

Aus dem Zentrum für Orthopädie und Unfallchirurgie (ZOU)  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**„Untersuchung des Einflusses von Losartan  
auf die Entwicklung einer posttraumatischen Gelenkkontraktur  
des Kniegelenks im Rattenmodell“**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Veit Tim Mickan  
aus Radebeul

Mainz, 2023

Tag der Promotion:

04. Mai 2023

*Für  
meine Frau,  
meine Eltern,  
meinen Bruder  
und  
meine Großeltern.*

*In tiefer Dankbarkeit  
für ihre  
unerschöpfliche Liebe  
und Unterstützung.*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>7</b>
<b>2. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>10</b>
<b>3. EINLEITUNG</b>	<b>13</b>
<b>4. LITERATURDISKUSSION</b>	<b>15</b>
4.1 DIE POSTTRAUMATISCHE GELENKKONTRAKTUR	15
4.1.1 <i>Einführung</i>	15
4.1.2 <i>Einteilung</i>	15
4.1.3 <i>Histopathologie</i>	16
4.1.4 <i>Pathophysiologie</i>	17
4.2 ELLENBOGENVERLETZUNGEN	24
4.2.1 <i>Epidemiologie</i>	24
4.2.2 <i>Versorgung einer Ellenbogenverletzung</i>	25
4.2.3 <i>Therapeutische Möglichkeiten bei Gelenksteife</i>	26
4.3 DAS EXPERIMENT	28
4.3.1 <i>Grundlagen medikamentöser Behandlungsziele</i>	28
4.3.2 <i>Bisherige experimentelle Therapien</i>	29
4.3.3 <i>Die Möglichkeiten durch Losartan</i>	31
<b>5. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>34</b>
5.1 STUDIENDESIGN	34
5.2 MEDIKATION	36
5.3 OPERATION	37
5.3.1 <i>Vorbereitung</i>	37
5.3.2 <i>Aufbau</i>	37
5.3.3 <i>Anästhesie</i>	39



## INHALTSVERZEICHNIS

---

5.3.4	<i>Operationsmethode</i>	41
5.3.5	<i>Entfernung des Kirschner-Drahtes</i>	48
5.4	BESTIMMUNG DER GELENKBEWEGLICHKEIT	50
5.4.1	<i>Messparameter</i>	50
5.4.2	<i>Ausführung</i>	51
5.4.3	<i>Auswertung</i>	55
5.5	HISTOLOGIE	56
5.5.1	<i>Dekalzifikation &amp; Einbettung</i>	56
5.5.2	<i>Mikrotomie &amp; Färbung</i>	57
5.5.3	<i>Morphometrische Bestimmung</i>	58
5.6	STATISTISCHE METHODEN	60
<b>6.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>61</b>
6.1	PERIOPERATIVE GEWICHTSENTWICKLUNG	61
6.2	VERÄNDERUNGEN DES BEWEGUNGSMAßES IM KNIEGELENK	63
6.2.1	<i>Ergebnisse zur maximal möglichen Extension des Kniegelenks</i>	64
6.2.2	<i>Ergebnisse zur myogenen Komponente der Gelenkkontraktur</i>	67
6.2.3	<i>Ergebnisse zur arthrogenen Komponente der Gelenkkontraktur</i>	68
6.2.4	<i>Ergebnisse zur Gesamtkontraktur des Kniegelenks</i>	69
6.3	MORPHOMETRIE DER DORSALEN KNIEGELENKKAPSEL	71
6.3.1	<i>Untersuchung der Länge der dorsalen Kniegelenkscapsel</i>	71
6.3.2	<i>Untersuchung der Dicke der dorsalen Kniegelenkscapsel</i>	74
<b>7.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>75</b>
7.1	DER EINFLUSS VON LOSARTAN AUF DAS BEWEGUNGSMAß	75
7.2	VERÄNDERUNGEN DER DORSALEN GELENKKAPSEL DURCH LOSARTAN	79
7.3	EINE EINORDNUNG DES EXPERIMENTS IN DIE AKTUELLE FORSCHUNG	81
7.4	LIMITATIONEN DES EXPERIMENTS	84

## INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>8. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>87</b>
<b>9. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>89</b>
<b>10. ANHANG</b>	<b>106</b>
10.1 NUTZUNGSERKLÄRUNG FÜR ILLUSTRATIONEN VON ANKE GRÜNOW	106
10.2 EQUIPMENT	107
10.3 MEDIKAMENTE	108
10.4 REAGENZIEN	109
10.5 VERBRAUCHSMATERIALIEN	109
<b>11. DANKSAGUNG</b>	<b>112</b>

# 1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNG	BEDEUTUNG
Abb.	Abbildung
AC	Arthrogene Gelenkkontraktur (arthrogenic contracture)
ACEI	Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer
ACLR	Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes
Ang II	Angiotensin II
a.p.	Anterior posterior
ARB	Angiotensin-Typ-1-Rezeptorantagonist
$\alpha$ -SMA	Alpha-Smooth Muscle Actin
AT-1	Angiotensin-Typ-1-Rezeptor
AT-2	Angiotensin-Typ-2-Rezeptor
BA	Physiologischer Extensionswinkel (baseline angle)
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET-1	Endothelin-1
EZM	Extrazelluläre Matrix
g	Gramm
HE	Hämatoxylin-Eosin
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IQR	Interquartilsabstand
JA	Extensionswinkel (joint angle)
JAX	Extensionswinkel nach periartikulärer Myotomie
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
<b>Placebo</b>	erhaltende Untersuchungsgruppe...
Kontrolle 2I	...mit zweiwöchiger postoperativer Immobilisationsphase
Kontrolle 4I	...mit vierwöchiger postoperativer Immobilisationsphase

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

Kontrolle 4I+Re	...mit vierwöchiger postoperativer Immobilisations- und vierwöchiger Remobilisationsphase nach Drahtextraktion
Konz.	Konzentration
<b>Losartan</b>	erhaltende Untersuchungsgruppe...
Losartan 2I	...mit zweiwöchiger postoperativer Immobilisationsphase
Losartan 4I	...mit vierwöchiger postoperativer Immobilisationsphase
Losartan 4I+Re	...mit vierwöchiger postoperativer Immobilisations- und vierwöchiger Remobilisationsphase nach Drahtextraktion
M.	Musculus (lat.) = Muskel
MC	Myogene Gelenkkontraktur (myogenic contracture)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MW	Mittelwert
N	Größe der Grundgesamtheit
NaCl	Natriumchlorid
N·mm	Newtonmillimeter (Einheit für das Drehmoment <i>M</i> )
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
∅	Durchmesser
OP	Operation
°	Winkelgrad
p.a.	Posterior anterior
p	Signifikanzwert
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PTGK	Posttraumatische Gelenkkontraktur
ROS	Freie Sauerstoffradikale (reactive oxygen species)
SD	Standardabweichung
SP	Substanz P
TC	Gesamtkontraktur (total contracture)
TEP	Totalendoprothese
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinases
TNF- α	Tumornekrosefaktor-α

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WHO	World Health Organization

---

## 2. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

### ABBILDUNGEN

---

ABB. 1: EINTEILUNG DER URSACHEN FÜR EINE POSTTRAUMATISCHE GELENKKONTRAKTUR NACH KAY [34] .....	16
ABB. 2: PATHOGENESE DER FIBROSE [4] .....	18
ABB. 3: DARSTELLUNG VON VIER POTENZIELLEN REZEPTOREN UND DEN DAZUGEHÖRIGEN ZYTOKINEN, DIE MIT ARTHROFIBROSE ASSOZIIERT SIND [4].....	22
ABB. 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ANGIOTENSIN II-, TGF-B- UND SMAD-SIGNALWEGE [19] .....	31
ABB. 5: DARSTELLUNG DER VERSUCHSPLANUNG .....	35
ABB. 6: AUFBAU DES OPERATIONSBEREICHES.....	38
ABB. 7: HYPEREXTENSION IM LINKEN KNIEGELENK.....	42
ABB. 8: RASUR UND DESINFEKTION DES LINKEN BEINS .....	42
ABB. 9: HAUTSCHNITT AM LATERALEN FEMUR.....	43
ABB. 10: DARSTELLUNG DES SEPTUM INTERMUSCULARE .....	43
ABB. 11: BLICK AUF DAS FREIGELEGTE FEMUR.....	43
ABB. 12: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER HANDBOHRUNG [1].....	44
ABB. 13: BLICK AUF DAS BOHRLOCH AM CONDYLUS LATERALIS FEMORIS.....	44
ABB. 14: HAUTSCHNITT AN DER VENTRALEN TIBIA .....	44
ABB. 15: POSITIONIERUNG DES BOHRERS AN DER TIBIA .....	45
ABB. 16: POSITIONIERUNG DES BOHRERS AM FEMUR .....	45
ABB. 17: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER BOHRVERLÄUFE [1] .....	45
ABB. 18: EINFÄDELN DES DRAHTES DURCH DAS FEMUR .....	46
ABB. 19: BIEGUNG DES DRAHTES AM MITTLEREN FEMURSCHAFT .....	46
ABB. 20: BIEGUNG DES DRAHTES AN DER VENTRALEN TIBIAKANTE .....	46
ABB. 21: POSITIONIERUNG DES TIBIALEN DRAHTHAKENS .....	47
ABB. 22: FASZIENNAHT .....	47
ABB. 23: POSTOPERATIVES KONTROLLBILD DER DRAHTLAGE .....	47

## ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

---

ABB. 24: SCHEMA MIT DEN ZU MESSENDEN PARAMETERN AM KNIEGELENK [1] .....	50
ABB. 25: DER VERSUCHSAUFBAU ZUR MESSUNG DER EXTENSION IM LINKEN KNIEGELENK.....	51
ABB. 26: RÖNTGENBILD DER PRÄOPERATIVEN MESSUNG DER EXTENSION .....	52
ABB. 27: RÖNTGENBILD DER MESSUNG NACH DRAHTENTFERNUNG (IN DIESEM BEISPIEL NACH VIER WOCHEN IMMOBILISATION) .....	53
ABB. 28: RÖNTGENBILD DER MESSUNG VIER WOCHEN NACH DRAHTENTFERNUNG.....	53
ABB. 29: RÖNTGENBILD DER MESSUNG NACH OBERSCHENKELAMPUTATION UND ZIRKULÄRER DURCHTRENNUNG DER MUSKULATUR .....	54
ABB. 30: AUSMESSUNG DES BEWEGUNGSMAßES MITTELS IMAGEJ .....	55
ABB. 31: ÜBERSICHT EINES SAGITTALSCHNITTES DURCH DAS KNIEGELENK .....	58
ABB. 32: MESSPARAMETER DER DORSALEN GELENKKAPSEL AM HISTOLOGISCHEN PRÄPARAT .....	59
ABB. 33: DARSTELLUNG DER PERIOPERATIVEN GEWICHTSENTWICKLUNG ÜBER DEN GESAMTEN BEOBACHTUNGSZEITRAUM VON ACHT WOCHEN IM VERGLEICH ZWISCHEN DER LOSARTAN- UND DER KONTROLLGRUPPE .....	61
ABB. 34: VERGLEICH DER MAXIMALEN EXTENSION DES KNIEGELENKS MIT UND OHNE GABE VON LOSARTAN VOR UND NACH ZWEI WOCHEN IMMOBILISATION; ** ( $p \leq 0,001$ ) .....	64
ABB. 35: VERGLEICH DER MAXIMALEN EXTENSION DES KNIEGELENKS MIT UND OHNE GABE VON LOSARTAN VOR UND NACH ZWEI UND VIER WOCHEN IMMOBILISATION; * ( $p \leq 0,05$ ), ** ( $p \leq 0,001$ ).....	65
ABB. 36: DARSTELLUNG DER MAXIMALEN EXTENSION DES KNIEGELENKS MIT UND OHNE GABE VON LOSARTAN VOR UND NACH 8 WOCHEN IMMOBILISATION UND REMOBILISATION SOWIE IM VERGLEICH ZU DEN ERGEBNISSEN NACH 2 BZW. 4 WOCHEN IMMOBILISATION; ** ( $p \leq 0,001$ ) .....	66
ABB. 37: VERGLEICHENDE DARSTELLUNG DER MYOGENEN GELENKKONTRAKTUR MIT UND OHNE GABE VON LOSARTAN NACH 2 BZW. 4 WOCHEN IMMOBILISATION SOWIE NACH 8 WOCHEN IMMOBILISATION UND REMOBILISATION .....	67
ABB. 38: VERGLEICHENDE DARSTELLUNG DER ARTHROGENEN GELENKKONTRAKTUR MIT UND OHNE GABE VON LOSARTAN NACH 2 BZW. 4 WOCHEN IMMOBILISATION SOWIE NACH 8 WOCHEN IMMOBILISATION UND REMOBILISATION; * ( $p \leq 0,05$ ).....	68

## ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

---

ABB. 39: VERGLEICHENDE DARSTELLUNG DER GESAMTKONTRAKTUR DES KNIEGELENKS MIT UND OHNE GABE VON LOSARTAN NACH 2 BZW. 4 WOCHEN IMMOBILISATION SOWIE NACH 8 WOCHEN IMMOBILISATION UND REMOBILISATION; ** ( $p \leq 0,001$ ) .....	69
ABB. 40: DARSTELLUNG DER GESAMTLÄNGE DER DORSALEN KNIEGELENKSKAPSEL MIT UND OHNE GABE VON LOSARTAN NACH 2 BZW. 4 WOCHEN IMMOBILISATION SOWIE NACH 8 WOCHEN IMMOBILISATION UND REMOBILISATION; * ( $p \leq 0,05$ ).....	71
ABB. 41: VERGLEICH DER DICKE DER DORSALEN KNIEGELENKSKAPSEL NACH 2 BZW. 4 WOCHEN IMMOBILISATION SOWIE NACH 8 WOCHEN IMMOBILISATION UND REMOBILISATION; * ( $p \leq 0,05$ ) .....	74

## TABELLEN

---

TABELLE 1: AUFLISTUNG ALLER BENÖTIGTEN MATERIALIEN .....	39
TABELLE 2: BESTIMMUNG DER VOLUMINA ZUR DURCHFÜHRUNG EINER NARKOSE UND DER ANTAGONISIERUNG AM BEISPIEL EINER 400 G SCHWEREN RATTE .....	40
TABELLE 3: HILFSTABELLE ZUM ANSETZEN DES TRAMADOL-TRINKWASSERS .....	41
TABELLE 4: MENGENANGABEN ZUR HERSTELLUNG DER ENTKALKUNGSLÖSUNG.....	56
TABELLE 5: DARSTELLUNG DER ENTWICKLUNG DER LÄNGEN DER PARS SUPERIOR UND DER PARS INFERIOR MIT UND OHNE GABE VON LOSARTAN NACH 2 BZW. 4 WOCHEN IMMOBILISATION SOWIE NACH 8 WOCHEN IMMOBILISATION UND REMOBILISATION .....	72



### 3. EINLEITUNG

In Folge eines traumatischen Ereignisses an einem Gelenk werden durch Entzündungsreaktionen unmittelbar Reparaturprozesse eingeleitet mit dem Ziel der Wundheilung und damit der Wiederherstellung einer regelrechten Artikulation [2]. Die ablaufende Entzündungskaskade resultiert in der Aktivierung von Myofibroblasten, die durch ihre kontraktile und Kollagen synthetisierenden Eigenschaften die Integrität des Gewebes wiederherstellen [3]. Durch gestörte Gegenregulationsmechanismen, die normalerweise den Heilungsprozess beenden, kann es jedoch zu einer gestörten übermäßigen Narbenbildung (Fibrosierung) mit Verschlechterung der Gelenkbeweglichkeit kommen [4].

Die daraus resultierende, als posttraumatische Gelenkkontraktur (PTGK) bezeichnete Erkrankung stellt ein häufiges orthopädisches Problem dar [5]. Beispielsweise beklagen 10 - 15 % der Patient\*innen nach Ellenbogenverletzungen über eine chronische Ellenbogensteife [6]. Bis zu 10 % der Patient\*innen, die eine Totalendoprothese (TEP) des Kniegelenks erhalten, entwickeln in der Folge eine PTGK [7]. Sie können unter chronischen Schmerzen leiden und bei Aktivitäten des täglichen Lebens deutlich eingeschränkt sein. Dies kann zu Problemen im Sozialleben und sogar zum Verlust des Arbeitsplatzes führen [8, 9]. Die aktuell zur Behandlung einer PTGK angewandten physiotherapeutischen und operativen Maßnahmen zielen auf eine Linderung der Schmerzen und Verbesserung der Gelenkbeweglichkeit ab. Einige Studien konnten jedoch zeigen, dass durch die Invasivität der Anwendungen der profibrotische Teufelskreis zusätzlich vorangetrieben wird [10, 11]. Behandlungsmöglichkeiten, die die zellulären und molekularen Pathomechanismen der PTGK beeinflussen, rücken deshalb immer mehr in den Fokus der aktuellen Forschung [12].

Ein neuer Therapieansatz zur Behandlung von Gelenkkontrakturen könnte die medikamentöse Hemmung von Myofibroblasten darstellen. Bei Untersuchungen von kontrakten Gelenkkapseln konnten diese in signifikant erhöhten Mengen festgestellt und ihre bedeutende Rolle, während der Fibrosierung, unterstrichen werden [13, 14]. In den letzten Jahren wurden bereits erhebliche Erkenntnisse über den Einfluss von Myofibroblasten und deren Regulationsmechanismen bei fibrotischen Prozessen an mehreren Organen gewonnen [15-18]. Insbesondere zeigte sich, dass das Hormon Angiotensin II (Ang II) neben seinen bekannten renalen und kardiovaskulären Wirkungen, als Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Fibrose spielt [19]. Ang II, präsent in fast allen Geweben, wirkt lokal über eine Aktivierung des Angiotensin-Typ-

1-Rezeptor (AT-1) profibrotisch und stimuliert die Aktivierung und Proliferation von Entzündungszellen und damit die exzessive Produktion von extrazellulärer Matrix (EZM) [20, 21]. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Hemmung von Ang II mithilfe von hochselektiven AT-1-Rezeptorantagonisten die Fibrose in vielen Organen, wie z.B. Herz, Niere, Leber, Lunge und Skelettmuskel, wesentlich verbessert oder sogar rückgängig gemacht werden konnte [22-26]. Speziell der Wirkstoff Losartan, der zur Behandlung einer arteriellen Hypertonie, Herzinsuffizienz und diabetischer Nephropathie zugelassen ist, offenbarte ein hohes antifibrotisches Wirkpotential [22-26].

In einer bereits veröffentlichten Studie des Zentrums für Orthopädie und Unfallchirurgie der Universitätsmedizin Mainz konnte ein neues, zuverlässiges Rattenmodell für eine PTGK des Kniegelenks vorgestellt werden, welches eine humane Gelenkverletzung mit anschließender Ruhigstellung imitiert [27]. Das Ziel dieser Dissertation ist es anhand des eben genannten Modells zu untersuchen, inwiefern sich die bereits gewonnenen Kenntnisse über die antifibrotischen Eigenschaften von Losartan auch auf die Entwicklung einer PTGK übertragen lassen. Hierzu wurde eine randomisierte, kontrollierte Studie konzipiert, in der 48 Sprague Dawley Ratten nach Kniegelenkstrauma über einen Beobachtungszeitraum von zwei, vier oder acht Wochen entweder Losartan oder Placebo oral einnahmen. Der primäre Endpunkt der experimentellen Studie war die Remission der PTGK. Der sekundäre Endpunkt war die unter der Therapie auftretende histologische Veränderung der dorsalen Gelenkkapsel. Die Hypothese dieser Arbeit ist es, dass durch die Gabe von Losartan die Aktivierung von Myofibroblasten gehemmt und damit die posttraumatische Gelenkkontraktur reduziert wird. Diese in-vivo-Testung eines bekannten und gut verträglichen Medikaments könnte damit den nächsten Schritt auf dem Weg zur Entwicklung einer praktikablen medikamentösen Prophylaxe der PTGK beim Menschen darstellen.

---

## 4. LITERATURDISKUSSION

### 4.1 Die posttraumatische Gelenkkontraktur

#### 4.1.1 Einführung

In Folge eines Luxationsereignisses oder einer Fraktur mit Gelenkbeteiligung setzen Mechanismen ein, die für eine schnelle Wiederherstellung der mechanischen Stabilität im Gelenk sorgen [28]. Vor allem bei chronischen oder rezidivierenden Verletzungen und/oder durch operative Eingriffe kann es jedoch zu einer gestörten Immunantwort während der Wundheilung kommen [4]. Eine vor allem durch das Zytokin Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ) vermittelte Entzündungskaskade resultiert in einem solchen Fall in einer gesteigerten Proliferation und Lebensfähigkeit von Myofibroblasten [28]. Durch den Ausfall der physiologischen Gegenregulation bilden sie exzessiv extrazelluläre Matrix (EZM) [29]. Als Resultat entsteht steifes und verkürztes fibrotisches Narbengewebe, welches die Funktion im angeschlossenen Gelenk limitiert [30]. In diesem Sinne wird die posttraumatische Gelenkkontraktur (PTGK) in der Literatur als eine Unterform der Arthrofibrose gesehen. Dies kann in vielen Gelenken auftreten und ist z.T. besser bekannt unter Begriffen wie frozen shoulder, Ellenbogen- oder Kniegelenksteife [31]. Eine PTGK kann erhebliche Beschwerden und starke körperliche Einschränkungen verursachen. Kontrakturen in den Ellenbogen- oder Kniegelenken können Aktivitäten des täglichen Lebens, wie z.B. die Körperpflege, die Nahrungsaufnahme oder das Ankleiden, erheblich einschränken. Schließlich kann dies zu starken Einbußen in der Lebensqualität und Einschränkungen in der Arbeitswelt mit nicht zu unterschätzenden psychologischen Auswirkungen auf das Wohlbefinden führen [2].

#### 4.1.2 Einteilung

Um die Ursachen für eine Gelenksteife verstehen und damit auch das therapeutische Vorgehen besser planen zu können, kann man die PTGK anhand der anatomischen Lokalisation in intra- oder extraartikulär einteilen [32]. Nach Morrey führen Pathologien der Synovialis, des Knochens und des Gelenkknorpels in Form von Adhäsion, Inkongruenz oder Destruktion zu intraartikulären Kontrakturen [33]. Bei extraartikulären Kontrakturen sind vor allem die Gelenkkapsel und -bänder sowie Haut und Bindegewebe (z.B. durch Verbrennungen) betroffen [32]. Die meisten Kontrakturen präsentieren sich als Mischform von intra- und

extraartikulären Komponenten. Beispielsweise sind in Folge von Frakturen neben intraartikulären Gelenkinkongruenzen häufig auch periartikuläre Vernarbungen und heterotope Ossifikationen zu finden. Die Einteilung nach Kay (siehe Abb. 1) orientiert sich aus chirurgischer Perspektive an den Gewebsstrukturen, die an der PTGK beteiligt sind [34].

GRAD	BETROFFENE STRUKTUR
I	reine Weichteilkontraktur
II	Weichteilkontraktur mit Ossifikationen
III	nicht dislozierte intraartikuläre Fraktur mit Weichteilkontraktur
IV	dislozierte intraartikuläre Fraktur mit Weichteilkontraktur
V	posttraumatische Knochenbrücken

Abb. 1: Einteilung der Ursachen für eine posttraumatische Gelenkkontraktur nach Kay [34]

#### 4.1.3 Histopathologie

Untersuchungen von Patient\*innen mit einer schweren Gelenksteife haben gezeigt, dass es nach einem Trauma vor allem durch eine Kontraktur der Gelenkkapsel zum Bewegungsverlust kommt [33]. In der genaueren Betrachtung stellte man fest, dass sich eine kontrakte Kapsel durch ihre zellulären und extrazellulären Bestandteile deutlich von einer unveränderten Kapsel unterscheidet. Die inflammatorischen Prozesse der PTGK spiegeln sich durch veränderte Zytokin- und Enzym Spiegel wieder [35]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich in den kontrakten Gelenkkapseln eine signifikant höhere Anzahl an Myofibroblasten befindet [13]. Bedingt durch die vermehrte Produktion von EZM ist die kontrakte Kapsel dicker und hat einen erhöhten Kollagengehalt [35]. Die Kollagenfasern zeigen eine umfangreichere Vernetzung sowie einen niedrigeren Proteoglykan- und Wassergehalt, was zu einer hohen Zugfestigkeit, jedoch zu einer verringerten Dehnbarkeit führt [36]. Veränderte Verhältnisse von Matrixmetalloproteinasen (MMP) und ihren Hemmstoffen (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, kurz TIMP) verlangsamen die Umbauprozesse der EZM und führen damit zu einer verminderten Narbenumgestaltung [37]. Zusätzliche Immobilisation und fehlende mechanische Belastung prädisponieren das Gelenk für eine Zunahme der Kollagenvernetzung und weitere Narbenbildung [36].

#### 4.1.4 Pathophysiologie

Der komplexe Verlauf einer Fibrose ist charakterisiert durch eine Dysregulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort. In Abb. 2 ist dieser Prozess in einem anschaulichen Fließschema dargestellt. Die durch ein Trauma hervorgerufene Verletzung verursacht im Gelenkgewebe oxidativen Stress und eine Entzündungsreaktion, die die Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen (Botenstoffe) wie z.B. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) und Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ) induzieren [4]. Diese locken vermehrt Mastzellen, Makrophagen und Lymphozyten an. Durch die Aktivierung dieser Immunzellen verstärkt sich die Entzündungsreaktion, und die Proliferation von Fibroblasten wird gefördert [4, 38]. Schließlich führt diese Kaskade dazu, dass sich Fibroblasten zu Myofibroblasten differenzieren, die die Hauptrolle bei der Entstehung einer Fibrose spielen. Myofibroblasten können sich durch die eigene Sekretion von TGF- $\beta$  und PDGF der Apoptose entziehen, weitere Immunzellen aktivieren und dadurch den fibrotischen Prozess unterstützen [39]. Aufgrund von Dysregulationen bei der Apoptose und Autophagie von Zellen und Mediatoren sowie sich verstärkende Feedbackmechanismen (dargestellt als gelbe Pfeile in der Abb. 2) durch das gesteigerte Expressieren von Zytokinen, kommt es zu einer anhaltenden pathologischen Fibrosierung mit exzessiver Bildung von EZM, die schließlich zu Adhäsionen und Kontrakturen im Gelenk führen [38, 39].

Das bereits erwähnte Zytokin TGF- $\beta$  ist ein wichtiger Akteur in diesem Prozess. Es stimuliert die Proliferation und Differenzierung der Fibroblasten und verstärkt deren EZM-Produktion [30]. PDGF unterstützt das Überleben und die Proliferation von Myofibroblasten und sorgt für eine höhere TGF- $\beta$ -Eigensynthese der Fibroblasten [4]. Durch die fortwährende Präsenz der profibrotischen Zytokine und Mediatoren wird die chronische Entzündung im Gewebe aufrechterhalten, indem u.a. vermehrt Rezeptoren für weitere Zytokine gebildet werden [40]. Wiederholte Traumata bzw. chronische Entzündungen können epigenetische Modifikationen verursachen und die Aktivierung von Myofibroblasten und matrixbezogenen Genen auslösen [39]. Essentiell für den fibrotischen Umbau ist außerdem mechanischer Stress durch interne und externe Spannungen, die auf das verletzte Gewebe wirken, da sie die biochemische Aktivität der Fibroblasten verändern und diese anregen, sich zu Myofibroblasten zu differenzieren [41]. Fast alle Arten von Immunzellen sind in den Prozess einer Fibrose involviert und die dazugehörigen Stoffwechselwege sind sehr komplex, deswegen soll im Folgenden nur auf die wichtigsten Zelltypen und Zytokine im Detail eingegangen werden.

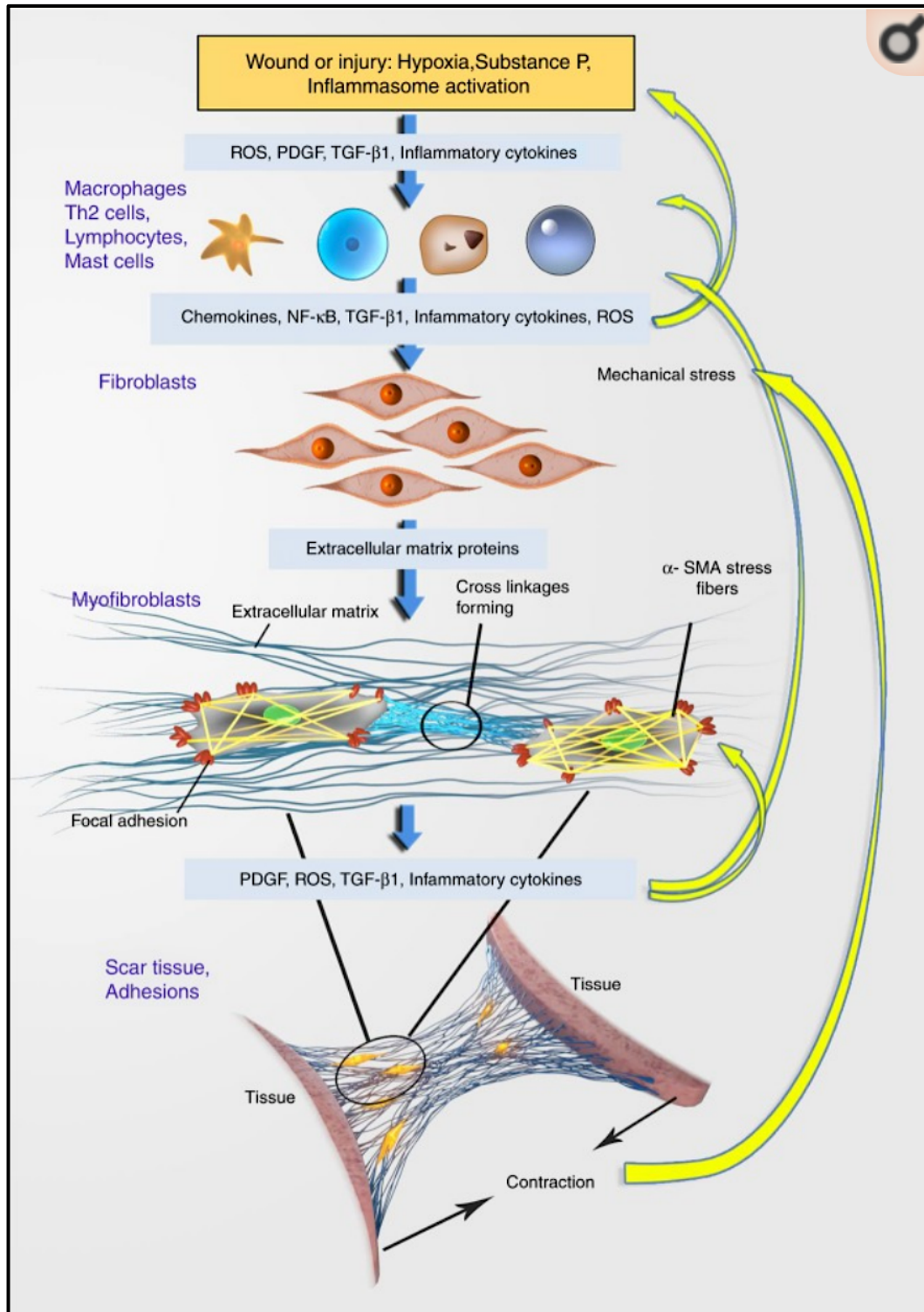


Abb. 2: Pathogenese der Fibrose [4]

### Myofibroblasten

Myofibroblasten sind die wichtigsten Effektorzellen bei der Entstehung einer Fibrose [39]. Sie sind verantwortlich für den Umbau der EZM und die Ablagerung von dichtem fibrotischen Kollagen [42]. Außerdem bilden sie kontraktile Zellverbindungen aus, die es möglich machen, eine Kontraktur im umliegenden Gewebe auszulösen [43]. Sie wurden Anfang der 1970er

Jahre von Gabbiani im Granulationsgewebe von heilenden Hautwunden entdeckt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen sekretorische Eigenschaften von Fibroblasten und kontraktile Merkmale ähnlich der glatten Muskulatur besitzen [44]. Seitdem konnte die wichtige Rolle der Myofibroblasten im Hinblick auf viele pathophysiologische Prozesse im Rahmen der Reparatur und des Umbaus von Gewebe demonstriert werden. Auf der einen Seite begünstigt die Aktivität von Myofibroblasten die Wiederherstellung des Wundverschlusses und der mechanischen Stabilität verletzter Organe [42]. Auf der anderen Seite führt eine deregulierte, chronische Aktivität von Myofibroblasten dazu, dass sich Gewebe durch Kontrakturbildung verformt und damit die Organfunktion einschränkt [45]. Es wurde beobachtet, dass die Ausbildung einer solchen Gewebskontraktur unter verschiedenen Umständen geschehen kann, z.B. bei der Sklerodermie [46] oder beim Morbus Dupuytren in Form einer Fibromatose der Palmaraponeurose [47]. Myofibroblasten spielen ebenfalls bei der Fibrosierung lebenswichtiger Organe, wie Leber, Herz, Lunge oder Niere, eine wesentliche Rolle [15-18].

Myofibroblasten sind eine Mischform aus Fibroblasten und glatten Muskelzellen. Sie besitzen funktionell gesehen einen zweigeteilten Aufbau [28]. Zum einen enthalten sie eine große Anzahl an rauem endoplasmatischem Retikulum zur Produktion von Kollagen Typ III [48]. Dies fungiert als eine Vorstufe von Kollagen Typ I, aus welchem schließlich intaktes Bindegewebe aufgebaut werden kann [48]. Zum anderen enthalten sie einen Aktin-Myosin-Komplex, wie eine glatte Muskelzelle, der eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion, Migration und Morphogenese spielt [45]. Diese kontraktile Bündel aus Mikrofilamenten, auch Stressfasern genannt, können über Integrine in der Zellmembran und fokale Adhäsionen das Zytoskelett mit der EZM verbinden und Einfluss auf die Organisation und Kontraktur der Matrix nehmen [43]. Dadurch können die Zellen untereinander kommunizieren und eine Kontraktion in Verbindung mit der EZM in einem größeren Gewebsverbund auslösen [48].

Der Ursprung von Myofibroblasten liegt in einer großen Vielfalt verschiedener Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass sie als Teil des physiologischen Wundheilungsprozesses unter dem Einfluss von entzündungsfördernden Zytokinen wie TGF- $\beta$ , Interleukin 1 und 6 (IL-1 und IL-6) aus verschiedenen lokalen Zelltypen entstehen können, um verletztes Gewebe schnell zu reparieren [42]. Vor allem Fibroblasten, die sich in verschiedenen Geweben direkt vor Ort befinden, gelten als wichtige Quelle für Myofibroblasten [49]. Abhängig von der Art des verletzten Gewebes und seiner spezifischen Mikroumgebung trägt darüber hinaus eine

Auswahl verschiedener Vorläuferzellen, wie z.B. Chondrozyten, glatte Muskelzellen oder Epithelzellen, zur Population der Myofibroblasten bei [42].

Ein komplexes System aus chemischen und mechanischen Signalen beeinflusst die Entstehung und die Aktivität von Myofibroblasten. Hildebrand et al. konnten zeigen, dass bei einer posttraumatischen Gelenkkontraktur am menschlichen Ellenbogengelenk und im Tiermodell in den Gelenkkapseln erhöhte Werte für die Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$  und Connective Tissue Growth Factor (CTGF) zu finden sind, die Myofibroblasten und fibrotische Prozesse stimulieren [50]. Der wohl am häufigsten in der Forschung und Diagnostik verwendete Marker, um einen Myofibroblasten zu identifizieren, ist das Protein  $\alpha$ -SMA, eine Isoform des Aktins der glatten Muskulatur [45]. Dieses kontraktile Protein, welches in den Stressfasern unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  exprimiert wird, ist nicht nur für die Diagnostik wichtig, sondern auch für die Zellfunktion. Es beeinflusst in großem Maße die Zellkommunikation und -motorik, da seine vermehrte Bildung auch auf das Wachstum und die Ausreifung von fokalen Adhäsionen Einfluss nimmt [43]. Unter diesen Umständen entwickelt sich schließlich eine bessere Kraftübertragung und als Folge eine erhöhte Spannung in der EZM [51].

Am Ende einer normalen Wundheilung gehen einige Myofibroblasten in die Apoptose, während andere zu ihrem ursprünglichen Zelltyp zurückkehren. Die zugrunde liegenden Prozesse, für welchen Weg sich ein Myofibroblast entscheidet, sind jedoch noch unbekannt [52]. Durch epigenetische Veränderungen in Myofibroblasten ist die Aktivität von proinflammatorischen und profibrotischen Genen erhöht [53]. Dies scheint Myofibroblasten für Verletzungen zu sensibilisieren, sodass zurückentwickelte Fibroblasten bei einer erneuten Verletzung mit größerer Wahrscheinlichkeit reaktiviert werden [52]. Aufgrund dieser Beobachtung wird gemutmaßt, dass Patient\*innen bei wiederholten Gelenkoperationen oder -verletzungen anfälliger sind für eine Arthrofibrose. Es konnte bereits gezeigt werden, dass nach jeder Rekonvaleszenz mehr und mehr aus Myofibroblasten zurückentwickelte Fibroblasten und damit mehr und mehr profibrotische Zellen im genesenen Gewebe vorzufinden sind [4].

### Makrophagen

Makrophagen (Fresszellen) stehen in enger Verbindung zu Myofibroblasten. Durch TGF- $\beta$  aktiviert spielen sie eine wichtige Rolle bei der Fibrose [54]. Auf der einen Seite können sie selbst proinflammatorische und profibrotische Zytokine, wie den Tumornekrosefaktor-alpha



(TNF- $\alpha$ ), IL-1, TGF- $\beta$  und PDGF, sezernieren und damit die Initiierung und Aufrechterhaltung einer Fibrose steuern [39, 55]. Auf der anderen Seite können sie die Auflösung einer Fibrose wesentlich beeinflussen, indem sie beispielsweise überschüssiges Kollagen aus beschädigtem Gewebe entfernen oder durch die Sekretion von Kollagenasen Bestandteile der EZM abbauen [55].

### Mastzellen und Substanz P

Bei Patient\*innen mit posttraumatischen Gelenkkontrakturen wurde beobachtet, dass nicht nur die Anzahl der Myofibroblasten in den Gelenkkapseln signifikant erhöht ist, sondern auch die der Mastzellen und neuropeptidhaltiger Nervenfasern [56]. Diese Veränderungen wurden nicht nur in akuten, sondern auch in chronischen Gelenkkontrakturen gefunden [56]. Durch weitere Erkenntnisse stellten Hildebrand et al. die Hypothese einer Myofibroblasten-Mastzellen-Neuropeptide-Fibrose-Achse auf, die als eine weitere Ursache für die fibrotischen Veränderungen in der Gelenkkapsel angesehen wird [57, 58]. Mastzellen reifen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark heran und sind als ausgereifte Zellen in Haut, Schleimhäuten und im Bindegewebe zu finden [59]. Sie können verschiedene profibrotische Mediatoren wie TGF- $\beta$ 1, PDGF, Endothelin-1 (ET-1) und Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) sezernieren, die die Differenzierung und Proliferation von Myofibroblasten induzieren können [60]. Sie stellen damit eine der Schlüsselfiguren bei der Aktivierung von Myofibroblasten dar. Mastzellen wiederum stehen unter einem großen Einfluss von Neuropeptiden, vor allem Substanz P (SP) und Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP). In Gelenkkapseln und -bändern wurden peptiderge Nervenenden, die SP beinhalten, in enger Nachbarschaft zu Mastzellen nachgewiesen [61]. Aufgrund bestimmter Signale, wie Schmerz oder Verletzung, werden SP und CGRP aus freien Nervenendigungen abgesondert und induzieren die Freisetzung der Mastzellmediatoren [62]. Die SP-Synthese wird durch das Auftreten von TNF- $\alpha$  und IL-6 gesteigert [63]. Es kann Entzündungs- und Proliferationsmediatoren sowie viele profibrotische Gene hochregulieren [63, 64]. Außerdem verstärkt es die Produktion von Kollagen Typ I und  $\alpha$ -SMA [65]. Dieser Mechanismus für PTGK steht im Einklang mit dem klinischen Bild, dass durch Schmerzen und Entzündungen in der Verletzungs- und frühen Heilungsphase eine spätere Kontrakturbildung begünstigt wird [2].

### Transforming Growth Factor $\beta$

TGF- $\beta$  spielt eine zentrale Rolle in der Pathologie der Fibrose. Es fördert den fibrotischen Prozess indem es die Migration und Proliferation von Fibroblasten, die Differenzierung zu Myofibroblasten und die Synthese von EZM stimuliert [54]. Es wird von vielen Zellen, u.a. Immunzellen und Myofibroblasten, produziert und aktiviert [41]. Die experimentelle Induktion von TGF- $\beta$  in Kniegelenken von Ratten zeigte in der Folge eine übermäßige Proliferation von Fibroblasten und eine gesteigerte Produktion von EZM (siehe Abb. 3) [31]. Nach einer Verletzung oder einem chirurgischen Eingriff entstehen durch die Hypoxie freie Sauerstoffradikale (ROS), die die Produktion von TGF- $\beta$  stimulieren [66]. TGF- $\beta$  selbst kann zudem die ROS-Produktion induzieren, wodurch ein sich verstärkender Feedbackmechanismus entsteht (siehe Abb. 2) [66]. Indem es die Expression von antioxidativen Enzymen, z.B. Glutathion, hemmt, kann das Zytokin diesen Mechanismus noch verstärken und damit die Zahl an aktivierten entzündungsfördernden Zytokinen signifikant hochregulieren [66].

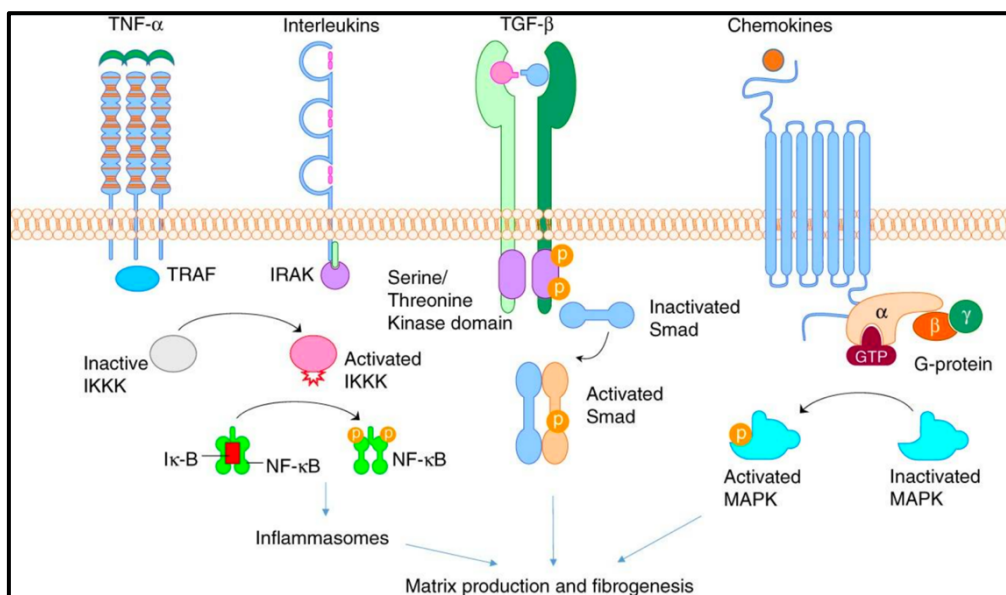


Abb. 3: Darstellung von vier potenziellen Rezeptoren und den dazugehörigen Zytokinen, die mit Arthrofibrose assoziiert sind [4]

### Tumornekrosefaktor $\alpha$

TNF- $\alpha$  ist ein weiteres wichtiges Zytokin für die Pathogenese der Fibrose, da es positiven Einfluss auf die Produktion von TGF- $\beta$ , das Wachstum von Fibroblasten und die Expression von Kollagen Typ I nimmt [67, 68]. TNF- $\alpha$  scheint, nach Mattyasovszky et al., zu Beginn des Heilungsprozesses eine dosisabhängige modulatorische Wirkung auf Myofibroblasten zu

haben [69]. Bei niedrigen Dosen fördert es deren Proliferation. Bei hohen Dosen hemmt es hingegen die Kontraktion der EZM durch Prostaglandin E<sub>2</sub>-vermittelte Herunterregulation der Genexpression von  $\alpha$ -SMA und Kollagen Typ I [69].

### Interleukine

Interleukine sind eine Gruppe von Botenstoffen, die von Leukozyten und Makrophagen sezerniert werden und an der Regulation eines Entzündungsgeschehens im Gewebe beteiligt sind [70]. Die Gruppe der proinflammatorischen Interleukine, vor allem IL-1, IL-6 und IL-17, spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer Fibrose [71].

IL-1 ist ein potentes Zytokin, welches die Transkription von TGF- $\beta$  und PDGF nach einem Trauma induziert und somit die Entwicklung einer Fibrose vorantreibt [72]. Es nimmt Einfluss auf die Zellmigration, die Zelladhäsion, die Produktion von MMP und die Expression von immunmodulatorischen Genen [73]. IL-6 scheint sich vor allem durch die erhöhte Expression von TGF- $\beta$ -Rezeptoren und die damit verstärkte Signaltransduktion an der Entwicklung einer Fibrose zu beteiligen [74]. IL-17, welches vorwiegend aus T<sub>H</sub>17-Zellen und natürlichen Killerzellen freigesetzt wird, regt die Produktion von TGF- $\beta$  und anderen proentzündlichen Zytokinen in Fibroblasten an und fördert gleichzeitig das Überleben dieser Zellen [75]. Außerdem kann es die Produktion von Kollagen Typ I und MMP aktivieren [71, 76].

In einer Studie von Schafer et al. konnte dargestellt werden, dass IL-11 ebenfalls eine stark profibrotische Wirkung besitzt. Es treibt die Synthese von Proteinen voran, die an der Produktion und Kontraktion der EZM und an weiteren Prozessen der Fibrose beteiligt sind [77]. Durch das Auftreten von TGF- $\beta$  wird verstärkt IL-11 produziert. Da IL-11 und sein Rezeptor spezifisch in Fibroblasten exprimiert werden, konnten Schafer et al. zeigen, dass durch die Inhibition dieses Interleukins die profibrotische Wirkung von TGF- $\beta$  gehemmt werden kann [77].

In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass Zytokin IL-4 die Lebensfähigkeit und die kontraktile Eigenschaften von Myofibroblasten positiv beeinflusst, indem es die Genexpression von  $\alpha$ -SMA und Kollagen Typ I hochreguliert [78]. Somit stellt IL-4 ein weiteres Angriffsziel zur Therapie von posttraumatischen Gelenkkontraktur beim Menschen dar [78].

## 4.2 Ellenbogenverletzungen

Im Folgenden soll die Bedeutung der PTGK im klinischen Alltag als Komplikation von Gelenkverletzungen am Beispiel des Ellenbogens verdeutlicht werden. Das Ellenbogengelenk ist eines der beweglichsten Gelenke des Körpers und seine Funktion essenziell, um die Hand frei im Raum positionieren zu können. Aktivitäten des täglichen Lebens können mit einem Bewegungsradius von 30° Extension bis 130° Flexion, sowie einer Unterarmrotation von je 50° Pro- und Supination durchgeführt werden [32]. Das aus drei Teilgelenken zusammengesetzte Drehscharniergelenk, welches von einer gemeinsamen Gelenkkapsel umschlossen wird, weist eine sehr kongruente Konstruktion auf [48]. In Kombination mit den Kollateralbändern sorgt es für ausreichend Stabilität, um Lasten, die über den Unterarm gehalten werden, standzuhalten. Aufgrund seines Aufbaus mit einem relativ begrenzten Gelenkraum und der engen Beziehung zu den Muskeln, welche zusätzlich zur Stabilisation beitragen, ist dieses Gelenk besonders anfällig für eine PTGK [79].

### 4.2.1 Epidemiologie

David M. Sheps hat in seiner Masterarbeit an der University of Calgary unter der Leitung von Dr. K. A. Hildebrand durch die Analyse der Datenbank der Calgary Health Region festgestellt, dass in den Jahren 2002 bis 2005 ca. 1200 Ellenbogenverletzungen (Alter der Patient\*innen  $\geq$  18. Lebensjahr) dokumentiert wurden [8]. In ihrer Hochrechnung auf die Gesamtbevölkerung Kanadas (ca. 35 Millionen Einwohner) ergaben sich daraus schätzungsweise 20.000 Ellenbogenfrakturen und -luxationen pro Jahr [2]. In einer weiteren Studie stellten sie fest, dass im Zuge einer traumatischen Ellbogenverletzung eine von acht Patient\*innen eine operationspflichtige Gelenkkontraktur entwickelte [6]. Daraus schlussfolgerten sie, dass in Kanada pro Jahr ca. 2500 operative Eingriffe zur Kontrakturbehandlung durchgeführt werden [6]. Betroffen ist dabei vor allem die Gruppe der Erwerbstätigen zwischen dem 20. und 60. Lebensjahr [6]. Es zeigt sich also, dass Verletzungen des Ellbogens, wie z.B. Frakturen, Luxationen oder die Kombination aus beidem, häufig mit posttraumatischem Bewegungsverlust oder Gelenkkontrakturen verbunden sind. Außerdem verdeutlichen diese Zahlen, dass das häufige Vorkommen der posttraumatischen Kontrakturen neben den erheblichen Auswirkungen auf die individuelle Lebensqualität auch eine hohe sozioökonomische Belastung für die Gesellschaft darstellt [80-82].

#### 4.2.2 Versorgung einer Ellenbogenverletzung

Anhand der 2018 von der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie e.V. (DGU) herausgegebenen Leitlinie zur Versorgung einer Ellenbogen-Erstluxation [83] soll im Folgenden beispielhaft die Versorgung einer Ellenbogenverletzung und die damit einhergehenden Probleme dargestellt werden. Das Ellenbogengelenk ist das am zweithäufigsten dislozierte Gelenk bei Erwachsenen mit einer Inzidenz von 5 – 6 pro 100.000 Personen pro Jahr [84]. Männer und Frauen erleiden diese Verletzung in gleichem Maße, jedoch sind Männer vor allem in den ersten vier Lebensdekaden und Frauen ab der fünften Lebensdekade mehrheitlich betroffen [85]. 45 % der Unfälle passieren während der Ausübung einer sportlichen Aktivität, z.B. Football/Rugby, Basketball, Turnen oder Inlineskating [85]. Der Unfallmechanismus ist häufig ein Sturz auf die dorsal extendierte und supinierte Hand bei leicht flektiertem Ellenbogen. Die Ellenbogenluxation wird eingeteilt in ligamentär (einfach), bei der das laterale ulnare Kollateralband sowie die dorsale und ventrale Kapsel rupturieren, und in komplex [86, 87], wozu die vor allem bei einer pronierten Unterarmposition entstehenden Luxationsfrakturen zählen [88]. Bei der Erstversorgung einer Patient\*in mit Verdacht auf eine Ellenbogenluxation ist eine konventionelle Röntgenbildgebung in zwei Ebenen zur Verifizierung der Luxation notwendig, sowie die klinische Überprüfung der peripheren Durchblutung, Motorik und Sensibilität. Mögliche Begleitverletzungen der Knochen, Weichteile, Gefäße oder Nerven müssen ausgeschlossen werden. Unter adäquater Analgesie bzw. Analgosedierung wird eine zeitnahe geschlossene Reposition des Gelenks empfohlen, da sich Diese zu 98,5 % erfolgreich gezeigt hat [89]. Nach Ruhigstellung im gespaltenen immobilisierenden Verband erfolgt eine Röntgenkontrolle zur Dokumentation der Reposition und eine erneute Überprüfung der peripheren Durchblutung, Motorik und Sensibilität. Die konservative und frühfunktionelle Therapie bei einfachen Luxationen stellt, basierend auf einer Studie von Hackl et al. [90], den evidenzbasierten Behandlungsstandard dar. Die Publikation des sog. „FuncSiE Trials“ [91] lieferte zusätzlich unterstützende Ergebnisse. Es konnte gezeigt werden, dass eine kurzfristige Immobilisation von maximal einer Woche deutlich zur Schmerzreduktion beiträgt. Durch den anschließenden Beginn einer aktiv-assistierten physiotherapeutischen Behandlung innerhalb der ersten Woche ohne weitere Ruhigstellung konnten die Patient\*innen früher ein funktionelles Bewegungsausmaß erlangen und schneller an den Arbeitsplatz zurückkehren [90, 91]. In einer anderen Studie zeigte sich jedoch, dass im Langzeitverlauf (mittleres Follow-up von 88 Monaten) bleibende

Beschwerden eher die Regel als die Ausnahme darstellen [92]. Von 110 untersuchten Patient\*innen beklagten 56 % Bewegungseinschränkungen, 62 % verbliebene Schmerzen und 8 % ein subjektives Instabilitätsgefühl. Neben bestimmten Indikationen, wie z.B. eine offene Luxation, strukturelle Nerven- oder Gefäßverletzungen oder Repositionshindernissen, die eine operative Versorgung erfordern, fehlt es an Evidenz, um konservative und operative Behandlungsindikationen abzugrenzen. Das Ausmaß der Weichteilverletzung muss berücksichtigt werden, da es das klinische Ergebnis nachweislich negativ beeinflusst [90]. Letztlich hat sich gezeigt, dass eine operative Behandlung in der Akutphase bei höhergradigen Instabilitäten zu guten klinischen Ergebnissen führt [93], jedoch den konservativen Methoden nicht grundsätzlich überlegen ist [94]. Häufig angewandte Operationstechniken sind die offene oder die arthroskopisch-gestützte Bandnaht/-refixation. Zu den häufigsten postoperativen Komplikationen zählen persistierende Instabilitäten, Gelenksteifen und Ulnarisneuropathien [90, 93, 95]. Zur Entlastung der persistierenden posttraumatischen Gelenksteife kann eine operative Arthrolyse durchgeführt werden. Letztlich muss in der Praxis ein engmaschiges klinisches Follow-up nach Ellenbogenluxation erfolgen, um den Behandlungsfortschritt zu sichern und um frühzeitig Komplikationen zu erkennen [96].

### 4.2.3 Therapeutische Möglichkeiten bei Gelenksteife

Aufgrund seiner komplexen Anatomie und Biomechanik ist das Ellenbogengelenk besonders anfällig für die Entwicklung einer posttraumatischen Gelenkkontraktur. Nach wie vor stellt die Behandlung dieser Pathologie eine große Herausforderung dar. Grundlage der Vorgehensweise bildet eine ausführliche Anamnese mit Aufarbeitung der initialen Verletzung und der anschließenden Therapie [97]. Weitere wichtige Faktoren sind: prätraumatisches Bewegungsvermögen, Beginn der Gelenkkontraktur, Symptome, Komorbiditäten (Infektionen, neurologische Ausfälle, etc.) und Compliance der Patient\*in [97]. Es folgen schließlich eine ausführliche Untersuchung, sowie laborchemische und bildgebende Diagnostik zur Einordnung des Schweregrades der Kontraktur. Gemeinsam mit der Patient\*in sollte je nach Leidensdruck und gewünschtem Aktivitätsniveau eine realistische Zielsetzung der Therapie erfolgen, um eine möglichst hohe Compliance zu erreichen [97].

Da es keinen allgemein anerkannten Behandlungsalgorithmus gibt, sollte die Therapie individuell angepasst und zunächst ein konservatives Procedere angestrebt werden [5]. Zudem müssen mechanische Komplikationen, wie z.B. heterotope Ossifikationen oder

knöcherne Fehlstellungen, die eine Einschränkung der Gelenkbeweglichkeit verursachen, ausgeschlossen bzw. operativ versorgt werden. Grundlage der konservativen Therapie besteht in der regelmäßigen physiotherapeutischen Mobilisation des Ellenbogengelenks mit aktiven und passiven Übungen zur Verbesserung der Beweglichkeit sowie antiphlogistisch und analgetisch wirkende physikalische Anwendungen [98]. Unterstützend werden zur langsamen Dehnung des Gewebes aktive oder passive Schienungen eingesetzt [99, 100]. Der Einsatz einer Motorschiene („continuous passive motion“, CPM) ist umstritten, da sich bisher kein signifikanter Benefit gezeigt hat und das Komplikationsrisiko für Blutungen, Schäden des Bandapparates und des Nervus ulnaris erhöht ist [101, 102].

Besteht eine PTGK mehr als 6 Monate bzw. zeigt sich unter der konservativen Therapie seit über drei Monate kein Fortschritt, dann wird eine operative Therapie empfohlen [5]. Bei der Indikation und der Wahl der operativen Versorgung sollten stets die individuellen Anforderungen und Fähigkeiten mit einbezogen werden [5]. Beispielsweise können mittels Arthroskopie Adhäsionen gelöst, Osteophyten abgetragen, freie Gelenkkörper entfernt und die verkürzte Gelenkkapsel durchtrennt werden (Arthrolyse) [5, 79, 103]. Gegebenenfalls ist eine offene Arthrolyse bei ausgeprägten Ossifikationen oder extraartikulären Pathologien notwendig [5, 79]. Eine Behandlungsalternative bei begleitend kompromittierten umliegenden Weichteilen stellt die Distraktionsarthrolyse mittels äußerem Bewegungsfixateur dar. Nach intraoperativer Distraktion wird der Fixateur abwechselnd in maximaler Extension und Flexion arretiert und somit eine regelmäßige Dehnung erreicht [103]. Die Methodik der Narkosemobilisation, bei der eine passive Dehnung des Ellenbogens vollzogen wird, wird in der Literatur bezüglich der Nutzen-Risiko-Abwägung kontrovers diskutiert [104, 105]. Letztlich ergaben die bisherigen Studienergebnisse nur einen mäßigen Erfolg, bei gleichzeitig hohem Komplikationsrisiko, u.a. besteht die Gefahr einer Nerven- oder Bandschädigung, einer heterotopen Ossifikation oder einer erneuten verstärkten Fibrosierung durch Setzen eines neuen Entzündungsreizes [106, 107].

## 4.3 Das Experiment

### 4.3.1 Grundlagen medikamentöser Behandlungsziele

Im letzten Kapitel wurde deutlich, dass die Gelenksteife, welche nach Trauma oder Operationen auftreten kann, eine häufige orthopädische Komplikation darstellt [5]. Durch das eingeschränkte Bewegungsvermögen des verletzten Gelenks sind die betroffenen Patient\*innen physisch und psychisch stark beeinträchtigt [103]. Bisher etablierte physiotherapeutische und chirurgische Maßnahmen zur Behandlung einer Gelenkkontraktur verbessern häufig den Bewegungsbereich [12]. Ergebnisse einer Studie von Kaneguchi et al. legen jedoch nahe, dass sich im Rahmen der therapeutischen Mobilisation eine zusätzliche Inflammation bilden kann, die die Fibrose und damit auch die Bewegungseinschränkung negativ beeinflussen kann [10]. Maßgebend für die Therapie sollte stets die schnelle Wiederherstellung der Gelenkbeweglichkeit, Verringerung von chronischen Schmerzen und die dadurch verbundene verbesserte Lebensqualität sein [80-82]. Ein grundlegendes Problem der gegenwärtigen Maßnahmen ist, dass sie erst angewandt werden, wenn sich bereits eine PTGK entwickelt hat. In den vergangenen Jahren rückte daher die Etablierung einer nicht-invasiven, medikamentösen Therapie zur Prophylaxe bzw. Verbesserung einer PTGK in den Fokus. Durch den präventiven Charakter wären diese Optionen der chirurgischen Therapie überlegen. Gleichzeitig können mögliche Komplikationen eines chirurgischen Eingriffs, wie Schmerzen, Wundheilungsstörungen, Infektionen, Blutungen, Nervenschädigungen oder die Verstärkung der Fibrosierung, vermieden werden [106, 107].

Hauge et Rofstad beschäftigten sich in einer Arbeit mit der Mikroumgebung von soliden Tumorerkrankungen [108]. Ein therapeutisch interessantes Merkmal war hierbei die Fibrose des Gewebes. Die Autoren formulierten anhand der Pathogenese drei Behandlungsziele zur Normalisierung des fibrotischen Gewebes [108]. Analog lassen sich diese auch auf die zielgerichtete antifibrotische Therapie bei PTGK übertragen:

- 1. ZIEL:** die einzelnen Komponenten der EZM (als Strukturen des fibrotischen Gewebes)
- 2. ZIEL:** die Aktivität der Myofibroblasten (als Produzenten der EZM)
- 3. ZIEL:** profibrotische Signalkaskaden (Aktivierung von Myofibroblasten)



### 4.3.2 Bisherige experimentelle Therapien

Die derzeit häufig verschriebenen Medikamente zur Behandlung einer Arthrofibrose oder einer PTGK sind entzündungshemmende Medikamente aus der Gruppe der NSAR, z.B. Aspirin, oder der Glukokortikoide, z.B. Dexamethason oder Prednisolon. Obwohl diese die Fibrosierung von Organen nicht aufhalten können, haben sie immerhin beide in Tiermodellen der Leber- und Lungenfibrose gezeigt, dass sie den Spiegel an profibrotischen Mediatoren reduzieren und damit das Fortschreiten der Fibrose bremsen können [109-111].

Wie in der Arbeit von Usher et al. dargestellt, ist die bei einer PTGK stattfindende Fibrosierung das Resultat eines Ungleichgewicht in der Zytokinproduktion, welches vor allem durch hohe Konzentrationen von TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 befördert wird [4]. Ein wichtiger therapeutischer Ansatz bei der Behandlung der PTGK ist daher die Regulierung dieser Zytokine und Mediatoren. Aktuell gibt es trotz der guten Kenntnisse über die Pathogenese einer Fibrose keine wirksame Therapie, um diese zu stoppen bzw. um sie zu heilen [54, 109]. Die Forschung der letzten Jahre legte ihr Augenmerk vor allem auf die Untersuchung der Regulationsmechanismen, die Einfluss auf die Aktivität der Myofibroblasten nehmen. Es konnten viele bedeutsame Erkenntnisse für die Behandlung verschiedener fibrotischer Erkrankungen, an z.B. Leber, Herz oder Lunge, gewonnen werden [52, 72, 77]. Da Myofibroblasten nicht nur an der Fibrosierung dieser Organe beteiligt sind, sondern auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer PTGK spielen, gilt es zu untersuchen, ob durch diese Erkenntnisse auch neue Therapieansätze zur Behandlung einer PTGK entwickelt werden können. Im Folgenden sollen einige wesentliche Forschungsansätze porträtiert werden.

Im Rahmen ihrer Forschung an der Myofibroblasten-Mastzellen-Neuropeptide-Fibrose-Achse ergründeten Hildebrand et al. mithilfe eines Kaninchenmodells die Wirkung von Ketotifen auf PTGK [2, 58, 112]. Ketotifen ist ein etablierter, zugelassener Arzneistoff aus der Gruppe der H1-Antihistaminika, welcher als kompetitiver Antagonist am H1-Rezeptor und als Mastzellstabilisator wirkt [113, 114]. Der Wirkstoff findet Verwendung im Rahmen von allergischen Erkrankungen wie Heuschnupfen oder atopischer Dermatitis. Das Medikament wirkt zudem antiphlogistisch, indem es die Freisetzung von Entzündungsmediatoren hemmt [58]. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass durch die Behandlung mit Ketotifen die Anzahl an Mastzellen und Myofibroblasten signifikant reduziert und damit die Arthrofibrose verringert werden konnte [112]. In einer randomisierten klinischen Studie (PERK 1) untersuchte die Arbeitsgruppe die Wirkung von Ketotifen nach Ellenbogenfrakturen/-luxationen [115]. Sie

konstatierte, dass die Verabreichung von Ketotifen im Vergleich zum Placebo zu keiner signifikanten Verringerung einer PTGK führte [115]. In einer aktuell noch laufenden prospektiven multizentrischen Phase-III-Studie (PERK 2) wollen sie die Wirksamkeit von Ketotifen zur Reduzierung einer PTGK und den damit einhergehenden Einfluss auf die Lebensqualität nach Gelenkverletzungen eruieren [116].

Xue et al. beschäftigten sich mit der Möglichkeit, die Expression von Zytokinen bereits auf genetischer Ebene zu beeinflussen [31]. Sie konnten erfolgreich anhand eines Rattenmodells mithilfe interferierender RNA-Moleküle PTGK behandeln [117]. Durch die Verwendung eines lentiviralen Vektors schafften sie es, das Smad4-Gen auszuschalten. Hierdurch konnte die Bildung des zu codierenden Smad-Proteins, welches essentiell für den TGF- $\beta$ -Signalweg ist (siehe Abb. 3 und Abb. 4), gehemmt werden [118]. Wie sie schließlich feststellen konnten, resultierte dies in einer Verringerung vieler wichtiger Mediatoren, wie z.B. TNF- $\alpha$ , IL-1 oder IL-6, und einer Verbesserung des Bewegungsausmaßes im Gelenk und der Länge der Gelenkkapsel [117].

Blessing et al. untersuchten die Wirkung von Relaxin-2, einem Peptidhormon, welches u.a. bei Frauen von der Plazenta in der Schwangerschaft produziert wird [119]. Durch seine antifibrotische Wirkung sorgt es dafür, dass der Geburtskanal in Vorbereitung auf den Geburtsakt geweitet wird [120]. Im Detail entfaltet Relaxin-2 seine hemmende Wirkung durch verstärkte MMP-Produktion und verminderte TIMP- und TGF- $\beta$ -Expression sowie verminderte Kollagenproduktion [121]. Im Rattenmodell konnten sie zeigen, dass sich nach mehreren intraartikulären Injektionen von Relaxin-2 das Bewegungsausmaß bei bereits bestehender Gelenksteifheit wieder normalisiert [119]. In der histologischen Untersuchung der behandelten Tiere waren die typischen Merkmale einer Kontraktur nicht mehr vorhanden [119].

Bei den zwei letztgenannten Therapieansätzen erscheint vor allem die angewandte Applikationstechnik ein großes Problem auf dem Weg bis zur klinischen Anwendbarkeit darzustellen. Regelmäßige intraartikuläre Injektionen sind nur aufwendig unter strengen Rahmenbedingungen zu realisieren und können für Patienten schmerzhaft und risikobehaftet (durch Komplikationen wie z.B. eine Infektion oder Blutung) sein [122].

### 4.3.3 Die Möglichkeiten durch Losartan

Eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung von Myofibroblasten spielt der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ , dessen Funktionen und Einflüsse bei der Pathogenese einer Fibrose bereits im Detail im Kapitel 4.1.4 dargestellt wurden. In Untersuchungen zur kardialen Fibrose konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  einen wichtigen Partner bei der Steuerung von fibrogenen Reaktionen benötigt: Angiotensin II (Ang II) [123]. Bei hypertrophen Herzen mit begleitender Fibrose konnte eine erhöhte intrakardiale Ang II-Produktion nachgewiesen werden [124]. Dieses Oligopeptidhormon, welches u.a. Vasokonstriktion und einen erhöhten Blutdruck auslöst, wird lokal von aktivierten Makrophagen und Fibroblasten produziert [125]. Ang II wirkt spezifisch über den Angiotensin-Typ-1 (AT-1)- und Angiotensin-Typ-2 (AT-2)-Rezeptor [126]. Die Stimulation des AT-1 löst eine Vielzahl profibrotischer Effekte aus [20]. Zunächst wird durch Ang II die Produktion von TGF- $\beta$  in Myokardzellen und Fibroblasten verstärkt (siehe Abb. 4) [123].

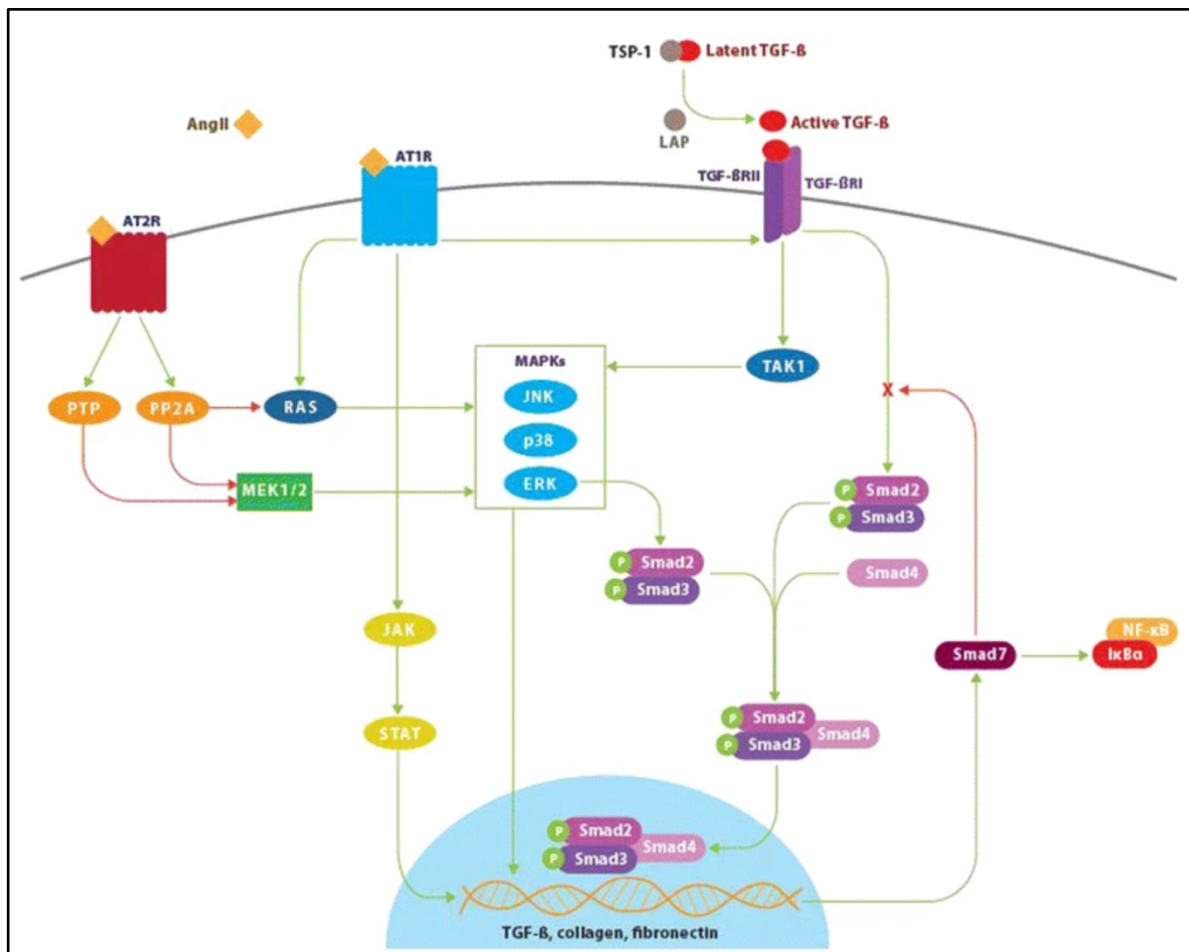


Abb. 4: Schematische Darstellung der Angiotensin II-, TGF- $\beta$ - und Smad-Signalwege [19]

Ang II und TGF- $\beta$  arbeiten schließlich in einem sich gegenseitig verstärkenden Netzwerk zusammen, durch welches u.a. die Proliferation und Aktivierung von Myofibroblasten

verstärkt und die kardiale Fibrose vorangebracht wird [127, 128]. Im Detail wird durch Aktivierung des AT-1 eine Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 über den ERK/p38/MAPK-Weg induziert [129]. Schließlich bilden die phosphorylierten Smad-Proteine mit Smad4 einen Komplex, welcher in den Zellkern transloziert und dort die Transkription von TGF- $\beta$ , Prokollagen I und III und Fibronectin verstärkt [130]. Die Bindung von Ang II an AT-1 aktiviert zudem direkt TGF- $\beta$ , dass die Smad-Signalisierung auf ähnliche Weise aktiviert. Die Aktivierung von AT-2 wirkt diesen Effekten durch Dephosphorylierung entgegen. Der phosphorylierte Smad-Komplex im Zellkern induziert zudem die Smad7-Transkription, welches wiederum eine hemmende Wirkung auf TGF- $\beta$  hat [130].

AT-1 und AT-2 zeigten sich beide deutlich vermehrt während der kardialen Fibrose [20]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Ang II auch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Nieren- und Leberfibrosen spielt [131, 132]. In einer Studie von Shibasaki et al. konnte gezeigt werden, dass bei Patient\*innen mit einer terminalen Niereninsuffizienz durch medikamentöse Antagonisierung die kardiale Fibrose signifikant verringert werden konnte [126, 133]. Das dabei verwendete Medikament war Losartan, ein Angiotensin-Typ-1-Rezeptorantagonist (ARB). Zudem konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass durch den therapeutischen Einsatz von Losartan die Fibrose in verletzten und dystrophisch veränderten Skelettmuskeln signifikant reduziert wurde [134, 135]. Hauge et Rofstad beschrieben in ihrem Paper die Möglichkeiten der antifibrotischen Therapie zur Normalisierung der Mikroumgebung von soliden Tumorerkrankungen [108]. Hierbei zeigten sich ebenfalls im Rahmen von Modellen zur Behandlung von Mamma- und Pankreastumoren vielversprechende therapeutische Wirkungen durch die Gabe von Losartan, die u.a. in einem verbesserten Gesamtüberleben resultierten [136, 137]. Somit konnte bereits mehrfach das antifibrotische Potential von Losartan bei Fibrosen verschiedener Organsysteme nachgewiesen werden.

Die Verwendung von Losartan birgt viele Vorteile. Es hat sich als ein sicheres, gut verträgliches und erschwingliches Medikament etabliert, welches auf der Liste der essentiellen Medikamente der WHO steht [138, 139]. Bisher ist Losartan zur Therapie einer essentiellen Hypertonie, einer chronischen Herzinsuffizienz und einer diabetischen Nephropathie zugelassen. In einer vom Robert Koch-Institut durchgeführten Bevölkerungsumfrage (Studie GEDA 2014/2015-EHIS) zeigte sich, dass in Deutschland im Durchschnitt fast jeder dritte Erwachsene an einer ärztlich diagnostizierten Hypertonie leidet [140]. Bei den  $\geq 65$ -Jährigen

sind es sogar an die zwei Drittel die einen Bluthochdruck haben [140]. Für dieses große Patientenkontingent könnte schließlich im Falle einer notwendigen PTGK-Therapie die bisherige antihypertensive Medikation auf Losartan umgestellt und damit die mögliche Nebenwirkung einer Hypotonie minimiert werden [139].

Bisher gibt es jedoch keine Untersuchungen zur Anwendbarkeit von Losartan bei PTGK. In einer ersten, sich diesem Thema nähernden retrospektiven Studie von Langston et al. wurde untersucht, welche Auswirkungen eine Ang II-Blockade mithilfe von Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmern (ACEI), wie z.B. Ramipril, oder ARB auf das Bewegungsausmaß nach einer Knie-TEP-Operation hat [141]. Sie stellten schließlich fest, dass weder durch die Verwendung von ACEI noch von ARB eine signifikante Veränderung bezüglich des postoperativen Bewegungsausmaßes nach 6 Monaten erreicht werden konnte. In ihrer Diskussion stellten Langston et al. unter anderem die Vermutung auf, dass die Art und Weise der Verabreichung der Medikamente die Auswertung beeinflusst haben könnte [141]. Es ist zum einen unklar, ob die bei diesen Patient\*innen angewandten Standarddosierungen zur Behandlung einer Hypertonie ausreichend sind, um auch eine ausreichende antifibrotische Wirkung zu erzielen. Und zum anderen, ob durch die orale Einnahme der Medikamente eine ausreichende periartikuläre Konzentration erreicht werden kann [141].

---

## 5. MATERIAL UND METHODEN

### 5.1 Studiendesign

Für diese randomisierte und verblindete in vivo Studie wurden zehn Wochen alte männliche Sprague Dawley Ratten (Janvier Labs, Saint-Berthevin Cedex, Frankreich) (N = 48) mit einem Durchschnittsgewicht von  $397 \pm 7$  g verwendet. Alle Versuchstiere wurden in einem abgeschirmten Laboratorium der Schutzstufe 1 individuell in Makrolon Typ IV Käfigen (ZOONLAB GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland) bei Raumtemperatur in einem 12 h Hell-Dunkel-Zyklus gehalten. Sie erhielten uneingeschränkten Zugang zu Futter und Wasser und konnten sich jederzeit frei in den Käfigen bewegen. Die Versuchsplanung wurde mithilfe von The Experimental Design Assistant [142] entwickelt. Wie in der Abb. 5 zu sehen, ist die Studie aus sechs Gruppen aufgebaut, von denen drei jeweils über einen unterschiedlich langen Zeitraum hinweg unter der täglichen oralen Gabe von Losartan beobachtet wurden. Die anderen drei Gruppen waren Kontrollgruppen. Jede Gruppe enthielt die gleiche Anzahl an zufällig zugeordneten Ratten (N = 8). Alle Ratten der drei Behandlungsgruppen wurden an Tag 1 einem operativen Eingriff mit chirurgischer Kniegelenksverletzung (Trauma) unterzogen.

Die Ratten der ersten Gruppe, Losartan 2I, wurden für zwei Wochen posttraumatisch in Flexionsstellung des linken Kniegelenkes mittels Kirschner-Draht (K-Draht) immobilisiert. In der zweiten Gruppe, Losartan 4I, wurde nach dem gleichen Prinzip für vier Wochen das traumatisierte, linke Bein ruhiggestellt. Nach Ablauf des jeweiligen Zeitraums wurde bei allen Ratten der beiden Gruppen der K-Draht entfernt, die entsprechenden Untersuchungen durchgeführt und die Ratten via CO<sub>2</sub>-Inhalation euthanasiert. Über einen Zeitraum von acht Wochen wurde die dritte Gruppe, Losartan 4I+Re, beobachtet. Für diese Gruppe war ebenfalls eine vierwöchige Immobilisation vorgesehen. Daran anschließend wurde der K-Draht entfernt, die Ratten jedoch am Leben gelassen. Ziel dieser Gruppe war es, zu untersuchen, welche Veränderungen nach einem Zeitraum von vier Wochen Remobilisation, im Sinne einer Rehabilitation, auftreten. Den oben genannten Losartan-Gruppen wurden jeweils gleich große Kontrollgruppen gegenübergestellt. Die Ratten der Kontrollgruppen wurden ebenfalls an Tag 1 am traumatisierten, linken Bein operiert, erhielten jedoch kein Medikament, sondern ein Placebo, um die Veränderungen durch die Einnahme von Losartan gegenüber der Einnahme eines Placebos zu ermitteln. Diese Kontrollgruppen wurden äquivalent als Kontrolle 2I, Kontrolle 4I und Kontrolle 4I+Re bezeichnet.

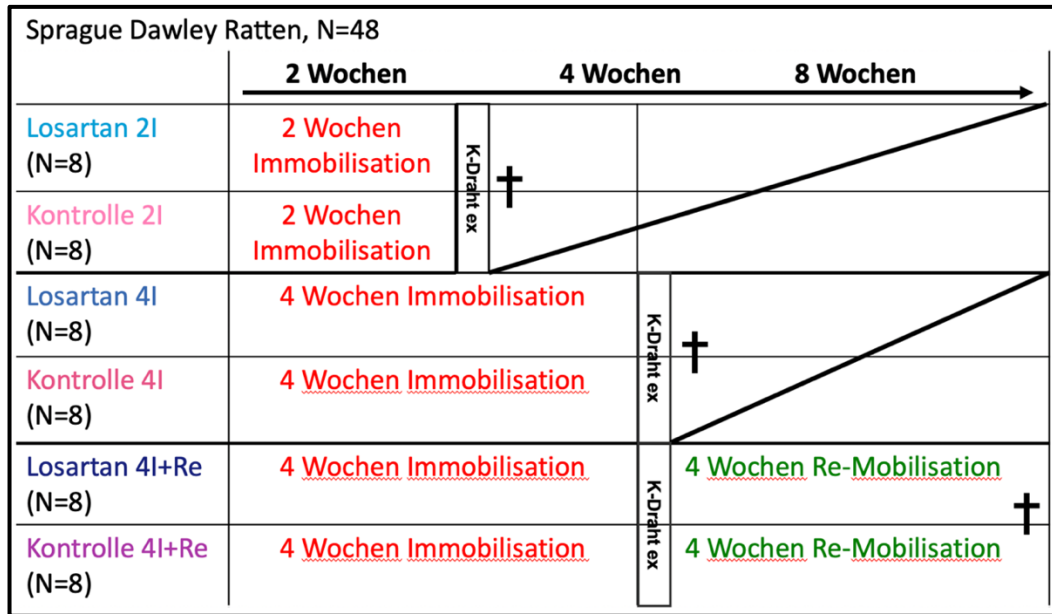


Abb. 5: Darstellung der Versuchsplanung

Die Randomisierung der Ratten in die sechs unterschiedlichen Gruppen erfolgte mittels RandList [143]. Hierdurch konnte gewährleistet werden, dass der Zeitpunkt der durchzuführenden Operationen keinen Einfluss auf das Ergebnis hat. Zu Beginn der Studie wurde zur besseren Vergleichbarkeit festgelegt, dass stets das linke Kniegelenk traumatisiert und operativ immobilisiert wird. Die Randomisierung in die einzelnen Versuchsgruppen und die Verblindung erfolgten durch den Studienkoordinator, der nicht aktiv in die Versuchsdurchführung und Datenerhebung eingebunden war. Dabei waren der Operateur, die Tierpfleger und der Auswerter in Bezug auf Gruppenzuordnung der Ratten und der Medikamente verblindet. Die Vorbereitung der Medikamente zur oralen Applikation fand ebenfalls unter Verblindung statt.

Die Anzahl der Versuchstiere beruhte auf Kalkulationen, die in zuvor durchgeführten Studien erhoben wurden [27, 112]. Die Studie wurde durch das zuständige Ethikkommittee (ID 23 177-07/ G 13-1-043) genehmigt. Es wurde eine Ausnahmegenehmigung nach § 9 Abs. 1 Satz 4 TierSchG (ID LUA-KO/AE 17-1-ES+TM) für den Doktoranden zur selbstständigen Durchführung der Eingriffe und Behandlungen erteilt. Die hierfür notwendigen Module 1 - 3 zur Erlangung von Grundkenntnissen und -fähigkeiten für tierexperimentelle operative Eingriffe gemäß der Tierschutzversuchstierverordnung Anlage 1 (Abschnitt 1 bis 3) an Mäusen und Ratten absolvierte er erfolgreich am Translational Animal Research Center (TARC) der Universitätsmedizin Mainz.

Es wurden entsprechend des Tierschutzgesetzes folgende **Abbruchkriterien** formuliert, die auf stärkere Schmerzen oder Leid des Versuchstieres schließen ließen:

- Aggressivität bei Palpation
- Im Vergleich zu anderen Tieren stark verminderte Futter- oder Wasseraufnahme
- Apathie
- Herzbeschwerden
- Selbstverstümmelungen
- motorische Auffälligkeiten sowie abnormale Körperhaltungen
- Atemstörungen
- Gewichtsverlust von mehr als 20 % des Ursprungsgewicht

Im Falle des Auftretens eines Abbruchkriteriums hätte eine sofortige Tötung des Versuchstieres, ebenfalls durch die Inhalation von CO<sub>2</sub>, folgen sollen.

### 5.2 Medikation

Jeder Ratte wurde ab dem ersten postoperativen Tag bis zur Euthanasie entsprechend ihrer Zuordnung das Medikament Losartan oder ein Placebo verabreicht (siehe Kapitel 10.3). Die Medikation wurde stets auf die gleiche Art und Weise vorbereitet. Die zu verabreichende Menge an Losartan, die eine Wirkung, jedoch kaum Nebenwirkungen gezeigt hatte, wurde basierend auf bereits etablierten Kleintiermodellen festgelegt [24, 144, 145]. Die täglich oral einzunehmende Dosis für Losartan betrug 30 mg / kg KG.

Zunächst wurde das aktuelle Gewicht der Ratten bestimmt. Aus diesem und der empfohlenen Tagesdosis konnte die spezifische Dosis der Ratte berechnet werden. Um einem Verlust, z.B. bei der Applikation, vorzubeugen, wurde die Berechnung der Dosismenge mit einem fünfprozentigen Aufschlag bedacht. Unter kontaminationsfreien Bedingungen wurden die Tabletten im Labor gemörsert und die entsprechende Menge abgewogen. Als nächstes wurde diese mit 10 g einer handelsüblichen Schoko-Creme vermengt und in einem Stück Frischhaltefolie sicher verpackt. Die Medikation pro Ratte wurde jeweils für eine Woche gestellt und in einer Box trocken und vor Wärme geschützt gelagert. Die Gabe erfolgte täglich durch die Tierpfleger oder den Doktoranden. Die Tiere priorisierten den süßen Aufstrich gegenüber ihrem täglichen Essen und verzehrten unverzüglich die applizierte Portion vollständig.



Das Prinzip der freiwilligen oralen Einnahme der täglichen Losartan-Dosis basiert auf Beobachtungen von Diogo et al. [146]. Sie konnten zeigen, dass die Losartan-Plasmakonzentration durch die Verwendung einer Trägersubstanz, wie die hier verwendete Schoko-Creme, um 29 % höher war als bei einer Sondenernährung. Darüber hinaus hoben sie hervor, dass die hier angewandte Methode schonender und selbstbestimmender war, da bestimmte für die Versuchstiere belastende, täglich durchzuführende Arbeitsschritte, wie die Herausnahme aus dem Käfig, die Fixierung durch den Untersucher und schließlich die Einführung einer Magensonde, umgangen wurden [146].

### 5.3 Operation

#### 5.3.1 Vorbereitung

Vor Beginn jeder Operation (OP) wurde überprüft, dass alle benötigten Materialien in ausreichender Zahl vorhanden sind. Die wiederverwendbaren Instrumente wurden nach jedem Einsatz ordnungsgemäß gereinigt, desinfiziert und sterilisiert. Der OP-Tisch wurde vor und nach jedem Einsatz desinfiziert. Während der Vorbereitung und der Operation wurden die allgemein gültigen sterilen Verhaltensregeln eingehalten. Dazu zählen die chirurgische Händedesinfektion, das sterile Anreichen von Instrumenten und Materialien, das Tragen von OP-Schuhen, OP-Haube, Mundschutz und entsprechender OP-Bereichskleidung, bestehend aus einer Hose und einem Kasack. Vor Beginn der OP zog der Operateur zusätzlich einen sterilen Kittel und sterile Operationshandschuhe an.

Außerdem wurde ein OP-Bericht angelegt und die für die OP vorgesehene Ratte identifiziert und notiert. Des Weiteren wurden in diesem Bericht die OP-Zeit, der Operateur/Anästhesist, der Verlauf der Operation mit etwaigen Komplikationen, das Gewicht der Ratte und die entsprechend verwendete Menge an Narkosemittel notiert.

#### 5.3.2 Aufbau

In der Mitte des Operationstisches wurde die zuvor desinfizierte und auf 37,0 °C eingestellte Wärmeplatte platziert. Die gesamte Oberfläche wurde mit einem sterilen Einmaltuch bedeckt. Der Aufbau des OP-Bereiches ist in Abb. 6 und eine Auflistung der verwendeten Materialien und OP-Instrumente ist in Tabelle 1 zu sehen (siehe Kapitel 10 für weitere Informationen).

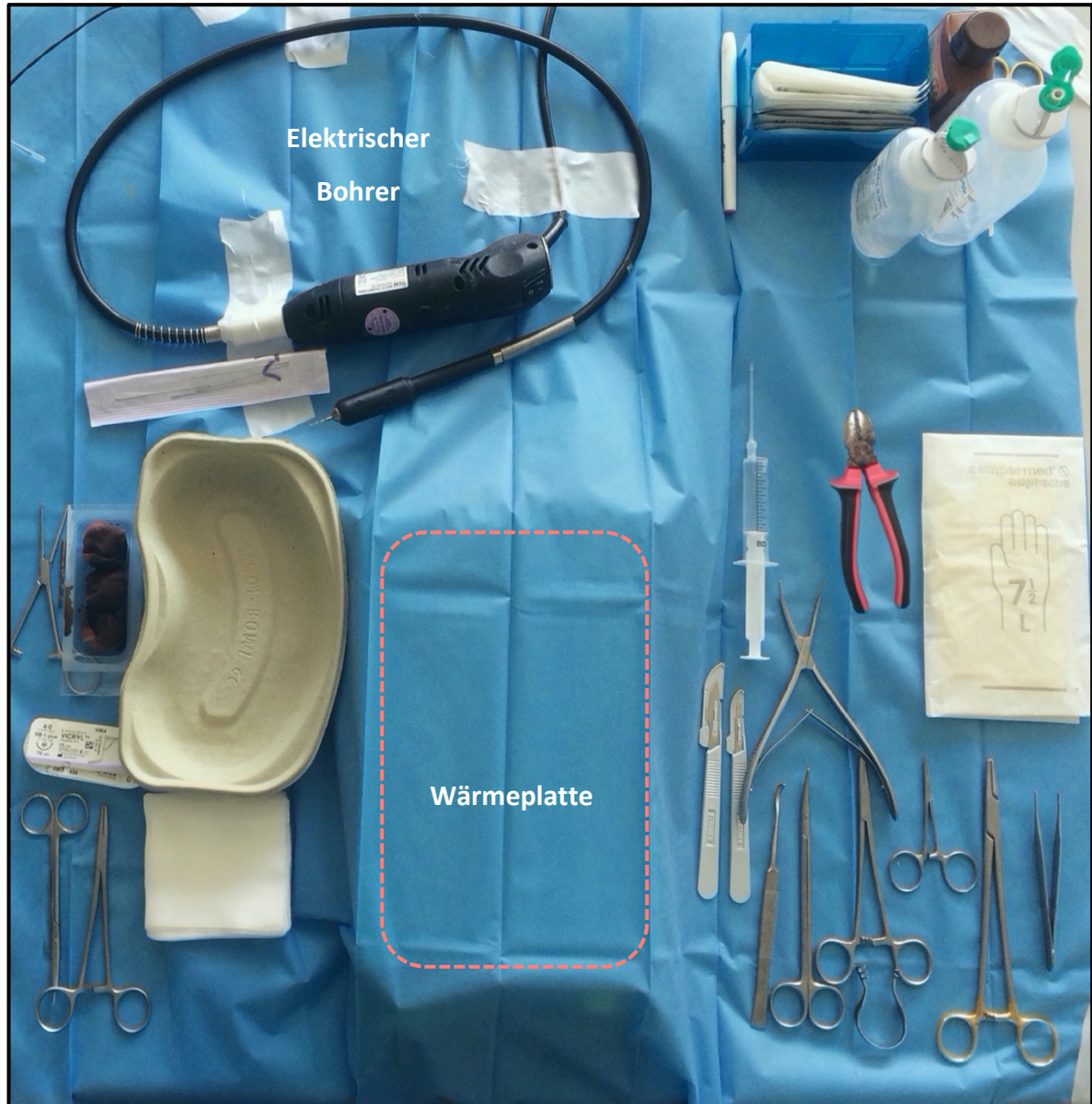


Abb. 6: Aufbau des Operationsbereiches

VERBRAUCHSMATERIALIEN	OP-INSTRUMENTE
Abdecktuch	Elektrischer Bohrer, ø 1,2 mm
Braunol, 100 ml Flasche	Handbohrer, ø 2,00 mm
ETHILON 4-0 (Nahtmaterial für Haut)	Hohlmeißelzange nach Luer
Knopfkanüle	Kocherklemme: gerade, chirurgisch
Mini-Spike	Mosquitoklemme: gerade, anatomisch
NaCl 0,9 %, 100 ml Flasche	Nadelhalter nach De Bakey
Nierenschale	Nadelhalter nach Mayo-Hegar
OP-Handschuhe, Größe 7 ½	Pinzette, chirurgisch nach Adson
Skalpell, groß	Pinzette, spitz
Skalpell, klein	Präparierschere: gebogen, stumpf
Sterile Kompressen	Präparierschere: gebogen, spitz
Spritze, 10 ml	Elevatorium nach Freer
Tupfer, 3 Stück	Seitenschneider
VICRYL 4-0 (Nahtmaterial für Faszien)	Wundspreizer nach Finsen, spitz

*Tabelle 1: Auflistung aller benötigten Materialien*

### 5.3.3 Anästhesie

#### Narkose und Antagonisierung

Um für die Versuchstiere eine dem chirurgischen Eingriff entsprechende Anästhesie zu ermöglichen, wurde eine Kombination mehrerer Injektionsanästhetika verwendet. Zum Einsatz kamen die vollständig antagonisierbaren Narkotika Fentanyl, Midazolam & Medetomidin. Dadurch konnten alle Aspekte einer guten Anästhesie erfüllt werden: Analgesie, Hypnose und Relaxation [147]. Gleichzeitig ermöglichte die Kombination die Verringerung der Dosierung der Einzelpräparate und dadurch auch der Gefahr von möglichen Nebenwirkungen. Fentanyl ist ein hochpotentes, kurz wirksames Analgetikum aus der Gruppe

der Opiate. Midazolam gehört zur Gruppe der Benzodiazepine und wirkt anxiolytisch, relaxierend und krampfhemmend. Ein spezifischer Antagonist ist Flumazenil. Medetomidin ist ein sedativ-hypnotisches Analgetikum und wirkt als sehr spezifischer  $\alpha_2$ -Adrenozeptoragonist. Atipamezol wird als kompetitiver Antagonist verwendet (siehe Kapitel 10.3) [148].

In der Tabelle 2 sind die Dosierungen der Medikamente für die Narkose und Antagonisierung aufgeführt. Zudem sind die zur Verfügung stehenden Konzentrationen der Medikamente angegeben. Am Beispiel für eine 400 g schwere Ratte wurden die jeweiligen zu verabreichenden Volumina berechnet. Im Folgenden eine Beispielrechnung für Midazolam:

$$\left(0,4 \text{ kg} \times 4 \frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right) \div 5 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = 0,32 \text{ ml}$$

<b>Gewicht der Ratte:</b>	0,4 kg		
<b>NARKOSE</b>	<b>Dosierung in mg/kg KG</b>	<b>Konzentration in mg/ml</b>	<b>zu verabreichendes Volumen in ml</b>
Fentanyl	0,005	0,05	0,04
Midazolam	4	5	0,32
Medetomidin	0,375	1	0,15
<b>ANTAGONISIERUNG</b>	<b>Dosierung in mg/kg KG</b>	<b>Konzentration in mg/ml</b>	<b>zu verabreichendes Volumen in ml</b>
Flumazenil	0,2	0,1	0,8
Atipamezol	1	5	0,08

Tabelle 2: Bestimmung der Volumina zur Durchführung einer Narkose und der Antagonisierung am Beispiel einer 400 g schweren Ratte

Die Anästhesie wurde durch Inhalation von 1 % Isofluran-Gas eingeleitet und durch die subkutane Injektion der o.a. Narkotika aufrechterhalten. Vor dem ersten Hautschnitt und während der gesamten Operation wurde regelmäßig überprüft, ob sich die zu operierende Ratte in der gewünschten Narkosetiefe befand. Hierfür sollten der Lid- und der Zwischenzehenreflex erloschen und die Atem- und die Herzfrequenz regelmäßig und etwas niedriger als physiologisch sein [149]. In der Anästhesie wird dieser Zustand als Toleranzstadium bezeichnet. Zum Schutz der Augen vor Austrocknung wurde beidseits ein großzügiger Film Augenschutzsalbe, die den Wirkstoff Dexpanthenol enthält, aufgetragen (siehe Kapitel 10.5). Um einem Wärmeverlust vorzubeugen, wurde darauf geachtet, dass die Ratte stets auf der Wärmeplatte lag.

Postoperative Schmerztherapie

Alle Ratten erhielten zur Schmerzlinderung nach jedem operativen Eingriff das Medikament Tramadol, ein analgetischer Wirkstoff aus der Gruppe der Opiode (siehe Kapitel 10.3). Dieses wurde über den gesamten Zeitraum von drei Tagen vor bis sieben Tage nach jeder Operation verabreicht. Der Zeitraum wurde so ausgewählt, dass eine Gewöhnungsphase an den Geschmack des Medikamentes sowie eine ausreichende Dauer der Schmerzfreiheit für jede Ratte gewährleistet werden konnte. Die Tramadol-Tropfen wurden im Verhältnis 2,5 mg/100 ml Trinkwasser gemischt und anstelle des normalen Trinkwassers angeboten (siehe Tabelle 3). Dadurch konnte die Ratte das Medikament fortwährend oral aufnehmen. Eine Interaktion zwischen Losartan und Tramadol erschien unwahrscheinlich. Beide Medikamente werden durch Isoenzyme des Cytochrom P<sub>450</sub> verstoffwechselt. Losartan ist Substrat von CYP2C9 und Tramadol von CYP3A4. Von einer Induktion oder Hemmung des jeweils anderen Isoenzym ist nicht auszugehen [150]. In den ersten postoperativen Tagen wurde jede Ratte täglich visitiert, um ihren Zustand auf Zeichen von Schmerzen oder Stress zu überprüfen.

ANALGESIE	benötigte Konzentration im Trinkwasser	Konzentration Stammlösung	Benötigte Menge Stammlösung	Verdünnung mit Trinkwasser
Tramadol	2,5 mg/100 ml	100 mg/ml	125 µl	125 µl + 500 ml

*Tabelle 3: Hilfstabelle zum Ansetzen des Tramadol-Trinkwassers*

5.3.4 Operationsmethode

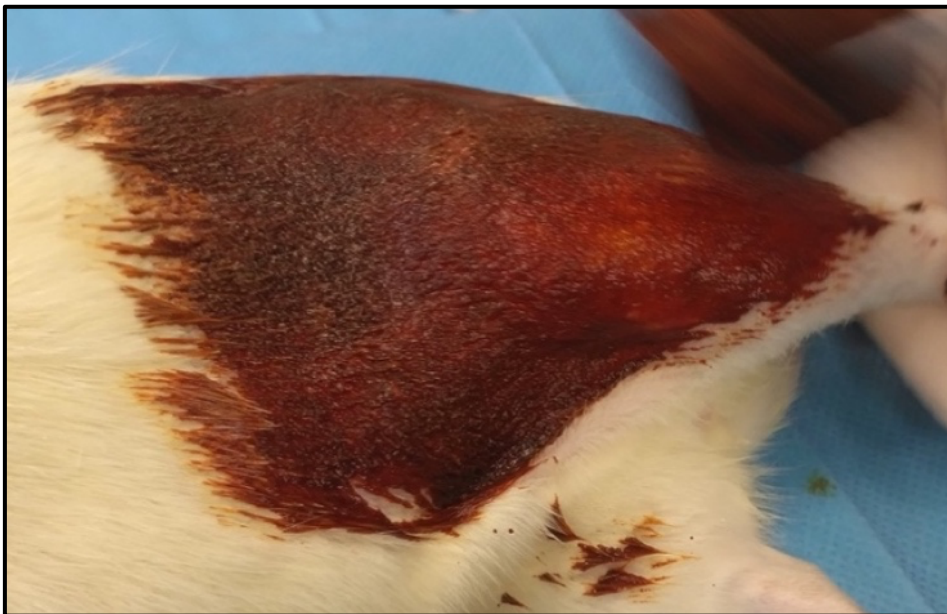
Nachdem der Narkoseschlaf erfolgreich eingeleitet und die richtige Narkosetiefe überprüft wurde, wurde die Ratte in die speziell für den Versuch angefertigte Messvorrichtung eingespannt. Die erste Messung diente zur Ermittlung des natürlichen Bewegungsausmaßes im Kniegelenk auf der zu operierenden, linken Seite. Die genaue Vorgehensweise wird im Kapitel 5.4 „Bestimmung der Gelenkbeweglichkeit“ erläutert. Im nächsten Schritt wurde das zu operierende Bein wie in Abb. 7 von dorsal mit den Daumen und von proximal mit den Zeigefingern an Tibia und Femur gegriffen und im Kniegelenk um -45° hyperextendiert, um eine Ruptur der dorsalen Kapsel zu erzielen [151, 152]. Bei der Durchführung konnte man ein Zerreißen der Kapsel spüren. Es folgte eine Röntgenkontrolle in Frontal- und Sagittalebene, um sicher zu gehen, dass es außer dem dorsalen Kapseldefekt zu keiner knöchernen Verletzung im Bereich des Kniegelenks gekommen war.





*Abb. 7: Hyperextension im linken Kniegelenk*

An einem zweiten Arbeitsplatz wurde das Fell mit einer entsprechenden Schermaschine (siehe Kapitel 10.2) am zu operierenden Ober- und Unterschenkel entfernt. Der rasierte Bereich sowie das angrenzende Fell wurden großzügig mit dem jodhaltigen Hautantiseptikum Braunol (siehe Kapitel 10.5) desinfiziert (siehe Abb. 8).

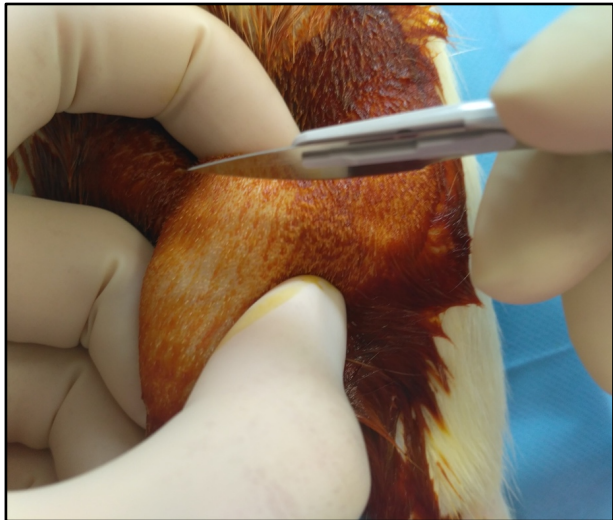


*Abb. 8: Rasur und Desinfektion des linken Beins*

Im Folgenden wird die in der aktuellen Studie angewandte Operationsmethode erklärt, durch welche in einer Vorstudie eine anhaltende PTGK erzielt werden konnte [27].

### - OPERATIONS-METHODE-

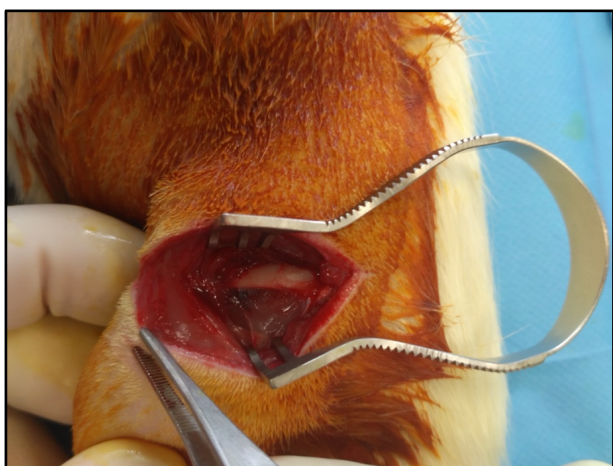
- 1) Mit dem linken Zeigefinger und Daumen wird die Haut am lateralen Femur des linken Beins vorgespannt.
- 2) Der Hautschnitt mittels Skalpell wird kniegelenksnah begonnen und in proximaler Richtung auf einer Länge von 2 - 2,5 cm entlang des Femurs durchgeführt (**Abb. 9**).
- 3) Mit der stumpfen Präparierschere wird die Faszie durchtrennt.
- 4) Das Septum intermusculare zwischen dem M. vastus lateralis und dem M. biceps femoris zeigt sich als feine, leicht bogenförmig verlaufende Linie (**Abb. 10**). Entlang dieses Septums wird die Muskulatur stumpf spreizend separiert. Mithilfe des Wundspreizers wird das nun freigelegte Femur dargestellt.
- 5) Im distalen Anteil wird vorsichtig bis zum Condylus lateralis femoris präpariert (**Abb. 11**). Die Knorpelfläche wird intakt gelassen, die Patella nicht luxiert und das laterale Seitenband geschont.



*Abb. 9: Hautschnitt am lateralen Femur*



*Abb. 10: Darstellung des Septum intermusculare*



*Abb. 11: Blick auf das freigelegte Femur*

- 6) Am Condylus lateralis femoris wird in der knorpelfreien Zone ein monokortikales Bohrloch von 2,0 mm Durchmesser und 4,0 mm Tiefe gesetzt (**Abb. 12**). Die Bohrung wird händisch durchgeführt, um Verletzungen des Seitenbandes oder des Knorpels zu verhindern (**Abb. 13**). Das Bohrloch sowie die Wunde werden mittels Knopfkanüle mit 2x10 ml steriler Kochsalzlösung gespült.
- 7) Zuwendung zum Unterschenkel. Mit dem rechten Zeigefinger und Daumen wird die Haut an der ventralen Tibia vorgespannt.
- 8) Im proximalen Drittel der Tibiadiaphyse distal der Tuberositas tibiae wird ein 1,5 cm langer Hautschnitt gesetzt.
- 9) Mit dem Skalpell wird scharf bis auf die Tibiavorderkante vorpräpariert (**Abb. 14**). Die Muskulatur wird stumpf nach medial abgeschoben.
- 10) Bei flektiertem Bein wird ein 1 mm durchmessender Kirschner-Draht (K-Draht) auf Tibia und Femur aufgelegt, um die gewünschte Bohrrichtung anzuvisieren.

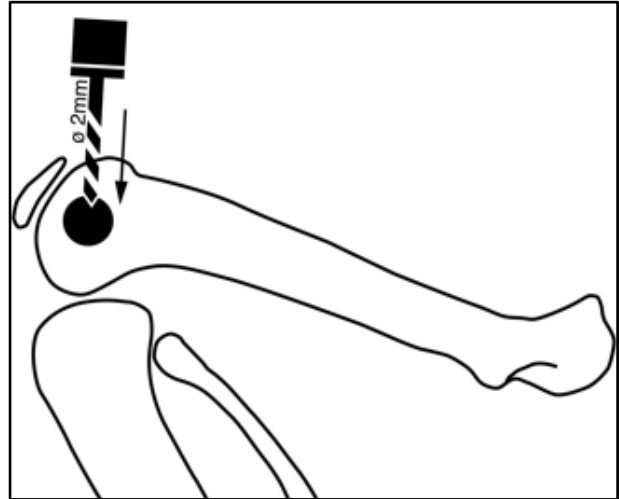


Abb. 12: Schematische Darstellung der Handbohrung [1]



Abb. 13: Blick auf das Bohrloch am Condylus lateralis femoris



Abb. 14: Hautschnitt an der ventralen Tibia



11) Unter sorgfältiger Schonung des Gewebes mittels Elevatorium wird mit dem Bohrer ( $\varnothing$  1,2 mm) die Tibia in nach proximal und lateral zielender a.p.-Richtung bikortikal durchbohrt (**Abb. 15**).



Abb. 15: Positionierung des Bohrers an der Tibia

12) Das entstandene Bohrloch sowie die Wunde werden mit 10 ml steriler Kochsalzlösung gespült.

13) Der 1 mm durchmessende K-Draht wird retrograd transossär über das Tibiabohrloch eingeführt und bei flektiertem Bein in Richtung des Femurs schonend vorgeschoben. Durch das laterale Vorbeischieben des Drahtes am Femur wird die geplante Eintrittsstelle am Femur erkennbar und mit dem OP-Stift markiert.



Abb. 16: Positionierung des Bohrers am Femur

14) Wundspreizer und Elevatorium werden erneut so platziert, dass die Schonung des umliegenden Gewebes gewährleistet ist. Der Bohrer ( $\varnothing$  1,2 mm) wird an der Stiftmarkierung ventral positioniert. In a.p.-Richtung wird nun in diagonal nach distal zielender Weise das Femur bikortikal durchbohrt (**Abb. 16 und Abb. 17**).

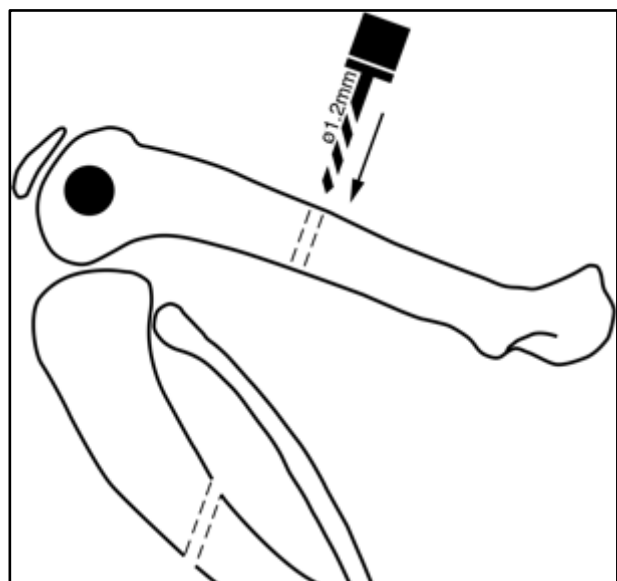
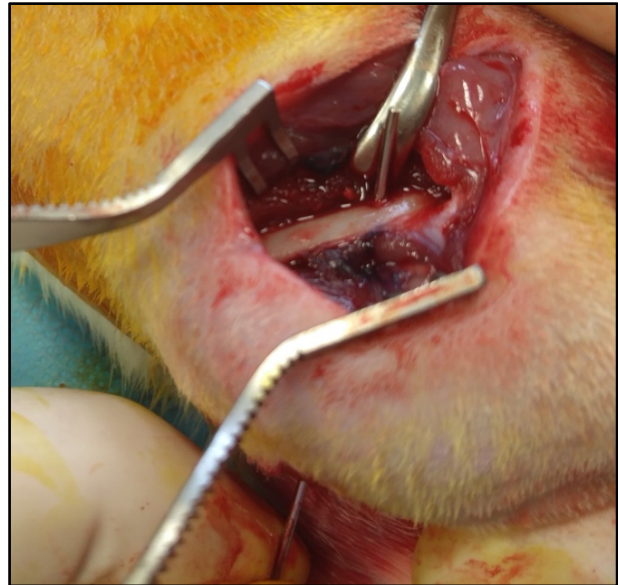


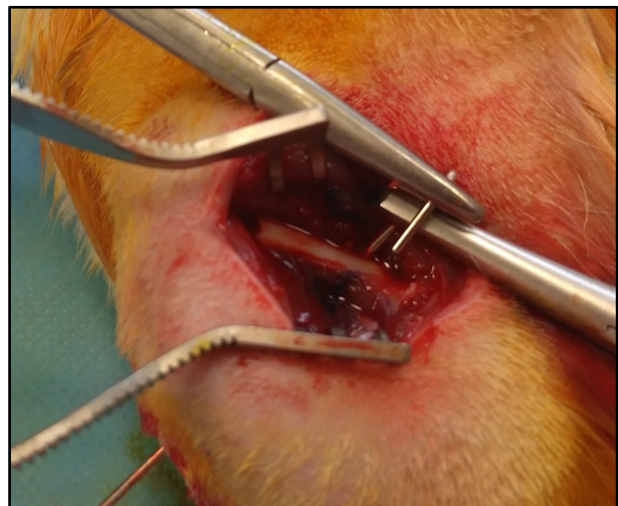
Abb. 17: Schematische Darstellung der Bohrverläufe [1]

15) Nach erneuter Spülung wird der über das Bohrloch in der Tibia eingebrachte Draht transossär durch das femorale Bohrloch in p.a.-Richtung eingefädelt (siehe **Abb. 18**).



*Abb. 18: Einfädeln des Drahtes durch das Femur*

16) Das hinter dem Femur austretende Ende des Drahtes wird hakenförmig umgebogen. Der Haken wird so präpariert, dass er sich schonend um das Femur legen kann. Hierzu eignen sich zwei stabile Nadelhalter (**Abb. 19**).



*Abb. 19: Biegung des Drahtes am mittleren Femurschaft*

17) An dem tibialen Drahtende wird gezogen, sodass sich der femorale Drahthaken um das Femur legt und sich dort verankert. Unter Zug wird die physiologisch maximal mögliche Knieflexion durch moderaten Druck auf Unter- und Oberschenkel eingestellt und durch Festklemmen des Drahtendes mit der Mosquitoklemme fixiert (**Abb. 20**).



*Abb. 20: Biegung des Drahtes an der ventralen Tibiakante*

18) Das aus der Tibia herausragende Drahtende wird über die Klemme mittels Nadelhalter hakenförmig umgebogen (**Abb. 21**). Der Draht wird anschließend gekürzt.

- 19) Der Situs wird gründlich mit steriler Kochsalzlösung gespült und die korrekte patellofemorale Artikulation geprüft.
- 20) Es folgt die Fasziennaht in Einzelknopftechnik mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl® 4-0). Die Muskulatur wird adaptierend genäht (**Abb. 22**).
- 21) Zum Schluss wird die Haut mit einem nicht resorbierbaren Faden (Ethilon® 4-0) verschlossen.
- 22) Um mögliche akzidentelle Frakturen auszuschließen und den Fixationswinkel zu überprüfen, wird postoperativ ein Kontrollröntgen in Seitenaufnahme durchgeführt (Abb. 23).
- 23) Wenn das Röntgenbild zufriedenstellend ist, kann die Antagonisierung der Narkose eingeleitet werden. Die Ratte wird auf Zellstoff gebettet in ihren Käfig gelegt.



Abb. 21: Positionierung des tibialen Drahhakens



Abb. 22: Fasziennaht

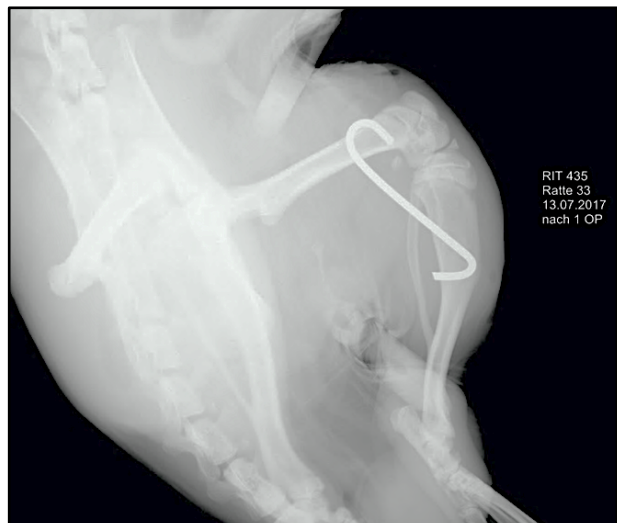


Abb. 23: Postoperatives Kontrollbild der Drahtlage



### 5.3.5 Entfernung des Kirschner-Drahtes

Nach den angesetzten Zeiträumen der Immobilisation von zwei Wochen für die Gruppe Losartan 2I bzw. vier Wochen für die Gruppen Losartan 4I und Losartan 4I+Re galt es, den eingebrachten K-Draht wieder zu entfernen. Der Operationsbereich wurde auf die gleiche Weise wie in Abb. 6 vorbereitet, ohne die Verwendung des elektrischen Bohrers. Ein mit Formaldehydlösung (siehe Kapitel 10.4) gefüllter Probenbecher stand zudem zur Konservierung des Kniegelenks für histologische Untersuchungen bereit. Zunächst wurde die vorgesehene Ratte narkotisiert (siehe Kapitel 5.3.3) und ein präoperatives Kontrollbild im Röntgen erstellt. Dies geschah, um die korrekte Lage des Drahtes über die Zeit zu kontrollieren und knöcherne Veränderungen während der Immobilisationsphase (z.B. Fraktur, osteomyelitische Lysezonen) auszuschließen.

Analog zu der Vorgehensweise in Kapitel 5.3.4 wurde die vorgesehene Ratte nun für die OP vorbereitet. Das zu operierende Bein wurde rasiert und desinfiziert. Zu Beginn der OP wurden die Arbeitsschritte 7) - 9) gemäß Kapitel 5.3.4 ausgeführt, um den tibialen Drahtstaken zu lokalisieren. Dieser wurde dann vom umgebenden Gewebe schonend freipräpariert und gelockert. Durch leichtes Drücken der Tibia in Flexion präsentierte sich der nicht gebogene Anteil des Drahtes. In diesem Bereich wurde mit Hilfe des Seitenschneiders der Drahtstaken komplett abgetrennt. Als Nächstes wurde entsprechend den Arbeitsschritten 1) - 4) in Kapitel 5.3.4 der femorale Drahtstaken gefunden und ebenso frei präpariert. Dieser wurde mit einem Nadelhalter gegriffen, mit drehenden Bewegungen vorsichtig gelockert und mitsamt dem restlichen Draht herausgezogen. Das operierte, linke Bein konnte nun wieder bewegt werden. In diesem Zustand erfolgte für alle drei Untersuchungsgruppen eine Messung der Extension des operierten Beins. Die genauere Vorgehensweise wird im Kapitel 5.4 „Bestimmung der Gelenkbeweglichkeit“ erläutert.

Da die Ratten der Gruppe Losartan 4I+Re noch einen weiteren Beobachtungszeitraum von vier Wochen Remobilisation vor sich hatten, folgte nach einer ausgiebigen Spülung mit 0,9 % NaCl-Lösung der Verschluss des OP-Gebietes mittels Faszien- und Hautnaht gemäß den Arbeitsschritten 20) und 21) in Kapitel 5.3.4. Die Narkose wurde antagonisiert und die Tiere wieder in ihre Käfige überführt. Zum Ende der vierten Woche der Remobilisation mussten die Ratten einer dritten Operation unterzogen werden. Es folgte wieder die gleiche Prozedur: Aufbau des Operationsbereiches (siehe Kapitel 5.3.2), Narkose (siehe Kapitel 5.3.3),

präoperative Messung der Gelenkbeweglichkeit (siehe Kapitel 5.4), OP-Vorbereitung der Ratte (siehe Kapitel 5.3.4).

Die Arbeitsschritte der dritten OP für die Gruppe Losartan 4I+Re entsprachen denen, die am Ende der zweiten OP für die Gruppen Losartan 2I und Losartan 4I durchgeführten wurden und im Folgenden erläutert werden. Zunächst wurde auf der medialen Seite des Oberschenkels die Haut von den unteren Schichten gelöst, so dass die Vasa femoralis leistentnah zum Vorschein kamen. Diese wurden durch eine Ligatur abgeklemmt. Im nächsten Schritt wurde kaudal der Ligatur die Oberschenkelmuskulatur zirkulär 1 cm proximal des Kniegelenkspaltes in toto durchgetrennt. Der knöchernen Femurschaft wurde nun von lateral unterhalb des Trochanter minors freipräpariert. Im proximalen Schaftbereich wurde mithilfe des Seitenschneiders eine transfemorale Amputation vorgenommen. Die restlichen Gewebsverbindungen zwischen dem amputierten Bein und dem Korpus wurden vorsichtig mit dem Skalpell separiert. Die Unterschenkelmuskeln wurden ebenfalls vollständig zirkulär 1 cm distal des Kniegelenks mit einem Skalpell durchtrennt. Für alle Gruppen folgte nun die letzte Messung der Gelenkbeweglichkeit (siehe Kapitel 5.4). Die entnommenen Kniegelenke wurden zum Schluss in die mit Formaldehydlösung gefüllten Probenbecher gelegt.

Die Euthanasie der Ratten erfolgte nach §4 des Tierschutzgesetzes unter Betäubung zur Vermeidung von Schmerzen und Leiden. Entsprechend der nach Anlage 2 der Tierschutz-Versuchstierverordnung erlaubten Tötungsverfahren wurden die narkotisierten Tiere in einen abgeschlossenen Behälter gelegt, welcher dann mit 100 Vol% CO<sub>2</sub> befüllt wurde. Kohlenstoffdioxid führt bei hohen Konzentrationen zur Atemdepression bis zum Atemstillstand, wodurch ein rascher, schmerzloser Tod einsetzt [153]. Nach Herausnehmen des Tieres wurde der Tod durch Überprüfung des Eintritts der Totenstarre, welche als sicheres Todeszeichen gilt, validiert.

## 5.4 Bestimmung der Gelenkbeweglichkeit

### 5.4.1 Messparameter

Zur Evaluation des Einflusses von Losartan auf die PTGK wurde als ein Kriterium die Veränderung der Gelenkbeweglichkeit herangezogen. Anhand des Vergleiches von prä- und posttraumatischen Messungen sowie dem Vergleich mit der Kontrollgruppe sollte dies untersucht werden (siehe Abb. 24). Der Extensionswinkel (joint angle = JA) wurde als Winkel zwischen zwei gedachten Längsachsen durch Femur und Tibia definiert, im Sinne einer Extension im Drehpunkt Kniegelenk. Die Längsachse der Tibia wurde mittig durch das obere Sprunggelenk und Tibiaplateau gezogen. Die Längsachse des Femurs wurde so gewählt, dass sie gleichmäßig durch den Femurschaft verlief. Ein Extensionswinkel von  $180^\circ$  würde einer vollständigen Extension im Kniegelenk entsprechen, welche bei Ratten aber nicht physiologisch ist. Alle Messungen wurden, wie im Kapitel 5.4.2 „Ausführung“ beschrieben, durchgeführt. Die erste Messung erfolgte vor der ersten Operation. Der gemessene Wert wurde für jede Ratte als ihr physiologischer Extensionswinkel (baseline angle = BA) definiert.

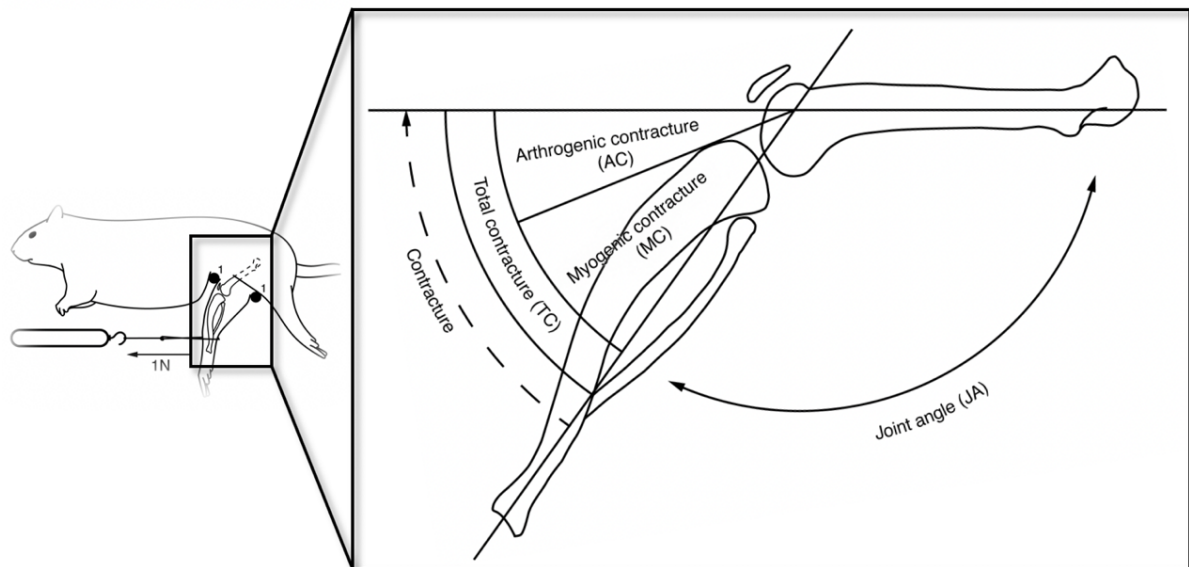


Abb. 24: Schema mit den zu messenden Parametern am Kniegelenk [1]

Mit der nächsten Messung nach K-Draht-Extraktion bei erhaltenen Weichteilen wurde entsprechend der Gruppen entweder nach zwei (Losartan 2I), vier (Losartan 4I) oder vier und acht Wochen (Losartan 4I+Re) das nun mögliche Extensionsvermögen (JA) ermittelt. Anschließend wurde die Haut entfernt und das gesamte Weichgewebe zirkulär 1 cm proximal und distal des Kniegelenks durchtrennt. Auf diese Weise konnte sich die das Kniegelenk überbrückende Muskulatur nicht kontrakturverstärkend auf die Messung auswirken.

Die myogene Kontraktur (MC) ergab sich aus der Differenz zwischen dem Gelenkwinkel vor (JA) und nach (JAX) periartikulärer Myotomie. Der Mittelwert der myogenen Extensionshemmung, welcher bereits spezifisch für 10 Wochen alte Sprague Dawley Ratten ermittelt wurde, beträgt  $21,7^\circ$  und entspricht der physiologischen Muskelspannung [27]. Diesen addierten wir zum BA, um das physiologische Bewegungsausmaß unter Herausrechnung der muskulären Komponente zu erhalten. Schließlich konnte aus der Differenz zwischen dem physiologischen Bewegungsausmaß ohne Muskulatur und dem Gelenkwinkel nach periartikulärer Myotomie (JAX) die arthrogene Kontraktur (AC) berechnet werden. Abschließend ergab die Summe aus MC und AC die Gesamtkontraktur (TC).

### 5.4.2 Ausführung

Die Bestimmung des Bewegungsausmaßes wurde stets unter Injektionsnarkose durchgeführt. Die Tiere wurden auf einer speziell für den Versuch angefertigten Messvorrichtung so platziert, dass das zu untersuchende linke Bein unten lag (Abb. 25).

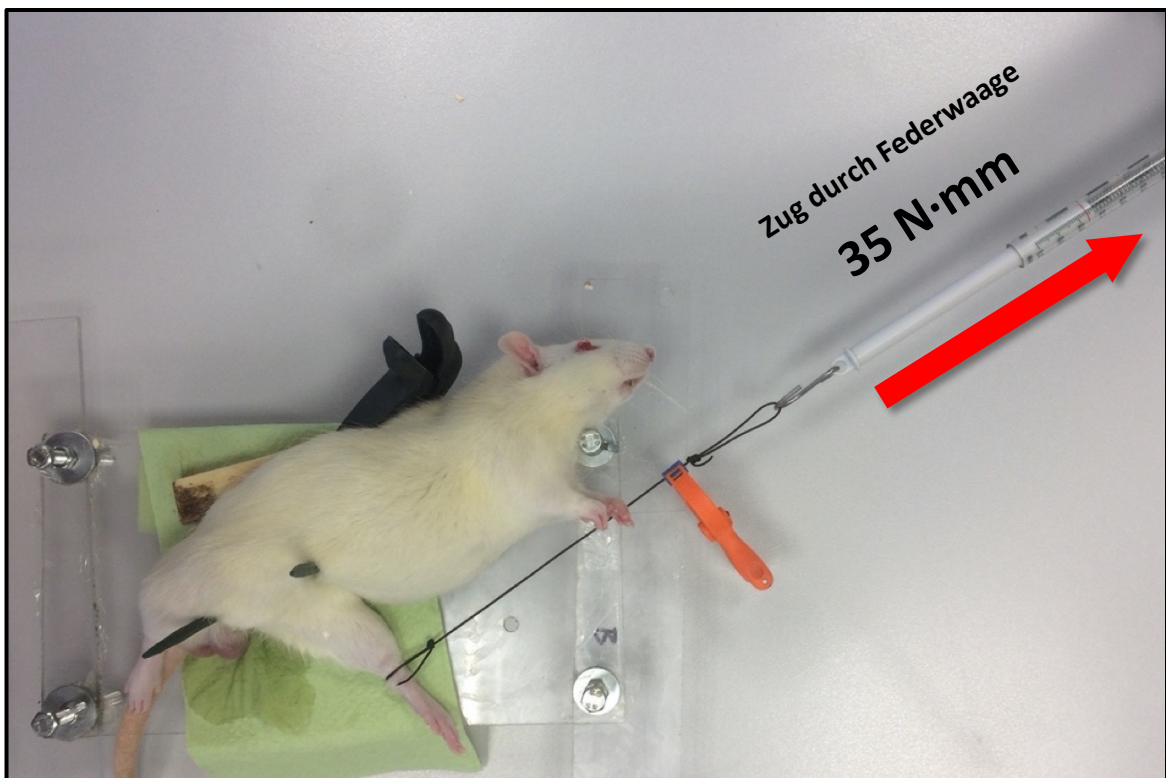
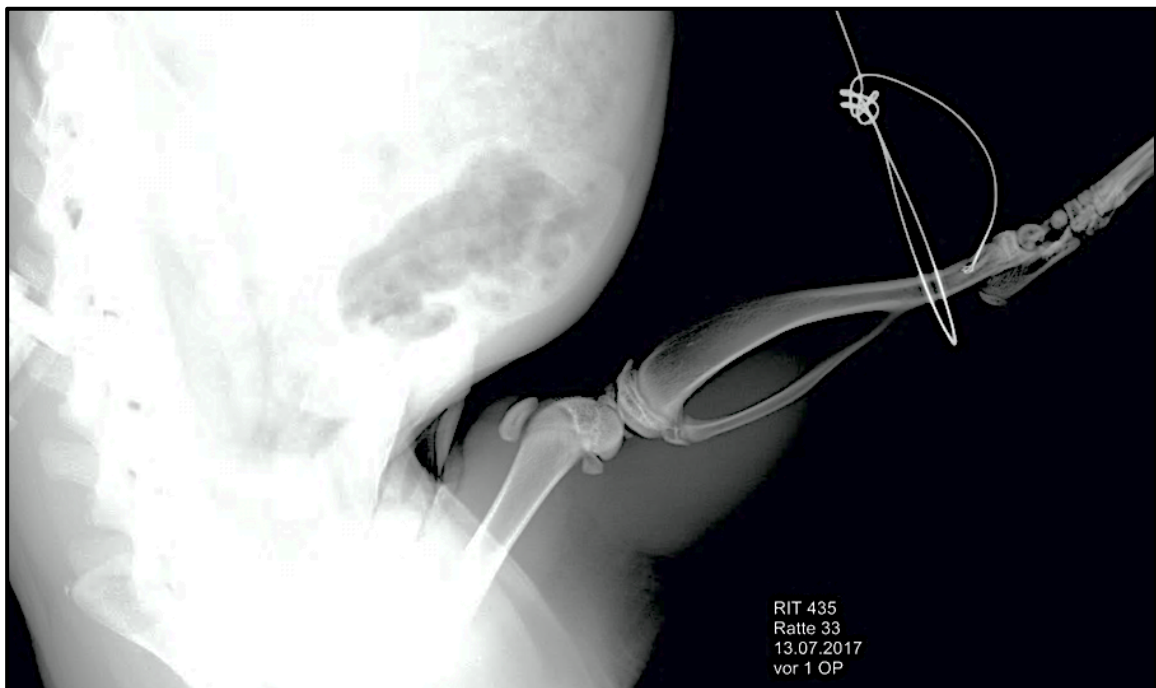


Abb. 25: Der Versuchsaufbau zur Messung der Extension im linken Kniegelenk

Das Gestell wurde aus Acrylglasplatten zusammengebaut, da diese durchlässig sind für Röntgenstrahlen. Zwei grüne Plastikstifte wurden benutzt, um die Hüfte der Ratte und damit auch die Position des Femurs zu stabilisieren. Die Schlaufe einer stabilen geflochtenen Schnur

wurde proximal der Malleolengabel um den Unterschenkel gelegt. Am anderen Ende wurde eine Federwaage in eine weitere Schlaufe gehakt. Durch einen Zug mit einem Drehmoment von 35 N·mm wurde nun die maximal mögliche Extension, ohne ein Einreißen der Gelenkkapsel zu provozieren, eingestellt [154, 155]. Der Zug wurde dabei 90° senkrecht zur Längsachse der Tibia ausgeübt. Es galt darauf zu achten, dass das Bein sich währenddessen nicht in eine Außenrotation bewegt. In dieser Einstellung wurde der Draht an der Messvorrichtung durch eine Klemme fixiert.

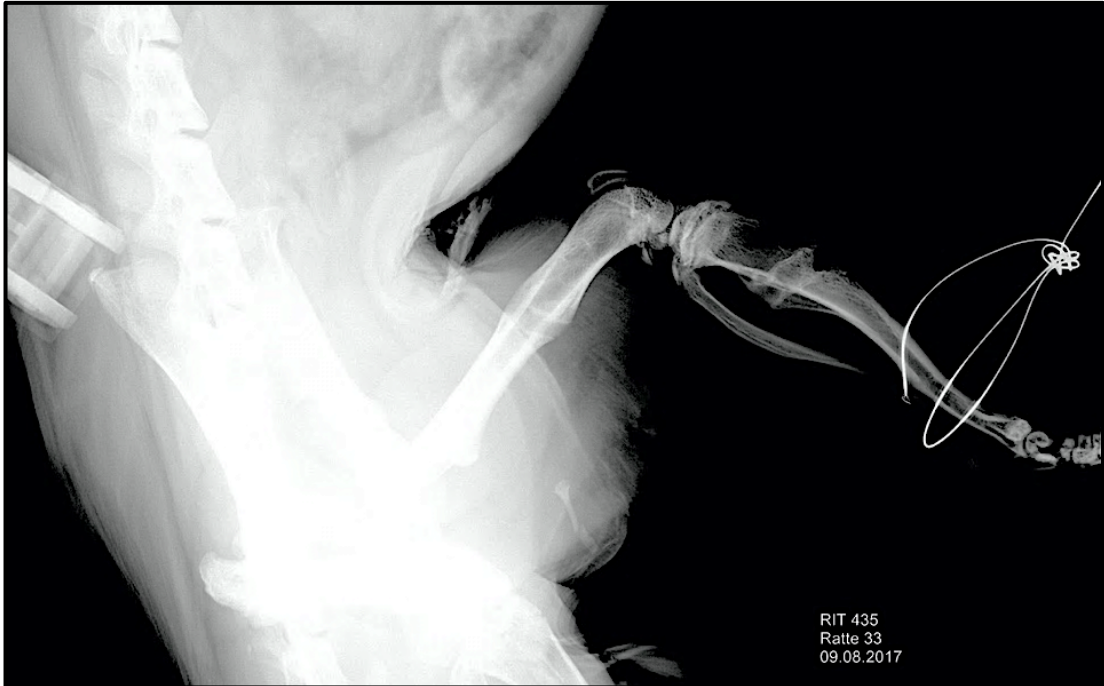
Zur Auswertung des Bewegungsausmaßes wurden radiologische Aufnahmen (Faxitron® MX-20, siehe Kapitel 10.2) des Kniegelenks in der Sagittalebene erstellt. Um eine Gleichheit der Aufnahmen zu garantieren, wurden diese stets am Bildschirm kontrolliert. Wichtig waren der senkrechte Zug am Bein sowie die korrekte Einstellung des Knies und des Unterschenkels. Die Patella sollte sichtbar sein und das obere Sprunggelenk streng seitlich aufgenommen werden. Dadurch konnte eine Verdrehung des Beins während des Zuges ausgeschlossen werden (Abb. 26). Die im Folgenden exemplarisch dargestellten Röntgenbilder (Abb. 26 - Abb. 29) stammen von einer Ratte, die der Gruppe Kontrolle 4I+4Re zugeordnet wurde. Hieran soll der Verlauf der Messungen dargestellt werden.



*Abb. 26: Röntgenbild der präoperativen Messung der Extension*

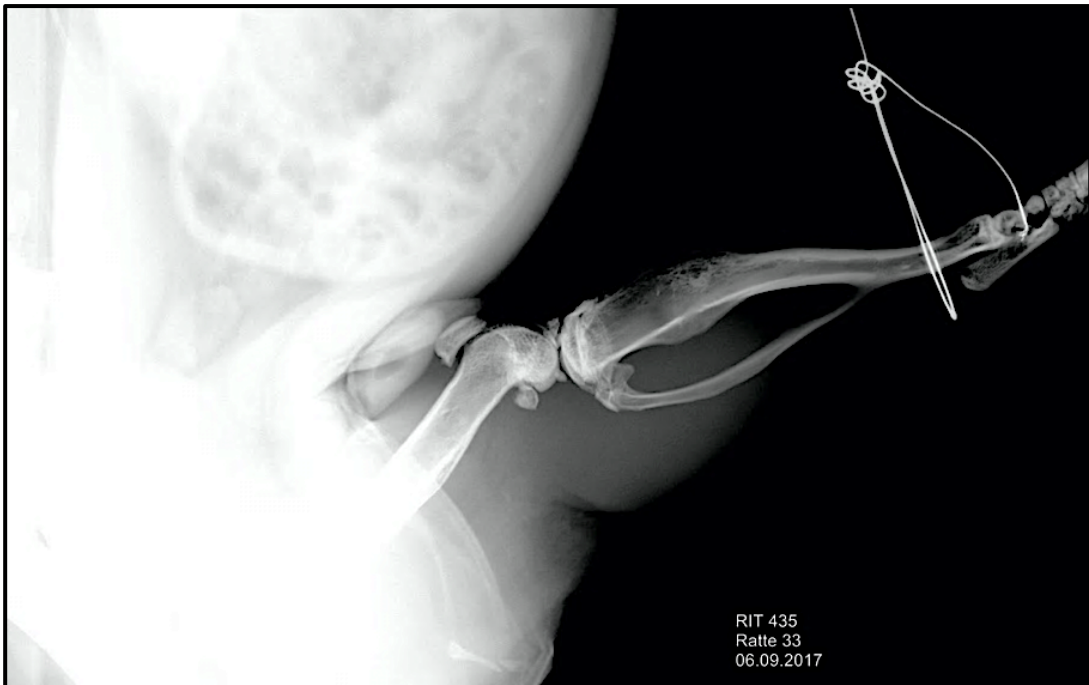
Nachdem die Möglichkeit der Extension durch Extraktion des K-Drahtes nach zwei oder vier Wochen wiederhergestellt wurde, wurde die Kniegelenksexension erneut durch einen Zug von 35 N·mm gemessen (Abb. 27).





*Abb. 27: Röntgenbild der Messung nach Drahtentfernung (in diesem Beispiel nach vier Wochen Immobilisation)*

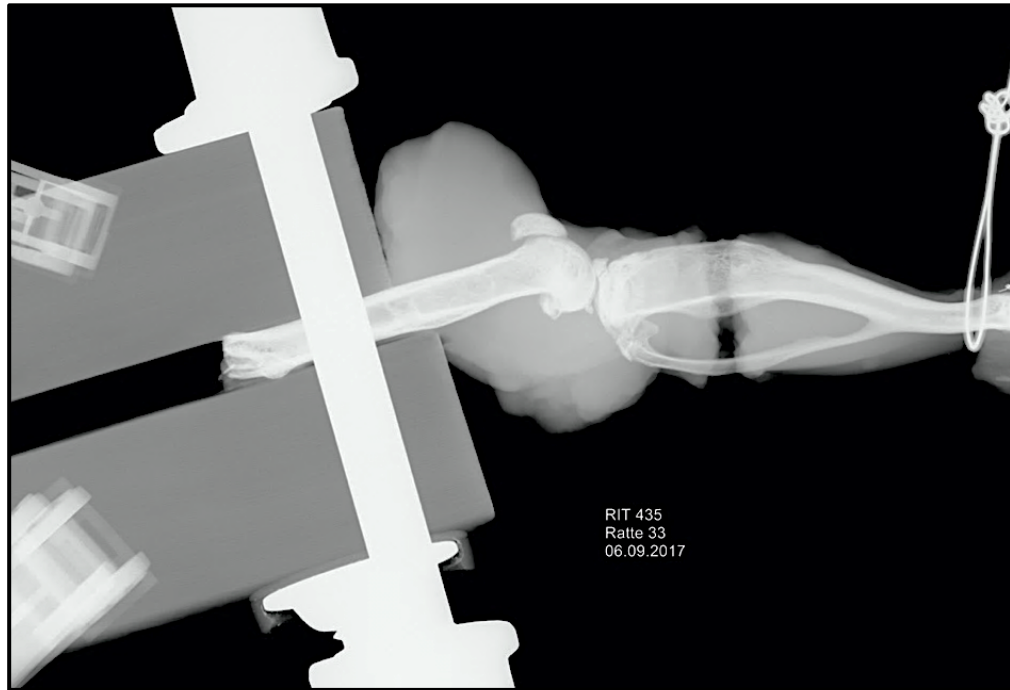
Nach Entfernung des K-Drahtes wurde nach weiteren vier Wochen der Remobilisation in der Gruppe 4I+Re eine dritte Messung, zunächst mit intaktem Haut- und Weichteilgewebe, durchgeführt (Abb. 28).



*Abb. 28: Röntgenbild der Messung vier Wochen nach Drahtentfernung*

Als Nächstes folgte die proximale transfemorale Amputation und die zirkuläre Durchtrennung der Muskulatur ober- und unterhalb des Kniegelenks, welche auch deutlich im Röntgenbild zu

erkennen ist (Abb. 29). Mithilfe einer Schraubzwinde wurden Kanthölzer vorsichtig an das Femur angepresst, um zu verhindern, dass es beim Zug durch die Federwaage zu einer Gleitbewegung des Femurs kam. Die Kanthölzer wurden darüber hinaus jeweils durch eine Klemmzwinde an der Messvorrichtung fixiert (Abb. 29).



*Abb. 29: Röntgenbild der Messung nach Oberschenkelamputation und zirkulärer Durchtrennung der Muskulatur*

### 5.4.3 Auswertung

Von jedem zu untersuchendem Kniegelenk entstanden schließlich drei bzw. vier seitliche Röntgenbilder (Röntgengerät Faxitron® MX-20, siehe Kapitel 10.2). Die Auswertung dieser Aufnahmen wurde mithilfe der frei zugänglichen Analysesoftware ImageJ [156] durchgeführt. Wie in dem Beispiel in Abb. 30 zu sehen, wurde das Werkzeug zur Winkelberechnung, welches durch einen roten Kreis markiert ist, verwendet. Hierbei wurde die tibiale Achse so gelegt, dass sie mittig durch das obere Sprunggelenk und das Tibiaplateau verlief. Die femorale Achse wurde entsprechend des Längsverlaufs der Femurdiaphyse gezogen. Der Winkel im Schnittpunkt der beiden Geraden entspricht dem Gelenkwinkel (JA, siehe Abb. 24).

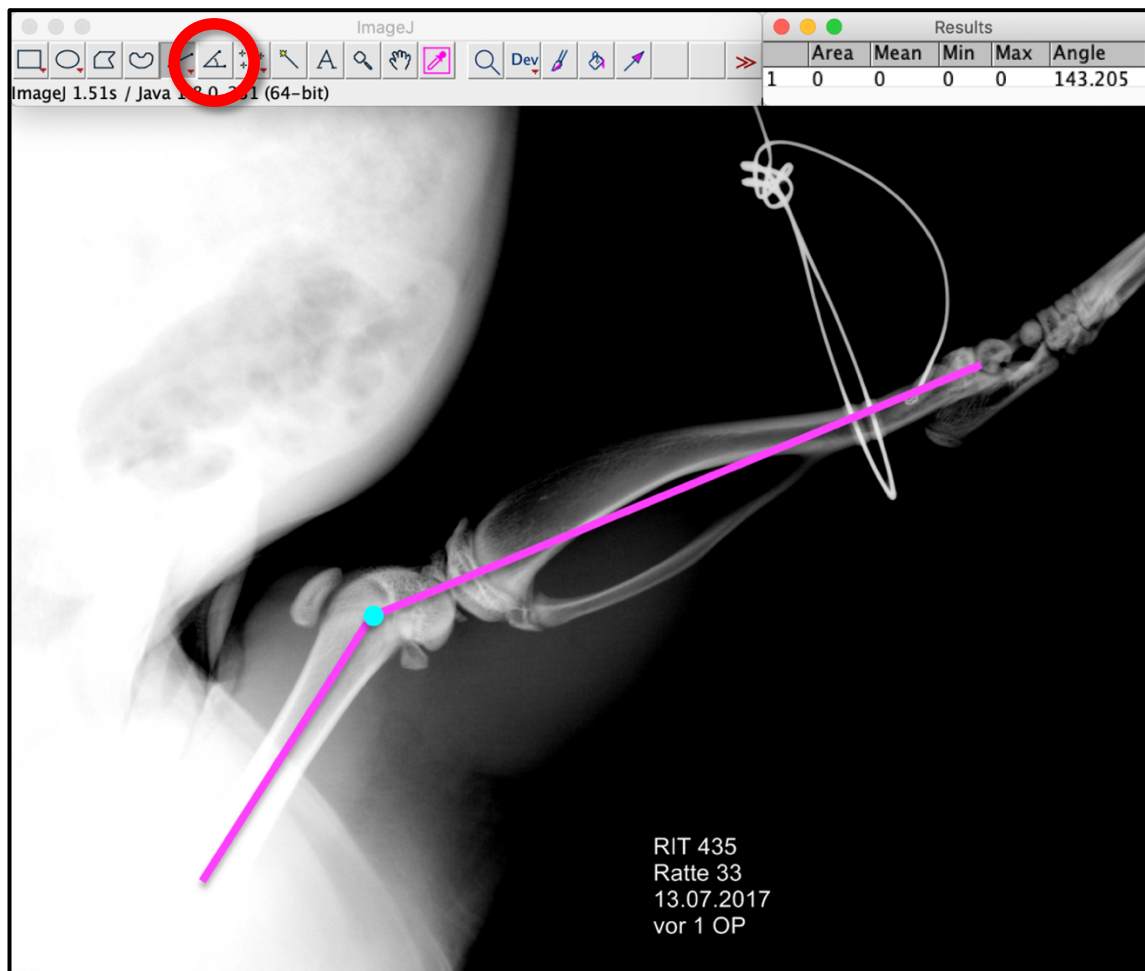


Abb. 30: Ausmessung des Bewegungsausmaßes mittels ImageJ

## 5.5 Histologie

### 5.5.1 Dekalzifikation & Einbettung

Für die histologische Aufarbeitung wurden der Tibia- und der Femurknochen um die Hälfte gekürzt und die das Kniegelenk umgebende Muskulatur vorsichtig so weit entfernt, dass die Gelenkkapsel intakt blieb. Zur Konservierung wurden sie mit 4,5 % Histofix®-Formaldehydlösung (siehe Kapitel 10.4) fixiert und bei Raumtemperatur konserviert, bis die in-vivo-Versuchsreihe abgeschlossen war.

Zur Anfertigung von histologischen Schnitten mussten die knöchernen Anteile der Kniegelenke entkalkt werden. Hierfür wurden sie in Kunststoffkassetten platziert. Für die Dekalzifikation wurde eine Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)-gepufferte 17,7 % Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung (siehe Tabelle 4) hergestellt, die auf 2000 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt wurde. Um eine ausreichende Entkalkung zu erreichen, wurde ein Zeitraum von insgesamt sechs Wochen gewählt. Der Prozess erfolgte bei Raumtemperatur.

EDTA-Lösung	Aqua dest.	EDTA	Tris	pH-Meter
17,70%	~ 1900 ml	354 g	116,8 g	pH 7,1 - 7,2

Tabelle 4: Mengenangaben zur Herstellung der Entkalkungslösung

Die Kassetten wurden in einem Mengenverhältnis von 1:20 (Gewebe zu Dekalzifizierlösung) in große Glasgefäße verteilt. Ein dauerhaft rotierender Magnetrührer im Glas sorgte für eine gleichmäßige Durchmischung. In der ersten Woche wurde die Lösung täglich gewechselt, in der zweiten Woche alle zwei Tage, in der dritte Woche alle drei Tage usw. Das Auswechseln der Flüssigkeit war wichtig, denn EDTA ist ein Chelatbildner, der mit freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen stabile, lösliche Chelatverbindungen eingeht und zu Beginn des Entkalkungsprozesses schnell verbraucht ist [157]. Nach und nach konnte somit das Hydroxyapatit, welches den Hauptanteil an anorganischer Substanz im Knochengewebe ausmacht, durch das Freigeben von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Knochen aufgelöst werden. Diese Methode stellt eine schonendere Entkalkung dar als beispielsweise die Entkalkung durch Säuren [157]. Nach Abschluss der Dekalzifikation wurden die Präparate mit Wasser gespült. Als Nächstes wurden sie für die Dehydratisierung und Paraffineinbettung in den Einbettautomaten gestellt. Die Entwässerung mit Alkohol in

aufsteigender Reihe (50 → 100 %) ist notwendig, damit das hydrophobe Paraffin das Gewebe komplett infiltrieren kann. Als Intermedium wird Xylol eingesetzt, welches die Löslichkeit zwischen Alkohol, Wasser und Paraffin vermittelt [59].

### 5.5.2 Mikrotomie & Färbung

Durch die Einbettung in Paraffin wird das fixierte Gewebe stabilisiert. Erst dies ermöglicht die Herstellung präziser histologischer Schnittpräparate. Die Paraffinblöcke wurden zunächst ausreichend durchgekühlt, um anschließend mithilfe eines Schlittenmikrotoms 5 µm dicke Sagittalschnitte des Kniegelenks anzufertigen. Jeder elfte Schnitt wurde aufbewahrt, auf einem ca. 45°C warmen Wasserbad entfaltet und schließlich glatt auf einen Objektträger übertragen. Der jeweils fünfte dieser überführten Schnitte erhielt eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Standardprotokoll [157]. Hierfür wurden die Schnitte zunächst zur groben Reinigung auf einer 60°C warmen Wärmeplatte gelagert, wodurch sich das Paraffin verflüssigte und abtropfte. Schließlich folgte die eigentliche Entparaffinierung mithilfe von Xylol und Alkohol in absteigender Reihenfolge (100 → 50 %). Die HE-Färbung hat sich als Routinefärbung durchgesetzt, da es möglich ist, durch sie gut reproduzierbare äquivalente Bilder von Gewebe herzustellen [158]. Der basische Farbstoff Hämatoxylin färbt die Zellkerne blau-violett und das saure Eosin lässt das Zytoplasma, Kollagenfasern und Erythrozyten rosa aussehen [159]. Durch diese Übersichtsfärbung war es möglich, morphologische Veränderungen zu beurteilen. Für die Auswertung waren vor allem die Median- und Paramediansagittalschnitte durch das Kniegelenk relevant. Ein Schnitt wurde als geeignet für die weitere Diagnostik eingestuft, wenn er die folgenden, in Abb. 31 exemplarisch gekennzeichneten Strukturen beinhaltet und keine Artefakte durch die Gewebspräparation entstanden waren:

- (1) Condylus femoris
- (2) Tibiakopf
- (3) Patella
- (4) Meniskus
- (5) Dorsale Gelenkkapsel mit intakter Verbindung zum Meniskus
- (6) Unversehrte Falte der Membrana synovialis



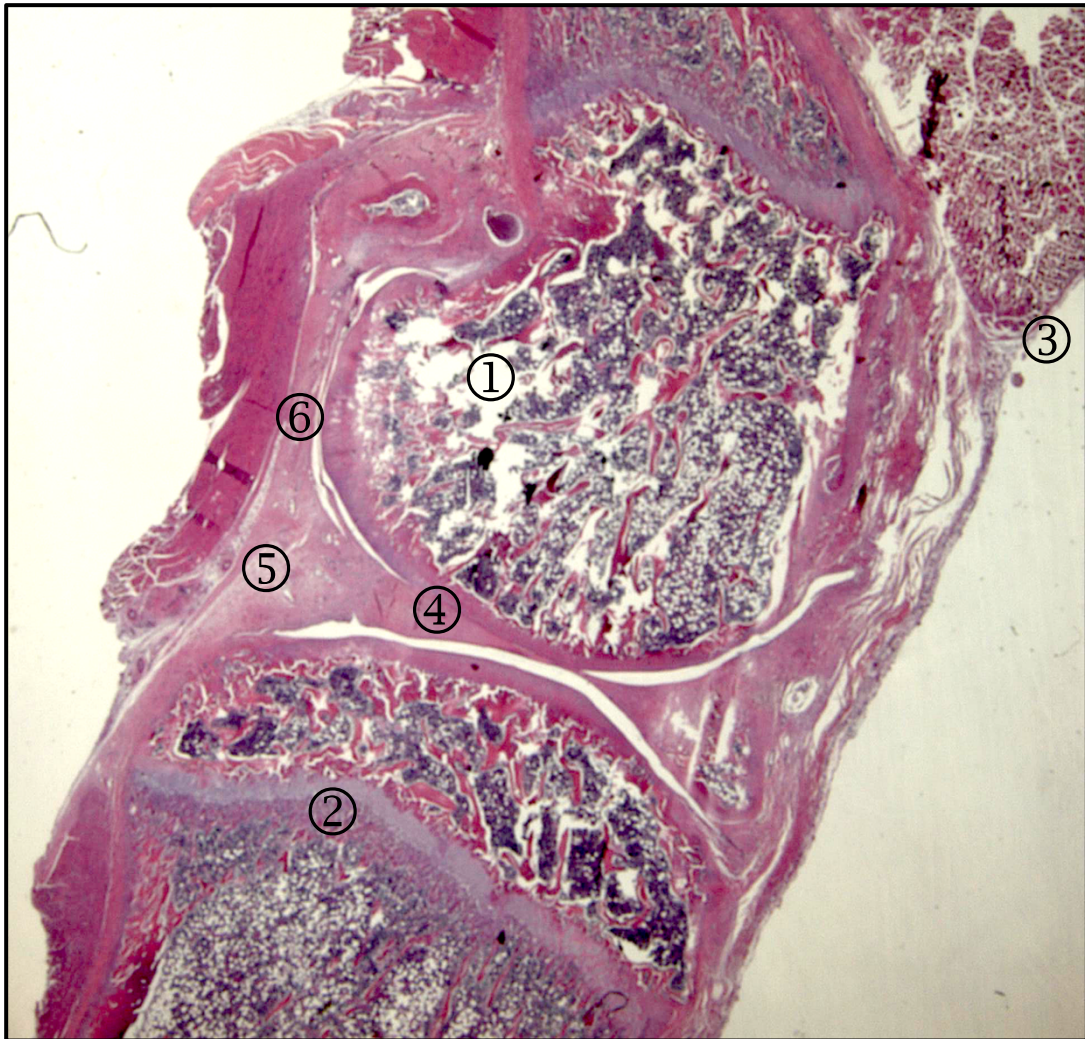


Abb. 31: Übersicht eines Sagittalschnittes durch das Kniegelenk

(1) *Condylus femoris* (2) *Tibiakopf* (3) *Patella* (4) *Meniskus* (5) *dorsale Gelenkkapsel mit intakter Verbindung zum Meniskus* (6) *unversehrte Falte der Membrana synovialis*

### 5.5.3 Morphometrische Bestimmung

Aus den Untersuchungsgruppen wurden jeweils vier geeignete histologische Schnitte von vier verschiedenen Ratten ausgewählt (also 16 Schnitte pro Gruppe) und anhand dieser die morphometrische Bestimmung der Messparameter durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Auswertung war der Untersucher weiterhin verblindet. Die ausgewählten Schnitte wurden mithilfe eines Lichtmikroskops und einer daran angeschlossener Kamera (siehe Kapitel 10.2) unter entsprechender Vergrößerung fotografiert und anschließend ebenfalls mit der frei zugänglichen Software ImageJ [156] analysiert.

Pro histologischen Schnitt wurden drei Messparameter bestimmt (Abb. 32) [160, 161]:

1. Länge der pars superior der dorsalen Kniegelenkscapsel
2. Länge der pars inferior der dorsalen Kniegelenkscapsel
3. Kapseldicke dorsal der meniskalen Aufhängung

Als pars superior wird der Teil der Membrana synovialis bezeichnet, der am Rande der knorpeligen Femurkondyle beginnt und sich bis zum Übergang auf den Meniskus aufspannt. Die pars inferior, ein weiterer Teil der Membrana synovialis, zieht vom Ende des knorpeligen Tibiakopfes bis zum Übergang auf den Meniskus. Die Kapseldicke wurde zwischen dem Dorsalrand des Meniskus und der angrenzenden Muskelschicht gemessen. Es wurde darauf geachtet, dass die hierfür gezogene Strecke mittig und senkrecht zum Dorsalrand des Meniskus steht, um eine Vergleichbarkeit zu schaffen.

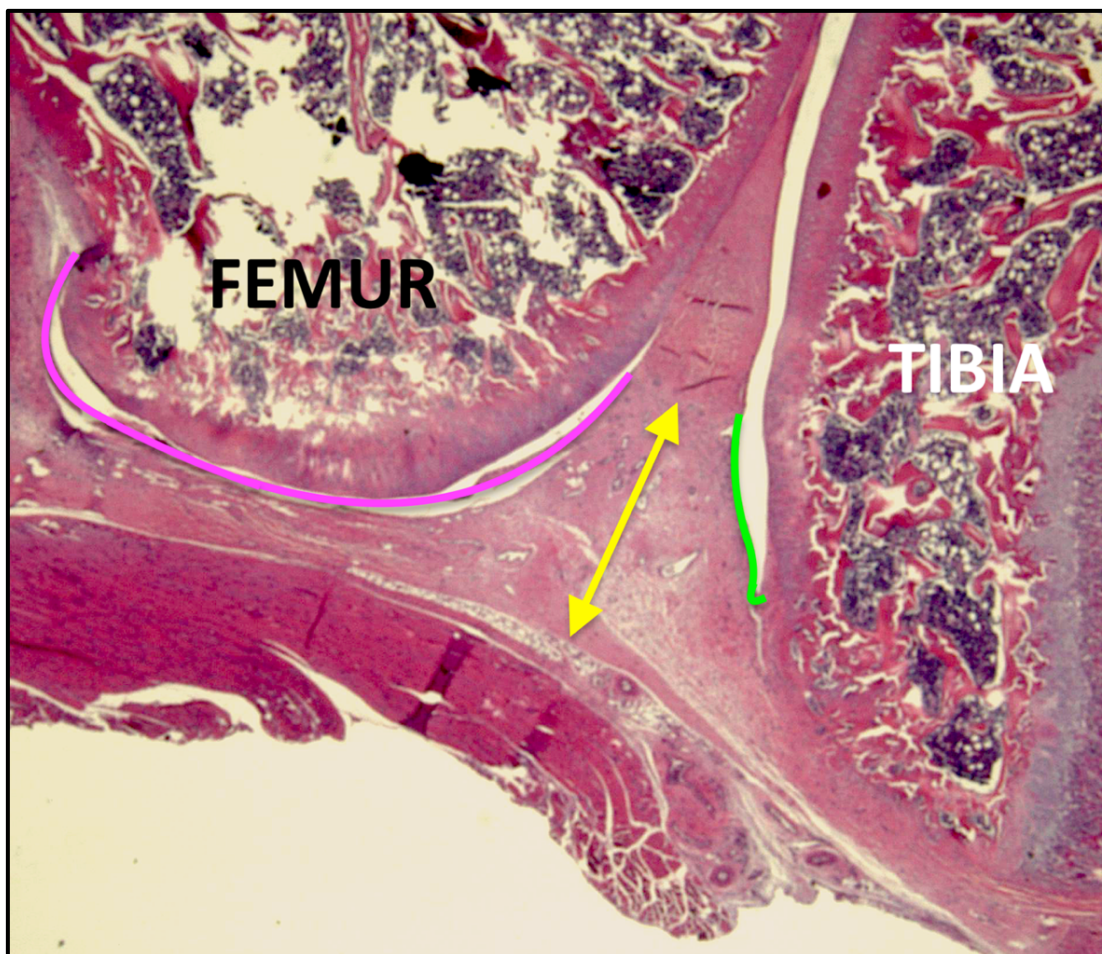


Abb. 32: Messparameter der dorsalen Gelenkkapsel am histologischen Präparat

Kapsellänge: pars superior (rosa), pars inferior (grün) der dorsalen Kniegelenkscapsel; Kapseldicke (gelb)

## 5.6 Statistische Methoden

Die statistische Analyse wurde mit der Software SPSS 23.0<sup>I</sup> und Microsoft® Excel<sup>II</sup> durchgeführt. Die Messergebnisse für die Extension und die Kontraktur (AC, MC und TC) im Kniegelenk wurden mit dem Welchs t-Test untersucht. Die Untersuchung der Länge und Dicke der dorsalen Kniegelenkskapsel erfolgten ebenfalls mittels Welchs t-Test. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angesehen. Zusätzlich wurde festgelegt, dass bei einem p-Wert ≤ 0,2 von einer „Tendenz“ gesprochen wurde.

Quantitative Ergebnisse im Text werden als Mittelwert ± Standardabweichung (MW ± SD) und in den Abbildungen als Boxplot-Diagramme dargestellt. Ein Boxplot besteht aus einem Rechteck, genannt Box, und zwei Linien, genannt Whiskers. Die Box entspricht dem Interquartilsabstand (IQR). Die Enden der Whiskers repräsentieren den jeweiligen Minimal- oder Maximalwert bzw. im Falle von Ausreißern das Eineinhalbfache des IQR [162]. In der Box wird der Median durch eine durchgezogene horizontale Linie und der Mittelwert durch ein Kreuz illustriert. Ausreißer, die größer sind als das Eineinhalbfache der SD vom MW, werden durch Kreise markiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit \* ( $p \leq 0,05$ ) und \*\* ( $p \leq 0,001$ ) markiert. Die rote, gepunktete Linie stellt die für Sprague Dawley Ratten altersspezifische, physiologische, myogene Extensionshemmung (21,7°) dar.

---

<sup>I</sup> SPSS Version 23.0, IBM Deutschland GmbH, Ehningen, <https://www.ibm.com/de-de/products/spss-statistics>

<sup>II</sup> Microsoft® Excel for Mac Version 16.36, Microsoft Corporation, Redmond/WA, USA, <https://products.office.com/de-de/excel>



## 6. ERGEBNISSE

### 6.1 Perioperative Gewichtsentwicklung

Jede der 48 Ratten wurde initial präoperativ gewogen; das durchschnittliche Startgewicht betrug  $397 \pm 7$  g. Im Verlauf erfolgte in wöchentlichen Abständen eine Bestimmung des Körpergewichts. Durch die stete Gewichtskontrolle konnten zugleich das Wohlbefinden sowie der Gesundheitszustand der Ratte kontrolliert werden. Außerdem diente die Bestimmung des Körpergewichts zur genauen Ermittlung der jeweils zu applizierenden Menge des Medikaments oder Placebos.

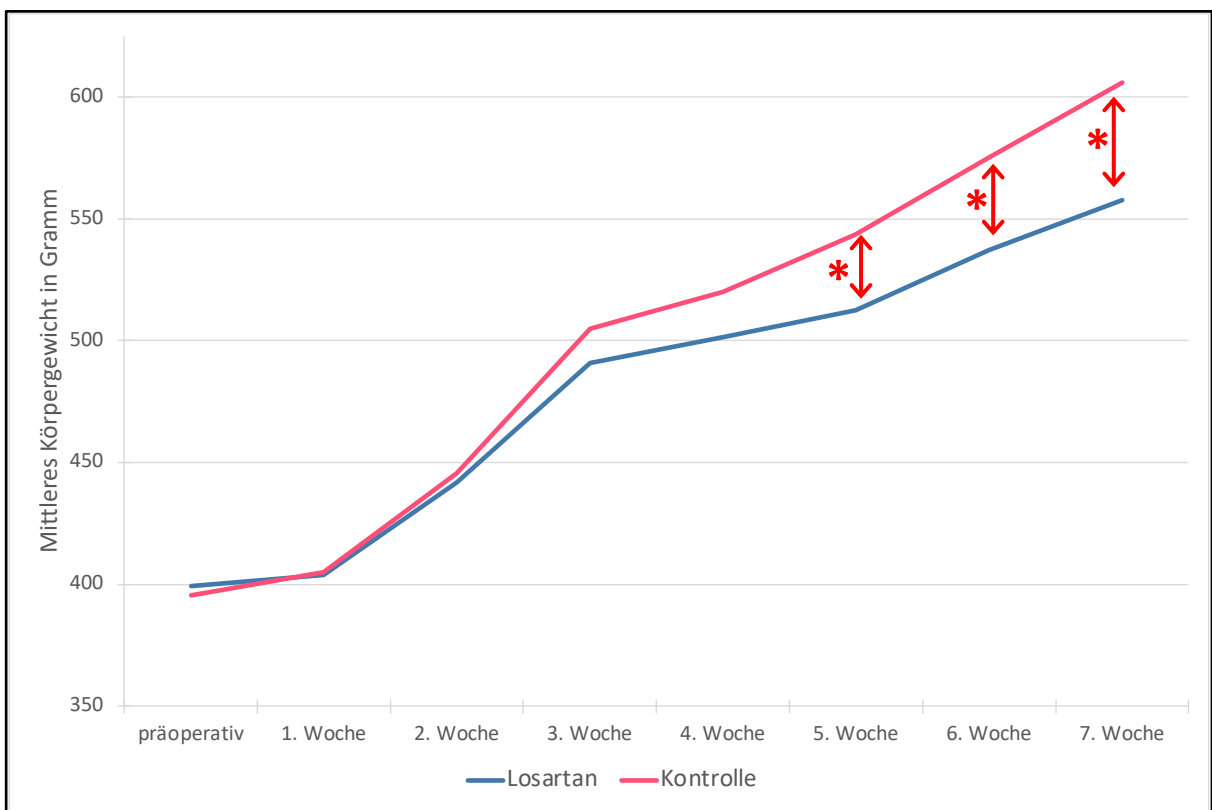


Abb. 33: Darstellung der perioperativen Gewichtsentwicklung über den gesamten Beobachtungszeitraum von acht Wochen im Vergleich zwischen der Losartan- und der Kontrollgruppe

Die Graphen ergeben sich aus den Mittelwerten des jeweiligen Körpergewichts pro Woche; \* ( $p \leq 0,05$ ).

Die ersten Messungen des Körpergewichts erfolgten vor dem initialen Trauma und ergaben einen mittleren Ausgangswert von  $399 \pm 12$  g für die Losartan- und von  $396 \pm 17$  g für die Kontrollgruppe ( $p = 0,41$ ) (Abb. 33). Nach zwei Wochen Immobilisation hatten die Tiere ein Durchschnittsgewicht von  $442 \pm 22$  g unter Losartan und  $446 \pm 20$  g in der Kontrolle ( $p = 0,52$ ). Am Ende der vierwöchigen Immobilisation wogen die Losartan-Ratten  $501 \pm 30$  g und die Kontroll-Ratten  $520 \pm 32$  g ( $p = 0,1$ ). Es zeigte sich, dass die Tiere beider Gruppen innerhalb

der jeweils ersten postoperativen Woche nach initialer Immobilisation sowie nach K-Draht-Extraktion im Schnitt nur 5-15 g/Woche zunahmen. In den anderen Wochen legten die Ratten im Schnitt 21-59 g/Woche an Gewicht zu.

In der 5. Woche war das durchschnittliche Gewicht unter Losartan bei  $512 \pm 22$  g. Im Vergleich zeigte sich in der Kontrolle ein signifikant schwereres Körpergewicht von  $544 \pm 35$  g ( $p = 0,03$ ). Dieser Trend setzte sich in den folgenden Wochen fort. In der Losartangruppe nahmen die Ratten im Mittel in der 6. Woche um 25 g ( $537 + 30$  g) und in der 7. Woche um 21 g ( $558 + 28$  g) zu. Die Tiere der Kontrollgruppe steigerten ihr Gewicht jeweils im Durchschnitt um 31 g in der 6. Woche ( $575 + 29$  g) und 7. Woche ( $606 + 28$  g). Die Ratten der Kontrollgruppe waren somit auch in der 6. Woche ( $p = 0,03$ ) als auch in der 7. Woche ( $p = 0,01$ ) signifikant schwerer als die Ratten der Losartangruppe.

In der Kontrolle 4I+Re-Gruppe präsentierte eine Ratte einen deutlichen Gewichtsverlust von - 16 % (von 426 g auf 357 g). Da die Grenze des Abbruchkriteriums von -20 % Gewichtsverlust jedoch nicht überschritten wurde, konnte die Ratte weiterhin in der Studie eingeschlossen bleiben. Im Verlauf des Experimentes mussten in der Gruppe „8 Wochen Immobilisation und Re-Mobilisation“ zwei Ratten durch das Erfüllen eines Abbruchkriteriums vorzeitig aus der Studie genommen werden. Eine Ratte der Losartan 4I+Re-Gruppe wurde in der dritten Woche durch den Tierarzt bei akuter Verschlechterung des Allgemeinzustandes eingeschläfert. In der fünften Woche wurde eine Ratte der Kontrolle 4I+Re-Gruppe nach Bestätigung eines Frakturverdachts euthanasiert. Beide Ratten zeigten bis zu den Zwischenfällen keine Auffälligkeiten, so dass ihre Daten in die Analyse des Körpergewichts eingeflossen sind.

---

## 6.2 Veränderungen des Bewegungsausmaßes im Kniegelenk

Der primäre Endpunkt der Studie war die Remission der PTGK. Hierfür wurden die biomechanischen Veränderungen nach einer komplexen Kniegelenksverletzung unter dem Einfluss des Wirkstoffes Losartan untersucht. Um dies zu verdeutlichen wurde das Ausmaß der Extension des Kniegelenks zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und die damit verbundene Entwicklung der Gelenkbeweglichkeit hinsichtlich der Entstehung einer posttraumatischen Gelenkkontraktur beobachtet. Im Kapitel 5.4.2 „Ausführung“ wurde die verwendete Messmethode im Detail beschrieben. Die nachfolgend verwendeten Messergebnisse wurden durch die Auswertung von Röntgenbildern mittels ImageJ (siehe Kapitel 5.4.3) ermittelt. Im Folgenden werden die drei Interventionsgruppen Losartan 2I, Losartan 4I und Losartan 4I+Re im Vergleich mit der jeweiligen Kontrollgruppe auf die folgenden Messparameter (siehe Kapitel 5.4.1) hin untersucht:

- ◆ Extension im Kniegelenk:
  - vor Immobilisation (BA) und nach Immobilisation bzw. Remobilisation (JA)
- ◆ Myogene Gelenkkontraktur (MC)
- ◆ Arthrogene Gelenkkontraktur (AC)
- ◆ Gesamtkontraktur (TC)

6.2.1 Ergebnisse zur maximal möglichen Extension des Kniegelenks

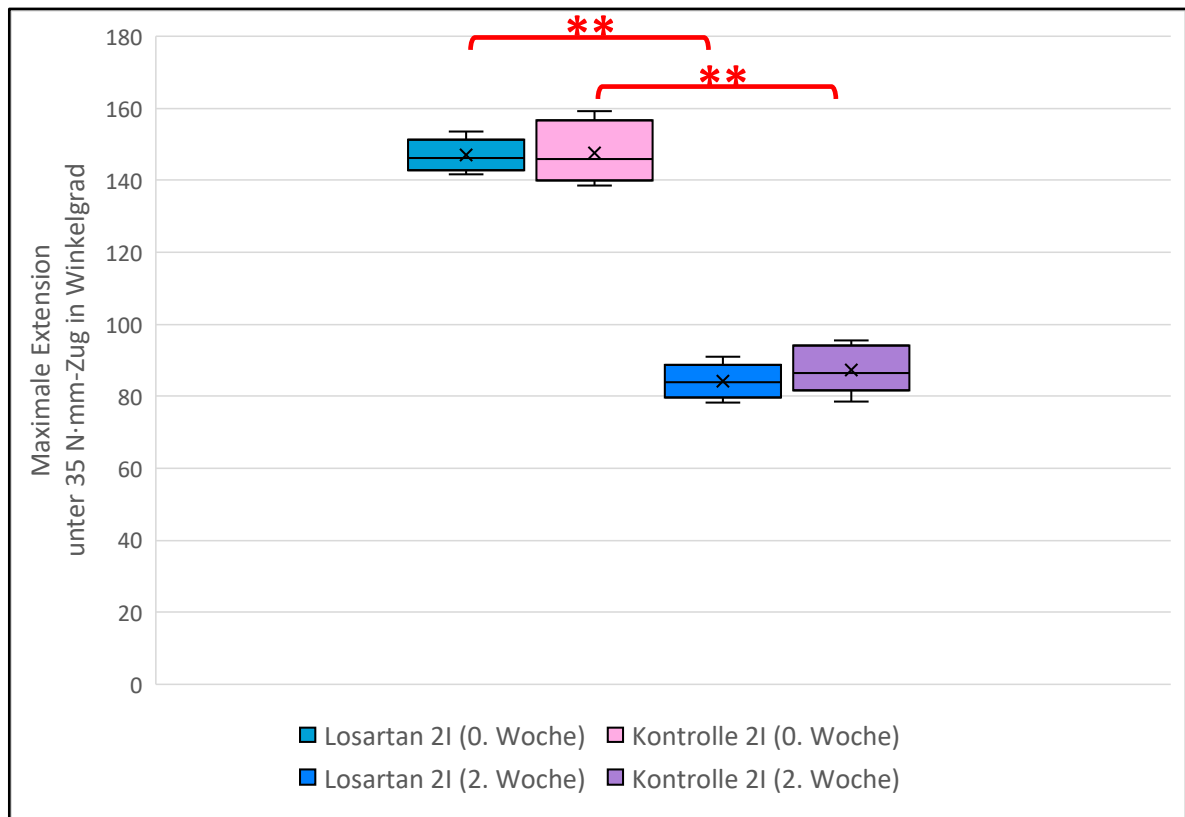


Abb. 34: Vergleich der maximalen Extension des Kniegelenks mit und ohne Gabe von Losartan vor und nach zwei Wochen Immobilisation; \*\* ( $p \leq 0,001$ )

Vor der ersten Operation wurde bei jeder Ratte durch einen Zug von 35 N·mm mittels Federwaage die physiologisch maximal mögliche Extension (BA) im Kniegelenk bestimmt. Für die Losartan 2I-Gruppe ergab sich ein BA von  $147,0^\circ \pm 4,5^\circ$ . Die Kontrolle 2I-Gruppe zeigte einen analogen Ausgangswert von  $147,6^\circ \pm 8,1^\circ$  ( $p = 0,85$ ) (Abb. 34). Die Messungen wurden am Ende des Beobachtungszeitraumes von zwei Wochen nach der Drahtextraktion und erhaltenen Weichteilen wiederholt. Im Vergleich zum BA konnte für Losartan 2I ein um  $63^\circ$  erheblich geringerer Gelenkwinkel (JA) von  $84,1^\circ \pm 5,1^\circ$  ( $p < 0,001$ ) gemessen werden. Für Kontrolle 2I ergab sich im Vergleich mit dem entsprechenden BA ein um  $60^\circ$  deutlich kleinerer JA von  $87,3^\circ \pm 6,4^\circ$  ( $p < 0,001$ ) (Abb. 34). Zwischen der Losartan 2I- und der Kontrolle 2I-Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Extensionsfähigkeit verzeichnet werden ( $p = 0,29$ ).

## ERGEBNISSE

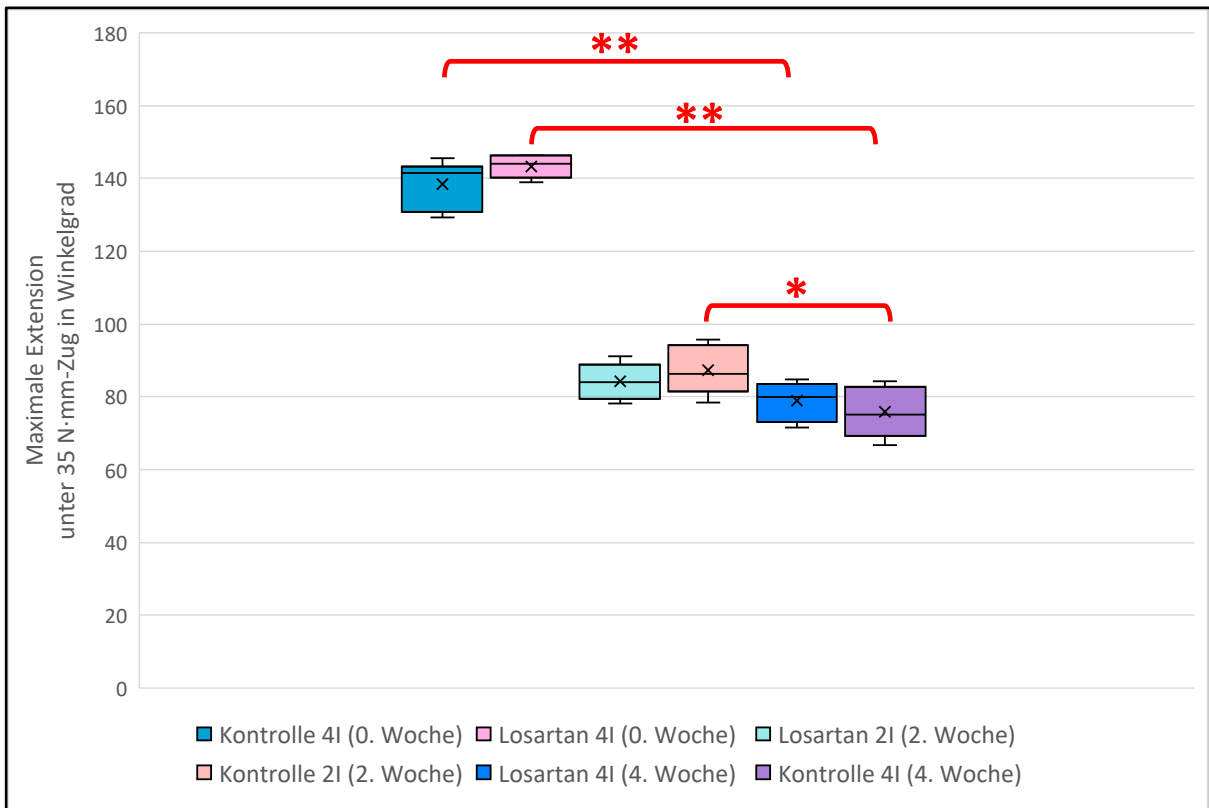


Abb. 35: Vergleich der maximalen Extension des Kniegelenks mit und ohne Gabe von Losartan vor und nach zwei und vier Wochen Immobilisation; \* ( $p \leq 0,05$ ), \*\* ( $p \leq 0,001$ )

Für Losartan 4I wurde initial eine physiologisch maximal mögliche Extension von  $138,2^\circ \pm 6,4^\circ$  gemessen. Der Ausgangswert in der Kontrolle 4I-Gruppe war tendenziell um  $5^\circ$  größer und lag bei  $143,1^\circ \pm 3,2^\circ$  ( $p = 0,08$ ) (Abb. 35). Während der vierwöchigen Immobilisation reduzierte sich der JA in Losartan 4I gegenüber dem BA deutlich um  $59^\circ$  auf  $78,9^\circ \pm 5,2^\circ$  ( $p < 0,001$ ). Im selben Beobachtungszeitraum verringerte sich der JA in der Kontrolle 4I im Vergleich zum BA erheblich um  $67^\circ$  auf  $75,7^\circ \pm 6,7^\circ$  ( $p < 0,001$ ). Jedoch konnte nach vier Wochen Immobilisation zwischen Losartan 4I und Kontrolle 4I kein signifikanter Extensionsunterschied festgestellt werden ( $p = 0,3$ ).

Beim Vergleich der Gruppen Losartan 4I und Losartan 2I fiel auf, dass das Extensionsvermögen durch zwei weitere Wochen der Immobilisation tendenziell um  $5^\circ$  abgenommen hat ( $p = 0,07$ ). In der Kontrollgruppe zeigte sich nach vier Wochen Immobilisation gegenüber Kontrolle 2I eine signifikante Reduktion der Extension um  $12^\circ$  ( $p = 0,003$ ) (Abb. 35).

## ERGEBNISSE

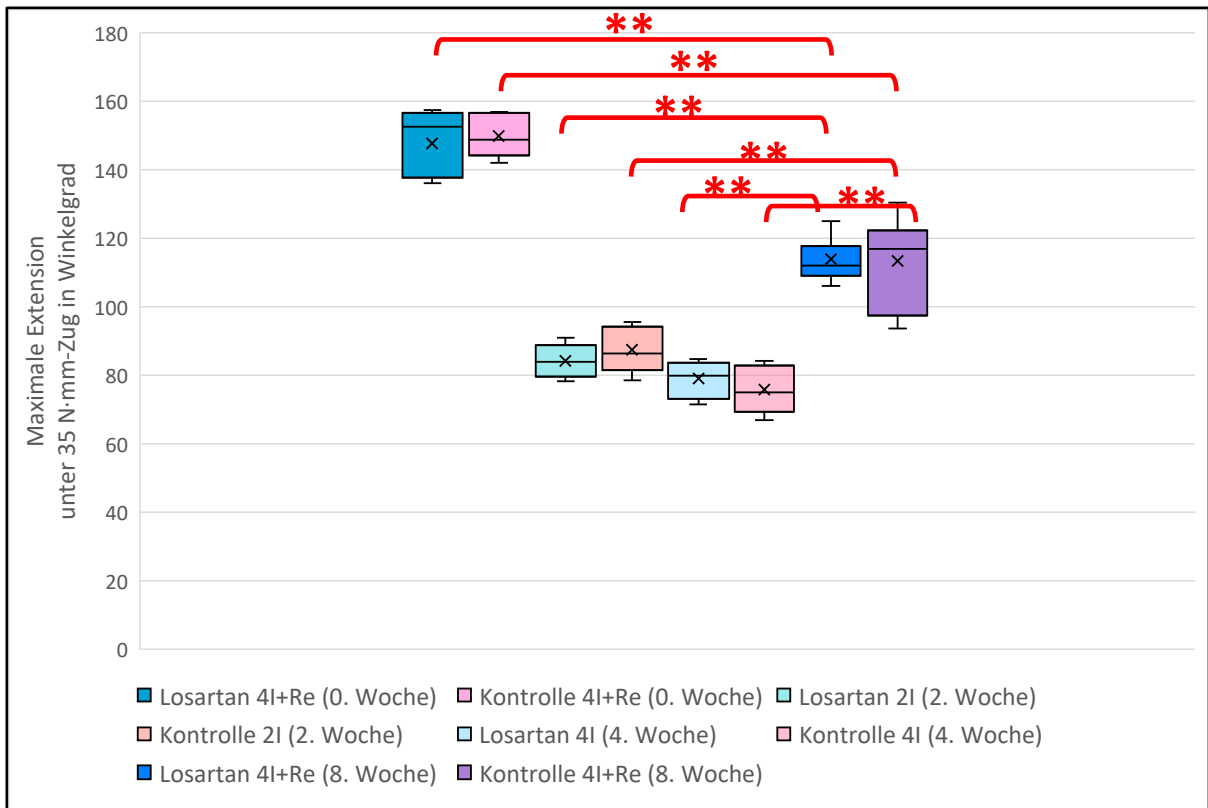


Abb. 36: Darstellung der maximalen Extension des Kniegelenks mit und ohne Gabe von Losartan vor und nach 8 Wochen Immobilisation und Remobilisation sowie im Vergleich zu den Ergebnissen nach 2 bzw. 4 Wochen Immobilisation; \*\* ( $p \leq 0,001$ )

Der Beobachtungszeitraum von Losartan 4I+Re und Kontrolle 4I+Re umfasste vier Wochen Immobilisation mit anschließender vierwöchiger Remobilisation nach K-Draht-Extraktion. In der Interventions- und in der Kontrollgruppe musste, wie bereits im Kapitel 6.1 besprochen, jeweils ein Versuchstier schon vor Ende des Experiments euthanasiert werden. Die entsprechenden Messdaten wurden nicht in die Analyse einbezogen.

Der BA für Losartan 4I+Re betrug  $147,5^\circ \pm 9,3^\circ$  und für Kontrolle 4I+Re  $149,9^\circ \pm 6,2^\circ$  ( $p = 0,59$ ) (**Abb. 36**). Nach acht Wochen erreichte Losartan 4I+Re einen im Vergleich zum BA um  $34^\circ$  niedrigeren JA von  $113,9^\circ \pm 6,4^\circ$  ( $p \leq 0,001$ ). Im Vergleich wurde in der Kontrolle 4I+Re gegenüber dem BA nach acht Wochen ein um  $37^\circ$  kürzerer JA von  $113,2^\circ \pm 13,2^\circ$  gemessen ( $p \leq 0,001$ ). Zwischen Losartan 4I+Re und Kontrolle 4I+Re konnte nach acht Wochen kein wesentlicher Unterschied der Extensionsfähigkeit festgestellt werden ( $p = 0,91$ ).

Im Vergleich zu den vorher betrachteten Gruppen nach zwei und vier Wochen Immobilisation zeigte sich sowohl innerhalb der Losartangruppe als auch innerhalb der Kontrollgruppe eine signifikant verbesserte Extensionsfähigkeit (jeweils  $p \leq 0,001$ ) (**Abb. 36**).

6.2.2 Ergebnisse zur myogenen Komponente der Gelenkkontraktur

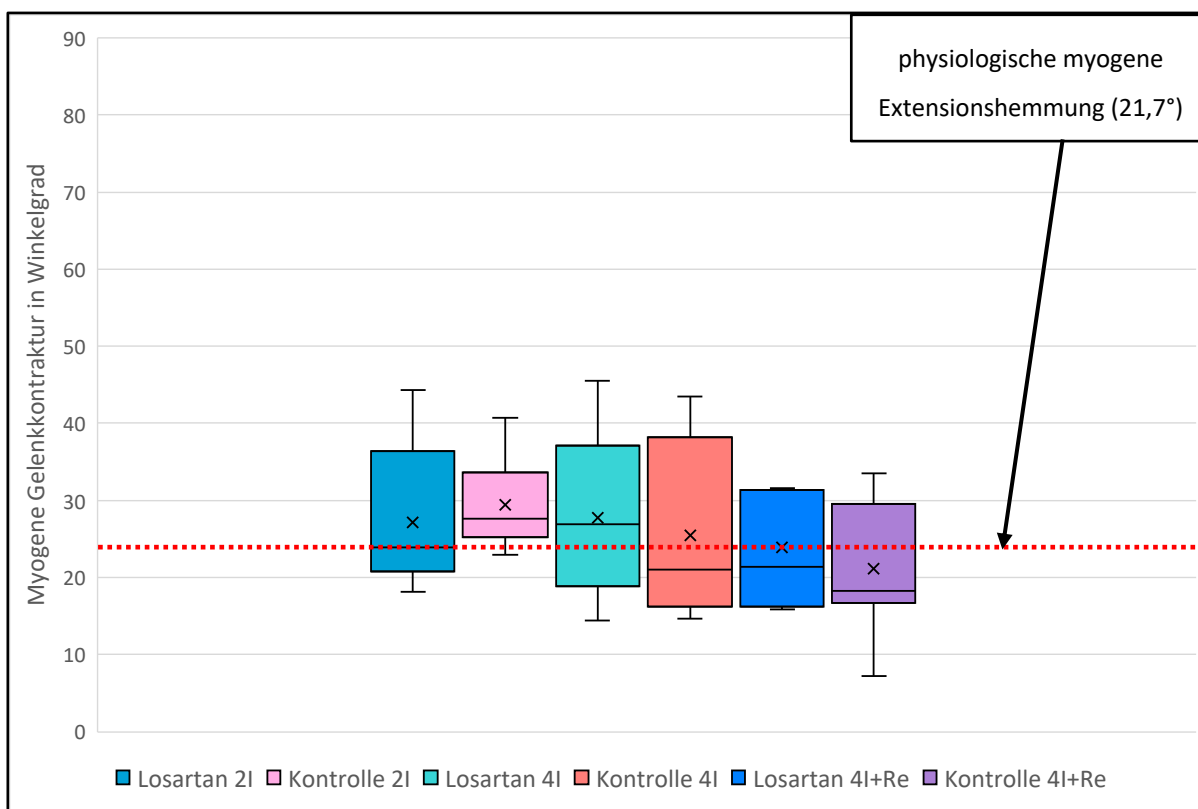


Abb. 37: Vergleichende Darstellung der myogenen Gelenkkontraktur mit und ohne Gabe von Losartan nach 2 bzw. 4 Wochen Immobilisation sowie nach 8 Wochen Immobilisation und Remobilisation

Die Bestimmung der myogenen Komponente der Gelenkkontraktur (MC) wurde bereits ausführlich in Kapitel 5.4.2 erklärt. Die MC wurde als das zusätzlich gewonnene Extensionsvermögen nach der periartikulären Myotomie definiert.

Nach zwei Wochen Immobilisation ergab sich eine MC für Losartan 2I von  $27,1^\circ \pm 9,7^\circ$  und eine MC von  $29,4^\circ \pm 5,9^\circ$  für Kontrolle 2I ( $p = 0,58$ ) (Abb. 37). Nach zwei weiteren Wochen Immobilisation zeigte sich unter Losartan ein analoger Wert von  $27,7^\circ \pm 10,8^\circ$  (Losartan 4I) ( $p = 0,91$ ). Innerhalb der Kontrollgruppe wurde ein Wert von  $25,4^\circ \pm 11,4^\circ$  (Kontrolle 4I) gemessen ( $p = 0,39$ ). Das Ausmaß der myogenen Kontraktur unterschied sich zwischen Losartan 4I und Kontrolle 4I nicht ( $p = 0,68$ ).

Abschließend zeigte sich nach vierwöchiger Remobilisation ein niedrigerer Mittelwert der MC von  $23,9^\circ \pm 7,0^\circ$  in Losartan 4I+Re ( $p = 0,43$ ) und von  $21,1^\circ \pm 9,1^\circ$  in Kontrolle 4I+Re ( $p = 0,44$ ). Zwischen der Losartan- und der Kontrollgruppe ergab sich auch nach acht Wochen kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,53$ ). Lediglich zwischen Kontrolle 2I und Kontrolle 4I+Re zeigte sich eine tendenzielle Verringerung der MC ( $p = 0,07$ ) (Abb. 37).

6.2.3 Ergebnisse zur arthrogenen Komponente der Gelenkkontraktur

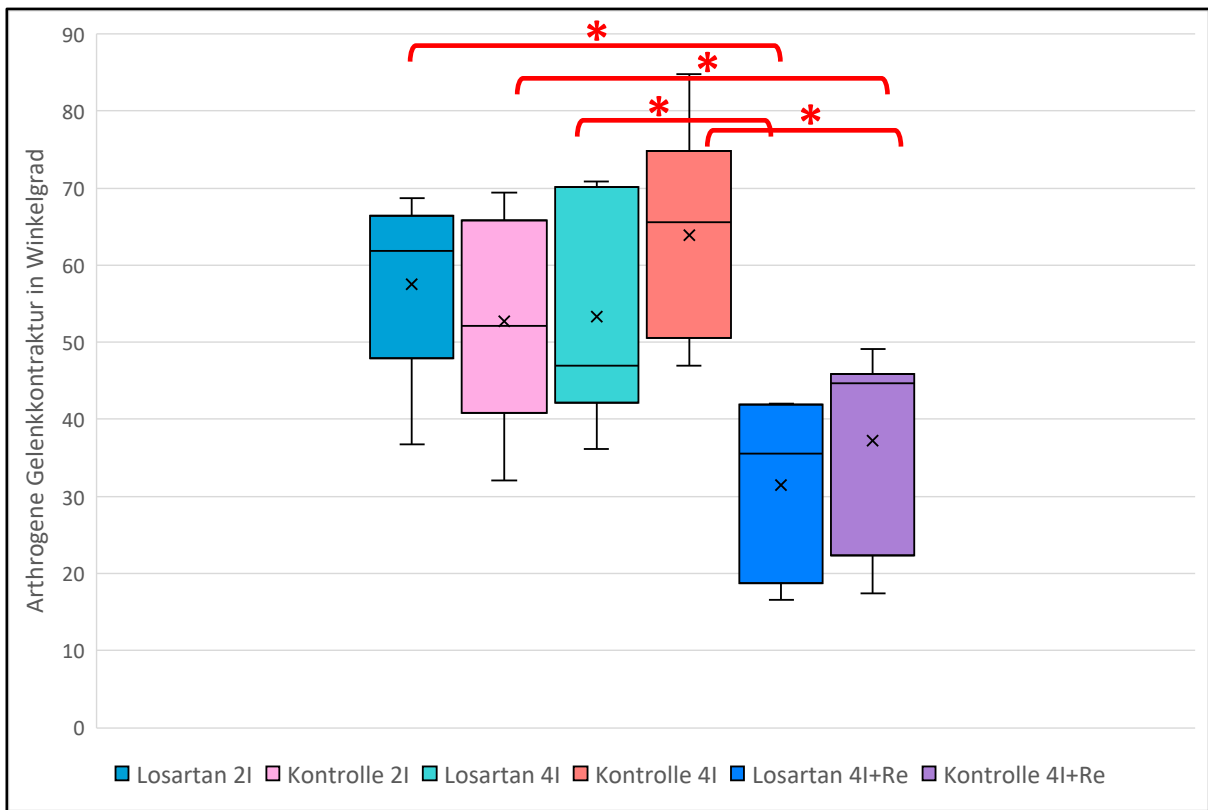


Abb. 38: Vergleichende Darstellung der arthrogenen Gelenkkontraktur mit und ohne Gabe von Losartan nach 2 bzw. 4 Wochen Immobilisation sowie nach 8 Wochen Immobilisation und Remobilisation; \* ( $p \leq 0,05$ )

Die arthrogene Gelenkkontraktur (AC) wurde aus der Differenz zwischen dem Extensionswinkel nach periartikulärer Myotomie und dem physiologischen Extensionswinkel ohne die physiologische myogene Extensionshemmung berechnet (siehe Kapitel 5.4.2).

Die Bestimmung der AC ergab nach 2 Wochen unter Losartan einen Wert von  $57,4^\circ \pm 11,2^\circ$  und unter Placebo einen Wert von  $52,7^\circ \pm 13,2^\circ$  ( $p = 0,45$ ) (Abb. 38). Vier Wochen Immobilisation führten zu einem AC-Mittelwert von  $53,3^\circ \pm 14,2^\circ$  für Losartan 4I ( $p = 0,53$ ) und zu einer tendenziellen Zunahme der AC für Kontrolle 4I um  $11^\circ$  auf  $63,8^\circ \pm 13,4^\circ$  ( $p = 0,12$ ). Hieraus resultierte eine tendenziell um  $10,5^\circ$  kleinere AC für Losartan 4I im Vergleich zur Kontrolle 4I ( $p = 0,15$ ).

Durch weitere vier Wochen Remobilisation verringerte sich die AC deutlich um  $22^\circ$  auf  $31,4^\circ \pm 10,5^\circ$  in Losartan 4I+Re ( $p = 0,005$ ). Ebenso reduzierte sich die AC erheblich um  $27^\circ$  auf  $37,2^\circ \pm 12,6^\circ$  in Kontrolle 4I+Re ( $p = 0,002$ ). Zwischen Losartan 4I+Re und Kontrolle 4I+Re dezimierte sich die tendenzielle Differenz von  $10,5^\circ$  nach acht Wochen auf  $5^\circ$  ( $p = 0,37$ ). Insgesamt bestand zwischen der Losartan- und Kontrollgruppe bezüglich der AC zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied.



Durch die Remobilisation ergab sich innerhalb der Interventions- (Losartan 2I und Losartan 4I vs. Losartan 4I+Re) sowie der Kontrollgruppe (Kontrolle 2I und Kontrolle 4I vs. Kontrolle 4I+Re) eine signifikante Abnahme der AC (jeweils  $p \leq 0,05$ ) (Abb. 38).

#### 6.2.4 Ergebnisse zur Gesamtkontraktur des Kniegelenks

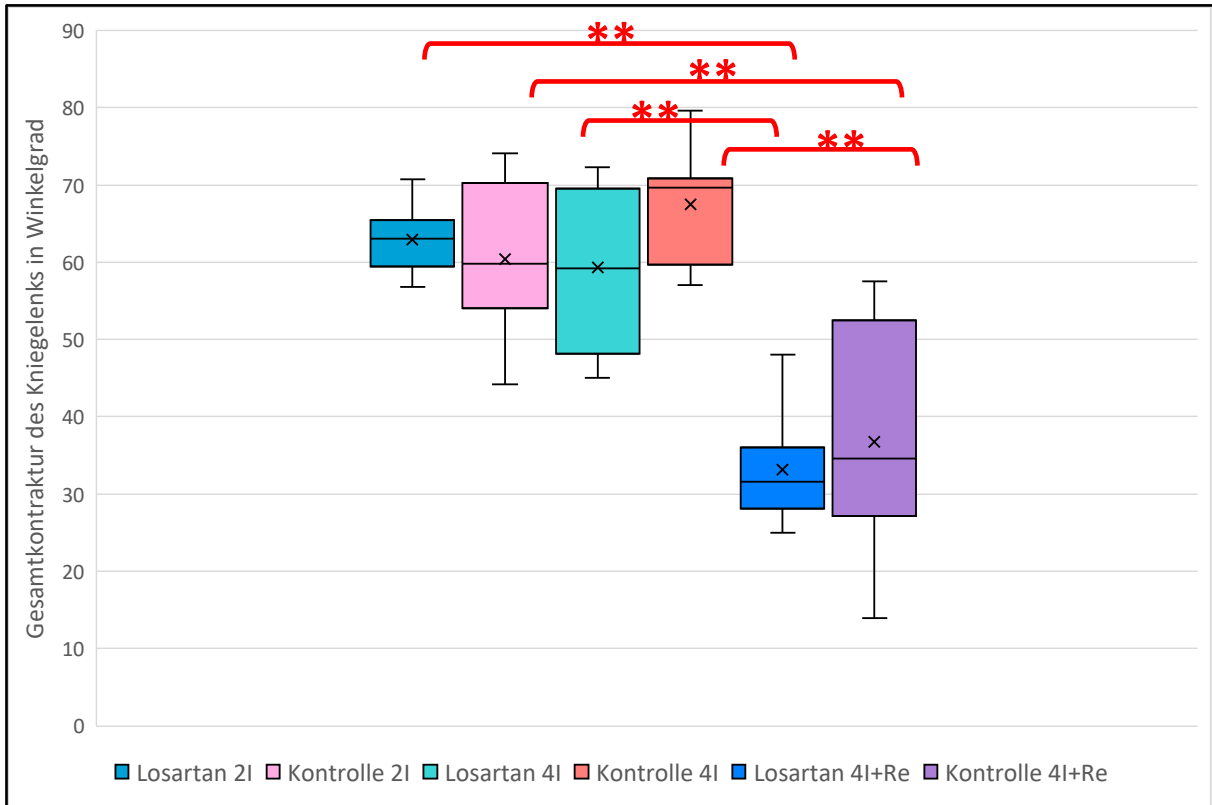


Abb. 39: Vergleichende Darstellung der Gesamtkontraktur des Kniegelenks mit und ohne Gabe von Losartan nach 2 bzw. 4 Wochen Immobilisation sowie nach 8 Wochen Immobilisation und Remobilisation; \*\* ( $p \leq 0,001$ )

Die Gesamtkontraktur (TC), definiert als die Summe aus arthrogener und myogener Gelenkkontraktur (siehe Kapitel 5.4.2), war in der Losartan 2I-Gruppe  $62,9^\circ \pm 4,4^\circ$  und in der Kontrolle 2I-Gruppe  $60,4^\circ \pm 9,9^\circ$  ( $p = 0,52$ ) (Abb. 39). In der Betrachtung der prozentualen Zusammensetzung der TC zeichnete sich für die Interventionsgruppe ein Verhältnis von 91 % AC zu 9 % MC ab. In der Kontrollgruppe ergab sich ein Verhältnis von 87 % AC zu 13 % MC.

Nach vier Wochen Immobilisation zeigte sich ein TC-Mittelwert unter Losartan von  $59,3^\circ \pm 10,5^\circ$  ( $p = 0,39$ ) und eine tendenzielle Steigerung der TC in der Kontrollgruppe um  $7,1^\circ$  auf  $67,5^\circ \pm 7,4^\circ$  ( $p = 0,13$ ). Hierdurch ergab sich eine tendenziell um  $8,2^\circ$  kleinere AC für Losartan 4I im Vergleich mit Kontrolle 4I ( $p = 0,09$ ). Die prozentuale Zusammensetzung der Gesamtkontraktur blieb für Losartan 4I unverändert (90 % AC und 10 % MC). Für Kontrolle 4I veränderte sich das Verhältnis zu 95 % AC zu 5 % MC.

## ERGEBNISSE

---

Nach der vierwöchigen Remobilisationsphase verringerte sich die TC deutlich um  $26^\circ$  auf  $33,6^\circ \pm 8,8^\circ$  in Losartan 4I+Re sowie um  $31^\circ$  auf  $36,6^\circ \pm 14,9^\circ$  in Kontrolle 4I+Re (je  $p \leq 0,001$ ) (Abb. 39). Die tendenzielle Divergenz von  $8,2^\circ$  nach vier Wochen Immobilisation zwischen der Losartan- und der Kontrollgruppe zeigte sich nach der Remobilisation nicht mehr ( $p = 0,37$ ). Letztlich ergab sich innerhalb der Interventions- (Losartan 2I und Losartan 4I vs. Losartan 4I+Re) sowie der Kontrollgruppe (Kontrolle 2I und Kontrolle 4I vs. Kontrolle 4I+Re) eine signifikante Abnahme der TC (jeweils  $p \leq 0,001$ ). Die Zusammensetzung der TC für Losartan 4I+Re zeigte nun ein Verhältnis von 93 % AC zu 7 % MC. Der Anteil der AC an der Gesamtkontraktur für Kontrolle 4I+Re vergrößerte sich in der vierwöchigen Remobilisationsphase erneut und betrug schließlich 100%.

### 6.3 Morphometrie der dorsalen Kniegelenkkapsel

Der sekundäre Endpunkt dieses Experiments war die Untersuchung der histologischen Veränderung der dorsalen Gelenkkapsel nach einer komplexen Kniegelenksverletzung unter dem Einfluss von Losartan. Hierfür wurden aus den Untersuchungsgruppen von vier verschiedenen Ratten jeweils ein geeigneter histologischer Schnitt ausgewählt, der zuvor mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt wurde. Mithilfe eines Mikroskops wurden die Schnitte vergrößert dargestellt, digitalisiert und schließlich mittels ImageJ ausgewertet. Wie bereits im Kapitel 5.5.3 detailliert ausgeführt, wurden pro Schnitt drei Messparameter bestimmt:

- ◆ Länge der pars superior der dorsalen Kniegelenkkapsel
- ◆ Länge der pars inferior der dorsalen Kniegelenkkapsel
- ◆ Kapseldicke dorsal der meniskalen Aufhängung

#### 6.3.1 Untersuchung der Länge der dorsalen Kniegelenkkapsel

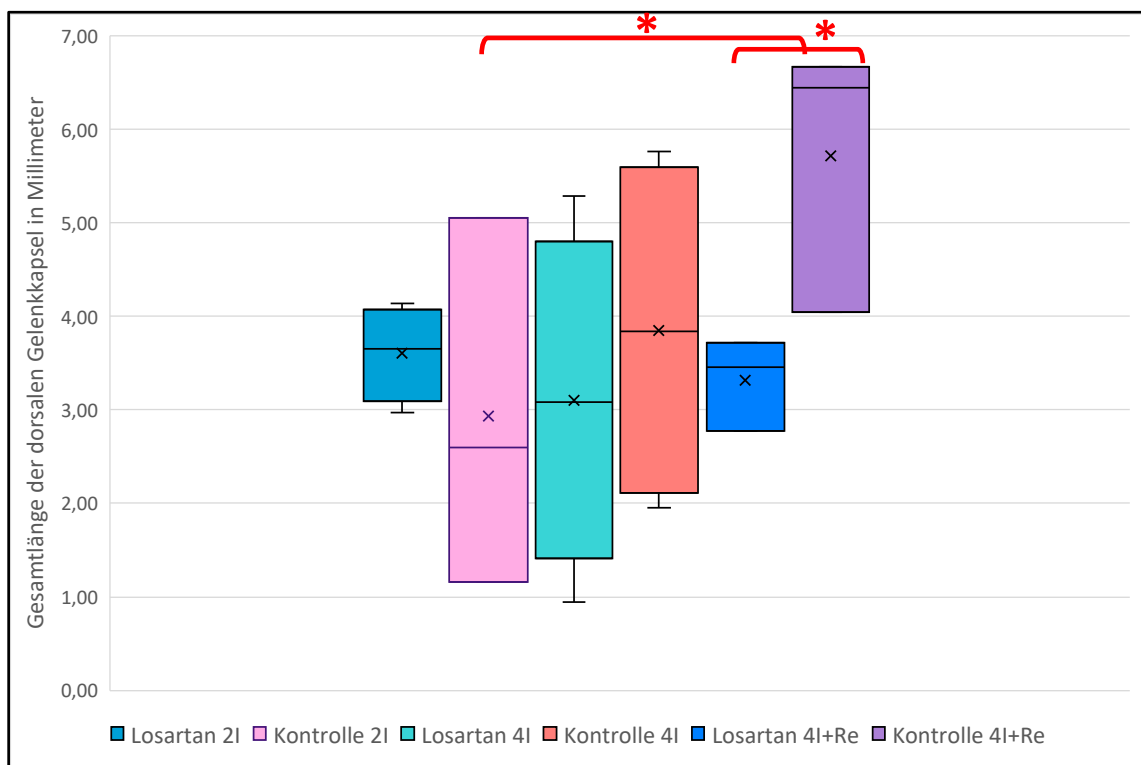


Abb. 40: Darstellung der Gesamtlänge der dorsalen Kniegelenkkapsel mit und ohne Gabe von Losartan nach 2 bzw. 4 Wochen Immobilisation sowie nach 8 Wochen Immobilisation und Remobilisation; \* ( $p \leq 0,05$ )

## ERGEBNISSE

Anatomische Veränderungen der dorsalen Kniegelenkscapsel beeinflussen wesentlich das Extensionsvermögen des Kniegelenks [163]. Daher werden im Folgenden die Veränderungen der Kapsellänge zum Ende der jeweiligen Beobachtungszeiträume beurteilt (Abb. 40).

Nach zwei Wochen Immobilisation ergab sich für Losartan 2I im Mittel eine Gesamtlänge von  $3,6 \pm 0,4$  mm. Für Kontrolle 2I wurde eine mittlere Gesamtlänge von  $2,9 \pm 1,6$  mm gemessen. Der angedeutete Längenunterschied von 0,7 mm war nicht signifikant ( $p = 0,39$ ). Die Gesamtlänge der dorsalen Gelenkkapsel ergab sich aus der Summe der Länge der pars superior und der Länge der pars inferior der dorsalen Kniegelenkscapsel. Wie in Tabelle 5 dargestellt ist, war die pars inferior für Losartan 2I und Kontrolle 2I im Mittel gleich:  $1,2 \pm 0,3$  mm ( $p = 0,81$ ). Die pars superior für Losartan 2I hatte eine Länge von  $2,4 \pm 0,2$  mm und war nur andeutungsweise 0,7 mm größer als die pars superior von Kontrolle 2I  $1,7 \pm 1,3$  mm ( $p = 0,47$ ).

GRUPPE	LÄNGE DER PARS SUPERIOR (IN MM)			LÄNGE DER PARS INFERIOR (IN MM)		
	Losartan	Kontrolle	p-Wert	Losartan	Kontrolle	p-Wert
<b>2I</b>	$2,4 \pm 0,2$	$1,7 \pm 1,3$	0,47	$1,2 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,3$	0,81
<b>4I</b>	$1,2 \pm 0,8$	$2,1 \pm 0,7$	0,15	$1,9 \pm 1,2$	$1,6 \pm 1,0$	0,78
<b>4I+Re</b>	$2,2 \pm 0,3$	$2,7 \pm 1,4$	0,20	$1,1 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,8$	0,02

*Tabelle 5: Darstellung der Entwicklung der Längen der pars superior und der pars inferior mit und ohne Gabe von Losartan nach 2 bzw. 4 Wochen Immobilisation sowie nach 8 Wochen Immobilisation und Remobilisation*

Nach vier Wochen Immobilisation ergab sich eine Gesamtlänge von  $3,1 \pm 1,6$  mm für Losartan 4I (vs. Losartan 2I:  $p = 0,53$ ) und eine Gesamtlänge von  $3,7 \pm 1,6$  mm für Kontrolle 4I (vs. Kontrolle 2I:  $p = 0,5$ ). Die sich andeutende 0,6 mm größere Kapsellänge für Kontrolle 4I im Vergleich zu Losartan 4I war nicht signifikant ( $p = 0,57$ ).

Bezüglich der pars inferior zeigte sich durch zwei weitere Wochen der Immobilisation kein Längenunterschied zwischen Losartan 4I ( $1,9 \pm 1,2$  mm) und Kontrolle 4I ( $1,6 \pm 1,0$  mm;  $p = 0,78$ ) (Tabelle 5). Im Vergleich zu den zwei Wochen Immobilisation-Gruppen konnte auch kein erheblicher Unterschied für die Länge der pars inferior festgestellt werden: Losartan 4I vs. Losartan 2I:  $p = 0,4$ ; Kontrolle 4I vs. Kontrolle 2I:  $p = 0,5$ .

Durch die weitere Immobilisation nahm die pars superior unter Losartan um 1,2 mm auf  $1,2 \text{ mm} \pm 0,8 \text{ mm}$  tendenziell ab ( $p = 0,07$ ), gleichzeitig maß die pars superior unter Placebo  $2,1 \text{ mm} \pm 0,7 \text{ mm}$  ( $p = 0,6$ ). Hieraus ergab sich unter Losartan 4I eine tendenziell 0,9 mm kleinere Länge der pars superior im Vergleich mit der Kontrolle 4I ( $p = 0,15$ ) (Tabelle 5).

Im Verlauf der vierwöchigen Remobilisationsphase zeigte sich eine Gesamtlänge der dorsalen Gelenkkapsel in Losartan 4I+Re von  $3,3 \pm 0,4 \text{ mm}$  ohne wesentliche Änderung im Vergleich zu Losartan 4I ( $p = 0,76$ ). In Kontrolle 4I+Re präsentierte sich eine tendenzielle Zunahme um 2,1 mm auf  $5,8 \pm 1,2 \text{ mm}$  ( $p = 0,12$ ). Die Gesamtlänge der Kontrollgruppe war 2,5 mm größer als die Gesamtlänge unter Losartan ( $p = 0,03$ ) (Abb. 40). Innerhalb der Kontrollgruppe präsentierte sich für Kontrolle 4I+Re eine um 2,9 mm größere Kapselgesamtlänge gegenüber Kontrolle 2I ( $p = 0,05$ ).

Die pars inferior für Losartan 4I+Re war im Mittel  $1,1 \pm 0,1 \text{ mm}$  lang. Die angedeutete kürzere Länge von 0,8 mm im Vergleich zu Losartan 4I war nicht signifikant ( $p = 0,32$ ). Die pars inferior für Kontrolle 4I+Re mit einem Mittelwert von  $3,1 \pm 0,8 \text{ mm}$  hingegen war tendenziell 1,5 mm länger als in Kontrolle 4I ( $p = 0,09$ ). Im Vergleich der beiden Untersuchungsgruppen nach acht Wochen zeigte sich gegenüber Losartan 4I+Re eine um 2 mm deutlich größere Länge der pars inferior in Kontrolle 4I+Re ( $p = 0,02$ ) (Tabelle 5).

Durch die vierwöchige Remobilisation vergrößerte sich die pars superior der Losartan 4I+Re tendenziell um 1 mm auf  $2,2 \pm 0,3 \text{ mm}$  im Vergleich zu Losartan 4I ( $p = 0,09$ ). Die Länge der pars superior der Kontrolle 4I+Re maß  $2,7 \pm 1,4 \text{ mm}$ . Gegenüber der Kontrolle 4I deutete sich ein Größenunterschied von 0,6 mm an ( $p = 0,29$ ). Die pars superior der Kontrolle 4I+Re war schließlich tendenziell 0,5 mm größer als die pars superior der Losartan 4I+Re ( $p = 0,2$ ) (Tabelle 5).

6.3.2 Untersuchung der Dicke der dorsalen Kniegelenkscapsel

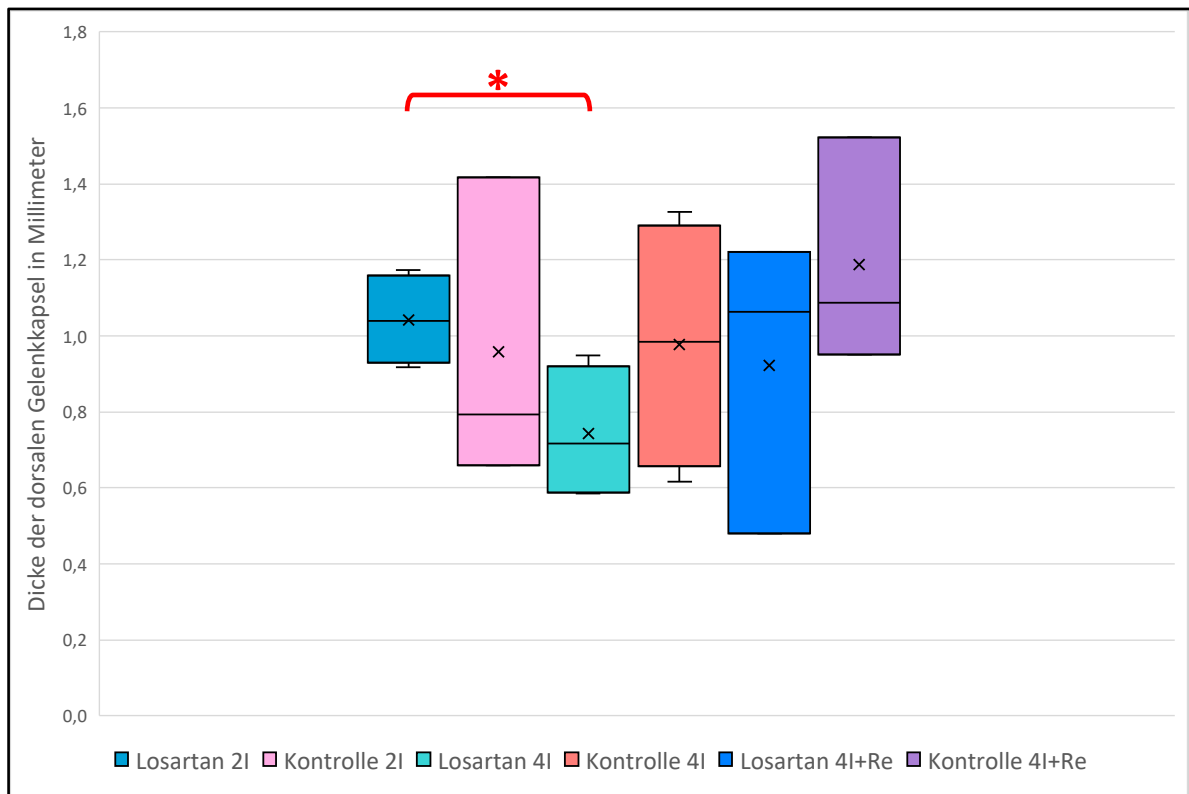


Abb. 41: Vergleich der Dicke der dorsalen Kniegelenkscapsel nach 2 bzw. 4 Wochen Immobilisation sowie nach 8 Wochen Immobilisation und Remobilisation; \* ( $p \leq 0,05$ )

Neben der Länge zählt auch die Dicke der dorsalen Kniegelenkscapsel zu den wichtigen Faktoren, die das Extensionsvermögen beeinflussen können [163]. Zur Vergleichbarkeit wurde, wie bereits in Kapitel 5.5.3 besprochen, ein definierter Bereich der dorsalen Capsel zwischen dorsalem Meniskusrand und angrenzendem Muskelgewebe ausgemessen.

Nach zwei Wochen Immobilisation wurde eine Kapseldicke von  $1,0 \pm 0,1$  mm für Losartan 2I und von  $1,0 \pm 0,4$  mm für Kontrolle 2I gemessen ( $p = 0,76$ ). Nach vier Wochen Immobilisation zeigte sich unter dem Einfluss von Losartan eine signifikante Abnahme der Kapseldicke um 0,3 mm auf  $0,7 \pm 0,2$  mm gegenüber Losartan 2I ( $p = 0,05$ ) (Abb. 41). Gleichzeitig blieb die Kapseldicke in Kontrolle 4I ( $1,0 \pm 0,3$  mm) im Vergleich mit Kontrolle 2I unverändert ( $p = 0,94$ ). Dies führte zwischen Losartan 4I und Kontrolle 4I zu keinem signifikanten, nur andeutungsweisen Unterschied von 0,3 mm ( $p = 0,27$ ). Nach der vierwöchigen Remobilisationsphase maß die Kapseldicke in Losartan 4I+Re  $0,9 \pm 0,4$  mm und in Kontrolle 4I+Re  $1,2 \pm 0,3$  mm ( $p = 0,40$ ). Im Vergleich zu den vier Wochen Immobilisationsgruppen ergab sich sowohl für Losartan 4I+Re als auch Kontrolle 4I+Re keine deutliche Veränderung (jeweils  $p = 0,44$ ).

---

## 7. DISKUSSION

Dieses Experiment untersuchte den Einfluss von oral verabreichtem Losartan auf die Entwicklung einer PTGK eines chirurgisch traumatisierten Kniegelenks im Rattenmodell (48 Sprague Dawley Ratten) über einen Beobachtungszeitraum von acht Wochen. Nachfolgend soll der Hypothese dieser Arbeit nachgegangen werden, ob durch die Gabe von Losartan die Aktivierung von Myofibroblasten und damit die posttraumatische Gelenkkontraktur gehemmt werden kann.

### 7.1 Der Einfluss von Losartan auf das Bewegungsausmaß

Die initialen Messungen der maximal möglichen Extension ergaben gleichwertige Ausgangswerte (BA) von  $147,0^\circ \pm 4,5^\circ$  (Losartan 2I) und  $147,6^\circ \pm 8,1^\circ$  (Kontrolle 2I) für die beiden Untersuchungsgruppen. Nach zwei Wochen Immobilisation zeigte sich eine signifikante Reduktion der Extensionsfähigkeit um  $63^\circ$  auf  $84,1^\circ \pm 5,1^\circ$  in der Losartan- und um  $60^\circ$  auf  $87,3^\circ \pm 6,4^\circ$  in der Kontrollgruppe. Am Ende der vierwöchigen Immobilisation verringerte sich die Extension im Vergleich zu Losartan 2I um  $5^\circ$  auf  $78,9^\circ \pm 5,2^\circ$  für Losartan 4I. In Kontrolle 4I wurde gegenüber Kontrolle 2I eine um  $12^\circ$  geringere Extensionsfähigkeit von  $75,7^\circ \pm 6,7^\circ$  gemessen. Es zeigte sich also, dass während der ersten beiden Wochen der Immobilisation die Extensionsfähigkeit wesentlich stärker abgenommen und sich der Großteil der Gelenkkontraktur ausgebildet hat. Durch die Remobilisation verbesserte sich die Extension schließlich um  $35^\circ$  auf  $113,9^\circ \pm 6,4^\circ$  für Losartan 4I+Re und um  $37,5^\circ$  auf  $113,2^\circ \pm 13,2^\circ$  für Kontrolle 4I+Re, jedoch deutlich entfernt vom initialen Bewegungsausmaß. Zu keinem Zeitpunkt des Experiments kam es, im Vergleich zur Kontrolle, durch die Gabe von Losartan zu einer signifikanten Verbesserung der Extensionsfähigkeit im Kniegelenk.

In gewisser Weise unterstützen diese Ergebnisse die Auswertungen der bereits genannten retrospektiven Studie von Langston et al., die das Bewegungsausmaß von 141 Kniegelenken nach Knie-TEP-OP untersuchten [141]. Sie verglichen hierbei Patienten, die Ang II-hemmende Medikamente (ACEI oder ARB) einnahmen, gegen eine Kontrollgruppe. Die jeweilige Dosierung richtete sich nach den Therapiestandards zur Behandlung einer arteriellen Hypertonie, Herzinsuffizienz, koronaren Herzkrankheit oder Diabetes mellitus. Die Einnahme von ACEI oder ARB zeigte gegenüber der Kontrolle keinen signifikanten Unterschied bezüglich

des postoperativen Bewegungsausmaß nach sechs Monaten [141]. In einer anderen retrospektiven Studie analysierten Arraut et al. spezifisch die Auswirkungen von Losartan auf das Bewegungsausmaß nach einer Knie-TEP-OP [164]. Die Hälfte der 158 eingeschlossenen Patienten nahmen vor der Operation seit mindestens drei Monaten Losartan zur Behandlung einer arteriellen Hypertonie ein. Es zeigte sich auch in dieser Studie keine signifikante Verbesserung des postoperativen Bewegungsausmaßes nach drei Monaten. Bei beiden Studien ist zu bemängeln, dass Informationen zum postoperativen Procedere (wie z.B. Immobilisation, Schmerz- oder Physiotherapie) entweder gar nicht oder nur sehr allgemein gehalten zur Verfügung gestellt wurden. Außerdem finden sich in beiden Studien keine genauen Angaben zu den jeweiligen Dosierungen der eingenommenen Medikamente. Bedair et al. konnten anhand eines Mausmodells mit Verletzung eines Skelettmuskels zeigen, dass die dosisabhängige Gabe von Losartan zu einer signifikant verringerten Fibrosierung und damit zu einer signifikant verbesserten Muskelregeneration führte [134]. Es wäre daher für die beiden oben genannten retrospektiven Studien interessant gewesen Einzelheiten über die durchschnittlich eingenommene Losartan-Dosis bzw. über die Verteilung der Dosismengen in der jeweiligen Interventionsgruppe zu erfahren, um Rückschlüsse auf eine mögliche Dosis-Wirkungs-Beziehung von Losartan beim Menschen ziehen zu können.

Bei der Betrachtung der Entwicklung der Gesamtkontraktur (TC) während der Immobilisation zeigte sich, dass sich der Großteil der PTGK während der ersten zwei Wochen nach Trauma entwickelte. Für Losartan 2I ergab sich ein Wert für die TC von  $62,9^\circ \pm 4,4^\circ$  und für die Kontrolle 2I ein TC-Winkel von  $60,4^\circ \pm 9,9^\circ$ . Innerhalb der zwei weiteren Wochen Ruhigstellung verlangsamte sich die Zunahme der TC. In einer frühen Studie, welche die PTGK anhand eines Rattenmodells untersuchte, beschrieben Wilson et al. ebenfalls eine gleichartige, schnelle und frühzeitige Entwicklung der Kontraktur [165]. Kaneguchi et al. entwickelten ein Rattenmodell zur Untersuchung der Arthrofibrose nach Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes (ACLR) [166]. Durch dieses konnten sie die Ausbildung einer operationsbedingten Gelenkkontraktur bereits am 7. postoperativen Tag nachweisen. Zu diesem Zeitpunkt war die PTGK bereits vollständig ausgeprägt und nahm in der Folge wieder ab, was durch den Verzicht auf eine posttraumatische Immobilisation in diesem Modell erklärt werden kann [166, 167]. Es konnte gezeigt werden, dass bereits eine zweiwöchige Immobilisation wesentlich zur Entstehung und zum Voranschreiten einer PTGK beitrug [154, 168]. Zusätzlich ist zu vermuten, dass das initiale Trauma die Kontrakturenbildung wesentlich



vorantreibt, da es gleichzeitig mehrere proinflammatorische Signalkaskaden auslöst [37, 50, 167].

Nach vier Wochen Immobilisation zeigte sich durch Losartan eine tendenzielle Reduktion der TC um  $3,6^\circ$  auf  $59,3^\circ \pm 10,5^\circ$ , bei gleichzeitiger Steigerungstendenz der TC in der Kontrollgruppe um  $7,1^\circ$  auf  $67,5^\circ \pm 7,4^\circ$  ( $p = 0,09$ ). Die TC wurde als die Summe der arthrogenen (AC) und myogenen (MC) Komponenten der Gelenkkontraktur definiert. Die MC unter Losartan zeigte sich nach zwei und vier Wochen Immobilisation gleichwertig. Für Kontrolle 2I und Kontrolle 4I war die MC ebenfalls fast gleichbleibend. Die AC unter Losartan zeigte sich andeutungsweise um  $4^\circ$  kleiner ( $53,3^\circ \pm 14,2^\circ$ ;  $p = 0,53$ ), sodass unter Vorbehalt eine Korrelation zwischen der Abnahme der TC und der Abnahme der AC unter Losartan vermutet werden könnte. Interessanterweise zeigte sich in Kontrolle 4I eine Tendenz zur Zunahme der AC um  $11^\circ$  auf  $63,8^\circ \pm 13,4^\circ$  ( $p = 0,12$ ), sodass sich die Zunahme der TC in Kontrolle 4I auch auf eine vergrößerte AC zurückführen lassen könnte. Für die AC ergab sich schließlich insgesamt ein tendenziell  $10,5^\circ$  kleinerer Wert für Losartan 4I im Vergleich zu Kontrolle 4I ( $p = 0,15$ ). Hieraus könnte eine sich andeutende antifibrotische Wirkung von Losartan in Erwägung gezogen werden.

Jedoch setzte sich dieser Trend in der nachfolgenden vierwöchigen Remobilisationsphase nicht fort. In diesem Beobachtungszeitraum kam es in beiden Gruppen zu einer signifikanten Verringerung der TC um  $26^\circ$  für Losartan 4I+Re auf  $33,6^\circ \pm 8,8^\circ$  und um  $31^\circ$  für Kontrolle 4I+Re auf  $36,6^\circ \pm 14,9^\circ$ . Diese ergab sich zum einen aus einem jeweils um  $4^\circ$  kleineren Mittelwert der MC für beide Untersuchungsgruppen und zum anderen durch eine signifikante Verringerung der AC um  $22^\circ$  auf  $31,4^\circ \pm 10,5^\circ$  unter Losartan und um  $27^\circ$  auf  $37,2^\circ \pm 12,6^\circ$  in der Kontrolle. Die tendenzielle Differenz der AC zwischen den beiden Untersuchungsgruppen dezimierte sich nach acht Wochen auf  $5^\circ$  ( $p = 0,37$ ), sodass sich die mögliche antifibrotische Wirkung von Losartan unter Remobilisationsbedingungen nicht bestätigen ließ.

Sowohl innerhalb der Losartan- als auch der Kontrollgruppen zeigte sich durch die vierwöchige Remobilisationsphase gegenüber der Immobilisation eine signifikante Abnahme der TC. Jedoch ließ sich dies nicht nur durch die Gabe von Losartan erklären, sondern bestätigte vielmehr die prinzipielle Wirksamkeit bereits etablierter Behandlungsstandards, welche eine frühzeitige Remobilisation beinhalten [169-171]. Nach der vierwöchigen Remobilisation konnte sowohl in der Losartan- als auch in der Kontrollgruppe eine signifikant gebesserte Extensionsfähigkeit verzeichnet werden. Jedoch war die Extension im Vergleich zum

jeweiligen BA um  $34^\circ$  (Losartan 4I+Re) bzw. um  $37^\circ$  (Kontrolle 4I+Re) signifikant niedriger. Dies ließ vermuten, dass trotz Remobilisation eine Restkontraktur vorhanden und die PTGK nicht vollständig überwunden war. Mehrere Studien wiesen bereits darauf hin, dass nach längerer Immobilisation des Kniegelenks eine PTGK durch Remobilisation nicht reversibel war [161, 163, 172]. Zhou et al. führten eine groß angelegte Studie durch, in welcher sie anhand eines Rattenmodells den Einfluss der Immobilisation (durch extraartikuläre, flektierte Ruhigstellung des Kniegelenks) auf die Ausbildung einer Gelenkkontraktur untersuchten [163]. Sie stellten fest, dass eine Ruhigstellung von mehr als zwei Wochen zu einer irreversiblen Kontraktur des Kniegelenks führte, auch wenn die Dauer der Remobilisation viermal so groß war wie die Dauer der Immobilisation [163]. Darüber hinaus berichteten Kaneguchi et al. in ihrer Studie an bereits genanntem ACLR-Arthrofibrose-Rattenmodell, dass, obwohl sie initial auf eine Immobilisation verzichteten, durch die Remobilisation das Extensionsvermögen bis zum 56. Tag (= 8. Woche) signifikant geringer als der präoperative Ausgangswert war [167]. Es gibt Hinweise darauf, dass die posttraumatische Remobilisation einen zusätzlichen proinflammatorischen Effekt darstellt und damit die Entzündungsreaktion aufrechterhält und die Bildung einer PTGK verstärkt [10, 172]. Kaneguchi et al. bestätigten eine verstärkte Expression von proinflammatorischen Genen, wie TGF- $\beta$  oder IL-1, in der posterioren Kniegelenkscapsel im Rahmen der Remobilisation [10, 172].

Demnach müsste die Ausprägung der PTGK vor allem durch den Grad der AC bestimmt sein. Diese Annahme bestätigte sich in diesem Experiment bei Betrachtung der prozentualen Zusammensetzung der TC. Während der Immobilisation machte die MC lediglich 10 % der TC aus. Die Dauer der Ruhigstellung hatte dabei keinen signifikanten Einfluss auf das Ausmaß der MC. Schließlich zeigte sich unter der Remobilisation eine vollständige Rekonvaleszenz der MC. Sie erreichte nach acht Wochen das Niveau der bereits angesprochenen physiologischen, myogenen Extensionshemmung ( $21,7^\circ$ ) von gleichaltrigen Ratten [27]. Das bedeutete, dass im Rahmen der Remobilisation die verbleibende TC zu 100 % der AC entsprach. Im Einklang hierzu sind die Ergebnisse von Dunham et al., die mithilfe eines Rattenmodells herausfanden, dass Muskeln und Sehnen nach sechs Wochen Immobilisation nur 10 % der PTGK des Ellenbogengelenks ausmachten. Zudem zeigten sie, dass nach einer gleich langen Remobilisationsphase von 6 Wochen die Muskeln und Sehnen nicht mehr signifikant zur Kontraktur beitrugen [173].

In gewisser Weise ähneln die Ergebnisse einer Studie von David et al., die anhand eines PTGK-Rattenmodell am Ellenbogengelenk die Auswirkungen von oral verabreichtem Losartan untersuchten [174]. In ihrem Modell benutzten sie zwei verschiedene Dosierungsstrategien (Strategie 1: 20 mg/kg/d für 3 Wochen; Strategie 2: 40 mg/kg 3x/Woche für 6 Wochen). Die PTGK wurde durch eine anteriore Kapsulotomie und eine Durchtrennung des lateralen Kollateralbandes provoziert. Im Anschluss wurde das Ellenbogengelenk sechs Wochen lang mit einem Verband ruhiggestellt, gefolgt von einer sechswöchigen Remobilisationsphase. Um die Wirkung von Losartan zu beurteilen, wurden biomechanische und histopathologische Untersuchungen durchgeführt. Letztlich zeigte weder die eine noch die andere Dosierungsstrategie eine signifikante Verbesserung der PTGK. Allerdings sollte beim Vergleich der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass bei David et al. während der Remobilisation Losartan abgesetzt wurde [174]. Eine, während der Remobilisation erneut ausgelöste, Entzündungsreaktion könnte Auswirkungen auf die Ergebnisse gehabt haben [10, 172].

## 7.2 Veränderungen der dorsalen Gelenkkapsel durch Losartan

Während der Immobilisation zeigte sich unter Losartan eine Gesamtlänge der dorsalen Gelenkkapsel nach zwei Wochen von  $3,6 \pm 0,4$  mm (Losartan 2I) und nach vier Wochen eine andeutungsweise 0,5 mm kürzere Länge von  $3,1 \pm 1,6$  mm (Losartan 4I;  $p = 0,53$ ). Gleichzeitig ergab sich in der Kontrollgruppe nach zwei Wochen eine Kapsellänge von  $2,9 \pm 1,6$  mm (Kontrolle 2I) und nach vier Wochen eine sich andeutende 0,8 mm längere Kapsel mit einem Wert von  $3,7 \pm 1,6$  mm (Kontrolle 4I;  $p = 0,5$ ). Durch die vierwöchige Immobilisation nahm die Länge der pars superior unter Losartan um 1,2 mm auf  $1,2 \text{ mm} \pm 0,8 \text{ mm}$  tendenziell ab ( $p = 0,07$ ). Hieraus ergab sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe die tendenzielle Differenz von 0,9 mm ( $p = 0,15$ ). Die Länge der pars inferior änderte sich während der gesamten Immobilisation nicht und hatte daher keinen Einfluss auf die Gesamtlänge der dorsalen Kapsel. In der bereits beschriebenen Studie von Zhou et al. wurde gezeigt, dass die zunehmende Verkürzung der dorsalen Gelenkkapsel mit dem Verlust der Extensionsfähigkeit im Kniegelenk korreliert [163]. Zudem stellten sie fest, dass die Verkürzung vor allem im femoralen Anteil der Gelenkkapsel, in dieser Arbeit als pars superior definiert, auftrat. Sie erklärten, dass die pars superior anatomisch länger als die pars inferior ist, wodurch sich mehr Synovialfalten bilden, in Kontakt treten und schließlich miteinander verkleben oder verwachsen können [163]. In Einklang mit dieser Beobachtung war die tendenziell

abnehmende Länge der pars superior in der Losartan 4I-Gruppe zu bringen. Konträr zu den Ergebnissen von Zhou et al. erschien die im Vergleich zu Kontrolle 2I angedeutete größere Kapsellänge der Kontrollgruppe nach vier Wochen Immobilisation, da die Extensionsfähigkeit gleichzeitig um 12° kleiner geworden ist.

Am Ende der vierwöchigen Remobilisation zeigte sich eine um 2,5 mm kürzere Gesamtlänge der dorsalen Gelenkkapsel unter Losartan (4I+Re:  $3,3 \pm 0,4$  mm) im Vergleich mit der Kontrolle (4I+Re:  $5,8 \pm 1,2$  mm;  $p = 0,03$ ). Im Gegensatz zur Immobilisation ergaben sich bei Betrachtung der Länge der pars inferior in der Remobilisationsphase signifikante Veränderungen. Während die pars inferior unter Losartan zwischen der vierten und der achten Woche eine sich andeutende Verkürzung um 0,8 mm zeigte (Losartan 4I+Re:  $1,1 \pm 0,1$  mm;  $p = 0,32$ ), wurde die pars inferior in der Kontrolle 4I+Re tendenziell 1,5 mm länger ( $3,1 \pm 0,8$  mm;  $p = 0,09$ ). Die pars inferior war also nach der Remobilisation unter Losartan 2 mm kürzer als in der Kontrolle 4I+Re ( $p = 0,02$ ). Nach der vierwöchigen Remobilisation präsentierte sich die pars superior unter Losartan im Vergleich zu Losartan 4I tendenziell um 1 mm vergrößert (Losartan 4I+Re:  $2,2 \pm 0,3$  mm;  $p = 0,09$ ). Gleichzeitig nahm die Länge der pars superior in der Kontrollgruppe von Woche 4 auf Woche 8 andeutungsweise um 0,5 mm zu (Kontrolle 4I+Re:  $2,7 \pm 1,4$  mm;  $p = 0,29$ ). Hieraus ergab sich nach der Remobilisation unter Losartan eine tendenziell 0,5 mm kürzere Länge der pars superior als in der Kontrolle 4I+Re ( $p = 0,2$ ).

Durch die Remobilisation zeigte sich eine Verbesserung der Extension gleichermaßen für Losartan 4I+Re und für Kontrolle 4I+Re. Den Beobachtungen von Zhou et al. nach müsste eine Zunahme des Bewegungsausmaßes auch mit einer Längenzunahme der dorsalen Gelenkkapsel einhergehen [163]. Diese Korrelation konnte in dieser Arbeit jedoch nur durch die Kontrollgruppe bestätigt werden. Im Vergleich blieb die Länge der dorsalen Gelenkkapsel nach der Remobilisation in der Losartangruppe nahezu gleich. Bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse von Zhou et al. zeigte sich, dass die Zunahme der Gesamtlänge der dorsalen Kapsel erneut hauptsächlich durch eine Zunahme der pars superior beeinflusst wurde [163]. Im Kontrast dazu war es in dieser Arbeit vor allem die pars inferior in der Kontrollgruppe, die signifikant größer als in der Losartangruppe und für die Zunahme der Gesamtlänge verantwortlich war. In der bereits genannten Studie von Kaneguchi et al. wurden anhand des ACLR-Rattenmodells auch die Längenänderungen der dorsalen Kniegelenkkapsel bei der Bildung einer Gelenkkontraktur untersucht [167]. Sie beschrieben eine signifikant kürzere Länge der pars inferior nach vier Wochen Remobilisation im Vergleich zur Kontrolle (nicht

---

operierte kontralaterale Seite). Dieses Ergebnis von Kaneguchi et al. kontrastiert ebenfalls die Längenzunahme der pars inferior in der Kontrolle 4I+Re.

Die PTGK ist neben der Verkürzung der Kapsellänge auch durch eine Zunahme der Kapseldicke charakterisiert [163]. Interessanterweise wurde die dorsale Kniegelenkkapsel unter Losartan während der Immobilisation von der zweiten bis zur vierten Woche um 0,3 mm dünner (von  $1,0 \pm 0,1$  mm auf  $0,7 \pm 0,2$  mm;  $p = 0,05$ ). Gleichzeitig blieb die Kapseldicke in der Kontrollgruppe während der vierwöchigen Immobilisation unverändert (Kontrolle 2I:  $1,0 \pm 0,4$  mm; Kontrolle 4I:  $1,0 \pm 0,3$  mm;  $p = 0,94$ ). Nach vier Wochen Immobilisation deutete sich eine 0,3 mm dünnere Kapsel für Losartan 4I im Vergleich zur Kontrolle 4I an ( $p = 0,27$ ). Dies könnte einen gewissen antifibrotischen Effekt von Losartan erahnen lassen, da es gleichzeitig mit der tendenziellen Abnahme der AC unter Losartan nach vier Wochen Immobilisation korreliert. Durch die vierwöchige Remobilisationsphase veränderte sich die Kapseldicke in den beiden Untersuchungsgruppen nicht (Losartan 4I+Re:  $0,9 \pm 0,4$  mm; Kontrolle 4I+Re:  $1,2 \pm 0,3$  mm;  $p = 0,44$ ). Die AC nahm durch die Remobilisation signifikant ab, die Kapseldicke jedoch nicht, sodass sich der Trend unter Losartan nicht bestätigte. In der Studie von Kaneguchi et al. nahm die Kapseldicke posttraumatisch bis zum 7. Tag deutlich zu [167]. Während der weiteren Remobilisation verringerte sich die Kapseldicke allmählich bis zur 8. Woche und ging gleichzeitig mit einer Verkleinerung der TC einher [167]. Diese Beobachtung bestätigte sich in dieser Arbeit nicht, da die Kapseldicke trotz einer abnehmenden TC während der Remobilisation unverändert blieb.

### 7.3 Eine Einordnung des Experiments in die aktuelle Forschung

Die ersten Studien mit PTGK-Tiermodellen dienten vor allem der Grundlagenforschung zum besseren Verständnis der Pathophysiologie einer PTGK [168, 172, 175, 176]. Darauf aufbauend konzentrierte man sich zunächst auf die Möglichkeiten antiinflammatorischer Medikamente zur Reduktion bzw. Prävention der posttraumatischen lokalen Entzündung im periartikulären Bindegewebe [177, 178]. Schließlich wurde in den letzten Jahren das Forschungsfeld der medikamentösen Therapiemöglichkeiten zur Hemmung einer PTGK deutlich erweitert und viele Erkenntnisse, die aus der Fibroseforschung an anderen Organen gewonnen wurden, auf ihre Übertragbarkeit auf die PTGK getestet. Einige Studien wurden bereits im Kapitel 4.3.2 besprochen. Andere werden noch im Verlauf detailliert ausgeführt.

Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse jener Studien mit dieser experimentellen Arbeit besteht nur unter Vorbehalt. Sie unterscheiden sich nicht nur in Bezug auf das getestete Medikament, sondern vor allem in der Konzeption der Studie. Beispielsweise verwendeten einige Studien nur eine durch Immobilisierung induzierte Kontraktur zur Erzeugung einer PTGK [119, 179, 180]. Morrey et al. sowie Nesterenko et al. beschrieben, dass eine Kombination aus Gelenkimmobilisation sowie Knochen- und Weichteilverletzung eine Kontraktur erzeuge, die der beim Menschen zu findenden Form der PTGK ähnlicher sei [181, 182]. Das in diesem Experiment verwendete PTGK-Rattenmodell umfasst eine intraartikuläre Knochenschädigung, einen Hämarthros sowie eine Ruptur der posterioren Gelenkkapsel mit anschließender Immobilisation des Kniegelenks mittels K-Draht-Fixierung [27]. Darüber hinaus gibt es Unterschiede hinsichtlich der Dauer der Immobilisation, der Art und Weise der Gelenkmessung und der Applikationsform des Medikaments. Viele dieser Studien verwendeten einen invasiven Applikationsweg in Form von intraartikulären, subkutanen oder intramuskulären Injektionen. All diese Verabreichungsformen bergen ein hohes Risiko für Nebenwirkungen, wie Blutungen, Infektionen, Nerven- oder Gewebeschäden [122, 183, 184]. Insbesondere die intraartikuläre Injektion erhöht das Risiko von Verletzungen der Kapsel, der Bänder und des Knorpelgewebes oder einer septischen Arthritis [122]. Es zeigte sich jedoch, dass in den neueren Studien zur medikamentösen PTGK-Behandlung die intraartikuläre Verabreichung eines Medikaments viel häufiger getestet wurde und möglicherweise der oralen Gabe bei der Verbesserung des Bewegungsumfanges überlegen ist [117, 119, 179, 185, 186]. Für dieses Experiment wurde jedoch bewusst die Entscheidung gefällt die orale Gabe von Losartan zu testen, da diese einer invasiven Applikationsform im Praxisalltag überlegen ist. Dies liegt zum einen an der Invasivität der Injektion mit den möglichen Komplikationen und zum anderen an der verminderten Compliance des Patienten bezüglich einer täglichen Injektion, die nur durch speziell geschultes medizinisches Fachpersonal durchgeführt werden kann. Zudem ist Losartan ein bereits etabliertes, für die orale Gabe zugelassenes Medikament, dessen Nebenwirkungsprofil sehr wohl bekannt ist [187]. Wie bereits im Kapitel 4.3.3 beschrieben wurde, leiden zwei Drittel der über 65-Jährigen an einer arteriellen Hypertonie [140]. Eine der wichtigsten Substanzklassen der Antihypertensiva sind die ARB, zu denen Losartan gehört und vielen Patienten als Therapeutikum verordnet wird. Das bedeutet für die mögliche Therapie der PTGK mit Losartan, dass gegebenenfalls nur eine Dosisanpassung eines bereits verschriebenen Medikaments notwendig wäre.

Es finden sich nur wenige publizierte PTGK-Tiermodellstudien, die über eine signifikante Verbesserung der Gelenkbeweglichkeit durch ein oral zu verabreichendes Medikament berichteten [155, 179, 188]. In einer Studie von Efirid et al. konnte anhand eines Rattenmodells nachgewiesen werden, dass nach zweiwöchiger posttraumatischer Immobilisation durch die tägliche orale Gabe von Montelukast eine signifikante Verbesserung des Bewegungsausmaßes um 12° im Kniegelenk erreicht wurde [155]. Montelukast wirkt als Leukotrien-Rezeptor-Antagonist vor allem antiinflammatorisch und findet in der Therapie von Asthma und allergischer Rhinitis Verwendung [189]. Das von Efirid et al. angewandte Kontrakturmodell unterschied sich deutlich von dem in dieser Arbeit verwendeten PTGK-Rattenmodell, da es bewusst eine strukturelle Schädigung der Knorpelgelenkflächen beinhaltete. Die ligamentären und muskulären Ansätze am medialen und lateralen Condylus wurden abgeschabt und der darunter befindliche Gelenkknorpel der Trochlea durch ein Skalpell angeschnitten [155]. Der ausgeprägte intraartikuläre Schaden führte mutmaßlich zu einer ausgeprägten Entzündungsreaktion mit deutlicher Narbenbildung, welche letztlich den positiven Effekt von Montelukast erklären könnte [155, 190]. Im Vergleich hierzu wurde in dieser experimentellen Arbeit bewusst ein Modell gewählt, bei dem auf eine Verletzung des Gelenkknorpels verzichtet wird, um eine Kongruenz der Gelenkpartner und damit eine uneingeschränkte Gelenkbeweglichkeit gewährleisten zu können [27]. Die Studie von Efirid et al. beinhaltete vergleichbare Messungen zum Bewegungsausmaß im Kniegelenk, jedoch fehlte eine histologische Aufbereitung der Kniegelenke, sodass Veränderungen der dorsalen Kniegelenkkapsel nicht verglichen werden konnten [155].

Zwei weitere Studien untersuchten die Wirkung der oralen Gabe von Celecoxib auf eine PTGK. Coxibe zählen zu den NSAR und wurden speziell für die selektive Hemmung der Cyclooxygenase-2 (COX-2) entwickelt [191]. Hierdurch kommt es zur reduzierten Synthese von inflammatorischen Prostaglandinen und Zytokinen, wie IL-1, IL-6 oder TNF- $\alpha$ , resultierend in einer verminderten Entzündung und der damit verbundenen Schmerzreaktion. Durch seine analgetische und antiphlogistische Wirkung wird Celecoxib aktuell zur Behandlung von aktivierten Arthrosen, rheumatoider Arthritis und Morbus Bechterew angewandt [188, 191]. Li et al. verwendeten eine zu dieser experimentellen Arbeit vergleichbare Methodik zur Erzeugung einer PTGK, allerdings anhand eines Kaninchenmodells [188]. Nach 30 Tagen Immobilisation zeigte sich durch die zweimal tägliche orale Gabe von Celecoxib eine signifikant verbesserte Gelenkbeweglichkeit um 93,6° im Kniegelenk. Weitere Untersuchungen zu Veränderungen der dorsalen Kniegelenkkapsel fehlen jedoch auch in

dieser Studie [188]. Ozawa et al. untersuchten ebenfalls die Wirkung von Celecoxib. Allerdings verwendeten sie ein atraumatisches Kontrakturmodell an Ratten mit einer Immobilisierung des Kniegelenks für drei Wochen [179]. Neben Messungen der Gelenkbeweglichkeit finden sich bei dieser Studie auch vergleichbare Messungen der dorsalen Kniegelenkkapsel. Sie stellten dar, dass Celecoxib die Ausbildung einer myogenen Kontraktur während einer Ruhigstellung verhindern konnte, indem es die Verkürzung der ischiocruralen Muskulatur abschwächte. Sie hoben hervor, dass der antiphlogistische und analgetische Effekt von Celecoxib bereits während der Immobilisierungsphase eine bedeutende Wirkung für die Prävention einer Kontraktur darstellen und somit als prophylaktische Therapie eingesetzt werden könnte. Celecoxib zeigte jedoch in der Studie von Ozawa et al. keine Wirkung auf die arthrogene Kontrakturkomponente. Es konnte weder die Verkürzung der Gelenkkapsel noch die Gelenkkontraktur hemmen [179].

### 7.4 Limitationen des Experiments

Im Verlauf dieser experimentellen Arbeit ergaben sich einige Fehleranfälligkeiten, Einschränkungen und Verbesserungspotentiale, denen bei der Konzeption künftiger Studien mehr Aufmerksamkeit gewidmet werden sollte. Die antifibrotische Wirkungskraft von Losartan, die sich bereits in verschiedenen Organen vorteilhaft gezeigt hat, konnte in diesem Experiment nicht zu einer signifikanten Verbesserung der PTGK führen. Ein Grund hierfür könnte gewesen sein, dass das initiale Trauma in dem verwendeten PTGK-Rattenmodell eine besonders ausgeprägte Fibrosierung im Kniegelenk ausgelöst haben könnte [27]. Durch die initial durchgeführte Hyperextension des Knies von  $-45^\circ$  wurde ein schwerwiegendes Kniegelenkstrauma imitiert, welches die Verletzung der hinteren Gelenkkapsel, der Kreuzbänder und der femoralen Wachstumsfuge im unreifen Rattenknie beinhaltete [27, 192]. So kann es sein, dass die Dosierung von Losartan zu niedrig gewählt worden ist, um einen adäquaten antifibrotischen Effekt für dieses PTGK-Modell zu erzielen [19]. In der Realität ist die Mehrzahl der Knieverletzungen jedoch geringeren Ausmaßes [193]. Dies könnte bedeuten, dass durch die Anwendung dieses PTGK-Rattenmodells der potenzielle Nutzen von Losartan für PTGK nach geringeren Traumata verschleiert wurde. Zur Erforschung von weiteren antifibrotischen Pharmakotherapien könnte daher gegebenenfalls ein PTGK-Modell mit einem weniger komplexen Verletzungsmuster hilfreich sein.



Eine von Morrey et al. aufgestellte Hypothese könnte auf einen anderen Grund aufmerksam machen, warum sich die antifibrotische Wirkung von Losartan in dieser experimentellen Arbeit unter Verwendung des PTGK-Rattenmodells nicht gezeigt hat. Sie untersuchten die Wirkung von intraartikulär injiziertem Fosaprepitant auf die Entwicklung einer PTGK im Kniegelenk anhand eines Kaninchenmodells [64]. Fosaprepitant ist ein selektiver Neurokinin-1-Rezeptor-Antagonist, der den Neurotransmitter Substanz P (SP) hemmt und zur Behandlung von Chemotherapie-induzierter Übelkeit und Erbrechen zugelassen ist [64, 194]. Der Einfluss von SP bei der Entstehung einer PTGK wurde bereits im Kapitel 4.1.4 ausführlich beschrieben. In ihrer Studie zeigte die Gabe von Fosaprepitant zwar eine Hochregulierung der Expression antifibrotischer Gene, jedoch ohne Auswirkungen auf die biomechanischen Eigenschaften der Gelenkkontraktur [64]. Die daraus abgeleitete Hypothese lautete, dass in dem hochkomplexen Prozess der Fibrosierung durch die Hemmung eines profibrotischen Signalweges andere profibrotische Signalwege hochreguliert werden [64]. Somit stellt sich die Frage, ob die antifibrotische Wirkung von Losartan allein über den AT-1 vermittelten Signalweg ausreichend ist, um der Entwicklung einer PTGK gegensteuern zu können. Um diese Frage abschließend klären zu können, sollte in zukünftigen Arbeiten zum einen der Einfluss von Losartan auf die Hemmung der Myofibroblasten (z.B. histologische Bestimmung der Zellzahl) und zum anderen die Wirkung von Losartan auf die Genexpression wichtiger profibrotischer Mediatoren (z.B. TGF- $\beta$ , IL-6, CTGF,  $\alpha$ -SMA und Kollagen Typ I) untersucht werden.

Das zu untersuchende Medikament Losartan wurde in diesem Experiment nur in einer Dosis, in einem Dosierungsintervall und einer Darreichungsform verabreicht. Genauere Informationen über die Konzentration des Wirkstoffes im Blutserum und in der Gelenkkapsel könnten Aufschluss über die Pharmakokinetik und die Bioverfügbarkeit des Medikaments geben. Hieraus würden sich neue optimierte Dosierungs- und Applikationsformen für weitere Studien schließen lassen [195]. Gleichzeitig sollte bei der Anwendung verschiedener Dosierungsstrategien unerwünschte Nebenwirkungen wie Hyperkaliämie, Hypoglykämie, Niereninsuffizienz oder Hypotonie mithilfe der Bestimmung von entsprechenden Vital- (z.B. Blutdruck) und Laborparametern (z.B. Kreatinin, Kalium, Glucose) überwacht werden [195].

Bei der Berechnung der notwendigen Anzahl an Versuchstieren für ein Experiment sollte stets der Leitsatz gelten: so viel wie nötig, so wenig wie möglich. Wie bereits aufgeführt wurde, mussten einige Ratten vorzeitig aus der Studie herausgenommen werden. Möglicherweise

könnte eine zu geringe Anzahl an Tieren in jeder Gruppe zu Schwankungen in den Daten beigetragen und hierdurch signifikante Unterschiede verschleiert haben. In diesem Sinne sollte zukünftig auf eine ausreichende große Anzahl an Tieren geachtet werden. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden in dieser Studie nur junge, gleichaltrige, männliche Ratten einbezogen. In einer Arbeit von Reiter et al. konnte gezeigt werden, dass es bei der Entwicklung einer PTGK nur geringfügige, geschlechtsabhängige Unterschiede gab [196]. Was jedoch bisher nicht untersucht wurde, ist, ob eine medikamentöse Therapie mit Losartan bei weiblichen Ratten einen vergleichbaren Effekt hat. Es zeigte sich, dass die Ratten der Kontrollgruppe, während der Remobilisationsphase, ein signifikant größeres Körpergewicht hatten als die Ratten der Losartangruppe. Prinzipiell wird ein schwereres Körpergewicht, in Form einer Präadipositas oder Adipositas, als Risikofaktor für ein eingeschränktes Bewegungsausmaß angesehen [197]. Da sich die Extensionsfähigkeit im Kniegelenk in beiden Untersuchungsgruppen, während der Remobilisation, jedoch gleichsam verbesserte, ergab sich keine direkte Korrelation zwischen der Beweglichkeit und dem Körpergewicht. Welchen Einfluss Losartan auf die Gewichtsentwicklung und diese wiederum auf die Entwicklung einer PTGK hatte, konnte auch aufgrund einer diesbezüglich mangelhaften Studienlage nicht abschließend erklärt werden. Alle Messungen wurden gemäß Kap. 6.4.2 durchgeführt. Die Messungen der maximal möglichen Extension prä- (0. Woche) sowie postoperativ (2., 4. oder 8. Woche) erfolgten stets durch einen Zug mit einem Drehmoment von 35 N·mm, welches händisch mittels Federwaage ausgeführt wurde. Die manuelle Anwendung könnte einen menschlichen Fehlerfaktor darstellen. Zur Bestimmung der arthrogener und myogener Kontraktur waren mehrere Messungen erforderlich. Dies könnte zu einer Schwächung der Gelenkstrukturen und damit zu größeren Winkeln geführt haben.

## 8. ZUSAMMENFASSUNG

Die posttraumatische Gelenkkontraktur stellt eine relevante Komplikation, ausgelöst durch Gelenktraumata oder invasive Operationen, dar. Die Genese der pathologischen Verminderung der Gelenkbeweglichkeit ist sehr umfassend und bisher nur unvollständig verstanden. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass es zu einer Dysregulation physiologischer Reparaturmechanismen kommt, welche hauptsächlich durch das Zusammenspiel von TGF- $\beta$  und Myofibroblasten vorangetrieben werden [4]. Durch Mobilisation von verschiedenen Zelltypen (Mastzellen, Makrophagen, Fibroblasten etc.) in das betroffene Gewebe wird die Entzündungskaskade durch die Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren induziert. Dies führt, aufgrund gesteigerter Proliferation und gestörter Apoptose, zum Verbleib von Myofibroblasten im betroffenen Gewebe. Durch diese werden eine Vielzahl an profibrotischen Signalwegen unablässig hochreguliert, welche in einer exzessiven Produktion von EZM münden und schlussendlich in der Fibrosierung der Gelenkkapsel enden [39]. Die übermäßige Ablagerung von pathologischem Bindegewebe führt zu Veränderungen der physiologischen Architektur des betroffenen Gelenks. Für die Patient\*innen kann dies schließlich spürbare schmerzhafte Bewegungseinschränkungen verursachen, die die Aktivitäten des täglichen Lebens und damit die Lebensqualität einschränken können [8, 12]. Physiotherapeutische und chirurgische Maßnahmen stellen die derzeit wichtigsten Behandlungsoptionen dar, durch die eine Verbesserung der Gelenkfunktion erreicht werden kann [4, 12, 198]. Jedoch kann durch den invasiven Charakter der operativen Methoden die bereits genannte Entzündungskaskade zusätzlich stimuliert werden, wodurch der Prozess der pathologischen Fibrosierung von Neuem entfacht werden kann [10, 170].

In diesem Fall könnte ein pharmakologischer Ansatz, der gezielt außer Kontrolle geratene profibrotische Signalkaskaden korrigiert, einen effektiveren Weg zur Behandlung einer PTGK darstellen. Beispielsweise wirkt Angiotensin II über den Angiotensin-Typ-1-Rezeptor in vielen Organen profibrotisch, indem es u.a. die Expression und Aktivierung von TGF- $\beta$  verstärkt [19, 134]. Losartan, ein AT-1-Rezeptorantagonist, ist vor allem bekannt für seine renale und kardiovaskuläre Wirkung [187]. Darüber hinaus zeigte sich in mehreren Studien das antifibrotische Potential von Losartan auch in anderen Organen, sodass es eine potenzielle Therapieoption zur Behandlung einer PTGK darstellen könnte [24, 133, 134]. Dieses Experiment untersuchte den Einfluss von oral verabreichtem Losartan auf die Entwicklung

einer PTGK eines chirurgisch traumatisierten Kniegelenks im Rattenmodell (48 Sprague Dawley Ratten) über einen Beobachtungszeitraum von acht Wochen.

Obwohl sich die antifibrotischen Eigenschaften von Losartan bereits in mehreren Organsystemen als wirkungsvoll erwiesen haben, war der Einfluss von Losartan auf die Entwicklung einer PTGK in diesem Rattenmodell bestenfalls nuanciert. Nach vier Wochen Immobilisation führte die Gabe von Losartan zu einer Verbesserung der Gesamtkontraktur um 10,5° im Vergleich zur Kontrollgruppe und deutete somit seine antifibrotischen Wirkung an. Dieser Effekt ließ sich jedoch für die übrigen Beobachtungszeiträume nicht bestätigen. Auf die Morphometrie der dorsalen Gelenkkapsel hinterließ Losartan im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen signifikanten Eindruck. Den größten Einfluss auf die Gesamtkontraktur hatte die vierwöchige Remobilisationsphase. Hierdurch verbesserte sich die Extensionsfähigkeit erheblich, jedoch mit deutlichem Abstand zum initialen Bewegungsausmaß. Eine Remission der PTGK konnte somit durch die Remobilisation nicht erreicht werden, was einmal mehr hervorhebt, dass weiterhin der Bedarf einer Pharmakotherapie zur Behandlung einer PTGK besteht.

In zukünftigen Experimenten sollte der Frage nachgegangen werden, inwiefern eine dosisabhängige antifibrotische Wirkung durch die orale Gabe von Losartan erzielt werden kann. Gleichzeitig sollte ein verstärktes Augenmerk auf die Effekte von Losartan auf zellulärer und genetischer Ebene geworfen werden. Vor allem sollte der Einfluss von Losartan auf die Regulation der Myofibroblasten und auf die Genexpression von TGF- $\beta$  genauer untersucht werden. Darauf aufbauend könnten neue Erkenntnisse gewonnen werden, die die Rolle des Ang II vermittelten profibrotischen AT-1-Signalwegs bei der Entwicklung der PTGK verdeutlichen.

---

## 9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Grünow A. Illustrationen zur Darstellung des PTGK-Rattenmodells. Berlin 2017.
2. Hildebrand K. A. Posttraumatic elbow joint contractures: defining pathologic capsular mechanisms and potential future treatment paradigms. *J Hand Surg Am.* 2013;38(11):2227-2233.
3. Darby I. A., Zakuan N., Billet F., et al. The myofibroblast, a key cell in normal and pathological tissue repair. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2016;73(6):1145-1157.
4. Usher K. M., Zhu S., Mavropalias G., et al. Pathological mechanisms and therapeutic outlooks for arthrofibrosis. *Bone research.* 2019;7:9-9.
5. Mellema J. J., Lindenhovius A. L. C., Jupiter J. B. The posttraumatic stiff elbow: an update. *Current reviews in musculoskeletal medicine.* 2016;9(2):190-198.
6. Myden C., Hildebrand K. Elbow joint contracture after traumatic injury. *J Shoulder Elbow Surg.* 2011;20(1):39-44.
7. Abdul N., Dixon D., Walker A., et al. Fibrosis is a common outcome following total knee arthroplasty. *Sci Rep.* 2015;5:16469.
8. Sheps D. M. The incidence of elbow injuries in the City of Calgary [Master Thesis]. Calgary, AB: Department of Community Health Sciences, University of Calgary; 2006.
9. Fischer U., Müller M., Strobl R., et al. Prevalence of functioning and disability in older patients with joint contractures: a cross-sectional study. *Eur J Phys Rehabil Med.* 2015;51(3):269-279.
10. Kaneguchi A., Ozawa J., Minamimoto K., et al. Active exercise on immobilization-induced contracted rat knees develops arthrogenic joint contracture with pathological changes. *J Appl Physiol (1985).* 2018;124(2):291-301.
11. Ibrahim I. O., Nazarian A., Rodriguez E. K. Clinical Management of Arthrofibrosis: State of the Art and Therapeutic Outlook. *JBJS Rev.* 2020;8(7):e1900223.
12. Zhang D., Nazarian A., Rodriguez E. K. Post-traumatic elbow stiffness: Pathogenesis and current treatments. *Shoulder Elbow.* 2020;12(1):38-45.

13. Hildebrand K. A., Zhang M., van Snellenberg W., et al. Myofibroblast numbers are elevated in human elbow capsules after trauma. *Clinical orthopaedics and related research*. 2004(419):189-197.
14. Abdel M. P., Morrey M. E., Barlow J. D., et al. Myofibroblast cells are preferentially expressed early in a rabbit model of joint contracture. *J Orthop Res*. 2012;30(5):713-719.
15. Iredale J. P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(3):539-548.
16. Brown R. D., Ambler S. K., Mitchell M. D., et al. The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:657-687.
17. Thannickal V. J., Toews G. B., White E. S., et al. Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annu Rev Med*. 2004;55:395-417.
18. Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney international*. 2006;69(2):213-217.
19. Murphy A. M., Wong A. L., Bezuhy M. Modulation of angiotensin II signaling in the prevention of fibrosis. *Fibrogenesis & tissue repair*. 2015;8(1):7.
20. Kaschina E., Unger T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press*. 2003;12(2):70-88.
21. de Gasparo M., Catt K. J., Inagami T., et al. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 2000;52(3):415-472.
22. Elbaz M., Yanay N., Aga-Mizrachi S., et al. Losartan, a therapeutic candidate in congenital muscular dystrophy: studies in the dy(2J) /dy(2J) mouse. *Ann Neurol*. 2012;71(5):699-708.
23. Couluris M., Kinder B. W., Xu P., et al. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with losartan: a pilot project. *Lung*. 2012;190(5):523-527.
24. Heller J., Shiozawa T., Trebicka J., et al. Acute haemodynamic effects of losartan in anaesthetized cirrhotic rats. *Eur J Clin Invest*. 2003;33(11):1006-1012.
25. Boffa J. J., Lu Y., Placier S., et al. Regression of renal vascular and glomerular fibrosis: role of angiotensin II receptor antagonism and matrix metalloproteinases. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(5):1132-1144.

- 
26. Lim D. S., Lutucuta S., Bachireddy P., et al. Angiotensin II blockade reverses myocardial fibrosis in a transgenic mouse model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2001;103(6):789-791.
  27. Baranowski A., Schlemmer L., Forster K., et al. A novel rat model of stable posttraumatic joint stiffness of the knee. *J Orthop Surg Res*. 2018;13(1):185.
  28. Klingberg F., Hinz B., White E. S. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *The Journal of pathology*. 2013;229(2):298-309.
  29. Ouyang X., Ghani A., Mehal W. Z. Inflammasome biology in fibrogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(7):979-988.
  30. Hinz B. Tissue stiffness, latent TGF- $\beta$ 1 Activation, and mechanical signal transduction: Implications for the pathogenesis and treatment of fibrosis. *Current Rheumatology Reports*. 2009;11(2):120.
  31. Watson R. S., Gouze E., Levings P. P., et al. Gene delivery of TGF- $\beta$ 1 induces arthrofibrosis and chondrometaplasia of synovium in vivo. *Lab Invest*. 2010;90(11):1615-1627.
  32. Morrey B. F. The posttraumatic stiff elbow. *Clinical Orthopaedics and Related Research*<sup>®</sup>. 2005;431:26-35.
  33. Morrey B. F. Surgical treatment of extraarticular elbow contracture. *Clin Orthop Relat Res*. 2000(370):57-64.
  34. Kay N. R. *Surgery of the elbow: practical and scientific aspects*: Arnold; 1998.
  35. Cohen M. S., Schimmel D. R., Masuda K., et al. Structural and biochemical evaluation of the elbow capsule after trauma. *J Shoulder Elbow Surg*. 2007;16(4):484-490.
  36. Akeson W. H., Amiel D., Mechanic G. L., et al. Collagen cross-linking alterations in joint contractures: changes in the reducible cross-links in periarticular connective tissue collagen after nine weeks of immobilization. *Connect Tissue Res*. 1977;5(1):15-19.
  37. Hildebrand K. A., Zhang M., Hart D. A. High rate of joint capsule matrix turnover in chronic human elbow contractures. *Clin Orthop Relat Res*. 2005;439:228-234.
  38. Freeman T. A., Parvizi J., Dela Valle C. J., et al. Mast cells and hypoxia drive tissue metaplasia and heterotopic ossification in idiopathic arthrofibrosis after total knee arthroplasty. *Fibrogenesis & tissue repair*. 2010;3:17-17.

- 
39. Wynn T. A., Ramalingam T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012;18(7):1028-1040.
  40. Wu J., Chitapanarux T., Chen Y., et al. Intestinal myofibroblasts produce nitric oxide in response to combinatorial cytokine stimulation. *J Cell Physiol.* 2013;228(3):572-580.
  41. Wipff P. J., Hinz B. Myofibroblasts work best under stress. *J Bodyw Mov Ther.* 2009;13(2):121-127.
  42. Hinz B., Phan S. H., Thannickal V. J., et al. The Myofibroblast: One Function, Multiple Origins. *The American Journal of Pathology.* 2007;170(6):1807-1816.
  43. Tomasek J. J., Gabbiani G., Hinz B., et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2002;3(5):349-363.
  44. Gabbiani G., Ryan G. B., Majno G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia.* 1971;27(5):549-550.
  45. Hinz B. The myofibroblast: Paradigm for a mechanically active cell. *Journal of Biomechanics.* 2010;43(1):146-155.
  46. Varga J., Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *The Journal of Clinical Investigation.* 2007;117(3):557-567.
  47. Tomasek J. J., Vaughan M. B., Haaksma C. J. Cellular structure and biology of Dupuytren's disease. *Hand Clin.* 1999;15(1):21-34.
  48. Benninghoff A., Drenckhahn D. Band 1: Zelle, Gewebe, Entwicklung, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. *Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie.* 17. Auflage. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2008.
  49. Kendall R. T., Feghali-Bostwick C. A. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol.* 2014;5:123.
  50. Hildebrand K. A., Zhang M., Hart D. A. Myofibroblast upregulators are elevated in joint capsules in posttraumatic contractures. *Clinical orthopaedics and related research.* 2007;456:85-91.



- 
51. Hinz B., Dugina V., Ballestrem C., et al. Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Molecular biology of the cell*. 2003;14(6):2508-2519.
  52. Trautwein C., Friedman S. L., Schuppan D., et al. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *J Hepatol*. 2015;62(1 Suppl):S15-24.
  53. Li M., Riddle S. R., Frid M. G., et al. Emergence of fibroblasts with a proinflammatory epigenetically altered phenotype in severe hypoxic pulmonary hypertension. *J Immunol*. 2011;187(5):2711-2722.
  54. Rockey D. C., Bell P. D., Hill J. A. Fibrosis--a common pathway to organ injury and failure. *N Engl J Med*. 2015;372(12):1138-1149.
  55. Wynn T. A., Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis*. 2010;30(3):245-257.
  56. Hildebrand K. A., Zhang M., Salo P. T., et al. Joint capsule mast cells and neuropeptides are increased within four weeks of injury and remain elevated in chronic stages of posttraumatic contractures. *J Orthop Res*. 2008;26(10):1313-1319.
  57. Monument M. J., Hart D. A., Salo P. T., et al. Posttraumatic elbow contractures: targeting neuroinflammatory fibrogenic mechanisms. *J Orthop Sci*. 2013;18(6):869-877.
  58. Hildebrand K. A., Zhang M., Befus A. D., et al. A myofibroblast–mast cell–neuropeptide axis of fibrosis in post-traumatic joint contractures: An in vitro analysis of mechanistic components. *Journal of Orthopaedic Research*. 2014;32(10):1290-1296.
  59. Welsch U., Kummer W., Deller T. Begriffe und Methodik. In: *Histologie - Das Lehrbuch*. 5. Auflage. München: Urban&Fischer Verlag/ Elsevier GmbH; 2018. p. 1-14.
  60. Gruber B. L. Mast cells in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep*. 2003;5(2):147-153.
  61. Henry C. H., Wolford L. M. Substance P and mast cells: preliminary histologic analysis of the human temporomandibular joint. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;92(4):384-389.
  62. Foreman J. C. Substance P and calcitonin gene-related peptide: effects on mast cells and in human skin. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1987;82(3-4):366-371.

- 
63. Brito H. O., Barbosa F. L., Reis R. C. D., et al. Evidence of substance P autocrine circuitry that involves TNF- $\alpha$ , IL-6, and PGE2 in endogenous pyrogen-induced fever. *J Neuroimmunol.* 2016;293:1-7.
  64. Morrey M. E., Sanchez-Sotelo J., Lewallen E. A., et al. Intra-articular injection of a substance P inhibitor affects gene expression in a joint contracture model. *J Cell Biochem.* 2018;119(2):1326-1336.
  65. Glaser S., Gaudio E., Renzi A., et al. Knockout of the neurokinin-1 receptor reduces cholangiocyte proliferation in bile duct-ligated mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;301(2):G297-305.
  66. Bracey N. A., Gershkovich B., Chun J., et al. Mitochondrial NLRP3 protein induces reactive oxygen species to promote Smad protein signaling and fibrosis independent from the inflammasome. *J Biol Chem.* 2014;289(28):19571-19584.
  67. Zhang Y., Lee T. C., Guillemin B., et al. Enhanced IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha release and messenger RNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibrosis or after asbestos exposure. *J Immunol.* 1993;150(9):4188-4196.
  68. Sullivan D. E., Ferris M., Pociask D., et al. Tumor necrosis factor-alpha induces transforming growth factor-beta1 expression in lung fibroblasts through the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32(4):342-349.
  69. Mattyasovszky S. G., Hofmann A., Brochhausen C., et al. The effect of the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha on human joint capsule myofibroblasts. *Arthritis research & therapy.* 2010;12(1):R4-R4.
  70. Schmidt R. F., Lang F., Heckmann M. *Immunsystem. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie.* 31. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2010. p. 503-516.
  71. Deng Y. Q., Zhao H., Ma A. L., et al. Selected Cytokines Serve as Potential Biomarkers for Predicting Liver Inflammation and Fibrosis in Chronic Hepatitis B Patients With Normal to Mildly Elevated Aminotransferases. *Medicine (Baltimore).* 2015;94(45):e2003.
  72. Kolahian S., Fernandez I. E., Eickelberg O., et al. Immune Mechanisms in Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;55(3):309-322.

- 
73. Hengartner N. E., Fiedler J., Schrezenmeier H., et al. Crucial role of IL1beta and C3a in the in vitro-response of multipotent mesenchymal stromal cells to inflammatory mediators of polytrauma. *PLoS One*. 2015;10(1):e0116772.
  74. Luckett-Chastain L. R., Cottrell M. L., Kawar B. M., et al. Interleukin (IL)-6 modulates transforming growth factor- $\beta$  receptor I and II (TGF- $\beta$ RI and II) function in epidermal keratinocytes. *Exp Dermatol*. 2017;26(8):697-704.
  75. Snelling S. J., Bas S., Puskas G. J., et al. Presence of IL-17 in synovial fluid identifies a potential inflammatory osteoarthritic phenotype. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175109.
  76. Wilke C. M., Bishop K., Fox D., et al. Deciphering the role of Th17 cells in human disease. *Trends Immunol*. 2011;32(12):603-611.
  77. Schafer S., Viswanathan S., Widjaja A. A., et al. IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis. *Nature*. 2017;552(7683):110-115.
  78. Mattyasovszky S. G., Mausbach S., Ritz U., et al. Influence of the anti-inflammatory cytokine interleukin-4 on human joint capsule myofibroblasts. *J Orthop Res*. 2017;35(6):1290-1298.
  79. Adolfsson L. Post-traumatic stiff elbow. *EFORT open reviews*. 2018;3(5):210-216.
  80. Doornberg J. N., van Duijn P. J., Linzel D., et al. Surgical treatment of intra-articular fractures of the distal part of the humerus. Functional outcome after twelve to thirty years. *J Bone Joint Surg Am*. 2007;89(7):1524-1532.
  81. Forthman C., Henket M., Ring D. C. Elbow dislocation with intra-articular fracture: the results of operative treatment without repair of the medial collateral ligament. *J Hand Surg Am*. 2007;32(8):1200-1209.
  82. Lindenhovius A. L., Jupiter J. B. The posttraumatic stiff elbow: a review of the literature. *J Hand Surg Am*. 2007;32(10):1605-1623.
  83. Hackl M., Siebenlist S. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie e.V. (DGU): Ellenbogen Erstluxation. AWMF online: AWMF-Nr. 012-034. updated: 06.07.2018. cited: 13.05.2020. Available from: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/012-034I\\_S2e\\_Ellbogen-Erstluxation\\_2019-05.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/012-034I_S2e_Ellbogen-Erstluxation_2019-05.pdf).
  84. Josefsson P. O., Nilsson B. E. Incidence of elbow dislocation. *Acta Orthop Scand*. 1986;57(6):537-538.
-

- 
85. Stoneback J. W., Owens B. D., Sykes J., et al. Incidence of elbow dislocations in the United States population. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94(3):240-245.
  86. Hildebrand K. A., Patterson S. D., King G. J. Acute elbow dislocations: simple and complex. *Orthop Clin North Am.* 1999;30(1):63-79.
  87. O'Driscoll S. W., Morrey B. F., Korinek S., et al. Elbow subluxation and dislocation. A spectrum of instability. *Clin Orthop Relat Res.* 1992(280):186-197.
  88. Fitzpatrick M. J., Diltz M., McGarry M. H., et al. A new fracture model for "terrible triad" injuries of the elbow: influence of forearm rotation on injury patterns. *J Orthop Trauma.* 2012;26(10):591-596.
  89. Mayne I. P., Wasserstein D., Modi C. S., et al. The epidemiology of closed reduction for simple elbow dislocations and the incidence of early subsequent open reduction. *J Shoulder Elbow Surg.* 2015;24(1):83-90.
  90. Hackl M., Beyer F., Wegmann K., et al. The treatment of simple elbow dislocation in adults. *Deutsches Arzteblatt international.* 2015;112(18):311-319.
  91. Iordens G. I., Van Lieshout E. M., Schep N. W., et al. Early mobilisation versus plaster immobilisation of simple elbow dislocations: results of the FuncSiE multicentre randomised clinical trial. *Br J Sports Med.* 2017;51(6):531-538.
  92. Anakwe R. E., Middleton S. D., Jenkins P. J., et al. Patient-reported outcomes after simple dislocation of the elbow. *J Bone Joint Surg Am.* 2011;93(13):1220-1226.
  93. Micic I., Kim S.-Y., Park I.-H., et al. Surgical management of unstable elbow dislocation without intra-articular fracture. *International orthopaedics.* 2009;33(4):1141-1147.
  94. Josefsson P. O., Gentz C. F., Johnell O., et al. Surgical versus non-surgical treatment of ligamentous injuries following dislocation of the elbow joint. A prospective randomized study. *J Bone Joint Surg Am.* 1987;69(4):605-608.
  95. Jeon I. H., Kim S. Y., Kim P. T. Primary ligament repair for elbow dislocation. *Keio J Med.* 2008;57(2):99-104.
  96. Hackl M., Leschinger T., Müller L. P., et al. Evidenzbasierte Behandlung der ligamentären Ellenbogenluxation. *Obere Extremität.* 2019;14(1):27-32.

- 
97. O'Driscoll SW. Clinical assessment and open and arthroscopic surgical treatment of the stiff elbow. In: Jupiter JB e. T. s. e. R., IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2006. pp. 9–19.
  98. Jones V. Conservative management of the post-traumatic stiff elbow: a physiotherapist's perspective. *Shoulder Elbow*. 2016;8(2):134-141.
  99. Veltman E. S., Doornberg J. N., Eygendaal D., et al. Static progressive versus dynamic splinting for posttraumatic elbow stiffness: a systematic review of 232 patients. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2015;135(5):613-617.
  100. Lindenhovius A. L., Doornberg J. N., Brouwer K. M., et al. A prospective randomized controlled trial of dynamic versus static progressive elbow splinting for posttraumatic elbow stiffness. *J Bone Joint Surg Am*. 2012;94(8):694-700.
  101. Chaudhry H., Bhandari M. Cochrane in CORR (®): Continuous Passive Motion Following Total Knee Arthroplasty in People With Arthritis (Review). *Clin Orthop Relat Res*. 2015;473(11):3348-3354.
  102. Higgs Z. C., Danks B. A., Sibinski M., et al. Outcomes of open arthrolysis of the elbow without post-operative passive stretching. *J Bone Joint Surg Br*. 2012;94(3):348-352.
  103. Rausch V., von Glinski A., Königshausen M., et al. Steifer posttraumatischer Ellenbogen. *Trauma und Berufskrankheit*. 2017;19(3):275-281.
  104. Viveen J., Doornberg J. N., van den Bekerom M. P. J. Manipulation Under Anesthesia as a Treatment of Posttraumatic Elbow Stiffness: Should We Really? *J Orthop Trauma*. 2018;32(12):e497-e498.
  105. Spitler C. In response. *J Orthop Trauma*. 2018;32(12):e498.
  106. Araghi A., Celli A., Adams R., et al. The outcome of examination (manipulation) under anesthesia on the stiff elbow after surgical contracture release. *J Shoulder Elbow Surg*. 2010;19(2):202-208.
  107. Duke J. B., Tessler R. H., Dell P. C. Manipulation of the stiff elbow with patient under anesthesia. *J Hand Surg Am*. 1991;16(1):19-24.
  108. Hauge A., Rofstad E. K. Antifibrotic therapy to normalize the tumor microenvironment. *Journal of translational medicine*. 2020;18(1):207-207.

- 
109. El Agha E., Kramann R., Schneider R. K., et al. Mesenchymal Stem Cells in Fibrotic Disease. *Cell Stem Cell*. 2017;21(2):166-177.
  110. Yoshida S., Ikenaga N., Liu S. B., et al. Extrahepatic platelet-derived growth factor- $\beta$ , delivered by platelets, promotes activation of hepatic stellate cells and biliary fibrosis in mice. *Gastroenterology*. 2014;147(6):1378-1392.
  111. Czaja A. J. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(10):2515-2532.
  112. Monument M. J., Hart D. A., Befus A. D., et al. The mast cell stabilizer ketotifen fumarate lessens contracture severity and myofibroblast hyperplasia: a study of a rabbit model of posttraumatic joint contractures. *J Bone Joint Surg Am*. 2010;92(6):1468-1477.
  113. Drugs for allergic rhinitis and allergic conjunctivitis. *Med Lett Drugs Ther*. 2021;63(1622):57-64.
  114. Tibbo M. E., Limberg A. K., Salib C. G., et al. Anti-fibrotic effects of the antihistamine ketotifen in a rabbit model of arthrofibrosis. *Bone Joint Res*. 2020;9(6):302-310.
  115. Hildebrand K. A., Schneider P. S., Mohtadi N. G. H., et al. PrEvention of Posttraumatic contractuRes with Ketotifen 1 (PERK 1): A Randomized Clinical Trial. *J Orthop Trauma*. 2020;34(12):e442-e448.
  116. Ademola A., Hildebrand K. A., Schneider P. S., et al. PrEvention of posttraumatic contractuRes with Ketotifen 2 (PERK 2) - protocol for a multicenter randomized clinical trial. *BMC Musculoskelet Disord*. 2020;21(1):123.
  117. Xue M., Gong S., Dai J., et al. The Treatment of Fibrosis of Joint Synovium and Frozen Shoulder by Smad4 Gene Silencing in Rats. *PLoS One*. 2016;11(6):e0158093.
  118. Piersma B., Bank R. A., Boersema M. Signaling in Fibrosis: TGF- $\beta$ , WNT, and YAP/TAZ Converge. *Front Med (Lausanne)*. 2015;2:59.
  119. Blessing W. A., Okajima S. M., Cubria M. B., et al. Intraarticular injection of relaxin-2 alleviates shoulder arthrofibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(25):12183-12192.
  120. Marshall S. A., Senadheera S. N., Parry L. J., et al. The Role of Relaxin in Normal and Abnormal Uterine Function During the Menstrual Cycle and Early Pregnancy. *Reprod Sci*. 2017;24(3):342-354.

- 
121. Samuel C. S., Lekgabe E. D., Mookerjee I. The effects of relaxin on extracellular matrix remodeling in health and fibrotic disease. *Adv Exp Med Biol.* 2007;612:88-103.
  122. Cheng J., Abdi S. COMPLICATIONS OF JOINT, TENDON, AND MUSCLE INJECTIONS. *Tech Reg Anesth Pain Manag.* 2007;11(3):141-147.
  123. Campbell S. E., Katwa L. C. Angiotensin II Stimulated Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 in Cardiac Fibroblasts and Myofibroblasts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 1997;29(7):1947-1958.
  124. Holtz J. Pathophysiology of heart failure and the renin-angiotensin-system. *Basic Res Cardiol.* 1993;88 Suppl 1:183-201.
  125. Campbell S. E., Katwa L. C. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29(7):1947-1958.
  126. Ma Z. G., Yuan Y. P., Wu H. M., et al. Cardiac fibrosis: new insights into the pathogenesis. *Int J Biol Sci.* 2018;14(12):1645-1657.
  127. Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGF $\beta$ , angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ Res.* 2010;106(11):1675-1680.
  128. Wynn T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of pathology.* 2008;214(2):199-210.
  129. Schultz J. E. J., Witt S. A., Glascock B. J., et al. TGF- $\beta$ 1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *The Journal of Clinical Investigation.* 2002;109(6):787-796.
  130. Sun Y., Zhang J., Zhang J. Q., et al. Local angiotensin II and transforming growth factor-beta1 in renal fibrosis of rats. *Hypertension.* 2000;35(5):1078-1084.
  131. Mezzano S. A., Ruiz-Ortega M., Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension.* 2001;38(3 Pt 2):635-638.
  132. Yoshiji H., Kuriyama S., Yoshii J., et al. Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology.* 2001;34(4 Pt 1):745-750.

133. Shibasaki Y., Nishiue T., Masaki H., et al. Impact of the Angiotensin II Receptor Antagonist, Losartan, on Myocardial Fibrosis in Patients with End-Stage Renal Disease: Assessment by Ultrasonic Integrated Backscatter and Biochemical Markers. *Hypertension Research*. 2005;28(10):787-795.
134. Bedair H. S., Karthikeyan T., Quintero A., et al. Angiotensin II receptor blockade administered after injury improves muscle regeneration and decreases fibrosis in normal skeletal muscle. *Am J Sports Med*. 2008;36(8):1548-1554.
135. Cabello-Verrugio C., Morales M. G., Cabrera D., et al. Angiotensin II receptor type 1 blockade decreases CTGF/CCN2-mediated damage and fibrosis in normal and dystrophic skeletal muscles. *J Cell Mol Med*. 2012;16(4):752-764.
136. Diop-Frimpong B., Chauhan V. P., Krane S., et al. Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(7):2909-2914.
137. Chauhan V. P., Martin J. D., Liu H., et al. Angiotensin inhibition enhances drug delivery and potentiates chemotherapy by decompressing tumour blood vessels. *Nat Commun*. 2013;4:2516.
138. Tawfik V. L., Quarta M., Paine P., et al. Angiotensin receptor blockade mimics the effect of exercise on recovery after orthopaedic trauma by decreasing pain and improving muscle regeneration. *J Physiol*. 2020;598(2):317-329.
139. Hadipour-Lakmehsari S., Al Mouaswas S. Reduction of pain and improved muscle biology with the administration of losartan and delayed exercise in a murine trauma model. *J Physiol*. 2020;598(4):631-632.
140. Hannelore N., Ronny K., Sabine B. 12-Monats-Prävalenz von Bluthochdruck in Deutschland. *Journal of Health Monitoring* 2(1):57–63. DOI 10.17886/RKI-GBE-2017-007. ISSN 2511-2708. Robert Koch-Institut, Berlin.
141. Langston J. R., Ramsey D. C., Skoglund K., et al. Angiotensin II blockade had no effect on range of motion after total knee arthroplasty: a retrospective review. *J Orthop Surg Res*. 2020;15(1):48.



- 
142. NC3Rs. Experimental Design Assistant Version 1.0. London. National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research. cited: 01.03.2017. Available from: <https://eda.nc3rs.org.uk>.
143. Ellwanger U. Randlist Version 1.2. Tübingen. DatInf GmbH. cited: 07.04.2017. Available from: <http://randomisation.eu/index.shtml>.
144. Gohlke P., Linz W., Scholkens B. A., et al. Cardiac and vascular effects of long-term losartan treatment in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1996;28(3):397-402.
145. Kaneko K., Susic D., Nunez E., et al. Losartan reduces cardiac mass and improves coronary flow reserve in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens*. 1996;14(5):645-653.
146. Diogo L. N., Faustino I. V., Afonso R. A., et al. Voluntary Oral Administration of Losartan in Rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2015;54(5):549-556.
147. Erhardt W. Definition, Aufgaben und Bedeutung der tierärztlichen Anästhesiologie. In: *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier*. 2. Auflage. Stuttgart: Schattauer Verlag; 2011. p. 5-14.
148. Erhardt W. Pharmaka im Rahmen der Anästhesie und der perioperativen Schmerzlinderung. In: *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier*. 2. Auflage. Stuttgart: Schattauer Verlag; 2011. p. 15-140.
149. Erhardt W. Mechanismen der Anästhesie. In: *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier*. 2. Auflage. Stuttgart: Schattauer Verlag; 2011. p. 317-348.
150. Stefan O. Cytochrome P450: Enzymfamilie mit zentraler Bedeutung. *Pharmazeutische Zeitung*. 07/2012. Eschborn; issued by Avoxa - Mediengruppe Deutscher Apotheker GmbH; for Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände e. V.; 2012.
151. Li F., Liu S., Fan C. Lentivirus-mediated ERK2 siRNA reduces joint capsule fibrosis in a rat model of post-traumatic joint contracture. *Int J Mol Sci*. 2013;14(10):20833-20844.
152. Sun Y., Li F., Fan C. Effect of pERK2 on extracellular matrix turnover of the fibrotic joint capsule in a post-traumatic joint contracture model. *Exp Ther Med*. 2016;11(2):547-552.
153. Hackbarth H., Kuppers N., Bohnet W. Euthanasia of rats with carbon dioxide--animal welfare aspects. *Lab Anim*. 2000;34(1):91-96.
-

- 
154. Trudel G., Uhthoff H. K. Contractures secondary to immobility: is the restriction articular or muscular? An experimental longitudinal study in the rat knee. *Arch Phys Med Rehabil.* 2000;81(1):6-13.
155. Efid W., Kellam P., Yeazell S., et al. An evaluation of prophylactic treatments to prevent post traumatic joint stiffness. *J Orthop Res.* 2014;32(11):1520-1524.
156. Rasband W. ImageJ Version 1.51s. Bethesda, MD. U.S. National Institutes of Health. updated: 04.05.2020. cited: 05.12.2017. Available from: <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>.
157. Lang G. Verarbeitung von hartem Gewebe. In: *Histotechnik - Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik.* Wien: SpringerWienNewYork; 2013. p. 79-83.
158. Lang G. Histologische Färbung. In: *Histotechnik - Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik.* Wien: SpringerWienNewYork; 2013. p. 169-250.
159. Bancroft J. D., Layton C. The hematoxylin and eosin. In: *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques.* 8th Edition. London: Elsevier Ltd.; 2018. p. 126-139.
160. Ando A., Hagiwara Y., Onoda Y., et al. Distribution of type A and B synoviocytes in the adhesive and shortened synovial membrane during immobilization of the knee joint in rats. *Tohoku J Exp Med.* 2010;221(2):161-168.
161. Ando A., Suda H., Hagiwara Y., et al. Remobilization does not restore immobilization-induced adhesion of capsule and restricted joint motion in rat knee joints. *Tohoku J Exp Med.* 2012;227(1):13-22.
162. Shreffler J., Huecker M. R. *Exploratory Data Analysis: Frequencies, Descriptive Statistics, Histograms, and Boxplots.* StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
163. Zhou H., Trudel G., Uhthoff H. K., et al. Range of Extension Correlates with Posterior Capsule Length after Knee Remobilization. *Med Sci Sports Exerc.* 2018;50(12):2401-2408.
164. Arraut J., Lygrisse K. A., Singh V., et al. The effect of losartan on range of motion and rates of manipulation in total knee arthroplasty: a retrospective matched cohort study. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2022.

165. Wilson C. J., Dahners L. E. An examination of the mechanism of ligament contracture. *Clin Orthop Relat Res.* 1988;227:286-291.
166. Kaneguchi A., Ozawa J., Minamimoto K., et al. A rat model of arthrofibrosis developed after anterior cruciate ligament reconstruction without rigid joint immobilization. *Connect Tissue Res.* 2021;62(3):263-276.
167. Kaneguchi A., Ozawa J., Minamimoto K., et al. Formation process of joint contracture after anterior cruciate ligament reconstruction in rats. *J Orthop Res.* 2021;39(5):1082-1092.
168. Trudel G., Laneuville O., Coletta E., et al. Quantitative and temporal differential recovery of articular and muscular limitations of knee joint contractures; results in a rat model. *J Appl Physiol (1985).* 2014;117(7):730-737.
169. Thompson R., Novikov D., Cizmic Z., et al. Arthrofibrosis After Total Knee Arthroplasty: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *Orthop Clin North Am.* 2019;50(3):269-279.
170. Cheuy V. A., Foran J. R. H., Paxton R. J., et al. Arthrofibrosis Associated With Total Knee Arthroplasty. *J Arthroplasty.* 2017;32(8):2604-2611.
171. Archunan M., Swamy G., Ramasamy A. Stiffness After Total Knee Arthroplasty: Prevalence and Treatment Outcome. *Cureus.* 2021;13(9):e18271.
172. Kaneguchi A., Ozawa J., Kawamata S., et al. Development of arthrogenic joint contracture as a result of pathological changes in remobilized rat knees. *J Orthop Res.* 2017;35(7):1414-1423.
173. Dunham C. L., Castile R. M., Chamberlain A. M., et al. The Role of Periarticular Soft Tissues in Persistent Motion Loss in a Rat Model of Posttraumatic Elbow Contracture. *J Bone Joint Surg Am.* 2019;101(5):e17.
174. David M. A., Reiter A. J., Dunham C. L., et al. Pleiotropic Effects of Simvastatin and Losartan in Preclinical Models of Post-Traumatic Elbow Contracture. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:803403.
175. Watanabe M., Hoso M., Kojima S., et al. Histopathological Changes in Joint Components in a Rat Knee Joint Contracture Model Following Mobilization. *Journal of Physical Therapy Science.* 2012;24(11):1199-1203.

- 
176. Lee S., Sakurai T., Ohsako M., et al. Tissue stiffness induced by prolonged immobilization of the rat knee joint and relevance of AGEs (pentosidine). *Connect Tissue Res.* 2010;51(6):467-477.
  177. Namba R. S., Kabo J. M., Dorey F. J., et al. Intra-articular corticosteroid reduces joint stiffness after an experimental periarticular fracture. *J Hand Surg Am.* 1992;17(6):1148-1153.
  178. Clark D. D., Weckesser E. C. The influence of triamcinolone acetonide on joint stiffness in the rat. *J Bone Joint Surg Am.* 1971;53(7):1409-1414.
  179. Ozawa J., Kaneguchi A., Tanaka R., et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib attenuates joint contracture following immobilization in rat knees. *BMC Musculoskelet Disord.* 2016;17(1):446.
  180. Kaneguchi A., Ozawa J., Yamaoka K. Anti-inflammatory Drug Dexamethasone Treatment During the Remobilization Period Improves Range of Motion in a Rat Knee Model of Joint Contracture. *Inflammation.* 2018;41(4):1409-1423.
  181. Nesterenko S., Morrey M. E., Abdel M. P., et al. New rabbit knee model of posttraumatic joint contracture: indirect capsular damage induces a severe contracture. *J Orthop Res.* 2009;27(8):1028-1032.
  182. Dunham C. L., Castile R. M., Havlioglu N., et al. Persistent motion loss after free joint mobilization in a rat model of post-traumatic elbow contracture. *J Shoulder Elbow Surg.* 2017;26(4):611-618.
  183. Xu C., Peng H., Li R., et al. Risk factors and clinical characteristics of deep knee infection in patients with intra-articular injections: A matched retrospective cohort analysis. *Semin Arthritis Rheum.* 2018;47(6):911-916.
  184. Hunter J. Subcutaneous injection technique. *Nurs Stand.* 2008;22(21):41-44.
  185. Steplewski A., Fertala J., Beredjiklian P. K., et al. Blocking collagen fibril formation in injured knees reduces flexion contracture in a rabbit model. *J Orthop Res.* 2017;35(5):1038-1046.
  186. Gao Z. Y., Wu J. X., Liu W. B., et al. Reduction of adhesion formation after knee surgery in a rat model by botulinum toxin A. *Biosci Rep.* 2017;37(2).
  187. Mulla S., Siddiqui W. J. Losartan. *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.

188. Li F., He B., Liu S., et al. Celecoxib effectively inhibits the formation of joint adhesions. *Exp Ther Med.* 2013;6(6):1507-1511.
189. Choi J., Azmat C. E. Leukotriene Receptor Antagonists. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing


Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.

190. Huang C. K., Handel N. Effects of Singulair (montelukast) treatment for capsular contracture. *Aesthet Surg J.* 2010;30(3):404-408.
191. Davies N. M., McLachlan A. J., Day R. O., et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib: a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor. *Clin Pharmacokinet.* 2000;38(3):225-242.
192. Fornalski S., McGarry M. H., Csintalan R. P., et al. Biomechanical and anatomical assessment after knee hyperextension injury. *Am J Sports Med.* 2008;36(1):80-84.
193. Majewski M., Susanne H., Klaus S. Epidemiology of athletic knee injuries: A 10-year study. *Knee.* 2006;13(3):184-188.
194. Antiemetic Agents. *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury.* Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012.
195. Sica D. A., Gehr T. W., Ghosh S. Clinical pharmacokinetics of losartan. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(8):797-814.
196. Reiter A. J., Schott H. R., Castile R. M., et al. Females and males exhibit similar functional, mechanical, and morphological outcomes in a rat model of posttraumatic elbow contracture. *J Orthop Res.* 2021;39(9):2062-2072.
197. Jeong Y., Heo S., Lee G., et al. Pre-obesity and obesity impacts on passive joint range of motion. *Ergonomics.* 2018;61(9):1223-1231.
198. Jagodzinski M., Traut P. [Surgical treatment of arthrofibrosis of the knee joint]. *Unfallchirurgie (Heidelb).* 2022;125(11):856-861.

## 10. ANHANG

### 10.1 Nutzungserklärung für Illustrationen von Anke Grünow

#### **Nutzungserklärung zur Übertragung von Illustrationen an die Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur weiteren Verwendung**

Die Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, insbesondere deren Angehörige  und Tim Mickan, erhält acht Illustrationen zur kostenfreien Nutzung. Bei Nennung der Urheberin ist die zeitlich uneingeschränkte freie Verwendung, Vervielfältigung und Veröffentlichung auch über eine Zugehörigkeit an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz hinaus den oben genannten Personen gestattet.

Die Illustrationen werden als Bilddateien im TIFF- und JPEG-Format bereitgestellt.

Es handelt sich um die folgenden Illustrationen:

- 01 Bohrung Tibia
- 02 Bohrloch Femurkondyle
- 03 Anlage Bohrloch transfemoral diaphysär
- 04 Durchschieben K-Draht
- 05 Zurückziehen Draht nach Biegung am femoralen Teil
- 06 Biegung Draht Tibia
- 07 Contracture - angles
- 08 Messung



Anke Grünow

Berlin, den 03. August 2017

## 10.2 Equipment

EQUIPMENT	Produktname Hersteller Anschrift
<b>Digitale Küchenwaage</b>	SOEHNLE 65847 KWD Roma Küchenwaage Leifheit AG Nassau, Deutschland
<b>Elektrischer Bohrer mit Bohrwelle</b>	TCM Multifunktionswerkzeug Tchibo GmbH Hamburg, Deutschland
<b>Kabellose Kleintierschermaschine</b>	AESCULAP Favorita CL Aesculap Suhl GmbH Suhl, Deutschland
<b>Mikroskop (für Detailaufnahmen)</b>	Zeiss Axioskop Carl Zeiss Microscopy GmbH Jena, Deutschland
<b>Mikroskopkamera (für Detailaufnahmen)</b>	Leica DFC420C Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Wetzlar, Deutschland
<b>Mikroskop (für Übersichtsaufnahmen)</b>	Leica MZ16A Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Wetzlar, Deutschland
<b>Mikroskopkamera (für Übersichtsaufnahmen)</b>	Leica DC480 Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Wetzlar, Germany
<b>Mobiles Röntgengerät</b>	Faxitron MX-20 Cabinet X-ray System Faxitron X-Ray LLC Lincolnshire, USA
<b>Wärmeplatte</b>	BW03 Baxter Deutschland GmbH Unterschleißheim, Deutschland

## 10.3 Medikamente

MEDIKAMENT	Produktname Hersteller Anschrift
<b>Atipamezol</b>	Alzane 5 mg/ml Zoetis Deutschland GmbH Berlin, Deutschland
<b>Fentanyl</b>	Fentanyl-Janssen 0,1 mg/2 ml Janssen-Cilag GmbH Neuss, Deutschland
<b>Flumazenil</b>	Flumazenil Hikma 0,1 mg/ml Hikma Pharma GmbH Martinsried, Deutschland
<b>Isofloran flüssig</b>	Forene AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG Wiesbaden, Deutschland
<b>Losartan</b>	Losartan 12,5 mg Winthrop Arzneimittel GmbH Frankfurt am Main, Deutschland
<b>Medetomidin</b>	Dorbene vet 1 mg/ml Zoetis Deutschland GmbH Berlin, Deutschland
<b>Midazolam</b>	Midazolam-ratiopharm 15 mg/3 ml ratiopharm GmbH Ulm, Deutschland
<b>Placebo</b>	P-Tabletten weiß Lichtenstein Winthrop Arzneimittel GmbH Frankfurt am Main, Deutschland
<b>Tramadol</b>	Tramadol-ratiopharm 100 mg ratiopharm GmbH Ulm, Deutschland



## 10.4 Reagenzien

<b>REAGENZ</b>	<b>Hersteller</b> <b>Anschrift</b>
<b>Destilliertes Wasser</b> <b>(Aqua dest.)</b>	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
<b>EDTA</b> <b>(Ethyldiamintetraessigsäure)</b>	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
<b>Formaldehydlösung 4,5 %</b> <b>(ROTI Histofix)</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe
<b>Isotone Kochsalzlösung</b> <b>(NaCl 0,9%)</b>	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
<b>TRIS</b> <b>(Trishydroxymethylaminomethan)</b>	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland

## 10.5 Verbrauchsmaterialien

<b>VERBRAUCHSMATERIAL</b>	<b>Produktname</b> <b>Hersteller</b> <b>Anschrift</b>
<b>Abdecktuch 90 x 100 cm, steril</b>	Foliodrape Protect selbstklebend Paul Hartmann AG Heidenheim, Deutschland
<b>Augenschutzsalbe, enthält Dexpanthenol</b>	Corneregel EDO Augengel 0,6 g Bausch & Lomb GmbH Berlin, Deutschland
<b>Desinfektion, Haut &amp; Schleimhaut</b>	Braunol, 7,5 % PVP-Iod-Lösung, 100 ml B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
<b>Desinfektion, Hände</b>	Desderman pure Schülke & Mayr Norderstedt, Deutschland

## ANHANG

<b>Desinfektion, medizinische Geräte</b>	Terralin liquid Schülke & Mayr Norderstedt, Germany
<b>Desinfektion, Oberflächen</b>	Incidin Wipes Dispenser N Incidin Premium Wipes Incidin Pro Ecolab Deutschland GmbH Monheim am Rhein, Deutschland
<b>Desinfektion, OP-Besteck</b>	Gigasept Instru AF Schülke & Mayr Norderstedt, Deutschland
<b>Entnahmekanüle, steril</b>	Mini-Spike B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
<b>Kanüle, gelb, steril</b>	Sterican Einmalkanüle, gelb, G30 x ½" B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
<b>Kanüle, rot, steril</b>	Sterican Mix halbstumpf, G18 x 1 ½" B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
<b>Kirschner-Draht, Ø 1,0 mm</b>	Eickemeyer - Medizintechnik für Tierärzte KG Tuttlingen, Deutschland
<b>Kompressen 7,5 x 7,5 cm, steril</b>	Gazin Mullkompressen, steril Lohmann & Rauscher GmbH & Co.KG Neuwied
<b>Nahtmaterial, resorbierbar, steril (Fasziennaht)</b>	VICRYL violett geflochten, Nadel RB1-PLUS, 4 / 0 = 1,5 Nahtmaterial, Fadenlänge 70 cm Johnson & Johnson Medical GmbH ETHICON, Norderstedt, Deutschland
<b>Nahtmaterial, nicht resorbierbar, steril (Hautnaht)</b>	ETHILON schwarz monofil, Nadel P3, 4 / 0 = 1,5 Nahtmaterial, Fadenlänge 45 cm Johnson & Johnson Medical GmbH ETHICON, Norderstedt, Deutschland

## ANHANG

<b>Nierenschale</b>	Einmal-Nierenschale Medi Bowl W. Söhngen GmbH Taunusstein, Deutschland
<b>Operationshandschuhe, Größe 7 ½, steril</b>	Sempermed Supreme Semperit Investments Asia Pte Ltd. Singapur
<b>Probenbecher zur Konservierung, steril</b>	Becher mit Schraubverschluss, Deckel gelb Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
<b>Rollenpflaster</b>	Leukosilk 5 m x 2,50 cm BSN medical GmbH Hamburg, Deutschland
<b>Skalpell, groß, steril (Fig. 10)</b> <b>Skalpell, klein, steril (Fig. 15)</b>	Standard-Einwegskalpell, steril FEATHER Safety Razor Co. Ltd. Osaka, Japan
<b>Sonde zum Spülen, steril, 70 mm lang</b>	Einmal-Knopfkanüle steril, ø 0,8 mm Interlock Medizintechnik GmbH Lensahn, Deutschland
<b>Spritze, 1 ml, steril</b> <b>Spritze, 3 ml, steril</b>	Injekt - F Luer Solo B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
<b>Spritze, 10 ml, steril</b>	BD DISCARDIT II Einmalspritze 10 ml Becton Dickinson Heidelberg, Deutschland
<b>Tupfer, steril</b>	Schlinggazetupfer, 3 Stück, 20 x 20 cm, steril Fuhrmann GmbH Much, Deutschland
<b>Waschlotion</b>	Lifosan soft B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland

## **11. DANKSAGUNG**

Hinter dieser Dissertation steckt nicht das Werk einer einzelnen Person. Darum ist es mir ein großes Anliegen zum Schluss den Menschen ein besonders großes Dankeschön auszusprechen, ohne deren Unterstützung und Motivation diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre.

An vorrangiger Stelle möchte ich meinem Betreuer für das Überlassen dieses interessanten Themas und die stets hervorragende Betreuung herzlich danken. Insbesondere gilt mein Dank für die unermüdliche fachliche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente sowie das stets offene Ohr bei der Anfertigung dieser Schrift.

Außerdem möchte ich dem ganzen Laborteam des ZOU danken, ohne deren großartige Hilfe im Forschungslabor die Durchführung der Experimente undenkbar gewesen wäre. Ebenfalls möchte ich meinen Freunden für das Korrekturlesen meiner Dissertationsschrift und Anke Grünow fürs Zurverfügungstellen der Grafiken in Abb. 12, Abb. 17 und Abb. 24 meinen herzlichsten Dank äußern. Des Weiteren bedanke ich mich sehr bei dem Zweitgutachter.

Von Herzen möchte ich meiner Frau danken. Vornehmlich bin ich ihr für ihre Geduld, für ihre Rücksichtnahme und für jede einzelne Umarmung und Aufmunterung in den schwierigen Phasen dieser Dissertation dankbar. Zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern und meinem Bruder und seiner Familie. Ohne deren uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.