 8 randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Studien teilgenommen hatten. Die Behandlungsdauer reichte von 12 bis zu 24 Wochen. Die Therapie mit Cilostazol erhöhte die maximale und die schmerzfreie Gehstrecke um 50 % bzw. 67 %. Die von den Patienten angegebene Lebensqualität ergab bessere Werte unter einer Therapie mit Cilostazol [121].

Cilostazol sollte zweimal täglich oral in einer Dosierung von 100 mg eingenommen werden. Auch gibt es Studien, die den Off-Label-Einsatz von Cilostazol zur Vorbeugung von Koronarthrombosen beziehungsweise Restenosen und Schlaganfall-Rezidiven untersuchen [70].

3.5.3 Wirkungsweise

Cilostazol hemmt die Phosphodiesterase-3 und führt über eine Erhöhung von cAMP zu einer Relaxierung der glatten Gefäßmuskulatur und damit zu einer Vasodilatation. Neben seiner gefäßerweiternden Wirkung besitzt Cilostazol auch eine blutplättchenhemmende Wirkung, die ebenfalls auf die Hemmung der Phosphodiesterase-3 und die anschließende Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels zurückzuführen ist. Auch hemmt Cilostazol die Proliferation glatter Muskelzellen in vitro und hat in einer klinischen Studie gezeigt, dass es die Triglyceridwerte senkt und die HDL-Cholesterinwerte erhöht. Präklinische Studien legen nahe, dass Cilostazol die Adenosinaufnahme hemmt. Durch die Erhöhung des interstitiellen Adenosinspiegels wird die cAMP-erhöhende Wirkung der Hemmung der Phosphodiesterase-3 in den Thrombozyten und der glatten Muskulatur verstärkt, wodurch die thrombozytenaggregationshemmende und gefäßerweiternde Wirkung des Medikaments gefördert wird.

3.5.4 Pharmakokinetik

Die Eliminationshalbwertszeit von Cilostazol beträgt 10,5 Stunden, während sich die Dauer der Thrombozytenaggregationshemmung über 3 bis 4 Tage erstreckt. Die Elimination erfolgt größtenteils über Metabolismus, wobei Cilostazol größtenteils von Leberenzymen metabolisiert wird. Die zwei Hauptmetabolite sind das 4'-trans-Hydroxy-Cilostazol und das 4–7-mal stärker wirksame Dehydro-

Cilostazol. Die Ausscheidung der Metabolite erfolgt hauptsächlich über den Urin. Cilostazol ist zu 95-98 % an Proteine gebunden, davon zum Großteil an Albumin. Bei Patienten, die unter einer Nierenfunktionsstörung leiden, sollte eine geringere Dosis zum Einsatz kommen [99].

3.5.5 Nebenwirkungen und Kontraindikationen

Unter den unerwünschten Nebenwirkungen kommen Kopfschmerzen mit etwa 30% am häufigsten vor, gefolgt von Durchfällen und Stuhlveränderungen mit jeweils > 15 % sowie Schwindel beziehungsweise Benommenheit mit etwa 10 %. Gelegentlich wurden nach der Einnahme von Cilostazol Schlaflosigkeit, Angstzustände, Schüttelfrost, Hyperglykämie, Anämie, Dyspnoe oder Gastritis beobachtet.

Als wichtige Kontraindikation ist die Herzinsuffizienz zu nennen [1]. Zudem darf Cilostazol bei Patienten mit einer Kreatininclearance von <25 ml / min nicht zum Einsatz kommen. Des Weiteren bestehen Kontraindikationen für Patienten mit mittelschwerer bis schwerer Leberfunktionsstörung, für Patienten mit bekannter Veranlagung für Blutungen, für Patienten mit bekannter ventrikulärer Tachykardie, Tachyarrhythmie oder instabiler Angina pectoris, für Patienten die gleichzeitig zusätzlich mindestens zwei weitere Thrombozytenaggregationshemmer oder Antikoagulanzen einnehmen sowie für Schwangere [99].

Eine Cochrane-Metaanalyse kam zu dem Ergebnis, Hemmstoffe der Phosphodiesterase-3 bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz für einen Anstieg der Sterblichkeitsrate im Vergleich zu Placebos verantwortlich sind. Unter der Therapie mit Hemmstoffen der Phosphodiesterase-3 kam es signifikant häufiger zu Fällen von Herztod, Herzrhythmusstörungen und Schwindelattacken [2].

3.5.6 Potenzial für die Frakturheilung

Studien haben bereits gezeigt, dass Cilostazol die Angiogenese und Vaskularisierung durch Hochregulierung verschiedener proangiogener Wachstumsfaktoren fördert [10,52]. Dies ist insbesondere von Interesse im Hinblick auf die Frakturheilung, da Vaskularisierung und Angiogenese hierbei eine wichtige Rolle spielen. Interessanterweise sind proangiogene Faktoren wie VEGF und Cyr61 dafür bekannt, dass sie auch über osteogene Aktivitäten verfügen [67,109]. Diese Aktivitäten beschleunigen den Prozess der Knochenbildung und verbessern die Reparatur von Knochenbrüchen [118]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Phosphodiesterasehemmer wie Cilostazol die Proliferation

und Differenzierung von Osteoblasten stimulieren und so die Knochenbildung beschleunigen und die Knochenmasse erhöhen. Dies ist höchstwahrscheinlich auf den erhöhten cAMP-Spiegel zurückzuführen, der die Wirkung von BMP-4 auf Osteoprogenitorzellen verstärkt [122,126]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Cilostazol die Frakturheilung bei jungen Mäusen beschleunigt, indem es sowohl die Geschwindigkeit der Knochenneubildung als auch des Kallusumbaus erhöht, was mit einer Hochregulierung von CYR61 einhergeht [40].

Die Auswirkungen von Cilostazol auf die Frakturheilung bei älteren Mäusen wurden bisher nicht untersucht. Dies ist aber zusätzlich erforderlich, da das Altern zu einer verminderten Funktion mehrerer Organe wie Leber und Niere führt. Dementsprechend können sich auch bei Menschen Pharmakokinetik, Metabolismus und Wirkung von Medikamenten bei älteren Erwachsenen im Vergleich zu jungen Menschen deutlich unterscheiden [60].

Daher wurden in der vorliegenden Studie zum ersten Mal die Auswirkungen von Cilostazol auf die Frakturheilung bei alten Mäusen unter Anwendung eines stabilen Modells einer geschlossenen Femurfraktur untersucht. Die Dosierung von Cilostazol mit 30 mg / kg Körpergewicht wurde dabei anhand der Ergebnisse einer Studie von Biscetti et al. [10] ausgewählt, in welcher für diese Dosierung die größten proangiogenen Effekte nachgewiesen werden konnten.

3.6 Fragestellung und Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Studie war, die Auswirkungen der Gabe von Sildenafil und Cilostazol auf die Frakturheilung im Mausmodell bei alten Tieren zu untersuchen.

Die Nullhypothese für den ersten Studienabschnitt lautet: „Die Gabe von Sildenafil hat keine Auswirkungen auf die Frakturheilung im Mausmodell bei alten Tieren“

Die Nullhypothese für den zweiten Studienabschnitt lautet: „Die Gabe von Cilostazol hat keine Auswirkungen auf die Frakturheilung im Mausmodell bei alten Tieren“

4 Material und Methoden

4.1 Versuchsprotokoll

Die im Rahmen der Studie durchgeführten Tierversuche mit der Versuchsnummer 04/2019 wurden vom Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittel- und Veterinärwesen (Zentralstelle, Konrad-Zuse-Straße 11, 66115 Saarbrücken) genehmigt. Die Versuche wurden am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg durchgeführt.

Die Tiere waren in der Versuchstierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg untergebracht und wurden dort für die Dauer der Versuche in Einzelkäfigen in klimatisierten Räumen unter Einfluss eines 12-stündigen Tag-/Nachtrhythmus gehalten. Die Ernährung erfolgte ad libitum sowohl mit Wasser als auch mit Standarddiätfutter (Altromin 1320, Altromin, Lage, Deutschland). Für die Versuche wurden CD-1-Mäuse mit einem Alter von 16–18 Monaten und einem Körpergewicht von 35–45 g verwendet. Das Alter von 16–18 Monaten wurde dabei orientierend an früheren Forschungsergebnissen zu altersbedingten Veränderungen bei CD-1-Mäusen gewählt [51].

Für den ersten Studienabschnitt, in dem die Auswirkungen von Sildenafil auf die Frakturheilung bei alten Mäusen untersucht werden sollten, wurden 21 Tiere in die Sildenafilgruppe und 21 Tiere in die Kontrollgruppe aufgenommen (siehe Tab. 1). In beiden Gruppen wurden zwei Subgruppen gebildet, um den Prozess der Frakturheilung sowohl nach 2 Wochen als auch nach 5 Wochen untersuchen zu können. Zudem wurden präoperativ 5 Versuchstiere aus der Sildenafilgruppe und 5 Versuchstiere aus der Kontrollgruppe ausgewählt, die nach 2 Wochen getötet und deren Femora ausschließlich zum Zweck der proteinbiochemischen Western-Blot-Analysen des Kallusgewebe genutzt wurden. Bei jeder Maus wurde eine geschlossene Fraktur mit Hilfe einer Guillotine verursacht, die daraufhin mit einer intramedullären Zugschraube osteosynthetisch versorgt wurde.

Allen Tieren wurde postoperativ für die Dauer der Versuchszeit jeden Tag mit einer Schlundsonde oral Lösung appliziert. Die Tiere der Sildenafilgruppe erhielten dabei täglich 5 mg/kg KG Sildenafil (Viagra®, Pfizer, Deutschland), gelöst in 1 ml 0,9% NaCl-Lösung und die Tiere der Kontrollgruppe 1 ml 0,9% NaCl-Lösung (B Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland).

Nach Ablauf des Versuchszeitraums (je nach Subgruppe nach 2 oder 5 Wochen) wurden die Tiere getötet und ihre Femora extrahiert. Daraufhin erfolgten röntgenologische, biomechanische, mikrocomputertomographische, histologische und immunhistochemische Untersuchungen.

	2 Wochen	5 Wochen	Western Blot
Kontrollgruppe	n = 7	n = 9	n = 5
Sildenafilgruppe	n = 7	n = 9	n = 5

Tab. 1: Versuchsprotokoll mit Anzahl der Tiere je Gruppe im Studienabschnitt Sildenafil

Für den zweiten Studienabschnitt, in dem die Auswirkungen von Cilostazol auf die Frakturheilung bei alten Mäusen untersucht werden sollten, wurden 21 Tiere in die Cilostazolgruppe und 21 Tiere in die Kontrollgruppe aufgenommen (siehe Tab. 2). In beiden Gruppen wurden zwei Subgruppen gebildet, um den Prozess der Frakturheilung sowohl nach 2 Wochen als auch nach 5 Wochen untersuchen zu können. Zudem wurden präoperativ 4 Versuchstiere aus der Cilostazolgruppe und 4 Versuchstiere aus der Kontrollgruppe ausgewählt, die nach 2 Wochen getötet und deren Femora ausschließlich zum Zweck der proteinbiochemischen Western-Blot-Analysen des Kallusgewebe genutzt wurden. Bei jeder Maus wurde eine geschlossene Fraktur mit Hilfe einer Guillotine verursacht, die daraufhin mit einer intramedullären Zugschraube osteosynthetisch versorgt wurde.

Allen Tieren wurde postoperativ für die Dauer der Versuchszeit jeden Tag mit einer Schlundsonde oral Lösung appliziert. Die Tiere der Cilostazolgruppe erhielten dabei täglich 30 mg/kg KG Cilostazol (Pletal®, Otsuka, Wexham, UK) gelöst in 1 ml 0,9% NaCl-Lösung) und die Tiere der Kontrollgruppe 1 ml 0,9% NaCl-Lösung (B Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Nach Ablauf des Versuchszeitraums (je nach Subgruppe nach 2 oder 5 Wochen) wurden die Tiere getötet und ihre Femora extrahiert. Daraufhin erfolgten röntgenologische, biomechanische, mikrocomputertomographische, histologische und immunhistochemische Untersuchungen.

	2 Wochen	5 Wochen	Western Blot
Kontrollgruppe	n = 8	n = 9	n = 4
Cilostazolgruppe	n = 8	n = 9	n = 4

Tab. 2: Versuchsprotokoll mit Anzahl der Tiere je Gruppe im Studienabschnitt Cilostazol

4.2 MouseScrew™

Die für die Studie genutzte Zugschraube (MouseScrew™, RISystem AG, Davos, Schweiz) besteht aus medizinischem Edelstahl. Die Schraube (siehe Abb. 10) hat eine Länge von 16 mm und einen Durchmesser von 0,5 mm. Sie besitzt proximal ein Gewinde (Länge 4 mm, Durchmesser 0,5 mm) und distal einen Konus (Länge 0,8 mm, Durchmesser 0,8 mm), der wichtig ist, um Halt in den distalen Femurkondylen der Mäuse zu gewährleisten. Wird beim Eindrehen der Schraube mithilfe eines dafür speziell gefertigten Instruments (RISystem AG) ein bestimmtes Drehmoment erreicht, so bricht diese an ihrer Sollbruchstelle von der Halterung ab und ist anschließend fest verankert.

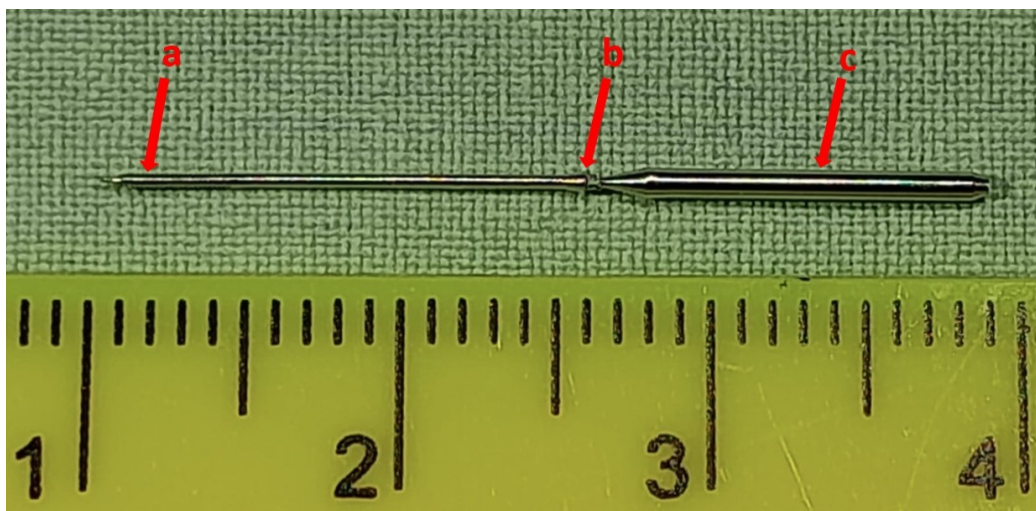


Abb. 10: MouseScrew™ mit proximalem Gewinde (a), distalem Konus (b) und Halterung (c)

4.3 Chirurgischer Eingriff

Für die Studie wurde bei den Versuchstieren eine geschlossene Femurfraktur induziert und mit der MouseScrew™ stabilisiert, wie zuvor ausführlich von Holstein et al. beschrieben [49]. Alle Eingriffe wurden bei aseptischen Bedingungen unter Verwendung eines Operationsmikroskopes durchgeführt, um ein möglichst präzises Arbeiten zu ermöglichen. Vor der Operation wurden eine Narkotisierung der Tiere körperlsgewichtsadaptiert mittels i.p. Injektion von 75 mg/kg KG Ketamin (Urostamin®, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) und 15 mg/kg KG Xylazin (Rompun®, Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland) durchgeführt. Anschließend wurde zum Augenschutz Dexpanthenolsalbe (Bepanthen® BayerVital GmbH, Leverkusen, Deutschland) auf die Cornea der

Tiere appliziert. Die zu operierende rechte Extremität wurde mittels eines elektrischen Rasierers von Haaren befreit.

Zu Beginn der Operation wurde das Ligamentum patellae aufgesucht, anschließend erfolgte ein Längsschnitt entlang der medialen Seite der Kniescheibe vom distalen Drittel des Oberschenkels bis zum proximalen Drittel des Unterschenkels (siehe Abb. 11). Daraufhin konnte nach einer Längsinzision entlang der medialen Seite der Patellasehne die Kniescheibe nach lateral disloziert werden, um das Kniegelenk freizulegen. Für die Schnitte sowie für die weitere Präparation kamen sterile Skalpellklingen (Carbon Steel Skalpellklingen #11, Aesculap AG & Co. KG, B Braun Melsungen AG, Tuttlingen, Deutschland) zum Einsatz. Nach Freilegung der Femurkondylen wurde mittels einer Kanüle (Sterican® 0.40 x 40 mm 27G x 1.5, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) ein Loch in den interkondylären Zwischenraum gebohrt und damit der Markraum am distalen Femur eröffnet.

Im Anschluss daran wurde ein Führungsdraht (Durchmesser 0,20 mm, RISystem AG, Davos, Schweiz) vom interkondylären Loch ausgehend in das Femur eingeführt, vorgeschoben und nach Durchtritt aus dem proximalen Femurende mittels einer kleinen Hautinzision ausgeleitet (siehe Abb. 12). Daraufhin wurde, wie zuvor beschrieben [97], mit Hilfe einer Guillotine eine geschlossene Fraktur erzeugt. Anschließend wurde das operierte Femur zur Kontrolle von Fraktur und Drahtlage geröntgt (siehe Abb. 13; Röntgenanlage MX-20, Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, Illinois, USA).

Nach Beurteilung des Röntgenbildes wurde die MouseScrewTM mit dem Führungsdraht verbunden und unter ständigem Druck und Drehung durch das Femur hindurch zu dessen proximalem Ende geleitet (siehe Abb. 14), wo sie fest verankert wurde und schließlich an ihrer Sollbruchstelle abbrach. Die Lage der MouseScrewTM im Femur wurde danach durch Anfertigung eines weiteren Röntgenbildes kontrolliert (siehe Abb. 15), die Patella reponiert und die Kniegelenkkapsel mit einer Einzelknopfnahrt (Ethicon ProleneTM 5-0, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) verschlossen (siehe Abb. 16). Zum Schluss erfolgte die Hautnaht mittels Einzelknopfnähten (siehe Abb. 17; Ethicon ProleneTM 5-0).

Zur Analgesie wurde den Tieren postoperativ körpergewichtsadaptiert Carprofen (5 mg/kg KG Rimadyl®, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) subkutan in die Nackenfalte injiziert. Außerdem wurde ab dem Tag vor der Operation bis vier Tage nach der Operation dem Trinkwasser Tramadol (1 mg/ml Tramal®, Grünenthal, Aachen, Deutschland) zur Schmerzmedikation beigemischt.

Im Anschluss an die OP bis zum Ende des Versuchszeitraums wurden die Versuchstiere täglich visitiert, gewogen und der Allgemeinzustand überprüft. Hierbei kam das Aufzeichnungsmuster nach §9 Absatz 5 des Tierschutzgesetzes zum Einsatz. Zudem wurde auf etwaige Anzeichen von Schmerzen, Entzündungen und Dislokationen des Implantates geachtet und der Wundbereich inspiziert.

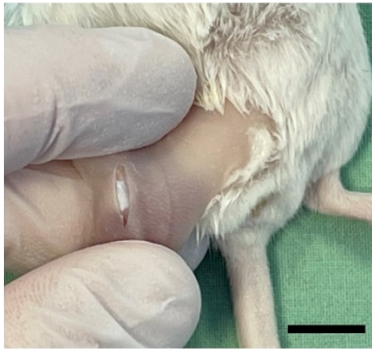


Abb. 11: Sicht auf das Ligamentum patellae nach Hautschnitt. Maßstabsleiste: 1cm

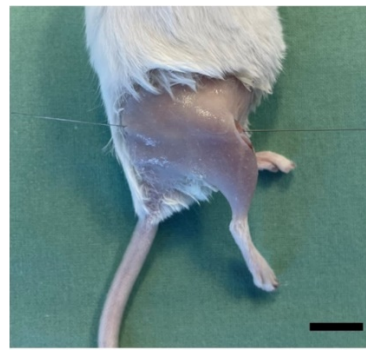


Abb. 12: Lage des Führungsdrahtes nach Einbringen ins Femur. Maßstabsleiste: 1 cm



Abb. 13: Röntgenkontrolle der Fraktur und der Lage des Führungsdrahtes. Maßstabsleiste: 0,25 cm

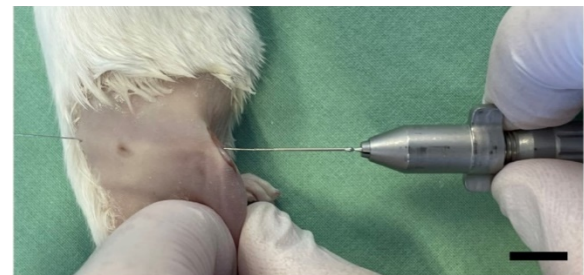


Abb. 14: Einbringen der MouseScrew™ über den Führungsdraht. Maßstabsleiste: 1 cm



Abb. 15: Röntgenkontrolle der MouseScrew™. Maßstabsleiste: 0,25 cm



Abb. 16: Kapselnaht. Maßstabsleiste: 1 cm

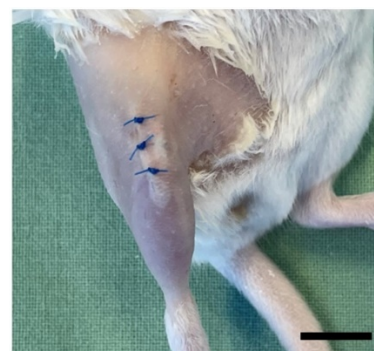


Abb. 17: Hautnaht. Maßstabsleiste: 1 cm

4.4 Medikamentenapplikation

Allen Versuchstieren wurde für die Dauer der Versuche täglich mit einer Schlundsonde ($\varnothing$ 1,2 mm, Länge 60 mm, Bohrung Luer-Lock, Spitenolive B, ACUFIRM, Ernst Kratz GmbH, Dreieich, Deutschland) oral Lösung appliziert. Hierfür wurden die Tiere im Nackenbereich festgehalten und die Schlundsonde vorsichtig durch ihren Mund in die Speiseröhre eingeführt, wobei dieser Vorgang durch die natürlichen Schluckbewegungen der Mäuse erleichtert wurde. Anschließend konnte die jeweilige Lösung appliziert werden. Für den ersten Studienabschnitt erhielten die Tiere der Sildenafilgruppe täglich 5 mg/kg KG Sildenafil (Viagra®, Pfizer, Deutschland, gelöst in 1 ml 0,9% NaCl-Lösung) und die Tiere der ersten Kontrollgruppe 1 ml 0,9% NaCl-Lösung. Für den zweiten Studienabschnitt erhielten die Tiere der Cilostazolgruppe täglich 30 mg/kg KG Cilostazol (Pletal®, Otsuka, Wexham, UK, gelöst in 1 ml 0,9% NaCl-Lösung) und die Tiere der zweiten Kontrollgruppe 1 ml 0,9% NaCl-Lösung.

4.5 Tötung der Tiere

Je nach Subgruppenzugehörigkeit wurden die Tiere nach 2 beziehungsweise 5 Wochen Versuchszeit durch eine Überdosis Pentobarbital (Nacoren®, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein) getötet. Zusätzlich wurde anschließend ein Genickbruch durchgeführt.

4.6 Abschließendes Röntgenbild

Nach erfolgter Tötung der Tiere durch eine Überdosis Pentobarbital wurde ein abschließendes Röntgenbild der operierten Femora angefertigt (Röntgenanlage MX-20, Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, Illinois, USA). Anhand dieser Röntgenbilder konnte die Lage der MouseScrewTM mit der postoperativen Ausgangslage verglichen sowie eine Dislokation ausgeschlossen werden. Zudem erfolgte eine orientierende Bewertung der Frakturheilung.

4.7 Entnahme und Konservierung der Femora

Nach der Tötung der Versuchstiere und dem Anfertigen eines abschließenden Röntgenbildes wurden sowohl das operierte als auch das kontralaterale nicht operierte Femur durch Ablösung von Muskeln und Bändern freigelegt. Dabei wurde insbesondere darauf geachtet, den Frakturkallus am operierten Femur zu schonen. Es folgte die Exartikulation der Femora in Kniegelenk und Hüftgelenk sowie deren Entnahme. Daraufhin konnte verbliebenes Weichteilgewebe unter Vorsicht beseitigt werden. Beim

operierten Femur wurde im Anschluss noch die MouseScrewTM entfernt, anschließend erfolgten biomechanische Messungen. Danach wurden die Knochen in mit NaCl 0,9% Lösung angefeuchtete Kompressen verpackt und bei -80 °C eingefroren.

4.8 Biomechanik

Für die biomechanischen Testungen wurde eine dafür geeignete Apparatur (Mini-Zwick Z 2.5, Zwick GmbH, Ulm, Deutschland) verwendet. Getestet wurden hierbei sowohl die operierten als auch die kontralateralen nicht-operierten Femora im Sinne einer 3-Punkt-Biegetestung [40,97]. Hierbei wurde darauf geachtet, die Knochen nicht zu beschädigen, sodass diese anschließend den mikrocomputertomographischen, histologischen und immunhistochemischen Analysen zugeführt werden konnten. Bei allen Knochen wurden vor den Messungen verbliebenes Weichteilgewebe entfernt, bei den operierten Femora wurde zusätzlich noch das Implantat entfernt. Alle Knochen wurden für die Messungen mit der ventralen Seite nach unten weisend auf die Auflagestempel gelegt. Der Abstand zwischen den beiden Auflagestempeln betrug dabei 6 mm. Die Geschwindigkeit der Messung betrug über den gesamten Messverlauf 1 mm pro Minute. Aus den hierbei erhobenen Werten wurde ein Kraft-Weg-Diagramm erstellt. Der lineare Anteil des Kraft-Weg-Diagramms wurde zur Bestimmung der Biegesteifigkeit [N/mm] verwendet, zusätzlich wurde die Biegesteifigkeit der operierten Femora prozentual zur Biegesteifigkeit der kontralateralen nicht frakturierten Femora berechnet.

4.9 μ CT

Die Femora wurden mit einem Mikrocomputertomographiegerät (Skyscan 1176, Bruker, Billerica, USA) gescannt. Die Scans wurden mit einer räumlichen Auflösung von 9 μ m unter standardisierten Bedingungen durchgeführt (Röhrenspannung: 50 kV; Stromstärke: 200 μ A; Intervalle: 0,4°; Belichtungszeit: 3500 ms; Filter: 0,5 mm Aluminium).

Die erzeugten Bilder wurden in dreidimensionalen Arrays gespeichert und unter Verwendung eines geeigneten Programmes zur Bildbearbeitung (DataViewer, Bruker, Billerica, USA) zum Zweck der Auswertung aufbereitet. Hierbei wurde ein Volume of Interest (VOI) definiert, dessen Bereich jeweils dem gesamten gescannten Femur entsprach. Um die Grauwerte als Mineralgehalt (Knochenmineraldichte) auszudrücken, wurden Kalziumhydroxylapatit (CaHA)-Phantomstäbchen mit bekannten Knochenmineraldichtewerten (0,250 g und 0,750 g CaHA/cm³) zur Kalibrierung verwendet.

Im Bereich des Volume of Interest (VOI) wurde anschließend die Region of Interest (ROI), die im Laufe der Frakturheilung neu gebildetem Kallusgewebe entsprach, manuell unter Ausschluss des ursprünglichen kortikalen Knochens eingezeichnet. Die Schwellenwerte zur Unterscheidung zwischen stark und schwach mineralisiertem Knochen basieren auf der visuellen Inspektion der Bilder, dem qualitativen Vergleich mit histologischen Schnitten und vorherigen Studien zur Untersuchung von Knochenheilung und Kallusgewebe mittels μ CT [12,93]. Eine Knochenmineraldichte von mehr als $0,642 \text{ g/cm}^3$, die zu Grauwerten von 98-255 führt, wurde als hoch mineralisierter Knochen eingestuft. Bei schlecht mineralisiertem Knochen wurde ein Knochenmineraldichtewert zwischen $0,410$ und $0,642 \text{ g/cm}^3$ angenommen, was Grauwerten von 68-97 entsprach.

Die folgenden Parameter wurden aus der Kallus-ROI für jeden Knochen berechnet: Gesamtvolumen, Knochenvolumen, Anteil des Knochenvolumens am Gesamtvolumen, niedrig mineralisiertes Knochenvolumen, hoch mineralisiertes Knochenvolumen, Knochenoberflächendichte, Trabekeldicke, Trabekelabstand, sowie Trabekelanzahl.

4.10 Histologie und Histomorphometrie

Nach der biomechanischen Prüfung und erfolgter μ CT-Analyse wurden die Knochen 24 Stunden lang in Paraformaldehyd fixiert. Daraufhin wurden die Proben für weitere 24 Stunden bei einer Temperatur von 4°C in eine 30-prozentige Saccharoselösung eingelegt und anschließend bei -80°C eingefroren. Für die Analysen wurden Längsschnitte durch die Femurachse mit einer Dicke von $4 \mu\text{m}$ unter Verwendung eines Kryostats (Leica CM3050 S, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) nach der Kawamotos-Film-Methode angefertigt [59]. Die Schnitte wurden anschließend auf Objektträger aufgebracht und gefärbt. Um die Schnitte mit Safranin-O einzufärben, wurden diese zunächst für eine Minute in Eisenhämatoxylin nach Weigert eingelegt und daraufhin einer Spülung mit destilliertem Wasser unterzogen. Anschließend wurden sie mit Salzsäure-Alkohol behandelt und für 5 Minuten gebläut. Nach einer weiteren Spülung erfolgte das Auftragen von 0,02%igem Fast Green für 4 Minuten, daraufhin wurden die Schnitte mit 1%iger Essigsäure gespült und in 0,1%igem Safranin-O für 5 Minuten eingelegt. Zum Schluss erfolgte eine Entwässerung der Schnitte durch 100%igen Ethanol sowie das Auftragen von Xylol.

Bei den auf diese Weise mit Safranin-O gefärbten Schnitten wurden am Mikroskop (Olympus BX60 Mikroskop, Olympus, Shinjuku, Japan; Zeiss Axio Cam und Axio Vision 3.1, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei einer Vergrößerung von $12,5\times$ die Strukturindizes nach den Empfehlungen von Gerstenfeld et al. [31] berechnet. Als histomorphometrische Parameter wurden jeweils die Gesamtkallusfläche (mm^2), die Knochenkallusfläche (mm^2), die Knorpelkallusfläche (mm^2) und die

fibröse Kallusfläche (mm^2) bestimmt. Die Gesamtkallusfläche wurde als das gesamte knöcherne, knorpelige und fibröse Kallusgewebe definiert. Vorbestehender kortikaler Knochen der proximalen und distalen Fragmente wurde von dieser Wertung ausgeschlossen.

Um den Remodelingprozess zu analysieren, wurde außerdem der Durchmesser des Kallusgewebes im Verhältnis zum Durchmesser des Femurknochens am Frakturspalt bestimmt. Jeder Bereich wurde markiert und mit dem Analysesystem ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) ausgemessen. Außerdem konnte aus den so erhobenen Werten jeweils noch der prozentuale Anteil der knöchernen, knorpeligen und fibrösen Kallusfläche an der gesamten Kallusfläche ermittelt werden.

Zusätzlich wurde die Aktivität von tartratresistenter saurer Phosphatase (TRAP) im Kallusgewebe jeweils 2 und 5 Wochen nach der Operation sichtbar gemacht, um Osteoklasten nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden Längsschnitte von $4\text{ }\mu\text{m}$ Dicke durch die Femurachse in einer Mischung aus 5 mg Naphthol AS-MX-Phosphat und 11 mg Fast-Red-TR-Salz in 10 ml 0,2 M Natriumacetatpuffer (pH 5,0) für eine Stunde bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend mit Methylgrün gegengefärbt und mit Glycerin-Gelatine abgedeckt.

TRAP-positive Zellen wurden im Kallusgewebe mit einer 400-fachen Vergrößerung in standardisierter Weise gezählt. Hierzu wurden pro Kallus bei den 2 Wochen nach Fraktur gewonnenen Femora 11 High Power Fields (HPF) und bei den nach 5 Wochen gewonnenen Femora aufgrund der geringeren Kallusgröße 7 HPFs ausgewertet. Die HPFs wurden zu diesem Zweck nach einem standardisierten Schema festgelegt (siehe Abb. 18) und die Werte als TRAP-positive Zellen pro HPF angegeben.

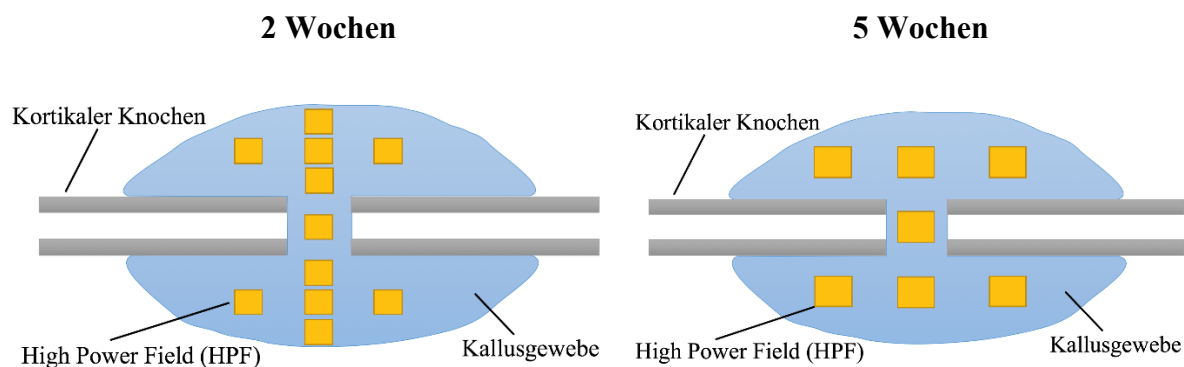


Abb. 18: Standardisiertes Schema zum Mikroskopieren der Kalli nach 2 Wochen mit 11 High Power Fields sowie nach 5 Wochen mit 7 High Power Fields

Des Weiteren wurde ein Punktesystem (Histo-Score) zur Beurteilung der Qualität der Frakturüberbrückung verwendet [28,86]. Hierbei wurden jeweils beide Kortizes analysiert und dabei jeweils zwei Punkte für knöcherne Überbrückung, ein Punkt für knorpelige Überbrückung oder null

Punkte für Überbrückung mit fibrösem Gewebe vergeben. Bei Anwendung dieses Punktesystems ergibt sich ein Maximum von 4 Punkten für jede Probe, diese Punktzahl weist auf eine vollständige knöcherne Frakturüberbrückung hin. Bereiche ohne sichtbares Gewebe innerhalb des Kallus wurden dabei von der Analyse ausgeschlossen.

4.11 Immunhistochemie

Zur Analyse der zellulären Zusammensetzung des Kallusgewebe wurden Längsschnitte mit einer Dicke von 4 µm angefertigt und anschließend verschiedenen Antikörperfärbungen zugeführt. Zu diesem Zweck wurden die Längsschnitte zunächst über eine Dauer von einer Minute in 100%igen Ethanol eingetaucht und daraufhin einer Spülung mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) unterzogen. Im Anschluss daran wurde die Permeabilisierung in PBS mit 0,2%igem Triton-X (PBST) durchgeführt.

Für den immunhistochemischen Nachweis von Mikrogefäßen wurden die Schnitte mit einem monoklonalen Ratten-Anti-Maus-Antikörper gegen den Endothelzellmarker CD31 (1:100; Abcam, Cambridge, UK) über Nacht in PBST mit 5 %igem Ziegenerum gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte erneut in PBS gewaschen und daraufhin mit einem Ziegen-Anti-Ratten-IgG-Alexa555-Antikörper als sekundärem Antikörper (1:100; Life Technology, Eugene, OR, USA) in PBS für eine Stunde gefärbt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342 (2 µg/mL; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland).

Um den neutrophilen Granulozytenmarker Myeloperoxidase (MPO) sowie den Makrophagenmarker CD68 nachzuweisen, wurden die Schnitte mit einem polyklonalen Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper gegen MPO (1:100; Abcam) und einem polyklonalen Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper gegen CD68 (1:100; Abcam) gefärbt. Als Sekundärantikörper wurde hierbei ein Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (1:100; Dianova, Hamburg, Deutschland) verwendet.

In den Proben wurde die Anzahl der CD31-positiven Mikrogefäße sowie der MPO- und CD68-positiven Zellen unter Nutzung eines Mikroskops (Olympus BX60 Mikroskop, Olympus, Shinjuku, Japan; Zeiss Axio Cam und Axio Vision 3.1, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) in 400-facher Vergrößerung ermittelt und jeweils pro HPF angegeben. Um dies zu ermöglichen, wurden pro Kallus bei den nach 2 Wochen extrahierten Femora 11 HPFs und bei den nach 5 Wochen extrahierten Femora aufgrund der geringeren Kallusgröße 7 HPFs nach standardisierter Weise festgelegt. Anschließend wurden Bilder von diesen digitalisiert, bevor die Gefäße beziehungsweise Zellen gezählt werden konnten. Diese Zählungen erfolgten unter Nutzung des Analysesystem ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

4.12 Western Blot

Mit dem Ziel, die Proteinexpression im Kallusgewebe quantitativ zu bestimmen, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. In der Sildenafilgruppe wurde die Expression von CYR61, VEGF, HO-1, des Rezeptors für die Aktivierung des Nuklearfaktor-Kappa-B-Liganden (RANKL), Osteoprotegerin (OPG) sowie von Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) bestimmt. In der Cilostazolgruppe erfolgte die Bestimmung der Expression von CYR61, BMP-2, BMP-4, CD31, Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und runt-related transcription factor 2 (RUNX2).

Die Proben für die Western-Blot-Analysen wurden nach einer Versuchsdauer von 2 Wochen nach Operation aus dem Kallusgewebe der Versuchstiere entnommen. Hierbei wurde das Kallusgewebe jeweils mit einer Skalpellklinge abgetragen und in ein Behältnis mit Lysepuffer (10 mM Tris, pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5 % Triton-X 100, 0,02 % NaN₃, 0,2 mM PMSF) überführt. Als Nächstes konnten die Proben in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und danach bis zu den Analysen bei -80 °C eingelagert werden. Um die Proteine zu extrahieren, wurde zunächst eine Homogenisierung unter Verwendung des beschriebenen Lysepuffers sowie einer NaN₃ Proteaseninhibitor-Lösung (1:75, v/v; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) durchgeführt. Daraufhin wurden die Proben für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert und für eine weitere halbe Stunde zentrifugiert (16000 x g). Zu diesem Zweck wurden die extrahierten Proteine in einem Natriumdodecylsulfatpolyacrylamidgel durch Elektrophorese separiert und danach auf eine Polyvinylendifluoridmembran (BioRad, München, Deutschland) übertragen.

Anschließend konnte die Inkubation mit den folgenden monoklonalen Primärantikörpern erfolgen: Schaf-Anti-Maus-CYR61 (1:300, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland), Ziege Anti-Maus BMP-2 und BMP-4 (1:300, R&D Systems), Kaninchen Anti-Maus CD31 (1:300, Cell Signaling Technology, Danvers, USA), Maus Anti-Maus PI3K (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) und Kaninchen Anti-Maus RUNX2 (1:300, Abcam), Kaninchen-Anti-Maus-VEGF (1:300, Abcam), Kaninchen-Anti-Maus-HO-1 (1:30, Enzo Life Sciences by Biomol GmbH), Kaninchen-Anti-Maus Nrf2 (1:50, Cell Signaling Technology), Kaninchen-Anti-Maus-RANKL (1:300, Abcam), Ratte-Anti-Maus-OPG (1:300, R&D Systems), Maus-Anti-Maus- β -Aktin (1:1000, Santa Cruz Biotechnology).

An die Inkubation mit den Primärantikörpern schloss sich die Behandlung mit korrespondierenden Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörpern (Dako Deutschland GmbH, Hamburg) an. Die Expression der Proteine wurde unter Verwendung eines Chemilumineszens (ECL, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) nach Exposition der Membran durch das Chemocam-Imager-System (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) sichtbar gemacht und zur Gewährleistung der Quantifizierbarkeit gegen β -Aktin (1:1000 Santa Cruz Biotechnology) normalisiert.

Zur Quantifizierung der Proteinexpression kam die Software LabImage 1D (Version 4.1, Kaplan Bio-Imaging GmbH, Leipzig, Deutschland) zur Anwendung. Die Software ermöglichte hierbei die automatische Erkennung der Position von Western-Blot-Banden und die Quantifizierung der Pixelintensität.

4.13 Statistische Analyse

Zur statistischen Datenanalyse wurde das Programm SigmaPlot 13.0 (Jandel Corporation, San Rafael, USA) verwendet. Die Angabe der Werte in dieser Arbeit erfolgt als Mittelwerte (MW) $\pm$ Standardfehler (SEM). Die Daten wurden mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung und mithilfe des F-Tests auf Varianzgleichheit überprüft. Anschließend erfolgten Vergleiche der Gruppen mit dem ungepaarten Student's t-Test. Bei nichtparametrischen Werten kam es zur Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von $< 0,05$ festgelegt.

5 Ergebnisse Sildenafil

5.1 Ergebnisse Röntgen

Zwei Wochen nach der Fraktur fanden sich in den angefertigten Röntgenbildern deutliche Anzeichen einer Kallusbildung sowohl bei den Kontrolltieren (Abb. 19 a) als auch bei den Mäusen, die Sildenafil erhalten hatten (Abb. 19 c).

Nach 5 Wochen zeigten die Femora in beiden Gruppen eine vollständige knöcherne Überbrückung (Abb. 19 b, d). Dabei zeigte sich der Kallus in den mit Sildenafil behandelten Tieren vergleichsweise größer als in der Kontrollgruppe.

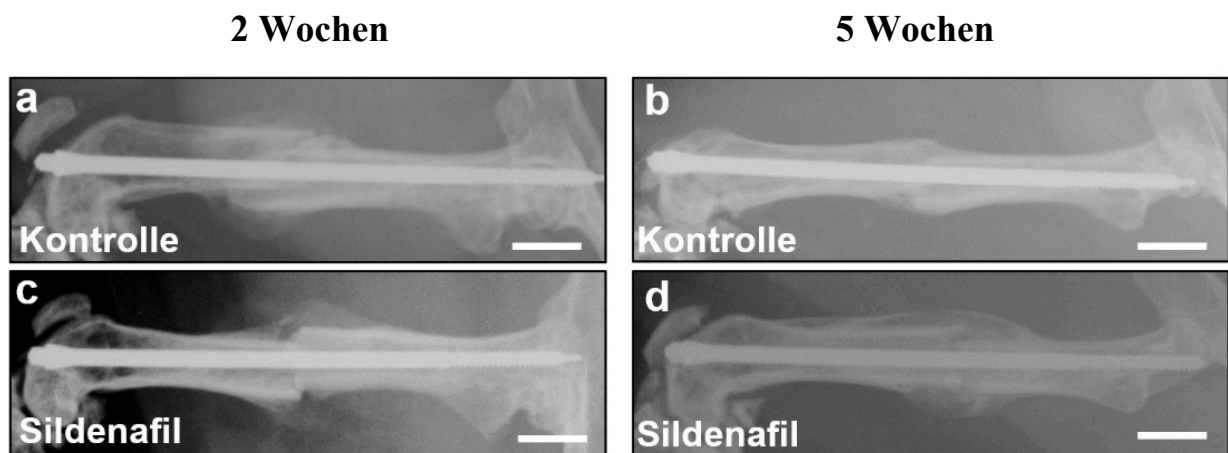


Abb. 19: Repräsentative Röntgenbilder der mit MouseScrew™ stabilisierten Femora der Kontrollgruppe (a, b) und Sildenafilgruppe (c, d) 2 (a, c) und 5 Wochen (b, d) nach der Fraktur. Maßstabsleisten: 2 mm

5.2 Ergebnisse Biomechanik

Zwei Wochen nach der Fraktur (Abb. 20 a) erreichten die Femora der mit Sildenafil behandelten Tiere eine im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht höhere Biegesteifigkeit, die Differenz allerdings war nicht signifikant. Auch 5 Wochen nach der Fraktur (Abb. 20 b) war kein signifikanter Unterschied zwischen der Sildenafilgruppe und der Kontrollgruppe feststellbar.

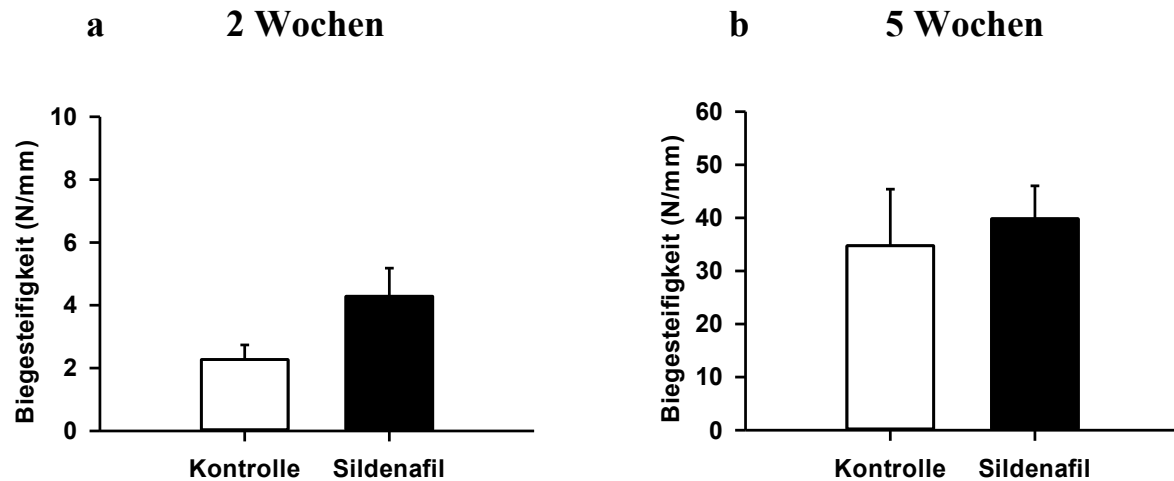


Abb. 20: Biegesteifigkeiten (N/mm) der frakturierten Femora der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Sildenafil behandelten Tiere (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

Die Biegesteifigkeiten der nicht frakturierten kontralateralen Femora zeigten weder nach 2 Wochen (Abb. 21 a) noch nach 5 Wochen (Abb. 21 b) einen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.

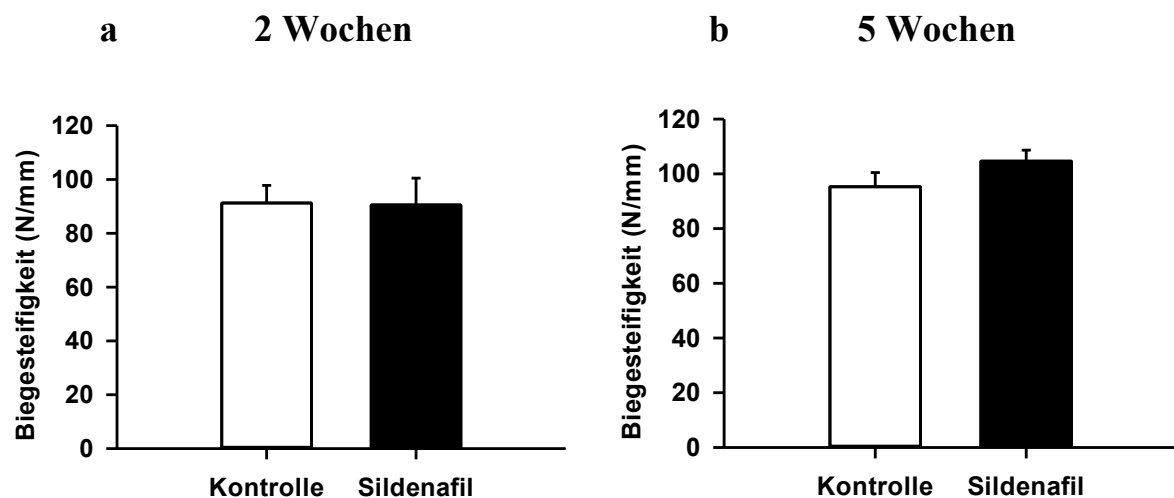


Abb. 21: Biegesteifigkeiten (N/mm) der nicht frakturierten kontralateralen Femora der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Sildenafil behandelten Tiere (schwarze Balken) nach 2 (a) und 5 (b) Wochen Versuchszeit. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

Bei der Messung der Biegesteifigkeiten der frakturierten Femora in Relation zu den nicht frakturierten kontralateralen Femora zeigten sich weder nach 2 Wochen (Abb. 22 a) noch nach 5 Wochen (Abb. 22 b) signifikante Unterschiede.

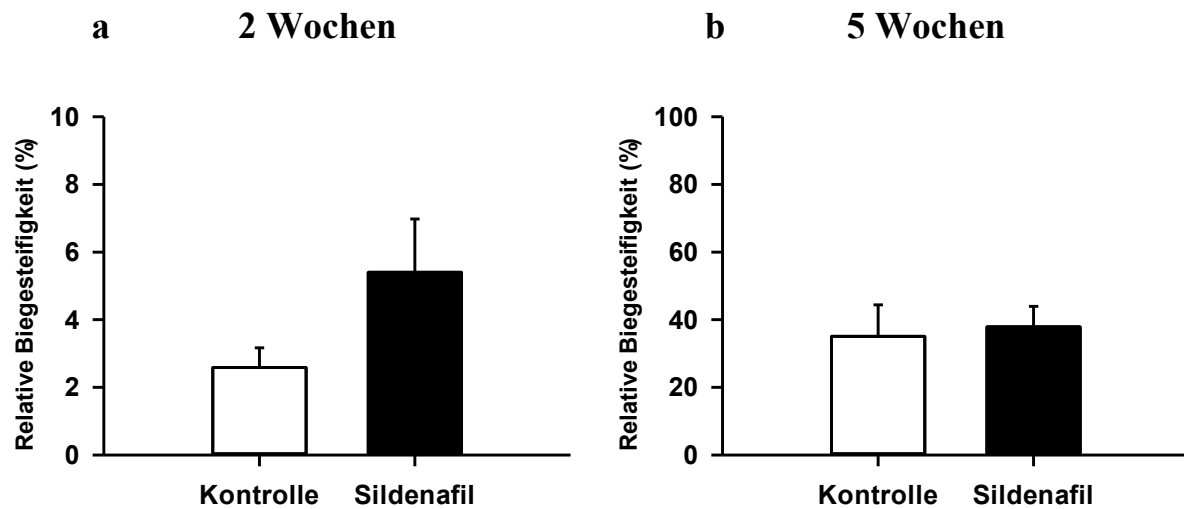


Abb. 22: Relative Biegesteifigkeiten (%) der frakturierten Femora in Relation zu den nicht frakturierten kontralateralen Femora der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Sildenafil behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

5.3 Ergebnisse μ CT

In der μ CT-Bildgebung zeigten sich deutliche Anzeichen für endochondrale Knochenheilung mit Kallusbildung 2 Wochen nach der Fraktur (Abb. 23 a, c) sowie knöcherner Überbrückung 5 Wochen nach der Fraktur (Abb. 23 b, d) sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Sildenafilgruppe.

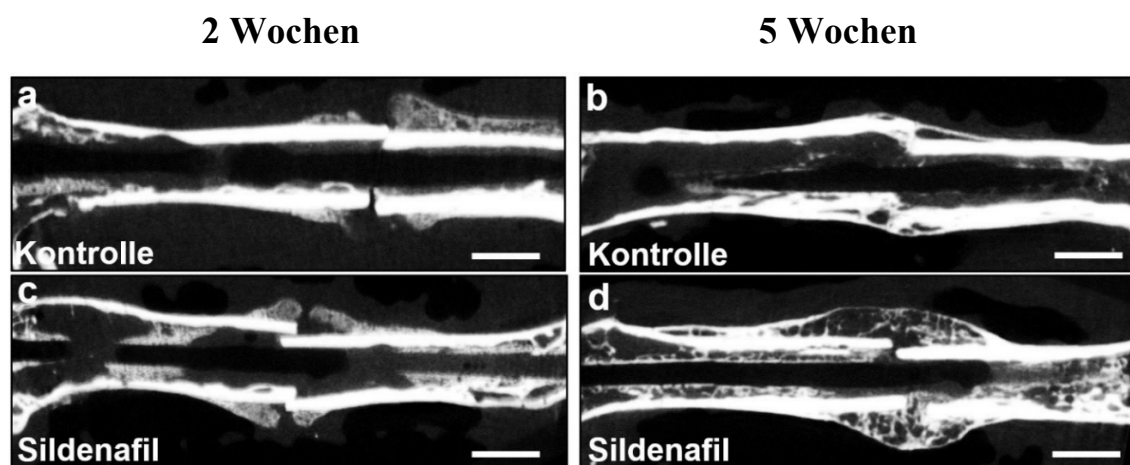


Abb. 23: Repräsentative μ CT-Bilder der frakturierten Femora der Kontrolltiere (a,b) und der mit Sildenafil behandelten Mäuse (c,d) 2 (a,c) und 5 Wochen (b,d) nach der Fraktur. Maßstabsleisten: 1,5 mm

Die Analyse des Kallusvolumen zeigte weder 2 (Abb. 24 a) noch 5 (Abb. 24 b) Wochen nach der Fraktur signifikante Unterschiede zwischen der Sildenafilgruppe und der Kontrollgruppe.

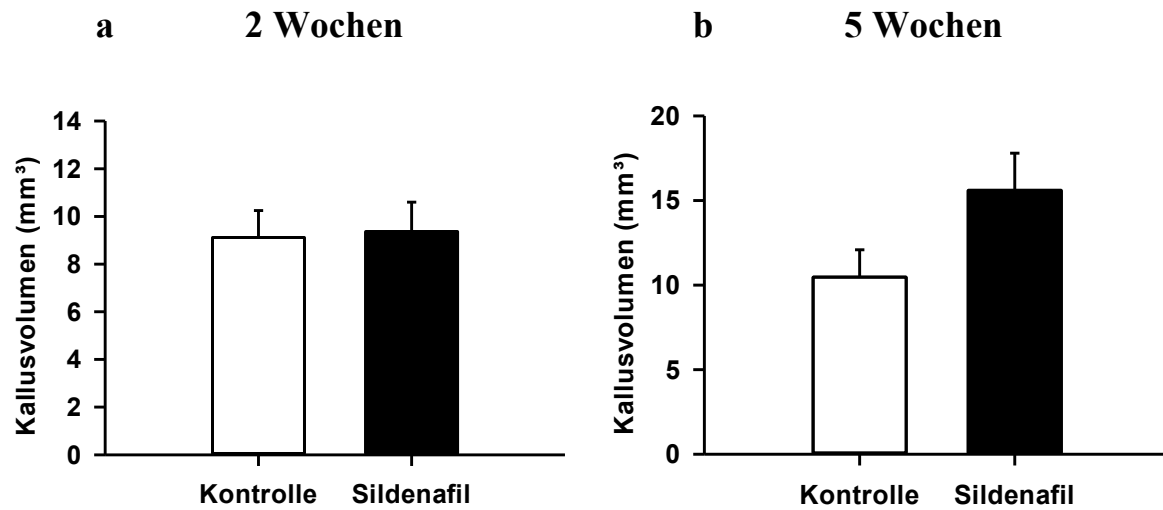


Abb. 24: Kallusvolumen (mm³) der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Sildenafil behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

Das gesamte Knochenvolumen wies 2 Wochen nach der Fraktur (Abb. 25 a) keinen signifikanten Unterschied zwischen der Sildenafilgruppe und der Kontrollgruppe auf. Im Gegensatz dazu stellte sich bei der Analyse 5 Wochen nach der Fraktur (Abb. 25 b) heraus, dass das gesamte Knochenvolumen in der Sildenafilgruppe signifikant größer war als in der Kontrollgruppe.

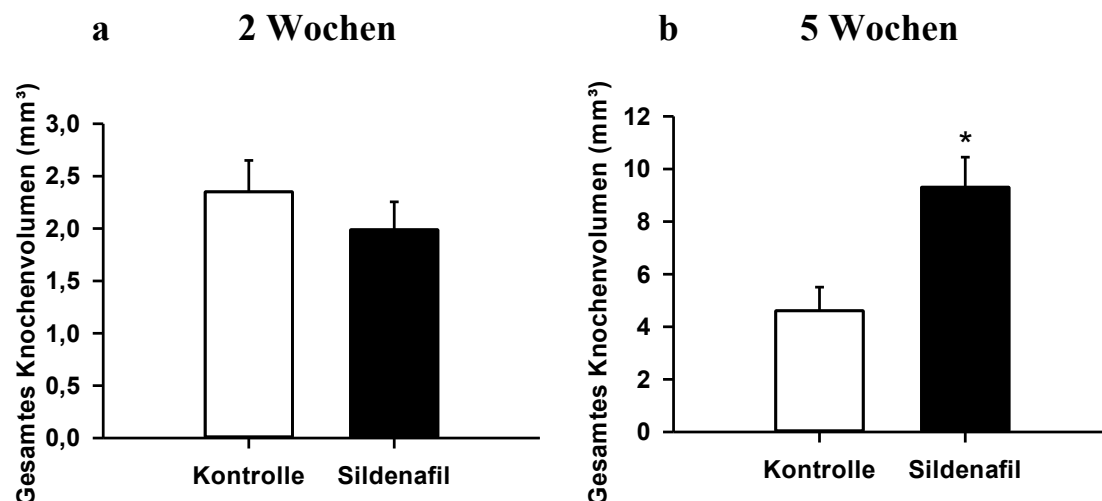


Abb. 25: Gesamtes Knochenvolumen (mm³) der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Sildenafil behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Das niedrig mineralisierte Knochenvolumen zeigte 2 Wochen nach der Fraktur (Abb. 26 a) keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Demgegenüber ließ sich 5 Wochen nach der Fraktur (Abb. 26 b) in der Sildenafilgruppe ein im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhtes niedrig mineralisiertes Knochenvolumen feststellen.

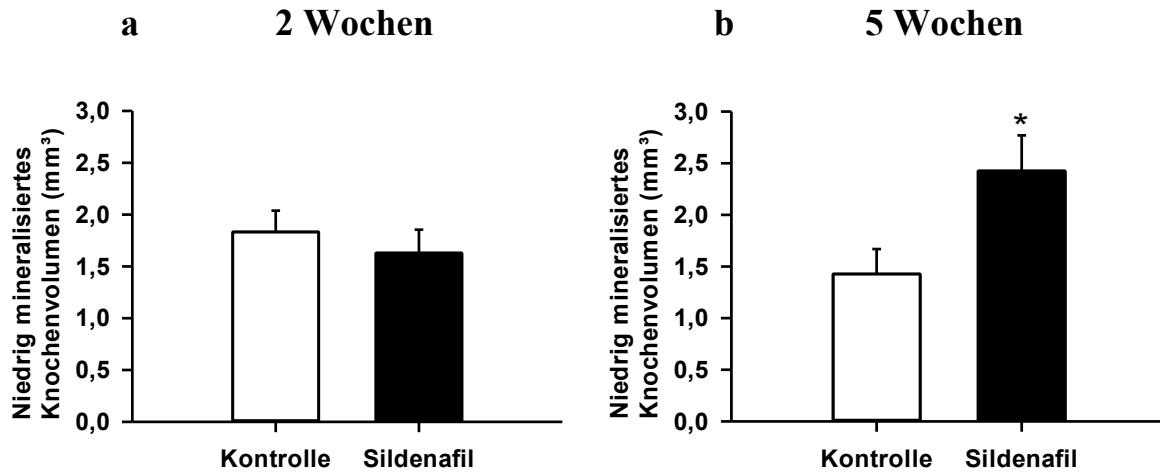


Abb. 26: Niedrig mineralisiertes Knochenvolumen (mm³) der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Sildenafil behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Bei der Analyse des hoch mineralisierten Knochenvolumen war 2 Wochen nach der Fraktur (Abb. 27 a) kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Sildenafil behandelten Tieren und der Kontrollgruppe feststellbar. Fünf Wochen nach der Fraktur (Abb. 27 b) zeigte sich das hoch mineralisierte Knochenvolumen in der Sildenafilgruppe signifikant größer als in der Kontrollgruppe.

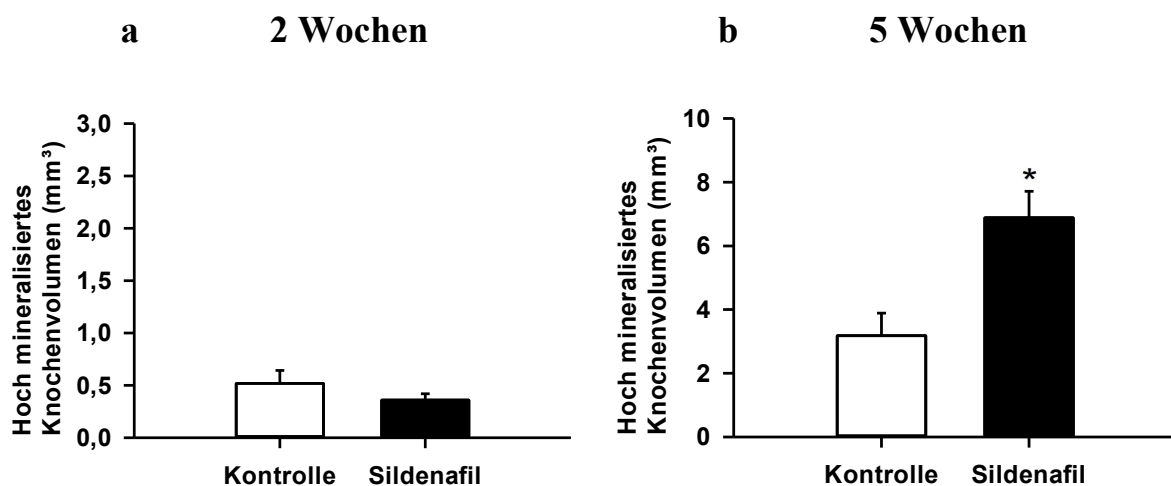


Abb. 27: Hoch mineralisiertes Knochenvolumen (mm³) der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Sildenafil behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Der Anteil des Knochenvolumens am Gesamtvolumen des Kallus zeigte 2 Wochen nach der Fraktur (Abb. 28 a) im Vergleich der Sildenafilgruppe mit der Kontrollgruppe keinen statistisch signifikanten Unterschied. Fünf Wochen nach der Fraktur (Abb. 28 b) dagegen war der Anteil des Knochenvolumens am Gesamtvolumen des Kallus in der Sildenafilgruppe signifikant größer als in der Kontrollgruppe.

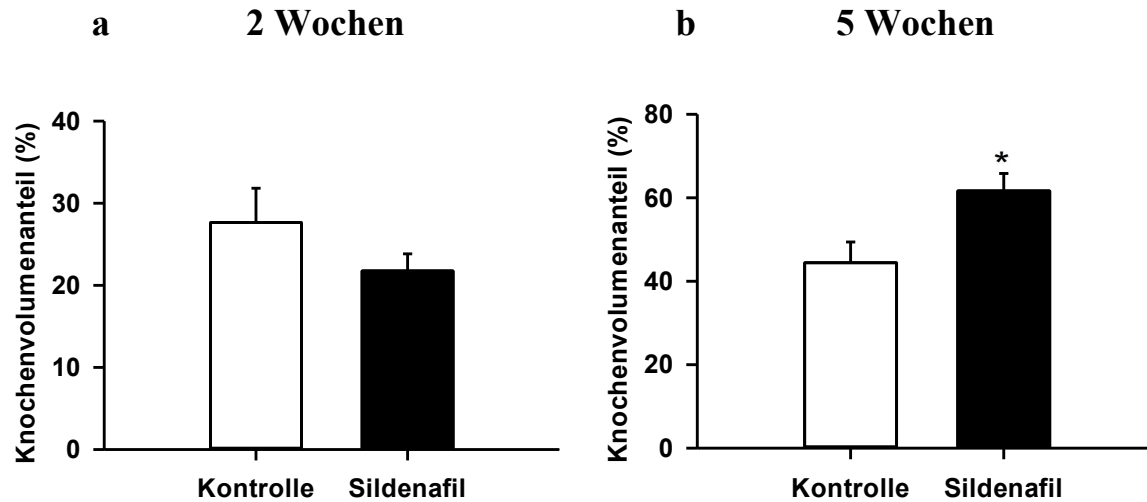


Abb. 28: Anteil des Knochenvolumens am Gesamtvolumen des Kallus (%) der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Sildenafil behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Bei der Analyse der Knochenoberflächendichte war weder nach 2 Wochen (Abb. 29 a) noch nach 5 Wochen (Abb. 29 b) ein signifikanter Unterschied zwischen der Sildenafilgruppe und der Kontrollgruppe erkennbar.

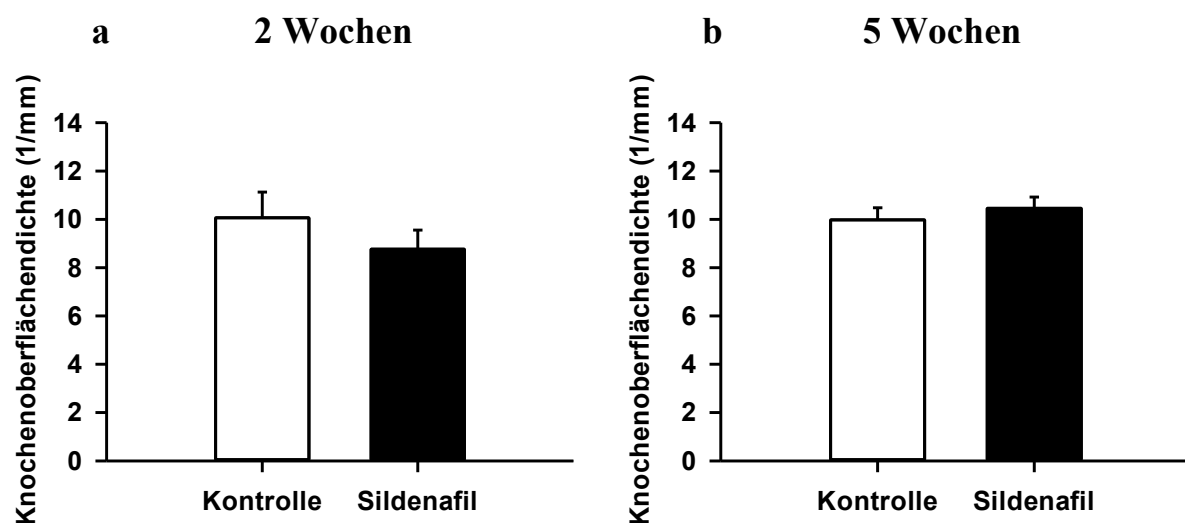


Abb. 29: Knochenoberflächendichte (1/mm) der Femora der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Sildenafil behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

Die Werte der Trabekeldicke unterschieden sich 2 Wochen nach der Fraktur (Abb. 30 a) nicht signifikant zwischen den beiden Versuchsgruppen. Im Gegensatz dazu war die Trabekeldicke 5 Wochen nach der Fraktur (Abb. 30 b) in der Sildenafilgruppe signifikant größer als in der Kontrollgruppe.

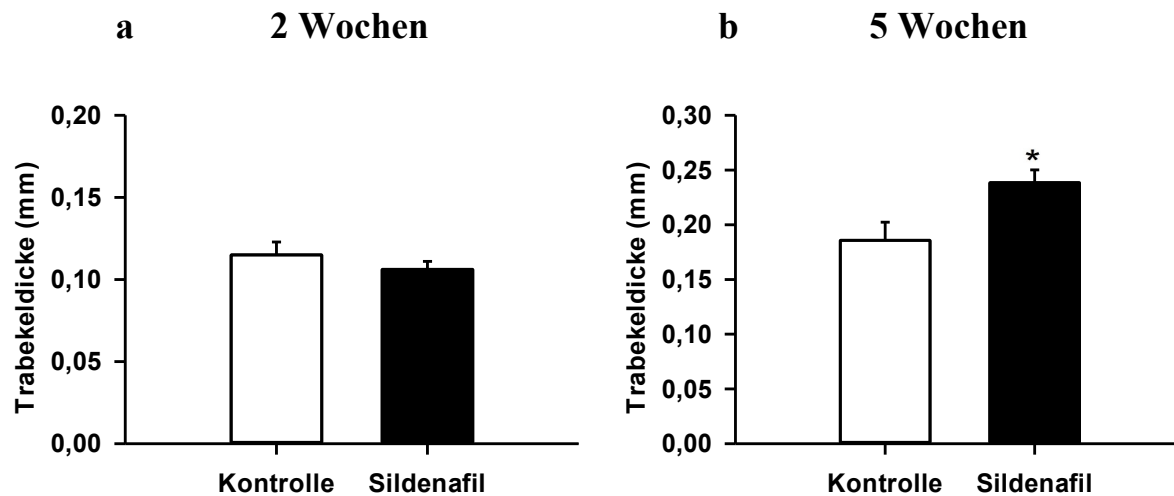


Abb. 30: Trabekeldicke (mm) der Femora der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Sildenafil behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Zwei Wochen nach der Fraktur (Abb. 31 a) war bei der Untersuchung des Trabekelabstands kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen feststellbar. Fünf Wochen nach der Fraktur (Abb. 31 b) hingegen war der Trabekelabstand in der Sildenafilgruppe signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe.

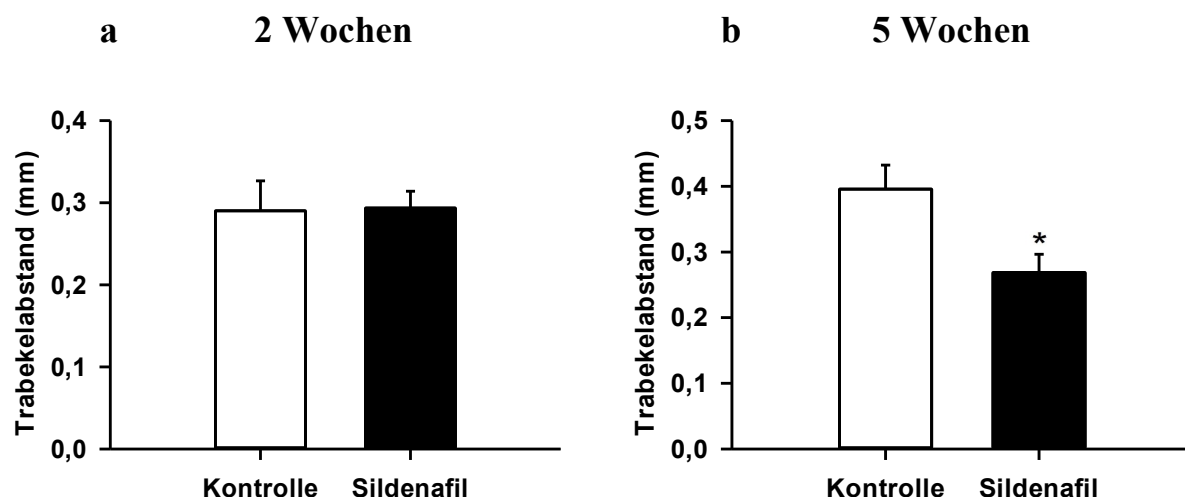


Abb. 31: Trabekelabstand (mm) der Femora der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Sildenafil behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Bei der Analyse der Trabekelanzahl ließ sich weder nach 2 Wochen (Abb. 32 a) noch nach 5 Wochen (Abb. 32 b) ein signifikanter Unterschied zwischen Sildenafilgruppe und Kontrollgruppe feststellen.

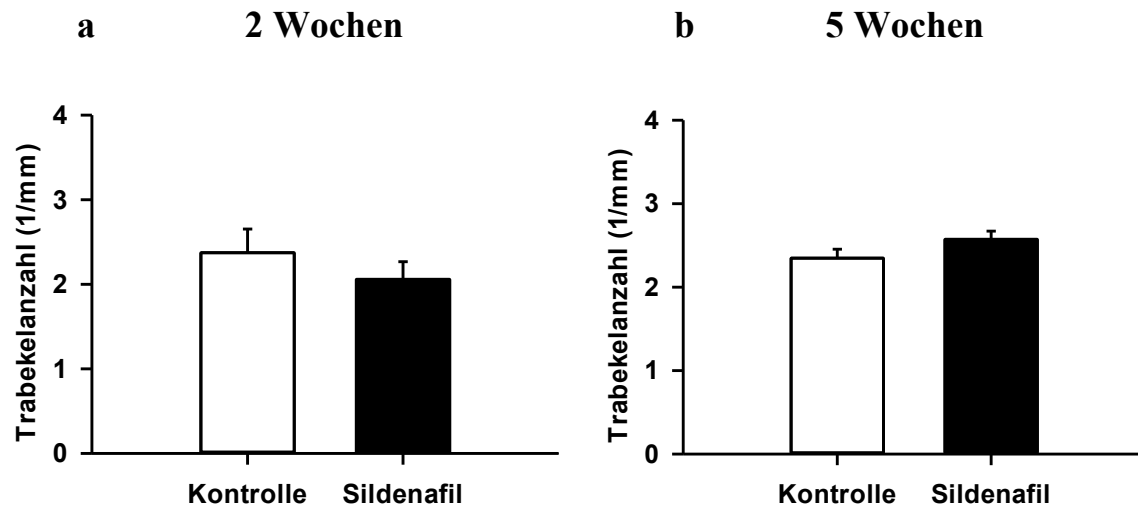


Abb. 32: Trabekelanzahl (1/mm) der Femora der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Sildenafil behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

5.4 Ergebnisse Histologie und Histomorphometrie

In der Safranin-O-Färbung zeigte sich bei der Analyse der Gesamtkallusfläche sowohl 2 Wochen (Abb. 33 a) als auch 5 Wochen (Abb. 33 b) nach der Fraktur kein signifikanter Unterschied zwischen der Sildenafilgruppe und der Kontrollgruppe.

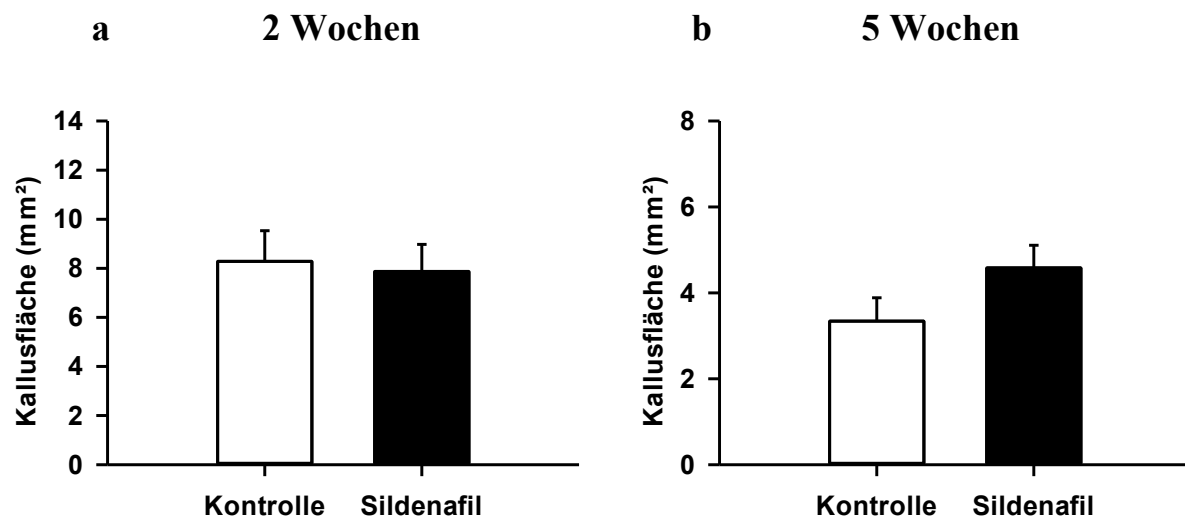


Abb. 33: Kallusfläche (mm²) der Femora der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Sildenafil behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

Nach 2 Wochen (Abb. 34 a, b) zeigten die histologischen Analysen Zeichen enchondraler Kallusbildung sowie nach 5 Wochen (Abb. 34 c, d) vollständige knöcherne Überbrückung in beiden Gruppen.

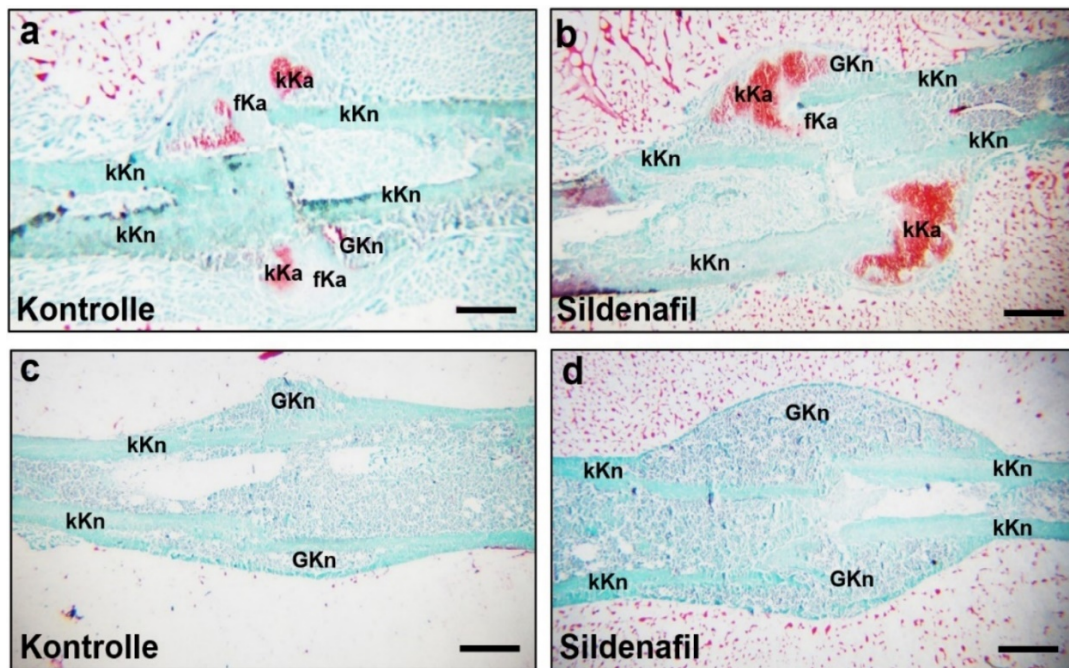


Abb. 34: Repräsentative Bilder von mit Safranin-O gefärbten Schnitten der Femora der Mäuse der Kontrollgruppe (a, c) und der Sildenafilgruppe (b, d) 2 (a, b) und 5 Wochen (c, d) nach der Fraktur. Maßstabsleisten = 1 mm
kKa = knorpeliger Kallus, fKa = fibröser Kallus, GKKn = Geflechtknochen, kKn = kortikaler Knochen

Die Analyse der Relation Kallusdurchmesser / Femurdurchmesser erbrachte 2 Wochen nach der Fraktur (Abb. 35 a) keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Fünf Wochen nach der Fraktur (Abb. 35 b) war der Kallusdurchmesser / Femurdurchmesser in der Sildenafilgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant größer.

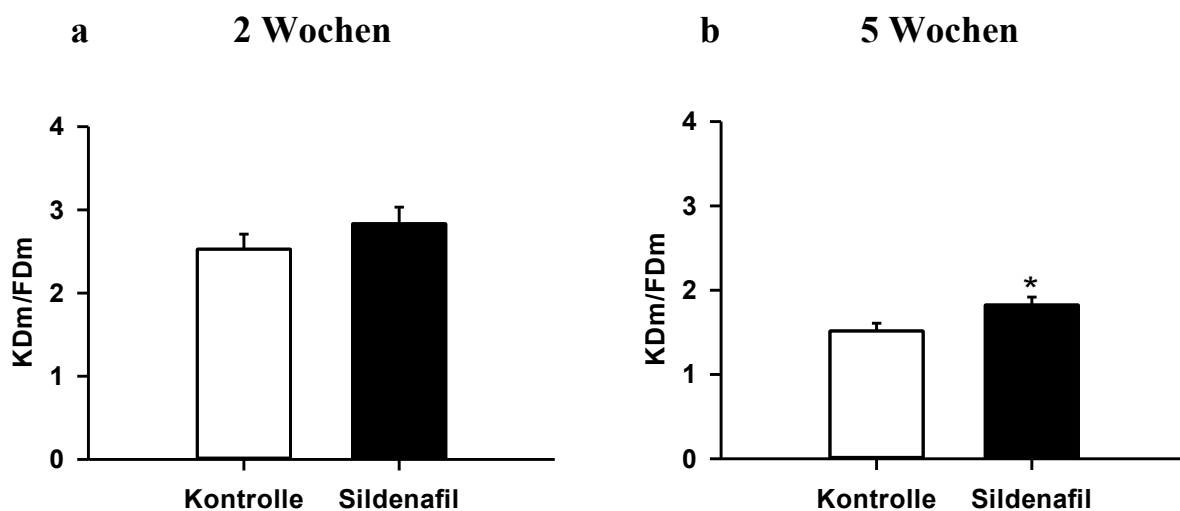


Abb. 35: Kallusdurchmesser / Femurdurchmesser der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Sildenafil

behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Zwei Wochen nach der Fraktur (Abb. 36 a) bestand der Kallus in der Kontrollgruppe zu 33,7 % aus Knochengewebe, zu 23,1 % aus Knorpelgewebe und zu 43,2 % aus fibrösem Gewebe. Der Kallus in der Sildenafilgruppe setzte sich zu 34,3 % aus Knochengewebe, zu 38,4 % aus Knorpelgewebe und zu 27,3 % aus fibrösem Gewebe zusammen. Signifikante Unterschiede ließen sich nicht feststellen, auch wenn der Kallus in der Sildenafilgruppe im Vergleich einen höheren Knorpelanteil und einen geringeren Anteil an fibrösem Gewebe aufwies.

Fünf Wochen nach der Fraktur (Abb. 36 b) bestand der Kallus in der Kontrollgruppe zu 90,8 % aus Knochengewebe, zu 0,6 % aus Knorpelgewebe und zu 8,6 % aus fibrösem Gewebe. Vergleichbar setzte sich der Kallus in der Sildenafilgruppe zu 90,2 % aus Knochengewebe, zu 0,7 % aus Knorpelgewebe und zu 9,1 % aus fibrösem Gewebe zusammen. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ließen sich hier ebenfalls nicht feststellen.

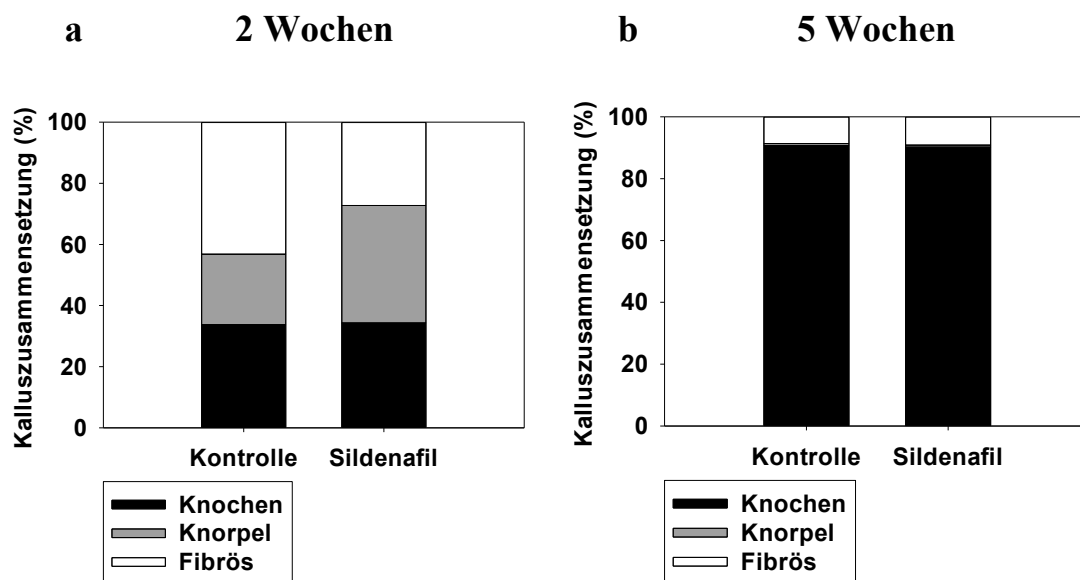


Abb. 36: Zusammensetzung des Kallus (%) der Kontrolltiere und der mit Sildenafil behandelten Mäuse 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur aus Knochen, Knorpel und fibrösem Gewebe.

Die Auswertung der Frakturüberbrückung bei den mit Sildenafil behandelten Tieren sowie den Kontrolltieren ergab weder nach 2 Wochen (Abb. 37 a) noch nach 5 Wochen (Abb. 37 b) signifikant unterschiedliche Werte beim Histo-Score.

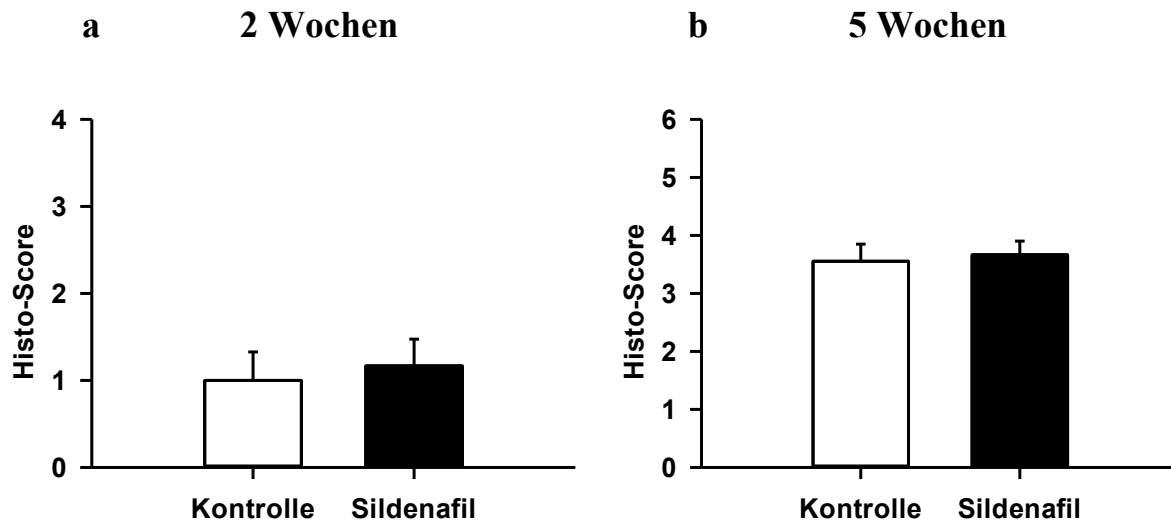


Abb. 37: Histo-Score der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Sildenafil behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

Zwei Wochen nach der Fraktur (Abb. 38 a) fand sich in der Sildenafilgruppe eine signifikant geringere Anzahl TRAP-positiver Osteoklasten / HPF im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe auch Abb. 39 a,b). Fünf Wochen nach der Fraktur (Abb. 38 b) konnte kein signifikanter Unterschied bei der Anzahl der TRAP-positiven Osteoklasten / HPF festgestellt werden (siehe auch Abb. 39 c,d).

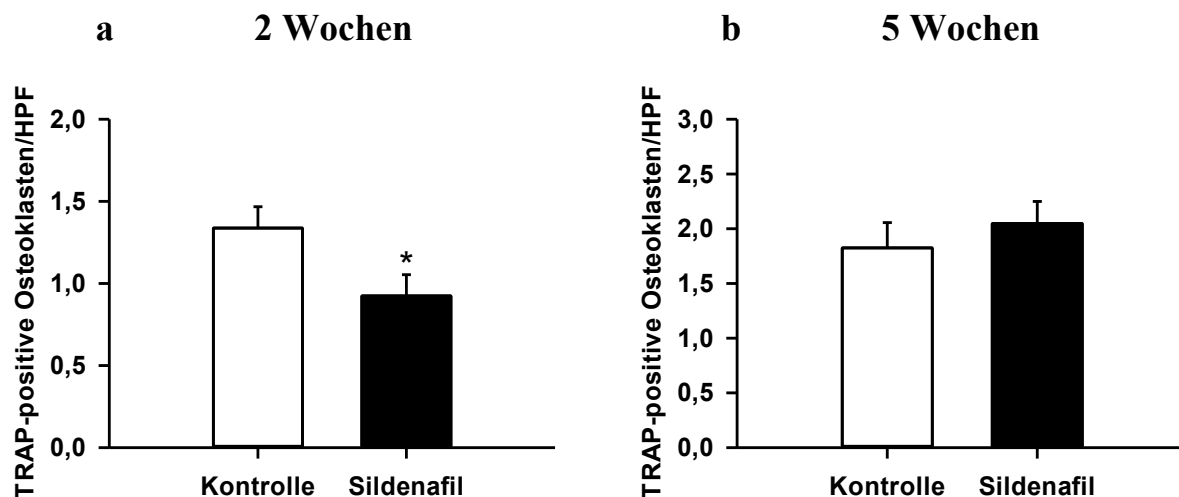


Abb. 38: TRAP-positive Osteoklasten / HPF im Kallusgewebe der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Sildenafil behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

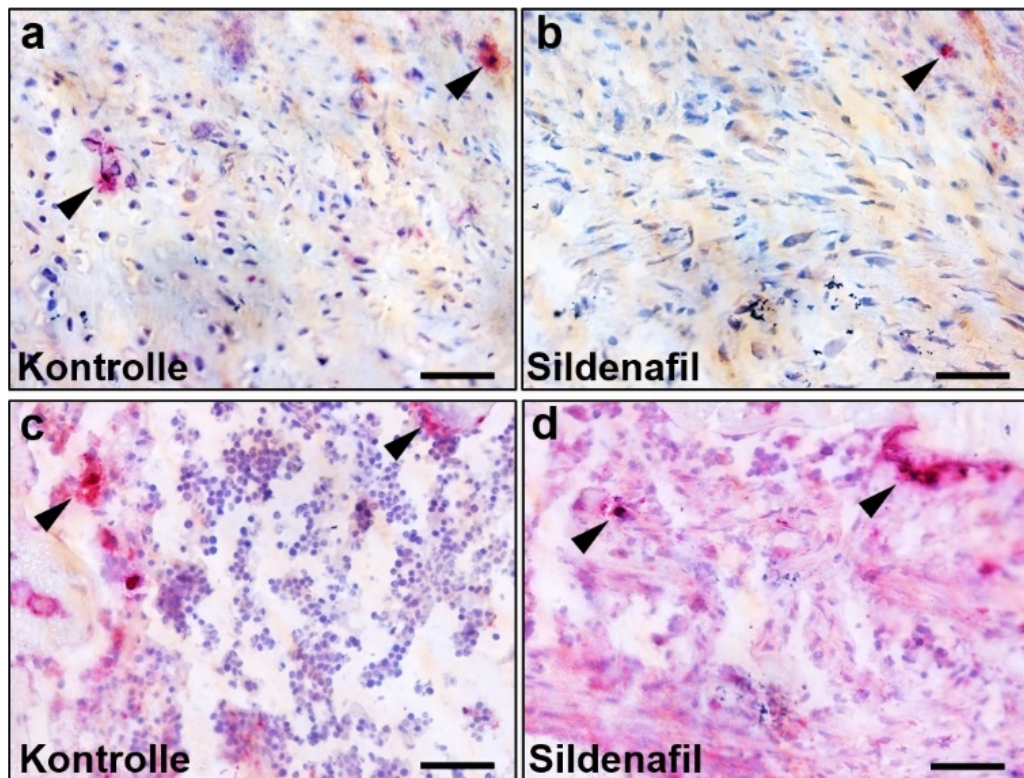


Abb. 39: Repräsentative histologische Bilder von TRAP-positiven Osteoklasten im Kallusgewebe von mit Sildenafil behandelten Tieren (b, d) und Kontrolltieren (a, c) 2 Wochen (a, b) sowie 5 Wochen (c, d) nach der Fraktur. Die TRAP-positiven Osteoklasten sind jeweils durch Pfeilspitzen markiert. Maßstabsleisten: 50 µm

5.5 Ergebnisse Immunhistochemie

Ein signifikanter Unterschied bei der Anzahl der CD31-positiven Blutgefäße / HPF war weder nach 2 Wochen (Abb. 40 a) noch nach 5 Wochen (Abb. 40 b) feststellbar (siehe auch Abb. 41 a-d).

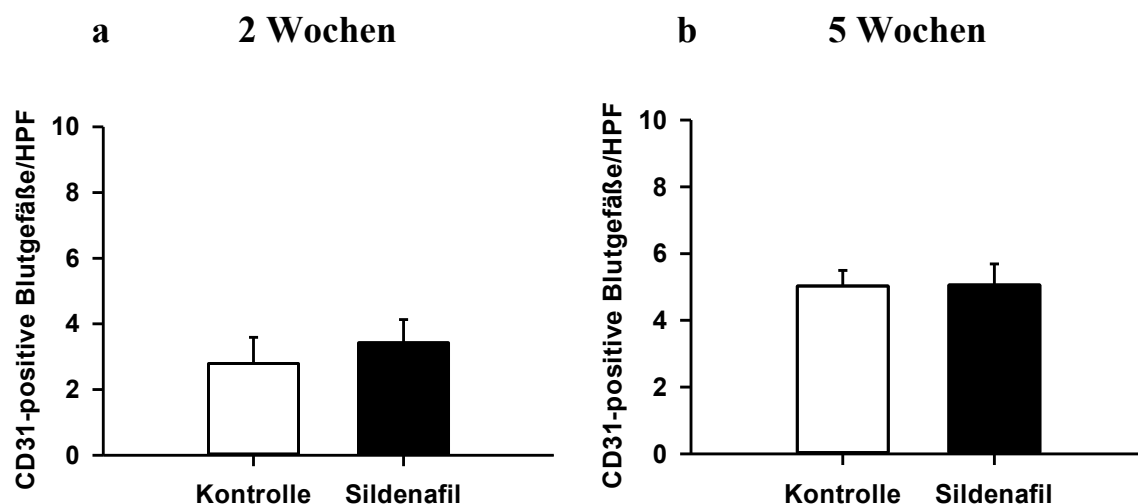


Abb. 40: CD31-positiv Blutgefäße / HPF im Kallusgewebe der Kontrolltiere und der mit Sildenafil behandelten Mäuse 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben.

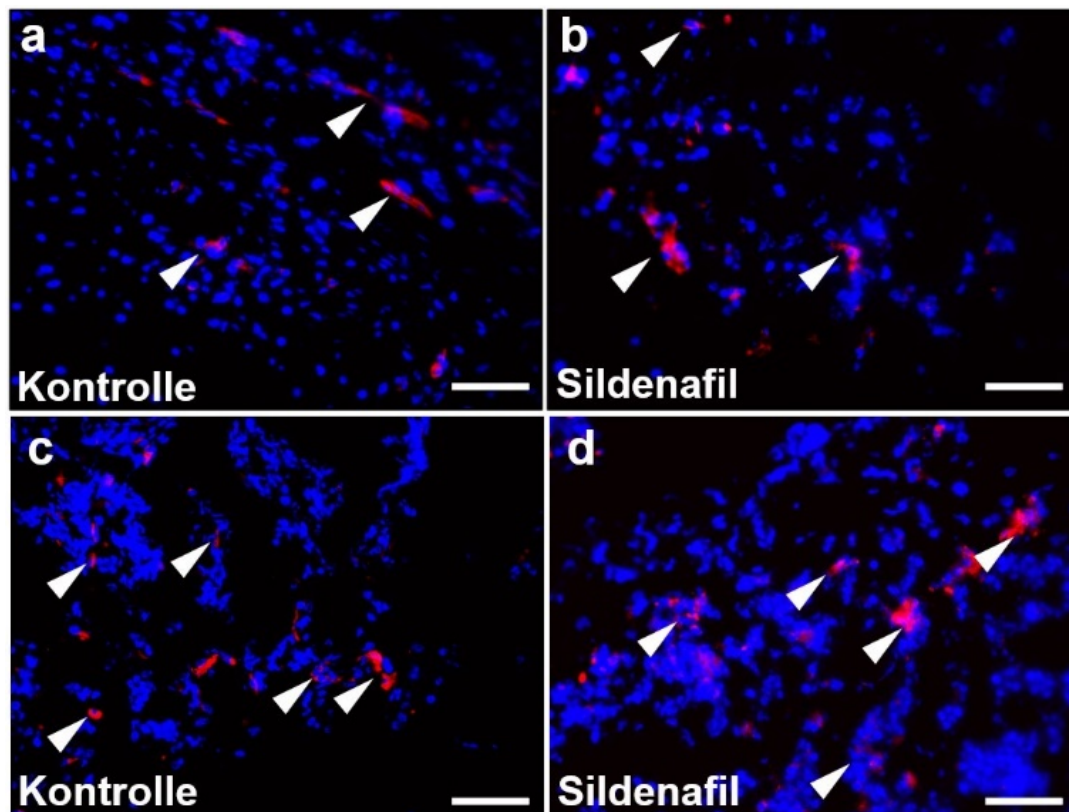


Abb. 41: Repräsentative immunhistochemische Bilder von CD-31-positiven Mikrogefäßen im Kallusgewebe der Kontrolltiere (a, c) und der mit Sildenafil behandelten Mäuse (b, d) 2 Wochen (a, b) sowie 5 Wochen (c, d) nach der Fraktur. Die Mikrogefäße sind jeweils durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Maßstabsleisten: 50 µm

Ein signifikanter Unterschied zwischen der Sildenafilgruppe und der Kontrollgruppe bei der Anzahl der MPO-positiven Granulozyten / HPF war weder 2 Wochen (Abb. 42 a) noch 5 Wochen nach der Fraktur (Abb. 42 b) feststellbar (siehe auch Abb. 43 a-d).

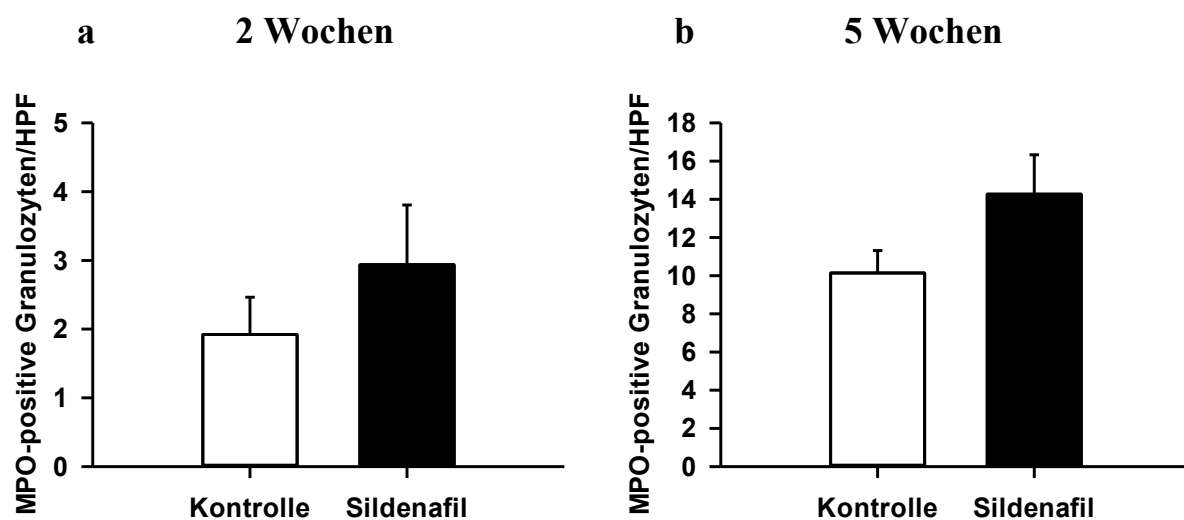


Abb. 42: MPO-positive Granulozyten / HPF im Kallusgewebe der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Sildenafil behandelten Mäuse 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben.

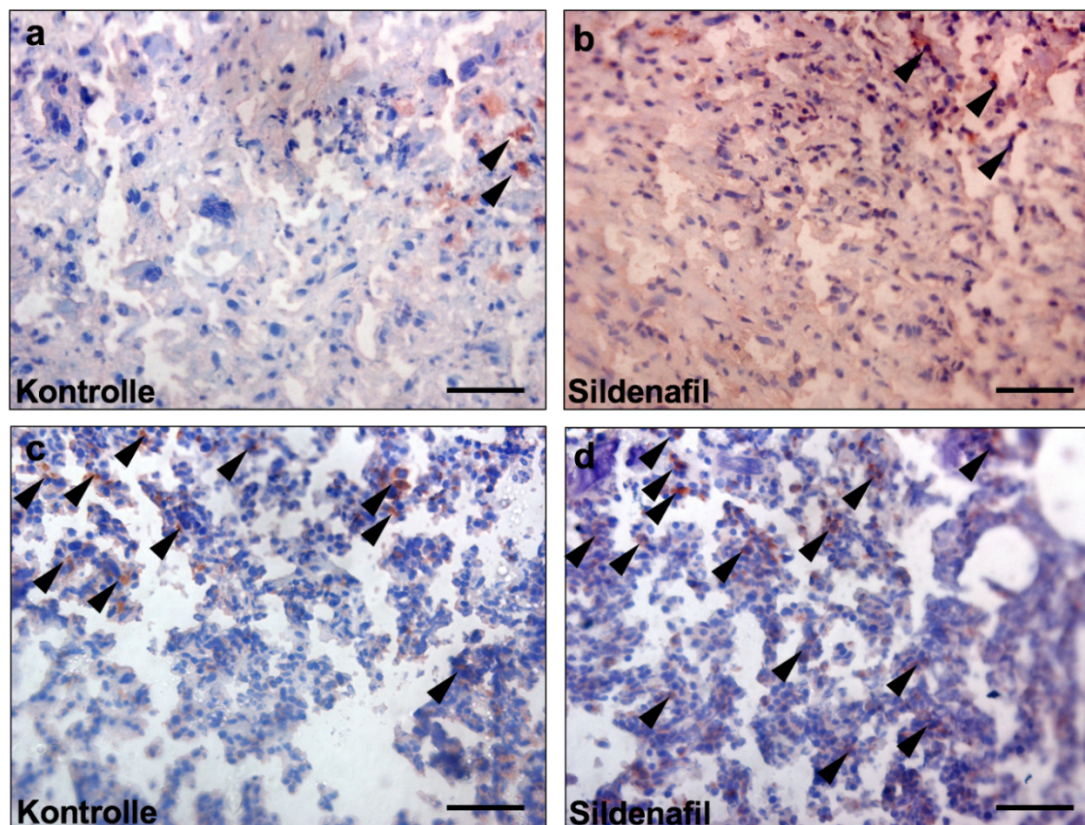


Abb. 43: Repräsentative immunhistochemische Bilder MPO-positiver Granulozyten im Kallusgewebe von mit Sildenafil behandelten Tieren (b, d) und Kontrolltieren (a, c) 2 Wochen (a, b) sowie 5 Wochen (c, d) nach der Fraktur. Die MPO-positiven Granulozyten sind jeweils durch Pfeilspitzen markiert. Maßstabsleisten: 50 μm

Bei der Analyse der CD68-positiven Zellen / HPF waren weder nach 2 (Abb. 44 a) noch nach 5 Wochen (Abb. 44 b) signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu erkennen (siehe auch Abb. 45)

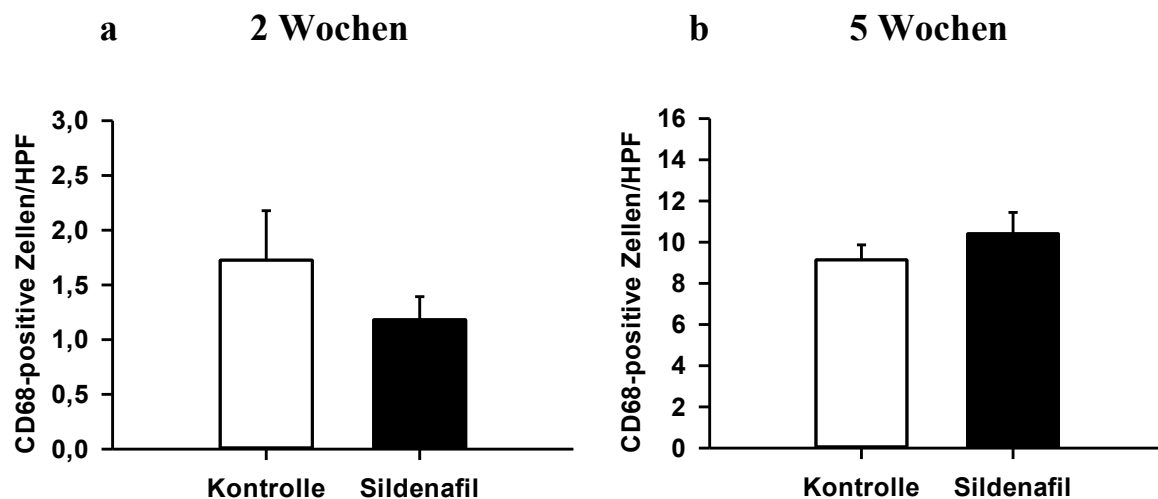


Abb. 44: CD68-positive Zellen / HPF im Kallusgewebe der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Sildenafil behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

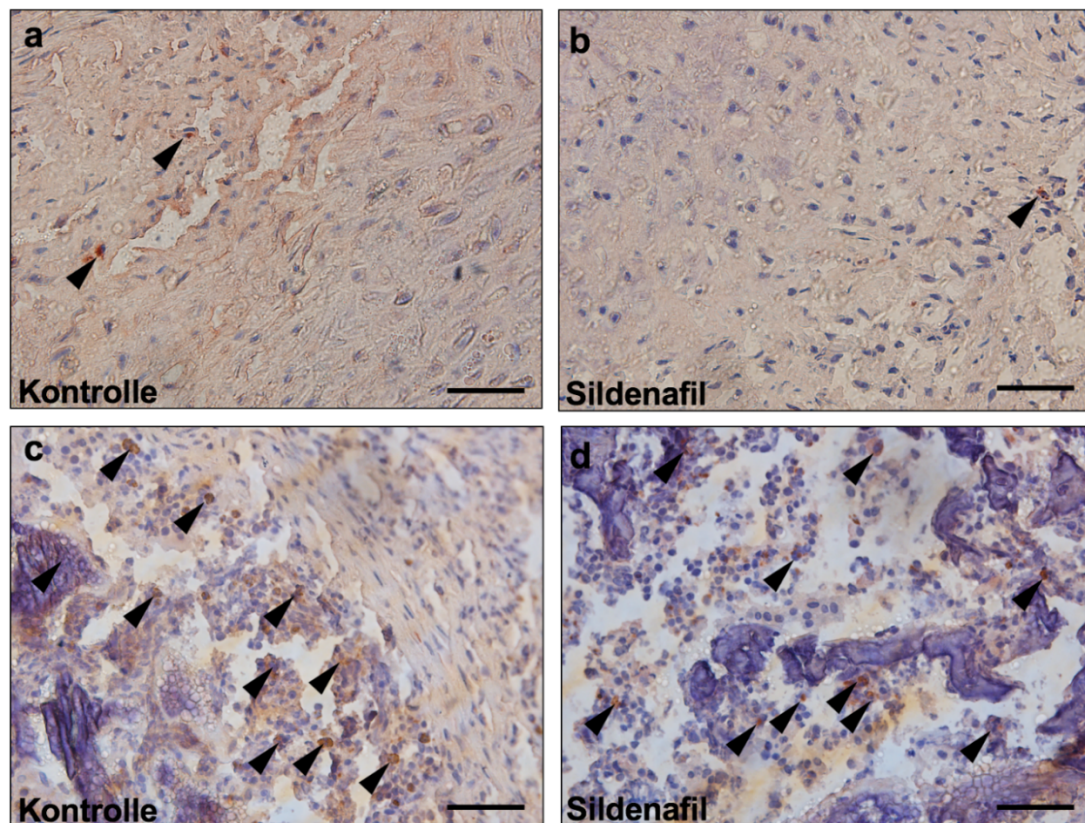


Abb. 45: Repräsentative immunhistochemische Bilder CD68-positiver Zellen im Kallusgewebe von mit Sildenafil behandelten Tieren (b, d) und Kontrolltieren (a, c) 2 Wochen (a, b) sowie 5 Wochen (c, d) nach der Fraktur. Die CD68-positiven Zellen sind jeweils durch Pfeilspitzen markiert. Maßstabsleisten: 50 µm

5.6 Ergebnisse Western Blot

Bei der Untersuchung des Proteins OPG (Abb. 46, Abb. 47 a) zeigte sich in der Sildenafilgruppe eine signifikant stärkere Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei der Analyse der Expression des Proteins RANKL (Abb. 46, Abb. 47 b) fand sich kein signifikanter Unterschied.

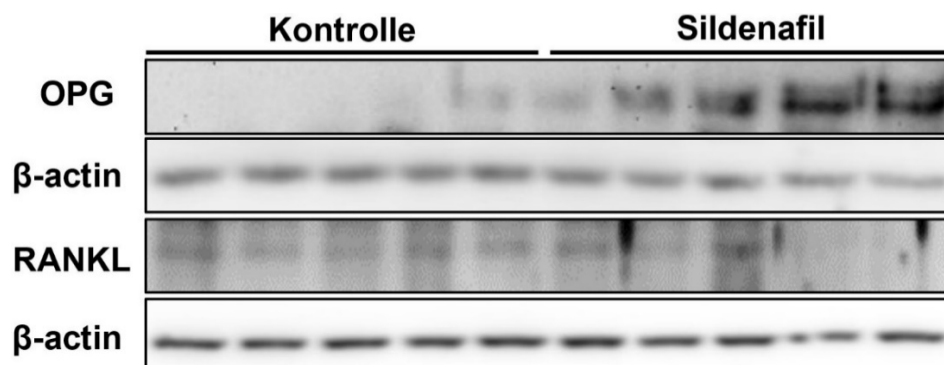


Abb. 46: Western-Blot-Analyse der Proteinexpression von OPG und RANKL im Kallusgewebe der Kontrolltiere und der mit Sildenafil behandelten Mäuse 2 Wochen nach der Fraktur.

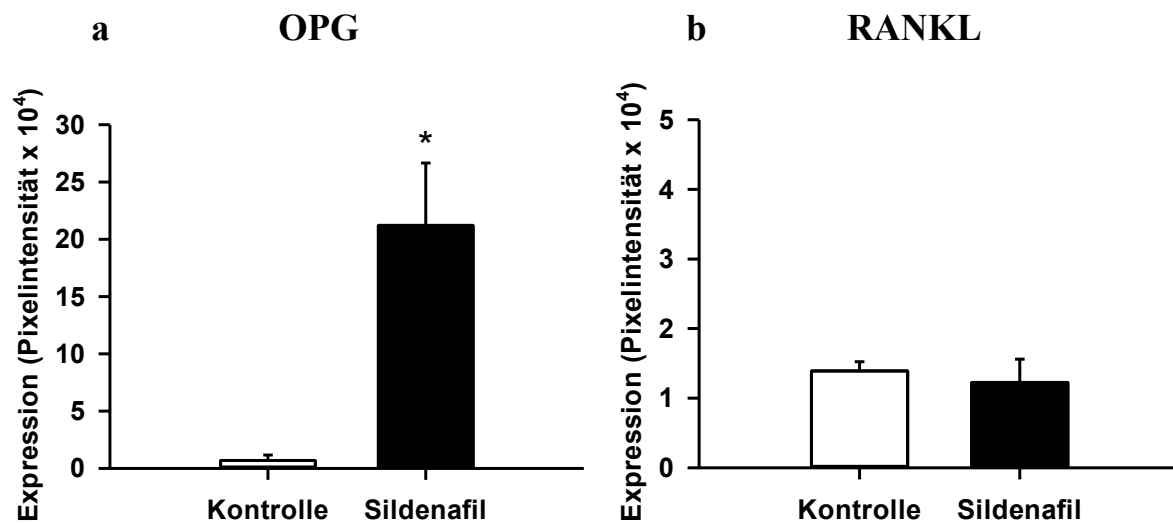


Abb. 47: Quantitative Analyse der Expression von OPG (a) und RANKL (b) im Kallusgewebe der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Sildenafil behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Bei der Analyse der Expression von VEGF (Abb. 48, Abb. 49 a) zeigte die Sildenafilgruppe eine höhere Pixelintensität im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Bei der Expression von CYR61 (Abb. 48, Abb. 49 a) ergab sich ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Sildenafilgruppe und der Kontrollgruppe.

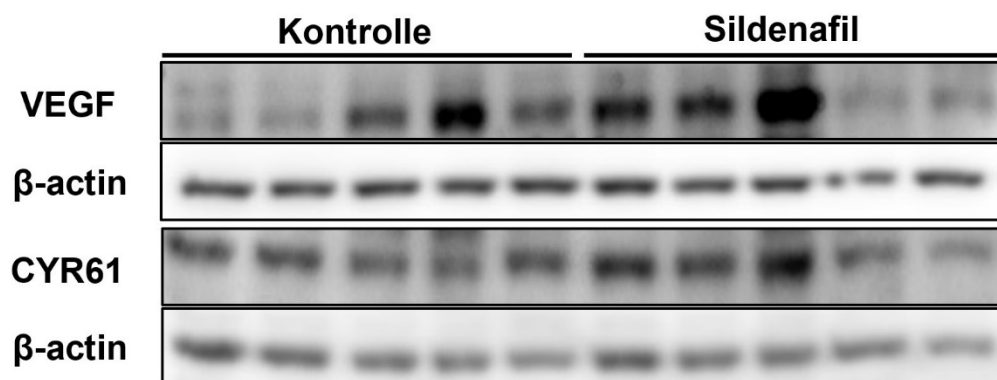


Abb. 48: Western-Blot-Analyse der Proteinexpression von VEGF und CYR61 im Kallusgewebe der Kontrolltiere und der mit Sildenafil behandelten Mäuse 2 Wochen nach der Fraktur.

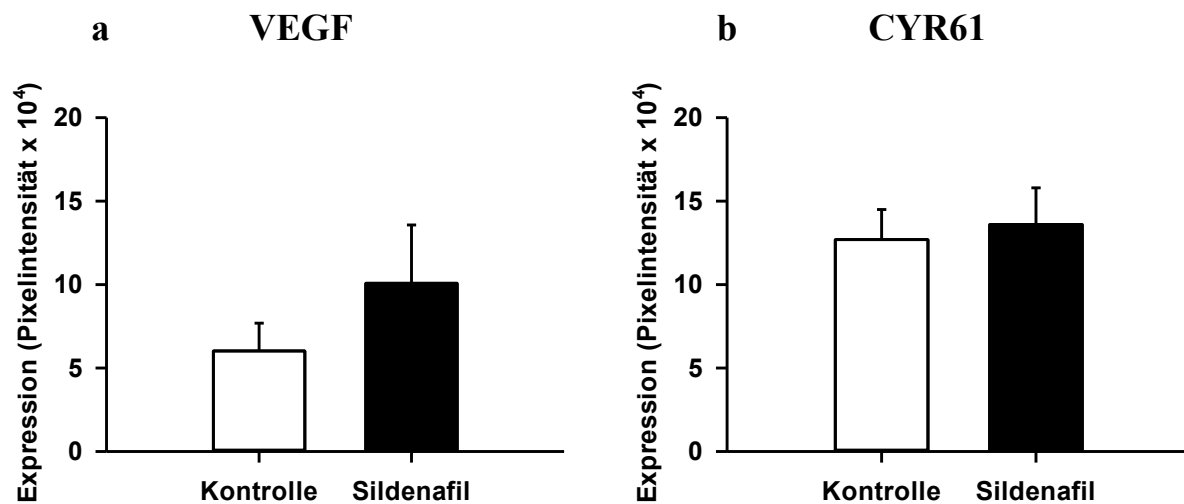


Abb. 49: Quantitative Analyse der Expression von VEGF (a) und CYR61 (b) im Kallusgewebe der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Sildenafil behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

Das Protein Nrf2 zeigte bei der Analyse nach 2 Wochen in der Sildenafilgruppe eine signifikant geringere Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 50, Abb. 51 a). Bei der Expression von HO-1 war kein signifikanter Unterschied zwischen Sildenafilgruppe und Kontrollgruppe erkennbar (Abb. 50, Abb. 51 b).

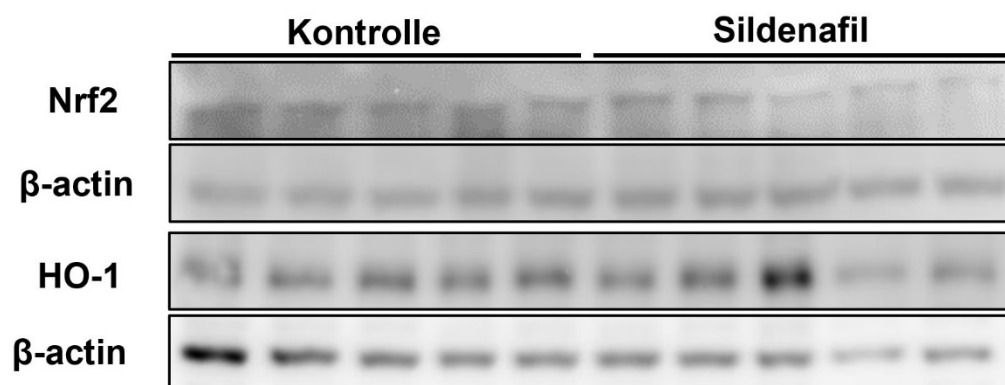


Abb. 50: Western-Blot-Analyse der Proteinexpression von Nrf2 und HO-1 im Kallusgewebe der Kontrolltiere und der mit Sildenafil behandelten Mäuse 2 Wochen nach der Fraktur.

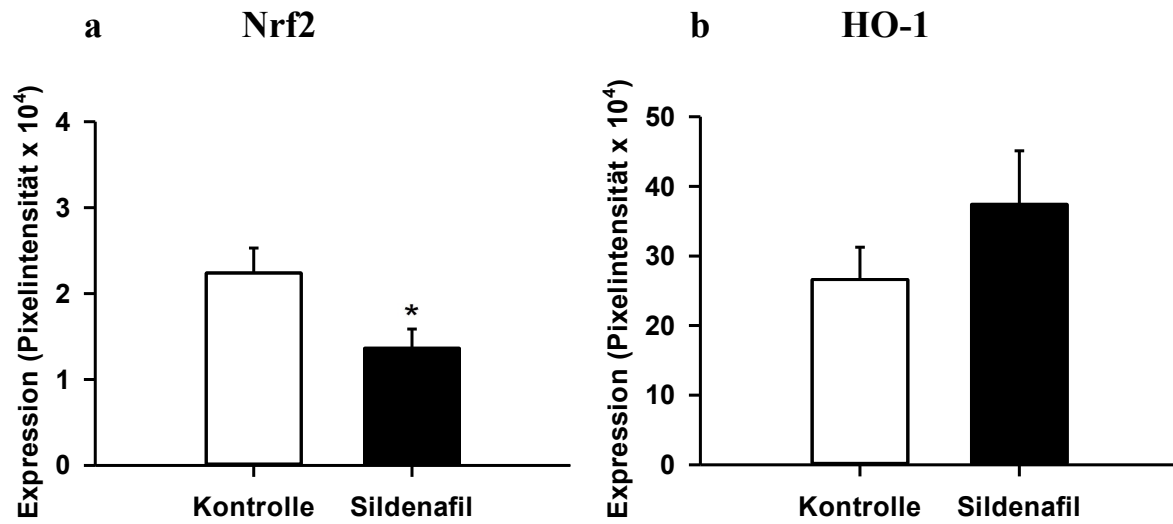


Abb. 51: Quantitative Analyse der Expression von Nrf2 (a) und HO-1 (b) im Kallusgewebe der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Sildenafil behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

6 Ergebnisse Cilostazol

6.1 Ergebnisse Röntgen

Zwei Wochen nach der Fraktur (Abb. 52 a, c) zeigten sich deutliche Anzeichen einer Kallusbildung bei den mit Cilostazol behandelten Tieren und den Kontrolltieren. Fünf Wochen nach der Fraktur (Abb. 52 b, d) zeigten die Femora beider Gruppen eine vollständige knöcherne Überbrückung.

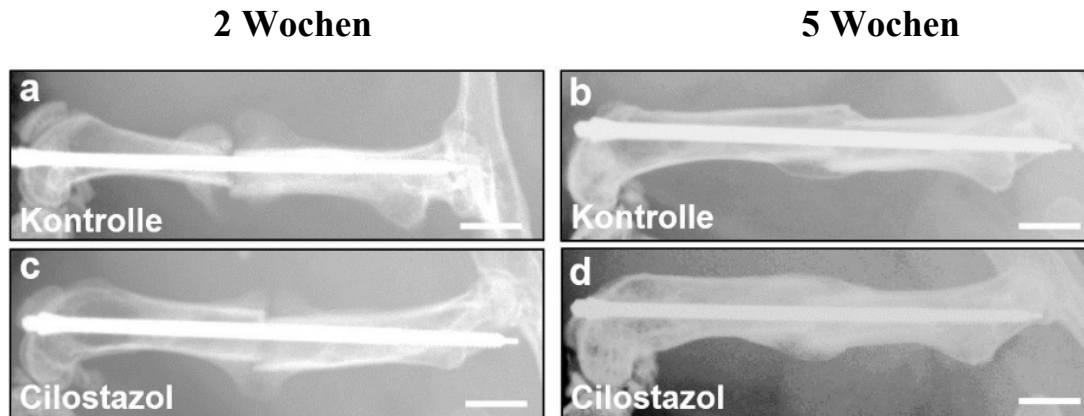


Abb. 52: Repräsentative Röntgenbilder der frakturierten Femora der mit Cilostazol behandelten Mäusen (c, d) und der Mäuse der Kontrollgruppe (a, b) nach 2 (a, c) und 5 Wochen (b, d). Maßstabsleisten: 2 mm

6.2 Ergebnisse Biomechanik

Zwei Wochen nach der Fraktur (Abb. 53 a) erreichten die Femora der mit Cilostazol behandelten Tiere eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höhere Biegesteifigkeit. Fünf Wochen nach der Fraktur (Abb. 53 b) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen.

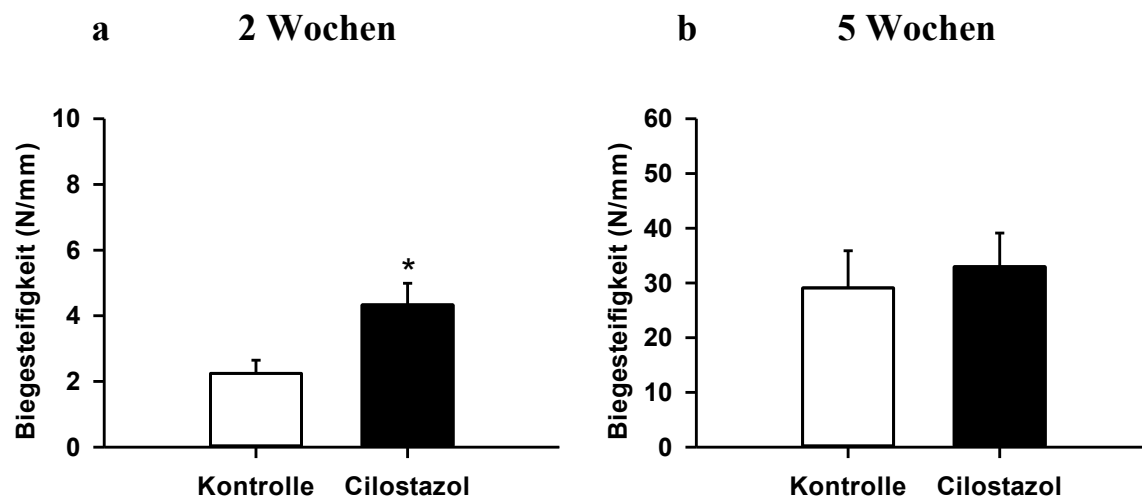


Abb. 53: Biegesteifigkeiten (N/mm) der Kontrollen (weiße Balken) und der mit Cilostazol behandelten Tiere (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur in. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben.

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Die kontralateralen nicht frakturierten Femora zeigten im Vergleich der Cilostazolgruppe mit der Kontrollgruppe weder nach 2 (Abb. 54 a) noch nach 5 Wochen (Abb. 54 b) signifikante Unterschiede bei der gemessenen Biegesteifigkeit.



Abb. 54: Biegesteifigkeiten (N/mm) der nicht frakturierten kontralateralen Femora der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Cilostazol behandelten Tiere (schwarze Balken) nach 2 (a) und 5 (b) Wochen Versuchszeit. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

In Relation zu den nicht frakturierten kontralateralen Femora zeigten die frakturierten Femora zwei Wochen nach der Fraktur (Abb. 55 a) in der Cilostazolgruppe signifikant höhere Werte bei den gemessenen Biegesteifigkeiten als in der Kontrollgruppe. Fünf Wochen nach der Fraktur (Abb. 55 b) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen.

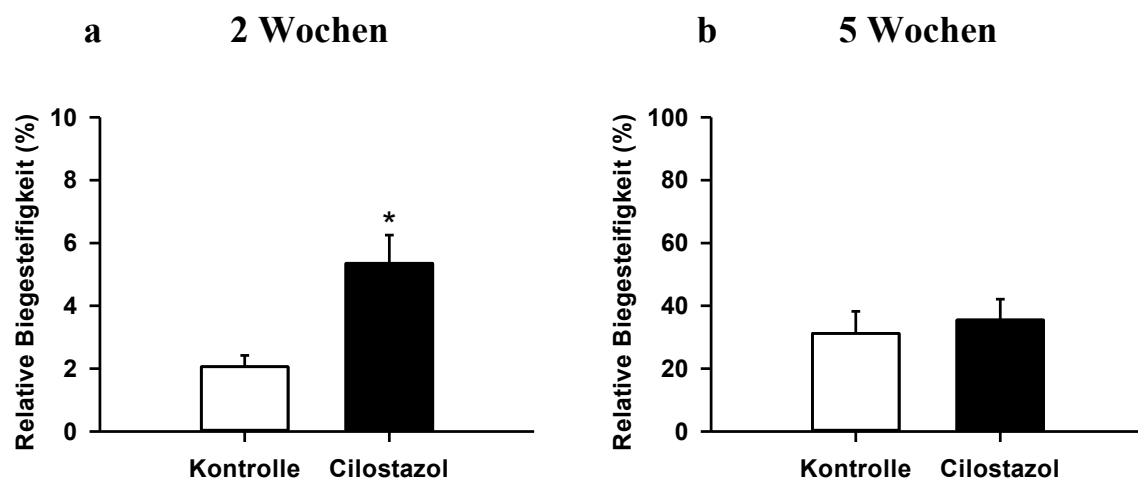


Abb. 55: Relative Biegesteifigkeiten der frakturierten Femora in Relation zu den nicht frakturierten kontralateralen Femora der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Cilostazol behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

6.3 Ergebnisse μ CT

In Übereinstimmung mit den Röntgenbildern zeigte die μ CT-Bildgebung deutliche Anzeichen für enchondrale Knochenheilung mit Kallusbildung 2 Wochen nach der Fraktur (Abb. 56 a, b) sowie knöcherner Überbrückung 5 Wochen nach der Fraktur (Abb. 56 c, d) in beiden Gruppen.

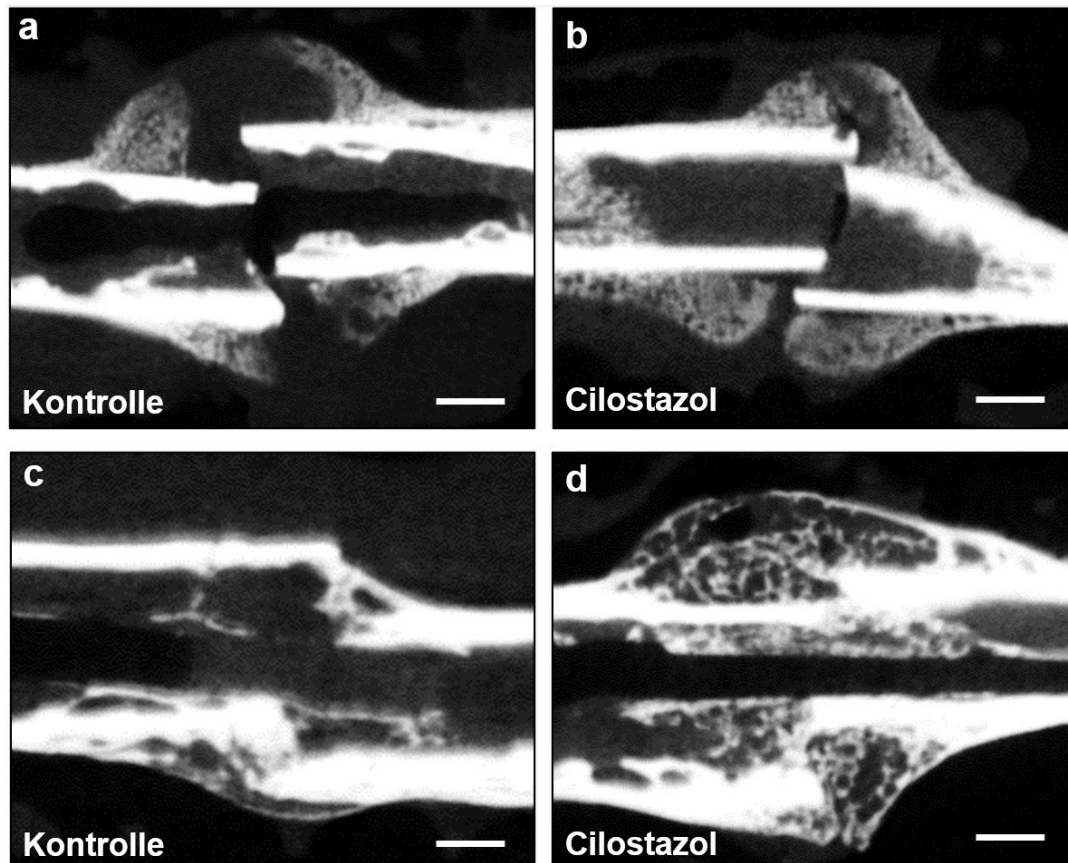


Abb. 56: Repräsentative μ CT-Bilder der Femora der Kontrolltiere (a, c) und der mit Cilostazol behandelten Mäuse (b, d) 2 (a, b) und 5 Wochen (c, d) nach der Fraktur. Maßstabsleisten = 1,5 mm

Das Kallusvolumen zeigte sich 2 Wochen nach der Fraktur (Abb. 57 a) in der Cilostazolgruppe signifikant größer als in der Kontrollgruppe. Fünf Wochen nach der Fraktur (Abb. 57 b) ergab sich ebenfalls ein signifikant größeres Kallusvolumen in der Cilostazolgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

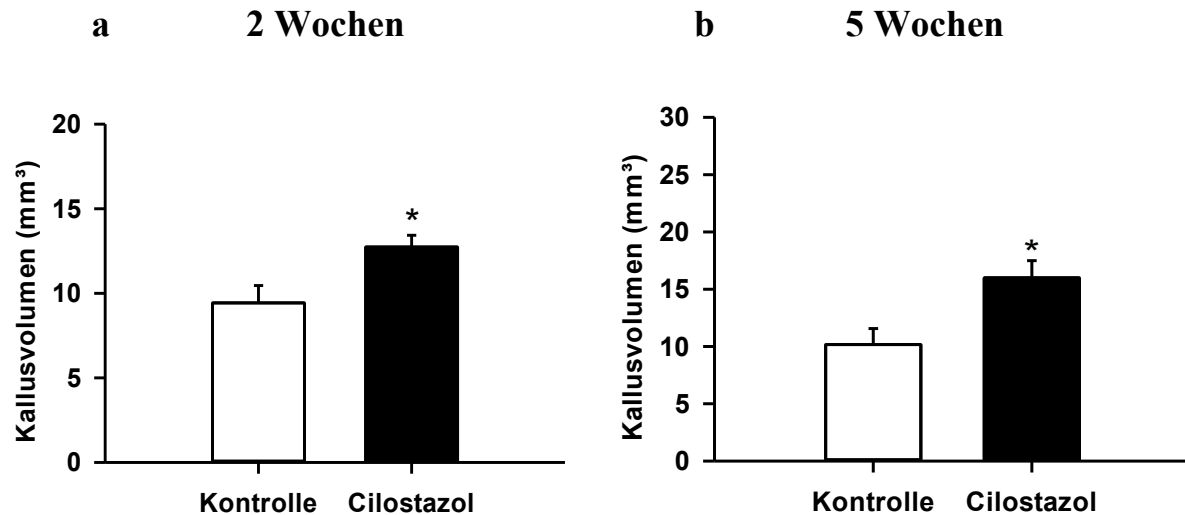


Abb. 57: Kallusvolumen (mm³) der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Cilostazol behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Bei der Analyse des gesamten Knochenvolumen zeigte sich 2 Wochen nach der Fraktur (Abb. 58 a) kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Cilostazolgruppe. Fünf Wochen nach der Fraktur (Abb. 58 b) war das gesamte Knochenvolumen in der Cilostazolgruppe signifikant größer als in der Kontrollgruppe.

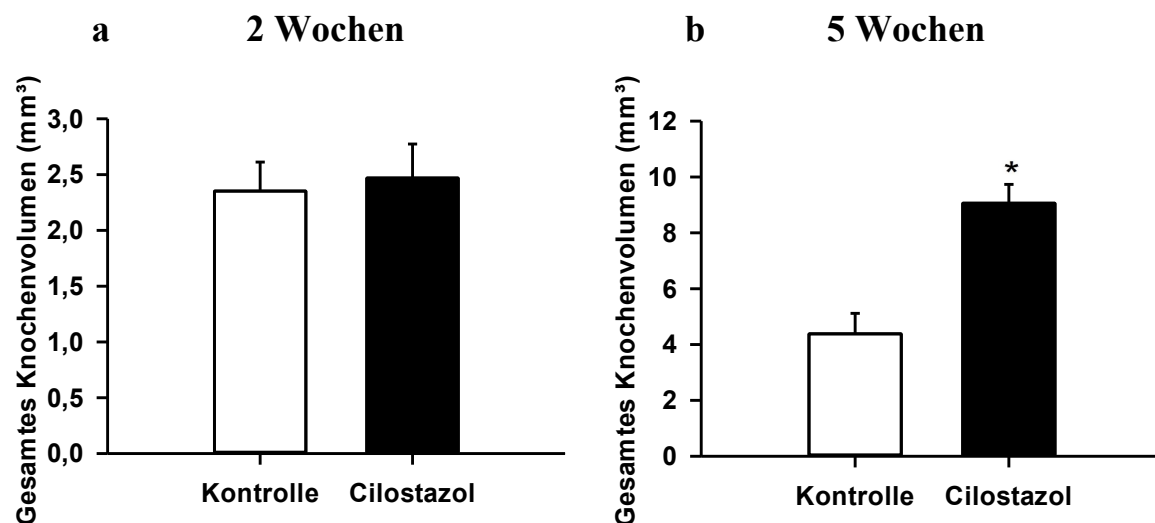


Abb. 58: Gesamtes Knochenvolumen (mm³) der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Cilostazol behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Das niedrig mineralisierte Knochenvolumen zeigte 2 Wochen nach der Fraktur (Abb. 59 a) keinen signifikanten Unterschied zwischen der Cilostazolgruppe und der Kontrollgruppe. Fünf Wochen nach der Fraktur (Abb. 59 b) fand sich in der Cilostazolgruppe ein signifikant größeres niedrig mineralisiertes Knochenvolumen als in der Kontrollgruppe.

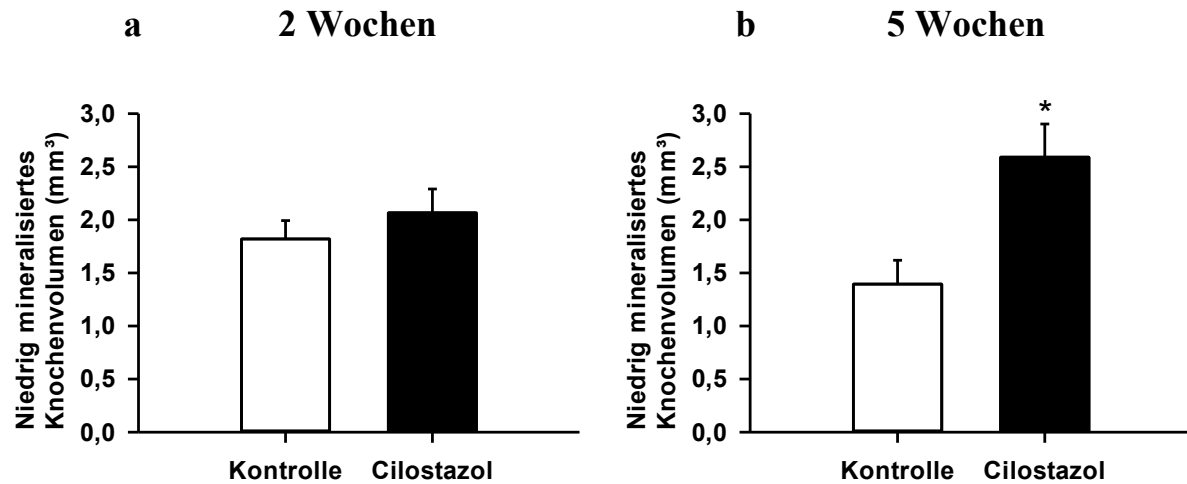


Abb. 59: Niedrig mineralisiertes Knochenvolumen (mm³) der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Cilostazol behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. * p < 0,05 vs. Kontrolle

Das hoch mineralisierte Knochenvolumen zeigte 2 Wochen nach der Fraktur (Abb. 60 a) keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen. Fünf Wochen nach der Fraktur (Abb. 60 b) war das hoch mineralisierte Knochenvolumen in der Cilostazolgruppe signifikant größer als in der Kontrollgruppe.



Abb. 60: Hoch mineralisiertes Knochenvolumen (mm³) der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Cilostazol behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. * p < 0,05 vs. Kontrolle

Ein signifikanter Unterschied zwischen der Cilostazolgruppe und der Kontrollgruppe beim Anteil des Knochenvolumens am Gesamtvolumen des Kallus 2 Wochen nach der Fraktur (Abb. 61 a) konnte nicht festgestellt werden. Demgegenüber war der Anteil des Knochenvolumens am Gesamtvolumen des Kallus 5 Wochen nach der Fraktur (Abb. 61 b) in der Cilostazolgruppe signifikant größer als in der Kontrollgruppe.

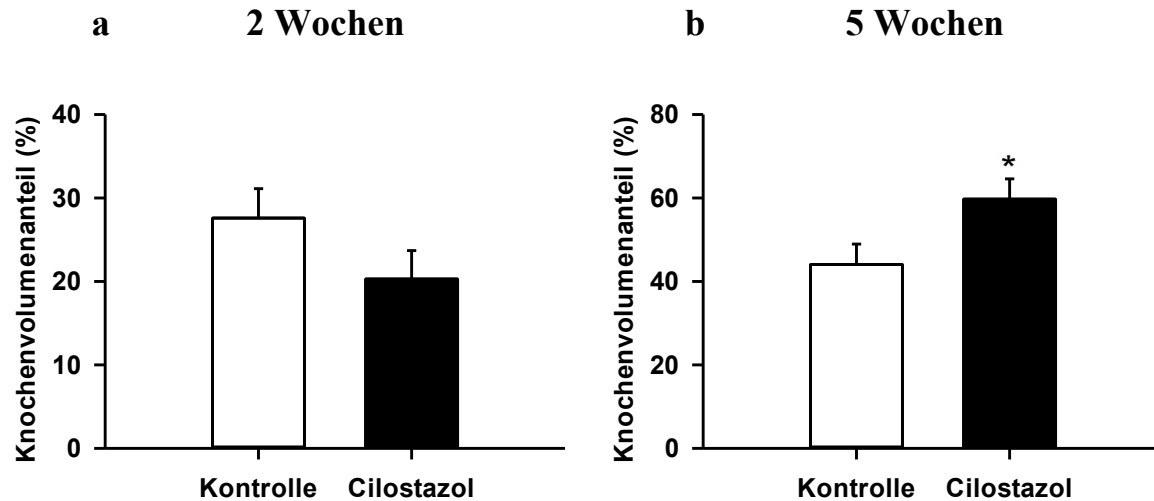


Abb. 61: Anteil des Knochenvolumens am Gesamtvolumen des Kallus (%) der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Cilostazol behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Bei der Analyse der Knochenoberflächendichte zeigte sich weder 2 (Abb. 62 a) noch 5 Wochen (Abb. 62 b) nach der Fraktur ein signifikanter Unterschied zwischen Cilostazolgruppe und Kontrollgruppe.

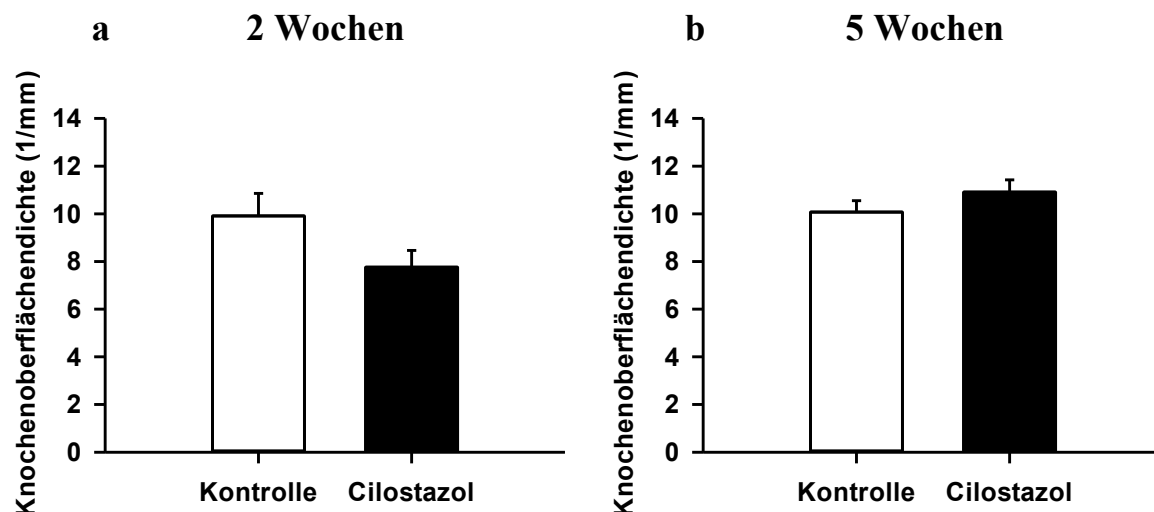


Abb. 62: Knochenoberflächendichte (1/mm) der Femora der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Cilostazol behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

Bei der Analyse der Trabekeldicke zeigten sich weder 2 Wochen (Abb. 63 a) noch 5 Wochen (Abb. 63 b) nach der Fraktur signifikante Unterschiede zwischen der Cilostazolgruppe und der Kontrollgruppe.

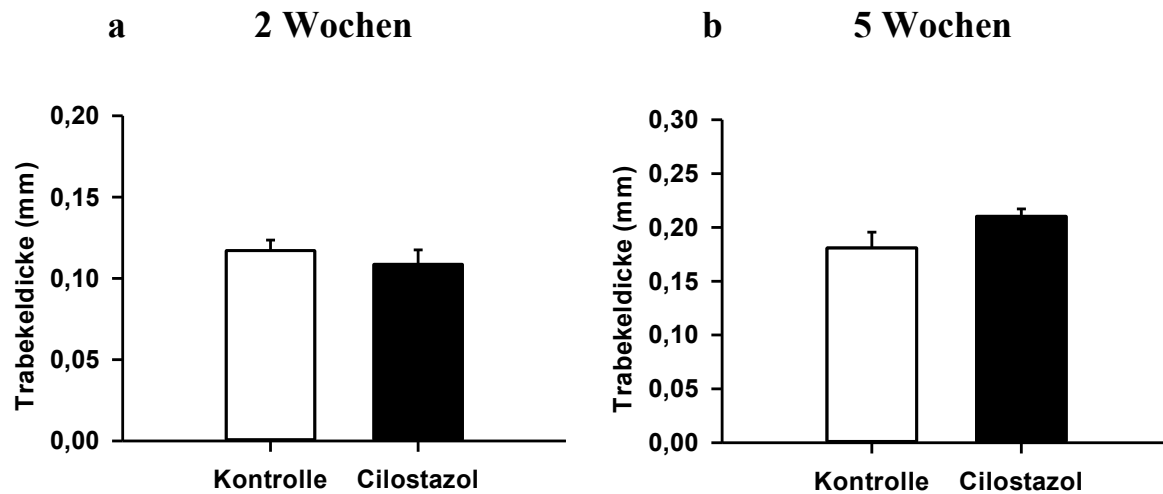


Abb. 63: Trabekeldicke (mm) der Femora der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Cilostazol behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

Bei der Analyse des Trabekelabstandes 2 Wochen nach der Fraktur (Abb. 64 a) war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen feststellbar. Fünf Wochen nach der Fraktur (Abb. 64 b) war der Trabekelabstand in der Cilostazolgruppe signifikant geringer als in der Kontrollgruppe.

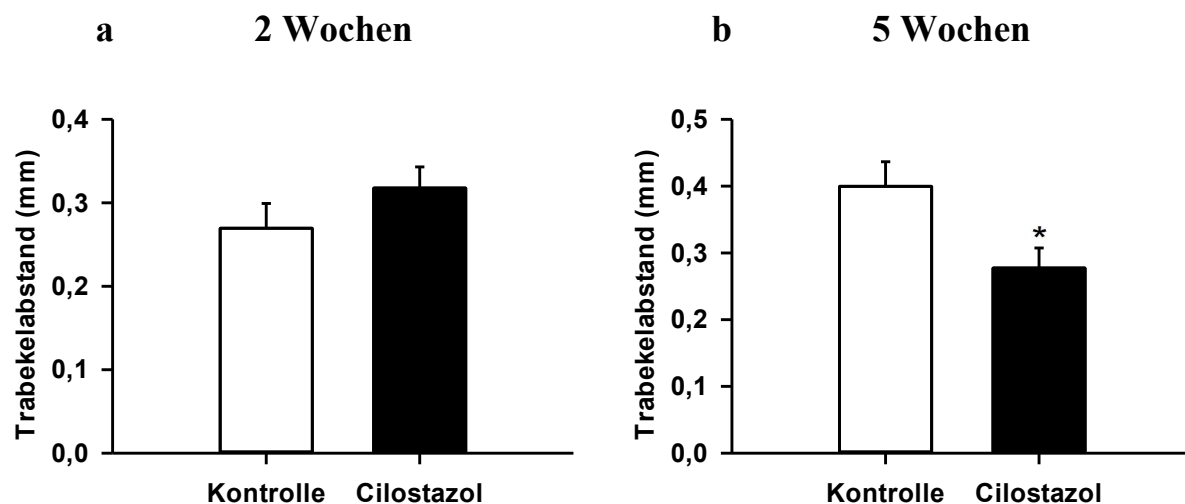


Abb. 64: Trabekelabstand (mm) der Femora der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Cilostazol behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Bei der Analyse der Trabekelanzahl bestand sowohl 2 (Abb. 65 a) als auch 5 Wochen (Abb. 65 b) nach der Fraktur kein signifikanter Unterschied zwischen der Cilostazolgruppe und der Kontrollgruppe.

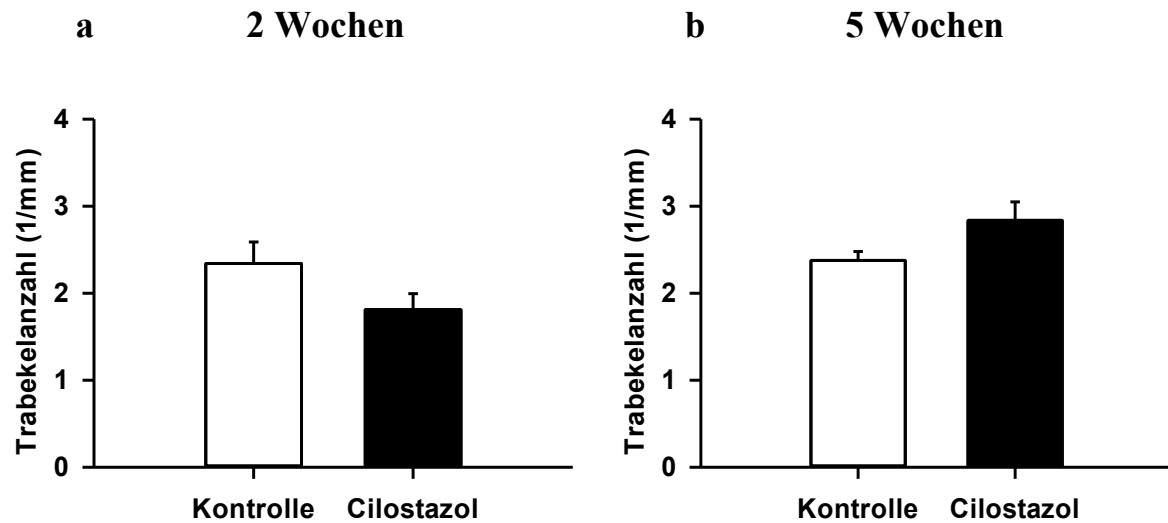


Abb. 65: Trabekelanzahl (1/mm) der Femora der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Cilostazol behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

6.4 Ergebnisse Histologie und Histomorphometrie

In der Safranin-O-Färbung zeigte sich bei der Analyse der gesamten Kallusfläche weder 2 Wochen nach der Fraktur (Abb. 67 a) noch 5 Wochen nach der Fraktur (Abb. 67 b) ein signifikanter Unterschied zwischen der Cilostazolgruppe und der Kontrollgruppe.

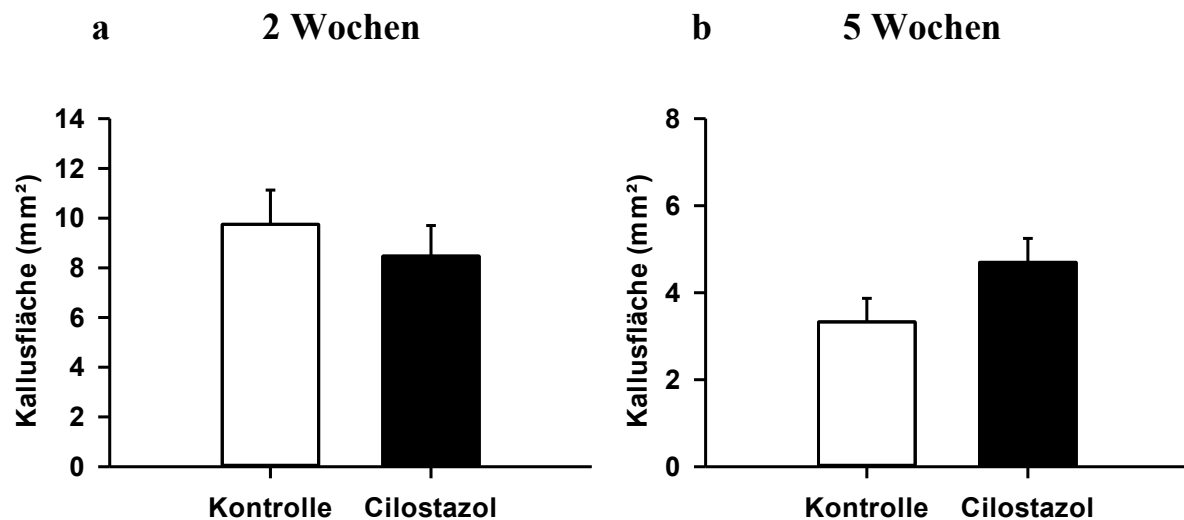


Abb. 67: Kallusfläche (mm²) der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Cilostazol behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

Die histologischen Analysen zeigten in beiden Gruppen deutliche Anzeichen einer enchondralen Kallusbildung 2 Wochen nach der Fraktur (Abb. 66 a, b) sowie eine vollständige knöcherne Überbrückung 5 Wochen nach der Fraktur (Abb. 66 c, d).

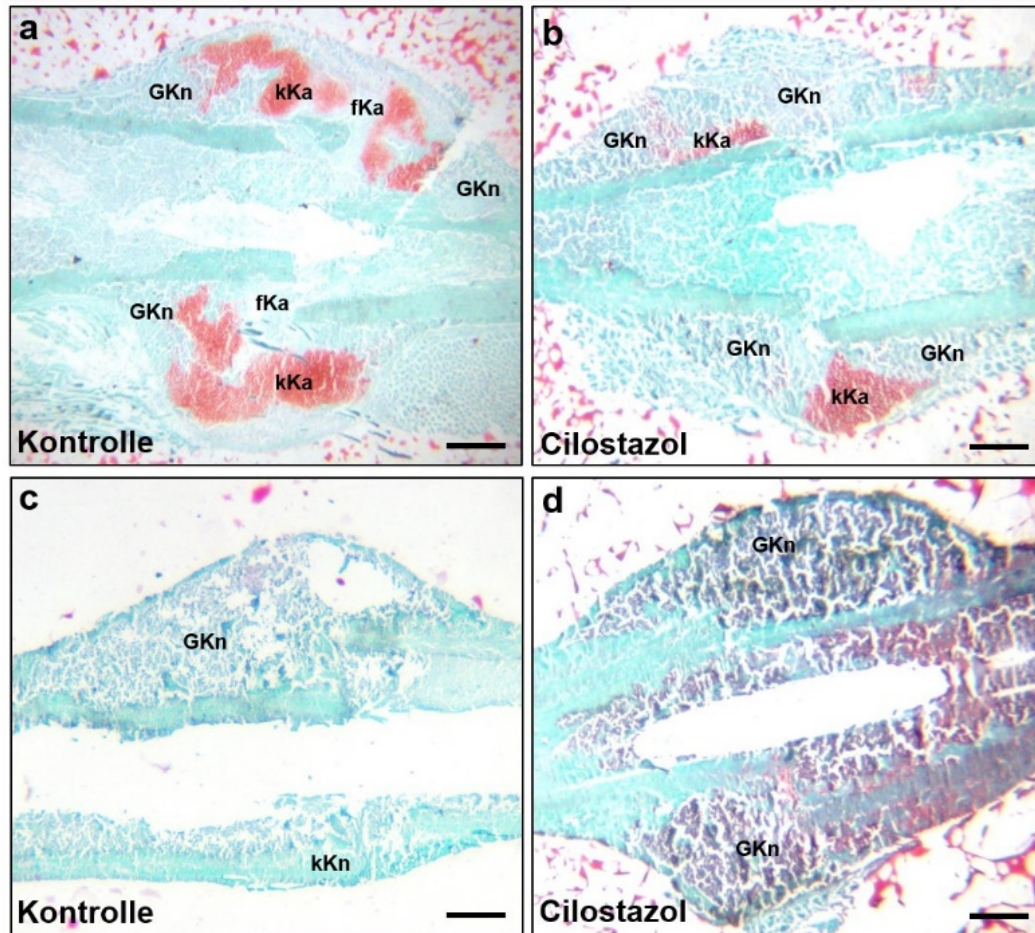


Abb. 66: Repräsentative histologische Bilder von mit Safranin-O gefärbten Schnitte der Femora der Kontrolltiere (a, c) und der mit Cilostazol (b, d) behandelten Mäuse 2 (a, b) und 5 Wochen (c, d) nach der Fraktur. kKa= knorpeliger Kallus, fKa= fibröser Kallus, GKn= Geflechtknochen, kKn= kortikaler Knochen
Maßstabsleisten = 1 mm

Die Analyse der Relation Kallusdurchmesser / Femurdurchmesser zeigte weder 2 Wochen (Abb. 68 a) noch 5 Wochen (Abb. 68. b) nach der Fraktur einen signifikanten Unterschied zwischen Cilostazolgruppe und Kontrollgruppe.

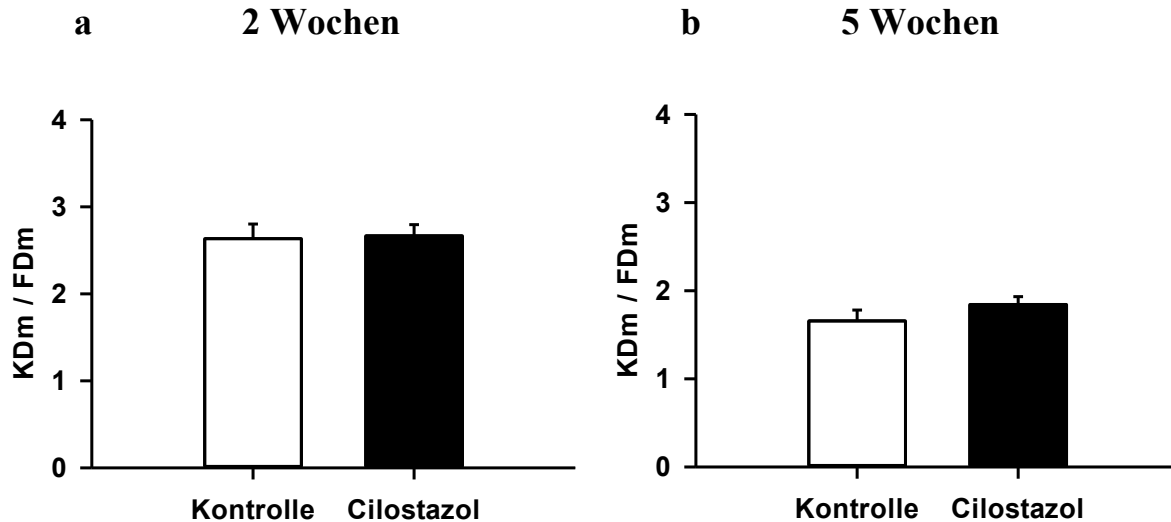


Abb. 68: Kallusdurchmesser / Femurdurchmesser der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Cilostazol behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

Zwei Wochen nach der Fraktur (Abb. 69 a) bestand der Kallus in der Kontrollgruppe zu 30,2 % aus Knochengewebe, zu 24,4 % aus Knorpelgewebe und zu 45,4 % aus fibrösem Gewebe. Demgegenüber setzte sich der Kallus in der Cilostazolgruppe zu 42,2% aus Knochengewebe, zu 30,3 % aus Knorpelgewebe und zu 27,5 % aus fibrösem Gewebe zusammen. Statistisch signifikante Unterschiede ließen sich nicht feststellen, auch wenn der Kallus in der Cilostazolgruppe im Vergleich einen höheren Knochenanteil, einen höheren Knorpelanteil sowie einen geringeren Anteil an fibrösem Gewebe aufwies.

Fünf Wochen nach der Fraktur (Abb. 69 b) bestand der Kallus in der Kontrollgruppe zu 92,3 % aus Knochengewebe, zu 0,6 % aus Knorpelgewebe und zu 7,1 % aus fibrösem Gewebe. Vergleichbar setzte sich der Kallus in der Cilostazolgruppe zu 89,3 % aus Knochengewebe, zu 0,6 % aus Knorpelgewebe und zu 10,2 % aus fibrösem Gewebe zusammen. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen bestanden nicht.

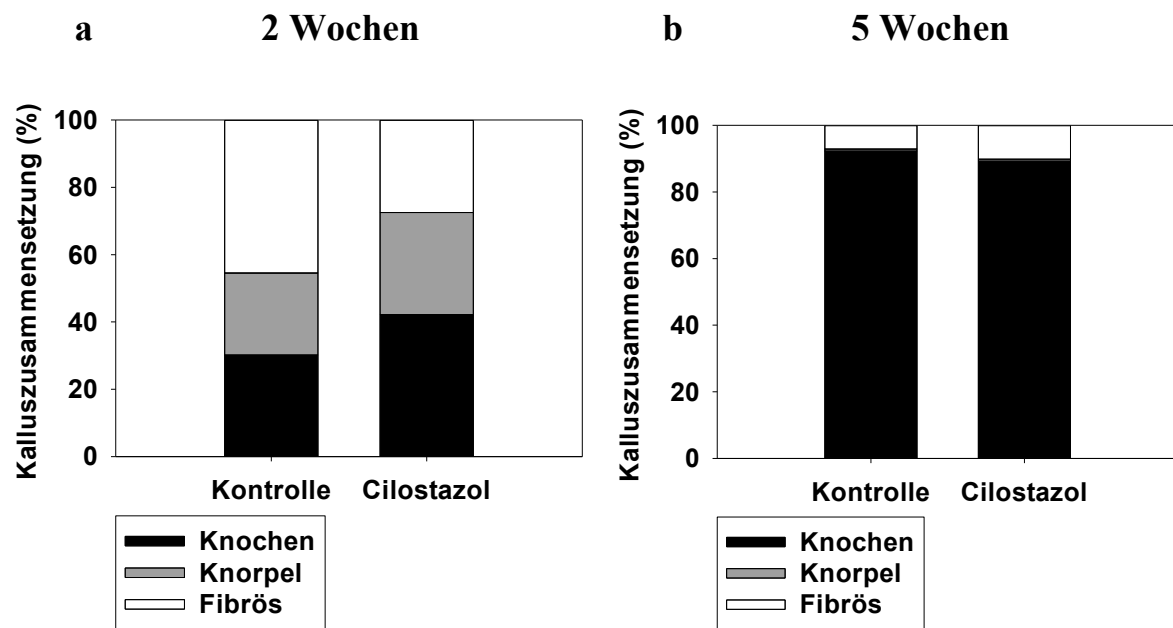


Abb. 69: Zusammensetzung des Kallus (%) der Kontrolltiere und der mit Cilostazol behandelten Mäuse 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur aus Knochen, Knorpel und fibrösem Gewebe.

Die Auswertung der Frakturüberbrückung ergab nach 2 Wochen (Abb. 70 a) einen signifikant höheren Histo-Score bei den mit Cilostazol behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren. Fünf Wochen nach der Fraktur (Abb. 70 b) unterschied sich der Histo-Score nicht mehr signifikant zwischen den beiden Gruppen.

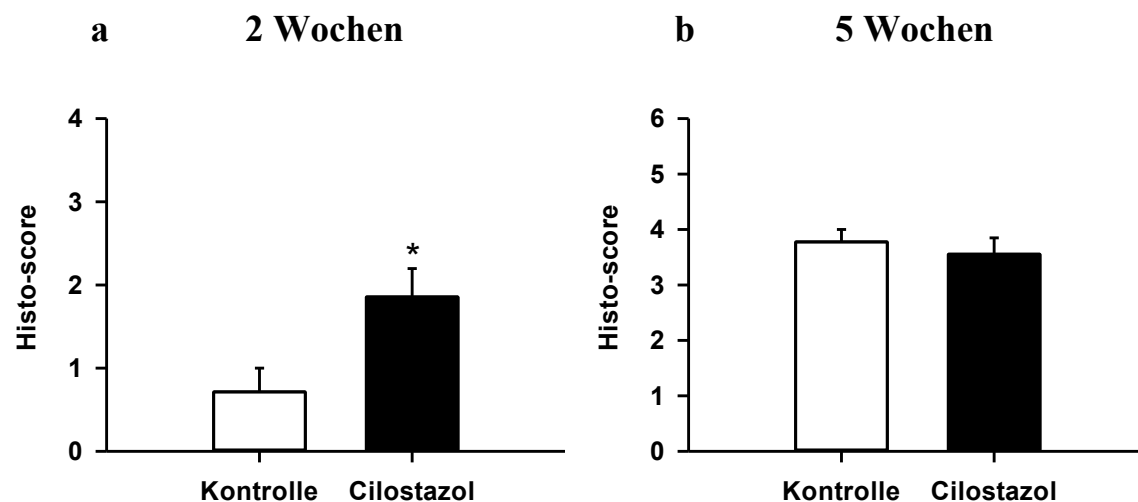


Abb. 70: Histo-Score der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Cilostazol behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Weder nach 2 Wochen (Abb. 71 a) noch nach 5 Wochen (Abb. 71 b) fand sich ein signifikanter Unterschied bei der Anzahl TRAP-positiver Osteoklasten / HPF im Vergleich der Cilostazolgruppe mit der Kontrollgruppe (siehe auch Abb. 72 a-d).

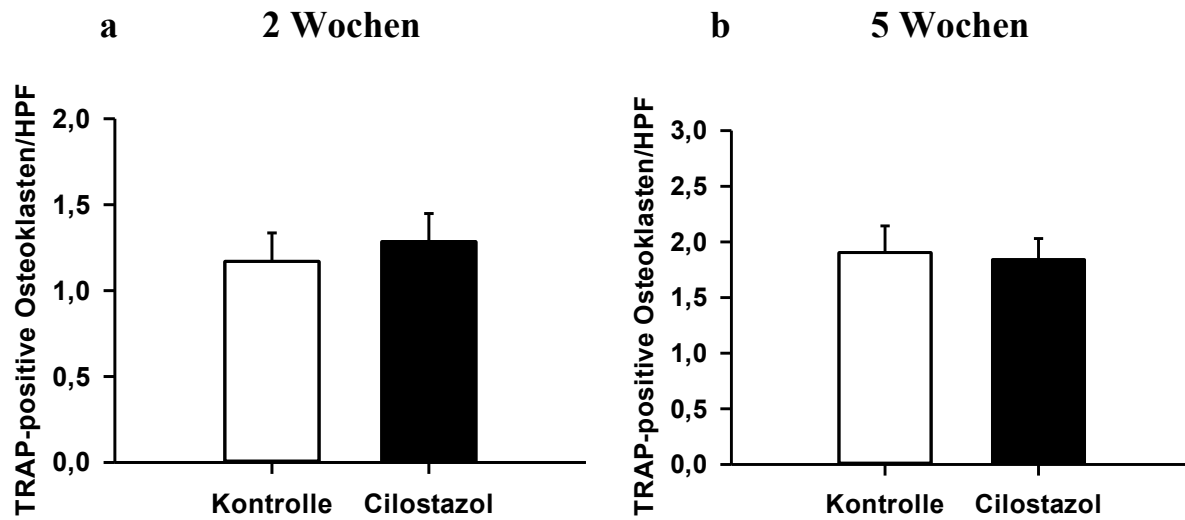


Abb. 71: TRAP-positive Osteoklasten / HPF im Kallusgewebe der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Cilostazol behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

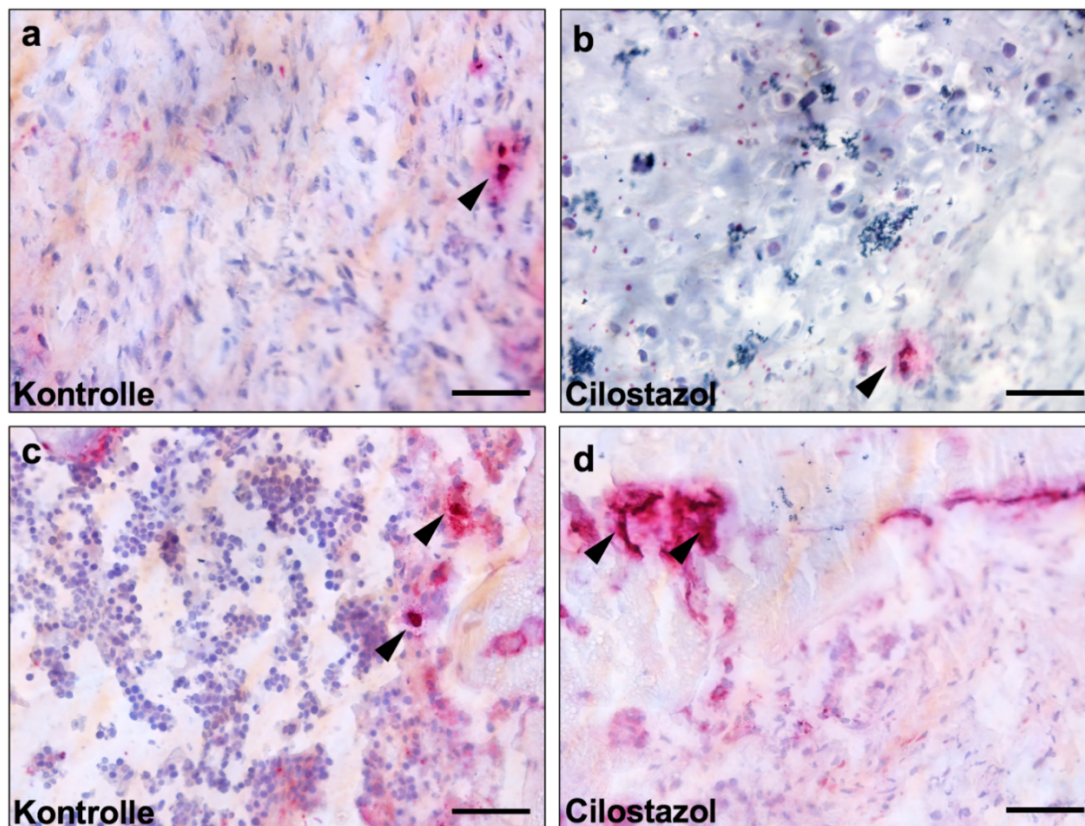


Abb. 72: Repräsentative histologische Bilder TRAP-positiver Osteoklasten im Kallusgewebe von mit Cilostazol behandelten Tieren (b, d) und Kontrolltieren (a, c) 2 Wochen (a, b) sowie 5 Wochen (c, d) nach der Fraktur. Die TRAP-positiven Osteoklasten sind jeweils durch Pfeilspitzen markiert. Maßstabsleisten: 50 μ m

6.5 Ergebnisse Immunhistochemie

Zwei Wochen nach der Fraktur (Abb. 74 a, c und Abb. 73 a) zeigte sich in der Cilostazolgruppe eine signifikant höhere Anzahl CD31-positiver Blutgefäße / HPF im Vergleich zur Kontrollgruppe. Fünf Wochen nach der Fraktur (Abb. 74 b, d und Abb. 73 b) zeigte sich kein signifikanter Unterschied.



Abb. 73: CD31-positive Blutgefäße / HPF im Kallusgewebe der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Cilostazol behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

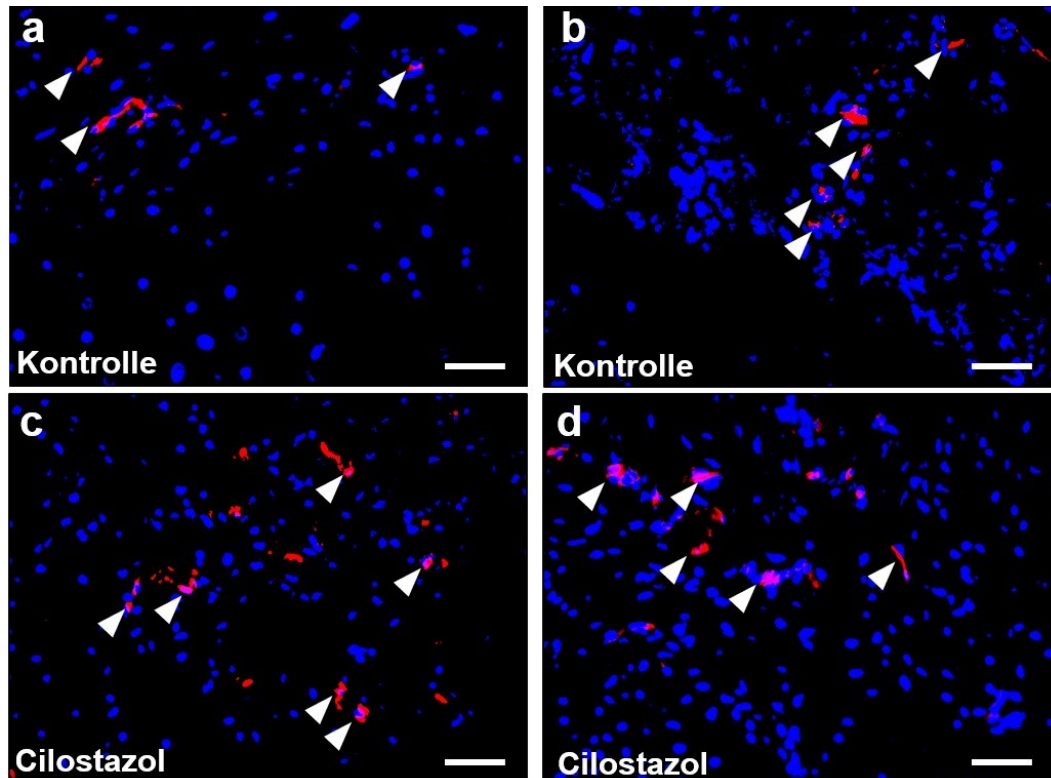


Abb. 74: Repräsentative immunhistochemische Bilder von CD-31-positiven Mikrogefäßen im Kallusgewebe der Kontrolltiere (a, b) und der mit Cilostazol behandelten Mäuse (c, d) 2 Wochen (a, c) sowie 5 Wochen (b, d) nach der Fraktur. Die Mikrogefäße sind jeweils durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Maßstabsleisten: 50 μ m

Sowohl 2 Wochen (Abb. 76 a,b und Abb. 75 a) als auch 5 Wochen (Abb. 76 c,d und Abb. 75 b) nach der Fraktur fand sich in der Cilostazolgruppe eine etwas größere Anzahl MPO-positiver Granulozyten / HPF als in der Kontrollgruppe. Der Unterschied war jedoch jeweils statistisch nicht signifikant.

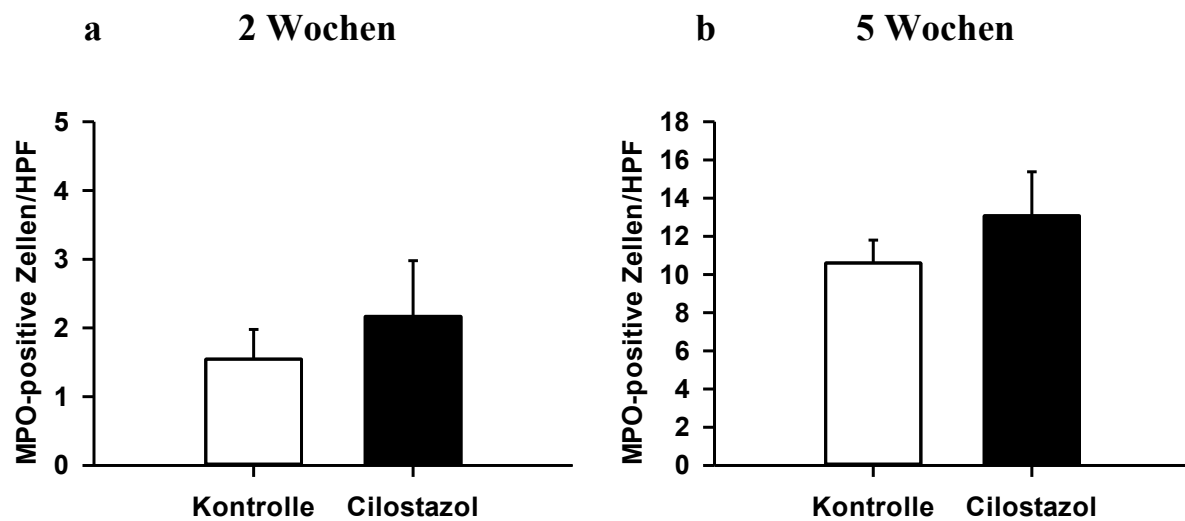


Abb. 75: MPO-positive Granulozyten / HPF im Kallusgewebe der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Cilostazol behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

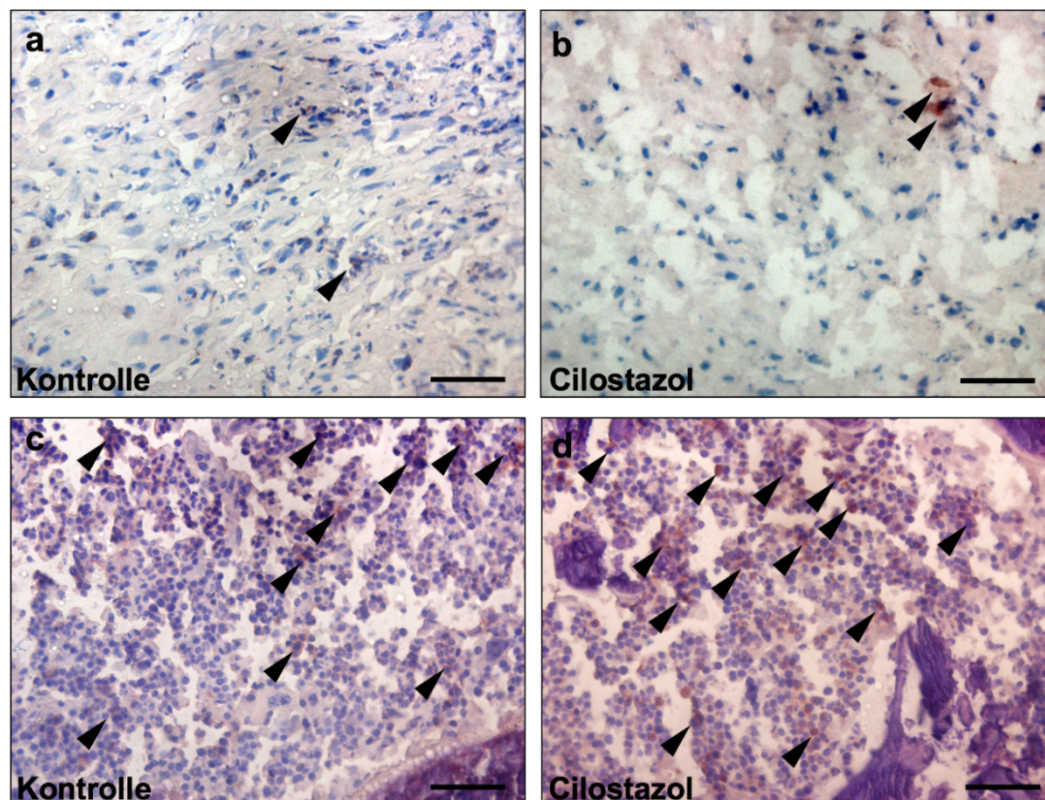


Abb. 76: Repräsentative immunhistochemische Bilder MPO-positiver Granulozyten im Kallusgewebe von mit Cilostazol behandelten Tieren (b, d) und Kontrolltieren (a, c) 2 Wochen (a, b) sowie 5 Wochen (c, d) nach der Fraktur. Die MPO-positiven Granulozyten sind jeweils durch Pfeilspitzen markiert. Maßstabsleisten: 50 μ m

Sowohl 2 Wochen (Abb. 78 a,b und Abb. 77 a) als auch 5 Wochen (Abb. 78 c,d und Abb. 77 b) nach der Fraktur fand sich in der Cilostazolgruppe eine größere Anzahl CD68-positiver Zellen / HPF als in der Kontrollgruppe. Der Unterschied war jedoch jeweils statistisch nicht signifikant.

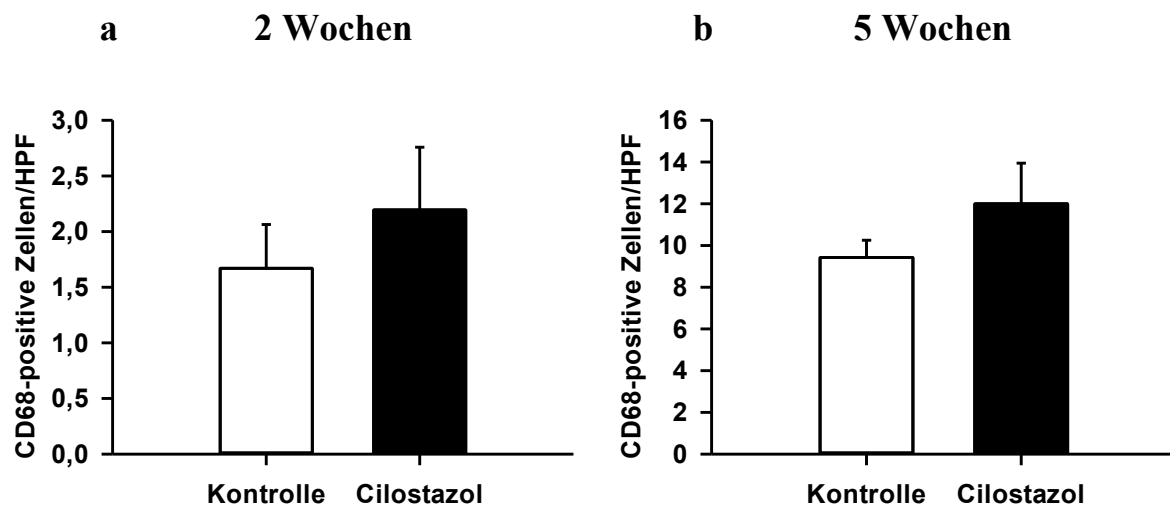


Abb. 77: CD68-positive Zellen / HPF im Kallusgewebe der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der Cilostazolgruppe (schwarze Balken) 2 (a) und 5 (b) Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

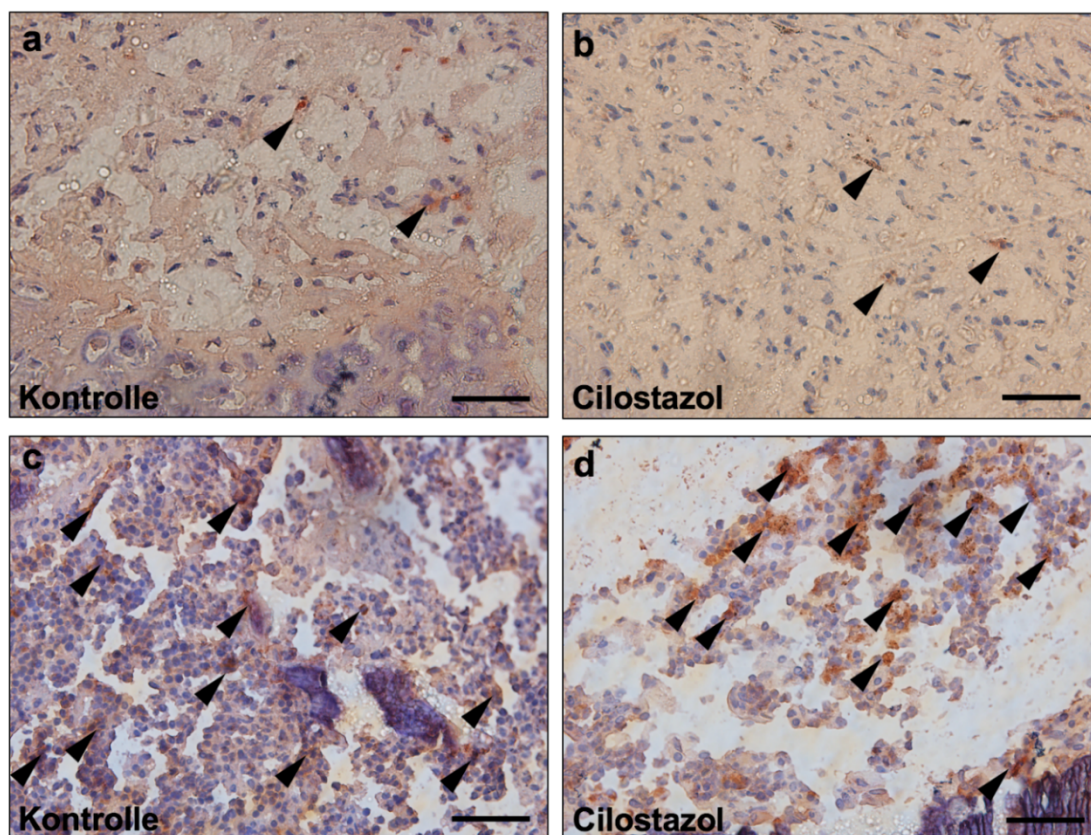


Abb. 78: Repräsentative immunhistochemische Bilder CD68-positiver Zellen im Kallusgewebe von mit Cilostazol behandelten Tieren (b, d) und Kontrolltieren (a, c) 2 Wochen (a, b) sowie 5 Wochen (c, d) nach der Fraktur. Die CD68-positiven Zellen sind jeweils durch Pfeilspitzen markiert. Maßstabsleisten: 50 μ m

6.6. Ergebnisse Western Blot

In der Cilostazolgruppe fand sich eine höhere Expression von BMP-2 (Abb. 79 und Abb. 80 a) im Vergleich zur Kontrollgruppe, ein signifikanter Unterschied bestand allerdings nicht. Hinsichtlich der Expression von BMP-4 (Abb. 79 und Abb. 80 b) zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen.

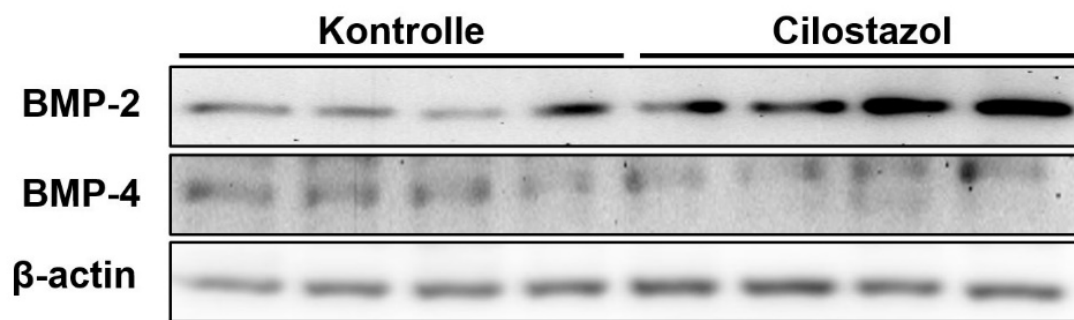


Abb. 79: Western-Blot-Analyse der Proteinexpression von BMP-2 und BMP-4 im Kallusgewebe der Kontrolltiere und der mit Cilostazol behandelten Mäuse 2 Wochen nach der Fraktur.

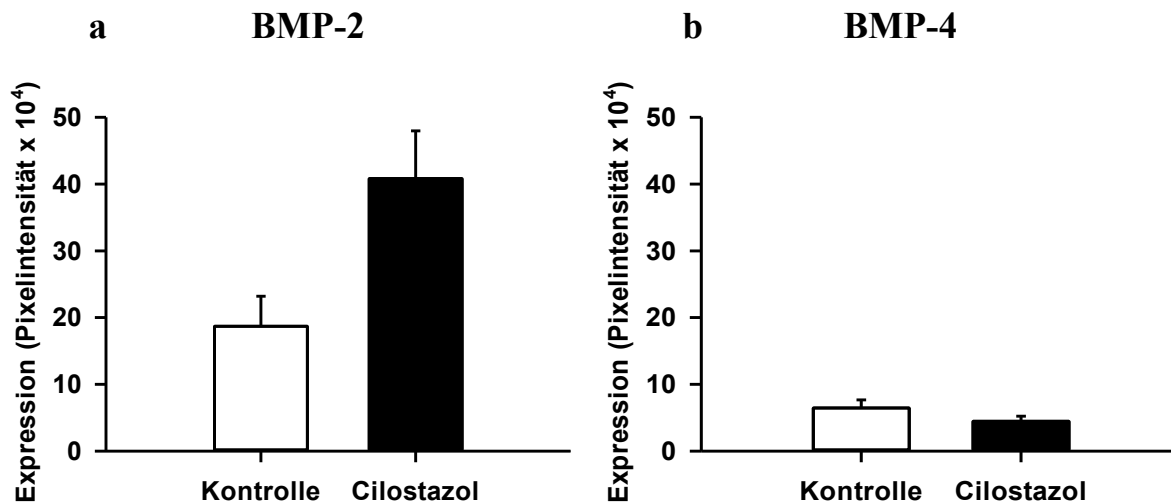


Abb. 80: Quantitative Analyse der Expression von BMP-2 (a) und BMP-4 (b) im Kallusgewebe der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Cilostazol behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

Bei der Analyse der Expression von CYR61 (Abb. 81 und Abb. 82 a) war kein signifikanter Unterschied zwischen der Cilostazolgruppe und der Kontrollgruppe feststellbar. Bei der Analyse der Expression von CD31 (Abb. 81 und Abb. 82 b) zeigte sich in der Cilostazolgruppe eine signifikant höhere Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe.

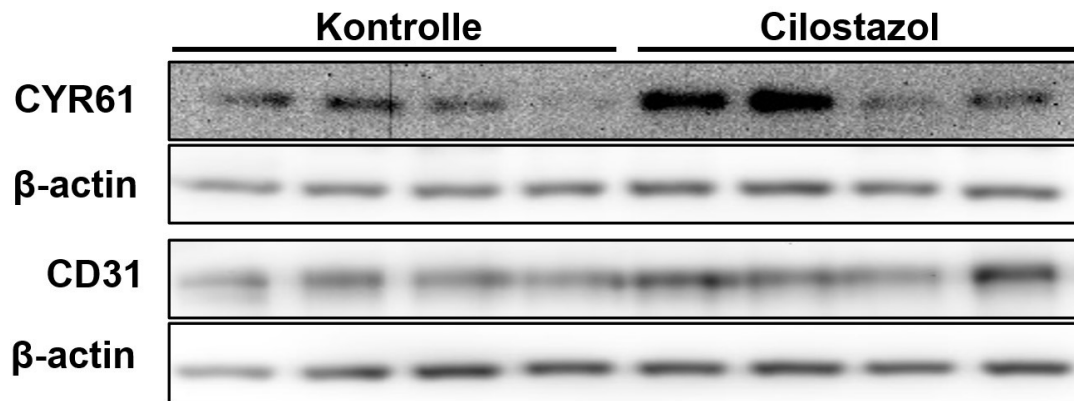


Abb. 81: Western-Blot-Analyse der Proteinexpression von CYR61 und CD31 im Kallusgewebe der Kontrolltiere und der mit Cilostazol behandelten Mäuse 2 Wochen nach der Fraktur.

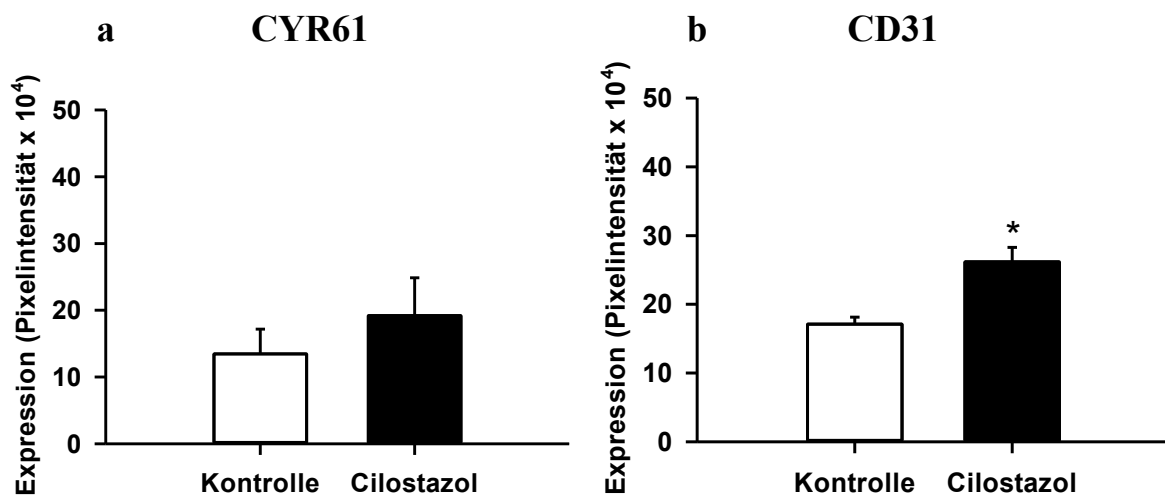


Abb. 82: Quantitative Analyse der Expression von CYR61 (Abb. 82 a) und CD31 (Abb. 82 b) im Kallusgewebe der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Cilostazol behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. * p < 0,05 vs. Kontrolle

Bei der Untersuchung des Proteins PI3K (Abb. 83 und Abb. 84 a) zeigte sich in der Cilostazolgruppe eine signifikant stärkere Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei der Analyse der Expression des Proteins RUNX2 (Abb. 83 und Abb. 84 b) zeigte sich ebenfalls in der Cilostazolgruppe eine signifikant stärkere Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe.

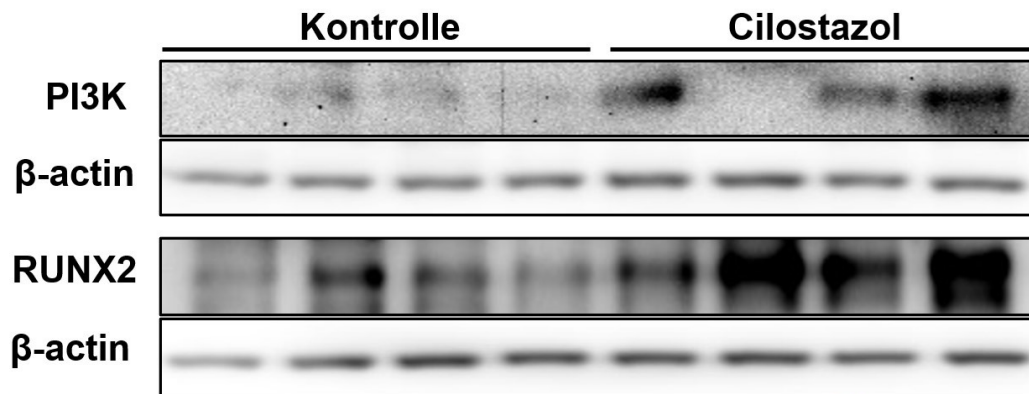


Abb. 83: Western-Blot-Analyse der Proteinexpression von PI3K und RUNX2 im Kallusgewebe der Kontrolltiere und der mit Cilostazol behandelten Mäuse 2 Wochen nach der Fraktur.

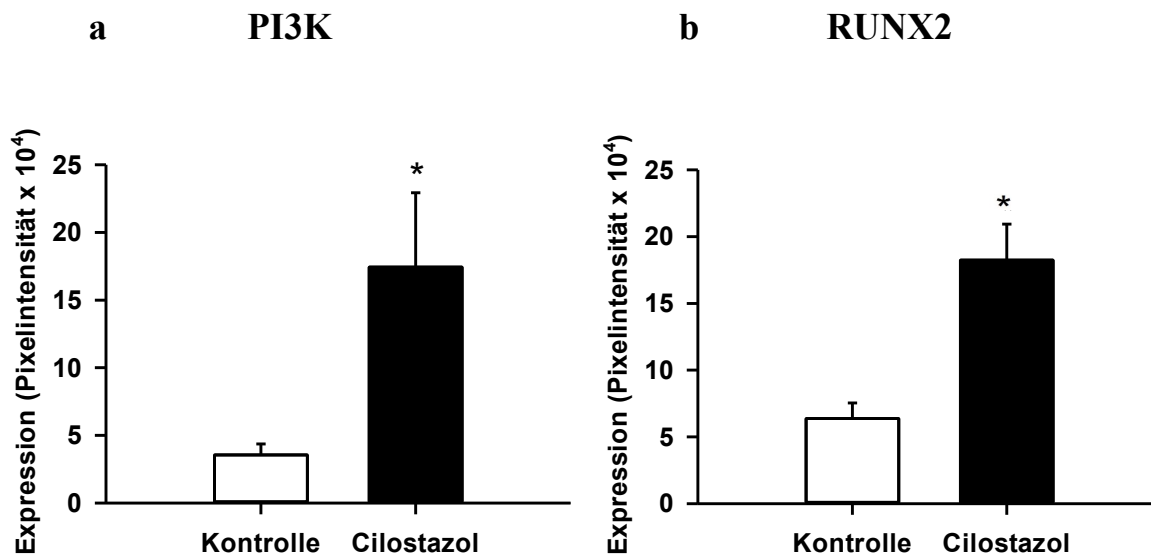


Abb. 84: Quantitative Analyse der Expression von PI3K (Abb. 84 a) und RUNX2 (Abb. 84 b) im Kallusgewebe der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Cilostazol behandelten Mäuse (schwarze Balken) 2 Wochen nach der Fraktur. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. * p < 0,05 vs. Kontrolle

7 Diskussion

7.1 Diskussion der Methoden

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der Frage, ob sich die Gabe von Sildenafil oder Cilostazol jeweils positiv auf die Frakturheilung bei älteren Mäusen auswirkt. Die Frakturheilung ist ein außerordentlich komplexer Prozess, für dessen erfolgreiches Gelingen unter anderem das Zusammenspiel mehrerer knochenfremder Gewebe wie Weichteilgewebe, Gefäße oder Periost unabdingbar ist. Das ossäre „micro-environment“ ist dabei nicht adäquat mit in vitro durchgeführten Experimenten reproduzierbar [27]. Deshalb wurde für die vorliegenden Experimente ein etabliertes Frakturmodell in der Maus gewählt.

Ein Versuchsmodell mit Mäusen bietet im Vergleich zu Großtiermodellen deutliche Vorteile. Die Unterbringung der Tiere ist einfacher, kostengünstiger und erlaubt eine größere Anzahl von Tieren auf begrenztem Raum zu halten. Darüber hinaus sind die Zuchtzyklen wesentlich kürzer, sodass in kurzer Zeit viele Tiere für große Studiengruppen gezüchtet werden können. Das Genom der Maus ist komplett entschlüsselt und die Verwendung von Mäusen bietet eine Vielzahl an Möglichkeiten für Forschung auf molekulargenetischer Ebene. Auch stehen für Experimente mit Mäusen viele Antikörper zur Verfügung [45]. Mäuse besitzen im Gegensatz zu größeren Tieren (z.B. Hunden) oder Menschen keine Havers-Systeme. Im Gegensatz zu größeren Tieren erfolgt der Knochenumbau bei Mäusen über Resorptionshöhlen. Mäuse sind dennoch geeignet für die Untersuchung der Frakturheilung, da dieser Prozess mit dem Remodeling über Havers-Systeme bei größeren Tieren vergleichbar ist [96].

Für Frakturstudien an Mäusen ist die Tibia im Vergleich zum Femur als weniger geeignet zu betrachten. Zum einen ist die Stabilisierung einer Fraktur der Tibia aufgrund ihres dreieckigen, nach distal abfallenden Durchmessers und ihrer gekrümmten Längsachse schwieriger. Diese anatomischen Gegebenheiten der Tibia stellen auch ein Problem dar, wenn man biomechanische Tests unter vergleichbaren Bedingungen durchführen möchte. Eine weitere Problematik bei Verwendung der Tibia für Frakturmodelle ergibt sich aus dem Vorhandensein der Fibula, die bei geschlossenen Frakturmodellen in einem Großteil der Fälle ebenfalls bricht, woraus entweder ein kombinierter Kallus der beiden Frakturen oder zwei verschiedene Kalli resultieren. Zur Vermeidung einer Fibulafraktur muss die Tibia sehr weit distal nahe der Metaphyse gebrochen werden. Bei der Anwendung von geschlossenen Tibiafrakturmodellen ist eine so genaue Positionierung der Fraktur allerdings nicht möglich, weshalb es zu einer sehr variablen und schlecht vorhersehbaren Kallusbildung kommt [50]. Die Stabilität der Fibula wiederum hat Auswirkungen auf den Heilungsverlauf des Bruchs sowie auf die Bildung des Kallus [113].

Im Gegensatz zur Tibia zeigt das Femur der Maus einen relativ wenig variierenden Durchmesser. Entsprechend finden sich an verschiedenen Frakturstellen im diaphysären Teil des Knochens vergleichbare Kallusreaktionen. Aufgrund der geraden Längsachse ist die standardisierte Frakturstabilisierung beim Femur einfacher als bei der Tibia. Im Gegensatz zur Tibia ist das Femur für Rotationstests geeignet, und auch 3- und 4-Punkt-Biegetests liefern beim Femur konsistentere Ergebnisse im Vergleich zur Tibia. Die verhältnismäßig voluminöse Muskeldecke des Femurs stellt eine Herausforderung bei der Herstellung einer geschlossenen Fraktur dar, allerdings bietet sie wiederum gute Möglichkeiten die Rolle des Weichteilgewebes im Rahmen der Frakturheilung zu analysieren [50].

Zur Analyse der Frakturheilung werden sowohl geschlossene als auch offene Frakturmodelle verwendet. Geschlossene Femurfrakturmodelle bei Mäusen basieren auf dem von Manigrasso und O'Connor [78] beschriebenen Modell, bei dem es sich um eine Abwandlung des von Bonnarens und Einhorn [11] beschriebenen Femurfrakturmodells bei Ratten handelt. Der Vorteil der geschlossenen Modelle besteht darin, dass durch den parapatellaren Zugang und die geschlossene Frakturierung nur ein geringes zusätzlich operatives Weichteiltrauma verursacht wird, allerdings kann das intramedulläre Implantat durchaus das Endost und das Knochenmark beschädigen.

Bei offenen Frakturmodellen wird das Femur über einen lateralen Zugang unter Sicht entweder frakturiert oder osteotomiert [16,28]. Die offenen Operationsverfahren verursachen große Weichteiltraumata, die sich negativ auf die Vaskularisierung des Femurs und den Erfolg der Frakturheilung auswirken können. Für die vorliegende Studie wurde daher ein geschlossenes Frakturmodell ausgewählt.

Werden zur Osteosynthese intramedulläre Fixationstechniken verwendet, so kommt es nur zu einer geringen Beeinträchtigung von Weichteilgewebe. Darüber hinaus wird die axiale Stabilität in hohem Maße gewährleistet. Zu beachten ist, dass im Vergleich zu extramedullären Verfahren häufiger Schäden an Knochenmark und Endost resultieren. Durch die Verwendung von extramedullären Implantaten werden Endost und Knochenmark geschont, allerdings muss während des chirurgischen Eingriffs darauf geachtet werden, dass das Periost nicht beschädigt wird. Auch kommt es hierbei in größerem Ausmaß zu Verletzungen von Weichteilgewebe [133].

Die Steifigkeit der Frakturfixierung hat einen enormen Einfluss auf den Erfolg der Frakturheilung [3]. Daher ist für jedes Frakturmodell ein standardisiertes Osteosyntheseverfahren erforderlich. In den meisten Frakturmodellen bei Mäusen wurden lange jedoch Implantate verwendet, die die Fraktur nicht ausreichend stabilisierten oder sogar ganz auf eine Fixierung der Fraktur verzichtet [48].

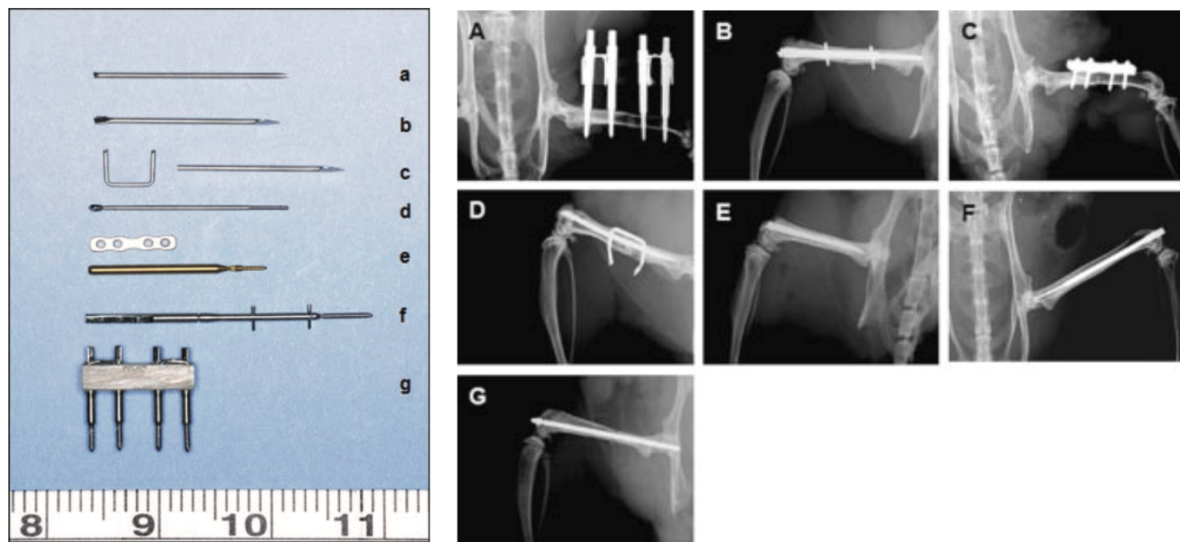


Abb. 87: Übersicht zur Frakturstabilisierung bei Mäusen verwendbarer Implantate sowie korrespondierende in-vivo-Röntgenaufnahmen: Konventioneller Pin (a, E), Verriegelungsnagel (b, F), Pin-Clip-Vorrichtung (c, D), intramedulläre Schraube (d, G), Verriegelungsplatte (e, C), Mausnagel (f, B), externer Fixateur (g, A).

Aus: Histing T et al. (2009) [43]

Für die Stabilisierung von Frakturen bei Mäusen stehen derzeit mehrere Methoden zur Verfügung. Bei der Verwendung der Pin-Clip-Vorrichtung, der Verriegelungsplatte, des Mausnagels sowie des Externen Fixateurs lässt sich eine hohe Rotationsstabilität erzielen. Für diese Verfahren ist ein offener chirurgischer Zugang erforderlich, was mit einem großen Weichteiltrauma verbunden ist [43]. Zur geschlossenen intramedullären Frakturstabilisierung kann ein konventioneller Pin aus rostfreiem Stahl eingesetzt werden. Die Vorteile dieser Technik sind die einfache, wenig invasive Operationstechnik, das geringe Gewicht des Implantats und die niedrigen Kosten. Die größten Nachteile sind die fehlende Rotationsstabilität, das hohe Dislokationsrisiko und die Beschädigung der Markhöhle [45].

Eine weitere Möglichkeit bietet die Verwendung eines Verriegelungsnagels. Dieser Nagel besteht aus einer Injektionsnadel, die durch Abflachung des proximalen und distalen Endes modifiziert wird. Dementsprechend bietet dieses Implantat eine höhere Stabilität im Vergleich zur einfachen Fixierung mit einem Pin, wobei die Vorteile der wenig invasiven, einfachen Operationstechnik, des geringen Gewichtes des Implantates und der niedrigen Kosten erhalten bleiben. Obwohl eine gewisse Achsen- und Rotationsstabilität gegeben ist, kann die Stabilisierung einer Fraktur mit dem Verriegelungsnagel jedoch nicht als starre Fixierungstechnik angesehen werden. Ähnlich wie bei der einfachen Fixierung mittel Stift wird die Induktion von Schäden an der Markhöhle als weiterer Nachteil angesehen [45].

Bei der für diese Versuchsreihe verwendeten intramedullären Schraube MouseScrewTM wird eine hohe Rotations- und Achsenstabilität durch interfragmentäre Kompression erreicht. Zu den Nachteilen zählen die Schädigung der Markhöhle sowie die vergleichsweise hohen Kosten des Implantats. Ein großer

Vorteil dieser Technik besteht in der ausgezeichneten Stabilisierung, zudem handelt es sich um eine einfache Operationstechnik, die eine gute Standardisierbarkeit ermöglicht. Weitere Vorteile bei Verwendung der MouseScrewTM ergeben sich aus dem geringen Gewicht des Implantats sowie der geringen Invasivität, sodass nur ein geringfügiges Weichteiltrauma verursacht wird. Im Vergleich zur Frakturstabilisierung mittels Pin oder Verriegelungsnagel konnte bei Verwendung der MouseScrewTM eine signifikant höhere Rotations- und Achsenstabilität nachgewiesen werden [49].

Zur Narkotisierung von Nagetieren während Operationen stehen sowohl inhalative als auch injizierbare Anästhetika zur Verfügung. Im Rahmen dieser Versuchsreihe erfolgte die Narkotisierung der Tiere durch intraperitoneale Injektion von Ketamin und Xylazin. Vorteilhaft in der Anwendung von Inhalationsanästhetika sind die gute Steuerbarkeit der Narkosetiefe sowie die verhältnismäßig geringe Beeinträchtigung der Versuchstiere, sodass inhalative Narkosen auch mehrmals hintereinander in kurzen Abständen wiederholt werden können. Aufgrund der geringen Halbwertszeit der Narkosegase erwachen die Versuchstiere nach Beendigung der Narkose schnell. Die Anwendung von Inhalationsanästhetika bringt jedoch einige Nachteile mit sich, so ist eine kontinuierliche Überwachung des Tieres erforderlich und es wird eine Vielzahl an Gerätschaften benötigt. Außerdem ist die Verwendung von Narkosegasen mit hohen Kosten verbunden und die Tiere müssen in einer geeigneten Weise positioniert werden. Des Weiteren lässt sich selbst mit großer Sorgfalt in der Vorbereitung nicht ausschließen, dass der Operateur besonders bei längeren Operationen durch möglichen Austritt von Narkosegas beeinträchtigt wird. Injizierbare Narkosemittel sind schlechter steuerbar und stellen aufgrund ihrer längeren Halbwertszeit eine größere Belastung für die Versuchstiere dar, allerdings sind sie auch deutlich kostengünstiger, einfacher in der Handhabung und bergen kaum Risiken für den Operateur [45].

Um eine adäquate Analgesie zu gewährleisten, erhielten die Versuchstiere einen Tag präoperativ bis drei Tage postoperativ Tramadolhydrochlorid. Bei der Auswahl einer geeigneten Schmerzmedikation ist zu beachten, dass eine Beeinflussung der Frakturheilung durch nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) nicht ausgeschlossen werden kann [45]. Das in dieser Versuchsreihe verwendete Opioid Tramadol weist im Vergleich zu nichtsteroidalen Antirheumatika eine deutlich höhere analgetische Potenz auf [103]. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Knochendichtewerte ebenso wie die Biegesteifigkeit und Bruchkraft von Knochen während der Frakturheilung von Tramadol nicht beeinflusst werden [8].

Der Prozess der Knochenheilung nimmt bei Mäusen mit etwa 4 Wochen im Vergleich zum Menschen deutlich weniger Zeit in Anspruch [42]. Eine Woche nach Frakturierung ist das Kallusgewebe noch zu weich für biomechanische Analysen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass der Frakturkallus nach 2 Wochen seine größte Ausdehnung erreicht [78]. Der optimale Zeitpunkt, um die späte Phase der

Knochenheilung zu untersuchen, liegt bei Mäusen Forschungsergebnissen zufolge bei etwa 3 bis 5 Wochen [45]. Aufgrund dieser Tatsachen wurde 2 Wochen nach Start der Experimente als Zeitpunkt ausgewählt, um die frühe Phase der Knochenheilung zu analysieren, und 5 Wochen nach Versuchsstart, um die späte Phase beziehungsweise den Abschluss der Frakturheilung zu untersuchen.

Für die biomechanischen Analysen wurde eine 3-Punkt-Biegetestung als Verfahren ausgewählt, wobei die Kallusmitte als Ansatzpunkt der Kraft gewählt und darauf geachtet wurde, während dieser Analysen die Femora nicht zu zerstören [43]. So konnten anschließend weitere Untersuchungen an ihnen durchgeführt und damit auch die Anzahl der benötigten Versuchstiere reduziert werden. Um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Messungen zu gewährleisten, wurden die zu untersuchenden Knochen für die biomechanischen Analysen in gleicher Weise mit der ventralen Seite nach oben positioniert. Aufgrund der geringen Größe der zu untersuchenden Knochen konnte eine 4-Punkt-Biegetestung mit im Gegensatz zur 3-Punkt-Biegetestung gleichmäßigerer Kraftverteilung nicht durchgeführt werden [78].

Zweidimensionale und dreidimensionale Mikrocomputertomographieaufnahmen zählen zusammen mit Röntgenuntersuchungen zu den etablierten Verfahren der Bildgebung, die zur Analyse der Frakturheilung bei Mäusen herangezogen werden. Die radiologischen Analysen erfolgten mittels Mikro-CT, was den großen Vorteil mit sich bringt die Mineralisation und Beschaffenheit der Knochen dreidimensional untersuchen zu können. Zur Unterscheidung zwischen hoch und niedrig mineralisiertem Knochen wurde sich dabei auch an bereits vorliegenden Studien zur Untersuchung von Knochenheilung und Kallusgewebe mittels μ CT orientiert [12,93].

Die einzelnen Bestandteile des Frakturkallus zu den jeweiligen Auswertungszeitpunkten nach 2 und 5 Wochen sind für die Beurteilung des Heilungsfortschritts von großem Interesse. Für die histologische Untersuchung des gewonnenen Kallusgewebe wurde nach der bewährten von Gerstenfeld et al. [31] veröffentlichten Methodik vorgegangen. Um Aufschlüsse über die zellulären Abläufe des Frakturheilungsprozesses sowie mögliche Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen aufzuzeigen, wurden zudem immunhistochemische Analysen durchgeführt.

Um weitere Informationen über die Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren während des postoperativen Heilungsprozesses zu erhalten, wurden auch proteinbiochemische Analysen durchgeführt. Tritt eine Fraktur auf, so ist eine Vielzahl von Proteinen an den nachfolgenden Entwicklungen beteiligt. Proteinbiochemische Untersuchungen bieten eine weitere Möglichkeit, eventuelle Einflüsse der verwendeten Wirkstoffe Sildenafil und Cilostazol auf die Frakturheilung zu untersuchen. Anhand bereits veröffentlichter Studienergebnisse [44] wurden zu diesem Zweck CYR61,

VEGF, HO-1, RANKL, OPG sowie PCNA ausgewählt. Zusätzlich wurde die Expression von Nrf2, BMP-2, BMP-4, CD31, PI3K und RUNX2 untersucht.

Die Dosierung von Sildenafil (5mg/ kg KG) wurde auf Grundlage bereits veröffentlichten Studienergebnisse ausgewählt [43]. Die Dosierung von Sildenafil, die momentan in Mausmodellen Anwendung findet, ist damit in etwa fünfmal so hoch wie die im klinischen Gebrauch beim Menschen verwendete Dosis (0,7-1,5 mg/ kg KG). Auf diese Weise kann der schnelleren Metabolisierungsrate von Mäusen im Vergleich zum Menschen Rechnung getragen werden.

Bei der Einnahme von Cilostazol durch Menschen wird eine Dosis von bis zu zweimal 100 mg pro Tag empfohlen. Die für die vorliegende Studie verwendete Dosierung von 30 mg/ kg KG wurde anhand der Ergebnisse mehrerer Studien ausgewählt [10,40,120].

7.2 Diskussion der Ergebnisse Sildenafil

Eine vorausgegangene Studie konnte bereits zeigen, dass die Gabe von Sildenafil die Frakturheilung im Mausmodell bei jungen Tieren verbessern kann [44]. Dies war mit einer schnelleren knöchernen Überbrückung des Bruchspaltes und einer im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhten Biegesteifigkeit assoziiert. In der vorliegenden Studie wurden nun zum ersten Mal die Auswirkungen von Sildenafil auf die Frakturheilung bei alten Mäusen untersucht. Überraschenderweise stimulierte Sildenafil weder die Angiogenese im Kallusgewebe noch zeigte sich eine Beschleunigung der Frakturheilung. Die Ergebnisse zeigten jedoch eine verringerte Anzahl und Aktivität von Osteoklasten im Kallusgewebe der mit Sildenafil behandelten Mäuse. Dies ging mit einem höheren Knochenvolumen 5 Wochen nach der Fraktur einher, was auf eine Verzögerung des Kallus-Remodeling hindeutet.

Knochenregeneration und Knochenumbau sind hochkomplexe Prozesse, die eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zelltypen benötigen [6]. Unter diesen Zellen sind die Osteoklasten von zentraler Bedeutung. Osteoklasten sind mehrkernige Zellen, die unter dem Einfluss des Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktors (M-CSF) und von RANKL, das von Osteoblasten und Osteozyten sezerniert wird, aus myeloischen Vorläuferzellen entstehen [14]. RANKL gilt daher als potenter Stimulator der Osteoklastenbildung und Osteoklastenaktivität. Demgegenüber stört OPG, ein löslicher Decoy-Rezeptor für RANKL, die RANKL-RANK-Bindung, was zu einer Hemmung der Osteoklastenbildung und Osteoklastenaktivität führt [65,83,116].

Osteoklasten sind dabei maßgeblich für das Knochen-Remodeling verantwortlich. Sie bauen neuen unreifen Knochen ab und ersetzen diesen durch reifen lamellären Knochen, wodurch die

biomechanische Stabilität verbessert wird [6]. Aktivierte Osteoklasten verursachen Lakunen in den Knochentrabekeln. Um Knochengewebe abbauen zu können, widmen sich die Osteoklasten zunächst der Säureproduktion und lösen dadurch Kalziumverbindungen auf. Zudem verringern sie den pH-Wert in den Resorptionslakunen auf 4,5. Anschließend sezernieren sie lysosomale Enzyme wie beispielsweise Cathepsin-K in die Lakunen hinein und resorbieren daraufhin die zerlegte Extrazellulärmatrix [129]. Insbesondere die Hemmung der Osteoklastenaktivität durch pharmakologische Substanzen wie Melatonin oder Pantoprazol verzögert den Prozess des Knochenumbaus, was eine Beeinträchtigung der Frakturheilung zur Folge hat [46,47,86].

In der vorliegenden Studie zeigten die Ergebnisse eine signifikant reduzierte Anzahl von Osteoklasten im Kallusgewebe bei den mit Sildenafil behandelten Mäusen. Dies ging mit einer signifikant höheren Expression von OPG einher, während sich die Expression von RANKL zwischen den beiden Studiengruppen nicht signifikant unterschied. Infolgedessen bestand bei den mit Sildenafil behandelten Tieren ein erhöhtes OPG/RANKL-Verhältnis. Das höhere Knochenvolumen sowie das erhöhte Verhältnis von Kallus- zu Femurknochendurchmesser in der Sildenafilgruppe könnte daher auf einen verzögerten Kallusumbau zurückzuführen sein, der durch eine verringerte Anzahl und Aktivität von Osteoklasten im Kallusgewebe verursacht wird.

Der Alterungsprozess führt zu erheblichen Veränderungen in der Genexpression und im Stoffwechsel, was mit einer hohen Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) einhergeht [19]. Es ist hinlänglich bekannt, dass diese toxischen Radikale Kernsäuren und Proteine schädigen, was Zellschäden und Zellalterung zur Folge hat [63]. In der frühen Phase der Frakturheilung werden ROS freigesetzt, besonders bei ischämischen und entzündlichen Zuständen. Die durch ROS verursachten schädlichen Effekte können durch antioxidative Enzyme, die auch während der Frakturheilung exprimiert werden, abgeschwächt werden. Interessanterweise zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine deutlich verringerte Expression von Nrf2 im Kallusgewebe der mit Sildenafil behandelten Mäuse. Es ist bekannt, dass Nrf2 eine wichtige Rolle beim Schutz vor ROS und apoptotischen Zellschäden einnimmt [71]. Daher kann spekuliert werden, dass der verzögerte Knochenumbau, der bei den mit Sildenafil behandelten Mäusen beobachtet wurde, auch auf ein erhöhtes Maß an durch ROS verursachter Zellschädigung zurückzuführen ist [88].

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigten Lippross et al. [69], dass Nrf2-Knockout-(KO)-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine verzögerte und beeinträchtigte Frakturheilung aufwiesen. Die reduzierte Expression von Nrf2, die bei den mit Sildenafil behandelten Mäusen festgestellt wurde, könnte jedoch auch Folge einer negativen Rückkopplungsschleife durch eine bereits abgeschwächte Entzündungsreaktion und eine verminderte Produktion von ROS sein [39,108]. Nrf2 scheint komplexe Auswirkungen auf die Differenzierung von Osteoklasten zu haben. So zeigten Hyeon et al. [54], dass

ein Mangel an Nrf2 oxidativen Stress sowie die RANKL-induzierte Differenzierung von Osteoklasten fördert. Im Gegensatz dazu zeigten Park et al. [100] in einer in-vitro-Zell-Kokultur, dass ein Nrf2-Mangel in Osteoblasten eine signifikant höhere mRNA- und Proteinexpression von OPG zur Folge hat. Bemerkenswert ist, dass die Autoren keinen signifikanten Unterschied in der RANKL-Expression in Nrf2-defizienten Osteoblasten feststellen konnten. Des Weiteren zeigte die Kokultur von Nrf2-defizienten Osteoblasten mit Wildtyp-, KEAP1-defizienten oder Nrf2-defizienten Osteoblasten eine geringere Osteoklastenbildung im Vergleich zur Kokultur von Wildtyp-Osteoblasten und Makrophagen [107].

Diese Ergebnisse deuten auf die wichtige Rolle von Nrf2 bei der indirekten Regulierung der Osteoklastendifferenzierung durch Beeinflussung der Osteoblasten hin. Nrf2 ist in der Lage, die Osteoklastendifferenzierung direkt zu hemmen, indem es die Produktion von ROS verringert. Demgegenüber kann Nrf2 auch indirekt die Bildung von Osteoklasten fördern, indem es die Sekretion von OPG durch Osteoblasten hemmt [35]. Aufgrund dieser Eigenschaften von Nrf2 kann spekuliert werden, dass die in der vorliegenden Studie bei den mit Sildenafil behandelten Mäusen festgestellte höhere Expression von OPG auf eine verminderte Expression des antioxidativen Proteins Nrf2 zurückzuführen ist [100]. Ähnlich wie Nrf2 kommt auch HO-1 eine wichtige Rolle beim Schutz vor oxidativem Stress und ROS zu, indem es die Apoptose in vielen verschiedenen Zelltypen reguliert [71,106]. Wir konnten bei den mit Sildenafil behandelten alten Mäusen eine leicht erhöhte Expression von HO-1 feststellen, was auf einen kompensatorischen Mechanismus aufgrund der deutlich reduzierten Expression von Nrf2 hindeuten könnte.

Überraschenderweise zeigen die Ergebnisse der hier durchgeführten Studie, dass die Gabe von Sildenafil bei den alten Mäusen weder die Bildung von Blutgefäßen im Kallus stimulierte noch die Frakturheilung beschleunigte. Dies steht im Gegensatz zu früheren Studienergebnissen, in denen gezeigt werden konnte, dass Sildenafil die Frakturheilung beschleunigt und die Knochenbildung in einem atrophischen Pseudoarthrosen-Modell bei jungen erwachsenen Mäusen durch Hochregulierung der Expression der pro-angiogenen und pro-osteogenen Faktoren CYR61 und VEGF induziert [44,87]. Bei älteren mit Sildenafil behandelten Tieren war die Expression von CYR61 und VEGF im Vergleich zu den Kontrolltieren jedoch nicht signifikant erhöht.

Die Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass sich die Wirkungsweise von Sildenafil und die daraus resultierenden Effekte der Behandlung bei alten Mäusen deutlich von denen bei jungen erwachsenen Tieren unterscheiden. In der Tat wurden in früheren Studien, in denen die Auswirkungen von Pantoprazol auf die Frakturheilung bei jungen erwachsenen sowie bei alten Mäusen untersucht wurden, ähnliche Ergebnisse erzielt [47,82]. Diese Daten deuten auf einen anderen Wirkmechanismus der Behandlung mit Pantoprazol bei alten Mäusen im Vergleich zu jungen erwachsenen Tieren hin. Bei

alten Mäusen führt Pantoprazol zu einer Beeinträchtigung der Knochenheilung, indem es eine überschießende Osteoklastenaktivität auslöst, welche wahrscheinlich auf einen erhöhten Parathormon (PTH)-Serumspiegel durch Kalzium-Malabsorption zurückzuführen ist. Bei jungen erwachsenen Tieren hingegen beeinträchtigt Pantoprazol die Frakturheilung aufgrund einer verringerten Osteoklastenaktivität mit verzögertem Knochenumbau, was auf einer Hemmung der osteoklastischen V-ATPase beruhen könnte [82].

Garcia et al. [29] haben gezeigt, dass eine Behandlung mit EPO die Frakturheilung bei Mäusen beschleunigen kann, was mit einer signifikant erhöhten Biegesteifigkeit der Knochen sowie einer signifikant erhöhten endostalen Vaskularisierung einherging. Demgegenüber stellten Orth et al. [97] fest, dass die positiven Auswirkungen einer EPO-Behandlung auf die Frakturheilung bei alten Tieren ausbleiben. Diese Erkenntnisse waren höchstwahrscheinlich auf nachteilige Auswirkungen auf die rheologischen Eigenschaften des Blutflusses und eine damit einhergehende verschlechterte Mikrozirkulation zurückzuführen. Die fehlende signifikante Hochregulierung von CYR61 und VEGF, die in der vorliegenden Studie beobachtet wurde, könnte als Ursache die altersbedingte Dysfunktion des vaskulären Systems des Knochens haben. Diese Dysfunktion könnte zu einer bereits verminderten Vaskularisierung und Angiogenese an der Frakturnstelle führen und so eine reduzierte Expression von proangiogenen Faktoren zur Folge haben.

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal die Auswirkungen von Sildenafil auf die Frakturheilung bei alten Mäusen untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass Sildenafil die Frakturheilung bei älteren Mäusen nicht verbessert, was höchstwahrscheinlich auf die fehlende Hochregulierung von CYR61 und VEGF zurückzuführen ist. Es zeigte sich jedoch eine verringerte Anzahl und Aktivität von Osteoklasten im Kallusgewebe der mit Sildenafil behandelten Mäuse, was zu einem verzögerten Knochenumbau führte. Dies ging mit einer verminderten Expression von Nrf2 und einer erhöhten Expression von OPG einher. Daher scheint Sildenafil bei geriatrischen Patienten keine vielversprechende Behandlungsoption zur Beschleunigung und Verbesserung der Knochenregeneration nach Fraktur zu sein.

7.3 Diskussion der Ergebnisse Cilostazol

In der vorliegenden Arbeit wurden im zweiten Studienabschnitt zum ersten Mal die Auswirkungen von Cilostazol auf die Frakturheilung bei alten Mäusen untersucht. Die neuen Daten zeigen, dass die Gabe von Cilostazol die Frakturheilung beschleunigt und die Knochenbildung bei diesen Tieren stimuliert. So zeigten sich bei der Cilostazol-Gruppe 2 Wochen nach Fraktur eine signifikant höhere

Biegesteifigkeit und nach 5 Wochen eine erhöhte Knochenneubildung sowie eine verbesserte Trabekelarchitektur im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Eine adäquate Vaskularisierung gilt als eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreich verlaufende Frakturheilung. Die Stimulierung der endostalen Zirkulation ermöglicht es mesenchymalen Stammzellen, durch neu gebildete Kapillaren in die Frakturstelle einzudringen und dort den Remodellierungsprozess einzuleiten [58]. Es wurde bereits gezeigt, dass die Stimulierung der Vaskularisierung die Frakturheilung beschleunigen kann [21,66]. Neu gebildete Blutgefäße sorgen für den Transport von lebenswichtigen Nährstoffen, Sauerstoff und Stammzellen zur Frakturstelle, was die Bildung eines Kallusgewebes und den anschließenden Prozess der Verknöcherung ermöglicht [84].

Demgegenüber ist eine gehemmte Angiogenese für den Prozess der Knochenheilung von Nachteil, da hieraus ein verlängerter Heilungsverlauf sowie die Entwicklung einer Pseudoarthrose resultieren kann [37]. Lu et al. [75] stellten fest, dass im Kallusgewebe junger Mäuse mehr Blutgefäße vorhanden sind als im Kallusgewebe mittelalter und geriatrischer Tiere, was mit einer veränderten Expression der entscheidend an der Regulierung der Angiogenese beteiligter Matrix-Metalloproteinasen (MMP)-9 und 13 einherging. In einer früheren Studie zeigte sich, dass Cilostazol in der Lage ist, die Angiogenese in einem ischämischen Modell der hinteren Extremität zu stimulieren [52]. In Übereinstimmung mit dieser Studie wurde hier bei den mit Cilostazol behandelten Mäusen 2 Wochen nach der Fraktur im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikant höhere Anzahl CD31-positiver Mikrogefäße im Kallusgewebe der Femora nachgewiesen. Daraus leitet sich die Vermutung ab, dass diese verbesserte frühe Vaskularisierung deutlich zur beschleunigten Frakturheilung bei den mit Cilostazol behandelten Tieren beigetragen hat [89].

Des Weiteren zeigte die Western-Blot Analyse bei den mit Cilostazol behandelten Tieren eine signifikant höhere Expression von PI3K. Die PI3K-Signalübertragung wird durch Rezeptortyrosinkinasen und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert und reguliert die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten während der Osteoblastogenese und des Skelettaufbaus [34]. Außerdem berichteten Scanlon et al. [110], dass eine Erhöhung der PI3K-Signalübertragung zu einer verbesserten femoralen Knochenregeneration führt, indem die Proliferation von Periostzellen in der frühen Phase der Frakturheilung stimuliert wird. Interessanterweise gibt es Hinweise darauf, dass die Behandlung mit Cilostazol ebenfalls eine erhöhte PI3K-Expression zur Folge hat. So konnten Mohamed et al. [92] zeigen, dass Cilostazol die durch Diabetes verursachte Schädigung von Hodengewebe durch eine erhöhte PI3K-Expression reduziert. Dieses Erkenntnis stützt die Vermutung, dass Cilostazol die Frakturheilung bei älteren Mäusen durch eine PI3K-vermittelte Stimulation der Osteoblastogenese verbessert. Außerdem zeigten Shi et al. [114], dass durch Cilostazol der apoptotische Zelltod unterdrückt und die Dysfunktion von Endothelzellen über die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs reduziert wird.

Dadurch könnte die altersbedingte Beeinträchtigung der Vaskularisierung an der Frakturstelle vermindert werden, was zu einer verstärkten Angiogenese und letztlich zu einer Beschleunigung der Frakturheilung geführt haben kann.

RUNX2 ist für die Differenzierung von Osteoblasten und die Reifung von Chondrozyten von großer Wichtigkeit. Es ist entscheidend an der Regulierung der Knochenbildung beteiligt, indem es mehrere Signalwege wie beispielsweise Hedgehog, FGF (Fibroblast Growth Factor) und Wnt (Wingless Int-1) steuert und so durch Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen die osteogene Linie stimuliert [61]. Darüber hinaus zeigten Zelzer et al. [132], dass RUNX2 wichtig für die enchondrale Knochenbildung ist, da es bei RUNX2-defizienten Mäusen nicht zu einer Invasion des Knorpelgewebes mit neu gebildeten Blutgefäßen kommt. Auch berichteten Orth et al. [98], dass mit VEGF beschichtete Mikropartikel die Expression von RUNX2 bei Mäusen mit einer Pseudoarthrose fördern, was zu einer verstärkten Knochenbildung führte. Auch wurde bereits gezeigt, dass mit RUNX2-cDNA beladene Typ-I-Kollagenschwämme die Regeneration von Knochengewebe in alveolären Defekten bei Mäusen verbessern [123].

Da in der vorliegenden Arbeit bei den mit Cilostazol behandelten Mäusen eine höhere RUNX2-Expression im Kallusgewebe frakturerter Oberschenkelknochen nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass Cilostazol bei älteren Mäusen gleichzeitig mehrere Signalwege aktiviert, die die Frakturheilung beschleunigen und die Knochenbildung verbessern [89]. Diese Ansicht wird auch dadurch gestützt, dass bei den mit Cilostazol behandelten Mäusen eine mehr als 2-fach höhere Expression von BMP-2 im Kallusgewebe festgestellt werden konnte. BMP-2 ist insbesondere in der frühen Phase der Frakturheilung für den Prozess der Knochenregeneration von großer Wichtigkeit, da es die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen stimuliert [91].

In einer früheren Studie konnte während der Frakturheilung im Kallusgewebe eine signifikant erhöhte Expression des proosteogenen und proangiogenen Markers CYR61 bei jungen Mäusen beobachtet werden [22]. Dies war hier nicht der Fall, weshalb zu vermuten ist, dass sich die Wirkungsweise von Cilostazol, ähnlich wie bei Sildenafil, bei alten Mäusen deutlich von derjenigen bei jungen erwachsenen Tieren unterscheidet. Für diese Vermutung sprechen auch die Ergebnisse einer Studie von Herath et al. [40], bei der positive Auswirkungen von Cilostazol auf die Frakturheilung bei jungen Tieren im Gegensatz zu unserer Studie mit einer signifikant höheren Expression von CYR61, BMP-4 und RANKL einhergingen.

8 Schlussfolgerungen

1: Sildenafil trägt nicht dazu bei, die Frakturheilung im Alter zu verbessern. Im Gegenteil verzögert der Wirkstoff den Prozess des Knochenumbaus sogar. Dies war höchstwahrscheinlich auf eine geringere Anzahl und Aktivität von Osteoklasten im Kallusgewebe zurückzuführen und geht mit einer erhöhten Expression von OPG und einer verringerten Expression von Nrf2 einher. Die Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass Sildenafil kein vielversprechender Kandidat zur Förderung der Knochenregeneration bei geriatrischen Patienten nach Fraktur ist.

2: Cilostazol beschleunigt die Frakturheilung und Knochenbildung bei älteren CD-1-Mäusen durch Stimulierung der Angiogenese und Erhöhung der Expression von PI3K und RUNX2 im Kallusgewebe. Daher könnte dieser bereits zugelassene und in der klinischen Praxis gut etablierte Wirkstoff ein vielversprechender Kandidat zur Förderung der Knochenregeneration bei geriatrischen Patienten nach Fraktur sein.

9 Literaturverzeichnis

1. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K (2017) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 12th ed. Elsevier, München
2. Amsallem E, Kasparian C, Haddour G, Boissel J-P, Nony P (2005) Phosphodiesterase III inhibitors for heart failure. *Cochrane Database Syst Rev.* 1:CD002230
3. Augat P, Margevicius K, Simon J, Wolf S, Suger G, Claes L (1998) Local tissue properties in bone healing: influence of size and stability of the osteotomy gap. *J Orthop Res.* 4:475-81
4. Aumüller G, Aust G, Conrad A, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D, et al. (2020) Duale Reihe Anatomie. 5th ed. Thieme, Stuttgart
5. Bab I, Hajbi-Yonissi C, Gabet Y, Müller R (2007) Micro-Tomographic Atlas of the Mouse Skeleton. Springer US, Boston
6. Bahney CS, Zondervan RL, Allison P, Theologis A, Ashley JW, Ahn J, Miclau T, Marcucio RS, Hankenson KD (2019) Cellular biology of fracture healing. *J Orthop Res.* 37:35–50
7. Bak B, Andreassen TT (1989) The effect of aging on fracture healing in the rat. *Calcif Tissue Int.* 45:292-7
8. Beck A, Krischak G, Sorg T, Augat P, Farker K, Merkel U, Kinzl L, Claes L (2003) Influence of diclofenac (group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs) on fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg.* 123:327-32
9. Biberthaler P, van Griensven M (2017) Knochendefekte und Pseudarthrosen. Springer, Berlin Heidelberg
10. Biscetti F, Pecorini G, Straface G, Arena V, Stigliano E, Rutella S, Locatelli F, Angelini F, Ghirlanda G, Flex A (2013) Cilostazol promotes angiogenesis after peripheral ischemia through a VEGF-dependent mechanism. *Int J Cardiol.* 167:910-6
11. Bonnarens F, Einhorn TA (1984) Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res.* 2:97-101
12. Bosemark P, Isaksson H, McDonald MM, Little DG, Tägil M (2013) Augmentation of autologous bone graft by a combination of bone morphogenic protein and bisphosphonate increased both callus volume and strength. *Acta Orthop.* 84:106-11
13. Cauley JA, Thompson DE, Ensrud KC, Scott JC, Black D (2000) Risk of mortality following clinical fractures. *Osteoporos Int.* 11:556-61
14. Charles JF, Aliprantis AO (2014) Osteoclasts: more than “bone eaters”. *Trends Mol Med.* 20:449–59

15. Cheitlin MD, Hutter AM, Brindis RG, Ganz P, Kaul S, Russell RO, Zusman RM, Forrester JS, Douglas PS, Faxon DP, Fisher JD, Gibbons RJ, Halperin JL, Hutter AM, Hochman JS, Kaul S, Weintraub WS, Winters WL, Wolk MJ (1999) Use of Sildenafil (Viagra) in Patients With Cardiovascular Disease. *Circulation*. 99:168-77
16. Cheung KMC, Kaluarachi K, Andrew G, Lu W, Chan D, Cheah KSE (2003) An externally fixed femoral fracture model for mice. *J Orthop Res*. 21:685-90
17. Clark D, Nakamura M, Miclau T, Marcucio R (2017) Effects of Aging on Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep*. 15:601–608
18. Constantinescu IM, Bolfa P, Constantinescu D, Mironiuc AI, Gherman CD (2017) Treatment with Sildenafil and Donepezil Improves Angiogenesis in Experimentally Induced Critical Limb Ischemia. *Biomed Res Int*. 2017:9532381
19. Davalli P, Mitic T, Caporali A, Lauriola A, D’Arca D (2016) ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2016:3565127
20. Duscher D, Rennert RC, Januszyk M, Anghel E, Maan ZN, Whittam AJ, Perez MG, Kosaraju R, Hu MS, Walmsley GG, Atashroo D, Khong S, Butte AJ, Gurtner GC (2014) Aging disrupts cell subpopulation dynamics and diminishes the function of mesenchymal stem cells. *Sci Rep*. 4:7144
21. Eckardt H, Ding M, Lind M, Hansen ES, Christensen KS, Hvid I (2005) Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. *J Bone Joint Surg Br*. 87:1434-8
22. Fataccioli V, Abergel V, Wingertsman L, Neuville P, Spitz E, Adnot S, Calenda V, Teiger E (2002) Stimulation of angiogenesis by Cyr61 gene: a new therapeutic candidate. *Hum Gene Ther*. 13:1461-70
23. Felsenberg D (2001) Struktur und Funktion des Knochens: Stützwerk aus Kollagen und Hydroxylapatit. *Pharmazie in unserer Zeit* 30:488-494
24. Fleisch H (1997) Bisphosphonates: mechanisms of action and clinical use in osteoporosis - an update. *Horm Metab Res*. 29:145-50
25. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G (2000) Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*. 908:244-54
26. Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S (2016) *Pharmakologie und Toxikologie*. 2nd ed. Springer, Berlin Heidelberg
27. Friedman RJ, An YH, Ming J, Draughn RA, Bauer TW (1996) Influence of biomaterial surface texture on bone ingrowth in the rabbit femur. *J Orthop Res*. 14:455-64
28. Garcia P, Holstein JH, Histing T, Burkhardt M, Culemann U, Pizanis A, Wirbel RJ, Pohlemann T, Menger MD (2008) A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: impact of stability on fracture healing. *J Biomech*. 41:1689-96

29. Garcia P, Speidel V, Scheuer C, Laschke MW, Holstein JH, Histing T, Pohlemann T, Menger MD (2011) Low dose erythropoietin stimulates bone healing in mice. *J Orthop Res.* 29:165–72
30. Geerts WH, Heit JA, Clagett GP, Pineo GF, Colwell CW, Anderson FA, Wheeler HB (2001) Prevention of venous thromboembolism. *Chest.* 119:132S-175S
31. Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA (2005) Application of Histomorphometric Methods to the Study of Bone Repair. *J Bone Miner Res.* 20:1715-22
32. Graefe K, Lutz W, Bönisch H (2016) *Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie.* 2nd ed. Thieme, Stuttgart
33. Grifka J, Kuster M (2011) *Orthopädie und Unfallchirurgie.* Springer, Berlin Heidelberg
34. Guntur AR, Rosen CJ (2011) The skeleton: a multi-functional complex organ: new insights into osteoblasts and their role in bone formation: the central role of PI3Kinase. *J Endocrinol.* 211:123–30
35. Han J, Yang K, An J, Jiang N, Fu S, Tang X (2022) The Role of NRF2 in Bone Metabolism - Friend or Foe? *Front Endocrinol (Lausanne)* 13:813057
36. Hankenson KD, Zimmerman G, Marcucio R (2014) Biological perspectives of delayed fracture healing. *Injury* 45:S8-S15
37. Hausman MR, Schaffler MB, Majeska RJ (2001) Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone* 29:560-4
38. Haynes BF, Markert ML, Sempowski GD, Patel DD, Hale LP (2000) The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol.* 18:529-60
39. Hemnes AR, Zaiman A, Champion HC (2008) PDE5A inhibition attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension through inhibition of ROS generation and RhoA/Rho kinase activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 294:L24-33
40. Herath SC, Lion T, Klein M, Stenger D, Scheuer C, Holstein JH, Mörsdorf P, Rollmann MFR, Pohlemann T, Menger MD, Histing T (2015) Stimulation of angiogenesis by cilostazol accelerates fracture healing in mice. *J Orthop Res.* 33:1880-7
41. Herdegen T (2019) *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie.* 4th ed. Thieme, Stuttgart
42. Hiltunen A, Aro HT, Vuorio E (1993) Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice. *Clin Orthop Relat Res.* 297:23-7
43. Histing T, Holstein JH, Garcia P, Matthys R, Kristen A, Claes L, Menger MD, Pohlemann T (2009) Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture. *J Orthop Res.* 27:1152-6
44. 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.* 29:867-73

45. 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* 49:591-9
46. Histing T, Anton C, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger MD (2012) Melatonin impairs fracture healing by suppressing RANKL-mediated bone remodeling. *J Surg Res.* 173:83–90
47. Histing T, Stenger D, Scheuer C, Metzger W, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2012) Pantoprazole, a proton pump inhibitor, delays fracture healing in mice. *Calcif Tissue Int.* 90:507–514
48. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T (2007) Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech.* 40:215-9
49. Holstein JH, Matthys R, Histing T, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Meier C, Pohlemann T, Menger MD (2009) Development of a stable closed femoral fracture model in mice. *J Surg Res.* 153:71-5
50. 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:S31-8
51. Homburger F, Russfield AB, Weisburger JH, Lim S, Chak SP, Weisburger EK (1975) Aging changes in CD-1 HaM/ICR mice reared under standard laboratory conditions. *J Natl Cancer Inst.* 55:37–45
52. Hori A, Shibata R, Morisaki K, Murohara T, Komori K (2012) Cilostazol stimulates revascularisation in response to ischaemia via an eNOS-dependent mechanism. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 43:62-5
53. Huppelsberg J, Walter K (2013) *Kurzlehrbuch Physiologie*. 4th ed. Thieme, Stuttgart
54. Hyeon S, Lee H, Yang Y, Jeong W (2013) Nrf2 deficiency induces oxidative stress and promotes RANKL-induced osteoclast differentiation. *Free Radic Biol Med.* 65:789–799
55. Jacobsen KA, Al-Aql ZS, Wan C, Fitch JL, Stapleton SN, Mason ZD, Cole RM, Gilbert SR, Clemens TL, Morgan EF, Einhorn TA, Gerstenfeld LC (2008) Bone formation during distraction osteogenesis is dependent on both VEGFR1 and VEGFR2 signaling. *J Bone Miner Res.* 23:596-609
56. Junqueira LC, Carneiro J, Gratzl M (2005) *Histologie*. 6th ed. Springer, Berlin Heidelberg
57. Junqueira LC, Carneiro J (1996) *Histologie*. 4th ed. Springer, Berlin
58. Kanczler J, Oreffo R (2008) Osteogenesis and angiogenesis: The potential for engineering bone. *Eur Cell Mater.* 15:100-14

59. Kawamoto T, Kawamoto K (2021) Preparation of Thin Frozen Sections from Nonfixed and Undecalcified Hard Tissues Using Kawamoto's Film Method (2020). *Methods Mol Biol.* 2230:259–281
60. Klotz U (2009) Pharmacokinetics and drug metabolism in the elderly. *Drug Metab Rev.* 41:67–76
61. Komori T (2019) Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. *Int J Mol Sci.* 20:1694
62. Koneru S, Varma Penumathsa S, Thirunavukkarasu M, Vidavalur R, Zhan L, Singal PK, Engelman RM, Das DK, Maulik N (2008) Sildenafil-mediated neovascularization and protection against myocardial ischaemia reperfusion injury in rats: role of VEGF/angiopoietin-1. *J Cell Mol Med.* 12:2651-64
63. Kubo Y, Wruck CJ, Fragoulis A, Drescher W, Pape HC, Lichte P, Fischer H, Tohidnezhad M, Hildebrand F, Pufe T, Jahr H (2019) Role of Nrf2 in Fracture Healing: Clinical Aspects of Oxidative Stress. *Calcif Tissue Int.* 105:341–352
64. Kühn F (2017) Die demografische Entwicklung in Deutschland. <https://www.bpb.de/themen/soziale-lage/demografischer-wandel/196911/die-demografische-entwicklung-in-deutschland/> zuletzt aufgerufen am 16.1.25 CC BY-NC-ND 3.0 DE
65. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165–76
66. Li R, Stewart DJ, von Schroeder HP, Mackinnon ES, Schemitsch EH (2009) Effect of cell-based VEGF gene therapy on healing of a segmental bone defect. *J Orthop Res.* 27:8-14
67. Lienau J, Schell H, Epari DR, Schütze N, Jakob F, Duda GN, Bail HJ (2006) CYR61 (CCN1) protein expression during fracture healing in an ovine tibial model and its relation to the mechanical fixation stability. *J Orthop Res.* 24:254-62
68. Lippert H (2010) Anatomie. 8th ed. Urban & Fischer in Elsevier, München
69. Lippross S, Beckmann R, Streubesand N, Ayub F, Tohidnezhad M, Campbell G, Kan YW, Horst F, Sönmez TT, Varoga D, Lichte P, Jahr H, Pufe T, Wruck CJ (2014) Nrf2 deficiency impairs fracture healing in mice. *Calcif Tissue Int.* 95:349–61
70. Liu Y, Shakur Y, Yoshitake M, Kambayashi J (2006) Cilostazol (Pletal®): A Dual Inhibitor of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Type 3 and Adenosine Uptake. *Cardiovasc Drug Rev.* 19:369–386
71. Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J (2016) Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 73:3221–47

72. Lögters T, Windolf J, Flohé S (2009) Femurschaftfrakturen. *Unfallchirurg* 112:635-651
73. Lopas LA, Belkin NS, Mutyaba PL, Gray CF, Hankenson KD, Ahn J (2014) Fractures in geriatric mice show decreased callus expansion and bone volume. *Clin Orthop Relat Res.* 472:3532-32
74. Lu C, Mielau T, Hu D, Hansen E, Tsui K, Puttlitz C, Marcucio RS (2005) Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *J Orthop Res.* 23:1300-7
75. Lu C, Hansen E, Sapozhnikova A, Hu D, Mielau T, Marcucio RS (2008) Effect of age on vascularization during fracture repair. *J Orthop Res.* 26:1384-9
76. Lüllmann-Rauch R (2009) Taschenlehrbuch Histologie. 3rd ed. Thieme, Stuttgart
77. Lüllmann-Rauch R, Asan E (2019) Taschenlehrbuch Histologie. 6th ed. Thieme, Stuttgart
78. Manigrasso MB, O'Connor JP (2004) Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma.* 18:687-95
79. Marsell R, Einhorn TA (2011) The biology of fracture healing. *Injury* 42:551-5
80. Medhat D, Rodríguez CI, Infante A (2019) Immunomodulatory Effects of MSCs in Bone Healing. *Int J Mol Sci.* 20:5467
81. Mehta M, Strube P, Peters A, Perka C, Hutmacher D, Fratzl P, Duda GN (2010) Influences of age and mechanical stability on volume, microstructure, and mineralization of the fracture callus during bone healing: is osteoclast activity the key to age-related impaired healing? *Bone* 47:219-28
82. 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
83. Menger MM, Merscher B, Scheuer C, Braun BJ, Herath SC, Rollmann MF, Stenger D, Später T, Pohlemann T, Menger MD, Histing T (2021) Amlodipine accelerates bone healing in a stable closed femoral fracture model in mice. *Eur Cell Mater.* 41:592–602
84. Menger MM, Laschke MW, Orth M, Pohlemann T, Menger MD, Histing T (2021) Vascularization Strategies in the Prevention of Nonunion Formation. *Tissue Eng Part B Rev.* 27:107–132
85. Menger MM, Laschke MW, Nussler AK, Menger MD, Histing T (2022) The vascularization paradox of non-union formation. *Angiogenesis* 25:279–290
86. Menger MM, Stief M, Scheuer C, Rollmann MF, Herath SC, Braun BJ, Ehnert S, Nussler AK, Menger MD, Laschke MW, Histing T (2023) Diclofenac, a NSAID, delays fracture healing in aged mice. *Exp Gerontol.* 178:112201

87. Menger MM, Bauer D, Bleimehl M, Scheuer C, Braun BJ, Herath SC, Rollmann MF, Menger MD, Laschke MW, Histing T (2023) Sildenafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, stimulates angiogenesis and bone regeneration in an atrophic non-union model in mice. *J Transl Med.* 21:607
88. Menger MM, Emmerich M, Scheuer C, Hans S, Braun BJ, Herath SC, Rollmann MF, Menger MD, Laschke MW, Histing T (2024) Sildenafil delays bone remodeling of fractured femora in aged mice by reducing the number and activity of osteoclasts within the callus tissue. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 173:116291
89. Menger MM, Emmerich M, Scheuer C, Hans S, Ehnert S, Nüssler AK, Herath SC, Steinestel K, Menger MD, Histing T, Laschke MW (2024) Cilostazol Stimulates Angiogenesis and Accelerates Fracture Healing in Aged Male and Female Mice by Increasing the Expression of PI3K and RUNX2. *Int J Mol Sci.* 25:755
90. Meyer RA, Tsahakis PJ, Martin DF, Banks DM, Harrow ME, Kiebzak GM (2001) Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *J Orthop Res.* 19:428-35
91. Mi M, Jin H, Wang B, Yukata K, Sheu T-J, Ke QH, Tong P, Im H-J, Xiao G, Chen D (2013) Chondrocyte BMP2 signaling plays an essential role in bone fracture healing. *Gene* 512:211–8
92. Mohamed MZ, Hafez HM, Zenhom NM, Mohammed HH (2018) Cilostazol alleviates streptozotocin-induced testicular injury in rats via PI3K/Akt pathway. *Life Sci.* 198:136–142
93. 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* 44:335-44
94. Mutyaba PL, Belkin NS, Lopas L, Gray CF, Dopkin D, Hankenson KD, Ahn J (2014) Notch signaling in mesenchymal stem cells harvested from geriatric mice. *J Orthop Trauma.* 28 Suppl 1:S20-3
95. Niethard F, Pfeil J, Biberthaler P (2017) *Duale Reihe Orthopädie und Unfallchirurgie.* 8th ed. Thieme, Stuttgart
96. Nunamaker DM (1998) Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* (355 Suppl):S56-65
97. 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
98. 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. *J Orthop Res.* 37:821–831
99. Otsuka Pharma Gmbh (2018) Fachinformation Pletal 50 mg / Pletal 100 mg. <https://fachinformation.srz.de/pdf/otsukapharma/pletal50100mgtabletten.pdf>

100. Park CK, Lee Y, Kim KH, Lee ZH, Joo M, Kim H-H (2014) Nrf2 is a novel regulator of bone acquisition. *Bone* 63:36–46
101. Prisby RD, Ramsey MW, Behnke BJ, Dominguez JM, Donato AJ, Allen MR, Delp MD (2007) Aging reduces skeletal blood flow, endothelium-dependent vasodilation, and NO bioavailability in rats. *J Bone Miner Res.* 22:1280-8
102. Pyriochou A, Zhou Z, Koika V, Petrou C, Cordopatis P, Sessa WC, Papapetropoulos A (2007) The phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil stimulates angiogenesis through a protein kinase G/MAPK pathway. *J Cell Physiol.* 211:197-204
103. Reig E (2002) Tramadol in musculoskeletal pain--a survey. *Clin Rheumatol.* 21 Suppl 1:S9-11
104. Rose S, Maffulli N (1999) Hip fractures. An epidemiological review. *Bull Hosp Jt Dis.* 58:197-201
105. Ruchholtz S, Wirtz DC (2013) *Orthopädie und Unfallchirurgie essentials* 2nd ed. Thieme, Stuttgart
106. Ryter SW, Choi AMK (2005) Heme oxygenase-1: redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models. *Antioxid Redox Signal.* 7:80–91
107. Sakai E, Morita M, Ohuchi M, Kido MA, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Itoh K, Yamamoto M, Tsukuba T (2017) Effects of deficiency of Kelch-like ECH-associated protein 1 on skeletal organization: a mechanism for diminished nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1 during osteoclastogenesis. *FASEB J.* 31:4011–4022
108. Santos CL, Souza MHL, Gomes AS, Lemos HP, Santos AA, Cunha FQ, Wallace JL (2005) Sildenafil prevents indomethacin-induced gastropathy in rats: role of leukocyte adherence and gastric blood flow. *Br J Pharmacol.* 146:481–6
109. Saran U, Gemini Piperni S, Chatterjee S (2014) Role of angiogenesis in bone repair. *Arch Biochem Biophys.* 561:109-17
110. Scanlon V, Walia B, Yu J, Hansen M, Drissi H, Maye P, Sanjay A (2017) Loss of Cbl-PI3K interaction modulates the periosteal response to fracture by enhancing osteogenic commitment and differentiation. *Bone* 95:124–135
111. Schiebler T, Korf H (2007) *Anatomie*. 10th ed. Steinkopff, Heidelberg
112. Schneider D (2013) *Checkliste Arzneimittel A-Z*. 6th ed. Thieme, Stuttgart
113. Shefelbine SJ, Augat P, Claes L, Simon U (2005) Trabecular bone fracture healing simulation with finite element analysis and fuzzy logic. *J Biomech.* 38:2440-50
114. Shi M-Q, Su F-F, Xu X, Liu X-T, Wang H-T, Zhang W, Li X, Lian C, Zheng Q-S, Feng Z-C (2016) Cilostazol suppresses angiotensin II-induced apoptosis in endothelial cells. *Mol Med Rep.* 13:2597–605
115. Siewert JR, Stein HJ (2012) *Chirurgie*. 9th ed. Springer, Berlin

116. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309–19
117. Slade Shantz JA, Yu Y-Y, Andres W, Mielau T, Marcucio R (2014) Modulation of macrophage activity during fracture repair has differential effects in young adult and elderly mice. *J Orthop Trauma*. 28 Suppl 1(0 1):S10-4
118. Stegen S, van Gastel N, Carmeliet G (2015) Bringing new life to damaged bone: the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone* 70:19-27
119. Steinmann GG (1986) Changes in the human thymus during aging. *Curr Top Pathol*. 75:43-88
120. Stutz J (2020) Einfluss von Cilostazol auf die Frakturheilung im murinen Ischämie-Modell. Universität des Saarlandes, Homburg/Saar [doi:10.22028/D291-32613](https://doi.org/10.22028/D291-32613)
121. Thompson PD, Zimet R, Forbes WP, Zhang P (2002) Meta-analysis of results from eight randomized, placebo-controlled trials on the effect of cilostazol on patients with intermittent claudication. *Am J Cardiol*. 90:1314–1319
122. Tsutsumimoto T, Wakabayashi S, Kinoshita T, Horiuchi H, Takaoka K (2002) A phosphodiesterase inhibitor, pentoxifylline, enhances the bone morphogenetic protein-4 (BMP-4)-dependent differentiation of osteoprogenitor cells. *Bone* 31:396-401
123. Tu Q, Zhang J, James L, Dickson J, Tang J, Yang P, Chen J (2007) Cbfa1/Runx2-deficiency delays bone wound healing and locally delivered Cbfa1/Runx2 promotes bone repair in animal models. *Wound Repair Regen*. 15:404–12
124. Ulfig N (2019) *Kurzlehrbuch Histologie*. 5th ed. Thieme, Stuttgart
125. Vidavalur R, Penumathsa SV, Zhan L, Thirunavukkarasu M, Maulik N (2006) Sildenafil induces angiogenic response in human coronary arteriolar endothelial cells through the expression of thioredoxin, hemeoxygenase and vascular endothelial growth factor. *Vascul Pharmacol*. 45:91-5
126. Wakabayashi S, Tsutsumimoto T, Kawasaki S, Kinoshita T, Horiuchi H, Takaoka K (2002) Involvement of Phosphodiesterase Isozymes in Osteoblastic Differentiation. *J Bone Miner Res*. 17:249-56
127. Walker DK (1999) Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man. *Xenobiotica* 29:297–310
128. Waschke J, Böckers T, Paulsen F (2019) *Sobotta Lehrbuch Anatomie*. 2nd ed. Elsevier, München
129. Wennemuth G (2017) *Taschenbuch Histologie*. 2nd ed. Elsevier, München
130. White BL, Fisher WD, Laurin CA (1987) Rate of mortality for elderly patients after fracture of the hip in the 1980's. *J Bone Joint Surg Am*. 69:1335-40

131. Yamamoto Y, Noguchi T, Takahashi N (2005) Effects of calcitonin on osteoclast. *Clin Calcium* 15:147-51
132. Zelzer E, Glotzer DJ, Hartmann C, Thomas D, Fukai N, Soker S, Olsen BR (2001) Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mech Dev.* 106:97–106
133. Zwingenberger S, Niederlohm E, Vater C, Rammelt S, Matthys R, Bernhardt R, Valladares RD, Goodman SB, Stiehler M (2013) Establishment of a femoral critical-size bone defect model in immunodeficient mice. *J Surg Res.* 181:e7-e14

10 Originalarbeiten zur Promotionsarbeit

Sildenafil delays bone remodeling of fractured femora in aged mice by reducing the number and activity of osteoclasts within the callus tissue.

Maximilian M Menger, **Maximilian Emmerich**, Claudia Scheuer, Sandra Hans, Benedikt J Braun, Steven C Herath, Mika F Rollmann, Michael D Menger, Matthias W Laschke, Tina Histing

Biomedicine & Pharmacotherapy (2024) Apr:173:116291

DOI: 10.1016/j.biopha.2024.116291 PMID: 38442669

Cilostazol Stimulates Angiogenesis and Accelerates Fracture Healing in Aged Male and Female Mice by Increasing the Expression of PI3K and RUNX2.

Maximilian M Menger, **Maximilian Emmerich**, Claudia Scheuer, Sandra Hans, Sabrina Ehnert, Andreas K Nüssler, Steven C Herath, Konrad Steinestel, Michael D Menger, Tina Histing, Matthias W Laschke

International Journal of Molecular Sciences (2024) Jan 6;25(2):755

DOI: 10.3390/ijms25020755 PMID: 38255829 PMCID: PMC10815626

11 Danksagung

Ein großer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Tina Histing für die Ermöglichung dieser Arbeit und ihre wertvolle Unterstützung.

Vielen Dank an Dr. med. Maximilian Menger für die hervorragende Betreuung und stetige Unterstützung.

Ein großes Dankeschön gilt Prof. Dr. med. Michael D. Menger und Prof. Dr. med. Matthias W. Laschke für das Einbringen ihrer wissenschaftlichen Expertise.

Vielen Dank an Claudia Scheuer und Julia Parakenings für die Unterstützung beim Western Blot.

Vielen Dank an Sandra Hans und Claudia Bickelmann für die Unterstützung bei der Histologie.

Ein großes Dankeschön an die Tierpfleger des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie für die Versorgung der Mäuse und an Dr. med. vet. Monika Frings für die Beaufsichtigung der Versuche.

Vielen Dank an alle Mitarbeitende des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie für die tolle Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt Jurena, meinen Eltern, Großmutter und Manfred für die jahrelange emotionale Begleitung dieser Arbeit!

12 Lebenslauf

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

Tag der Promotion: 08.09.2025

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

Berichterstatter: Prof. Dr. Tina Histing

Prof. Dr. Stefan Landgraeber