

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

„Systemische Effekte von Bosentan, Nintedanib und ihrer Kombination in der Prävention und  
Therapie posttraumatischer Kniegelenkskontrakturen“-

Eine experimentelle Studie im Rattenmodell sowie die Implementierung einer neuen  
biomechanischen Messmethode

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

Vorgelegt von

Dennis Warnke  
aus Geilenkirchen

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Herr Univ.-Prof. Dr. P. Drees

Tag der Promotion: 17.02.2026

Nachnutzungslizenz: CC-BY-4.0

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>III</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VI</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2 LITERATURDISKUSSION</b> .....	<b>3</b>
2.1 Kniegelenksverletzungen .....	3
2.1.1 Einführung .....	3
2.1.2 Epidemiologie .....	3
2.1.3 Therapie einer Kniegelenksverletzung am Beispiel der Tibiakopffraktur.....	4
2.2 DIE POSTTRAUMATISCHE GELENKKONTRAKTUR.....	6
2.2.1 Einführung .....	6
2.2.2 Einteilung und Klassifikation.....	7
2.2.3 Risikofaktoren .....	9
2.2.4 Pathophysiologie .....	10
2.2.5 Therapiemöglichkeiten der PTGK des Kniegelenks.....	19
2.3 DAS EXPERIMENT .....	21
2.3.1 Bisherige pharmakotherapeutische Ansätze .....	21
2.3.2 Das Versuchsmedikament Bosentan.....	24
2.3.3 Das Versuchsmedikament Nintedanib.....	26
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>29</b>
3.1 STUDIENDESIGN .....	29
3.1.1 Aufbau der Studie.....	29
3.1.2 Abbruchkriterien.....	31
3.2 MEDIKATION .....	31
3.3 ANÄSTHESIE.....	32
3.3.1 Operative Narkose und Schmerztherapie.....	32
3.3.2 Postoperative Schmerztherapie.....	33
3.4 OPERATIVER EINGRIFF .....	33
3.4.1 Vorbereitungen .....	33
3.4.2 Ablauf der Operation.....	34
3.4.3 Euthanasie.....	37

3.5	POSTMORTALE BIOMECHANISCHE GELENKMESSUNG .....	38
3.5.1	<i>Aufbau und Funktionsweise des Arthrometers</i> .....	40
3.5.2	<i>Berechnung der Fläche unter der Kraft-Winkel-Kurve (AUC)</i> .....	42
3.5.3	<i>Durchführung des Messvorgangs und Beispielmessung</i> .....	43
3.6	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	46
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>48</b>
4.1	PERIOPERATIVE VERLAUFSKONTROLLE DES GEWICHTS UND KOMPLIKATIONEN .....	48
4.2	BIOMECHANISCHE MESSUNGEN .....	50
4.2.1	<i>Gelenkwinkel bei 35 N·mm</i> .....	51
4.2.2	<i>Arthrogene Gelenkkontraktur</i> .....	52
4.2.3	<i>Dynamische Kraftentwicklung in Abhängigkeit vom Gelenkwinkel</i> .....	56
4.2.4	<i>AUC Gesamtübersicht</i> .....	58
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>59</b>
5.1	ERGEBNISSE DER STATISCHEN ROM-MESSUNGEN .....	59
5.1.1	<i>Der Einfluss von Bosentan auf die ROM</i> .....	59
5.1.2	<i>Der Einfluss von Nintedanib auf die ROM</i> .....	62
5.1.3	<i>Der Einfluss von Bosentan+Nintedanib auf die ROM</i> .....	64
5.2	DYNAMISCHE ROM-MESSUNG .....	66
5.3	WISSENSCHAFTLICHE EINORDNUNG DER ERGEBNISSE UND METHODIK .....	69
5.4	LIMITATIONEN DES EXPERIMENTS.....	72
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b> .....	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>78</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>99</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>100</b>
10.1	MESS- UND ANALYSEGERÄTE.....	100
10.2	FLÜSSIGKEITEN .....	101
10.3	MEDIKAMENTE.....	102
10.4	OPERATIONSMATERIALIEN .....	104
10.5	SCORE-SHEET RATTEN.....	105
10.6	VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	106
<b>11</b>	<b>TABELLARISCHER LEBENS LAUF</b> .....	<b>109</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Langform</b>
3D	dreidimensional
5-LO	5-Lipoxygenase
a.p	anterior.posterior
Abb.	Abbildung
AC	arthrogene Kontraktur
AC(K)	pGnM der Kontrollgruppe
AC(G)	pGnM der eigenen Versuchsgruppe
ACLr	Anterior Cruciate Ligament reconstruction
AF	Arthrofibrose
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve
BMI	Body-Mass-Index
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
CPM	Continue Passive Motion
CT	Computertomographie
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CYP	Cytochrom P450
D	Durchmesser
DEA	Drug Enforcement Administration
DGOU	Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMA	European Medicines Agency
ERK	extracellular-signal-regulated-kinase
ET-1	Endothelin-1
EZM	extrazelluläre Matrix
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGF-R	Fibroblast Growth Factor-Receptor
g	Gramm
IL-1 $\beta$	Interleukin-1beta
IL-6	Interleukin-6

## Abkürzungsverzeichnis

---

ILDs	Interstitial Lung Diseases
IMBEI	Institut für medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik
inc	Inkrement
IPF	idiopathische pulmonale Fibrose
IQR	Interquartilsabstand
JA	Gelenkwinkel
K-Draht	Kirschner-Draht
KG	Körpergewicht
L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L-Arginin-Methyl-Ester
LOA	Lysis of adhesions
M.	Musculus
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
ml	Milliliter
mg/kg	Milligramm/Kilogramm
mm	Millimeter
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
mRss	modifizierter Rodnan skin score
MRT	Magnetresonanztomographie
MUA	Manipulation unter Anästhesie
<i>N</i>	Newton
NaCl	Natriumchloridlösung
NF-κB	Nukleärer Faktor-KappaB
NOAEL	No-Observed-Adverse-Effect-Level
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
NSCLC	Non-small-cell lung cancer
N·mm	Newtonmillimeter
N·rad	Newton · Radiant
N·°	Newton · Winkelgrad
OA	Osteoarthritis
<i>p</i>	p-Wert (statistische Signifikanz)
PAH	pulmonale arterielle Hypertonie
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
pGnM	physiologischer Gelenkwinkel bei 35 N·mm nach Myotomie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PTGK	Posttraumatische Gelenkkontraktur

## Abkürzungsverzeichnis

---

RA	Rheumatoide Arthritis
Raf	Rat fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
ROM	Range of Motion
ROS	Reactive Oxygen Species
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SP	Substanz P
SSc	Systemische Sklerose
SSc-ILDs	SSc-assoziierte interstitielle Lungenerkrankungen
Tab.	Tabelle
TARC	Translational Animal Research Center
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor-beta
TIMPs	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TKA	totale Kniegelenksprothese
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktors-alpha
U	Umfang
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glycosyltransferase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
$\alpha$ -SMA	alpha-Smooth Muscle Actin Protein
$\pi$	Die Zahl Pi

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Wundheilung und des Circulus vitiosus der Arthrofibroseentstehung.....	11
Abb. 2: Darstellung der Signaltransduktion des aktivierten ET-1-Rezeptors und der Blockade durch ET-1-Hemmer .....	15
Abb. 3: Schematische Darstellung des inhibitorischen Einflusses von Bosentan auf die Fibroblastenaktivierung .....	26
Abb. 4: Wirkmechanismus von Nintedanib auf die PDGF-, FGF- und VEGF-Rezeptoren im Kontext der Fibrose und Angiogenese.....	28
Abb. 5: Studiendesign .....	29
Abb. 6: Röntgenbildkontrolle der intraartikulären Traumainduktion .....	35
Abb. 7: Radiologische Kontrolle der K-Draht-Arthrodesese.....	37
Abb. 8: Schematische Darstellung Bewegungsradius des Kniegelenks der Ratte .....	39
Abb. 9: Darstellung des Arthrometers mit elektronischem Linearschlitten .....	41
Abb. 10: Messung des Startwinkels mittels ImageJ .....	44
Abb. 11: Bewegungsradius Versuchstier der Gruppe A.....	45
Abb. 12: Übersicht des Gewichtsverlaufs der Versuchstiere .....	48
Abb. 13: JA aller Versuchsgruppen bei 35 N·mm .....	51
Abb. 14: Darstellung der AC(G) des rechten Kniegelenks gegenüber dem pGnM des linken Kniegelenks der jeweiligen Versuchsgruppe .....	53
Abb. 15: Darstellung der AC(K) des rechten Kniegelenks gegenüber dem pGnM des linken Kniegelenks der Kontrollgruppe .....	54
Abb. 16: Übersicht der ROM des rechten Beins (A) AC(G)- und (B) AC(K)-Berechnung.....	55
Abb. 17: Darstellung der AUC bei 80°, 100°, 130° und 150° .....	56
Abb. 18: Übersicht der Gesamt-ROM aller Versuchsgruppen .....	58

## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Übersicht der vier Arthrofibrosetypen nach Shelbourne .....	8
Tab. 2: Einteilung der Schweregrade der postoperativen AF nach Kalson. ....	8
Tab. 3: Dosisrechner der Medikamente .....	32
Tab. 4: Übersicht der Mittelwerte der JAs $\pm$ Standardabweichung des linken und rechten Kniegelenks des pGnM.....	52

## 1 Einleitung

Nach einem Gelenktrauma setzt der Körper Reparaturmechanismen in Gang, um das verletzte Gewebe zu restituieren und eine regelrechte Artikulation wiederherzustellen. Insbesondere nach Frakturen, Operationen oder schweren Weichteil- und Bandverletzungen kann es in der Folge zu einer bisher unvollständig verstandenen Dysregulation physiologischer Wundheilungsprozesse kommen (1). Die überschießende Synthese proinflammatorischer und profibrotischer Zytokine, Wachstumsfaktoren und Zellen steht einer reduzierten Apoptoserate beteiligter Zellen sowie dysfunktionalen Gegenregulationsmechanismen gegenüber (1, 2). Vor allem das Zytokin *Transforming Growth Factor-beta* (TGF- $\beta$ ) sowie kontraktile Myofibroblasten wurden in der Vergangenheit als zentrale Treiber fibrotischer Umbauprozesse identifiziert (3, 4). Myofibroblasten sorgen durch eine gesteigerte Synthese von *extrazellulären Matrix* (EZM)-Komponenten, wie Kollagenen, für eine exzessive Ablagerung von Bindegewebe im Gelenk und in der Gelenkkapsel, die in einer Störung der Gelenkarchitektur und -mechanik resultiert (5). Bei den betroffenen Patienten manifestiert sich dies in einer persistierenden Limitation und Schmerzhaftigkeit der Gelenkbeweglichkeit, die zu Einschränkungen von Alltagsaktivitäten und einer erheblichen Reduktion der Lebensqualität wie auch der beruflichen Leistungsfähigkeit führen kann (6-8).

Das als *posttraumatische Gelenkkontraktur* (PTGK) bezeichnete Krankheitsbild stellt daher eine schwerwiegende und häufig unterschätzte Komplikation in der traumatologischen und orthopädischen Praxis dar. Insbesondere das Kniegelenk weist im Kontext des demografischen Wandels und der hohen biomechanischen Beanspruchung im Alltag und beim Sport eine gesteigerte Vulnerabilität gegenüber degenerativen Prozessen und Verletzungen auf. In der jüngeren Vergangenheit wurde in Deutschland eine stetige Zunahme der Implantation *totaler Kniegelenksprothesen* (TKA) im Vergleich zu den Vorjahren verzeichnet, mit aktuell 190.708 im Jahr 2024 (9). Dabei zeigte sich insbesondere, dass zunehmend jüngere Patientengruppen betroffen sind (10). Ebenso wurde in Kanada über einen Zeitraum von 17 Jahren ein signifikanter Anstieg der jährlichen Inzidenz operativer Therapien nach Kreuzbandrupturen von 40,6 pro 100.000 Einwohner im Jahr 2002/2003 auf 51,2 pro 100.000 Einwohner im Jahr 2018/2019 dokumentiert (11). Die hohen Inzidenzen der PTGK von 1,3–13% nach TKA (12-14) und 4–38% (15-17) nach Kreuzbandoperationen unterstreichen die Relevanz der Erforschung innovativer und präventiver Therapieoptionen, um die Heilung zu beschleunigen und langfristige funktionelle Einschränkungen zu vermeiden.

Trotz des Fortschritts moderner Rehabilitationsmethoden und minimalinvasiver chirurgischer Behandlungsoptionen bleibt die Therapie der PTGK des Kniegelenks eine komplexe Herausforderung. Bisherige etablierte physiotherapeutische und operative Therapieformen

fokussieren sich primär auf die Reduktion der Schmerzen und akuten Entzündung sowie die Verbesserung der Gelenkbeweglichkeit (6). Ein konträrer Effekt, der zu einer Aggravation der Entzündungsreaktion und Fibroseentstehung durch die bestehenden Therapieformen beiträgt, wurde jedoch bereits in einigen Studien beobachtet und diskutiert (6, 18, 19).

Deshalb verlagerte sich der Fokus in der PTGK-Forschung zunehmend auf die Entwicklung pharmakologischer Therapien, die durch zelluläre und genetische Modulation von Regulationsmechanismen in die Fibrogenese eingreifen. Die Mehrheit der vorausgegangenen Experimente konzentrierte sich dabei auf die Reduktion proinflammatorischer Zytokine (20-22) sowie die Inhibition isolierter Signalwege (23) und Mediatoren wie TGF- $\beta$  (24) innerhalb der komplexen Signalkaskade der PTGK. Diese Forschungsansätze konnten bislang jedoch keinen Durchbruch als nachhaltige und praktikable Therapieoption erzielen. Dennoch konnte u.a. der Einfluss des Hormons *Endothelin-1* (ET-1) sowie der Wachstumsfaktoren *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF) und *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF) auf die Fibroseentstehung nachgewiesen werden (25, 26).

Insbesondere der ET-1-Rezeptorantagonist Bosentan und der multiple Tyrosinkinase-Inhibitor Nintedanib, der die Wachstumsfaktoren PDGF, FGF und *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) kompetitiv inhibiert (27), könnten daher einen vielversprechenden pharmakologischen Ansatz in der Prävention und Therapie der PTGK darstellen. Die Übertragbarkeit der in früheren Studien (28-31) nachgewiesenen antifibrotischen Wirksamkeit von Bosentan und Nintedanib auf unterschiedliche Organfibrosen wird in dieser Arbeit erstmals im Kontext der translationalen Medizin im Hinblick auf die PTGK des Kniegelenks untersucht. Hierzu wurde auf Basis eines bereits etablierten und für diese Studie modifizierten Rattenmodells (32) eine randomisierte, kontrollierte Studie mit 52 männlichen Sprague-Dawley-Ratten konzipiert. Die Versuchstiere erhalten nach einem standardisierten Kniegelenkstrauma und einer zweiwöchigen Kniegelenksarthrodese mittels *Kirschner-Draht* (K-Draht) entweder eines der beiden genannten Versuchsmedikamente, die Kombinationstherapie oder ein Placebo über den Zeitraum der Ruhigstellung. Anschließend wird das Kniegelenk mit einem neuartigen automatisierten Arthrometer biomechanisch vermessen. Der primäre Endpunkt liegt in einer mechanisch messbaren Reduktion der *arthrogenen Kontraktur* (AC), idealerweise bis hin zur vollständigen Remission der PTGK.

Der in der vorliegenden Forschungsarbeit gewählte innovative pharmakologische Ansatz der simultanen Inhibition multipler Signalkaskaden in der Pathogenese der Fibrose könnte neben der Implementierung einer neuen biomechanischen Messmethode im Rattenmodell einen entscheidenden Meilenstein auf dem Weg zu einer präventiven und anwenderfreundlichen Therapieoption der PTGK markieren.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Kniegelenksverletzungen

#### 2.1.1 Einführung

Für die Fortbewegung des menschlichen Körpers und die Teilhabe am gesellschaftlichen und beruflichen Leben ist ein reibungsloses Zusammenspiel des Bewegungsapparates, insbesondere der Gelenke, Sehnen, Bänder und Muskeln der unteren Extremität, essenziell. Das Kniegelenk ist ein Drehscharniergelenk, das zu den Diarthrosen zählt und aus den artikulierenden Anteilen des distalen Femurs, der Patella und der proximalen Tibia gebildet wird. Diese Komponenten formen zwei Gelenke, das Femorotibialgelenk, das in einen lateralen und medialen Anteil unterteilt werden kann, sowie das Femoropatellargelenk. Beide Gelenke sind von einer gemeinsamen Gelenkkapsel umgeben (33). In Anbetracht des geringen Weichteilmantels und der erheblichen biomechanischen Belastungen, die durch das Körpergewicht und dynamische Bewegungen, wie Laufen und Springen, auf das Kniegelenk einwirken, sind die Stabilität des Gelenks und der Schutz des Gelenkknorpels von zentraler Bedeutung. Dies gewährleistet einerseits die Minimierung von Verletzungen sowie andererseits die Aufrechterhaltung einer langfristigen Funktionalität und Belastbarkeit des Gelenks. Der Bandapparat des Kniegelenks umfasst sowohl die intrakapsulären Kreuzbänder als auch die extrakapsulär gelegenen und partiell mit der Kapsel verwachsenen Kollateralbänder (33). Diese sorgen neben den Menisken, die sich auf dem tibialen Anteil der Gelenkfläche befinden und zusätzlich als „Stoßdämpfer“ den Gelenkknorpel schützen, für die Stabilisierung und den Schutz vor Luxationen (34).

Das physiologische Bewegungsausmaß des Kniegelenks ermöglicht eine Flexion von  $0^{\circ}$ – $140^{\circ}/150^{\circ}$ , eine Extension von  $0^{\circ}$ – $5^{\circ}/10^{\circ}$ , eine Außenrotation von  $30^{\circ}$ – $40^{\circ}$  und eine Innenrotation von bis zu  $10^{\circ}$  (35). Die Rotationsachse verläuft vertikal durch den medialen Tibiakondylus, wobei die im Vergleich zur Außenrotation reduzierte Innenrotation auf die Anatomie der Kreuzbänder zurückzuführen ist (35). Für die meisten alltäglichen Aktivitäten wie Treppensteigen oder Sitzen ist ein Bewegungsausmaß von  $10^{\circ}$ – $120^{\circ}$  erforderlich (36). Nach einer Verletzung kann sich infolge eines Traumas oder eines operativen Eingriffes am Kniegelenk eine PTGK als Komplikation ausbilden.

#### 2.1.2 Epidemiologie

In einer großflächigen Studie analysierten Gage et al. die Daten von 6,6 Millionen Knieverletzungen, die in dem Zeitraum von 1999 bis 2008 in den USA registriert wurden. Die

höchste Inzidenzrate wurde in der Alterskohorte der 15–24-Jährigen beobachtet, wobei nahezu 50% der Verletzungen auf Sport- und Freizeitaktivitäten zurückzuführen waren (37). Diese Altersgruppe ist im Kontext des Arbeitsmarktes besonders relevant, da Knieverletzungen in diesem Alter erhebliche langfristige gesundheitliche Folgen haben können. Kniegelenksnahe Frakturen, die mit einer Inzidenz von 3,9% (37) aller Knieverletzungen verhältnismäßig selten auftraten, betrafen absolut gesehen dennoch 258.158 Patienten, was die klinische Relevanz der Verletzung unterstreicht.

Ein ähnlicher epidemiologischer Trend wurde in Deutschland durch Schneider et al. in ihrer Studie aus dem Jahr 2016 bestätigt. In dieser Untersuchung wurden die medizinischen Abrechnungs- und Diagnosedaten von allen Mitgliedern der AOK Baden-Württemberg im Hinblick auf die Inzidenz von Knieverletzungen im Zeitraum von 2008 bis 2013 ausgewertet (38). Die Inzidenzrate kniegelenksnaher Frakturen stieg in dem erfassten Zeitraum zwischen 2008 und 2013 um 5,7% bei den Männern und um 9,7% bei den Frauen an. Im Jahr 2013 wurden bei einer Gesamtmitgliederzahl von 3,779 Millionen Menschen der AOK Baden-Württemberg 3.590 kniegelenksnahe Frakturen dokumentiert, was einer Inzidenz von 4,1% aller Knieverletzungen entspricht. Bezüglich der kniegelenksnahen Frakturen wurde kein signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied festgestellt, jedoch zeigte sich ein linearer Anstieg der Inzidenz bei Frauen ab dem 45. Lebensjahr (38).

### 2.1.3 Therapie einer Kniegelenksverletzung am Beispiel der Tibiakopffraktur

Im Folgenden soll die klinische Relevanz der PTGK als Komplikation traumatischer Kniegelenksverletzungen exemplarisch anhand der Tibiakopffraktur und der dafür 2021 erschienen Leitlinie der *Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie* (DGOU) verdeutlicht werden. Tibiakopffrakturen stellen mit einer Inzidenz von 1–2% aller Frakturen (39) eine seltene, aber klinisch bedeutsame Unterform der kniegelenksnahen Frakturen dar (40, 41). Ein Häufigkeitsgipfel tritt vor allem bei jungen Männern unter 40 Jahren infolge von Hochrasanztraumata auf, während ältere Frauen bei einem zweiten Häufigkeitsgipfel aufgrund einer häufig verminderten Knochenqualität vorwiegend durch Niedrigrasanztraumata betroffen sind (40, 42).

Die Frakturen entstehen bei Hochrasanztraumata durch eine direkte Gewalteinwirkung, während Niedrigrasanztraumata vorzugsweise im höheren Lebensalter durch eine indirekte Einwirkung und eine Kombination aus Valgus-/Varusstress, Rotation und axialer Stauchung auftreten (39). Das Schadensbild kann vielseitig sein und sowohl knöcherne als auch Weichteilstrukturen betreffen (43). In einer Studie von Aguilar et al., die 1165 Patienten mit

Tibiakopffrakturen untersuchte, lag in 95,7% der Fälle die Frakturätiologie in einem Verkehrsunfall, wobei Motorradfahrer mit 82,6% die Hauptgefährdungsgruppe darstellten (44).

Die Klassifikation der Tibiakopffraktur erfolgt im deutschsprachigen Raum nach der AO-Klassifikation, der Schatzker-Klassifikation (45) sowie der 10-Segment-Klassifikation, die der Einteilung des proximalen Tibiaplateaus dient (39). Für die Darstellung des gesamten Frakturverlaufs kann zusätzlich das 3-Säulen-Modell angewandt werden, welches das intra- und extraartikuläre Tibiaplateau in die Segmente medial, lateral und posterior unterteilt (46). Bei begleitenden Weichteilverletzungen hat sich allgemein für offene Frakturen die Klassifikation nach Gustilo und Anderson (47) etabliert, während geschlossene Frakturen nach Tscherny und Oestern klassifiziert werden (48). In bis zu 63% der Fälle treten begleitende Verletzungen des Bandapparates (49) auf, wobei insbesondere die Kreuzbänder mit einer Inzidenz von 22,5–37,3% betroffen sind (50, 51).

Bei der Versorgung von Tibiakopffrakturen sind neben der allgemeinen Anamnese der Ablauf des Unfallhergangs, die Inspektion, Palpation und Testung der peripheren Durchblutung, Motorik und Sensibilität elementar, um begleitende Gefäß-/Nervenverletzungen frühzeitig zu erkennen oder auszuschließen (39). Die diagnostische Bildgebung umfasst eine Röntgenaufnahme in zwei Ebenen sowie eine anschließende *dreidimensionale* (3D) *Computertomographie* (CT)-Rekonstruktion bei intraartikulären Frakturen (52). Beim Vorliegen einer tiefen Gelenkstufe oder einem anderen Hinweis auf eine Gelenkluxation ist neben dem apparativen Ausschluss einer traumatischen Gefäßdissektion (53) die Durchführung einer *Magnetresonanztomographie* (MRT) indiziert, um ligamentäre Begleitverletzungen zu identifizieren (54).

Die Entscheidung zwischen konservativer und operativer Therapie erfolgt in Abhängigkeit vom Frakturtyp, den Begleitverletzungen, individuellen Anforderungen an die funktionelle Belastbarkeit und Stabilität sowie von patientenspezifischen Co-Morbiditäten. Operative Verfahren umfassen primär die Refixierung mittels Platten und Schrauben (41). Insbesondere bei geriatrischen Patienten mit schlechter Knochenqualität und begleitender *Osteoarthritis* (OA) kann die TKA zusätzlich eine vielversprechende Therapieoption bieten (55). Bei schweren Begleitverletzungen, wie Gefäß-/Nervenläsionen oder offenen Frakturen, kann eine temporäre Stabilisierung mit einem Fixateur externe notwendig sein (39). Je nach Frakturtyp kann eine begleitende Arthroskopie die operative Versorgung unterstützen und resultiert laut Jiang et al. in einer besseren postoperativen Gelenkbeweglichkeit gegenüber der konventionellen offenen osteosynthetischen Frakturversorgung (56).

Das Ziel der Osteosynthese ist die übungsstabile Wiederherstellung des Kniegelenks (39). Im Anschluss erfolgt eine Phase der Teilbelastung und frühfunktionellen Physiotherapie,

unterstützt durch passive Bewegung mit einer *Continue Passive Motion-Bewegungsschiene* (CPM). Ein engmaschig überwachtes Schmerzmanagement (57) und der frühzeitige Beginn der postoperativen Rehabilitation sollten ebenso wie eine zeitnahe vollständige Wiederherstellung der Extension sowie einer Flexion von über 90° angestrebt werden (39).

In der Studie von Stevens et al. wiesen junge Patienten unter 40 Jahren, die aufgrund einer dislozierten Tibiakopffraktur nach einem Niedrigrasanztrauma operativ behandelt wurden, gute Langzeitergebnisse auf (58). Im Gegensatz dazu treten bei Hochrasanztraumata häufig Langzeitkomplikationen auf (41). Zu den häufigsten Komplikationen der Tibiakopffraktur zählen die postoperative Gonarthrose (41) sowie die PTGK (59). Darüber hinaus können weitere dauerhafte Schädigungen wie Muskelatrophien, Gelenkinkongruenzen, Bandinstabilitäten, Achsfehlstellungen und neurovaskuläre Begleitverletzungen auftreten (39). Insbesondere eine begleitende Menishektomie und bestehende Gelenkinkongruenzen nach der Operation erhöhen das Risiko für die Entwicklung einer Gonarthrose erheblich (60). Zusätzlich beeinflusst das Ausmaß der Weichteilverletzungen das Outcome negativ und muss in der Versorgung der Fraktur und Nachsorge der Patienten Beachtung finden (61).

Gemäß der Deutschen gesetzlichen Unfallversicherung resultiert unabhängig von der Therapieform, ob konservativ oder operativ, eine Tibiakopffraktur in etwa 25% der Fälle in einer derart signifikanten Beeinträchtigung der strukturellen Integrität und Funktion des Kniegelenks, dass die daraus resultierenden Unfallfolgen einen Anspruch auf Unfallrente begründen (39, 62). Die für Tibiakopffrakturen beschriebene Inzidenz der PTGK liegt bei 4–14,5%, bei Hochrasanztraumata sogar bis zu 18,5% (63-65) und stellt somit eine relevante Komplikation der Tibiakopffraktur dar, die für das behandelnde Team eine erhebliche Herausforderung in der klinischen Praxis darstellt.

## **2.2 Die posttraumatische Gelenkkontraktur**

### **2.2.1 Einführung**

Als Reaktion auf eine Fraktur mit Gelenkbeteiligung oder eine Operation aktiviert der Körper regenerative Prozesse, die eine frühzeitige Wiederherstellung der Gelenkbeweglichkeit ermöglichen sollen (66). Infolge einer bisher unvollständig verstandenen Ätiologie kann jedoch eine unkontrollierte Immunreaktion und überschießende Bindegewebsbildung im und am Gelenk hervorgerufen werden, die zu variablen Bewegungseinschränkungen führt (5). Die primäre Ursache wird in einer gestörten Entzündungskaskade der Zytokine vermutet, in der die Dysregulation von TGF- $\beta$  eine maßgebliche Rolle spielt (3). Eine persistente Aktivierung von TGF- $\beta$  resultiert in einer verstärkten Proliferation und einer prolongierten Lebensdauer von

Myofibroblasten (2, 67, 68). In der Konsequenz kommt es zu einer dysregulierten Synthese von EZM-Komponenten, was gravierende Auswirkungen auf die Gelenkbeweglichkeit und die Elastizität des umliegenden Gewebes hat (1, 5, 69-71). Prinzipiell kann fast jedes Gelenk von der PTGK betroffen sein, sie tritt jedoch gehäuft am Kniegelenk, der Schulter und dem Ellenbogen auf, wo sie umgangssprachlich unter den Bezeichnungen Kniegelenkssteife, Schultersteife (Frozen Shoulder) oder Ellenbogensteife bekannt ist (6, 72). Für die Patienten können die Konsequenzen schwerwiegend sein. Die limitierte Beweglichkeit und Entzündung führen, in Abhängigkeit vom betroffenen Gelenk, zu Schmerzen und funktionellen Beeinträchtigungen im Alltag, wie bspw. beim Gehen, Binden der Schuhe oder Ankleiden (7, 8). Diese Einschränkungen können die Lebensqualität, die berufliche Leistungsfähigkeit sowie die psychische Gesundheit der Betroffenen erheblich beeinträchtigen und weitreichende sozioökonomische Konsequenzen für die Gesellschaft nach sich ziehen (5, 6, 39).

### 2.2.2 Einteilung und Klassifikation

Das Krankheitsbild der PTGK stellt eine spezifische Subgruppe in der Ätiologie der *Arthrofibrose* (AF) dar. Die Definitionen und Klassifikationen der AF variieren in der Literatur häufig in Abhängigkeit vom betroffenen Gelenk, dem *Bewegungsmaß* (ROM) und weiteren patientenspezifischen Kriterien (6, 73). Um die Entstehung der PTGK besser zu verstehen und eine gezielte Therapie einleiten zu können, ist die anatomische Lokalisation des pathologischen Prozesses von enormer Bedeutung.

Laut Morrey et al. (74) und Pujol et al. (57) setzt sich die posttraumatische Steifheit des Gelenks aus zwei wesentlichen Komponenten zusammen: einem intraartikulären und einem extraartikulären Anteil. Intraartikuläre Kontrakturen resultieren aus einer strukturellen Veränderung des intrakapsulären Gewebes, die zu Adhäsionen, Proliferation von narbigem Bindegewebe und einem Impingement des Knochens führt (57, 75, 76). Demgegenüber kann die extraartikuläre Komponente sowohl durch eine narbige Verkürzung des Muskels als auch durch fibrotische Verwachsungen zwischen der Haut und tieferliegenden Gewebsstrukturen oder Veränderungen der Gelenkkapsel und der periartikulären Bänder verursacht werden (57, 74). Die Mischform der intra- und extraartikulären Kontraktur repräsentiert in der klinischen Praxis ein häufiges Erscheinungsbild.

Eine generellere Einteilung stellt die Differenzierung in eine residuelle und eine aktive Arthrofibrose-Form dar. Bei der aktiven Form ist eine fortwährende Entzündung des Gewebes mit progressiver Bildung der EZM, einer erhöhten Anzahl entzündungsfördernder Mediatoren und Zellen sowie positiver Rückkopplungsmechanismen zur Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses zu beobachten. Im Gegensatz dazu ist die Entzündungsreaktion bei

der residuellen AF abgeklungen. Bei dieser Form verhindern narbige Veränderungen weiterhin eine physiologische Gelenkmechanik (1). Ein potenzieller Ansatz zur zellulären Differenzierung der jeweiligen Phase könnte die Bestimmung der Konzentrationen des *Tumornekrosefaktors-alpha* (TNF- $\alpha$ ) und des *Interleukin-1beta* (IL-1 $\beta$ ) sein. Diese Marker waren in einer Untersuchung von Pan et al. bei älterem fibrotischen Lungengewebe gegenüber aktiv fibrotischen Veränderungen der Lunge nicht mehr nachweisbar (77).

Eine erste Klassifikation der PTGK des Kniegelenks wurde von Shelbourne et al. im Jahr 1996 veröffentlicht. Shelbourne definierte vier Arthrofibrosentypen (*Tabelle* (Tab.) 1) bei Patienten nach operativer *vorderer Kreuzbandrekonstruktion* (ACLR), in Abhängigkeit von der Bewegungseinschränkung gegenüber dem gesunden, kontralateralen Kniegelenk (78).

Tab. 1: Übersicht der vier Arthrofibrosentypen nach Shelbourne (78)

<b>Typ I</b>	Extensionsverlust < 10° und normale Flexion
<b>Typ II</b>	Extensionsverlust > 10° und normale Flexion
<b>Typ III</b>	Extensionsverlust > 10° und Flexionsverlust > 25°
<b>Typ IV</b>	Extensionsverlust > 10° und Flexionsverlust > 30° sowie Vorliegen einer Patella Baja

Tab. 2: Einteilung der Schweregrade der postoperativen AF nach Kalson et al. (79)

<b>Schweregrad</b>	<b>Flexion</b> (Beugedefizit)	<b>Extension</b> (Streckdefizit)
Mild	90°–100°	5°–10°
Mittel	70°–89°	11°–20°
Schwer	< 70°	> 20°

Im Jahr 2016 veröffentlichten Kalson et al. ein Konsensdokument, in dem eine internationale Übereinkunft bezüglich der Definition und Klassifikation der postoperativen AF des Kniegelenks präsentiert wurde.

In dieser Publikation wurde die AF als Weichteilfibrose beschrieben, die präoperativ nicht nachweisbar war und keiner spezifischen Ätiologie, wie beispielsweise prothetisch bedingten Ursachen oder Infektionen, zugeordnet werden konnte (79). Die postoperative ROM war in der Folge in der Flexion oder Extension eingeschränkt. Die Limitationen der Flexion und Extension wurden hierfür in drei Schweregrade (mild, mittel oder schwer) kategorisiert (Tab. 2) (79). Ungeachtet der Bemühungen von Shelbourne und Kalson et al. existiert für die PTGK des Kniegelenks bislang keine einheitlich anerkannte Klassifikation, die als Grundlage einer zielgerichteten und differenzierten Therapie dienlich ist.

### 2.2.3 Risikofaktoren

Das Auftreten einer posttraumatischen arthrofibrotischen Reaktion im Kniegelenk ist multifaktoriell bedingt (80). In der Vergangenheit konnten jedoch verschiedene Risikofaktoren für die Entstehung einer PTGK identifiziert werden. Einige dieser Faktoren können durch den Patienten aktiv beeinflusst werden, während andere entweder nicht direkt modifizierbar oder bislang noch unbekannt sind.

Die Ätiologie und der Schweregrad der Knieverletzung sind maßgebliche Faktoren in der Risikobewertung der Kontrakturstehung. Verletzungen des vorderen oder hinteren Kreuzbandes, Kniedislokationen, intraartikuläre Frakturen sowie die Immobilisation mittels externen Fixateurs erhöhen signifikant das grundlegende Risiko für die Entwicklung einer PTGK im Kniegelenk (81). Insbesondere durch die verlängerte Immobilisation des Gelenks mit einem starren Fixateur externe steigt die Wahrscheinlichkeit um 10% mit jedem zusätzlichen Tag der Anlage für die Notwendigkeit einer *Manipulation unter Anästhesie* (MUA) oder einer Quadrizepsplastik (64). Darüber hinaus erhöht sich das Risiko für die Entwicklung einer PTGK bei bilateralen Tibiakopffrakturen mit jeder zusätzlichen Woche der Fixateur-Anlage (82). Weitere signifikante Risikofaktoren stellen frühere operative Eingriffe oder Knieverletzungen (83, 84), ein verzögerter Rehabilitationsbeginn (7) sowie eine verminderte präoperative ROM dar (85).

Im Gegensatz dazu scheinen ein junges Alter (< 18 Jahre) (86), eine frühzeitige prä- und postoperative Rehabilitation (6, 86, 87) sowie die Mobilisierung des Gelenks (64) protektiv auf die Entstehung einer PTGK zu wirken. Das weibliche Geschlecht und ein erhöhter *Body-Mass-Index* (BMI) wurden in multiplen Studien als potenzielle Risikofaktoren untersucht, führten jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen, sodass sie nicht eindeutig als solche identifiziert werden konnten (83, 84, 86, 88).

### 2.2.4 Pathophysiologie

Der Begriff Fibrose beschreibt die durch einen inflammatorischen Reiz oder ein Trauma induzierte exzessive Zunahme der EZM, die aus einer gestörten Immunantwort zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem resultiert und praktisch jedes Organ betreffen kann (69, 89).

Im Kontext der PTGK führt die durch ein Trauma ausgelöste Verletzung zu Blutungen und oxidativem Stress und setzt komplexe Entzündungskaskaden in Gang, die eine verstärkte Aktivierung entzündungsfördernder Zytokine wie PDGF und TGF- $\beta$  im Gelenk bewirkt (1, 90, 91). In der akuten Phase nach der Verletzung wird das Immunsystem durch die Rekrutierung von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Mastzellen und Lymphozyten aktiviert (1, 92). Dieser Prozess verstärkt die Entzündungsreaktion und induziert durch die Anwesenheit dieser Zellen sowohl die Freisetzung profibrotischer Zytokine als auch die Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten (92). Myofibroblasten sind maßgeblich beteiligt an der Bildung der EZM, der Restitution des Gewebes und der Pathogenese der Fibrose (1, 4). Mechanische Spannungen im betroffenen und angrenzenden Gewebe sowie die Bildung *freier Sauerstoffradikale* (ROS) durch Zellschädigung und biomechanische Umbauprozesse fördern zusätzlich die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten (69, 93-96). Chronische Entzündungen infolge der anhaltenden Präsenz profibrotischer Zytokine oder rezidivierende Traumata können eine epigenetische Modifikation beteiligter Zellen und Mediatoren hervorrufen sowie eine verstärkte Expression der Rezeptoren profibrotischer Zytokine induzieren (71, 97).

Eine aus den zuvor genannten Faktoren resultierende überschießende Aktivierung und Dysregulation proinflammatorischer Zellen des Immunsystems durch Verstärkung der positiven Rückkopplungsmechanismen (*Abbildung* (Abb.) 1) oder eine unzureichende Autophagie und Apoptose dieser Zellen, profibrotischer Zytokine oder Myofibroblasten setzen in der Folge einen Circulus vitiosus in Gang. Dieser fördert die fibrotischen Umbauprozesse im Gelenk, was zur Ausbildung von Adhäsionen, Kontrakturen und Schmerzen führen kann (2, 4). Angesichts der Komplexität der Pathomechanismen und der Vielzahl an beteiligten Komponenten des Immunsystems wird im Folgenden eine Fokussierung auf die relevantesten Zelltypen, Zytokine und Mediatoren der Fibrose vorgenommen.

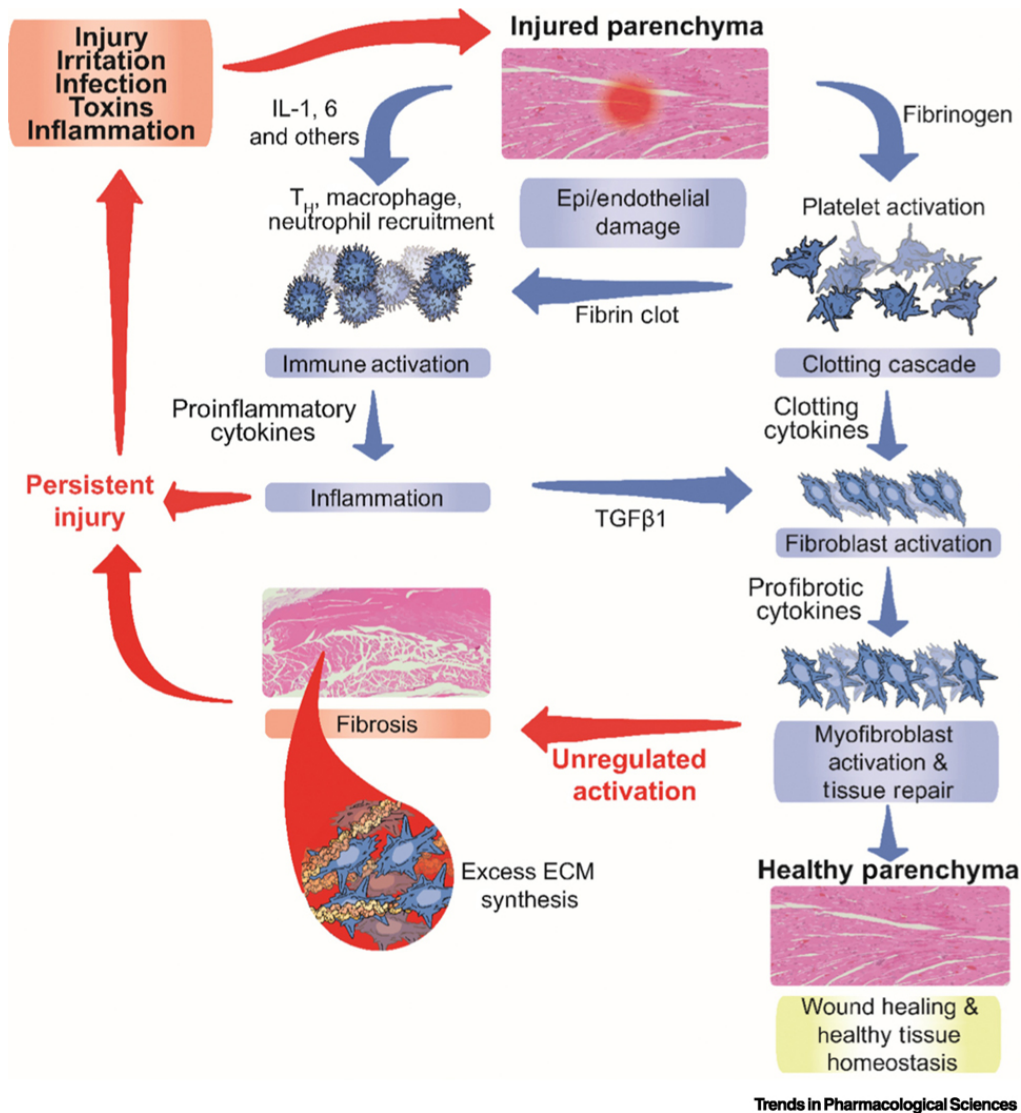


Abb. 1: Schematische Darstellung der Wundheilung und des Circulus vitiosus der Arthrofibroseentstehung (übernommen aus (98), Abb. 1)

## Myofibroblasten

Myofibroblasten nehmen sowohl im physiologischen Wundheilungsprozess als auch in der Pathogenese fibrotischer Erkrankungen eine zentrale Rolle ein (1, 4, 99). Einerseits sind Myofibroblasten in dem regenerativen Gewebereparaturprozess aufgrund ihrer spezialisierten Synthesefunktion von EZM, insbesondere in Form von Kollagen Typ I und III sowie der Ablagerung von dichtem Kollagen, von elementarer Bedeutung (100, 101). Andererseits kann die persistente und dysregulierte Aktivität von Myofibroblasten die Ausbildung von Kontrakturen fördern, die zu Funktionseinschränkungen bis hin zum vollständigen Verlust der

Organfunktion führen kann (102). Insbesondere in vitalen Organen wie dem Herzen, der Lunge, der Niere oder der Leber können die Folgen gravierend sein (103-106).

Die ursprüngliche Population der Myofibroblasten stammt in Abhängigkeit vom betroffenen Organ und dem spezifischen Mikromilieu primär aus lokalen Fibroblasten. Alternativ setzen sie sich aus unterschiedlichen Vorläuferzellen, wie Chondrozyten, glatten Muskelzellen oder Epithelzellen, zusammen (100). Die Differenzierung zu Myofibroblasten erfolgt als Reaktion auf mechanischen Stress, oder als biochemische Antwort auf die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  und *Interleukin-6* (IL-6) nach einem entzündlichen Reiz, um das geschädigte Gewebe schnell und effizient zu reparieren (100, 107).

Je nach Stadium der Wundheilung bilden sie Zell-Zell- und Zell-EZM-Kontakte aus, die eine verstärkte Proliferation, Migration und Phagozytose durch die autokrine Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und TGF- $\beta$  induzieren (101, 108, 109). Ihre besondere Fähigkeit, kontraktile Kräfte ähnlich der glatten Muskulatur auszuüben, gibt den Myofibroblasten ihren Namen und stellt das wichtigste Unterscheidungsmerkmal zu anderen Formen der Fibroblasten dar. Ferner wurde bei in-vitro-Standardkulturen beobachtet, dass alle kultivierten fibroblastischen Zellen Aktin-Myosin-Fasern, auch Stressfasern genannt, ausbilden (110). Gemäß der oben genannten Definition müssten demnach alle fibroblastischen Zellen als Myofibroblasten bezeichnet werden (110). Younesi et al. klassifizierten sie in der Folge in vivo als Proto-Myofibroblasten, da sie gegenüber hochkontraktilen Myofibroblasten über eine fehlende Integration von *alpha-Smooth Muscle Actin Protein* ( $\alpha$ -SMA) in den Aktinfilamentbündeln verfügen (110). Beide Formen sind im physiologischen Wundheilungsprozess jedoch koexistent (111).

Das  $\alpha$ -SMA-Protein wird unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  synthetisiert und fördert durch seine gesteigerte Expression die kontraktile Aktivität der Stressfasern, was in einer erhöhten Spannung innerhalb der EZM resultiert. Die vermehrte Expression von  $\alpha$ -SMA nimmt gleichfalls Einfluss auf die Entwicklung und Maturation fokaler Adhäsionen in der EZM (112). In der klinischen Diagnostik und Forschung wird  $\alpha$ -SMA daher als gängiger Marker für die Identifikation von Myofibroblasten herangezogen (113).

Folglich stellt der Myofibroblast eine funktionelle Hybridzelle dar, die sowohl fibroblastische als auch glatte Muskelzell-Eigenschaften vereint. Diese doppelte Funktionalität resultiert aus der Fähigkeit der EZM-Synthese sowie der mechanotransduktiven Kopplung kontraktile Einheiten über Integrine und fokale Adhäsionen in der Zellmembran (111, 114). Die Vernetzung der Myofibroblasten sowohl untereinander als auch mit dem Zytoskelett potenziert durch den Einfluss von  $\alpha$ -SMA die kontraktile Kräfte innerhalb der EZM (111). Die temporär erhöhte

Spannung sorgt dafür, dass es während der Wundheilung zu keiner Ruptur des Gewebes kommt (110). Eine Dysregulation des Heilungsprozesses durch große Wundflächen oder eine chronische Aktivierung der Myofibroblasten resultiert in einer anhaltenden Steifheit des betroffenen Gewebes (110).

In der finalen Phase der physiologischen Wundheilung werden Myofibroblasten durch die Aktivierung des apoptotischen Signalwegs oder durch die Re-Differenzierung in ihren ursprünglichen Zelltyp aus dem Gewebe entfernt (110). Die physiologischen und biochemischen Prozesse, die den finalen Weg eines einzelnen Myofibroblasten bestimmen und somit zur Restitution des physiologischen, Myofibroblasten-freien Zustands im Gewebe beitragen, sind bislang noch nicht vollständig verstanden (115). Epigenetische Modifikationen der Myofibroblasten scheinen als Gedächtnis der Verletzung zu dienen und können in der Folge in einer erhöhten Aktivität proinflammatorischer Zytokine und Gene resultieren (116, 117). Methylierungsprozesse der *Desoxyribonukleinsäure* (DNA) und Histone führen dabei zu einer Reduktion der Expression antifibrotischer Gene und einer verstärkten Expression profibrotischer Gene (118). Insbesondere in den ersten zwei Wochen nach einem Gewebstrauma kommt es zu einem starken Anstieg der durch TGF- $\beta$  induzierten Anzahl von Myofibroblasten (119). Unterhauser et al. beobachteten dabei eine bis zu 10-fach erhöhte Anzahl kontraktile Myofibroblasten in arthrofibrotischen Kniegelenken bei Revisionsoperationen nach ACLr gegenüber einer Kontrollgruppe ohne PTGK nach ACLr. Auffällig war zudem, dass eine dritte Kontrollgruppe, bei der eine Second-Look-Arthroskopie nach dem Eingriff durchgeführt wurde, eine ebenfalls 5-fach erhöhte Anzahl von Myofibroblasten gegenüber der Kontrollgruppe ohne sekundären Eingriff aufwies (120). Insbesondere in posttraumatisch rekonstruiertem Gewebe zurückentwickelte Myofibroblasten scheinen daher bei einem erneuten Trauma anfällig für eine frühzeitige Reaktivierung aus den Speichern residueller präfibrotischer Zellen zu sein, was das Risiko einer Dysregulation der Signalwege profibrotischer und proinflammatorischer Zytokine begünstigen könnte (121). Dies hat Auswirkungen auf zukünftige Operationen, da die unbemerkte Regression der Fibrose eine verstärkte konträre Gewebsreaktion in der Folge auslösen kann (1).

### Mastzellen und Substanz P

Mastzellen differenzieren sich aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und sind in verschiedenen Geweben des Körpers, einschließlich der Haut und der Gelenkkapsel, sowie in unmittelbarer Nachbarschaft zu Gefäßen und Nerven lokalisiert (122). Die im Zellinneren vorgefertigten Granula, die verschiedene Mediatoren enthalten, stellen einen wesentlichen Bestandteil sowohl bei der Initiierung als auch bei der Aufrechterhaltung einer

Entzündungsreaktion dar und sind potenziell eng mit der Pathogenese der Fibrose verknüpft (99). Zu den von Mastzellen produzierten und freigesetzten profibrotischen Mediatoren zählen FGF, PDGF und ET-1. Im Gegensatz dazu wird TGF- $\beta$  erst nach der Stimulation der Mastzelle synthetisiert und nicht vorab in den Granula gespeichert (123). Mastzellen unterliegen primär dem Einfluss von Neuropeptiden wie *Substanz P* (SP) und dem Calcitonin Gene Related Peptide. Diese werden während der Entzündungsreaktion durch multiple Zellen freigesetzt und induzieren die Degranulation der Mastzellmediatoren, was zur Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten sowie zu einer Intensivierung der inflammatorischen Antwort führt (124-126).

Die Expression von SP und dessen Rezeptor Neurokinin-1 wird durch die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 hochreguliert, was in der Folge das Schmerzempfinden verstärkt (127). Ferner werden durch positive Rückkopplungsmechanismen von SP antiapoptotische und proinflammatorische Mediatoren sowie profibrotische Gene hochreguliert (99). Dies resultiert in einer Zunahme der Synthese von  $\alpha$ -SMA und Kollagen Typ I (128).

Koeck et al. identifizierten in ihrer Studie eine erhöhte Dichte synovialer sensorischer Nervenfasern, die SP exprimieren, sowie eine reduzierte Anzahl antifibrotischer sympathischer Nervenfasern in von PTGK betroffenen Kniegelenken nach TKA (129). Eine Zunahme der absoluten Mastzellzahl und neuropeptidhaltiger, sensorischer Nervenfasern im Kapselgewebe konnte durch Hildebrand et al. in einem PTGK-Kaninchenmodell beobachtet werden (130). Freeman et al. zeigten, dass entzündungsassoziiertes oxidativer Stress die Erhöhung der Mastzellzahl vorantreibt, was die Proliferation von Fibroblasten und die Formierung avaskulärer Regionen fördert. Hypoxie und der daraus resultierende oxidative Stress führten in der Folge zu einer metaplastischen Umwandlung von fibrotischem Gewebe in Faserknorpel und damit zu einer heterotropen Ossifikation des Gewebes (2). Die Ergebnisse der drei Studien unterstreichen eine potenziell entscheidende Einflussnahme von Mastzellen und SP auf die Entstehung der AF.

### Makrophagen

Der Einfluss von Makrophagen auf die Pathogenese der Fibrose wird in der Forschung zunehmend als relevanter Faktor betrachtet (131). Es besteht eine enge Interaktion zwischen Makrophagen und Myofibroblasten, wobei eine Vielzahl von Hinweisen darauf schließen lässt, dass diese sich reziprok in ihrer Funktion durch die Sekretion von Chemokinen und Zytokinen

beeinflussen (132). Aktivierte Makrophagen lassen sich im Hinblick auf ihren Phänotyp und ihre Funktion in zwei Subtypen unterteilen: den M-1- und den M-2-Typ (133).

M-1-Makrophagen können unter anderem durch TGF- $\beta$  aktiviert werden und induzieren überwiegend proinflammatorische Prozesse durch die Sekretion der Zytokine PDGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6, welche die Initiierung und Aufrechterhaltung der Fibrose regulieren (131, 134). Im Gegensatz dazu produzieren M-2-Makrophagen antiinflammatorische Zytokine wie Interleukin-10 und Interleukin-13. Durch den Abbau überschüssigen Kollagens sowie die Sekretion und Regulation von *Matrix-Metalloproteinasen* (MMPs) steuern sie das Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau der EZM, was zur Verzögerung und Regression der Fibrose beitragen kann (135, 136).

## Endothelin-1

Das Peptidhormon ET-1, das vornehmlich von vaskulären Endothelzellen synthetisiert wird, ist die prädominante Isoform im menschlichen Organismus und wurde ursprünglich als vasoregulatorischer Faktor mit langanhaltender und starker vasokonstriktorischer Wirkung beschrieben (137, 138). Als Ligand der ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wirkt es primär regulatorisch auf den Blutdruck und kann sowohl eine Vasokonstriktion als auch eine Vasodilatation induzieren (139). Die Aktivierung von ET-1<sub>A</sub>-Rezeptoren durch ET-1 führt zu einer Vasokonstriktion, die Aktivierung von ET-1<sub>B</sub>-Rezeptoren zu einer Vasodilatation (Abb. 2) (140).

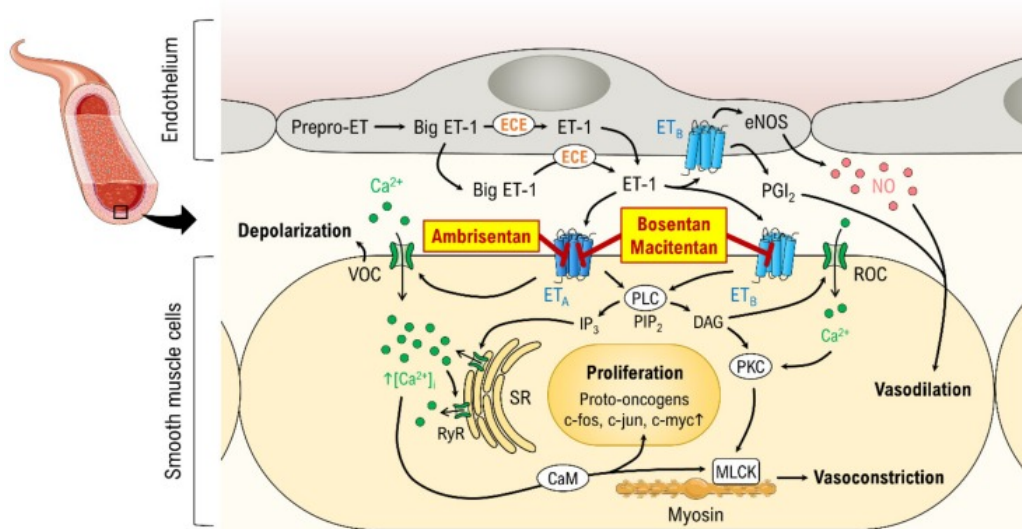


Abb. 2: Darstellung der Signaltransduktion des aktivierten ET-1-Rezeptors und der Blockade durch ET-1-Hemmer (übernommen aus (140), Abb. 1)

Darüber hinaus ist ET-1 von zentraler Bedeutung für die Wundheilung (141). Das Hormon fördert die Aktivierung und Proliferation von Fibroblasten (138, 139), die Differenzierung zu Myofibroblasten (142), die Produktion von Kollagen Typ I und III (143, 144) sowie die Expression von  $\alpha$ -SMA (142) und CTGF (145). Auf der *Ribonukleinsäure* (RNA)-Ebene reguliert ET-1 profibrotische Prozesse, indem es die Expression von Kollagen-Promotoren verstärkt und zeitgleich MMPs-Promotoren supprimiert (146). Teder et al. identifizierten eine synergistische Wirkung von ET-1 mit TGF- $\beta$ , PDGF und FGF auf profibrotische Prozesse, insbesondere durch die Induktion von Zelltransformationen und -replikationen (25). Horstmeyer et al. beobachteten zudem, dass ET-1 und TGF- $\beta$  ihre profibrotischen Effekte wechselseitig verstärkten (147). Ferner fördert ET-1 die Apoptose-Resistenz von Myofibroblasten und trägt damit maßgeblich zur Aufrechterhaltung fibrotischer Umbauprozesse in der Lunge bei (148).

### Transforming Growth Factor- $\beta$

Der Transforming Growth Factor- $\beta$  fungiert sowohl als Schlüsselmediator im physiologischen Wundheilungsprozess als auch in der Pathogenese der Fibrose (72, 149). TGF- $\beta$  wird von einer Vielzahl von Zelltypen synthetisiert, wobei insbesondere die Produktion aktivierter Fibroblasten, Myofibroblasten, Makrophagen, Mastzellen und T-Zellen für den Wundheilungsprozess und die Entstehung der Fibrose von Bedeutung ist (1, 150-152). Die Aktivierung von TGF- $\beta$  wird gleichfalls durch ein Spektrum verschiedener proinflammatorischer Zytokine, Wachstumsfaktoren und ROS vermittelt (153). ROS entstehen infolge einer Schädigung und der daraus resultierenden Hypoxie im betroffenen Gewebe (154). Demgegenüber stimuliert TGF- $\beta$  die Bildung von ROS, infolgedessen ein positiver Rückkopplungsmechanismus entsteht (155). Nach seiner Aktivierung erhöht TGF- $\beta$  autokrin die eigene Expression und verstärkt so zusätzlich seine Signalwirkung (156). In der Konsequenz steuert TGF- $\beta$  die Fibroseentstehung durch die Aktivierung und Proliferation von Myofibroblasten, die Expression von  $\alpha$ -SMA, die Synthese von EZM sowie die Inhibition des Kollagenabbaus (3, 157, 158). Zudem aktiviert es die *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase* (TIMPs), deren Wirkung die Hemmung der MMPs und folglich die Blockade des Abbaus der EZM zur Folge hat (72, 136).

In Mausmodellen konnte durch die Inaktivierung des TGF- $\beta$ -RII-Rezeptors sowie des zytoplasmatischen SMAD3-Proteins, das eine wesentliche Rolle in der Signaltransduktion des TGF- $\beta$  von der Zellmembran in den Nukleus spielt, eine Reduktion der Fibrose in Niere und Lunge beobachtet werden (159, 160). Im Gegensatz dazu führte die experimentelle Induktion

von TGF- $\beta$  in Kniegelenken von Ratten zu einer signifikant erhöhten Proliferation von Fibroblasten und einer verstärkten Synthese der EZM (72). Hildebrand et al. beobachteten gleichfalls erhöhte TGF- $\beta$ -Konzentrationen in Kniegelenkkapseln in einem PTGK-Kaninchenmodell (161).

### Platelet-Derived Growth Factor

Nach Gewebeverletzungen wird im Rahmen der Wundheilung durch geschädigte Epithelzellen, Endothelzellen und inflammatorische Zellen die Produktion und Sekretion von PDGF sowie die Induktion der Expression des PDGF-Rezeptors auf mesenchymalen Zellen angeregt (162). In der Folge fördert PDGF die Proliferation und Migration von Myofibroblasten und reguliert die Synthese- und Sekretionsaktivität von TGF- $\beta$  in Fibroblasten sowie von Matrixkomponenten (149, 163, 164).

Es wird angenommen, dass die profibrotischen Effekte von PDGF durch eine Dysregulation des Wundheilungsprozesses eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Fibrosen spielen. Zeichen et al. wiesen in arthrofibratischen Kniegelenken nach Kapselbandverletzungen eine erhöhte immunhistochemische Expression von PDGF gegenüber nicht fibrotisch veränderten Kniegelenken nach (149). Ebenso fanden Murakami et al. nach isolierten Kreuzbandverletzungen in der Synovia des Hoffa-Fettkörpers an fibrotischen Stellen immunhistochemisch nachgewiesene erhöhte PDGF-Konzentrationen. PDGF stellt somit eine weitere potenzielle Zielstruktur für die Durchbrechung des Circulus vitiosus in der Entstehung der PTGK dar (162).

### Fibroblast-Growth Factor

Die zu der Gruppe der Wachstumsfaktoren zählende Familie des FGF gehört mit bisher 22 bekannten Subtypen zu den vielfältigsten Zytokinen im menschlichen Organismus (165). Neben regulatorischen Einflüssen auf zelluläre Funktionen wie Wachstum, Proliferation, Differenzierung und Apoptose (165-167) spielt FGF eine zentrale Rolle in der Restitution von geschädigtem Gewebe, der Angiogenese (168) sowie Stoffwechsel- und Entzündungsprozessen (165). Die 22 Subtypen werden gemäß ihrer Homologie und Phylogenie (165, 169) in fünf parakrine und eine endokrine Subfamilie eingeteilt (170). Mit Ausnahme des Universalliganden FGF-1 variiert die Affektivität zu den fünf *FGF-Rezeptoren* (FGF-R) ebenso wie die Expression und Distribution der einzelnen Subtypen in den jeweiligen Organsystemen des Menschen (168). Eine erhöhte Konzentration von FGF-1 kann zu einer

Intensivierung der Entzündungsreaktion führen (171) und wurde in der Synovia arthritischer Kniegelenke nachgewiesen (172). Zudem induziert FGF-1 die verstärkte Produktion und Aktivierung von IL-2 und des *nukleären Faktors KappaB* (NF- $\kappa$ B) in T-Zellen (173). In einer Studie zur Einflussnahme von FGF auf die Pathogenese der *idiopathischen pulmonalen Fibrose* (IPF) an humanen Lungenfibroblasten konnten eine verstärkte Aktivierung der FGF-1/FGF-R-Signalkaskade sowie die Expression von FGF-1 und FGF-R 1–4 beobachtet werden, die eine Progression der Fibrose durch die Migration von Fibroblasten und eine erhöhte Aktivität des *Mitogen-aktivierten-Proteinkinase* (MAPK)-Signalwegs begünstigen könnte. Die therapeutische Gabe von FGF-1 und Heparin führte in der Folge zu einer Reduktion der Kollagenproduktion und Apoptose der IPF-Lungenfibroblasten, was auf eine aberrante FGF-1/FGF-R-Signaltransduktion und damit eine zentrale Einflussnahme von FGF-1 in der Pathogenese der IPF hinweisen könnte (174). Ein konträrer therapeutischer Effekt auf die TGF- $\beta$ 1-induzierte pulmonale Fibrose konnte in einem Rattenmodell durch die Inhibition der Myofibroblasten-Differenzierung, Regulation der TGF- $\beta$ 1-Signaltransduktion sowie FGF-R1-Expression durch FGF-1 aufgezeigt werden (175). Die Resultate vorangegangener Studien verdeutlichen, dass einzelne Subtypen des FGFs in Abhängigkeit von den involvierten Signalwegen, der betroffenen Zelle oder Rezeptoren pro- oder antifibrotische Effekte ausüben können (165). Dennoch scheint der FGF/FGF-R-Signalweg in entzündlichen Prozessen des Körpers (165) und der Pathogenese der Fibrose einzelner Organe wie der Lunge nachweislich von Bedeutung zu sein (176, 177).

### Connective-Tissue Growth Factor

CTGF nimmt als eines von Fibroblasten, Tumor- und Muskelzellen (178) in der EZM produziertes Matrixprotein eine wesentliche Rolle in der Interaktion mit Chemokinen, Integrinen, Wachstumsfaktoren (179) und dem FGF-R (180) ein. Im Detail reguliert CTGF verschiedene Prozesse der Zelladhäsion, –proliferation, –migration und –differenzierung (26, 181). Während der Wundheilung kommt es zu einer verstärkten Expression von CTGF, die im physiologischen Verlauf des Heilungsprozesses wieder inhibiert wird (182). Eine erhöhte Konzentration und Aktivierung von CTGF kann jedoch die Produktion und Akkumulation profibrotischer EZM-Proteine (183) sowie die Aktivierung und Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten (184) fördern, die in einer Schädigung des betroffenen Gewebes und der Entstehung einer Fibrose resultieren können. Abreu et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass CTGF im extrazellulären Raum das Zytokin TGF- $\beta$  durch die direkte Bindung mit ihm aktivierte (185, 186). Darüber hinaus führte in einem Mausmodell die isolierte Expression von CTGF in Fibroblasten zu einer Gewebsfibrose der Haut, Lunge und Niere, die durch die Zugabe von

TGF- $\beta$  zu einer gesteigerten Induktion des CTGF-Promotors führte (26). Beide genannten Studien unterstreichen, dass der dysregulierte reziproke Einfluss von TGF- $\beta$  und CTGF das Risiko der Fibroseentstehung zusätzlich erhöhen könnte. Eine pharmakologische Inhibition von CTGF könnte daher sowohl die gesteigerte EZM-Produktion als auch die Aktivierung von TGF- $\beta$  und von Myofibroblasten reduzieren und in der Folge die Progression der PTGK verlangsamen.

### 2.2.5 Therapiemöglichkeiten der PTGK des Kniegelenks

Infolge der hohen biomechanischen Beanspruchung weist das Kniegelenk eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber Verletzungen und der nachfolgenden Entwicklung einer PTGK auf. Die in Kapitel 1 und 2.1.3 aufgeführten hohen Inzidenzen der PTGK nach TKA, ACLr und Tibiakopffrakturen sowie die daraus abgeleitete klinische Relevanz, bedingt durch Einschränkungen im Alltag (187), und die für die Betroffenen und die Gesellschaft verbundenen sozioökonomischen Aspekte (38, 39) haben die medizinische Forschung zu der Entwicklung diverser Behandlungsansätze veranlasst.

Bedeutsam für die frühzeitige Diagnosestellung und Therapieeinleitung ist die regelmäßige Follow-up-Kontrolle der ROM des Patienten nach Verletzungen oder Operationen (6). Die nachfolgende Wahl der adäquaten Behandlungsoption sollte auf Grundlage der Ätiologie und Lokalisation der PTGK getroffen werden (6). Bei frühzeitiger Diagnosestellung besteht laut Mauro und Noyes et al. innerhalb der ersten drei postoperativen Monate mit einer intensiven Physiotherapie, Extensionschienenversorgung und oraler Kortikosteroidgabe in über 60% der Fälle die Möglichkeit der erfolgreichen konservativen Therapie ohne den Einsatz operativer Verfahren (188, 189). Der Einsatz einer Extensionsschiene bietet laut der Studie von Noyes et al. nur innerhalb der ersten 8–12 Wochen bei einem Extensionsverlust bis 10° einen Vorteil und sollte bei einer verminderten Streckung von > 12° nicht mehr zum Einsatz kommen (189). Zu den weiteren konservativen Therapieoptionen zählt die Anwendung der CPM-Schiene, die in der Frührehabilitation begleitend eingesetzt werden kann. Der Einsatz dieser motorisierten Bewegungsschiene wird in der Forschung jedoch kontrovers diskutiert. Haller et al. beobachteten in ihrer Studie mit 186 Patienten mit Tibiaplateaufrakturen ein signifikant reduziertes Risiko der Entwicklung einer PTGK durch die Anwendung der CPM (64). Barei et al. konstatierten in ihrer Studie zu Komplikationen in der Frakturversorgung von durch Hochrasanztraumata verursachten bikondylären Tibiakopffrakturen gleichfalls, dass eine routinemäßige Anwendung der CPM-Schiene das Risiko der PTGK signifikant reduziert (190). Demgegenüber zeigt der Einsatz der CPM im Rahmen der postoperativen Nachsorge nach TKA bei 104 Patienten in der Studie von Maniar et al. keine signifikante Verbesserung der

ROM (191). In einer weiteren prospektiv randomisierten Studie konnten Hill et al. in der postoperativen sechsmonatigen Kurzzeitnachsorge nach intraartikulären Frakturen des Kniegelenks bei 40 Patienten ebenfalls keinen signifikanten Vorteil des Einsatzes der CPM-Schiene beobachten (192).

Die MUA stellt bei ausbleibendem Erfolg konservativer Maßnahmen für ausgewählte Patienten innerhalb der ersten drei postoperativen Monate eine potenzielle Behandlungsoption dar (64, 193). Manche Autoren stellen den isolierten Nutzen und Einsatz der MUA aufgrund der Nutzen-Risiko-Abwägung jedoch in Frage (57, 194). Vorteile der MUA stellen die geringste Invasivität aller invasiven Verfahren und die nachgewiesene Steigerung der ROM dar. Nachteil der Therapie ist jedoch die fehlende Visualisierung der fibrotischen Gewebsstrukturen während des Eingriffs (195) und ein daraus resultierendes erhöhtes Risiko von Verletzungen wie intraoperativen Frakturen, Hämarthrosen, heterotroper Ossifikation, postoperativer Vernarbung sowie Nerven- und Knorpelschäden (73, 196).

Operative Verfahren stellen ab dem dritten postoperativen Monat bei persistierender Limitation der ROM ergänzende Therapieoptionen dar. Diese umfassen die minimalinvasive *arthroskopische Adhäsiolelyse* (LOA) oder die offene Quadrizepsplastik zur Behandlung einer extraartikulären Fibrose (193, 196). Das minimalinvasive Verfahren der LOA stellt dabei das am häufigsten eingesetzte invasive Therapieverfahren dar (15, 57) und zeigte insbesondere im postoperativen Zeitraum von drei bis sechs Monaten in Kombination mit der MUA sehr gute Ergebnisse im Hinblick auf die Steigerung der ROM (59, 196). Vorzüge des Verfahrens bieten die gute Visualisierung und die Option der Lösung intraartikulärer Adhäsionen, die Entfernung freier Gelenkkörper, die Arthrolyse bei Verkürzung der Gelenkkapsel, das verminderte Risiko von Wundinfektionen sowie eine schnellere Mobilität und Rehabilitation (195, 197). Zeitgleich stellt es ein anspruchsvolles Operationsverfahren für den Operateur dar (195), der arthroskopische Zugangsweg kann durch die Limitation der ROM erschwert sein und extraartikuläre Fibrosierungen können durch die Operation nicht begleitend gelöst werden (197). In Kombination mit der MUA existiert zudem das Risiko der Entwicklung von Hämarthrosen, Infektionen, Embolien, iatrogenen Frakturen und Knorpelschäden (187, 197). Nach Durchführung jedes Eingriffs sollte daher stets ein nachfolgendes strenges postoperatives Rehabilitationsprogramm durchgeführt werden (59). Je länger die PTGK andauert, desto geringfügiger ist die Verbesserung der ROM und das funktionelle Outcome, weshalb chronisch Betroffene vermutlich weniger von dem Verfahren profitieren (187).

Die Quadrizepsplastik stellt eine bedeutsame zusätzliche Therapieoption bei extraartikulärer Beteiligung der PTGK mit einem Flexionsdefizit dar (57, 59). Obgleich die Quadrizepsplastik im direkten Vergleich zur MUA und LOA die umfangreichste Verbesserung der ROM bietet

(195, 198), wird sie dennoch aufgrund ihrer hohen Invasivität und hohen Morbidität nur als Ultima Ratio angewendet (199).

Bei der PTGK kommt es häufig zu einem Streckdefizit und einer Verkürzung der hinteren Gelenkkapsel, weshalb die offene Arthrolyse aufgrund des arthroskopisch schwierigen Zugangswegs zu der posterioren Gelenkkapsel notwendig sein kann (73). Alle genannten invasiven Therapieoptionen tragen das Risiko, infolge des erneuten Gewebstraumas eine intensivierete Entzündungsreaktion des Körpers und damit eine langanhaltende Reaktivierung und Aggravation der PTGK zu induzieren (1, 200). Der aktuelle Forschungsstand offenbart, dass multiple Behandlungsstrategien der PTGK existieren, die ihre Berechtigung in der klinischen Praxis haben. Jedoch sind die eingesetzten Verfahren mit einer Vielzahl von Komplikationen, zusätzlichen operativen Eingriffen sowie einem erhöhten Risiko für eine verstärkte Entzündungsreaktion und Reaktivierung der PTGK assoziiert. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Entwicklung präventiver nicht-invasiver Therapieoptionen.

## 2.3 Das Experiment

### 2.3.1 Bisherige pharmakotherapeutische Ansätze

Das vorausgegangene Kapitel verdeutlicht, dass die nach Traumata oder Operationen auftretende Gelenksteife des Kniegelenks eine der häufigsten Komplikationen in der traumatologischen und orthopädischen Praxis darstellt, für die bisher keine konsensbasierte Behandlungsstrategie existiert (201). Physiotherapeutische und chirurgische Therapieoptionen verbessern häufig die ROM. Dennoch konstatierten Kaneguchi und Millet et al., dass bisherige konservative (6, 18, 19) und operative (1, 202) Behandlungsansätze eine intensivierete Inflammationsreaktion hervorrufen können, die die Fibrose aggraviert und in der Konsequenz negative Auswirkungen auf die Gelenkbeweglichkeit hat.

In der klinischen Praxis werden daher häufig begleitend zu den im letzten Kapitel genannten interventionellen Verfahren pharmakologische Therapien mit *Nichtsteroidalen Antirheumatika* (NSAR) und Glukokortikoiden zur Analgesie und Suppression von Entzündungsprozessen in der postoperativen Rehabilitation und Behandlung der PTGK eingesetzt. Diese haben bisher jedoch unzureichende Erfolge in der Steigerung der ROM erzielt.

NSAR wie Aspirin wirken antiinflammatorisch und analgetisch durch die Inhibition der Enzyme *Cyclooxygenase-1* (COX-1) und *Cyclooxygenase-2* (COX-2) (203). Obwohl bisher keine Forschungsarbeit einen signifikanten antifibrotischen Effekt belegen konnte (204), werden NSAR häufig bei Patienten mit PTGK verschrieben. Im Tiermodell der Leberfibrose zeigte

Aspirin eine Reduktion der Konzentration profibrotischer Mediatoren und damit eine Abschwächung der Fibroseprogression (205). Salmons et al. konstatierten in ihrer Studie ein reduziertes Risiko für die PTGK und MUA bei perioperativer Gabe von NSAR nach TKA in einem 12-wöchigen postoperativen Untersuchungszeitraum (206). Aufgrund ihres langfristigen ungünstigen Nebenwirkungsprofils, das eine Zunahme des Risikos der Entstehung von Herzinsuffizienz, Schlaganfall sowie toxischen nephrologischen und gastrointestinalen Effekten umfasst, sollten NSAR insbesondere bei geriatrischen Patienten nur als akute analgetische Behandlungsoption in den frühen Stadien der PTGK eingesetzt werden (207).

Glukokortikoide wie Prednisolon oder Dexamethason gehören neben NSAR zu den weiteren häufig eingesetzten Pharmaka in der symptomatischen Therapie der PTGK (1). Glukokortikoide reduzieren dabei primär die Symptome, indem sie proinflammatorische Zytokine und Mediatoren herunterregulieren (208). Sowohl die orale als auch die intraartikuläre Gabe zeigten in klinischen Studien eine Reduktion von Schulter- und Knieschmerzen, wobei die intraartikuläre Applikation aufgrund der geringeren systemischen Exposition und der höheren lokalen Konzentration im Zielgewebe überlegene Resultate erzielte (209, 210). Hinsichtlich einer signifikanten Steigerung der ROM sind die in der Literatur berichteten Ergebnisse jedoch heterogen (211, 212).

In Folge der unzureichenden antifibrotischen Wirksamkeit der zuvor beschriebenen NSAR und Glukokortikoide konzentrierte sich die Forschung verstärkt auf die Entwicklung neuer präventiver pharmakologischer Strategien, um der Entstehung einer PTGK zu verhindern, oder deren Ausprägung und Progression zu minimieren. Eine präventive medikamentöse Prophylaxe könnte die durch invasive Eingriffe bedingte verlängerte Morbidität der Patienten, die mit Funktionseinschränkungen, Schmerzen und postoperativen Komplikationen verbunden ist, vermutlich signifikant reduzieren. Darüber hinaus würden verkürzte Ausfallzeiten und niedrigere Gesundheitskosten den sozioökonomischen Einfluss auf die Gesellschaft verringern (213).

Ein zentraler therapeutischer Ansatzpunkt ist die Modulation der von Usher et al. beschriebenen Dysregulation proinflammatorischer und profibrotischer Zytokine und Wachstumsfaktoren, insbesondere TGF- $\beta$ , PDGF und IL-1 $\beta$ , die eine gesteigerte und ungerichtete Kollagenproduktion fördern und letztlich zu einer Fibrose führen können (1). Aktuelle Forschungstrends legten den Fokus zunehmend auf den modulatorischen Eingriff in die komplexen Regulationsmechanismen der Zytokine und Mediatoren, die die Aktivität von Myofibroblasten beeinflussen, welche als Hauptverursacher der überschießenden Kollagenproduktion gelten (vgl. Kapitel 2.2.3). Bei fibrotischen Erkrankungen anderer Organe wie der Lunge (214), dem Herzen (215), oder der Niere (216), konnten zahlreiche bedeutsame

pathophysiologische Erkenntnisse gewonnen und Pharmakotherapien entwickelt werden, deren Übertragbarkeit es auf die Pathogenese der PTGK im Rahmen der translationalen Medizin zukünftig zu prüfen gilt. Im Folgenden werden exemplarisch ausgewählte Forschungsansätze der medikamentösen Therapie der PTGK dargestellt.

Wang et al. untersuchten in ihrer Studie den Effekt der wöchentlichen intraartikulären Injektion von Hyaluronsäure in das Kniegelenk nach Trauma und Immobilisation im Kaninchenmodell (217). Hyaluronsäure, ein Polysaccharid und wesentlicher Bestandteil der Synovialflüssigkeit in Diarthrosen, spielt eine wesentliche Rolle bei der Gelenkschmierung und strukturellen Unterstützung bei Gelenkbelastung (98). Sie fördert die Zellmigration von Immunzellen, unterstützt Zellen des Matrix-Remodelings in der Wundheilung (98), reguliert nachgelagerte TGF- $\beta$ -abhängige Signalwege (218) und wird durch die Reduktion der Reibung des Gelenkknorpels häufig in der Prävention und Behandlung der OA eingesetzt (219, 220). In der Studie von Wang et al. führte die Hyaluronsäuretherapie nach 8 Wochen im Vergleich zum Placebo zu einer signifikanten Verbesserung der ROM sowie zu einer Reduktion von Adhäsionen und Kollagen im Gelenk (217). Ferner konstatierte Rutjes et al. in ihrer durchgeführten Metaanalyse jedoch, dass die Applikation von Hyaluronsäure bei symptomatischen Patienten mit OA gleichfalls in einer Aggravation der Entzündungsreaktion resultieren kann (221). Die Wirksamkeit von Hyaluronsäure, insbesondere bei akuten Entzündungsprozessen im Gelenk, bleibt daher umstritten und bedarf weiterer Forschungsarbeiten (222).

Dudakovic et al. testeten den Einfluss der täglichen intraperitonealen Applikation von Adiponektin auf die Entwicklung der PTGK im Mausmodell sowie den Effekt des Hormons auf humane Fibroblasten, die aus dem Kniegelenk von an PTGK erkrankten Patienten isoliert wurden (223). Adiponektin, ein von Adipozyten sezerniertes Hormon, besitzt pleiotrope Eigenschaften, einschließlich antiinflammatorischer, antiapoptotischer und antifibrotischer Effekte, die nahezu alle Organsysteme des menschlichen Körpers betreffen (224). Dudakovic et al. beobachteten, dass die durch TGF- $\beta$ 1 induzierte Kollagenablagerung in primären humanen Kniefibroblasten durch Adiponektin reduziert wurde. Zudem fanden sie eine Verringerung der *messenger-RNA* (mRNA) und des Proteinspiegels von  $\alpha$ -SMA, dem zentralen Marker von Myofibroblasten (vgl. Kapitel 2.2.3). Die Applikation von 5 Milligramm/Kilogramm (mg/kg) des Hormons führte bei Mäusen, die über einen Zeitraum von vier Wochen immobilisiert und anschließend vier Wochen remobilisiert wurden, zu einer signifikanten Verbesserung der ROM im Vergleich zur Placebogruppe (223).

Losartan ist ein kompetitiver Antagonist des Angiotensin-II-Rezeptors, der eine zentrale Rolle in der Regulation des Blutdrucks im Kontext des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems spielt

(225). Klinisch ist Losartan für die Behandlung der arteriellen Hypertonie zugelassen, wobei sein antifibrotisches Potential in multiplen Organen wie dem Herzen (226), der Leber (227) und der Lunge (228) in Tiermodellen nachgewiesen wurde. Seine antifibrotische Wirkung entfaltet Losartan primär durch die Hemmung der durch Angiotensin-II induzierten verstärkten Produktion von TGF- $\beta$  in kardialen Fibroblasten (229) sowie durch die Inhibition der Proliferation und Aktivierung von Myofibroblasten (230). Darüber hinaus konnte eine durch Losartan verursachte Blockade der Kollagen Typ I-Synthese in kardialen Myofibroblasten bei Patienten mit terminalen Nierenerkrankungen beobachtet werden (231). In Studien von Baranowski und Wegner et al., die die Wirkung von Losartan auf die PTGK des Kniegelenks nach Trauma, Immobilisation und Remobilisation im Rattenmodell untersuchten, wurden sowohl eine signifikante Reduktion der Anzahl der Myofibroblasten als auch eine verminderte Genexpression von TGF- $\beta$ 1, IL-6 und CTGF nachgewiesen (23, 232). Zudem zeigte sich eine tendenzielle Abnahme der Kollagenablagerung in den ersten vier Wochen. Im Hinblick auf die Morphologie und Länge der Gelenkkapsel sowie die Verbesserung der ROM ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen (23, 232).

Ogleich Losartan in verschiedenen Organsystemen eine antifibrotische therapeutische Wirksamkeit demonstrierte, konnte am Kniegelenk in der Studie von Wegner et al. kein hinreichender Effekt und damit kein signifikanter Durchbruch in der Prävention und Therapie der PTGK erzielt werden (232). Die Ergebnisse der Studien von Wang und Dudakovic et al. erscheinen vielversprechend, doch könnte die eingesetzte Applikationstechnik eine Herausforderung für die Implementierung in der klinischen Praxis darstellen. Regelmäßige intraartikuläre Injektionen sind mit einem erhöhten Risiko für Komplikationen wie Schmerzen, Blutungen und Infektionen assoziiert (233). Darüber hinaus stellt sie sowohl für die Patienten als auch für das Klinikpersonal einen erheblichen Aufwand dar (234).

### 2.3.2 Das Versuchsmedikament Bosentan

Einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz zur präventiven Behandlung der PTGK könnte die Anwendung des Versuchsmedikaments Bosentan bieten. Der Wirkstoff Bosentan wird in der Behandlung der *pulmonalen arteriellen Hypertonie* (PAH) sowie zur Reduktion neuer digitaler Ulzerationen bei Patienten mit *systemischer Sklerose* (SSc) eingesetzt (235). Das Medikament wird zweimal täglich, morgens und abends, oral eingenommen und entfaltet seine Wirkung systemisch im gesamten Organismus. Zu den relevanten *unerwünschten Arzneimittelwirkungen* (UAWs) zählen ein dosisabhängiger, temporärer Anstieg der Lebertransaminasen in den ersten 26 Wochen sowie eine dosisabhängige, nicht progressive Erniedrigung des Hämoglobinwertes (235).

Seine Wirkung entfaltet Bosentan durch die duale, spezifische und kompetitive Antagonisierung der Endothelin-1-Rezeptoren, bei denen es mit dem Peptidhormon ET-1 um die Bindungsstellen der ET-1<sub>A</sub>- und ET-1<sub>B</sub>-Rezeptoren konkurriert (235, 236). ET-1 spielt eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Fibrose, wie in Kapitel 2.2.4 bereits umfassend dargelegt wurde. Die ET-1<sub>A</sub>- und ET-1<sub>B</sub>-Rezeptoren sind vornehmlich auf vaskulären glatten Muskelzellen und Endothelzellen lokalisiert (237). Katwa et al. wiesen darüber hinaus die in-vitro Präsenz von ET-1<sub>A</sub> und ET-1<sub>B</sub> Rezeptoren mit einer leichten Dominanz von ET-1<sub>B</sub> auf der Oberfläche isolierter kardialer Fibroblasten bei Ratten nach, was eine potenzielle direkte Modulation von ET-1 auf die Fibroblastenfunktion ermöglichen könnte (238).

TGF- $\beta$  zählt zu den potentesten Regulatoren von ET-1 und nimmt als Mediator eine Schlüsselrolle in der Aktivierung von Myofibroblasten ein (vgl. Kapitel 2.3.3). Dabei induziert TGF- $\beta$  die Expression von ET-1 durch die transkriptionelle Regulation des ET-1-Promotorgens (239) und fördert die Freisetzung von ET-1 in vaskulären glatten Muskelzellen (240), kardialen Zellen (241) und Endothelzellen (239). Lagares et al. stellten in ihrer Untersuchung der TGF- $\beta$ 1/ET-1-Achse und deren Einfluss auf die Wundheilung der durch Bleomycin induzierten dermalen Fibrose in Mäusen eine Abhängigkeit der Expression profibrotischer Gene von TGF- $\beta$ 1 durch ET-1 fest, was auf eine reziproke Beeinflussung der beiden Signalwege hinweist (141). Bosentan inhibiert die profibrotischen Effekte von TGF- $\beta$  und moduliert die zugehörige Signaltransduktion. Im Detail fördert Bosentan die Erhöhung der Konzentration des zu der SMAD-Proteinfamilie gehörenden intrazellulären Signalmoleküls SMAD6, das eine inhibitorische Wirkung auf die profibrotische Aktivität von TGF- $\beta$  ausübt (236). In kardialen Fibroblasten von Ratten zeigte sich zudem eine Reduktion des profibrotischen SMAD4-Proteins und des für die Aktivierung relevanten SMAD-Ankerproteins auf ein normwertiges Niveau (242). Darüber hinaus hemmt Bosentan die Fibroblastenaktivierung durch ET-1 sowohl durch die Reduktion der Expression von CTGF als auch durch die Inhibition von NF- $\kappa$ B (Abb. 3) (236). Der NF- $\kappa$ B ist Teil einer DNA-bindenden Proteinfamilie, die durch die Regulation der Transkription proinflammatorischer Gene eine essenzielle Funktion bei Immun- und Entzündungsreaktionen ausübt (243, 244). Die Studie von Muller et al. zeigte, dass die Gabe von Bosentan zu einer verminderten Expression von nF- $\kappa$ B in einem Rattenmodell mit Angiotensin-II-induzierter Hypertonie führte, was sowohl eine reduzierte Aktivierung von Fibroblasten als auch eine generelle Abnahme der Fibrose zur Folge hatte (245). Finsens et al. konnten zusätzlich eine signifikante Reduktion der Anzahl von Integrinen, Adhäsionen und inflammatorischen Zytokinen durch die Bosentangebe bei eosinophilen Lungenentzündungen beobachten (246). In einer Untersuchung von Raghu et al. zur Behandlung der IPF führte die selektive Inhibition des ET-1<sub>A</sub>-Rezeptors mit dem Medikament Ambrisentan zu einer Progression der Erkrankung, was den vorzeitigen Abbruch der Studie erforderlich machte

(247). Die simultane Inhibition der ET-1<sub>A</sub>- und ET-1<sub>B</sub>-Rezeptoren scheint daher eine zentrale Rolle in der Bekämpfung der Fibrose zu spielen, da beide Rezeptortypen durch ET-1 profibrotische Effekte vermitteln können (236).

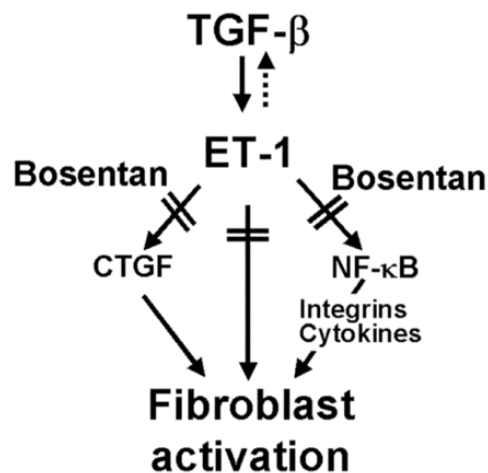


Abb. 3: Schematische Darstellung des inhibitorischen Einflusses von Bosentan auf die Fibroblastenaktivierung (übernommen aus (236), Abb. 1)

Neben den in verschiedenen Organsystemen beschriebenen Effekten des Endothelin-Systems auf die Pathomechanismen der Fibrose wurde in anderen Medikamentenstudien eine heterogene Einflussnahme von Bosentan auf die Reduktion der Organfibrose beschrieben (140, 236). Die Rolle des Endothelin-Systems in der Pathogenese der PTGK ist bisher aufgrund fehlender in vitro- oder in vivo-Studiendaten ungeklärt, wodurch die Frage offenbleibt, ob Bosentan eine vielversprechende Therapieoption in der Behandlung spielen könnte.

### 2.3.3 Das Versuchsmedikament Nintedanib

In bisherigen Forschungsansätzen zur Entwicklung von Pharmakotherapien der PTGK lag der Fokus in erster Linie auf der Beeinflussung einzelner spezifischer Signalwege innerhalb der multifaktoriellen Ätiologie der PTGK, wie exemplarisch bereits anhand ausgewählter Therapieansätze in Kapitel 2.3.1 verdeutlicht wurde. Im Gegensatz dazu fungiert der niedermolekulare Wirkstoff Nintedanib als ein intrazellulärer und multipler Tyrosinkinase-Inhibitor, der die Rezeptoren von PDGF, FGF und VEGF dosisabhängig (248), kompetitiv und reversibel inhibiert (27, 28, 249). Im Detail blockiert Nintedanib die *Adenosintriphosphat* (ATP)-Bindungstasche der Rezeptoren und unterbricht dadurch die damit verbundene intrazelluläre Signaltransduktion. Diese führt durch eine verstärkte Transkription profibrotischer und

proinflammatorischer Gene zur Induktion der Proliferation und Migration von Zellen und Mediatoren, die an der Wundheilung (250) und der Pathogenese der Fibrose beteiligt sind (27, 248, 249).

Nintedanib wird in Europa bei Erwachsenen zur Behandlung der IPF, der *SSc-assoziierten interstitiellen Lungenerkrankungen* (SSc-ILDs) (249) sowie als Therapieoption des fortgeschrittenen *nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms* (NSCLC) in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Docetaxel (251) eingesetzt. Das Medikament wird zweimal täglich in einem 12-stündigen Abstand oral eingenommen und wirkt systemisch im gesamten Organismus (249). Zu den relevanten UAWs zählen eine Erhöhung der Lebertransaminasen, die bei Dosisreduktion oder Therapieunterbrechung reversibel ist, sowie ein erhöhtes Blutungsrisiko bei Patienten mit entsprechender medikamentöser oder hereditärer Blutungsanamnese. Zu den am häufigsten in klinischen Studien und der Praxis beobachteten UAWs zählen Diarrhoe, Übelkeit und Erbrechen (252). Die Symptomatik war in der Regel jedoch mild bis moderat ausgeprägt und besserte sich bei den meisten Patienten im Verlauf der Therapie nach Gabe eines Antidiarrhoikums, ohne dass eine Dosisanpassung notwendig wurde (253).

In verschiedenen tierexperimentellen Modellen zu *interstitiellen Lungenerkrankungen* (ILDs), der SSc und SSc-ILD konnte der antiinflammatorische und antifibrotische Effekt von Nintedanib auf die Lunge (28, 254) und Leber (29) bereits beobachtet werden. Pharmakodynamisch zeigte sich, dass durch Nintedanib die Proliferation und Migration von Fibroblasten, die Differenzierung in aktive Myofibroblasten sowie die Sekretion der EZM gehemmt wurde (249). Wollin et al. konstatierten in ihrer Übersichtsarbeit zum Einfluss von Nintedanib auf die IPF, dass Nintedanib sowohl die TGF- $\beta$ -regulierte Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten als auch die Sekretion und Ablagerung von Kollagen inhibiert (248). Darüber hinaus hemmt Nintedanib den regulatorischen Effekt von TGF- $\beta$  auf die Signalkaskade des FGFs, indem es die Hochregulation von FGF-Rezeptoren auf Lungenfibroblasten (255) und dadurch die durch FGF-induzierte Proliferation der Fibroblasten unterdrückt (256). Die wesentliche Bedeutung des Wachstumsfaktors PDGF in der Pathogenese der Fibrose wurde bereits detailliert in Kapitel 2.2.3 beschrieben.

Nintedanib inhibiert multiple intrazelluläre Signalwege von PDGF (Abb. 4), darunter *Rat sarcoma* (Ras), *Rat fibrosarcoma* (Raf), MAPK, *extracellular-signal-regulated-kinase* (ERK) sowie die *Phosphoinositid-3-Kinase* (PI3K). Die Blockade dieser Signalkaskaden resultiert in einer reduzierten Proliferation und Migration sowie einer verkürzten Lebensdauer von Myofibroblasten (257).

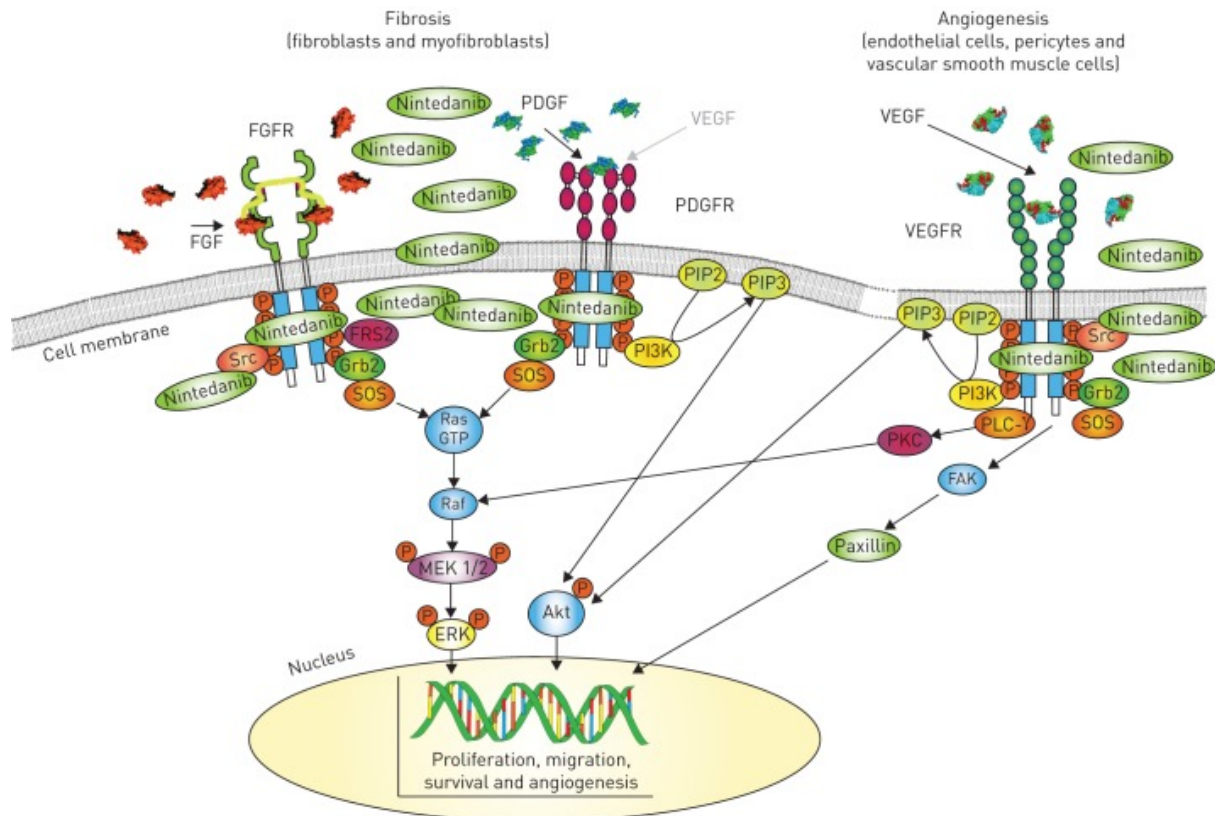


Abb. 4: Wirkmechanismus von Nintedanib auf die PDGF-, FGF- und VEGF-Rezeptoren im Kontext der Fibrose und Angiogenese (übernommen aus (248), Abb. 1)

Der Wachstumsfaktor VEGF spielt eine zentrale Rolle in der physiologischen Wundheilung. Durch die Aktivierung von VEGF wird die Angiogenese induziert, die Zellproliferation gefördert und die vaskuläre Permeabilität erhöht (258). Ferner wurde VEGF als bedeutender Regulator der Fibrose identifiziert. Die Blockade des VEGF-Rezeptors und seiner Signalwege durch Nintedanib führt zu einer Hemmung der Angiogenese und resultiert in einer verringerten Proliferation, Migration und Überlebensfähigkeit der Fibroblasten, indem die Bindung von VEGF an PDGF-Rezeptoren auf der Oberfläche von Lungenfibroblasten inhibiert wird (248).

Ogleich die therapeutischen, antifibrotischen und antiinflammatorischen Effekte von Nintedanib in früheren Untersuchungen vorwiegend in der Lunge sowie in von SSc-betroffenen fibrotischen Organen getestet wurden, lassen die vielversprechenden Ergebnisse dieser Studien (28, 253, 259) ebenfalls auf einen potenziellen therapeutischen Nutzen in der Behandlung der PTGK hoffen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Studiendesign

##### 3.1.1 Aufbau der Studie

Für die randomisierte, zweifach verblindete in-vivo Studie wurden 52 männliche, 10 Wochen alte Sprague-Dawley-Ratten (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) vom Versuchsleiter in vier gleich große, randomisierte Versuchsgruppen (n=13) aufgeteilt (Abb. 5). Die Anzahl der für die Studie und statistischen Signifikanz erforderlichen Versuchstiere wurde nach Festlegung des primären Endpunkts, der Reduktion der AC, in einer A-priori-Teststärkenanalyse (Signifikanzniveau  $\alpha$ : 5%; statistische Power  $\beta$ : 80%) mit Hilfe des *Instituts für medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik* (IMBEI) der Universitätsmedizin Mainz und auf Basis früherer Experimente mit vergleichbarem Versuchsaufbau erstellt (23, 232, 260). Der Studienleiter war weder an der praktischen Durchführung noch an der statistischen Analyse des Experiments aktiv beteiligt. Die Randomisierung erfolgte mithilfe von GraphPad<sup>1</sup>. Durch die Zufallsverteilung der Versuchstiere konnte gewährleistet werden, dass die variablen Zeitpunkte der chirurgischen Intervention keinen Einfluss auf das Ergebnis hatten. Die Ratten wurden im Tierstall des *Translational Animal Research Center* (TARC) der Universitätsmedizin Mainz einzeln in Makrolon-Typ IV Käfigen (Zoonlab, Castrop-Rauxel, Deutschland) bei Zimmertemperatur und einem 12-Stunden Tag/Nacht-Rhythmus gehalten.

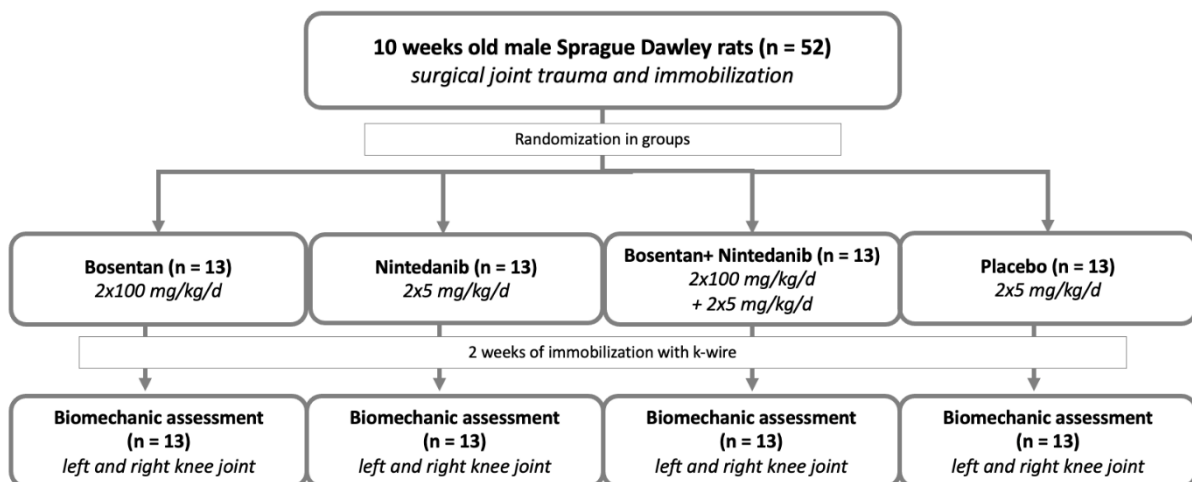


Abb. 5: Studiendesign

<sup>1</sup> QuickCalcs. GraphPad Software. <https://www.graphpad.com/quickcalcs/randomize1/> Zugriffsdatum: 13.05.2022

Die Tiere hatten allzeit freie Bewegung im Käfig und kontinuierlichen Zugang zu unbegrenzter Nahrung und Trinkwasser. Die vier Versuchsgruppen unterschieden sich ausschließlich in der postoperativen medikamentösen Therapie.

Vor der Durchführung des Experiments wurde das rechte Kniegelenk als Interventionsort für die Induktion des Traumas und die anschließende operative Immobilisierung festgelegt, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den Versuchsgruppen sicherzustellen. Alle Versuchstiere wurden am ersten Tag des zweiwöchigen Zyklus einem einheitlichen chirurgischen Eingriff unterzogen, der aus einer standardisierten Gelenkverletzung des rechten Kniegelenks und operativen Immobilisierung mittels temporärer 14-tägiger K-Draht-Knie-Arthrodese bestand. Anschließend erfolgte eine zweiwöchige, zweimal tägliche orale Therapie in festgelegten 12-stündigen Abständen. Nach Abschluss der 14-tägigen Pharmakotherapie wurden die Ratten mittels *Kohlenstoffdioxid* (CO<sub>2</sub>) euthanasiert. Unmittelbar nach der Euthanasie erfolgte die operative Exartikulation im Hüftgelenk des rechten und linken Beins. Das Kniegelenk wurde beidseits myotomiert und biomechanisch vermessen, wofür der K-Draht entfernt und ein automatisiertes Arthrometer zur Erfassung der Messwerte verwendet wurde.

Das Ziel des Experiments war die Untersuchung eines antifibrotischen Effekts der eingesetzten Pharmaka hinsichtlich einer potenziell messbaren Reduktion der AC des Kniegelenks im Kontext der PTGK.

Die Verabreichung der Wirkstoffe und das Monitoring der Tiere wurden zweimal täglich von einem an der Studie beteiligten Doktoranden durchgeführt. Sowohl die Operateure als auch die Doktoranden und Tierpfleger waren hinsichtlich der Gruppenzugehörigkeit der Versuchstiere verblindet.

Der Antrag zur Durchführung des Tierversuchsvorhabens ID 23 177-07/G 21-1-113 wurde von der lokalen Ethikkommission des Landesuntersuchungsamtes Rheinland-Pfalz in Koblenz genehmigt. Für die Durchführung des Tierexperiments sowie die Erlaubnis und Befähigung zur Handhabung der Versuchstiere mussten alle Doktoranden die Module 1–3 gemäß der Tierschutzversuchstierverordnung, Anlage 1 (Abschnitt 1–3), der versuchstierkundlichen Kurse des TARC der Universitätsmedizin Mainz erfolgreich absolvieren. Diese thematisierten die Grundlagen tierexperimenteller Versuche, einschließlich operativer und nicht-operativer Eingriffe an Mäusen und Ratten.

### 3.1.2 Abbruchkriterien

Gemäß den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes wurden für den Versuch sechs Abbruchkriterien definiert, um vermeidbares Leid, Schmerzen und Stress der Versuchstiere quantifizierbar zu machen und ein zeitliches Hinauszögern dieser Zustände zu verhindern.

Hierfür wurde ein Score-Sheet (vgl. Kapitel 8.5) bei der täglichen postoperativen Visite angewandt, mit dessen Hilfe potenziell betroffene Versuchstiere erkannt werden sollten. Zu den sofortigen Abbruchkriterien zählten:

1. Reduktion des Körpergewichts > 20% des Ausgangsgewichts
2. Atemgeräusche, gesträubtes Fell, geschlossene Augen, Krämpfe und Lähmungen
3. Apathie, Wund- oder Gelenkinfektionen, Nekrosen
4. Aggressivität bei Palpation
5. Abnorme Körperhaltung
6. Materialversagen (Bruch des Implantats, Dislokation der Cerclage) mit hoher Belastung für das Versuchstier

Bei Erfüllung eines der definierten Abbruchkriterien war der Studienleiter unverzüglich zu informieren und es wäre unmittelbar eine Euthanasie mittels CO<sub>2</sub> durchgeführt worden.

## 3.2 **Medikation**

Alle Ratten erhielten vom Tag der Operation bis zu ihrer Euthanasie das ihrer Versuchsgruppe zugeteilte Medikament. Alle Wirkstoffe wurden in Pulverform oral verabreicht. Die Tagesdosierungen wurden vor Beginn des ersten Tierversuchs in 1,5 *Milliliter* (ml) Safe-Lock-Tubes Reaktionsgefäße abgefüllt und mit Hilfe einer Feinwaage präzise dosiert. Der Doktorand, der die Tagesdosierungen vorbereitete, war gegenüber der Medikamenten- und Gruppenzugehörigkeit verblindet. Aufgrund der Pulver- und Lagerungsform der Medikamente in Eppendorf-Reaktionsgefäßen war es unvermeidlich, dass ein Teil der Dosierung an den Gefäßwänden haften blieb. Aus diesem Grund wurden die Wirkstoffe mit einer zusätzlichen Toleranz von 5% dosiert. Die Tagesdosis lag in der Bosentan-Gruppe bei 100 mg/kg *Körpergewicht* (KG), in der Nintedanib-Gruppe bei 5 mg/kg KG, in der Kombinationstherapie-Gruppe bei 100 mg/kg KG (Bosentan) + 5 mg/kg KG (Nintedanib).

Die Dosierung der eingesetzten Arzneimittel wurde auf Grundlage der *No-Observed-Adverse-Effect-Level* (NOAEL) früherer Studien zur Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und Verträglichkeit gewählt (261). Zu den zweimal täglich festgelegten Zeitpunkten wurde die in Einzeldosen vorbereitete Wirkstoffdosierung mit 10 *Gramm* (g) einer handelsüblichen

Schokoladencreme vermischt und den Versuchstieren zusätzlich zur regulären Nahrung angeboten. Dafür wurde die präparierte Schokocrema gut sichtbar an der Innenseite des Käfigs platziert, um den Verzehr anschließend kontrollieren zu können. Die Medikation wurde von allen Tieren unverzüglich und vollständig aufgenommen. Die Vorbereitung und Verabreichung der Medikation wurden ausschließlich durch die Doktoranden durchgeführt.

### 3.3 Anästhesie

#### 3.3.1 Operative Narkose und Schmerztherapie

Die Narkoseeinleitung erfolgte durch inhalative Applikation einer 1%-Isofluranlösung in einem luftdicht abgeschlossenen Raum. Zur Aufrechterhaltung der Anästhesie wurde eine gewichtsadaptierte Kombination (Tab. 3) aus Midazolam (4,0 mg/kg KG), Medetomidin (0,375 mg/kg KG) und Fentanyl (0,005 mg/kg KG) verwendet, die nach der Einleitung der inhalativen Narkose intraperitoneal injiziert wurde. Nach Abschluss des chirurgischen Eingriffs wurde die Anästhesie durch die subkutane Applikation der Kombination aus Atipamezol (1,0 mg/kg KG) und Flumazenil (0,2 mg/kg KG) antagonisiert. Die gewichtsadaptierte Dosisberechnung jedes Versuchstieres und die Präparation der für die Anästhesie und Antagonisierung notwendigen Medikamente wurden auf Grundlage des am ersten Versuchstag unmittelbar vor dem operativen Eingriff erfassten Körpergewichts durchgeführt. Ein potenzieller Verlust während der Injektion sowie geringfügige Abweichungen des Gewichts wurden durch eine Erhöhung der berechneten Dosierung um 5% kompensiert.

Tab. 3: Dosisrechner der Medikamente

Dosisrechner Medikamente				
Gewicht (kg)	Narkose	Konzentration	Dosierung	errechnete Menge
		(mg/ml)	(mg/kg KG)	(ml/ Ratte nach KG)
0,45	Medetomidin	1	0,375	0,16875
	Midazolam	5	4	0,36
	Fentanyl	0,05	0,005	0,045
	<b>Antagonisierung</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Dosierung</b>	<b>errechnete Menge</b>
		(mg/ml)	(mg/kg KG)	(ml/ Ratte nach KG)
	Atipamezol	5	1	0,09
	Flumazenil	0,1	0,2	0,9
	<b>Post-OP Analgesie</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Dosierung</b>	<b>benötigte Menge/Flasche (F) (500ml)</b>
		(mg/ml)	(mg/ml H2O)	(T) µl/ (F) ml
	Tramadol (T)	100	2,5/100	125 + 500

### 3.3.2 Postoperative Schmerztherapie

Für die postoperative Analgesie wurde das Opioid Tramadol in der in Tab. 3 aufgeführten Konzentration dem herkömmlichen Trinkwasser beigemischt und allen Versuchstieren jederzeit frei zugänglich gemacht.

Dieser Zeitraum erstreckte sich von drei Tagen vor bis drei Tage nach der Operation, um sowohl eine Gewöhnung an den Geschmack des Tramadols als auch eine suffiziente Schmerztherapie zu gewährleisten. Letzteres zielte darauf ab, eine unerwünschte Konditionierung mit dem negativen Reiz der Operation zu verhindern. Tramadol wird überwiegend über *Cytochrom P450 (CYP)-2D6* (80%) und alternativ über CYP3A4 in der Leber abgebaut (262). Der Metabolismus des im weiteren Verlauf des Experiments eingesetzten Bosentans erfolgt primär über CYP2C9 und ebenfalls über CYP3A4 in der Leber (263). Nintedanib wird nur in geringem Maße über das Cytochrom P450-System metabolisiert, wobei der primäre Weg der Verstoffwechslung CYP-unabhängig über Esterasen und *Uridindiphosphat (UDP)-Glycosyltransferasen (UGT)* erfolgt (27). Eine den Metabolismus betreffende potenzielle Arzneimittelinteraktion, die zu einer Reduktion oder Erhöhung der Konzentration eines der eingesetzten Medikamente führt, wurde für die im Experiment vorgenommene Kombination nicht beschrieben (263). Eine Interaktion zwischen Bosentan und Tramadol aufgrund des partiellen konvergenten Abbauweges über CYP3A4 erschien wegen der alternativen Metabolisierung über CYP2C9 als unwahrscheinlich. In den folgenden 14 Tagen wurden alle Ratten täglich auf Anzeichen von Stress oder Schmerzen infolge des Traumas und der Immobilisation untersucht, die gemäß den in Kapitel 3.1.2 definierten Versuchsabbruchkriterien eine vorzeitige Beendigung des Experiments erforderlich gemacht hätten.

## 3.4 Operativer Eingriff

### 3.4.1 Vorbereitungen

Vor Beginn jeder Operation wurden sämtliche erforderlichen Materialien, Instrumente, Medikamente und Geräte auf Vollständigkeit und Funktionsfähigkeit überprüft. Eine detaillierte Übersicht der benötigten Einmalmaterialien und Operationsinstrumente ist in Kapitel 8 aufgeführt.

Die Anästhesie und Operationen wurden in einem speziellen Operationsbereich für tierversuchstechnische Eingriffe des TARC-Gebäudes durchgeführt.

Der Operationstisch wurde vor, zwischen und nach jedem Eingriff gründlich gereinigt und desinfiziert. Während der Vorbereitung und der operativen Eingriffe wurden die

allgemeingültigen antiseptischen Maßnahmen strikt eingehalten. Diese umfassten das Tragen von Bereichskleidung und Bereichsschuhen, eines Mund-Nasen-Schutzes, einer Operationshaube, eines sterilen Operationskittels, steriler Operationshandschuhe sowie die Durchführung einer chirurgischen Händedesinfektion. Die wiederverwendbaren Instrumente wurden zwischen den Eingriffen ordnungsgemäß gereinigt und desinfiziert. Nach jedem Operationszyklus wurden die gebrauchten sterilisierbaren Instrumente maschinell gereinigt, desinfiziert und anschließend mittels Dampfsterilisation sterilisiert.

Der Operationsbereich bestand aus einer desinfizierten und auf 37 °C vorgewärmten Wärmeplatte, die mit einem sterilen 90 × 75 *Zentimeter* (cm) großen Abdecktuch abgedeckt war. Die benötigten Instrumente und Einmalmaterialien wurden dem Operateur steril angegeben und auf dem sterilen Abdecktuch platziert.

### 3.4.2 Ablauf der Operation

Vor Beginn des chirurgischen Eingriffs wurde den Versuchstieren ausreichend Corneagel (Corneregel; 50 mg Dexpanthenol/1 g Salbe) auf die Augen aufgetragen, um diese während der OP aufgrund des fehlenden Lidschlags vor Austrocknung zu schützen. Anschließend wurde das Fell großflächig von Ober- und Unterschenkel bis zur Hüfte mithilfe eines elektronischen Haartrimmers entfernt, um das Risiko von Mikrotraumata und dadurch resultierenden potenziellen Infektionen, die durch den Einsatz herkömmlicher Rasierer entstehen können, zu minimieren (264). Nach der Rasur wurde die Ratte mittig auf dem sterilen Tuch und der vorgewärmten Wärmeplatte platziert, das Operationsgebiet großzügig mit einer 7,5%-Braunol-Lösung desinfiziert und mit einem sterilen 60 × 50 cm Lochtuch abgedeckt. Anschließend erfolgte die Prüfung der Narkosetiefe durch Auslösung des interdigitalen Schmerzreflexes mit einer chirurgischen Pinzette. Die Operation durfte ausschließlich nach negativer Reflextestung gestartet werden, um eine ausreichende Narkosetiefe des Versuchstieres sicherzustellen. Nach einem initial positiven Reflextest und einer Wartezeit von 5 Minuten wurde bei einem erneut positiven Reflextest eine Nachdosierung des Anästhetikums vorgenommen. Hierbei wurde eine maximale zusätzliche Dosis von 30% der initial gewichtsadaptierten Narkosemittelgabe appliziert, um eine potenzielle Überdosierung zu vermeiden. Anschließend wurde die posteriore Gelenkkapsel durch manuelle Hyperextension des rechten Kniegelenks auf ein für Ratten unphysiologisches Bewegungsmaß von 180 Grad verletzt. Nach dem Vorspannen des Fells erfolgte eine etwa 2–3 cm lange Inzision der Cutis entlang der Vorderkante der Tibia, ausgehend vom unteren Drittel des Ligamentum patellae in distaler Richtung, unter Verwendung eines 10er-Skalpells. Im Anschluss wurde eine intraartikuläre Fraktur des Kniegelenks durch das manuelle Einbringen eines 1,0 *Millimeter* (mm) K-Drahts im unteren Drittel des Ligamentum patellae,

retropatellar und interkondylär in das Femur, imitiert (Abb. 6). Die ossäre Läsion maß dabei 1,0 mm in der Breite und 3,0 mm in der Tiefe. Die Position des K-Drahts wurde sowohl klinisch durch die freie Bewegung der Tibia als auch radiologisch mittels Bildgebung des Kniegelenks in zwei Ebenen (*anterior.posterior* (a.p) und lateral) mit dem mobilen Röntgengerät Faxitron® MX-20 kontrolliert. Eine handelsübliche Fünf-Cent-Münze wurde während des Experiments als Größenreferenz auf den radiologischen Aufnahmen verwendet. Nach der Kontrolle der korrekten Position des K-Drahts wurde dieser wieder entfernt. Für die Präparation des tibialen Bohrlochs zur temporären K-Draht-Arthrodese des Kniegelenks wurde die Tibiavorderkante nach Inzision der Tibialis-Anterior-Loge stumpf mit einem Milligan-Dissektor und einer sterilen Kompresse freipräpariert und dargestellt. Anschließend erfolgte die ascendierende (ca. 15°) bikortikale Bohrung der Tibia in Richtung des Kniegelenks unter Verwendung eines elektronischen, sterilen 1,0 mm-Bohrers am flektierten Unterschenkel. Zur Standardisierung und Reproduzierbarkeit wurde das tibiale, bikortikale Bohrloch in einem Abstand von 13 mm distal der Patella, entsprechend der Breite eines 15er-Einmalskalpells der Firma Feather, gesetzt und mit einem sterilen Stift markiert (Abb. 6). Die Positionierung des Bohrlochs im proximalen Drittel der Tibia sollte das Risiko von iatrogen bedingten Frakturen durch eine größere anatomische Knochenbreite reduzieren. Anschließend wurde ein steriler 0,6 mm K-Draht mit dem stumpfen Ende voran in das ascendierende Loch der Tibia eingebracht und durch das Weichteilgewebe bis zur Unterkante des Femurs vorgeschoben.

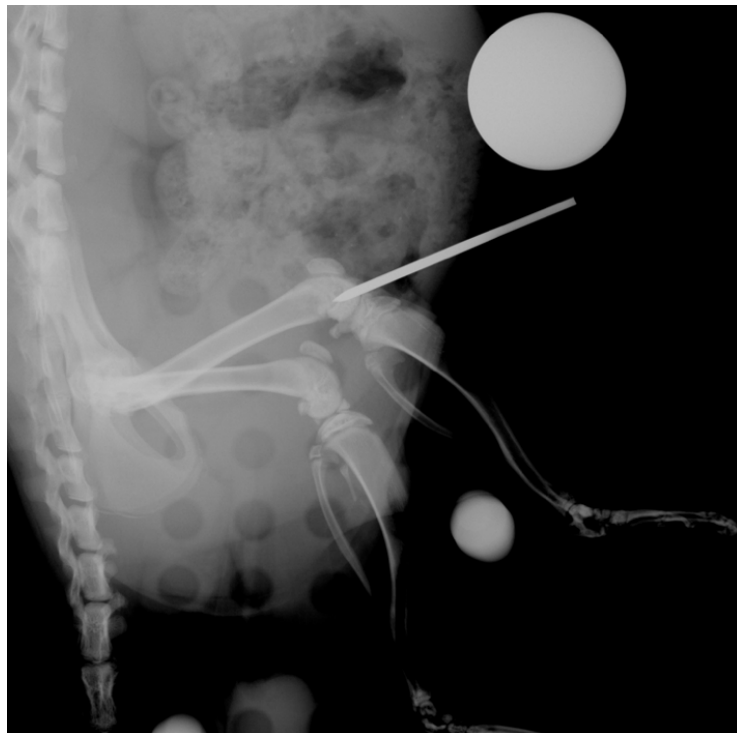


Abb. 6: Röntgenbildkontrolle der intraartikulären Traumainduktion

Nach dem Vorspannen des Fells mit Zeigefinger und Daumen am Femur erfolgte eine etwa drei Zentimeter lange Inzision der Cutis entlang des Septums Intermusculare femoris laterale unter Verwendung eines 10er-Skalpells. Die Aponeurose dient als anatomische Grenze zwischen der Extensoren- und Flexorenloge des Oberschenkels, wodurch ein atraumatischer und blutarmer Zugang zum Femur zwischen dem *Musculus* (M.) vastus lateralis und M. biceps femoris ermöglicht wurde. Die femorale Position des eingebrachten K-Drahts und der anatomische Verlauf des Femurs dienten als Orientierungshilfe bei der Schnitfführung. Nach Eröffnung der Faszie mit einem 15er-Skalpell wurde das Femur atraumatisch mit Hilfe eines Milligan-Dissektors und einer Mosquito-Klemme nach Halstedt freipräpariert. Anschließend wurde ein 2/3-zahniger Wundspreizer nach Finsen eingebracht. Die knochenahne Ablösung des Ursprungs des Caput breve des M. biceps femoris und des M. vastus lateralis von der Linea aspera und dem Septum intermusculare femoris laterale erfolgte ebenfalls unter Verwendung des 15er-Skalpells, um das freipräparierte Femur darzustellen.

Es folgte die Bestimmung der femoralen Bohrlochposition durch maximale Flexion des Kniegelenks und Visualisierung des K-Draht-Verlaufs mit nachfolgender Markierung der Bohrlochposition auf dem Femur mit einem sterilen Stift. Ein deszendierendes ( $15^\circ$ ) mittiges, bikortikales Bohrloch wurde unter Verwendung des elektrischen, sterilen 1,0 mm-Bohrers in das Femur eingebracht. Der von distal kommende 0,6 mm K-Draht wurde durch das femorale Bohrloch hindurchgeführt und durch Umbiegen des stumpfen femoralen Drahtendes mit einer Spitzzange hakenförmig am Femur fixiert. Das Kniegelenk wurde in maximale Flexion ( $145^\circ$ ) gebracht, das distale K-Drahtende mit einem Seitenschneider gekürzt und an der medialen Seite der Tibia ebenfalls ankerförmig fixiert. Im Anschluss wurden die Stabilität der K-Draht-Arthrodese und die rein ossäre Fixierung ohne Weichteileinschluss kontrolliert sowie eine ausgiebige Spülung der proximalen und distalen Wundhöhle mit einer 0,9%-Natriumchloridlösung (NaCl) vor Beginn des Wundverschlusses durchgeführt. Die Naht der Muskelfaszien erfolgte mit einem resorbierbaren, polyfilen 3-0 SH-1-Plus-Vicryl-Faden, während die Cutis mit einem nicht resorbierbaren, monofilen 4-0-Fs-2-Ethilon-Faden verschlossen wurde. Abschließend wurde das Fell mit 0,9% NaCl-Spüllösung gereinigt, getrocknet und ein atmungsaktiver, wasserdichter sowie selbstauflösender Sprühverband auf die Wundstellen aufgetragen.

Anschließend erfolgte eine radiologische Kontrolle der temporären K-Draht-Arthrodese zur Detektion potenzieller iatrogenen Frakturen und zur Überprüfung der korrekten Position des K-Drahts (Abb. 7). Die postoperative laterale Aufnahme wurde im weiteren Verlauf für die Bestimmung des resultierenden *Gelenkwinkels* (JA) verwendet. Für die postoperative radiologische Kontrolle wurde ein röntgenstrahlendurchlässiges Gestell aus Acrylglasplatten verwendet, auf dem die Ratte platziert wurde (32). Mit Hilfe von drei einschraubbaren

Plastikstiften konnten die Hüfte und das Bein des Tieres stabilisiert und fixiert werden, wodurch eine präzise Positionierung des zu untersuchenden Kniegelenks während der Durchleuchtung sichergestellt wurde.



Abb. 7: Radiologische Kontrolle der K-Draht-Arthrodese in lateraler Aufnahme

### 3.4.3 Euthanasie

Nach Abschluss der 14-tägigen medikamentösen Therapie wurden die Versuchstiere gemäß §4 des deutschen Tierschutzgesetzes zur Vermeidung von Schmerz und Leid betäubt und nachfolgend euthanasiert.

Für die Euthanasie wurde gemäß der Anlage 2 der Tierschutz-Versuchstierverordnung die inhalative Tötung mittels CO<sub>2</sub> gewählt. Dieses Verfahren wurde aufgrund seiner Eigenschaft, eine stress- und schmerzarme Tötung der Versuchstiere zu gewährleisten, ausgewählt (265).

Die Ratten wurden einzeln in einem luftdicht verschlossenen Behälter positioniert, in dem zunächst eine Sedierung mit 70% CO<sub>2</sub> erfolgte.

Anschließend wurde die Euthanasie durch die Exposition mit 100% CO<sub>2</sub> durchgeführt. Das Kohlenstoffdioxid induzierte innerhalb weniger Minuten eine Atemdepression, die zum unmittelbaren Herzstillstand führte.

### 3.5 Postmortale biomechanische Gelenkmessung

Zur biomechanischen Beurteilung des Einflusses der verabreichten Medikamente auf die PTGK wurden die Veränderungen der Gelenkbeweglichkeit bei einem definierten Drehmoment von 35 *Newtonmillimeter* (N·mm), die berechnete AC und die obligatorische Kraft pro Winkeländerung, dargestellt als Fläche unter der Kurve, als Messgrößen verwendet.

Das Drehmoment bei 35 N·mm wurde als Referenz- und Vergleichswert festgelegt, da es dem Drehmoment entspricht, bei dem eine maximale physiologische Kniegelenksexension und Dehnung der posterioren Gelenkkapsel der Ratte erreicht werden, ohne dass es zu einer strukturellen Schädigung des Gelenks oder der Kapsel kommt (32, 266). Ein im Vergleich zum maximalen physiologischen Kniegelenkwinkel reduzierter JA des traumatisierten und immobilisierten rechten Kniegelenks deutete daher auf die Entwicklung einer Kontraktur im Rahmen dieses Experiments hin.

In der Studie von Baranowski et al. belief sich das kombinierte, physiologische myogene und arthrogene Streckdefizit auf  $43,3^\circ \pm 7,4^\circ$ , wobei der myogene Anteil  $23,6^\circ \pm 8,1^\circ$  betrug. Zudem wurde in der Studie konstatiert, dass der myogene Anteil der Kontraktur in den ersten zwei Wochen der Immobilisation konstant bleibt und durch eine anschließende Remobilisation vollständig reversibel ist, was sich in den nicht signifikanten Unterschieden zwischen den Versuchs- und Kontrollgruppen zeigte (32). Aufgrund der aufgeführten Ergebnisse der Studie von Baranowski et al. lag der Schwerpunkt dieses Experiments auf der arthrogenen Komponente der Kontraktur. Dafür wurde der maximale JA bei einem Drehmoment von 35 N·mm nach einer periartikulären Myotomie, die 10 mm unter- und oberhalb des Kniegelenks durchgeführt wurde, am operierten rechten Kniegelenk gemessen. Dadurch wurde der myogene Einfluss eliminiert und ausschließlich die AC abgebildet.

Für die Berechnung der AC war zusätzlich die Messung des *physiologischen JA bei 35 N·mm des Kniegelenks nach Myotomie* (pGnM) erforderlich. Um eine bessere Vergleichbarkeit innerhalb des Experiments zu gewährleisten und zusätzlich neue Studiendaten zu generieren, wurde der pGnM der kontralateralen linken Beine aller Versuchsgruppen erhoben. Mit Hilfe

dieser Methode konnten potenzielle Unterschiede zwischen den pGnM-Referenzwerten der einzelnen Versuchsgruppen sowie deren Einfluss auf die AC im Vergleich zu der Kontrollgruppe identifiziert werden. Basierend auf den gemessenen maximalen JAs des rechten Kniegelenks aller Versuchstiere und den erfassten Referenzwerten der pGnM des linken Kniegelenks wurde anschließend die AC anhand der nachfolgenden Formel berechnet:

$$\text{AC Kniegelenk} = \text{Referenzwerte pGnM} - \text{maximaler JA nach Myotomie rechts}$$

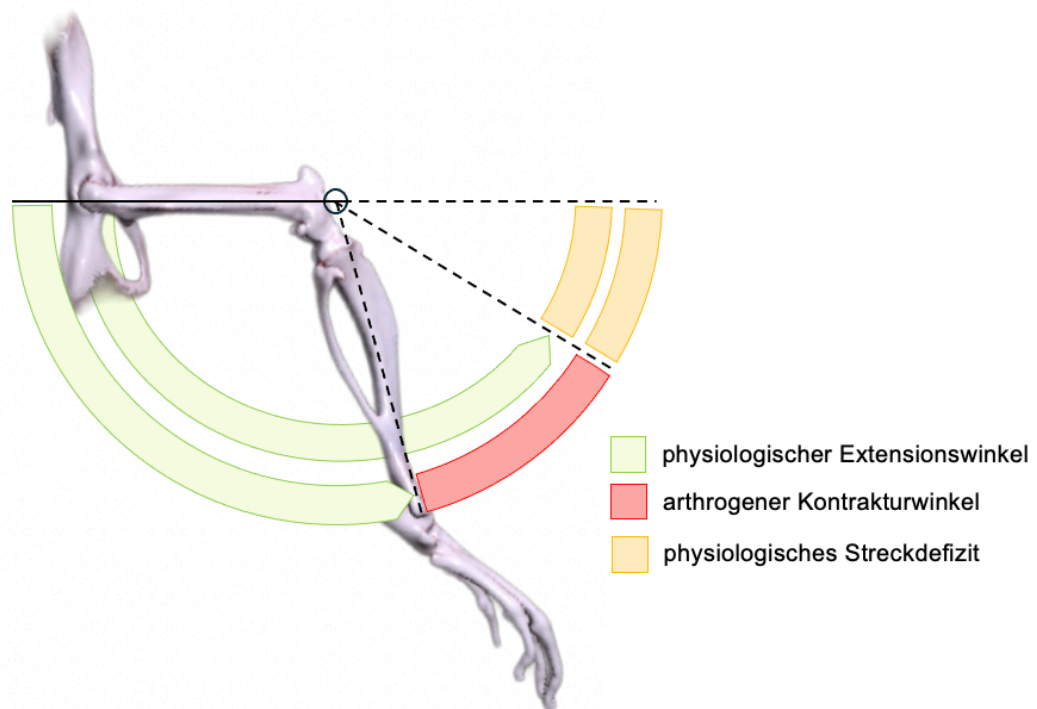


Abb. 8: Schematische Darstellung des Bewegungsradius des Kniegelenks der Ratte; grüner Bereich: physiologischer JA , roter Bereich: AC, orangener Bereich: physiologisches Extensionsdefizit

Abbildung 8 veranschaulicht schematisch den ROM des Kniegelenks der Ratte. Der Bewegungsradius ist farblich in drei separate Bereiche unterteilt. Das grüne Areal repräsentiert den JA bei einer Belastung von 35 N·mm nach Myotomie, während das rote Segment die AC abbildet. Das physiologische Extensionsdefizit des Kniegelenks der Ratte wurde anschließend durch die Differenz der pGnM-Referenzwerte und der maximalen Extension von 180° berechnet und markiert mit dem gelben Bereich das Ende des Extensionsradius.

Für die biomechanischen Messungen des Kniegelenks wurde ein spezifisches Arthrometer verwendet, das in Kooperation mit der Hochschule RheinMain in Wiesbaden/Rüsselsheim, Deutschland, entwickelt wurde. Dieses Gerät ermöglichte die automatisierte Durchführung der

Kniegelenksexension und erfasste präzise die dafür notwendige applizierte Kraft. Diese Methodik unterschied sich sowohl in der Vorgehensweise als auch in der Genauigkeit von den in früheren Studien mit Tiermodellen häufig verwendeten manuellen Messverfahren. In diesen wurde die ROM meist mit Hilfe einer am Bein befestigten Schlaufe, einer Federwaage sowie eines Newtonmeters bestimmt, wodurch die JAs einzig zu bestimmten Zeitpunkten statisch gemessen werden konnten (23, 232, 260, 267, 268). Durch die präzise Fixierung des Kniegelenks und die Automatisierung der Messungen mit Hilfe eines motorisierten Linearschlittens konnten die Messwerte über die gesamte Dauer der Extension dynamisch mit höchster Präzision und Reproduzierbarkeit erfasst werden. Dadurch war es möglich, die zeitliche Dynamik der Kraftentwicklung zu quantifizieren, die Kraftaufwendung jedes Versuchstieres zu berechnen und vergleichend zwischen den Experimentalgruppen als Fläche unter der Kurve zu visualisieren. Der Bewegungsradius des Arthrometers überschritt bei jedem Messvorgang mit 180° das physiologische Bewegungsmaß der Ratte, gewährleistete dadurch jedoch zugleich, dass alle relevanten Messwerte sicher erfasst wurden.

### 3.5.1 Aufbau und Funktionsweise des Arthrometers

Das verwendete Arthrometer (Abb. 9) bestand aus einer Haltevorrichtung aus Aluminium, einer Vollkunststoffplatte, in die sowohl das Zahnrad als auch die Haltestange für den distalen Unterschenkel integriert waren, sowie aus einem motorisierten Linearschlitten (Jenny Science; ELAX Ex F20). Der Linearschlitten war über eine Zahnstange mit dem Zahnrad gekoppelt und verantwortlich für die automatisierte Bewegung des Kniegelenks. Ferner wurde ein Servocontroller (Jenny Science; XENAX Xvi) mit dem Linearschlitten verbunden, um die Sensorik und Aufzeichnung der Kraftentwicklung sowie die Messung der zur Bewegung des Linearschlittens notwendigen Kraft zu steuern. Die Haltevorrichtung für das Versuchsbein enthielt eine Stoppklemme, in die das myotomierte und bis auf den Knochen präparierte Femur distal des Caput Femoris eingespannt wurde. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Bewegungen während des Messvorgangs ausschließlich entlang der Längsachse der Tibia erfolgten und unerwünschte, unkontrollierte Rotationen des Kniegelenks außerhalb der definierten Ebene verhindert wurden. Das in der Stoppklemme fixierte Versuchsbein wurde anschließend in einen Wellenhalter eingespannt und mit einer Feststellschraube fixiert. Das Caput femoris diente dabei als visuelle Orientierungshilfe für die korrekte, achsengerechte Positionierung im Wellenhalter, wobei der Femurkopf in einem 90°-Winkel in Richtung des Tisches zeigte, auf dem das Arthrometer platziert war.

Der distale Unterschenkel wurde proximal der Malleolengabel an der mit dem Zahnrad verbundenen Haltestange mit einer Polysorb-3-0-Ligatur befestigt.

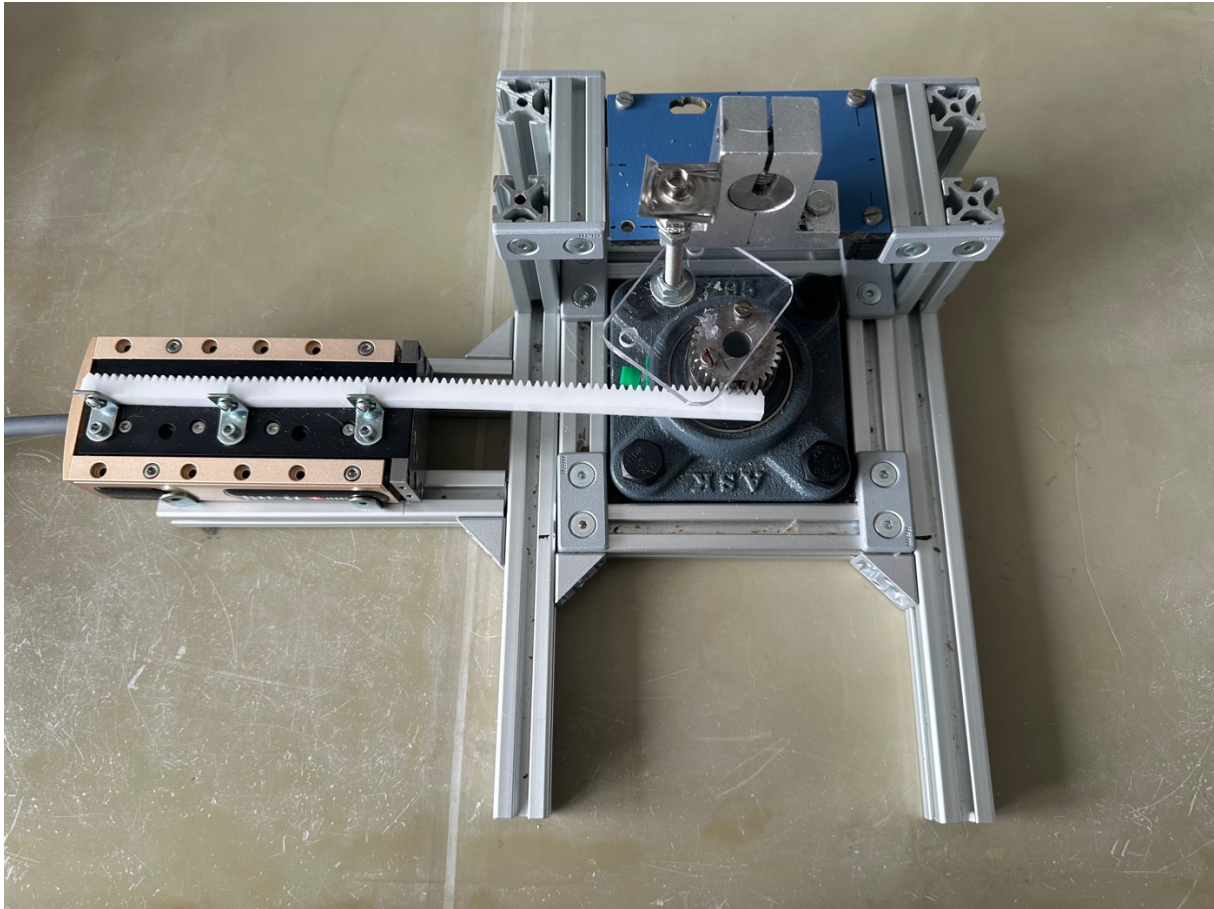


Abb. 9: Darstellung des Arthrometers mit elektronischem Linearschlitten (269)

Das Zahnrad, entlang dessen sich der Linearschlitten bewegte, wies einen Durchmesser von 33 mm mit und 27 mm ohne Zähne auf. Die Anzahl der Zähne betrug 31, wobei die Länge eines einzelnen Zahns gemessen von dem inneren Kreis des Zahnrad 3 mm betrug. Für die Bestimmung der Geräteposition in Relation zum JA konnte die durch die Bewegung des motorisierten Linearschlittens entlang des beschriebenen runden Zahnrad zurückgelegte Strecke als Berechnungsgrundlage herangezogen werden. Bei einem korrekt abgestimmten Lauf der Zahnstange am Zahnrad lag der Kontaktpunkt zwischen Zahn und Zahnstange annähernd in der Mitte des Zahns. Zur präzisen Berechnung des Umfangs des Zahnrad und somit der zurückgelegten Strecke waren sowohl der Umfang des inneren Kreises ohne Zähne als auch der des äußeren Kreises mit Zähnen erforderlich.

Der *Umfang* ( $U$ ) eines Kreises wird in Abhängigkeit vom *Durchmesser* ( $D$ ) und der Zahl *Pi* ( $\pi$ ) gemäß der Formel  $U = D \times \pi$  berechnet. Basierend auf dem ermittelten Umfang des inneren und äußeren Zahnradkreises konnte die Winkeländerung pro Millimeter im Verhältnis zu einem

Vollwinkel von 360 Grad berechnet werden. Die errechnete Winkeländerung pro Millimeter am mit hoher Wahrscheinlichkeit liegenden Kontaktpunkt in der Mitte des inneren und äußeren Zahnradkreises betrug  $3,85^\circ/\text{mm}$ . Dies entsprach  $0,00385^\circ$  pro *Inkrement* (inc). Nach der Fixierung des Kniegelenks und vor Beginn der Messungen musste sichergestellt werden, dass das Kniegelenk in einem  $90^\circ$ -Winkel zum Linearkugellager und zur Haltestange ausgerichtet war, sodass es orthogonal zur Längsachse der Tibia positioniert war. Dies gewährleistete, dass die während der Bewegung einwirkenden Kräfte achsengerecht und ohne Rotation auf das Kniegelenk einwirkten.

Die in den Servocontroller integrierte spezielle Kraftmesstechnologie der Firma Jenny Science ermöglichte in Kombination mit dem motorisierten Linearschlitten, die während der Gelenkbewegung entstandenen Kräfte sowie das Bewegungsausmaß der Kniegelenksexension präzise vorzugeben und aufzuzeichnen. Das Arthrometer war jedoch nicht in der Lage, die voreingestellte oder notwendige Kraft direkt in der physikalischen Einheit *Newton* (N) zu messen. Stattdessen wurde die für eine Positionsänderung des Arthrometers notwendige Stromstärke in *Milliampere* (mA) aufgezeichnet, die in der Messeinheit iForce angegeben wurde.

Die Umwandlung von iForce in N wurde mit Hilfe einer von der Firma Jenny Science bereitgestellten Formel  $1 \text{ N} \approx 12 \times 10 \text{ mA}$  durchgeführt (270). Durch die Umrechnung der gemessenen Stromstärke in Newton konnte in der späteren statistischen Analyse eine Vergleichbarkeit mit früheren Studien sichergestellt und die AC berechnet werden. Die nachfolgende Berechnung des Drehmoments resultierte aus dem Produkt der erfassten Kraft und dem mit 28 mm gemessenen Hebel des Arthrometers.

### 3.5.2 Berechnung der Fläche unter der Kraft-Winkel-Kurve (AUC)

Die Möglichkeit der dynamischen Erfassung einer kontinuierlichen Kraftentwicklung und der daraus berechneten Fläche unter der Kurve stellt ein Novum in der biometrischen Analyse von Gelenkkontrakturen im Kontext der Arthrofibroseforschung dar. Diese innovative Messmethode ermöglichte es, die Kontraktur nicht mehr nur an einzelnen prädeteterminierten Messpunkten, sondern über das gesamte Bewegungsmaß der Kniegelenksexension hinweg abzubilden und eine individuelle und versuchsgruppenspezifische Gesamtkraftentwicklung zu berechnen. Die AUC entspricht dem Produkt aus Kraft (N) und Winkelgrad ( $^\circ$ ).

Berechnet wurde die AUC mit Hilfe der Formel:

$$\text{AUC (N}\cdot\text{°)} = \frac{1}{2} \left( \frac{N_1 + N_2}{W_1 + W_2} \right)$$

$N\cdot\text{°}$  = Kraftentwicklung pro Winkelgrad (°)       $W$  = Winkelgrad (°)       $N$  = gemessene Kraft  
in Newton

Die konventionsgemäße Umrechnung von  $N\cdot\text{°}$  in die SI-konforme Einheit Newton · Radiant ( $N\cdot\text{rad}$ ) der Versuchsergebnisse der AUC des Kraft-Winkel-Diagramms wurde zur besseren Anschaulichkeit nicht durchgeführt. Da mit den AUC-Werten keine weiteren physikalischen Berechnungen durchgeführt wurden, erschien dieser pragmatische Ansatz aus unserer Sicht im Sinne der Anschaulichkeit vertretbar.

Die Position des Linearschlittens wurde in der Einheit inc aufgezeichnet, wobei 1 inc = 1  $\mu\text{m}$  entspricht. Eine präzise Positionsbestimmung des Geräts war entscheidend für die Berechnung der Veränderung des JA in Relation zur benötigten Kraft der Winkeländerung des Kniegelenks in der nachfolgenden statistischen Auswertung. Die Voreinstellung des Bewegungsradius der Extension durch die Definition der Start- und Zielposition des Arthrometers, der Beginn des Messvorgangs sowie die präzise Aufzeichnung der Messergebnisse konnten über die Webbrowser-App von Jenny Science am Computer gesteuert werden.

### 3.5.3 Durchführung des Messvorgangs und Beispielmessung

Vor dem Beginn der ersten Messung musste der Servocontroller mit dem Linearschlitten gekoppelt, an die Stromversorgung angeschlossen und über ein LAN-Kabel mit dem Computer verbunden werden. Anschließend wurde eine Kalibrierung und Testmessung des Arthrometers mit Hilfe der Webbrowser-App durchgeführt. Für die Fixierung des Rattenbeins in der Haltevorrichtung musste das Bein zunächst am Hüftgelenk amputiert, präpariert und myotomiert werden, um potenzielle myotone Einflüsse auf das Messergebnis zu eliminieren und eine stabile Positionierung in der Haltevorrichtung zu gewährleisten. Bei der Fixierung des Ober- und Unterschenkels in dem Arthrometer war es essenziell, Manipulationen des Kniegelenks zu vermeiden, um eine unbeabsichtigte manuelle Extension vor der eigentlichen Messung zu verhindern und somit die Verringerung eines potenziellen Effekts der Medikamente auszuschließen. Abschließend wurden die Messparameter für den Bewegungsradius der maximalen Extension in die Webbrowser-App eingegeben.

Die getestete und voreingestellte Position des Geräts umfasste einen Bewegungsradius von 0 bis 40000 inc. Dieser Messbereich wurde in vorangegangenen Probemessungen an der kontralateralen Extremität ermittelt und entsprach abhängig vom initialen Startwinkel einem Bewegungsumfang von bis zu 200°. Vor Beginn des Messvorgangs wurde eine fotografische Aufnahme des eingespannten Rattenbeins in mittiger Ausrichtung der Stoppklemme und des Femurs von oben angefertigt. Die Aufnahme erfolgte mit der Kamera eines handelsüblichen Apple iPhone 12. Das Foto wurde mit Hilfe eines fixierten Handyständers aufgenommen, um eine Reproduzierbarkeit und Konsistenz des Aufnahmewinkels sicherzustellen. Zum Start der biomechanischen Messung wurde der Motor über die Webbrowser-App von Jenny Science aktiviert, woraufhin das Arthrometer die automatisierte Kniegelenksexension und die Erfassung der Messwerte selbstständig durchführte. Nach Abschluss der einzelnen Messungen wurde der Datensatz, bestehend aus den erhobenen Messwerten und dem zugehörigen Graphen, auf dem Computer gespeichert.

Die vor Beginn des Messvorgangs erstellte fotografische Aufnahme wurde in der nachfolgenden statistischen Analyse verwendet, um den JA des Kniegelenks mithilfe der kostenfreien Analysesoftware ImageJ Version 153.t (271) zu bestimmen. Hierzu wurde für die Bestimmung der tibialen Achse in lateraler Ansicht eine Linie mittig durch das obere Sprunggelenk und Tibiaplateau gezeichnet (Abb. 10).

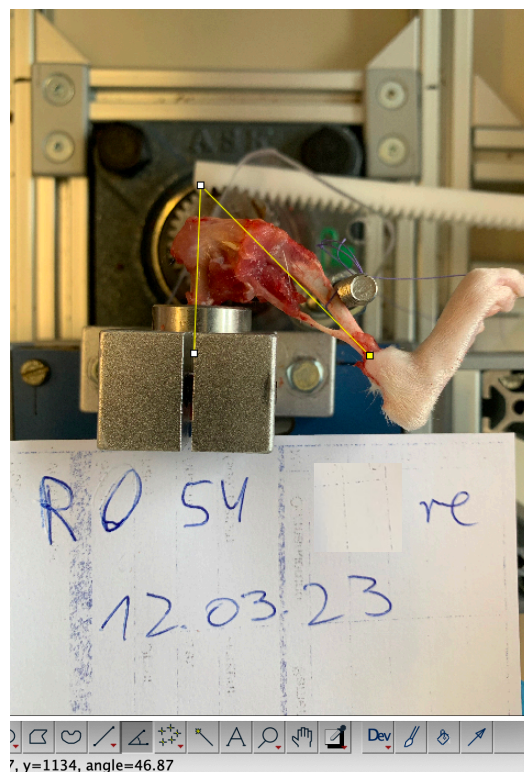


Abb. 10: Messung des Startwinkels mittels ImageJ

Für die femorale Achse wurde eine Linie entlang der mittigen Diaphyse des Femurs gelegt. Der resultierende JA am Schnittpunkt der beiden Achsen entsprach dem aktuellen Winkel des Kniegelenks und diente als Startwinkel der Messung in der späteren statistischen Auswertung.

Abbildung 11 zeigt eine vom Arthrometer erstellte, exemplarische grafische Darstellung der Messergebnisse des Bewegungsradius des rechten Kniegelenks eines Versuchstieres aus der Bosentan-Gruppe. Auf der x-Achse ist der Zeitverlauf in *Sekunden* (s) abgebildet, während die linke y-Achse die Position des Gerätes in inc und die rechte Seite der y-Achse die gemessene Stromstärke in mA darstellt.

Das Arthrometer initiierte den Messvorgang stets mit einer leichten Flexion in den ersten 1,538 s nach Beginn der Aufzeichnung, gefolgt von einer Hyperextension und der anschließenden Rückführung des Kniegelenks in die Ausgangsposition. Die negativen iForce-Messwerte, die annähernd ab 4,2 s auftraten, sind durch das Nachlassen der Spannung nach der Kapselruptur infolge der Hyperextension entstanden. In der grafischen Darstellung repräsentiert die blaue Kurve die jeweilige Position des Geräts im Zeitverlauf, einschließlich der Vor- und Rückstellbewegung des Linearschlittens. Weitere vom Arthrometer gemessene Parameter umfassten die Geschwindigkeit der Messung (Velocity) in inc/s sowie die Abweichung (Deviation) in inc. Die Velocity und Deviation wurden als Messparameter in der späteren Auswertung nicht explizit berücksichtigt, da die Deviation während der gesamten Messungen konstant nahezu null betrug. Die Position des Linearschlittens zu Beginn der Kniegelenksexension wurde im Graphen durch einen schwarzen Pfeil markiert. Die gelbe Kurve stellt den zeitlichen Verlauf der iForce dar, wobei der Anstieg der iForce synchron mit dem Einsetzen der Extension erfolgte. Der maximale aufgezeichnete iForce-Wert wurde in Abb. 11 durch einen roten Pfeil hervorgehoben.

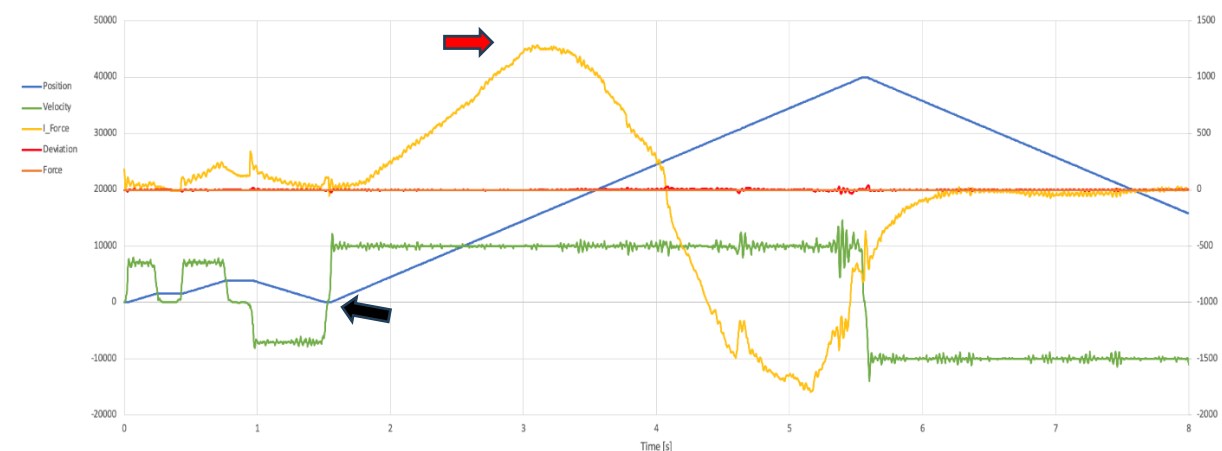


Abb. 11: Bewegungsradius Versuchstier der Gruppe A gelber Graph: iForce, blauer Graph: Geräteposition

### 3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Aufbereitung und Analyse der biomechanischen Messungen wurden mithilfe der Computerprogramme Microsoft® Excel (272) und Prism® (273) durchgeführt. Hierzu wurde der Datensatz auf den relevanten Messbereich zwischen dem Beginn der Extension (ab 1.538 s) und dem Start der Rückführung des zu messenden Beins eingegrenzt. Im Anschluss wurden die in Kapitel 3.5.1 dargestellten Konvertierungen zur Bestimmung der Kraft, basierend auf der gemessenen Stromstärke, in Abhängigkeit vom JA und der Position des Gerätes, auf die ermittelten Messwerte angewendet. Für die Bestimmung des durch die Positionsänderung des Arthrometers veränderten JA wurde der mit ImageJ berechnete Startwinkel additiv um das Produkt aus der Geräteposition und dem in Kapitel 3.5.1 berechneten Winkel pro inc ( $0,00385^\circ/\text{inc}$ ) erweitert. Hierdurch konnte die berechnete Kraft nicht mehr nur der Geräteposition, sondern einem spezifischen JA zugeordnet werden. Für eine erleichterte Übersicht und Vergleichbarkeit der Messwerte wurde der Mittelwert der Kraft aus den 20 Messpunkten pro Winkelgrad gebildet. Aus den resultierenden Werten wurden das Drehmoment bei 35 N·mm in Abhängigkeit vom korrelierenden Winkel und die Fläche unter der Kurve in  $10^\circ$ -Schritten zwischen  $80^\circ$  und  $150^\circ$  berechnet. Alle Messergebnisse wurden im Verlauf der statistischen Analyse auf die zweite Nachkommastelle gerundet. Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsgruppen wurden anschließend mittels Winsorizing und einem Trimfaktor von 0,1 transformiert, um den Einfluss extremer Ausreißer in der statistischen Analyse zu minimieren (274).

Für die statistische Testung und grafische Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm Prism® Version 10.1.0 (273) verwendet. Der JA bei 35 N·mm, die AC sowie die AUC wurden mittels one-way ANOVA-Test analysiert, während die Messergebnisse des Gewichtsverlaufs der Versuchstiere mit einem two-way ANOVA-Test untersucht wurden. Für die Gegenüberstellung der Versuchsgruppen untereinander wurde zusätzlich ein Tukey Multiple Comparisons Test eingesetzt, für den Vergleich der Gruppen gegen die Kontrollgruppe der Dunnetts Multiple Comparisons Test. Eine statistische Signifikanz wurde ab einem  $p$ -Wert ( $p$ ) von  $p < 0,05$  angenommen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mit \* für  $p$ -Werte  $< 0,05$  und \*\*\* für  $p$ -Werte  $< 0,001$  angegeben. Eine statistische Tendenz wurde ab einem  $p$ -Wert  $< 0,20$  berücksichtigt. Die Messergebnisse der JAs bei 35 N·mm und der AC wurden grafisch mit Hilfe von Boxplot-Diagrammen abgebildet. Für die Darstellung des Gewichtsverlaufs der Ratten und der AUC wurden XY-Diagramme und Balkendiagramme verwendet. In den Boxplot-Diagrammen wurden Ausreißer durch Whiskers oberhalb und unterhalb der Box angezeigt, wobei jedes Ende den kleinsten bzw. größten gemessenen Wert repräsentiert. Die Box zeigt den *Interquartilsabstand* (IQR)

der Messwerte, in der der Mittelwert als Kreuz und der Median als horizontale Linie abgebildet wurden. Die *Standardabweichung* (SD) wurde durch  $\pm$  bei der Darstellung der Mittelwerte angegeben.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Perioperative Verlaufskontrolle des Gewichts und Komplikationen

Vor Beginn des operativen Eingriffs wurde jedes Versuchstier am Tag der Operation gewogen. Dies diente sowohl zur Erfassung eines Referenzwerts für die Erkennung potenzieller postoperativer Komplikationen im Hinblick auf relevante Abbruchkriterien des Versuchs (vgl. Kapitel 3.1.2) als auch zur Berechnung der gewichtsadaptierten individuellen Dosierung der Anästhetika sowie der Versuchsmedikamente (vgl. Kapitel 3.3.1). Im weiteren Verlauf des Experiments erfolgte die Gewichtsbestimmung der Ratten in den ersten vier postoperativen Tagen täglich, jeweils abends im Rahmen der Medikamentengabe und der täglichen Kontrolle auf potenzielle Abbruchkriterien. Ab dem 5. Tag wurde die Gewichtsmessung, insofern in den ersten vier Tagen keine Auffälligkeiten im Gewichtsverlauf festgestellt wurden, ohne zusätzliche Zwischenmessungen jeweils am 8., 11. und 14. Tag durchgeführt.

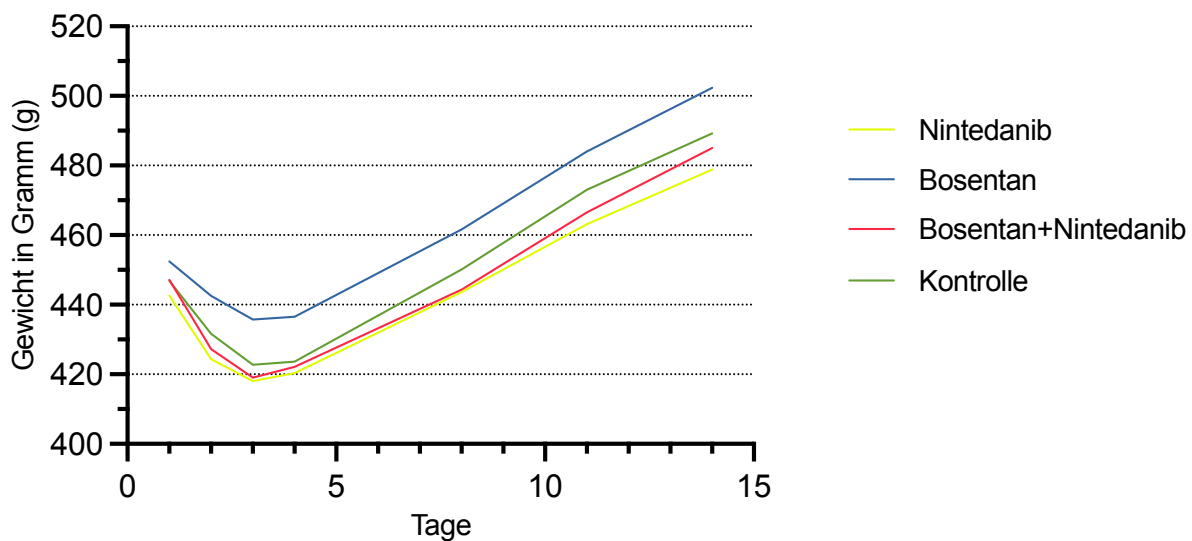


Abb. 12: Übersicht des Gewichtsverlaufs der Versuchstiere

Abbildung 12 zeigt den Gewichtsverlauf der Versuchstiere über einen Beobachtungszeitraum von 14 Tagen. Das durchschnittliche Ausgangsgewicht aller Versuchsgruppen an Tag 1 vor dem operativen Eingriff betrug  $447,26 \text{ g} \pm 27,92 \text{ g}$ . Die Versuchstiere der Bosentan-Gruppe wiesen an Tag 0 ein um 5 g über dem Gesamtdurchschnitt liegendes mittleres Körpergewicht von  $452,46 \text{ g} \pm 29,82 \text{ g}$  auf. Die Tiere der Nintedanib-Gruppe hatten ein um 5 g unter dem Gesamtdurchschnitt liegendes Durchschnittsgewicht ( $442,62 \text{ g} \pm 21,75 \text{ g}$ ). Das mittlere Körpergewicht der Versuchsgruppe, die mit der Kombinationstherapie Bosentan+Nintedanib behandelt wurde, betrug  $447,15 \text{ g} \pm 39,27 \text{ g}$ , während das Durchschnittsgewicht der Placebo-

Gruppe bei  $446,08 \text{ g} \pm 20,28 \text{ g}$  lag. Somit befand sich das Ausgangsgewicht der beiden letztgenannten Gruppen unmittelbar im Bereich des mittleren Körpergewichts aller Versuchstiere. Am Ende des zweiwöchigen Versuchszeitraums betrug das durchschnittliche Gewicht aller Tiere vor der Euthanasie  $488,89 \text{ g} \pm 32,14 \text{ g}$ . Die Versuchstiere der Bosentan-Gruppe wiesen an Tag 14 ein mittleres Gewicht von  $502,38 \text{ g} \pm 31,38 \text{ g}$  auf, während die Nintedanib-Gruppe  $478,85 \text{ g} \pm 31,70 \text{ g}$ , die Bosentan+Nintedanib-Gruppe  $485,08 \text{ g} \pm 39,02 \text{ g}$  und die Placebo-Gruppe  $498,23 \text{ g} \pm 25,33 \text{ g}$  erreichten. Die Tiere verzeichneten eine mittlere Gewichtszunahme von  $2,72 \text{ g}$  in den ersten 8 Tagen des Versuchszeitraums, gefolgt von einer Zunahme von  $38,91 \text{ g}$  zwischen Tag 8 und Tag 14.

Einige der Tiere zeigten in den ersten drei Tagen nach der Operation einen leichten Gewichtsverlust, der jedoch zu keinem Zeitpunkt die als Abbruchkriterium definierte Grenze von 20% des individuellen Ausgangsgewichts unterschritt. Der größte Gewichtsverlust im Beobachtungszeitraum wurde in den ersten postoperativen Tagen bei einem Versuchstier der Bosentan+Nintedanib-Gruppe mit 13% dokumentiert. Das Körpergewicht normalisierte sich jedoch in den darauffolgenden Tagen. Die anschließende statistische Analyse mittels two-way ANOVA-Test und Tukey Multiple Comparison Test zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Gewichtsentwicklung zwischen den Versuchsgruppen ( $p = 0,44$ ).

Im Verlauf der Studie traten bei einigen wenigen Versuchstieren Komplikationen auf, die deren Ausschluss aus dem Experiment, oder aus Teilen der statistischen Auswertung erforderlich machten. Innerhalb der ersten drei postoperativen Tage entwickelte eine Ratte eine etwa  $10 \times 20 \text{ mm}$  große Wunddehiszenz an der Oberschenkelnaht. Obwohl das Tier keine Anzeichen von Schmerzen, Verhaltensauffälligkeiten oder Veränderungen im Trink- oder Fressverhalten zeigte, entschied der Versuchsleiter aufgrund der Größe der Wunddehiszenz, das Versuchstier vorzeitig aus dem Versuch auszuschließen und unmittelbar mittels  $\text{CO}_2$  zu euthanasieren. Zudem verstarb ein weiteres Versuchstier während der Operation unter Narkose und konnte trotz sofort eingeleiteter Flüssigkeitsverabreichung sowie intraperitonealer Gabe des Antidots nicht reanimiert werden. Im Verlauf der biomechanischen Messungen wurden fünf weitere Tiere ausgeschlossen: zwei Versuchstiere aufgrund eines Messfehlers des Arthrometers sowie drei Tiere aufgrund von Femurfrakturen, die während des Messvorgangs auftraten. Da die resultierenden Messdaten unbrauchbar waren, konnten sie in die spätere Analyse nicht mit einbezogen werden. Die Daten dieser fünf Tiere wurden dennoch in die statistische Auswertung der Gewichtsentwicklung einbezogen. Die ausgeschiedenen Versuchstiere wurden im Laufe des Experiments nicht ersetzt, wodurch sich die endgültige Versuchsgruppengröße wie folgt ergab: 10 Tiere in der Bosentan-, 13 Tiere in der Nintedanib- sowie jeweils 11 Tiere in der Bosentan+Nintedanib- und der Placebo-Gruppe.

## 4.2 Biomechanische Messungen

Der primäre Endpunkt dieser Studie bestand in der Verbesserung des Bewegungsradius sowie Reduktion der AC nach PTGK des Kniegelenks und zweiwöchiger Immobilisation im Rattenmodell durch die orale Gabe von Bosentan, Nintedanib und der Kombination beider Medikamente im Vergleich zu einem Placebo. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde eine potenzielle Verbesserung der Kniegelenksexension anhand der in Kapitel 3.5 im Detail beschriebenen Messmethode geprüft. Dabei wurde ausschließlich die AC sowie die in Abhängigkeit vom JA erforderliche Kraft zur Extension in festgelegten Intervallen untersucht, ohne eine potenzielle Beeinflussung oder Verbesserung der myogenen Kontraktur zu berücksichtigen (vgl. Kapitel 3.5). Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der biomechanischen Messungen der Versuchsgruppen Bosentan, Nintedanib und Bosentan + Nintedanib im Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt.

Die biomechanischen Messungen und die anschließenden Berechnungen wurden anhand der nachfolgend aufgeführten Messparameter durchgeführt:

- **JA bei 35 N·mm nach periartikulärer Myotomie-** statische Messung  
Bestimmung des maximalen JA des Kniegelenks bei einem definierten Drehmoment von 35 N·mm zur Evaluierung des arthrogenen Anteils an der Gelenkbewegung
- **Arthrogene Gelenkkontraktur-** statische Messung  
Quantifizierung der durch die Kontraktur bedingten Einschränkung der Gelenkbeweglichkeit nach periartikulärer Myotomie als Indikator für das Ausmaß der arthrogenen Bewegungseinschränkung
- **Kraftentwicklung in Abhängigkeit vom JA-** dynamische Messung  
Messung der Kraftentwicklung in Abhängigkeit vom JA, dargestellt als AUC, um die benötigte Kraft zur Überwindung des Bewegungswiderstands des Kniegelenks in 10°-Intervallen zu ermitteln

#### 4.2.1 Gelenkwinkel bei 35 N·mm

Zum Nachweis einer AC des Kniegelenks sowie zur Ermittlung der Reduktion der AC durch die Applikation eines der Versuchsmedikamente wurde im Rahmen der biomechanischen Messungen der statische JA bei einem Drehmoment von 35 N·mm berechnet. Die Berechnung ermöglichte zudem eine Vergleichbarkeit mit vorangegangenen Studien, die ebenfalls einen verminderten JA bei 35 N·mm als Indikator einer Kontraktur herangezogen haben. Eine ausführliche Darstellung der Methodik ist in Kapitel 3.5.1 zu finden.

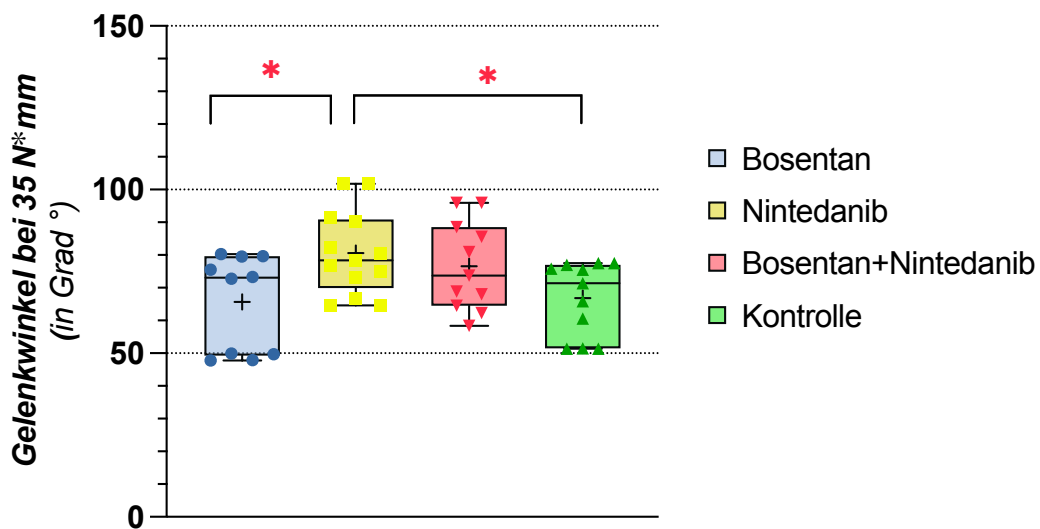


Abb. 13: JA aller Versuchsgruppen bei 35 N·mm nach zweiwöchiger Immobilisation und Myotomie rechts; \* ( $p < 0,05$ )

In den folgenden Untersuchungen zeigte sich im one-way ANOVA ein signifikanter Unterschied des JA zwischen den Versuchsgruppen ( $p < 0,05$ ) (Abb. 13). Die Nintedanib-Gruppe erreichte dabei mit einem Mittelwert von  $80,56^\circ \pm 12,64^\circ$  mit einer Differenz von  $13,7^\circ$  einen signifikant größeren JA als die Kontrollgruppe ( $66,86^\circ \pm 11,22^\circ$ ) ( $p < 0,05$ ). Die Bosentan+Nintedanib-Gruppe ( $76,62^\circ \pm 13,48^\circ$ ) wies einen um  $9,76^\circ$  größeren Bewegungsradius der Extension als die Kontrollgruppe auf, der keine signifikante Steigerung des Gelenkbeweglichkeit ergab, eine tendenzielle Verbesserung war in den Ergebnissen dennoch erkennbar ( $p = 0,2$ ). Im Gegensatz dazu konnte kein wesentlicher Unterschied des JA bei 35 N·mm unter der Therapie mit Bosentan (Mittelwert:  $63,36^\circ \pm 14,81^\circ$ ) gegenüber der Placebogabe (Mittelwert:  $66,86^\circ \pm 11,22^\circ$ ) ( $p = 0,99$ ) gezeigt werden. In der statistischen Analyse der Versuchsgruppen untereinander konnte darüber hinaus ein signifikanter Unterschied zwischen der Bosentan- und Nintedanib-Gruppe ( $p < 0,05$ ) mittels Tukey Multiple Comparison Test nachgewiesen werden (Abb. 13).

#### 4.2.2 Arthrogene Gelenkkontraktur

Den größten Einfluss auf die PTGK am Kniegelenk hat der arthrogene Anteil der Kontraktur (32). Aus diesem Grund wurde auf Grundlage der Berechnung der JAs am rechten Kniegelenk bei 35 N·mm sowie der des physiologischen Gelenkwinkels nach Myotomie (pGnM) am linken Kniegelenk in allen Versuchsgruppen die in Kapitel 3.5 erläuterte Formel für die Berechnung der AC angewendet. Ein individueller Vergleich des linken und rechten Kniegelenks jeder Ratte zur Berechnung der AC konnte aufgrund zweier Messfehler des Arthrometers, bei denen es zu einer negativen Aufzeichnung der iForce und damit zu einer fehlerhaften Messung der notwendigen Kraft kam, und drei während des Messvorgangs aufgetretenen Femurfrakturen nicht durchgeführt werden (vgl. Kapitel 4.1). Aufgrund der fehlenden Datensätze einzelner Tiere wurde alternativ der Mittelwert der jeweiligen Versuchsgruppe herangezogen.

Tab. 4: Übersicht der Mittelwerte der JAs  $\pm$  Standardabweichung des linken und rechten Kniegelenks des pGnM, bei 35 N·mm, der AC(G) und AC(K)

Versuchsgruppe	pGnM links	35 N·mm rechts	AC(G)	AC(K)
Bosentan	158,22° $\pm$ 14,09°	65,65° $\pm$ 14,71°	92,57° $\pm$ 14,71°	82,98° $\pm$ 14,71°
Nintedanib	147,54° $\pm$ 30,97°	80,56° $\pm$ 12,64°	66,98° $\pm$ 12,64°	68,07° $\pm$ 12,64°
Bosentan+Nintedanib	151,76° $\pm$ 27,51°	76,62° $\pm$ 13,48°	75,14° $\pm$ 13,48°	72,01° $\pm$ 13,48°
Placebo	148,63° $\pm$ 20,08°	66,86° $\pm$ 11,22°	81,77° $\pm$ 11,22°	81,77° $\pm$ 11,22°

Die Bosentan-Gruppe wies eine AC von 92,57°  $\pm$  14,71° basierend auf dem pGnM der eigenen Versuchsgruppe (AC(G)) und eine AC von 82,98°  $\pm$  14,71° unter Verwendung des pGnM der Kontrollgruppe (AC(K)) auf. Die auffällige Differenz von etwa 9,59° zwischen den beiden Werten der AC in Tab. 4 ist auf den gemessenen Mittelwert des linken pGnM der Bosentan-Gruppe zurückzuführen. Aufgrund dieses deutlichen Unterschieds des pGnM des linken Kniegelenks und dessen Einfluss auf die AC haben wir uns entschieden, eine zusätzliche alternative Darstellung der Ergebnisse zu verwenden und den pGnM der Kontrollgruppe als Referenz für alle Gruppen heranzuziehen. Diese Vorgehensweise hatte den weiteren Vorteil, potenzielle systemische Effekte der Medikamente auf das gesunde, linke Kniegelenk auszuschließen und den pGnM mit den geringsten externen Einflüssen darzustellen.

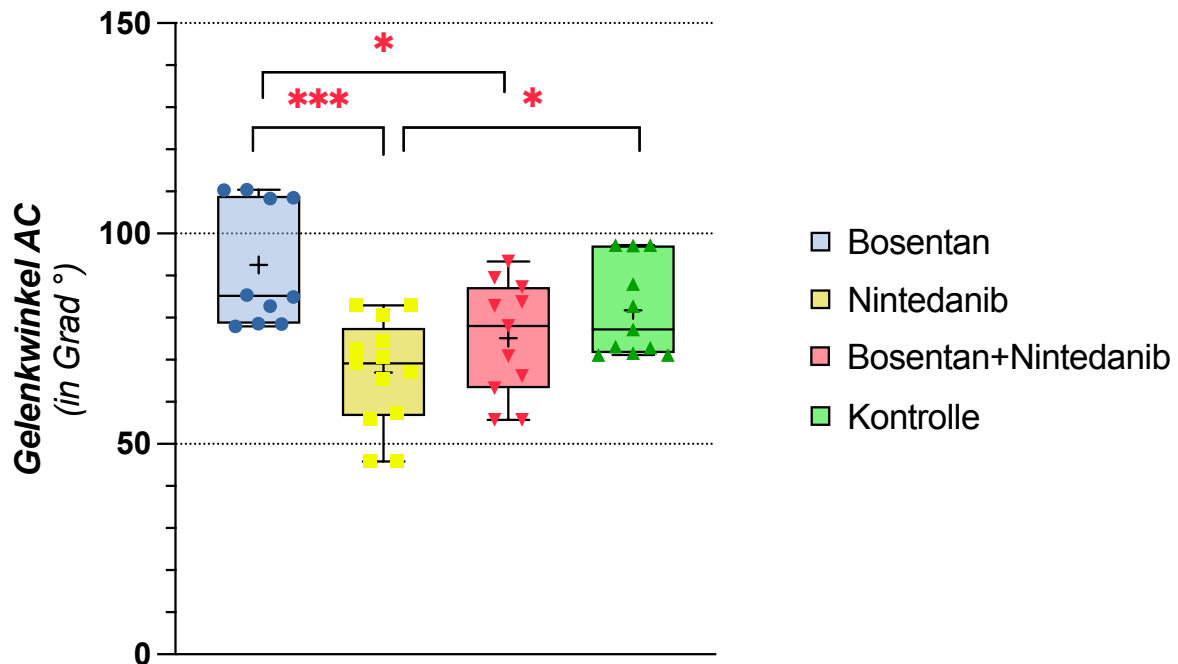
4.2.2.1 Arthrogene Kontraktur- AC(G)

Abb. 14: Darstellung der AC(G) des rechten Kniegelenks gegenüber dem pGnM des linken Kniegelenks der jeweiligen Versuchsgruppe; \* ( $p < 0,05$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ )

In den Ergebnissen der AC(G), basierend auf dem pGnM-Referenzwert der Versuchsgruppen, zeigte sich gegenüber dem Placebo ( $81,77^\circ \pm 11,22^\circ$ ) unter Bosentan ( $92,57^\circ \pm 14,71^\circ$ ) keine signifikante Reduktion der Kontrakturstärke, sondern eine gegenteilige tendenzielle Verstärkung der Kontraktur ( $p = 0,16$ ). Im Vergleich der Nintedanib-Gruppe ( $66,98^\circ \pm 12,64^\circ$ ) mit der Kontrollgruppe ( $81,77^\circ \pm 11,22^\circ$ ) konnte erneut eine signifikant reduzierte AC ( $p < 0,05$ ) nachgewiesen werden. Die Verabreichung der Kombinationstherapie aus Bosentan+Nintedanib ( $75,14^\circ \pm 13,48^\circ$ ) führte im Vergleich zur Placebo-Gruppe ( $81,77^\circ \pm 11,22^\circ$ ) zu keinem signifikanten Unterschied in der AC(G) ( $p = 0,5$ ).

In der statistischen Analyse zwischen allen Versuchsgruppen zeigten sich ebenfalls Unterschiede in der arthrogenen Kontrakturstärke (Abb. 14). Die Bosentan-Gruppe ( $92,57^\circ \pm 14,71^\circ$ ) wies sowohl im Vergleich zur Nintedanib-Gruppe ( $66,98^\circ \pm 12,64^\circ$ ) ( $p < 0,001$ ), als auch gegenüber der Kombinationstherapie ( $75,14^\circ \pm 13,48^\circ$ ) ( $p < 0,05$ ) eine signifikant gesteigerte Kontrakturbildung auf. Zwischen der Nintedanib-Monotherapie und der Kombinationstherapie Bosentan+Nintedanib konnte hingegen kein eindeutiger Unterschied in der Kontrakturstärke festgestellt werden ( $p = 0,43$ ).

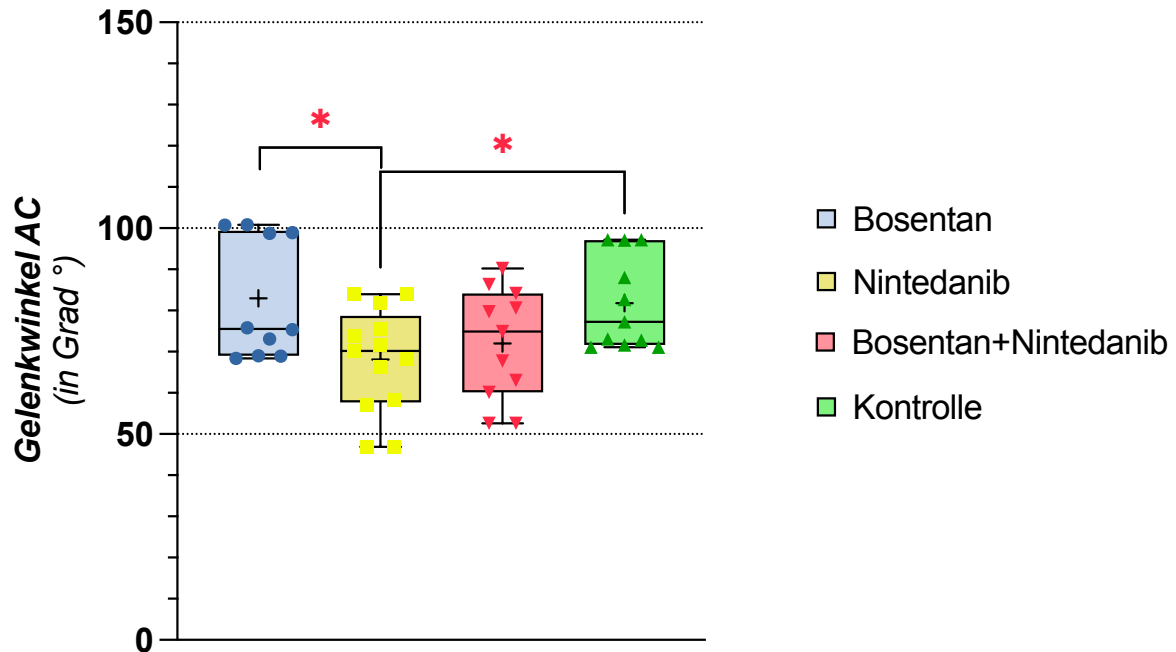
4.2.2.2 Arthrogene Kontraktur- AC(K)

Abb. 15: Darstellung der AC(K) des rechten Kniegelenks gegenüber dem pGnM des linken Kniegelenks der Kontrollgruppe; \* ( $p < 0,05$ )

Im Vergleich zu den Ergebnissen der Messung der AC(G) zeichneten sich bei den Ergebnissen der AC(K), auf Grundlage der pGnM der Kontrollgruppe, lediglich geringfügige Veränderungen ab (Abb. 15).

Die systemische Gabe von Bosentan ( $82,98^\circ \pm 14,71^\circ$ ) zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $81,77^\circ \pm 11,22^\circ$ ) keine signifikante Verbesserung des Extensionsradius und damit keinen positiven Einfluss auf die AC ( $p = 0,99$ ). Im Gegensatz dazu wies die Nintedanib-Gruppe ( $68,07^\circ \pm 12,64^\circ$ ) eine messbare signifikante Reduktion der AC gegenüber dem Placebo auf ( $p < 0,05$ ). Nach der Verabreichung der Kombinationstherapie ( $72,01^\circ \pm 13,48^\circ$ ) konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $81,77^\circ \pm 11,22^\circ$ ) erneut keine signifikant reduzierte AC festgestellt werden, eine Tendenz war jedoch marginal erkennbar ( $p = 0,2$ ).

In der statistischen Analyse unter der Anwendung des Tukey Multiple Comparison Test zeigte sich im Vergleich zu den Ergebnissen der AC(G) (vgl. Kapitel 4.2.2.1) gleichfalls weiterhin eine signifikante Reduktion der AC in der Nintedanib-Gruppe ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Bosentan-Gruppe.

Abbildung 16 veranschaulicht den gesamten Bewegungsradius des rechten Kniegelenks der vier Versuchsgruppen bis zu einem Maximum von 180°. Eine detaillierte Aufschlüsselung der einzelnen Messparameter in Bezug auf den Bewegungsumfang des Kniegelenks ist in Kapitel 3.5 aufgeführt. Diese Darstellung ermöglicht die Visualisierung des Anteils des JA bei 35 N·mm, der AC sowie des physiologischen Streckdefizits an der gesamten ROM jeder Versuchsgruppe. Der erhöhte JA und die reduzierte AC in der Nintedanib-Gruppe im Vergleich zur Bosentan- und Kontrollgruppe wurden sowohl durch die Berechnung der AC(G) als auch der AC(K) erfasst und grafisch vergleichend dargestellt.

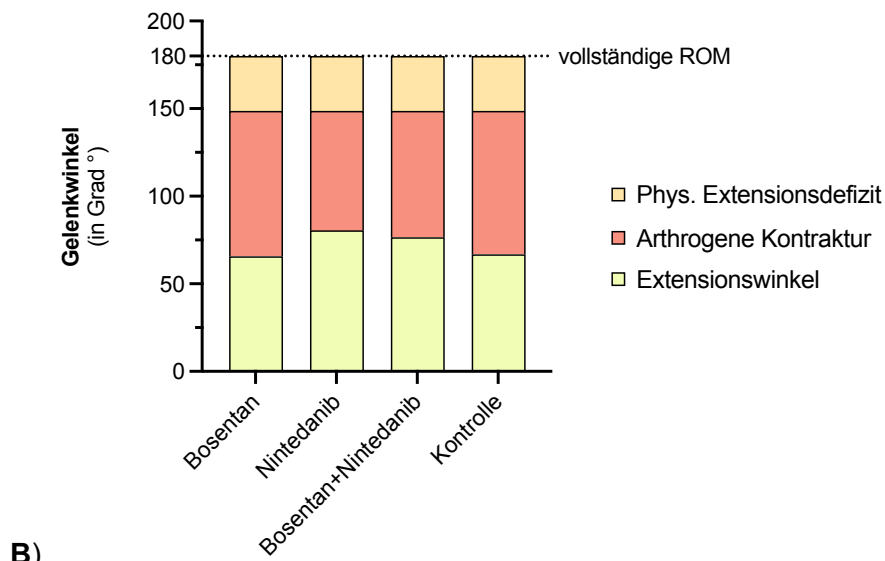
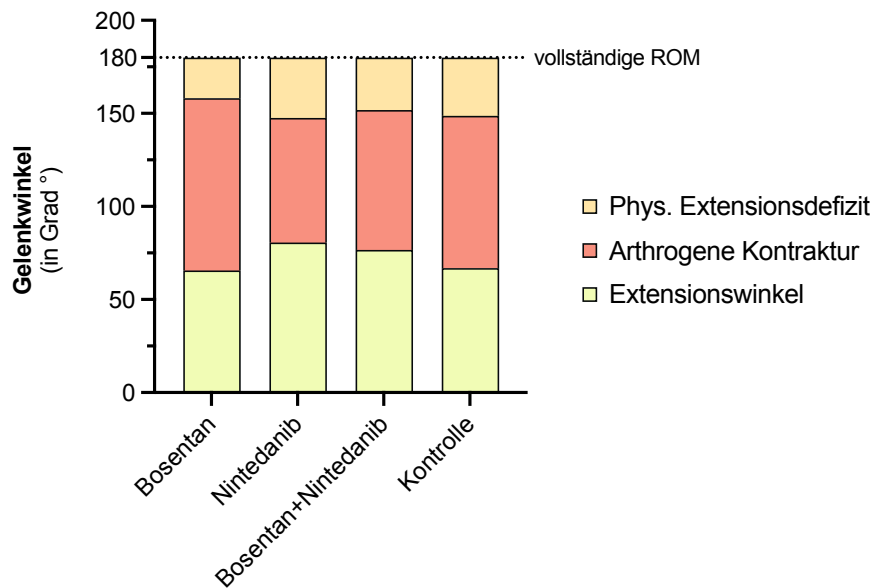


Abb. 16: Übersicht der ROM des rechten Beins der (A) AC(G)- und (B) AC(K)-Berechnung

### 4.2.3 Dynamische Kraftentwicklung in Abhängigkeit vom Gelenkwinkel

Der vollständige Bewegungsradius der Extension und die gesamte PTGK konnten mit Hilfe des eingesetzten Arthrometers erfasst und dynamisch dargestellt werden. Hierzu wurde die AUC für die in Abb. 17 dargestellten Winkel berechnet, wobei die in Kapitel 3.5.2 im Detail erläuterte Formel auf jedes Versuchstier und jede Versuchsgruppe angewendet wurde. Die Kraftmessung wurde dabei unter Verwendung eines Hebelarms von 28 mm (vgl. Kapitel 3.5.1) durchgeführt. Der definierte Messbereich von 80° bis 150° wurde auf Grundlage der gemessenen Startwinkel und der berechneten Mittelwerte der maximalen pGnM festgelegt.

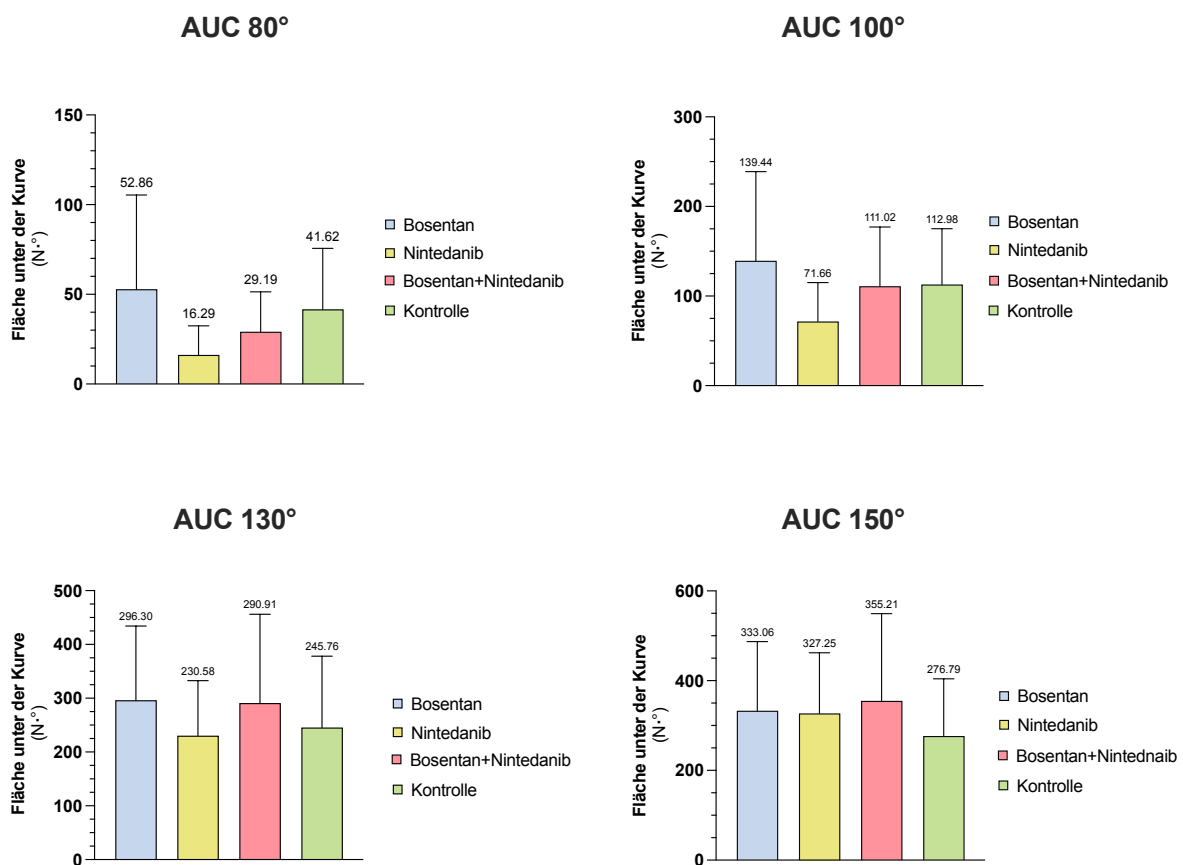


Abb. 17: Darstellung der AUC bei 80°, 100°, 130° und 150°; der Mittelwert der jeweiligen Versuchsgruppe ist oberhalb des Fehlerbalkens abgebildet.

Bei der AUC von 80° zeigte sich unter Bosentan eine größere Kraftänderung von  $52,86 \text{ N} \cdot ^\circ \pm 52,55 \text{ N} \cdot ^\circ$  im Vergleich zum Placebo mit  $41,62 \text{ N} \cdot ^\circ \pm 29,8 \text{ N} \cdot ^\circ$  ( $p = 0,56$ ). Die Versuchsgruppen, die mit Nintedanib ( $16,29 \text{ N} \cdot ^\circ \pm 16,2 \text{ N} \cdot ^\circ$ ) und der Kombinationstherapie ( $29,19 \text{ N} \cdot ^\circ \pm 21,92 \text{ N} \cdot ^\circ$ ) behandelt wurden, wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine um

61% (Nintedanib) und 30% (Bosentan+Nintedanib) reduzierte Gesamtkraftaufwendung zur Erreichung eines JA von 80° auf. Unter der Therapie mit Nintedanib war jedoch eine tendenziell verringerte Kraftentwicklung gegenüber dem Placebo ( $p = 0,16$ ) erkennbar.

In den Ergebnissen der AUC 100° (Abb. 17) zeigte sich ein ähnliches Muster. Die mit Bosentan behandelte Versuchsgruppe verzeichnete mit  $139,44 \text{ N} \cdot ^\circ \pm 99,49 \text{ N} \cdot ^\circ$  die höchste Kraftentwicklung aller Versuchsgruppen, jedoch ohne statistische Signifikanz ( $p = 0,71$ ). Im Vergleich dazu fand sich bei der Nintedanib-Gruppe ( $71,66 \text{ N} \cdot ^\circ \pm 43,49 \text{ N} \cdot ^\circ$ ) eine reduzierte Kraftaufwendung, die zwar unterhalb des Wertes der Kontrollgruppe ( $112,98 \text{ N} \cdot ^\circ \pm 62,24 \text{ N} \cdot ^\circ$ ) lag, jedoch ebenfalls kein signifikantes Ergebnis aufwies ( $p = 0,33$ ). Auffällig war die Zunahme der erforderlichen Kraft in der AUC 100° bei der Kombinationstherapie Bosentan+Nintedanib, deren Gesamtkraftentwicklung mit  $111,02 \text{ N} \cdot ^\circ \pm 66,01 \text{ N} \cdot ^\circ$  nahezu gleichauf mit der Placebo-Gruppe lag ( $p = 0,99$ ).

Die AUC der Bosentan-Gruppe zeigte bei der Kniegelenksexension auf 130° mit  $296,3 \text{ N} \cdot ^\circ \pm 137,83 \text{ N} \cdot ^\circ$  weiterhin die größte Fläche unter der Kurve und folglich die höchste Kraftentwicklung aller untersuchten Gruppen ( $p = 0,72$ ). Die mit Nintedanib behandelte Versuchsgruppe wies bei 130° mit  $230,58 \text{ N} \cdot ^\circ \pm 101,93 \text{ N} \cdot ^\circ$  erstmals eine nahezu gleiche Gesamtkraftentwicklung wie die Kontrollgruppe ( $245,76 \text{ N} \cdot ^\circ \pm 132,38 \text{ N} \cdot ^\circ$ ) auf ( $p = 0,99$ ). Auch die Kraftaufwendung der Kombinationstherapie Bosentan+Nintedanib nahm auf  $290,01 \text{ N} \cdot ^\circ \pm 165,30 \text{ N} \cdot ^\circ$  zu und übertraf damit zunehmend die der Kontrollgruppe ( $p = 0,77$ ).

Abschließend wurde die Kraftentwicklung aller Versuchsgruppen bei einer Extension bis 150° analysiert (Abb. 17). Die Gruppen, die mit Bosentan ( $333,06 \text{ N} \cdot ^\circ \pm 154,05 \text{ N} \cdot ^\circ$ ), Nintedanib ( $327,25 \text{ N} \cdot ^\circ \pm 134,74 \text{ N} \cdot ^\circ$ ) sowie der Kombinationstherapie ( $355,21 \text{ N} \cdot ^\circ \pm 194,16 \text{ N} \cdot ^\circ$ ) behandelten wurden, zeigten vergleichbare Ergebnisse bei 150°. Im Gegensatz dazu wies die Placebo-Gruppe einen deutlich geringeren Mittelwert ( $276,79 \text{ N} \cdot ^\circ \pm 127,28 \text{ N} \cdot ^\circ$ ) auf, ohne jedoch eine statistisch signifikante Reduktion der Kraftentwicklung im Vergleich zu den Medikamentengruppen darzustellen (Bosentan:  $p = 0,73$ ; Nintedanib:  $p = 0,76$ ; Bosentan+Nintedanib:  $p = 0,5$ ).

Die statistische Auswertung mittels Tukey Multiple Comparison Test zeigte, dass die AUC bei 80° und 90° unter der Behandlung von Nintedanib signifikant geringer war als unter Bosentan ( $p < 0,05$ ). Ein tendenziell vorteilhafter Effekt von Nintedanib auf die Kraftentwicklung im Vergleich zu Bosentan wurde zudem bei der AUC 100° ( $p = 0,11$ ) beobachtet. Darüber hinaus konnten weder innerhalb der übrigen Versuchsgruppen noch zwischen den Ergebnissen der AUC 100° bis AUC 150° aussagekräftige Unterschiede hinsichtlich der notwendigen Kraft zur Erreichung des definierten Extensionsumfangs festgestellt werden.

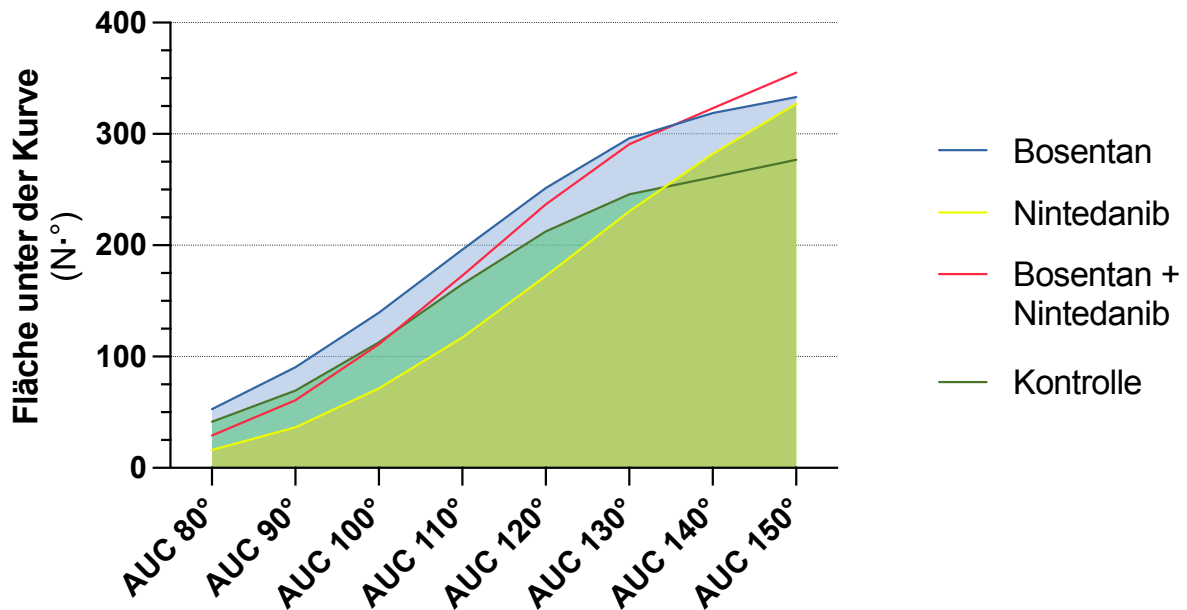
4.2.4 AUC Gesamtübersicht

Abb. 18: Übersicht der Gesamt-ROM aller Versuchsgruppen

Die vollständige Kraftentwicklung jeder Versuchsgruppe in 10°-Intervallen innerhalb des Bewegungsbereichs der rechten Kniegelenksexension von 80° bis 150° wird in Abb. 18 dargestellt. Die statistische Analyse der Kraftentwicklung im definierten Extensionsbereich unter Anwendung des one-way ANOVA-Tests ( $p = 0,73$ ) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Medikamentengruppen und der Kontrollgruppe (Bosentan:  $p = 0,65$ ; Nintedanib:  $p = 0,99$ ; Bosentan+Nintedanib:  $p = 0,95$ ).

Dieses Resultat spiegelte sich auch in den Ergebnissen der  $AUC_{\text{gesamt}}$  der Versuchsgruppen wider. Die Behandlung mit Bosentan führte zu einer  $AUC_{\text{gesamt}}$  von  $1485 \text{ N} \cdot ^\circ \pm 224,6 \text{ N} \cdot ^\circ$ , was die höchste erforderliche Kraftaufwendung im definierten Bewegungsumfang aller Versuchsgruppen darstellte und somit den geringsten Effekt auf die Reduktion der AC aufwies. Im Gegensatz dazu zeigte die Gabe von Nintedanib mit einer  $AUC_{\text{gesamt}}$  von  $1083 \text{ N} \cdot ^\circ \pm 152,7 \text{ N} \cdot ^\circ$  den niedrigsten Messwert und damit die geringste Kraftaufwendung, wobei die Kraftentwicklung über den gesamten Bewegungsbereich etwas geringer als die der Kontrollgruppe ( $AUC_{\text{gesamt}} = 1227 \text{ N} \cdot ^\circ \pm 188,3 \text{ N} \cdot ^\circ$ ) war. Die Kombinationstherapie von Bosentan+Nintedanib lag mit einem  $AUC_{\text{gesamt}}$  von  $1388 \text{ N} \cdot ^\circ \pm 237,2 \text{ N} \cdot ^\circ$  im mittleren Bereich der Versuchsgruppen. Auffällig war darüber hinaus die abnehmende Steigung der Graphen der Bosentan- und Kontrollgruppe, die ab einer AUC von 130° sichtbar wurde (Abb. 18).

## 5 Diskussion

In diesem Experiment wurde anhand eines Tiermodells mit 45 männlichen Sprague-Dawley-Ratten ein potenzieller präventiver Therapieansatz der PTGK unter der zweiwöchigen oralen Gabe von Bosentan, Nintedanib, der Kombination beider Medikamente und eines Placebos untersucht. Hierzu wurde ein neuartiges, objektivierbares und dynamisches Messverfahren zur Bestimmung der Kraftentwicklung und der ROM des Kniegelenks eingesetzt.

### 5.1 Ergebnisse der statischen ROM-Messungen

#### 5.1.1 Der Einfluss von Bosentan auf die ROM

In der wissenschaftlichen Gemeinschaft besteht ein weitgehender Konsens über die Einflussnahme von ET-1 (vgl. Kapitel 2.2.3) auf die Pathogenese der Fibrose (138). Frühere klinische Studien konnten bereits erhöhte ET-1-Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit des Kniegelenks im Rahmen entzündlicher Erkrankungen wie der *rheumatoiden Arthritis* (RA) und OA nachweisen (275, 276). Die Inhibition von ET-1 könnte daher einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz in der Behandlung der PTGK darstellen. In diesem Experiment wurde erstmals untersucht, inwieweit die orale Gabe des ET-1-Antagonisten Bosentan die Reduktion der AC bei der PTGK des Kniegelenks im Tiermodell beeinflussen kann.

Der Bewegungsradius bei 35 N·mm zeigte nach der Behandlung mit Bosentan mit  $65,65^\circ \pm 14,71^\circ$  keinen signifikanten Unterschied gegenüber dem Placebo mit  $66,86^\circ \pm 11,22^\circ$  ( $p > 0,99$ ). Auch die AC wies in der Berechnung sowohl mit dem gesunden kontralateralen Bein (AC(G)) mit  $92,57^\circ \pm 14,71^\circ$  ( $p < 0,16$ ) als auch mit dem gesunden linken Bein der Kontrollgruppe (AC(K)) mit  $82,98^\circ \pm 14,71^\circ$  ( $p > 0,99$ ) keine signifikante Zunahme des Extensionsradius im Vergleich zu der Kontrollgruppe ( $81,77^\circ \pm 11,22^\circ$ ) auf. Bei der Darstellung der AC(G) schien die zweiwöchige Therapie unter Bosentan sogar zu einer tendenziellen Verstärkung der AC gegenüber dem Placebo geführt zu haben ( $p < 0,16$ ). Obgleich Wong et al. in ihrem PTGK-Rattenmodell nach einmaliger intraartikulärer Kollagenase-Injektion von einer Zunahme der ROM im kontralateralen nicht behandelten Kniegelenk im Vergleich zu der Kontrollgruppe berichteten (277), konnte diese Beobachtung in unserem Experiment nicht bestätigt werden. Die Analyse sowohl der AC(G) als auch der AC(K) wies keinen signifikanten Unterschied der JAs bei 35 N·mm auf. Folglich konnte weder eine systemische Beeinflussung durch die eingesetzten Medikamente noch eine Veränderung der ROM durch eine potenzielle Mehrbelastung, resultierend aus der Immobilisation (278), auf das gesunde kontralaterale Gelenk nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen von Owen et al. (278) und Abdel et al. (279), die ebenfalls keinen signifikanten Unterschied im

Bewegungsradius zwischen dem unbehandelten kontralateralen Bein der Versuchstiere und dem der Kontrollgruppe als Folge einer kompensatorischen Mehrbelastung des gesunden Kniegelenks beobachten konnten. In den von Owen et al. und Abdel et al. verwendeten Tiermodellen wurde jedoch ausschließlich eine potenzielle mechanisch-induzierte Mehrbelastung des kontralateralen Kniegelenks geprüft, die aus einem experimentell gesetztem Gelenkstrauma mit nachfolgender Immobilisation des betroffenen Kniegelenks resultierte. Mögliche pharmakologische Einflussfaktoren wurden dabei nicht berücksichtigt.

Aufgrund der mangelnden Existenz verwandter Studiendaten, die das Medikament Bosentan in In-vivo- oder In-vitro-Studien im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der PTGK getestet haben, erscheint eine direkte Gegenüberstellung der Versuchsergebnisse mit denen anderer Tiermodelle nicht stichhaltig. Die Resultate zum Einfluss von Bosentan auf die Fibroseentstehung und den Bewegungsradius des Kniegelenks aus diesem Experiment reihen sich jedoch in die bislang inkongruenten Studienergebnisse zur Wirksamkeit von Bosentan in der Abschwächung der Progression und Reduktion von Organfibrosen bei In-vivo-Studien ein.

Bosentan findet bereits Anwendung in der Therapie der PAH und Prävention digitaler Ulzerationen im Kontext der SSc (235, 280). Kuhn et al. konnten in ihrer Studie bei 10 Patienten mit SSc, die über die Dauer von vier Wochen zweimal täglich 62,5 mg Bosentan und anschließend über einen Zeitraum von 20 Wochen zweimal täglich 125 mg Bosentan erhielten, eine signifikante Reduktion der Hautfibrose durch die Bestimmung der Dicke der Haut im Abstand von jeweils vier Wochen beobachten (281). Anzumerken ist hierbei jedoch, dass es sich um keine randomisierte, verblindete Studie mit einer Kontrollgruppe handelte, die ferner nur eine kleine Patientenkohorte aufwies. Zudem erfolgte die Messung der Hautdicke unter Verwendung des *modifizierten Rodnan skin score* (mRss). Bei dem mRss handelt es sich um eine klinische Messmethode, welche die Palpation der Haut an verschiedenen Körperregionen beinhaltet (282) und damit als untersucherabhängig und nicht objektivierbar angesehen werden muss.

Weiterhin wurde die Wirksamkeit von Bosentan in klinischen Studien bei Patienten mit IPF untersucht. Die IPF ist eine chronisch progressive, interstitielle Lungenerkrankung, die durch die übermäßige Ablagerung von fibrotischem Gewebe und eine verstärkte Narbenbildung als Reaktion auf endo- oder exogene Lungenschäden gekennzeichnet ist. In der Folge klagen die Patienten über Husten und Luftnot. Die Erkrankung betrifft vornehmlich Personen über 60 Jahre und ist aufgrund der fehlenden Heilungsmöglichkeit mit einer raschen Progression und schlechten Prognose assoziiert (283). In einer Metaanalyse von Li et al. aus dem Jahr 2024 konnte bei 4 eingeschlossenen Studien (284-287) mit 794 Probanden und einem Beobachtungszeitraum zwischen 52 und 104 Wochen kein signifikanter Effekt durch die Gabe

von Bosentan (62,5 mg–250 mg/Tag) auf die Reduktion der Fibrose und Senkung der Mortalität herausgestellt werden. Dennoch führte die Behandlung mit Bosentan zu einer Linderung der Symptomatik, die in einer Abnahme der Hospitalisierungs- und Exazerbationsrate sichtbar wurde (288).

Einen weiteren möglichen Erklärungsansatz bietet die reziproke Abhängigkeit von TGF- $\beta$  und ET-1 in der Pathogenese der Fibrose. Das Zytokin TGF- $\beta$  stellt den Schlüsselmediator in der Fibroseentstehung dar (72, 149) und ist ein starker Induktor von ET-1 (147). Die Blockade von ET-1 könnte in der Folge in der hochkomplexen Pathogenese der Fibrose zu einer Hochregulation alternativer profibrotischer Signalwege führen, wodurch die isolierte Inhibition von ET-1 umgangen wird (289).

Darüber hinaus könnte die Pharmakokinetik von Bosentan als Erklärung für die verminderte Wirksamkeit des Medikaments auf die Reduktion der PTGK in diesem Experiment dienen. Der Steady-State von Bosentan, gekennzeichnet durch das Erreichen einer stabilen Plasmakonzentration infolge eines Gleichgewichts zwischen Absorption und Elimination, stellt sich im Organismus in der Regel innerhalb von 3–5 Tagen ein (263). Kaneguchi et al. untersuchten in einem Rattenmodell nach Durchführung einer ACLr die zeitabhängigen myogenen und arthrogenen Einflüsse der Kontraktur auf das Kniegelenk. In den Ergebnissen ihrer Studie zeigte sich, dass trotz unmittelbarer Remobilisation bereits nach drei Tagen eine signifikant verringerte ROM an den myotomierten Kniegelenken gemessen wurde. Die AC war in diesem Experiment durch die Verkürzung der Länge der Synovialis und Verdickung der posterioren Gelenkkapsel sowie einer signifikanten Verringerung der ROM bereits nach sieben Tagen maximal ausgeprägt und nahm in der Folge durch Mobilisation bis zur Beendigung des Experiments nach 56 Tagen ab (290). Zusätzlich identifizierten Morrey et al. eine maximale Expression inflammatorischer Signalwege als unmittelbare immunologische Reaktion bereits innerhalb der ersten drei Tage in einem PTGK-Kaninchenmodell (291). Im Gegensatz dazu beobachteten Abdel et al., dass die Anzahl der Myofibroblasten, die als zentrale Effektorzellen fibrotischer Gewebsreaktionen gelten, erst nach zwei Wochen ihr Maximum erreichte und anschließend bis zur achten Woche nach Trauma-induktion abnahm (119). Es erscheint daher plausibel, dass die Pathogenese der PTGK in den ersten 14 Tagen zwei distinkte Phasen durchläuft: eine superakute Phase (Tag 1–5), dominiert durch eine unmittelbare Immunantwort, sowie eine nachfolgende semiakute Phase (Tag 6–14), die vom EZM-Umbau geprägt ist. Der maximale pharmakologische Effekt Bosentans auf die superakute Phase könnte aufgrund des prolongierten Zeitpunkts des Steady-States sowie unter Berücksichtigung der Studiendaten von Kaneguchi et al. (290) und Morrey et al. (291) maßgeblich reduziert worden sein.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass die orale Verabreichung von Bosentan vor Erreichen einer konstanten Plasmakonzentration über den Zeitraum von zwei Wochen keinen hinreichenden Effekt ausübt, um die Entstehung und Progression der Fibrose am Kniegelenk in unserem PTGK-Rattenmodell zu unterbinden.

### 5.1.2 Der Einfluss von Nintedanib auf die ROM

Mit dem Versuchsmedikament Nintedanib wurde erstmals ein Tyrosinkinase-Inhibitor als Therapieoption der PTGK des Kniegelenks eingesetzt, der über die Blockade der Wachstumsfaktoren PDGF, FGF und VEGF multiple Signalwege in der Pathogenese der Fibrose simultan inhibiert (vgl. Kapitel 2.2.3).

Die Messung des Bewegungsradius bei 35 N·mm der Nintedanib-Gruppe mit  $80,56^\circ \pm 12,64^\circ$  ergab eine signifikante Zunahme des JA im betroffenen Kniegelenk gegenüber der Placebogruppe mit  $66,86^\circ \pm 11,22^\circ$  ( $p < 0,05$ ). Ferner zeigten sich in der Berechnung der AC(G) ( $66,98^\circ \pm 12,64^\circ$ ) und AC(K) ( $68,07^\circ \pm 12,64^\circ$ ) von Nintedanib ebenfalls eine signifikante Reduktion der AC im Vergleich zur Kontrollgruppe mit  $81,77^\circ \pm 11,22^\circ$  ( $p(\text{AC(G)}) < 0,05$ ;  $p(\text{AC(K)}) < 0,05$ ). Zusätzlich wies die Nintedanib-Gruppe einen signifikant größeren Bewegungsradius bei 35 N·mm ( $p < 0,05$ ) sowie eine signifikant geringere arthrogene Kontraktorentwicklung ( $p(\text{AC(G)}) < 0,001$ ;  $p(\text{AC(K)}) < 0,05$ ) gegenüber der Bosentan-Gruppe auf. Die in diesem Experiment gewählte orale Dosierung von  $2 \times 2,5$  mg/kg pro Tag über die 14-tägige Interventionsspanne wurde auf Grundlage der NOAEL für Ratten bestimmt. Eine isolierte Gegenüberstellung der Ergebnisse mit denen vergleichbarer Studien ist aufgrund der fehlenden Datenlage im Hinblick auf die Dosierung und Behandlungsdauer des Medikaments im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der PTGK nicht durchführbar. Dennoch lassen die Ergebnisse der Gelenkbeweglichkeit und Reduktion der AC durch Nintedanib einen vielversprechenden antifibrotischen Effekt auf die Entstehung und Progression der PTGK des Kniegelenks vermuten, der bereits in früheren Tiermodell-Studien innerhalb einer zweiwöchigen Behandlungsdauer bei fibrotischen Erkrankungen des Harntrakts (292), der Leber (29) und der Lunge (293) beobachtet wurde.

Ausgehend von der Zulassung als effektiver Wirkstoff in der Therapie der IPF stellt sich die Studienlage zu Nintedanib in der Lunge am umfangreichsten dar. Richeldi et al. untersuchten in einer doppelt-verblindeten, randomisierten Studie an 1006 Patienten mit IPF über die Dauer von 52 Wochen die Wirksamkeit und Sicherheit der zweimal täglichen oralen Gabe von 150 mg Nintedanib gegenüber einem Placebo (28). Sie konnten zeigen, dass Nintedanib zu einer Verlangsamung der Krankheitsprogression und damit zu einer Reduktion der Fibrosierungsprozesse des Lungengewebes führte. Häufige UAWs waren insbesondere

gastrointestinale Beschwerden wie Diarrhöe, die unter der Therapie mit Nintedanib (61,5%) im Vergleich zum Placebo (18,3%) signifikant häufiger auftraten. Diese waren jedoch in weniger als 5% der Fälle so gravierend, dass die Studie vorzeitig abgebrochen werden musste (28).

Nintedanib wurde darüber hinaus in einer 2022 veröffentlichten Studie von Pérez et al. auf seine Wirksamkeit für die Therapie von  $\alpha$ -Sarkoglykanopathien in einem Mausmodell getestet (294). Alpha-Sarkoglykanopathien stellen eine autosomal-rezessive Subgruppe der Gliedergürtelmuskeldystrophien dar. Betroffen ist die Skelettmuskulatur, was in der Folge zu einer progressiven Schwächung, vorzugsweise der Schulter- und Beckenmuskulatur, bis hin zu einer irreversiblen Einschränkung der betroffenen Muskeln führt (295). Es existiert zu diesem Zeitpunkt keine kurative Therapie, weshalb bei den Patienten ein palliativer Ansatz aus Physiotherapie, Dehnübungen und Gewichtskontrolle zur Vorbeugung von Adipositas erfolgt (296). Pérez et al. konnten in ihrem Experiment zeigen, dass die zweimal tägliche orale Verabreichung von 50 mg/kg Nintedanib mit einer Magensonde bei transgenen Mäusen zu einer signifikanten Verbesserung der Laufstrecke und der Greifkraft führte. Dies wurde sowohl in der Funktionsprüfung des Muskels mittels Laufband und Kraftmessung als auch in der histologischen und molekulargenetischen Untersuchung nachgewiesen. Zudem wurde eine Reduktion der muskulären Fibrose, der chronischen Entzündung im Gewebe sowie eine Verminderung entzündlicher Zytokine bei den behandelten Mäusen im Vergleich zur Placebogruppe beobachtet (294).

Wenngleich der dominante Bestandteil der PTGK von der arthrogenen Komponente gebildet wird (32, 266), spielt der myogene Anteil (vgl. Kapitel 2.2.2) insbesondere im extraartikulären Bereich eine wesentliche Rolle in der Kontrakturstehung (57). Bei durch Hochrasanztraumata verursachten Tibiakopffrakturen kommt es häufig zu einer Begleitverletzung des periartikulären Weichteilgewebes (vgl. Kapitel 2.1.3), weshalb in diesen Fällen der extraartikulären Komponente eine höhere Bedeutung beigemessen werden sollte. Die Gabe von Nintedanib könnte in einem solch speziellen Fall nur unter Vorbehalt und nach Abschluss der operativen Therapie und Wundheilung erfolgen. Wundheilungsstörungen sind aufgrund des Wirkungsmechanismus von Nintedanib durch den inhibitorischen Einfluss auf die Wachstumsfaktoren PDGF, FGF und VEGF potenziell denkbar. Obwohl bisher nur in Fallberichten über Wundheilungsstörungen unter der Therapie mit Nintedanib in mukösem Gewebe berichtet wurde (297, 298), rät die EMA generell von einem perioperativen Einsatz des Medikaments ab (249). Ein potenzieller Einsatz im Rahmen einer konservativen Therapieform mit alleiniger Ruhigstellung des Gelenks könnte daher eine zukünftige Therapieoption darstellen. Wollin et al. beobachteten in einem Tiermodell zur Leberfibrose unter der präventiven Therapie mit Nintedanib vor Induktion der Fibrose signifikant bessere Resultate als durch die reine therapeutische Gabe nach der Fibroseentstehung (29). Die

präoperative Behandlung mit Nintedanib könnte daher insbesondere vor der Durchführung einer MUA oder vor Operationen bei Patienten mit einem erhöhten Risikoprofil für die Entwicklung einer PTGK einen möglichen Vorteil bieten.

Weiterhin wurde der Effekt von Nintedanib auf das osteoarthritisch veränderte Kniegelenk in einem invasiven Mausmodell von Yan et al. untersucht. Nach achtwöchiger, täglicher oraler Verabreichung von Nintedanib in Dosierungen von 30 mg/kg bzw. 100 mg/kg zeigten sich in der histologischen und der immunhistochemischen Analyse der Synovia signifikante Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe. So konnte eine generelle Abnahme der synovialen Entzündung und Fibrose, eine Reduktion der Kollagenablagerungen sowie eine verminderte Infiltration von M-1-Makrophagen festgestellt werden. Darüber hinaus wurde eine Downregulation der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  beobachtet (299). Die pathophysiologische Relevanz dieser Mediatoren und Zellen im Rahmen der Entstehung und Progression der PTGK wurde bereits in Kapitel 2.2.4 ausführlich erläutert. Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse erscheint es plausibel, dass die in unserem Tiermodell beobachtete signifikante therapeutische Wirkung von Nintedanib auf die PTGK zumindest teilweise durch die in der Studie von Yan et al. beschriebenen Zytokine und Zelltypen vermittelt wurde. Zur weiterführenden Validierung dieser Hypothese wäre neben der biomechanischen eine ergänzende histologische und molekulargenetische Analyse erforderlich.

In dem vorliegenden Experiment wurde unter Berücksichtigung der Versuchsdauer und des verwendeten methodischen Konzepts (vgl. Kapitel 3.5), das auf den Ergebnissen vorheriger Forschungsarbeiten (32, 266) basiert, ausschließlich die arthrogene Komponente der Kontraktur untersucht. Die Ergebnisse der genannten Studien belegen, dass die Gabe von Nintedanib den Fibrosierungsprozess verlangsamen und sowohl die Fibrose als auch die chronische Entzündung in verschiedenen Organgeweben reduzieren kann. Der in diesem Experiment erbrachte Nachweis einer Steigerung der ROM sowie einer Reduktion der AC im Kniegelenk durch Nintedanib im Rahmen der PTGK unterstreicht das therapeutische Potential des Wirkstoffs und stärkt die Evidenz für seine antifibrotische Wirksamkeit – in Ergänzung der bisherigen Erfolge bei fibrotischen Erkrankungen anderer Organe– nun auch im muskuloskelettalen System.

### 5.1.3 Der Einfluss von Bosentan+Nintedanib auf die ROM

Nach der zweiwöchigen Therapie mit der Kombination aus Bosentan und Nintedanib zeigte sich in der anschließenden biomechanischen Messung keine signifikante, jedoch eine grenzwertig tendenzielle Verbesserung des Extensionsradius bei 35 N·mm zwischen der Kombinationstherapie  $76,62^\circ \pm 13,48^\circ$  und dem Placebo  $66,86^\circ \pm 11,22^\circ$  ( $p < 0,2$ ). Auch in der

berechneten AC(G)  $75,14^\circ \pm 13,48^\circ$  und der AC(K)  $72,01^\circ \pm 13,48^\circ$  der Bosentan+Nintedanib-Gruppe fand sich kein signifikanter Unterschied in der Kontraktorentwicklung gegenüber der Kontrollgruppe  $81,77^\circ \pm 11,22^\circ$  ( $p(\text{AC(G)}) < 0,5$ ;  $p(\text{AC(K)}) < 0,2$ ). Lediglich bei der arthrogenen Kontraktorentwicklung der AC(G) konnte eine signifikant geringere Kontraktur der Kombinationstherapie gegenüber der Bosentan-Gruppe beobachtet werden ( $p < 0,05$ ). Im Gegensatz zu der alleinigen Gabe von Nintedanib wies die kombinierte Behandlung mit Bosentan durch die zusätzliche Inhibition der ET-1/TGF- $\beta$ -Achse keinen signifikanten Unterschied im Bewegungsradius bei 35 N-mm und der arthrogenen Kontrakturstehung auf. Dennoch spiegeln die Ergebnisse in Teilen die Resultate der isolierten Medikamentengabe wider.

Wind et al. untersuchten in ihrer offenen, einarmigen Studie mit 13 gesunden männlichen Probanden eine potenzielle Wechselwirkung von Bosentan und Nintedanib (300). Dafür erhielten die Probanden eine Einzeldosis von 150 mg Nintedanib an Tag 0 sowie weiterhin von Tag 1–8 zweimal täglich 125 mg Bosentan. Am Tag 7 nahmen die Studienteilnehmer eine weitere Einzeldosis von 150 mg Nintedanib ein. Im Anschluss wurde die maximale Plasmakonzentration von Nintedanib sowohl nach der ersten Einzelgabe als auch bis zu der letzten messbaren Plasmakonzentration bestimmt. In den nachfolgenden Messergebnissen zeigte sich keine signifikante Einflussnahme von Bosentan auf die Plasmakonzentration von Nintedanib. Die durchgeführte Studie weist jedoch einige Limitationen auf. Wind et al. untersuchten die kombinierte Gabe nur über einen sehr kurzen Zeitraum. Die simultane Verabreichung von Bosentan und Nintedanib erfolgte einzig an Tag 7, was eine Beeinflussung der Plasmakonzentration von Nintedanib über eine längere Zeitspanne nicht einschließt. Nintedanib wird primär CYP-unabhängig über Esterasen und UDP-Glycosyltransferasen und nur zu einem geringen Anteil über das CYP-System (CYP3A4) metabolisiert (27) (vgl. Kapitel 3.3.2). Aufgrund der Pharmakokinetik von Bosentan, bei welcher der Metabolismus als CYP3A4- und CYP2C9-Substrat und Induktor in der Leber (263) (vgl. Kapitel 3.3.2) erfolgt, wird von der *Drug Enforcement Administration* (DEA) in den USA von der kombinierten oralen Gabe von CYP3A4-Induktoren mit Nintedanib abgeraten (301). Somit liegt die Behauptung nahe, dass der geringe Metabolismus von Nintedanib über das CYP-System in Teilen der Beeinflussung von Bosentan durch die zweimal tägliche simultane Gabe über den Zeitraum von zwei Wochen unterliegt. Dies könnte eine potenzielle Erklärung für die Ergebnisse der biomechanischen Messungen darstellen, die eine tendenzielle Verbesserung des Bewegungsradius und der AC(K) andeuteten. Im Gegensatz zu der alleinigen Therapie mit Nintedanib führten sie allerdings zu keinem signifikanten Ergebnis. Weiterhin handelte es sich in der klinischen Studie von Wind et al. um eine kleine Kohorte gesunder Probanden. Sowohl die Versuchsgruppengröße als auch die fehlende Testung im Kontext einer fibrotischen

Erkrankung könnten mögliche lokale Wechselwirkungen der Medikamente in den Signalwegen der Pathogenese der Fibrose verschleiern, die auf die unvollständige Erforschung der Mechanismen der Fibroseentstehung zurückzuführen sind. Die Bestimmung der Plasmakonzentration, der lokalen Bosentan- und Nintedanib-Konzentrationen im Gelenk sowie der durch die Medikamente beeinflussten Wachstumsfaktoren und Rezeptoren könnte in einem weiteren experimentellen Tiermodell Aufschluss über eine potenzielle pharmakologische Interaktion der Medikamente geben.

## 5.2 Dynamische ROM-Messung

Die dynamische Messung der Kraftentwicklung der einzelnen Versuchsgruppen bei einer Kniegelenksexension auf 80°, 100°, 130° und 150° zeigte bis zu den jeweiligen festgelegten Referenzpunkten keine signifikanten Unterschiede in der Kraftentwicklung. Auffallend war jedoch, dass die Behandlung mit Bosentan über das gesamte Bewegungsausmaß der Extension bis 150° mit  $1485 \text{ N}^\circ \pm 224,6 \text{ N}^\circ$  die größte Kraftaufwendung aller Versuchsgruppen abbildete. Diese Beobachtung deckt sich mit der tendenziellen, jedoch nicht signifikanten Zunahme der AC, die sich in den Ergebnissen der AC(G) Berechnung (vgl. Kapitel 4.2.2.1) darstellte. Hervor stach ebenfalls die Kraftentwicklung der Nintedanib-Gruppe mit  $1083 \text{ N}^\circ \pm 152,7 \text{ N}^\circ$ . Sie zeigte einerseits die geringste Gesamtkraftaufwendung aller Versuchsgruppen bis 130°, während sie andererseits der signifikanten Steigerung der statischen ROM bei 35 N·mm und Reduktion der AC einer nur tendenziell verminderten Gesamtkraft im frühen Bereich der Kontraktur bei einem Bewegungsradius bis 80° ( $p < 0,16$ ) gegenüberstand. Die Gesamtkraftentwicklung der Kombinationstherapie ( $1388 \text{ N}^\circ \pm 237,2 \text{ N}^\circ$ ) lag zwar über jener der Kontrollgruppe ( $1227 \text{ N}^\circ \pm 188,3 \text{ N}^\circ$ ), nahm jedoch eine intermediäre Position zwischen den medikamentösen Versuchsgruppen ein und deckt sich folglich mit den statischen ROM-Ergebnissen. Zudem ist bei der grafischen Darstellung der Fläche unter der Kurve eine Abnahme der Steigung der Bosentan- und Placebogruppe ab einer Kraftaufwendung von 130° im Vergleich zu den anderen beiden Versuchsgruppen hervorzuheben. Eine mögliche Erklärung für die abweichende Kraftentwicklung der Bosentan- und Kontrollgruppe gegenüber den anderen Medikamentengruppen bieten die Studien von Zhou et al. (302) und Nakahara et al. (268). Zhou et al. konstatierten, dass über den Zeitraum von zwei bis 32 Wochen die extraartikuläre Immobilisation des Kniegelenks bei Ratten zu einer Verkürzung und Verdickung der posterioren Gelenkkapsel führte, die nach einer zweiwöchigen Immobilisation selbst durch Remobilisation irreversibel war (302). Wie bereits in Kapitel 5.1 erwähnt, führt die reine Immobilisation des Gelenks zwar ebenfalls zur Entstehung einer AC, jedoch ist diese geringer

ausgeprägt und tritt zeitlich später auf als in einem PTGK-Tiermodell (32, 268). Auch Nakahara et al. berichteten von einer Verkürzung der posterioren Gelenkkapsel sowie einer Zunahme der Länge von Adhäsionen zwischen der Synovialmembran und dem Femurknorpel nach der Induktion eines intraartikulären Traumas und zweiwöchiger Immobilisation mittels K-Draht in einem neuen Rattenmodell der PTGK (268).

Das in dieser Studie verwendete Rattenmodell wurde auf Grundlage des von Baranowski et al. (32) implementierten Konzepts modifiziert und durch die Integration der dynamischen ROM-Messung mit einem automatisierten Arthrometer erweitert. Die zugrunde liegende Methodik wurde ausführlich in Kapitel 3.4.2 dargelegt. Obgleich eine Überdehnung oder Teilruptur der posterioren Kapsel durch die Hyperextension des Kniegelenks auf 180° neben der intraartikulären interkondylären Knochenschädigung des Femurs durchgeführt wurde, ist in diesem Experiment auf die Gesamtruptur der posterioren Gelenkkapsel aufgrund der Schwere des Traumas und der Eventualität der Maskierung geringfügiger Unterschiede (232) verzichtet worden. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass es im Rahmen des in dieser Studie verwendeten PTGK-Modells ebenfalls zu einer irreversiblen Verkürzung und Verdickung der posterioren Gelenkkapsel gekommen ist. Die erhöhte Kraftentwicklung der Bosentan- und Kontrollgruppe bis 130° könnte sich daher teilweise durch eine unzureichende Wirksamkeit des Medikaments gegenüber subsynovialen Veränderungen sowie durch eine vermehrte Synthese von Kollagen Typ I erklären lassen, was letztlich eine Kapselfibrosierung und die Ausbildung intraartikulärer Adhäsionen zur Folge hatte (303). Die Konsequenz ist eine Verkürzung und Verdickung der Gelenkkapsel, die zu einer potenziell früheren Ruptur der posterioren Kapsel der Bosentan- und Kontrollgruppe und damit zur Verminderung der Steigung und Kraftentwicklung im Messbereich zwischen 130° und 150° führte. Das zeitlich verzögerte Abflachen der Kurve der Gesamtkraft der Nintedanib- und Kombinationstherapie könnte somit auf eine erhöhte Elastizität der posterioren Gelenkkapsel zurückzuführen sein. Diese wiederum ließe sich durch eine reduzierte Synthese von Kollagen Typ I, eine verminderte Adhäsionsbildung sowie eine daraus resultierende verringerte Fibrosierung erklären. Um diese Hypothese zu bestätigen, wäre es notwendig, in einer zukünftigen Forschungsarbeit die posteriore Gelenkkapsel im Hinblick auf eine mögliche Zunahme der Dicke und Länge zu vermessen und den Kollagenanteil histologisch zu untersuchen. Alternativ könnten die beobachteten Abweichungen zwischen den Versuchsgruppen >130° auch auf eine erhöhte Varianz der Messwerte zurückzuführen sein, was die statistische Aussagekraft in dem Bereich einschränkt und nur eine vorsichtige Interpretation der Ergebnisse zulässt.

Bisherige experimentelle PTGK-Tiermodelle verwendeten für die Bestimmung des Bewegungsradius des Kniegelenks primär manuelle, nicht-automatisierte (21-23, 32, 232, 260, 268, 304) Messmethoden. Dabei wurde das zu untersuchende Bein distal des

Kniegelenks mit einer Klemme, einer Schlaufe oder einem Faden an einem Dynamometer oder einer Federwaage befestigt. Das gewünschte Drehmoment wurde durch manuellen Zug am Bein oder der Befestigung eines kalibrierten Gewichts eingestellt. Der erzeugte JA wurde mit einer Kamera oder mit Hilfe eines Röntgengeräts erfasst und anschließend über das dokumentierte Bild mit einem Computerprogramm berechnet. In einem alternativen Ansatz führten Kaneguchi et al. und Ozawa et al. die biomechanische Bestimmung der ROM mit Hilfe eines 3D-Bewegungsanalyse-Systems durch. Vor Beginn der Messung wurden spezifische Marker am Kniegelenk positioniert. Drei Kameras zeichneten im Anschluss daran die aus einem am Unterschenkel befestigten Gewicht resultierende Kniegelenksexension auf. Durch die zuvor angebrachten Marker konnte der entstandene JA mit Hilfe eines Computerprogramms bei einem vorab definierten Drehmoment von 14,6 N·mm berechnet werden (20, 305). Ein Nachteil der bisher genannten Methoden liegt jedoch darin, dass diese durch die manuelle Handhabung untersucherabhängiger und fehleranfälliger sind als ein automatisierter Messprozess. Potenzielle Rotationen des Kniegelenks infolge mangelnder Fixierung der Hüfte und des Unterschenkels außerhalb der definierten Achse könnten Ungenauigkeiten und Messfehler hervorrufen. Überdies ist lediglich die statische Erfassung prädefiniertener Kräfte und Drehmomente umsetzbar. Eine konstante dynamische Messung der Kraftentwicklung sowie die Bestimmung der Gesamtkraft des vollständigen Bewegungsradius sind daher nicht durchführbar.

Trudel et al. verwendeten in ihrem Tiermodell ein automatisiertes Arthrometer, bei dem das Gerät eine Extension bis zu einer kalibrierten Kraft von 12,5 N ausführte (306). Nach Erreichen des initial festgelegten Endpunkts stoppte das Arthrometer, der resultierende JA wurde mit einer Kamera dokumentiert und anschließend mithilfe eines Computerprogramms bestimmt. Obgleich durch den Einsatz eines automatisierten Arthrometers die Reproduzierbarkeit gegeben und der humane Fehlerfaktor reduziert wurde, konnte durch die Verlangsamung des Gerätes vor Erreichen der definierten Kraft von 12,5 N und die Bestimmung eines einzelnen statischen Winkels dennoch weder eine Visualisierung der Kraftentwicklung noch eine kontinuierliche Darstellung der Kraft des gesamten Bewegungsradius erreicht werden.

In ihrem 2022 veröffentlichten Rattenmodell stellten Owen et al. ein automatisiertes Arthrometer vor, mit dem das Drehmoment über eine dynamische Lastzelle bei einer konstanten Kniegelenksexension von 1°/s während des gesamten Bewegungsumfanges der Kontraktur berechnet werden konnte (278). Ungeachtet der Leistungsfähigkeit des Geräts wurden in diesem neuen Tiermodell nur die JAs der statischen Drehmomente bei 2, 4 und 8 N·cm bestimmt. Die in vielen Studien durchgeführten wiederholten Messungen für die Bestimmung der myogenen und arthrogenen Kontrakturkomponente des Kniegelenks sowie zu den unterschiedlichen Drehmomenten könnten zu einer Beeinträchtigung der artikulären

und periartikulären Gewebsstrukturen geführt haben und folglich in einer Überschätzung des tatsächlichen Bewegungsradius resultieren.

Im Rahmen der biomechanischen Messungen dieser experimentellen Arbeit wurde hingegen erstmalig mit einem vergleichbaren automatisierten Arthrometer wie jenem, das in der Studie von Owen et al. (278) verwendet wurde, die Gesamtkraftentwicklung des definierten Bewegungsradius und der Anteil der AC dynamisch bis zur Ruptur der posterioren Gelenkkapsel bestimmt. Durch die Visualisierung der Fläche unter der Kurve wurden die beiden Parameter vergleichend zwischen den Versuchsgruppen abgebildet. Die dynamische Messung bietet weiterhin die Möglichkeit, die grafische Visualisierung des gesamten Bewegungsradius und das Ausmaß der Kontraktur über die Kraftunterschiede in prädefinierten Messbereichen zwischen Versuchsgruppen, Kontrollgruppen und physiologischen Referenzwerten noch präziser zu definieren.

### **5.3 Wissenschaftliche Einordnung der Ergebnisse und Methodik**

Bisherige etablierte konservative und operative Therapieformen der PTGK können Erfolge in der Verbesserung der ROM erzielen (vgl. Kapitel 2.2.4). Bei konservativen Therapieformen können frühe aktive Übungen des Gelenks speziell in der Anfangsphase jedoch ferner zu einer konträren Aggravation der Inflammation und Fibrose führen (18). Auch invasive, chirurgische PTGK-Studien weisen die Problematik geringer Fallzahlen (307), fehlender Informationen über präoperative Limitationen der ROM sowie untersucherabhängiger Messmethoden des Bewegungsradius auf (15). Ekhtiari et al. berichteten in ihrem Review zur PTGK-Behandlung nach ACLr, dass die ROM-Messung nur bei 37% (241 von 647) Patienten mit einem Goniometer und damit objektiv messbar und untersucherunabhängig durchgeführt wurde (15).

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Tiermodelle entwickelt, um in Ergänzung zu den etablierten, aufwendigen, teuren und komplikationsbehafteten Behandlungsstrategien potenzielle pharmakotherapeutische Ansätze zu erforschen. Hierfür wurden verschiedene invasive und nicht-invasive Tiermodelle insbesondere mit Kaninchen (308, 309) und Ratten (32, 266, 306) entwickelt.

Einige Arbeitsgruppen fokussierten sich zu Beginn der AF-Forschung auf einen antiinflammatorischen Therapieansatz, um eine Aggravation der Entzündung im betroffenen periartikulären Gewebe und einen Progress der Fibrose zu unterdrücken (289). In den letzten Jahren konzentrierte sich die medikamentöse Fibroseforschung zur Prophylaxe und Reduktion der PTGK verstärkt darauf, im Kontext der translationalen Medizin die Übertragbarkeit

etablierter, wirksamer antifibrotischer Wirkstoffe anderer Organe auf die PTGK zu untersuchen. Einige Studien sind dazu bereits in Kapitel 2.3.1 detaillierter beschrieben worden.

Eine Mehrheit vorhergehender Tiermodell-Studien (217, 277, 310, 311) priorisierte die intraartikuläre Injektion des eingesetzten Medikaments in das von der PTGK betroffene Kniegelenk und fokussierte sich primär auf die Inhibition eines einzelnen Signalwegs in der Fibrogenese. Auf zwei dieser Studien ist in Kapitel 2.3.1 bereits umfassend eingegangen worden. Obgleich die Ergebnisse der genannten Experimente Fortschritte in der Verbesserung der ROM erzielten und angesichts einer messbar höheren lokalen Wirkstoffkonzentration im Zielgewebe einer oralen Gabe überlegen scheinen, weist die in diesen Studien gewählte Applikationsform auch einige Nachteile auf. Die intraartikuläre Injektion ist mit einem erhöhten Risiko für Komplikationen wie Schmerzen, Blutungen, Infektionen sowie Gefäß- und Nervenschäden assoziiert (233). Darüber hinaus stellt die regelmäßige Injektion im Praxisalltag eine aufwendige Prozedur für speziell geschultes Klinikpersonal und die Patienten dar, was negative Effekte auf die Adhärenz der Betroffenen haben kann (312). Daher wurde in diesem Experiment gezielt die orale Gabe als Applikationsform gewählt, um eine für die Patienten anwenderfreundliche und, aufgrund des bekannten Nebenwirkungsprofils der eingesetzten Medikamente, gutverträgliche Therapieoption zu prüfen.

Die bisherigen Resultate experimenteller Arbeiten, die die orale Applikation eines Medikaments zur Verbesserung des Bewegungsradius des Kniegelenks untersuchten, zeigten jedoch eine gemischte Erfolgsbilanz in der Steigerung der Gelenkbeweglichkeit. Es finden sich in der aktuellen Forschungsliteratur nur wenige publizierte Arbeiten (21, 22), die über eine signifikante Verbesserung der ROM durch die orale Gabe eines Wirkstoffs berichten. Dabei konzentrierte sich die Mehrzahl der experimentellen Studien auf die Inhibition proinflammatorischer Faktoren, wie etwa die Hemmung der COX-1 und COX-2 (20, 21) sowie die Blockade von Leukotrien-Rezeptoren (22, 313).

Die gezielte Inhibition der COX-2 hat einen analgetischen Effekt und resultiert in der Reduktion der Synthese von Prostaglandinen sowie in der Folge proinflammatorischer Zytokine (314). Eingesetzt werden COX-2-Hemmer unter anderem in der Behandlung der RA, OA und Spondylitis (315). Leukotriene nehmen ebenfalls eine bedeutsame Funktion in der Stimulation proinflammatorischer Zytokine ein und werden durch ihre Inhibition in Form des Medikaments Montelukast als Therapieoption des Asthma bronchiale und der allergischen Rhinitis genutzt (313, 316).

Li et al. berichteten in ihrer PTGK-Studie im Kaninchenmodell nach 30-tägiger posttraumatischer Immobilisation des Kniegelenks und zweimaliger täglicher oraler Gabe des selektiven COX-2-Inhibitors Celecoxib über eine signifikant gesteigerte Kniebeweglichkeit um

93,6° (21). Anzumerken ist jedoch, dass Li et al. nur die Bestimmung der Gesamtkontraktur ohne die ergänzende Messung der AC vorgenommen haben. Der isolierte Effekt auf die myogene und arthrogene Komponente der Kontraktur geht daher aus dieser Studie nicht hervor. Demgegenüber konnten Ozawa et al. in ihrem Kontrakturmodell an Ratten nach der Immobilisation mittels K-Draht und unter der täglichen oralen Therapie mit 50 mg/kg Celecoxib über drei Wochen einen signifikanten Unterschied in der reversiblen myogenen, jedoch nicht in der irreversiblen arthrogenen Kontraktorentwicklung des Kniegelenks beobachten (20).

Ein ähnlich heterogenes Bild bieten die Studien zur Wirksamkeit der oralen Inhibition von Leukotrien-Rezeptoren von Efirid et al. (22) und Jeffs et al. (313). In dem von Efirid et al. verwendeten PTGK-Rattenmodell führte die traumatische Abschabung der ligamentären und muskulären Ansätze des medialen und lateralen Femurkondylus sowie die Verletzung des Gelenkknorpels mit nachfolgender Immobilisation über 14 Tage unter der täglichen oralen Behandlung mit 3,75 mg/kg Montelukast zu einer signifikant reduzierten AC und damit zu einer deutlichen Steigerung der Beweglichkeit des Kniegelenks. In der Folge konnte die AC durch die Gabe von Montelukast um 12° gegenüber der Kontrollgruppe reduziert werden (22). Die Ergebnisse von Efirid et al. decken sich mit denen dieser Studie, in der eine ähnliche signifikante Verringerung der AC durch die Behandlung mit Nintedanib von 14,79° (AC(G)) respektive 13,7° (AC(K)) gegenüber dem Placebo beobachtet wurde. Auf der anderen Seite konnten Jeffs et al. in ihrem Rattenmodell nach dreiwöchiger posttraumatischer Immobilisation trotz des erhöhten Nachweises von Leukotrien B<sub>4</sub> in der posterioren Gelenkkapsel keine signifikante Verbesserung der ROM durch die tägliche orale Gabe des Leukotrien-Inhibitors 5-*Lipoxygenase* (5-LO) beobachten (313). Einen nicht signifikanten analogen Effekt brachten auch die im Detail in Kapitel 2.3.1 erläuterte Studie von Wegner et al. (232) mit dem Blutdrucksenker Losartan sowie die experimentelle Forschungsarbeit von Baranowski et al. mit dem Lipidsenker Atorvastatin (23) auf den Bewegungsumfang hervor. In beiden Studien entschieden sich die Forscher jedoch erstmalig für ein Medikament, das bereits in früheren Studien antifibrotische Begleiteffekte in der Behandlung anderer Organerkrankungen offenbarte. Im dem vorliegenden Experiment wurde erstmals der systemische antifibrotische Effekt der oralen Gabe der Wirkstoffe Bosentan und Nintedanib auf die Prävention und Therapie der PTGK im Rattenmodell untersucht.

Die unmittelbare Vergleichbarkeit der vielfältigen PTGK-Tierversuchsstudien des Kniegelenks ist jedoch limitiert. Basierend auf diversen experimentellen Konzepten variieren die Studien nicht nur im Hinblick auf die Applikationsform und den zu untersuchenden Wirkstoff, sondern auch in der Dauer der Immobilisation, dem Mechanismus und dem Ausmaß der Traumainduktion sowie der biomechanischen Messmethodik. Einige Arbeitsgruppen induzierten die Kontraktur allein durch eine vorübergehende Immobilisation des Kniegelenks

(20, 317, 318). In nicht-invasiven Tiermodellen führte eine alleinige Immobilisation ebenfalls zu der Entstehung einer Gelenkkontraktur. Die Veränderungen im Gelenk traten im Rahmen eines invasiven Modells jedoch früher auf (268) und sorgten durch das artikuläre Trauma für eine stärkere AC (32) als bei einer reinen Immobilisation. Des Weiteren kommt ein invasives Modell durch die Initiierung eines Traumas von Weichteil und Knochen sowie der nachfolgenden temporären Immobilisation des Gelenks der beim Menschen vorherrschenden Ätiologie der Entstehung einer PTGK am nächsten (309, 319).

#### **5.4 Limitationen des Experiments**

Obwohl mit der durchgeführten Studie eine neue Messmethodik implementiert und vielversprechende Ansätze für die Therapie der PTGK des Kniegelenks gewonnen wurden, unterliegen das experimentelle Design und der methodische Ansatz dennoch einigen Limitationen, die bei der Interpretation und Verallgemeinerung der Ergebnisse sowie in der Planung und Durchführung zukünftiger Forschungsarbeiten Berücksichtigung finden sollten.

Die Traumainduktion in diesem Experiment erfolgte durch eine Kniegelenkshyperextension auf unphysiologische 180° sowie durch Imitierung einer intraartikulären Fraktur durch das Einbringen eines K-Drahts in den femoralen interkondylären Bereich. Die Kniegelenkshyperextension sowie das intraartikuläre Trauma durch den K-Draht wurden dabei manuell durch den Operateur durchgeführt. Eine operateurunabhängige Standardisierung und Automatisierung war folglich in beiden Operationsschritten nicht umsetzbar. Eine exzessive Hyperextension des Gelenks über 180° könnte anstelle der gezielten Überdehnung zu einer Ruptur der Gelenkkapsel geführt haben. Eine Hypoextension könnte wiederum eine verminderte Strukturschädigung der posterioren Gelenkkapsel bewirkt haben. Ferner wurde der K-Draht ohne visuelle Überprüfung retropatellar vorgeschoben und intraossär platziert. Das Ausmaß ungewollter Begleitverletzungen des Kapsel-Band-Apparates sowie von Gelenkknorpel, Nerven oder Gefäßen könnte somit variiert und Einfluss auf die Kontrakturentwicklung genommen haben. Darüber hinaus wurde nur die isolierte arthrogene Komponente der Kontraktur untersucht. Obgleich diese hauptverantwortlich für die langfristige und irreversible Kontrakturentstehung zu sein scheint (32, 306), beeinflusst die myogene Komponente insbesondere bei extraartikulär begleitenden Weichteilverletzungen ebenfalls den Bewegungsradius (57). Die Untersuchung des Effekts der in dieser Studie eingesetzten Wirkstoffe auf den myogenen Anteil der Kontraktur müsste daher in einer weiteren Forschungsarbeit evaluiert werden. Insbesondere das Medikament Nintedanib könnte eine gesteigerte Wirksamkeit auf die Reduktion der PTGK aufweisen, da dessen Therapieerfolg bei

fibrosierenden Erkrankungen der Skelettmuskulatur im Tiermodell (294, 320) bereits nachgewiesen wurde (vgl. Kapitel 5.1.2).

Zur Sicherung der Balance zwischen wissenschaftlicher Relevanz und tierethischen Überlegungen gilt in der Wissenschaft bei Tierversuchen nach dem 3R-Prinzip von Russel und Burch der Grundsatz: „So wenig wie möglich, so viel wie nötig“ (321). Im Verlauf dieses Experiments kam es zum vorzeitigen Ausschluss von Versuchstieren, deren Messungen nicht in die biomechanischen Analysen eingeflossen sind. Die verringerte Anzahl der Versuchstiere sowie das Vorliegen heterogener Versuchsgruppengrößen könnten infolgedessen Einfluss auf die Signifikanz und Varianz der Ergebnisse genommen haben und eine allgemeine Übertragbarkeit der Resultate nur unter Vorbehalt gewährleisten. In Zukunft sollte daher eine ausreichende Gruppengröße in der Studienplanung sichergestellt werden. Zudem weisen die drei Femurfrakturen während des Messvorgangs, die nicht starre Befestigung der distalen Tibia mit einer Ligatur an der Haltestange sowie das Auftreten zweier Fehlmessungen, bei denen ein negativer iForce-Wert aufgezeichnet wurde, noch Optimierungspotenzial des Arthrometers auf.

Der Verzicht auf die Umrechnung der Versuchsergebnisse der AUC von der Einheit  $N \cdot ^\circ$  in die SI-konforme Einheit  $N \cdot rad$  diente der Erleichterung der visuellen Interpretation des Kraft-Winkel-Diagramms. Dies schränkt jedoch die direkte Vergleichbarkeit mit Studien ein, die in ihren Tiermodellen ausschließlich SI-konforme Einheiten verwenden.

Infolge des vierbeinigen Gangs verfügen Ratten über ein individuelles Streckdefizit (278), das in der Berechnung der AC mit dem Mittelwert des kontralateralen Beins der Versuchsgruppe oder dem der Kontrollgruppe als Referenz in der Auswertung der Ergebnisse in diesem Experiment keine Berücksichtigung fand. Owen et al. konnten in einem neuentwickelten PTGK-Rattenmodell mit ihrer angewandten Messmethode, bei der das individuelle Streckdefizit in die Berechnung der Kontraktur integriert wurde, signifikante Unterschiede im Bewegungsradius zwischen den Versuchsgruppen nachweisen (278). Aufgrund der bereits erwähnten Femurfrakturen und Messfehler des Arthrometers war es nicht möglich, eine individuelle Berechnung der AC zwischen dem kontralateralen Bein und dem jeweiligen Versuchsbein jedes Versuchstieres in diesem Experiment zu erstellen. Eine Mitberücksichtigung des individuellen Streckdefizits ist in einem zukünftigen PTGK-Rattenmodell daher ratsam, um präzise marginale und signifikante Unterschiede zu demaskieren.

Die orale Applikationsform der Medikamente wurde aus den zuvor dargelegten Gründen bewusst für diesen Versuch gewählt. Aufgrund der Futtergewohnheiten der Ratten im Tiermodell wäre die von der EMA empfohlene orale Verabreichung von Nintedanib auf

nüchternen Magen nur per Gavage möglich. (249). Die Gavage-Methode ist in der Durchführung jedoch sehr aufwendig und gilt angesichts ihrer ausgeprägten Invasivität sowie des erhöhten Risikos iatrogenen Verletzungen umliegender anatomischer Strukturen als tierethisch umstritten (322). Sie unterliegt in Europa daher strengen tierschutzrechtlichen Zulassungs- und Genehmigungsvorhaben (323). Eine Reduktion der Wirksamkeit des Pharmakons oder potenzielle Wechselwirkungen konnten während der Durchführung dieses Experiments folglich nicht ausgeschlossen werden. Als alternative Applikationsform könnte in einer zukünftigen Forschungsarbeit die Wirksamkeit der eingesetzten Medikamente auf die Entwicklung der PTGK durch die unmittelbare intraartikuläre Gabe evaluiert werden. Basierend auf einer gesteigerten lokalen Konzentration im Gelenk wäre eine Verstärkung des Effekts auf die Kontraktur sowie eine simultane Reduktion systemischer Nebenwirkungen naheliegend. In dieser Studie lag der Fokus einzig auf der biomechanischen statischen und dynamischen Messung der ROM, der Berechnung der AC sowie der Visualisierung der Kraftaufwendung als Fläche unter der Kurve. Eine zusätzliche Erhebung der lokalen und systemischen Plasmakonzentration der Medikamente sowie der betroffenen Rezeptoren könnte in einem Folgeexperiment Aufschluss über den optimalen Zeitpunkt und die Dauer der Therapie geben. Weiterhin könnten die molekulargenetischen Untersuchungen inflammatorischer Cytokine wie TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, PDGF und FGF sowie die histologische Analyse der Zellzahl von Myofibroblasten und die Bestimmung von Kollagen in der Gelenkkapsel wesentliche neue Erkenntnisse über die Wirksamkeit und den zeitlichen Einfluss potenzieller Regulationsmechanismen in der Pathogenese der PTGK liefern.

## 6 Zusammenfassung

Die PTGK des Kniegelenks stellt eine gravierende und häufig langwierige Komplikation nach Verletzungen des Kapsel-Band-Apparats des Gelenks, Frakturen mit Gelenkbeteiligung und Operationen im Gelenkbereich dar. Infolge einer dysregulierten Antwort des Immunsystems nach einem Trauma kommt es im Zuge der Wundheilungsmechanismen zu einer Hochregulation profibrotischer Signalwege, Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie zu einem prolongierten Verbleib und einer reduzierten Apoptoserate von Myofibroblasten im betroffenen Gewebe (1, 91). Gestörte Gegenregulationsmechanismen führen zu einer exzessiven Synthese von EZM-Komponenten, deren übermäßige Ablagerung von Bindegewebe im Gelenk strukturelle Remodeling-Prozesse induziert und sowohl die Gelenkarchitektur als auch die Gelenkmechanik beeinträchtigen kann (1). Die eingeschränkte Beweglichkeit und Schmerzhaftigkeit des Gelenks können für die Betroffenen weitreichende Auswirkungen auf die Lebensqualität (6) haben und gehen gesamtgesellschaftlich mit umfangreichen sozioökonomischen Folgen (39, 213) einher. Die derzeit etablierten Behandlungsstrategien der PTGK umfassen primär konservative physiotherapeutische Maßnahmen oder invasive operative Verfahren (vgl. Kapitel 2.2.4). Beide Therapieansätze können jedoch durch frühzeitige Manipulationen oder aufgrund ihres invasiven Charakters zu einer konträren Aggravation der Inflammation und Fibrose führen (18, 80, 200). Die Ergebnisse der bestehenden Behandlungsmethoden sowie die in den Kapiteln 1 und 2.1.3 beispielhaft aufgezeigte hohe Inzidenz der PTGK des Kniegelenks nach TKA, Tibiakopffrakturen und ACLr verdeutlichen die hohe klinische Relevanz und die Notwendigkeit, die kausale, bislang unvollständig verstandene Pathophysiologie der PTGK weiter zu erforschen. Es fehlt nicht nur eine einheitliche Klassifikation, sondern auch ein Therapiealgorithmus, der neben den etablierten und effektiven, aber auch komplikationsbehafteten und kostspieligen Behandlungsstrategien kostengünstige, präventive pharmakologische Alternativen bietet.

Bisherige medikamentöse Forschungsansätze, die auf eine Verbesserung des Bewegungsradius der PTGK abzielten, offenbarten jedoch inkongruente Ergebnisse. Erfolgsversprechende Studiendaten in Tiermodellen, wie die Forschungsarbeiten von Wong et al. (277) und Dudakovic et al. (223), könnten an der Praktikabilität aufgrund der regelmäßig notwendigen intraartikulären oder intraperitonealen Applikationsform scheitern. Ferner konnte bislang in nur drei experimentellen Arbeiten (20-22), die einen oralen pharmakologischen Therapieansatz zur Behandlung der PTGK untersuchten, eine signifikante Einflussnahme der Wirkstoffe auf die Steigerung der ROM nachgewiesen werden. Einzig in der Studie von Efirid et al. wurde durch die Verabreichung eines Leukotrien-Inhibitors eine signifikante Reduktion der langfristigen und irreversiblen arthrogenen Hauptkomponente der Kontraktur beobachtet (22).

Mit diesem Experiment wurde erstmalig ein möglicher Effekt der oralen Gabe von Bosentan, Nintedanib sowie der Kombination beider Medikamente auf die Reduktion der AC am Kniegelenk über den Zeitraum von zwei Wochen in einem PTGK-Tiermodell (45 Sprague-Dawley-Ratten) untersucht. Darüber hinaus wurde in dieser Studie eine neue Methodik der biomechanischen Messung im PTGK-Rattenmodell eingeführt, bei der ein untersucherunabhängiges und automatisiertes Arthrometer zum Einsatz kam, das die dynamische Erfassung und grafische Darstellung der Kraftentwicklung als Fläche unter der Kurve ermöglicht.

Wenngleich die Gabe des ET-1 Antagonisten Bosentan keinen positiven Effekt auf den Bewegungsradius auszuüben und die AC tendenziell sogar zu verschlimmern schien, führte die Inhibition der Wachstumsfaktoren PDGF, FGF und VEGF (249) durch Nintedanib zu einer signifikanten Reduktion der AC um  $14,79^\circ$  ( $p(\text{AC}(\text{G})) < 0,001$ ) respektive  $13,7^\circ$  ( $p(\text{AC}(\text{K})) < 0,05$ ). Damit unterstreicht Nintedanib sein antifibrotisches Potenzial gleichfalls im Kontext der PTGK neben den bislang positiven Studienergebnissen anderer Organe, wie der Lunge (28), dem Herzen (324), der Leber (29) und dem Harntrakt (292). Durch die Gabe der Kombinationstherapie konnte wiederum nur eine tendenzielle, jedoch keine signifikante Einflussnahme auf die Gelenkbeweglichkeit und AC gegenüber der Placebogruppe beobachtet werden. Für die Ursachenfindung der mangelnden Wirksamkeit der Kombinationstherapie gilt es, potenzielle Interaktionsmechanismen der Wirkstoffe über die Bestimmung der lokalen und systemischen Konzentrationen der Medikamente sowie der betroffenen Rezeptoren ausfindig zu machen.

Obleich eine komplette Remission der PTGK in keiner Versuchsgruppe in dieser Studie erzielt werden konnte, bieten die signifikanten Ergebnisse in der Steigerung der ROM und der Reduktion der AC der Nintedanib-Gruppe einen vielversprechenden Ansatz, die gewonnenen Erkenntnisse in zukünftigen Experimenten eingehender zu untersuchen. Denkbare methodische Ergänzungen könnten die Testung alternativer Applikationsformen, die Bestimmung der optimalen Behandlungsdauer und Dosierung sowie eine erweiterte Fokussierung auf molekulargenetische und histologische Analysen umfassen. Die gewonnenen Erkenntnisse liefern damit wertvolle Impulse für die Erforschung der kausalen Pathogenese der Fibrose und könnten die weitere Grundlage für die Entwicklung eines anwenderfreundlichen, kosteneffizienten und präventiven pharmakologischen Therapieansatzes der PTGK schaffen.

## 7 Veröffentlichungen

Wegner E, Warnke D, Buschmann V, Hild B, Pirkl A, Ritz U, Harper A, Gercek E, Drees P, Baranowski A. Dual endothelin receptor inhibition with bosentan does not prevent the early formation of post-traumatic joint contracture in a rat model. *J Clin Med*. 2025;14(19).

Wegner, E, Warnke D, Buschmann V, Hild B, Mais B, Ritz U, Harper A, Gercek E, Drees P, Baranowski A. Nintedanib reduces severity of post-traumatic joint contracture by modulating fibrosis and inflammation. *J Mol Med (Berl)*. 2025.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Usher KM, Zhu S, Mavropalias G, Carrino JA, Zhao J, Xu J. Pathological mechanisms and therapeutic outlooks for arthrofibrosis. *Bone Res.* 2019;7:9.
2. Freeman TA, Parvizi J, Dela Valle CJ, Steinbeck MJ. Mast cells and hypoxia drive tissue metaplasia and heterotopic ossification in idiopathic arthrofibrosis after total knee arthroplasty. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2010;3:17.
3. Bonniaud P, Margetts PJ, Ask K, Flanders K, Gauldie J, Kolb M. TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *J Immunol.* 2005;175(8):5390-5.
4. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012;18(7):1028-40.
5. Ouyang X, Ghani A, Mehal WZ. Inflammasome biology in fibrogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(7):979-88.
6. Lee DR, Therrien E, Song BM, Camp CL, Krych AJ, Stuart MJ, et al. Arthrofibrosis Nightmares: Prevention and Management Strategies. *Sports Med Arthrosc Rev.* 2022;30(1):29-41.
7. Magit D, Wolff A, Sutton K, Medvecky MJ. Arthrofibrosis of the knee. *J Am Acad Orthop Surg.* 2007;15(11):682-94.
8. Laubenthal KN, Smidt GL, Kettelkamp DB. A quantitative analysis of knee motion during activities of daily living. *Phys Ther.* 1972;52(1):34-43.
9. Alexander Grimberg K-PG, Jörg Lützner, Oliver Melsheimer MM, Arnd Steinbrück. Jahresbericht 2025. Berlin: EPRD Deutsche Endoprothesenregister gGmbH; 2025.
10. Heinz T, Eidmann A, Anderson P, Weissenberger M, Jakuscheit A, Rudert M, et al. Trends in Computer-Assisted Surgery for Total Knee Arthroplasty in Germany: An Analysis Based on the Operative Procedure Classification System between 2010 to 2021. *J Clin Med.* 2023;12(2).
11. Paudel YR, Sommerfeldt M, Voaklander D. Increasing incidence of anterior cruciate ligament reconstruction: a 17-year population-based study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2023;31(1):248-55.
12. Mauerhan DR, Mokris JG, Ly A, Kiezbak GM. Relationship between length of stay and manipulation rate after total knee arthroplasty. *J Arthroplasty.* 1998;13(8):896-900.
13. Yercan HS, Sugun TS, Bussiere C, Ait Si Selmi T, Davies A, Neyret P. Stiffness after total knee arthroplasty: prevalence, management and outcomes. *Knee.* 2006;13(2):111-7.
14. Sharkey PF, Lichstein PM, Shen C, Tokarski AT, Parvizi J. Why are total knee arthroplasties failing today--has anything changed after 10 years? *J Arthroplasty.* 2014;29(9):1774-8.
15. Ekhtiari S, Horner NS, de Sa D, Simunovic N, Hirschmann MT, Ogilvie R, et al. Arthrofibrosis after ACL reconstruction is best treated in a step-wise approach with early recognition and intervention: a systematic review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2017;25(12):3929-37.

16. Chaudhary D, Monga P, Joshi D, Easwaran R, Bhatia N, Singh AK. Arthroscopic reconstruction of the anterior cruciate ligament using bone-patellar tendon-bone autograft: experience of the first 100 cases. *J Orthop Surg (Hong Kong)*. 2005;13(2):147-52.
17. Kartus J, Magnusson L, Stener S, Brandsson S, Eriksson BI, Karlsson J. Complications following arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction. A 2-5-year follow-up of 604 patients with special emphasis on anterior knee pain. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 1999;7(1):2-8.
18. Kaneguchi A, Ozawa J. Inflammation and Fibrosis Induced by Joint Remobilization, and Relevance to Progression of Arthrogenic Joint Contracture: A Narrative Review. *Physiol Res*. 2022;71(4):447-88.
19. Millett PJ, Johnson B, Carlson J, Krishnan S, Steadman JR. Rehabilitation of the arthrofibrotic knee. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*. 2003;32(11):531-8.
20. Ozawa J, Kaneguchi A, Tanaka R, Kito N, Moriyama H. Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib attenuates joint contracture following immobilization in rat knees. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016;17(1):446.
21. Li F, He B, Liu S, Fan C. Celecoxib effectively inhibits the formation of joint adhesions. *Exp Ther Med*. 2013;6(6):1507-11.
22. Efird W, Kellam P, Yeazell S, Weinhold P, Dahners LE. An evaluation of prophylactic treatments to prevent post traumatic joint stiffness. *J Orthop Res*. 2014;32(11):1520-4.
23. Baranowski A, Schlemmer L, Forster K, Slotina E, Mickan T, Truffel S, et al. Effects of losartan and atorvastatin on the development of early posttraumatic joint stiffness in a rat model. *Drug Des Devel Ther*. 2019;13:2603-18.
24. Mao D, Mi J, Pan X, Li F, Rui Y. Suppression of TGF-beta activity with remobilization attenuates immobilization-induced joint contracture in rats. *Injury*. 2021;52(3):434-42.
25. Teder P, Noble PW. A cytokine reborn? Endothelin-1 in pulmonary inflammation and fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;23(1):7-10.
26. Sonnylal S, Shi-Wen X, Leoni P, Naff K, Van Pelt CS, Nakamura H, et al. Selective expression of connective tissue growth factor in fibroblasts in vivo promotes systemic tissue fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2010;62(5):1523-32.
27. Wind S, Schmid U, Freiwald M, Marzin K, Lotz R, Ebner T, et al. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Nintedanib. *Clin Pharmacokinet*. 2019;58(9):1131-47.
28. Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2014;370(22):2071-82.
29. Wollin L, Togbe D, Ryffel B. Effects of Nintedanib in an Animal Model of Liver Fibrosis. *Biomed Res Int*. 2020;2020:3867198.
30. Karam H, Heudes D, Bruneval P, Gonzales MF, Loffler BM, Clozel M, et al. Endothelin antagonism in end-organ damage of spontaneously hypertensive rats. Comparison with angiotensin-converting enzyme inhibition and calcium antagonism. *Hypertension*. 1996;28(3):379-85.
31. Boffa JJ, Tharaux PL, Dussaule JC, Chatziantoniou C. Regression of renal vascular fibrosis by endothelin receptor antagonism. *Hypertension*. 2001;37(2 Pt 2):490-6.

32. Baranowski A, Schlemmer L, Forster K, Mattyasovszky SG, Ritz U, Wagner D, et al. A novel rat model of stable posttraumatic joint stiffness of the knee. *J Orthop Surg Res.* 2018;13(1):185.
33. Hsu H, Siwiec RM. *Knee Arthroplasty. StatPearls. Treasure Island (FL)2024.*
34. Fox AJ, Wanivenhaus F, Burge AJ, Warren RF, Rodeo SA. The human meniscus: a review of anatomy, function, injury, and advances in treatment. *Clin Anat.* 2015;28(2):269-87.
35. Michael Schünke ES, Udo Schumacher. *Prometheus LernAtlas der Anatomie Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem 2. Auflage 2. Auflage ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2007.*
36. Freeman MA, Pinskerova V. The movement of the normal tibio-femoral joint. *J Biomech.* 2005;38(2):197-208.
37. Gage BE, McIlvain NM, Collins CL, Fields SK, Comstock RD. Epidemiology of 6.6 million knee injuries presenting to United States emergency departments from 1999 through 2008. *Acad Emerg Med.* 2012;19(4):378-85.
38. Schneider O, Scharf HP, Stein T, Knapstein S, Hermann C, Flechtenmacher J. [Incidence of knee injuries : Numbers for outpatient and inpatient care in Germany]. *Orthopade.* 2016;45(12):1015-26.
39. (DGOU): DGfOuUeV. Tibiakopffrakturen: Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie DGOU; 2021 [updated 29.10.2021. Version 1.0:[Available from: [https://register.awmf.org/assets/guidelines/187-042l\\_S2k\\_Tibiakopffrakturen\\_2022-07.pdf](https://register.awmf.org/assets/guidelines/187-042l_S2k_Tibiakopffrakturen_2022-07.pdf).
40. Elsoe R, Larsen P, Nielsen NP, Swenne J, Rasmussen S, Ostgaard SE. Population-Based Epidemiology of Tibial Plateau Fractures. *Orthopedics.* 2015;38(9):e780-6.
41. D. Rixen MM. *Tibiakopffrakturen Stand der Versorgung. Trauma Berufskrankheit 2015 Springer Verlag Berlin- Heidelberg 2015. 2015.*
42. Krause M, Preiss A, Muller G, Madert J, Fehske K, Neumann MV, et al. Intra-articular tibial plateau fracture characteristics according to the "Ten segment classification". *Injury.* 2016;47(11):2551-7.
43. Prat-Fabregat S, Camacho-Carrasco P. Treatment strategy for tibial plateau fractures: an update. *EFORT Open Rev.* 2016;1(5):225-32.
44. Reatiga Aguilar J, Rios X, Gonzalez Edery E, De La Rosa A, Arzuza Ortega L. Epidemiological characterization of tibial plateau fractures. *J Orthop Surg Res.* 2022;17(1):106.
45. Schatzker J, McBroom R, Bruce D. The tibial plateau fracture. The Toronto experience 1968-1975. *Clin Orthop Relat Res.* 1979(138):94-104.
46. Luo CF, Sun H, Zhang B, Zeng BF. Three-column fixation for complex tibial plateau fractures. *J Orthop Trauma.* 2010;24(11):683-92.
47. Gustilo RB, Anderson JT. Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones: retrospective and prospective analyses. *J Bone Joint Surg Am.* 1976;58(4):453-8.

48. Tscherne H, Oestern HJ. [A new classification of soft-tissue damage in open and closed fractures (author's transl)]. *Unfallheilkunde*. 1982;85(3):111-5.
49. Fischbach R, Prokop A, Maintz D, Zahringer M, Landwehr P. [Magnetic resonance tomography in the diagnosis of intra-articular tibial plateau fractures: value of fracture classification and spectrum of fracture associated soft tissue injuries]. *Rofo*. 2000;172(7):597-603.
50. Chang H, Zheng Z, Shao D, Yu Y, Hou Z, Zhang Y. Incidence and Radiological Predictors of Concomitant Meniscal and Cruciate Ligament Injuries in Operative Tibial Plateau Fractures: A Prospective Diagnostic Study. *Sci Rep*. 2018;8(1):13317.
51. Deng X, Chen W, Shao D, Hu H, Zhu J, Ye Z, et al. Arthroscopic evaluation for tibial plateau fractures on the incidence and types of cruciate ligamentous injuries following closed reduction and internal fixation. *Int Orthop*. 2021;45(5):1287-98.
52. Millar SC, Arnold JB, Thewlis D, Fraysse F, Solomon LB. A systematic literature review of tibial plateau fractures: What classifications are used and how reliable and useful are they? *Injury*. 2018;49(3):473-90.
53. Cvetkovic S, Jakovljevic N, Simic D, Sladojevic M, Djurasic L, Davidovic L. Popliteal artery injury following traumatic knee joint dislocation in a 14-year-old boy: a case report and review of the literature. *Vojnosanit Pregl*. 2014;71(1):87-90.
54. Liu XD, Wang HB, Zhang TC, Wan Y, Zhang CZ. Comparison between computed tomography and magnetic resonance imaging in clinical diagnosis and treatment of tibial platform fractures. *World J Clin Cases*. 2020;8(18):4067-74.
55. Sabatini L, Aprato A, Camazzola D, Bistolfi A, Capella M, Masse A. Primary total knee arthroplasty in tibial plateau fractures: Literature review and our institutional experience. *Injury*. 2023;54 Suppl 1:S15-S23.
56. Jiang S, Wei H, Shi J, Xu X, Hao X. Efficacy of Arthroscopy-Assisted Minimally Invasive Surgery in the Treatment of Patients with Tibial Plateau Fractures. *Altern Ther Health Med*. 2024.
57. Pujol N, Boisrenoult P, Beaufils P. Post-traumatic knee stiffness: surgical techniques. *Orthop Traumatol Surg Res*. 2015;101(1 Suppl):S179-86.
58. Stevens DG, Beharry R, McKee MD, Waddell JP, Schemitsch EH. The long-term functional outcome of operatively treated tibial plateau fractures. *J Orthop Trauma*. 2001;15(5):312-20.
59. Stiefel EC, McIntyre L. Arthroscopic Lysis of Adhesions for Treatment of Post-traumatic Arthrofibrosis of the Knee Joint. *Arthrosc Tech*. 2017;6(4):e939-e44.
60. Weigel DP, Marsh JL. High-energy fractures of the tibial plateau. Knee function after longer follow-up. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84(9):1541-51.
61. Henkelmann R, Frosch KH, Glaab R, Lill H, Schoepp C, Seybold D, et al. Infection following fractures of the proximal tibia - a systematic review of incidence and outcome. *BMC Musculoskelet Disord*. 2017;18(1):481.
62. Statistik R. Berichtsjahre 2010-2019; Meldepflichtige Arbeits- und Wegeunfälle, neue Arbeits- und Wegeunfallrenten, Schienbeinkopffrakturen. In: Gesetzliche e, (DGUV) U, editors. 2020.

63. Canadian Orthopaedic Trauma S. Open reduction and internal fixation compared with circular fixator application for bicondylar tibial plateau fractures. Results of a multicenter, prospective, randomized clinical trial. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88(12):2613-23.
64. Haller JM, Holt DC, McFadden ML, Higgins TF, Kubiak EN. Arthrofibrosis of the knee following a fracture of the tibial plateau. *Bone Joint J.* 2015;97-B(1):109-14.
65. Kugelmann DN, Qatu AM, Strauss EJ, Konda SR, Egol KA. Knee Stiffness After Tibial Plateau Fractures: Predictors and Outcomes (OTA-41). *J Orthop Trauma.* 2018;32(11):e421-e7.
66. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(1):45-54.
67. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008;214(2):199-210.
68. Hildebrand KA, Zhang M, van Snellenberg W, King GJ, Hart DA. Myofibroblast numbers are elevated in human elbow capsules after trauma. *Clin Orthop Relat Res.* 2004(419):189-97.
69. Distler JHW, Gyorfi AH, Ramanujam M, Whitfield ML, Konigshoff M, Lafyatis R. Shared and distinct mechanisms of fibrosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2019;15(12):705-30.
70. Dean CS, Chahla J, Mikula JD, Mitchell JJ, LaPrade RF. Arthroscopic Posteromedial Capsular Release. *Arthrosc Tech.* 2016;5(3):e495-500.
71. Hinz B. Tissue stiffness, latent TGF-beta1 activation, and mechanical signal transduction: implications for the pathogenesis and treatment of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep.* 2009;11(2):120-6.
72. Watson RS, Gouze E, Levings PP, Bush ML, Kay JD, Jorgensen MS, et al. Gene delivery of TGF-beta1 induces arthrofibrosis and chondrometaplasia of synovium in vivo. *Lab Invest.* 2010;90(11):1615-27.
73. Chen AF, Lee YS, Seidl AJ, Abboud JA. Arthrofibrosis and large joint scarring. *Connect Tissue Res.* 2019;60(1):21-8.
74. Morrey BF. The posttraumatic stiff elbow. *Clin Orthop Relat Res.* 2005(431):26-35.
75. Mariani PP, Santori N, Rovere P, Della Rocca C, Adriani E. Histological and structural study of the adhesive tissue in knee fibroarthrosis: a clinical-pathological correlation. *Arthroscopy.* 1997;13(3):313-8.
76. Morrey BF. Surgical treatment of extraarticular elbow contracture. *Clin Orthop Relat Res.* 2000(370):57-64.
77. Pan LH, Ohtani H, Yamauchi K, Nagura H. Co-expression of TNF alpha and IL-1 beta in human acute pulmonary fibrotic diseases: an immunohistochemical analysis. *Pathol Int.* 1996;46(2):91-9.
78. Shelbourne KD, Patel DV, Martini DJ. Classification and management of arthrofibrosis of the knee after anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med.* 1996;24(6):857-62.
79. Kalson NS, Borthwick LA, Mann DA, Deehan DJ, Lewis P, Mann C, et al. International consensus on the definition and classification of fibrosis of the knee joint. *Bone Joint J.* 2016;98-B(11):1479-88.

80. Cheuy VA, Foran JRH, Paxton RJ, Bade MJ, Zeni JA, Stevens-Lapsley JE. Arthrofibrosis Associated With Total Knee Arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2017;32(8):2604-11.
81. Bodendorfer BM, Keeling LE, Michaelson EM, Shu HT, Apseloff NA, Spratt JD, et al. Predictors of Knee Arthrofibrosis and Outcomes after Arthroscopic Lysis of Adhesions following Ligamentous Reconstruction: A Retrospective Case-Control Study with Over Two Years' Average Follow-Up. *J Knee Surg*. 2019;32(6):536-43.
82. Reahl GB, Marinos D, O'Hara NN, Howe A, Degani Y, Wise B, et al. Risk Factors for Knee Stiffness Surgery After Tibial Plateau Fracture Fixation. *J Orthop Trauma*. 2018;32(9):e339-e43.
83. Sanders TL, Kremers HM, Bryan AJ, Kremers WK, Stuart MJ, Krych AJ. Procedural intervention for arthrofibrosis after ACL reconstruction: trends over two decades. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2017;25(2):532-7.
84. Csintalan RP, Inacio MC, Funahashi TT, Maletis GB. Risk factors of subsequent operations after primary anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med*. 2014;42(3):619-25.
85. Shelbourne KD, Wilckens JH, Mollabashy A, DeCarlo M. Arthrofibrosis in acute anterior cruciate ligament reconstruction. The effect of timing of reconstruction and rehabilitation. *Am J Sports Med*. 1991;19(4):332-6.
86. Dauty M, Menu P, Grondin J, Crenn V, Daley P, Fouasson-Chailloux A. Arthrofibrosis risk factors after anterior cruciate ligament reconstruction. *Front Sports Act Living*. 2023;5:1264150.
87. Grindem H, Granan LP, Risberg MA, Engebretsen L, Snyder-Mackler L, Eitzen I. How does a combined preoperative and postoperative rehabilitation programme influence the outcome of ACL reconstruction 2 years after surgery? A comparison between patients in the Delaware-Oslo ACL Cohort and the Norwegian National Knee Ligament Registry. *Br J Sports Med*. 2015;49(6):385-9.
88. Rahardja R, Love H, Clatworthy MG, Young SW. Risk factors for reoperation for arthrofibrosis following primary anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2024;32(3):608-15.
89. Iredale JP, Thompson A, Henderson NC. Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: Biochemistry and regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(7):876-83.
90. Gasse P, Mary C, Guenon I, Noulain N, Charron S, Schnyder-Candrian S, et al. IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Clin Invest*. 2007;117(12):3786-99.
91. Grellner W, Georg T, Wilske J. Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha) in human skin wounds. *Forensic Sci Int*. 2000;113(1-3):251-64.
92. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(8):583-94.
93. Wells RG. Tissue mechanics and fibrosis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(7):884-90.
94. Darby IA, Hewitson TD. Hypoxia in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Res*. 2016;365(3):553-62.

95. Wipff PJ, Hinz B. Myofibroblasts work best under stress. *J Bodyw Mov Ther.* 2009;13(2):121-7.
96. Merry P, Kidd BL, Mapp PI, Stevens CR, Morris CJ, Blake DR. Mechanisms of persistent synovitis. *Scand J Rheumatol Suppl.* 1988;76:85-93.
97. Wu J, Chitapanarux T, Chen Y, Soon RK, Jr., Yee HF, Jr. Intestinal myofibroblasts produce nitric oxide in response to combinatorial cytokine stimulation. *J Cell Physiol.* 2013;228(3):572-80.
98. Blessing WA, Williamson AK, Kirsch JR, Grinstaff MW. The Prognosis of Arthrofibroses: Prevalence, Clinical Shortcomings, and Future Prospects. *Trends Pharmacol Sci.* 2021;42(5):398-415.
99. Monument MJ, Hart DA, Salo PT, Befus AD, Hildebrand KA. Neuroinflammatory Mechanisms of Connective Tissue Fibrosis: Targeting Neurogenic and Mast Cell Contributions. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2015;4(3):137-51.
100. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol.* 2007;170(6):1807-16.
101. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol.* 2014;5:123.
102. Hinz B. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *J Biomech.* 2010;43(1):146-55.
103. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest.* 2007;117(3):539-48.
104. Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS. The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:657-87.
105. Richeldi L, Collard HR, Jones MG. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet.* 2017;389(10082):1941-52.
106. Kuppe C, Ibrahim MM, Kranz J, Zhang X, Ziegler S, Perales-Paton J, et al. Decoding myofibroblast origins in human kidney fibrosis. *Nature.* 2021;589(7841):281-6.
107. Tschumperlin DJ, Ligresti G, Hilscher MB, Shah VH. Mechanosensing and fibrosis. *J Clin Invest.* 2018;128(1):74-84.
108. Luo Y, Xie X, Luo D, Wang Y, Gao Y. The role of halofuginone in fibrosis: more to be explored? *J Leukoc Biol.* 2017;102(6):1333-45.
109. Schuster R, Younesi F, Ezzo M, Hinz B. The Role of Myofibroblasts in Physiological and Pathological Tissue Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2023;15(1).
110. Younesi FS, Miller AE, Barker TH, Rossi FMV, Hinz B. Fibroblast and myofibroblast activation in normal tissue repair and fibrosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2024;25(8):617-38.
111. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(5):349-63.
112. Hinz B, Dugina V, Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Mol Biol Cell.* 2003;14(6):2508-19.

113. Younesi FS, Son DO, Firmino J, Hinz B. Myofibroblast Markers and Microscopy Detection Methods in Cell Culture and Histology. *Methods Mol Biol.* 2021;2299:17-47.
114. Kanchanawong P, Calderwood DA. Organization, dynamics and mechanoregulation of integrin-mediated cell-ECM adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2023;24(2):142-61.
115. Trautwein C, Friedman SL, Schuppan D, Pinzani M. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *J Hepatol.* 2015;62(1 Suppl):S15-24.
116. Li M, Riddle SR, Frid MG, El Kasmi KC, McKinsey TA, Sokol RJ, et al. Emergence of fibroblasts with a proinflammatory epigenetically altered phenotype in severe hypoxic pulmonary hypertension. *J Immunol.* 2011;187(5):2711-22.
117. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmouliere A, Varga J, et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol.* 2012;180(4):1340-55.
118. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF-beta: the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2016;12(6):325-38.
119. Abdel MP, Morrey ME, Barlow JD, Kreofsky CR, An KN, Steinmann SP, et al. Myofibroblast cells are preferentially expressed early in a rabbit model of joint contracture. *J Orthop Res.* 2012;30(5):713-9.
120. Unterhauser FN, Bosch U, Zeichen J, Weiler A. Alpha-smooth muscle actin containing contractile fibroblastic cells in human knee arthrofibrosis tissue. Winner of the AGA-DonJoy Award 2003. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2004;124(9):585-91.
121. Kisseleva T, Cong M, Paik Y, Scholten D, Jiang C, Benner C, et al. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(24):9448-53.
122. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev.* 1997;77(4):1033-79.
123. Gruber BL. Mast cells in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep.* 2003;5(2):147-53.
124. Foreman JC. Peptides and neurogenic inflammation. *Br Med Bull.* 1987;43(2):386-400.
125. Schaffer M, Beiter T, Becker HD, Hunt TK. Neuropeptides: mediators of inflammation and tissue repair? *Arch Surg.* 1998;133(10):1107-16.
126. Gottwald T, Coerper S, Schaffer M, Koveker G, Stead RH. The mast cell-nerve axis in wound healing: a hypothesis. *Wound Repair Regen.* 1998;6(1):8-20.
127. Brito HO, Barbosa FL, Reis RCD, Fraga D, Borges BS, Franco CRC, 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.
128. Glaser S, Gaudio E, Renzi A, Mancinelli R, Ueno Y, Venter J, 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.
129. Koeck FX, Schmitt M, Baier C, Stangl H, Beckmann J, Grifka J, et al. Predominance of synovial sensory nerve fibers in arthrofibrosis following total knee arthroplasty compared to osteoarthritis of the knee. *J Orthop Surg Res.* 2016;11:25.

130. Hildebrand KA, Zhang M, Salo PT, Hart DA. 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):1313-9.
131. Rockey DC, Bell PD, Hill JA. Fibrosis--a common pathway to organ injury and failure. *N Engl J Med.* 2015;372(12):1138-49.
132. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev.* 2008;88(1):125-72.
133. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;25(12):677-86.
134. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2:17023-.
135. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol.* 2003;73(2):209-12.
136. Wynn TA, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis.* 2010;30(3):245-57.
137. Weber C, Schmitt R, Birnboeck H, Hopfgartner G, Eggers H, Meyer J, et al. Multiple-dose pharmacokinetics, safety, and tolerability of bosentan, an endothelin receptor antagonist, in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol.* 1999;39(7):703-14.
138. Rodriguez-Pascual F, Busnadiego O, Gonzalez-Santamaria J. The profibrotic role of endothelin-1: is the door still open for the treatment of fibrotic diseases? *Life Sci.* 2014;118(2):156-64.
139. Swigris JJ, Brown KK. The role of endothelin-1 in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *BioDrugs.* 2010;24(1):49-54.
140. Enevoldsen FC, Sahana J, Wehland M, Grimm D, Infanger M, Kruger M. Endothelin Receptor Antagonists: Status Quo and Future Perspectives for Targeted Therapy. *J Clin Med.* 2020;9(3).
141. Lagares D, Garcia-Fernandez RA, Jimenez CL, Magan-Marchal N, Busnadiego O, Lamas S, et al. Endothelin 1 contributes to the effect of transforming growth factor beta1 on wound repair and skin fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(3):878-89.
142. Shi-Wen X, Chen Y, Denton CP, Eastwood M, Renzoni EA, Bou-Gharios G, et al. Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. *Mol Biol Cell.* 2004;15(6):2707-19.
143. Rizvi MA, Katwa L, Spadone DP, Myers PR. The effects of endothelin-1 on collagen type I and type III synthesis in cultured porcine coronary artery vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28(2):243-52.
144. Xu S, Denton CP, Holmes A, Dashwood MR, Abraham DJ, Black CM. Endothelins: effect on matrix biosynthesis and proliferation in normal and scleroderma fibroblasts. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31 Suppl 1:S360-3.

145. Xu SW, Howat SL, Renzoni EA, Holmes A, Pearson JD, Dashwood MR, et al. Endothelin-1 induces expression of matrix-associated genes in lung fibroblasts through MEK/ERK. *J Biol Chem.* 2004;279(22):23098-103.
146. Shi-Wen X, Denton CP, Dashwood MR, Holmes AM, Bou-Gharios G, Pearson JD, et al. Fibroblast matrix gene expression and connective tissue remodeling: role of endothelin-1. *J Invest Dermatol.* 2001;116(3):417-25.
147. Horstmeyer A, Licht C, Scherr G, Eckes B, Krieg T. Signalling and regulation of collagen I synthesis by ET-1 and TGF-beta1. *FEBS J.* 2005;272(24):6297-309.
148. Horowitz JC, Ajayi IO, Kulasekaran P, Rogers DS, White JB, Townsend SK, et al. Survivin expression induced by endothelin-1 promotes myofibroblast resistance to apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(1):158-69.
149. Zeichen J, Haeder L, Jagodzinski M, Lobenhoffer P, Bosch U, Brand J. [Localisation of TGF-beta and PDGF and their relevance for the pathogenesis of arthrofibrosis]. *Unfallchirurg.* 2008;111(2):79-84.
150. Budi EH, Schaub JR, Decaris M, Turner S, Derynck R. TGF-beta as a driver of fibrosis: physiological roles and therapeutic opportunities. *J Pathol.* 2021;254(4):358-73.
151. Kim KK, Sheppard D, Chapman HA. TGF-beta1 Signaling and Tissue Fibrosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(4).
152. Frangogiannis N. Transforming growth factor-beta in tissue fibrosis. *J Exp Med.* 2020;217(3):e20190103.
153. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF-beta and the TGF-beta Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8(5).
154. Xu X, Zheng L, Yuan Q, Zhen G, Crane JL, Zhou X, et al. Transforming growth factor-beta in stem cells and tissue homeostasis. *Bone Res.* 2018;6:2.
155. Liu RM, Gaston Pravia KA. Oxidative stress and glutathione in TGF-beta-mediated fibrogenesis. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(1):1-15.
156. Van Obberghen-Schilling E, Roche NS, Flanders KC, Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor beta 1 positively regulates its own expression in normal and transformed cells. *J Biol Chem.* 1988;263(16):7741-6.
157. Desmouliere A. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol Int.* 1995;19(5):471-6.
158. Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res.* 2000;257(1):180-9.
159. Zhao J, Shi W, Wang YL, Chen H, Bringas P, Jr., Datto MB, et al. Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;282(3):L585-93.
160. Meng XM, Huang XR, Xiao J, Chen HY, Zhong X, Chung AC, et al. Diverse roles of TGF-beta receptor II in renal fibrosis and inflammation in vivo and in vitro. *J Pathol.* 2012;227(2):175-88.

161. Hildebrand KA, Zhang M, Hart DA. Myofibroblast upregulators are elevated in joint capsules in posttraumatic contractures. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;456:85-91.
162. Klinkhammer BM, Floege J, Boor P. PDGF in organ fibrosis. *Mol Aspects Med.* 2018;62:44-62.
163. Jester JV, Huang J, Petroll WM, Cavanagh HD. TGFbeta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGFbeta, PDGF and integrin signaling. *Exp Eye Res.* 2002;75(6):645-57.
164. Zhao T, Zhao W, Chen Y, Li VS, Meng W, Sun Y. Platelet-derived growth factor-D promotes fibrogenesis of cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013;304(12):H1719-26.
165. Xie Y, Su N, Yang J, Tan Q, Huang S, Jin M, et al. FGF/FGFR signaling in health and disease. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):181.
166. Yang L, Zhou F, Zheng D, Wang D, Li X, Zhao C, et al. FGF/FGFR signaling: From lung development to respiratory diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2021;62:94-104.
167. Boilly B, Vercoutter-Edouart AS, Hondermarck H, Nurcombe V, Le Bourhis X. FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000;11(4):295-302.
168. Sun C, Tian X, Jia Y, Yang M, Li Y, Fernig DG. Functions of exogenous FGF signals in regulation of fibroblast to myofibroblast differentiation and extracellular matrix protein expression. *Open Biol.* 2022;12(9):210356.
169. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(3):235-53.
170. Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2015;4(3):215-66.
171. Jonker JW, Suh JM, Atkins AR, Ahmadian M, Li P, Whyte J, et al. A PPARgamma-FGF1 axis is required for adaptive adipose remodelling and metabolic homeostasis. *Nature.* 2012;485(7398):391-4.
172. Sano H, Forough R, Maier JA, Case JP, Jackson A, Engleka K, et al. Detection of high levels of heparin binding growth factor-1 (acidic fibroblast growth factor) in inflammatory arthritic joints. *J Cell Biol.* 1990;110(4):1417-26.
173. Byrd VM, Ballard DW, Miller GG, Thomas JW. Fibroblast growth factor-1 (FGF-1) enhances IL-2 production and nuclear translocation of NF-kappaB in FGF receptor-bearing Jurkat T cells. *J Immunol.* 1999;162(10):5853-9.
174. MacKenzie B, Korfei M, Henneke I, Sibinska Z, Tian X, Hezel S, et al. Increased FGF1-FGFRc expression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 2015;16(1):83.
175. Shimbori C, Bellaye PS, Xia J, Gauldie J, Ask K, Ramos C, et al. Fibroblast growth factor-1 attenuates TGF-beta1-induced lung fibrosis. *J Pathol.* 2016;240(2):197-210.
176. Chanda D, Otoupalova E, Smith SR, Volckaert T, De Langhe SP, Thannickal VJ. Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis. *Mol Aspects Med.* 2019;65:56-69.

177. Chaudhary NI, Roth GJ, Hilberg F, Muller-Quernheim J, Prasse A, Zissel G, et al. Inhibition of PDGF, VEGF and FGF signalling attenuates fibrosis. *Eur Respir J.* 2007;29(5):976-85.
178. Fu M, Peng D, Lan T, Wei Y, Wei X. Multifunctional regulatory protein connective tissue growth factor (CTGF): A potential therapeutic target for diverse diseases. *Acta Pharm Sin B.* 2022;12(4):1740-60.
179. Leask A, Abraham DJ. All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 23):4803-10.
180. Hendesi H, Barbe MF, Safadi FF, Monroy MA, Popoff SN. Integrin mediated adhesion of osteoblasts to connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) induces cytoskeleton reorganization and cell differentiation. *PLoS One.* 2015;10(2):e0115325.
181. Kim H, Son S, Ko Y, Shin I. CTGF regulates cell proliferation, migration, and glucose metabolism through activation of FAK signaling in triple-negative breast cancer. *Oncogene.* 2021;40(15):2667-81.
182. Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell.* 1993;4(6):637-45.
183. Henderson NC, Rieder F, Wynn TA. Fibrosis: from mechanisms to medicines. *Nature.* 2020;587(7835):555-66.
184. Schnieder J, Mamazhakypov A, Birnhuber A, Wilhelm J, Kwapiszewska G, Ruppert C, et al. Loss of LRP1 promotes acquisition of contractile-myofibroblast phenotype and release of active TGF-beta1 from ECM stores. *Matrix Biol.* 2020;88:69-88.
185. Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol.* 2002;4(8):599-604.
186. Antar SA, Ashour NA, Marawan ME, Al-Karmalawy AA. Fibrosis: Types, Effects, Markers, Mechanisms for Disease Progression, and Its Relation with Oxidative Stress, Immunity, and Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2023;24(4).
187. Abdelghafour KM, A SE, M HA, Abdelaziz MK. Arthroscopic Lysis of Adhesions for Treatment of Post-Traumatic Knee Arthrofibrosis: A Prospective Study. *Cureus.* 2023;15(1):e33275.
188. Mauro CS, Irrgang JJ, Williams BA, Harner CD. Loss of extension following anterior cruciate ligament reconstruction: analysis of incidence and etiology using IKDC criteria. *Arthroscopy.* 2008;24(2):146-53.
189. Noyes FR, Berrios-Torres S, Barber-Westin SD, Heckmann TP. Prevention of permanent arthrofibrosis after anterior cruciate ligament reconstruction alone or combined with associated procedures: a prospective study in 443 knees. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2000;8(4):196-206.
190. Barei DP, Nork SE, Mills WJ, Henley MB, Benirschke SK. Complications associated with internal fixation of high-energy bicondylar tibial plateau fractures utilizing a two-incision technique. *J Orthop Trauma.* 2004;18(10):649-57.
191. Maniar RN, Baviskar JV, Singhi T, Rathi SS. To use or not to use continuous passive motion post-total knee arthroplasty presenting functional assessment results in early recovery. *J Arthroplasty.* 2012;27(2):193-200 e1.

192. Hill AD, Palmer MJ, Tanner SL, Snider RG, Broderick JS, Jeray KJ. Use of Continuous Passive Motion in the Postoperative Treatment of Intra-Articular Knee Fractures. *J Bone Joint Surg Am.* 2014;96(14):e118.
193. Bong MR, Di Cesare PE. Stiffness after total knee arthroplasty. *J Am Acad Orthop Surg.* 2004;12(3):164-71.
194. Bible JE, Simpson AK, Biswas D, Pelker RR, Grauer JN. Actual knee motion during continuous passive motion protocols is less than expected. *Clin Orthop Relat Res.* 2009;467(10):2656-61.
195. Gittings D, Hesketh P, Dattilo J, Zgonis M, Kelly J, Mehta S. Arthroscopic lysis of adhesions improves knee range of motion after fixation of intra-articular fractures about the knee. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2016;136(12):1631-5.
196. Franulic N, Laso J, Del Pino C, Brito C, Olivieri R, Gaggero N. Arthroscopic fibroarthrolysis and mobilization under anesthesia is a simple, reproducible, and satisfactory method for the treatment of patients with severe post-traumatic arthrofibrosis of the knee. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol.* 2024.
197. Kukreja M, Kang J, Curry EJ, Li X. Arthroscopic Lysis of Adhesions and Anterior Interval Release With Manipulation Under Anesthesia for Severe Post-traumatic Knee Stiffness: A Simple and Reproducible Step-by-Step Guide. *Arthrosc Tech.* 2019;8(5):e429-e35.
198. Oliveira VG, D'Elia LF, Tirico LE, Gobbi RG, Pecora JR, Camanho GL, et al. Judet quadricepsplasty in the treatment of posttraumatic knee rigidity: long-term outcomes of 45 cases. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012;72(2):E77-80.
199. Liu KM, Liu S, Cui Z, Han X, Tang T, Wang A. A less invasive procedure for posttraumatic knee stiffness. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2011;131(6):797-802.
200. Mack M. Inflammation and fibrosis. *Matrix Biol.* 2018;68-69:106-21.
201. Middleton AH, Perlewitz MA, Edelstein AI, Vetter CS. Knee Arthrofibrosis following Tibial Plateau Fracture Treated with Arthroscopic Lysis of Adhesions with Manipulation. *J Knee Surg.* 2022;35(7):816-20.
202. Stone RC, Pastar I, Ojeh N, Chen V, Liu S, Garzon KI, et al. Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Res.* 2016;365(3):495-506.
203. Fields BKK, Skalski MR, Patel DB, White EA, Tomasian A, Gross JS, et al. Adhesive capsulitis: review of imaging findings, pathophysiology, clinical presentation, and treatment options. *Skeletal Radiol.* 2019;48(8):1171-84.
204. Favejee MM, Huisstede BM, Koes BW. Frozen shoulder: the effectiveness of conservative and surgical interventions--systematic review. *Br J Sports Med.* 2011;45(1):49-56.
205. Yoshida S, Ikenaga N, Liu SB, Peng ZW, Chung J, Sverdlow DY, 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):1378-92.
206. Salmons HI, Payne AN, Taunton MJ, Owen AR, Fruth KM, Berry DJ, et al. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Oral Corticosteroids Mitigated the Risk of Arthrofibrosis After Total Knee Arthroplasty. *J Arthroplasty.* 2023;38(6S):S350-S4.

207. Wongrakpanich S, Wongrakpanich A, Melhado K, Rangaswami J. A Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use in The Elderly. *Aging Dis.* 2018;9(1):143-50.
208. Czaja AJ. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(10):2515-32.
209. Habib GS, Saliba W, Nashashibi M. Local effects of intra-articular corticosteroids. *Clin Rheumatol.* 2010;29(4):347-56.
210. Lorbach O, Anagnostakos K, Scherf C, Seil R, Kohn D, Pape D. Nonoperative management of adhesive capsulitis of the shoulder: oral cortisone application versus intra-articular cortisone injections. *J Shoulder Elbow Surg.* 2010;19(2):172-9.
211. Wang W, Shi M, Zhou C, Shi Z, Cai X, Lin T, et al. Effectiveness of corticosteroid injections in adhesive capsulitis of shoulder: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(28):e7529.
212. Desai MJ, Matson AP, Ruch DS, Leversedge FJ, Aldridge JM, 3rd, Richard MJ. Perioperative Glucocorticoid Administration Improves Elbow Motion in Terrible Triad Injuries. *J Hand Surg Am.* 2017;42(1):41-6.
213. Bingham JS, Bukowski BR, Wyles CC, Pareek A, Berry DJ, Abdel MP. Rotating-Hinge Revision Total Knee Arthroplasty for Treatment of Severe Arthrofibrosis. *J Arthroplasty.* 2019;34(7S):S271-S6.
214. Ghazipura M, Mammen MJ, Herman DD, Hon SM, Bissell BD, Macrea M, et al. Nintedanib in Progressive Pulmonary Fibrosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Am Thorac Soc.* 2022;19(6):1040-9.
215. Schafer S, Viswanathan S, Widjaja AA, Lim WW, Moreno-Moral A, DeLaughter DM, et al. IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis. *Nature.* 2017;552(7683):110-5.
216. Li L, Fu H, Liu Y. The fibrogenic niche in kidney fibrosis: components and mechanisms. *Nat Rev Nephrol.* 2022;18(9):545-57.
217. Wang M, Liu C, Xiao W. Intra-articular injection of hyaluronic acid for the reduction in joint adhesion formation in a rabbit model of knee injury. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2014;22(7):1536-40.
218. Meran S, Thomas DW, Stephens P, Enoch S, Martin J, Steadman R, et al. Hyaluronan facilitates transforming growth factor-beta1-mediated fibroblast proliferation. *J Biol Chem.* 2008;283(10):6530-45.
219. Curran MP. Hyaluronic acid (Supartz(R)): a review of its use in osteoarthritis of the knee. *Drugs Aging.* 2010;27(11):925-41.
220. Teeple E, Elsaid KA, Jay GD, Zhang L, Badger GJ, Akelman M, et al. Effects of supplemental intra-articular lubricin and hyaluronic acid on the progression of posttraumatic arthritis in the anterior cruciate ligament-deficient rat knee. *Am J Sports Med.* 2011;39(1):164-72.
221. Rutjes AW, Juni P, da Costa BR, Trelle S, Nuesch E, Reichenbach S. Viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2012;157(3):180-91.

222. Mahapatra P, Horriat S, Anand BS. Anterior cruciate ligament repair - past, present and future. *J Exp Orthop*. 2018;5(1):20.
223. Dudakovic A, Limberg AK, Bothun CE, Dilger OB, Bayram B, Bettencourt JW, et al. AdipoRon reduces TGFbeta1-mediated collagen deposition in vitro and alleviates knee stiffness in vivo. *J Cell Physiol*. 2024;239(2):e31168.
224. Straub LG, Scherer PE. Metabolic Messengers: Adiponectin. *Nat Metab*. 2019;1(3):334-9.
225. Sica DA, Gehr TW, Ghosh S. Clinical pharmacokinetics of losartan. *Clin Pharmacokinet*. 2005;44(8):797-814.
226. Varo N, Etayo JC, Zalba G, Beaumont J, Iraburu MJ, Montiel C, et al. Losartan inhibits the post-transcriptional synthesis of collagen type I and reverses left ventricular fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1999;17(1):107-14.
227. Wei HS, Li DG, Lu HM, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, et al. Effects of AT1 receptor antagonist, losartan, on rat hepatic fibrosis induced by CCl(4). *World J Gastroenterol*. 2000;6(4):540-5.
228. Yao HW, Zhu JP, Zhao MH, Lu Y. Losartan attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Respiration*. 2006;73(2):236-42.
229. Campbell SE, Katwa LC. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29(7):1947-58.
230. Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ Res*. 2010;106(11):1675-80.
231. Shibasaki Y, Nishiue T, Masaki H, Tamura K, Matsumoto N, Mori Y, 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. *Hypertens Res*. 2005;28(10):787-95.
232. Wegner E, Mickan T, Truffel S, Slotina E, Muller L, Wunderlich F, et al. The effect of losartan on the development of post-traumatic joint stiffness in a rat model. *Biomed Pharmacother*. 2023;166:115291.
233. Xu C, Peng H, Li R, Chai W, Li X, Fu J, 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):911-6.
234. Cheng J, Abdi S. Complications of Joint, Tendon, and Muscle Injections. *Tech Reg Anesth Pain Manag*. 2007;11(3):141-7.
235. Tracleer (Bosentan) ZUSAMMENFASSUNG DER MERKMALE DES ARZNEIMITTELS, (2009).
236. Clozel M, Salloukh H. Role of endothelin in fibrosis and anti-fibrotic potential of bosentan. *Ann Med*. 2005;37(1):2-12.
237. Houde M, Desbiens L, D'Orleans-Juste P. Endothelin-1: Biosynthesis, Signaling and Vasoreactivity. *Adv Pharmacol*. 2016;77:143-75.
238. Katwa LC, Guarda E, Weber KT. Endothelin receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 1993;27(12):2125-9.

239. Rodriguez-Pascual F, Redondo-Horcajo M, Lamas S. Functional cooperation between Smad proteins and activator protein-1 regulates transforming growth factor-beta-mediated induction of endothelin-1 expression. *Circ Res.* 2003;92(12):1288-95.
240. Gonzalez W, Chen Z, Damon DH. Transforming growth factor-beta regulation of endothelin expression in rat vascular cell and organ cultures. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001;37(2):219-26.
241. Harada M, Itoh H, Nakagawa O, Ogawa Y, Miyamoto Y, Kuwahara K, et al. Significance of ventricular myocytes and nonmyocytes interaction during cardiocyte hypertrophy: evidence for endothelin-1 as a paracrine hypertrophic factor from cardiac nonmyocytes. *Circulation.* 1997;96(10):3737-44.
242. Ingeborg Schafhalter-Zoppoth MOG, and John R. Teerlink. Endothelin antagonism with bosentan, a dual receptor blocker, normalizes dysregulated transforming growth factor beta signaling pathways in rats with chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 2002.
243. Xiao C, Ghosh S. NF-kappaB, an evolutionarily conserved mediator of immune and inflammatory responses. *Adv Exp Med Biol.* 2005;560:41-5.
244. Luedde T, Schwabe RF. NF-kappaB in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;8(2):108-18.
245. Muller DN, Mervaala EM, Schmidt F, Park JK, Dechend R, Genersch E, et al. Effect of bosentan on NF-kappaB, inflammation, and tissue factor in angiotensin II-induced end-organ damage. *Hypertension.* 2000;36(2):282-90.
246. Finsnes F, Lyberg T, Christensen G, Skjonsberg OH. Effect of endothelin antagonism on the production of cytokines in eosinophilic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;280(4):L659-65.
247. Raghu G, Behr J, Brown KK, Egan JJ, Kawut SM, Flaherty KR, et al. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with ambrisentan: a parallel, randomized trial. *Ann Intern Med.* 2013;158(9):641-9.
248. Wollin L, Wex E, Pautsch A, Schnapp G, Hostettler KE, Stowasser S, et al. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* 2015;45(5):1434-45.
249. Agency EM. Nintedanib Accord SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS. 2024.
250. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16(5):585-601.
251. Reck M, Kaiser R, Mellempgaard A, Douillard JY, Orlov S, Krzakowski M, et al. Docetaxel plus nintedanib versus docetaxel plus placebo in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (LUME-Lung 1): a phase 3, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(2):143-55.
252. Corte T, Bonella F, Crestani B, Demedts MG, Richeldi L, Coeck C, et al. Safety, tolerability and appropriate use of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 2015;16:116.
253. Lamb YN. Nintedanib: A Review in Fibrotic Interstitial Lung Diseases. *Drugs.* 2021;81(5):575-86.

254. Flaherty KR, Wells AU, Cottin V, Devaraj A, Walsh SLF, Inoue Y, et al. Nintedanib in Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases. *N Engl J Med*. 2019;381(18):1718-27.
255. Thannickal VJ, Aldweib KD, Rajan T, Fanburg BL. Upregulated expression of fibroblast growth factor (FGF) receptors by transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) mediates enhanced mitogenic responses to FGFs in cultured human lung fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;251(2):437-41.
256. Chen Y, Zhao M, Fu M, Yao W, Tang C. The role of calcineurin in the lung fibroblasts proliferation and collagen synthesis induced by basic fibroblast growth factor. *Chin Med J (Engl)*. 2003;116(6):857-62.
257. Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(4):255-73.
258. Hamada N, Kuwano K, Yamada M, Hagimoto N, Hiasa K, Egashira K, et al. Anti-vascular endothelial growth factor gene therapy attenuates lung injury and fibrosis in mice. *J Immunol*. 2005;175(2):1224-31.
259. Pope JE, Denton CP, Johnson SR, Fernandez-Codina A, Hudson M, Nevskaya T. State-of-the-art evidence in the treatment of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol*. 2023;19(4):212-26.
260. Wegner E, Slotina E, Mickan T, Truffel S, Arand C, Wagner D, et al. Pleiotropic Long-Term Effects of Atorvastatin on Posttraumatic Joint Contracture in a Rat Model. *Pharmaceutics*. 2022;14(3).
261. McGovern TJ. 205832Orig1s000. CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH: FDA Food and Drug Administration 2014.
262. Miotto K, Cho AK, Khalil MA, Blanco K, Sasaki JD, Rawson R. Trends in Tramadol: Pharmacology, Metabolism, and Misuse. *Anesth Analg*. 2017;124(1):44-51.
263. Dingemans J, van Giersbergen PL. Clinical pharmacology of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43(15):1089-115.
264. Tanner J, Melen K. Preoperative hair removal to reduce surgical site infection. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021;8(8):CD004122.
265. Hackbarth H, Kuppers N, Bohnet W. Euthanasia of rats with carbon dioxide--animal welfare aspects. *Lab Anim*. 2000;34(1):91-6.
266. Trudel G, Uthoff HK. 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.
267. Zhang QB, Huo L, Li M, Zhang R, Zhou T, Wang F, et al. Role of hypoxia-mediated pyroptosis in the development of extending knee joint contracture in rats. *Eur J Med Res*. 2024;29(1):298.
268. Nakahara R, Ito A, Nakahata A, Nagai-Tanima M, Kawai H, Uchiyama K, et al. Development of a novel model for intraarticular adhesion in rat knee joint. *PLoS One*. 2023;18(9):e0292000.

269. Wegner E, Warnke D, Buschmann V, Hild B, Mais B, Ritz U, et al. Nintedanib reduces severity of post-traumatic joint contracture by modulating fibrosis and inflammation. *J Mol Med (Berl)*. 2025.
270. Science J. Broschüre Forceteq® Signateq® DE V1.3. 2024.
271. Rasband W. ImageJ. 1.53t ed2024.
272. Corporation M. Microsoft® Excel für Mac. 16.87 ed. Redmond/WA, USA : <https://products.office.com/de-de/excel>; 2024.
273. GraphPad Software i. Prism 10 for macOS. 10.1.0 ed. Boston, Massachusetts USA: GraphPad Software, inc; 2023.
274. Hemmerich A. Winsorizing Rechner StatistikGuru 2018 [updated 2024. Available from: [https://statistikguru.de/rechner/winsorizing-rechner.html#:~:text=Winsorizing%20ist%20die%20Transformation%20von,Winsor%20\(1895-1951\)](https://statistikguru.de/rechner/winsorizing-rechner.html#:~:text=Winsorizing%20ist%20die%20Transformation%20von,Winsor%20(1895-1951))).
275. Yoshida H, Imafuku Y, Ohhara M, Miyata M, Kasukawa R, Ohsumi K, et al. Endothelin-1 production by human synoviocytes. *Ann Clin Biochem*. 1998;35 ( Pt 2):290-4.
276. Zhao Z, Li E, Cao Q, Sun J, Ma B. Endothelin-1 concentrations are correlated with the severity of knee osteoarthritis. *J Investig Med*. 2016;64(4):872-4.
277. Wong K, Trudel G, Laneuville O. Intra-articular collagenase injection increases range of motion in a rat knee flexion contracture model. *Drug Des Devel Ther*. 2018;12:15-24.
278. Owen AR, Dagneaux L, Limberg AK, Bettencourt JW, Bayram B, Bolon B, et al. Biomechanical, histological, and molecular characterization of a new posttraumatic model of arthrofibrosis in rats. *J Orthop Res*. 2022;40(2):323-37.
279. Abdel MP, Morrey ME, Grill DE, Kolbert CP, An KN, Steinmann SP, et al. Effects of joint contracture on the contralateral unoperated limb in a rabbit knee contracture model: a biomechanical and genetic study. *J Orthop Res*. 2012;30(10):1581-5.
280. Matucci-Cerinic M, Denton CP, Furst DE, Mayes MD, Hsu VM, Carpentier P, et al. Bosentan treatment of digital ulcers related to systemic sclerosis: results from the RAPIDS-2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(1):32-8.
281. Kuhn A, Haust M, Ruland V, Weber R, Verde P, Felder G, et al. Effect of bosentan on skin fibrosis in patients with systemic sclerosis: a prospective, open-label, non-comparative trial. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(7):1336-45.
282. Khanna D, Furst DE, Clements PJ, Allanore Y, Baron M, Czirjak L, et al. Standardization of the modified Rodnan skin score for use in clinical trials of systemic sclerosis. *J Scleroderma Relat Disord*. 2017;2(1):11-8.
283. Raimundo K, Chang E, Broder MS, Alexander K, Zazzali J, Swigris JJ. Clinical and economic burden of idiopathic pulmonary fibrosis: a retrospective cohort study. *BMC Pulm Med*. 2016;16:2.
284. King TE, Jr., Behr J, Brown KK, du Bois RM, Lancaster L, de Andrade JA, et al. BUILD-1: a randomized placebo-controlled trial of bosentan in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(1):75-81.

285. King TE, Jr., Brown KK, Raghu G, du Bois RM, Lynch DA, Martinez F, et al. BUILD-3: a randomized, controlled trial of bosentan in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(1):92-9.
286. Tanaka Y, Hino M, Gemma A. Potential benefit of bosentan therapy in borderline or less severe pulmonary hypertension secondary to idiopathic pulmonary fibrosis-an interim analysis of results from a prospective, single-center, randomized, parallel-group study. *BMC Pulm Med.* 2017;17(1):200.
287. Raghu G, King TE, Jr., Behr J, Brown KK, du Bois RM, Leconte I, et al. Quality of life and dyspnoea in patients treated with bosentan for idiopathic pulmonary fibrosis (BUILD-1). *Eur Respir J.* 2010;35(1):118-23.
288. Li HF, Wang JX, Xie ZF, Li LH, Li B, Huang FF, et al. Bosentan and ambrisentan in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a meta-analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2024;28(3):1183-93.
289. Morrey ME, Sanchez-Sotelo J, Lewallen EA, An KN, Grill DE, Steinmann SP, et al. Intra-articular injection of a substance P inhibitor affects gene expression in a joint contracture model. *J Cell Biochem.* 2018;119(2):1326-36.
290. Kaneguchi A, Ozawa J, Minamimoto K, Yamaoka K. Formation process of joint contracture after anterior cruciate ligament reconstruction in rats. *J Orthop Res.* 2021;39(5):1082-92.
291. Morrey ME, Abdel MP, Riester SM, Dudakovic A, van Wijnen AJ, Morrey BF, et al. Molecular landscape of arthrofibrosis: Microarray and bioinformatic analysis of the temporal expression of 380 genes during contracture genesis. *Gene.* 2017;610:15-23.
292. Bozkurt M, Polat EC, Ozcan L, Ozer M, Ozturk GY, Yildirim F, et al. Effect of Nintedanib on healing and fibrosis in rats with experimentally induced urethral injury. *Prog Urol.* 2023;33(7):393-400.
293. Ding KL, Smith C, Seedorf G, Abman SH. Nintedanib preserves lung growth and prevents pulmonary hypertension in a hyperoxia-induced lung injury model. *Pediatr Res.* 2024.
294. Alonso-Perez J, Carrasco-Rozas A, Borrell-Pages M, Fernandez-Simon E, Pinol-Jurado P, Badimon L, et al. Nintedanib Reduces Muscle Fibrosis and Improves Muscle Function of the Alpha-Sarcoglycan-Deficient Mice. *Biomedicines.* 2022;10(10).
295. Straub V, Murphy A, Udd B, group Lws. 229th ENMC international workshop: Limb girdle muscular dystrophies - Nomenclature and reformed classification Naarden, the Netherlands, 17-19 March 2017. *Neuromuscul Disord.* 2018;28(8):702-10.
296. Pegoraro E, Hoffman EP. Limb-Girdle Muscular Dystrophy Overview - RETIRED CHAPTER, FOR HISTORICAL REFERENCE ONLY. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Amemiya A, editors. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA)1993.
297. Yalamarthi N, Alipouriani A, Savage E, Gorgun E. Delayed healing of rectal mucosa after endoscopic submucosal dissection (ESD) with nintedanib use. *BMJ Case Rep.* 2023;16(12).
298. Takahashi S, Endo M, Fukuda Y, Ogawa K, Nakamura M, Okada K, et al. Nintedanib-Induced Delayed Mucosal Healing after Adjuvant Radiation in a Case of Oropharyngeal Carcinoma. *Case Rep Oncol.* 2022;15(2):776-82.

299. Yan J, Feng G, Yang Y, Zhao X, Ma L, Guo H, et al. Nintedanib ameliorates osteoarthritis in mice by inhibiting synovial inflammation and fibrosis caused by M1 polarization of synovial macrophages via the MAPK/PI3K-AKT pathway. *FASEB J.* 2023;37(10):e23177.
300. Wind S, Simons G, Bertulis J, Coeck C. FRI0411 Coadministration of bosentan has no effect on the pharmacokinetics of nintedanib. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2017;76(Suppl 2):642-3.
301. Ingelheim B. OFEV (nintedanib) US prescribing information: DEA; 2024 [updated 07/2024]. Available from: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=da1c9f37-779e-4682-816f-93d0faa4cfc9>.
302. Zhou H, Trudel G, Uthoff HK, Laneuville O. Range of Extension Correlates with Posterior Capsule Length after Knee Remobilization. *Med Sci Sports Exerc.* 2018;50(12):2401-8.
303. Lee S, Sakurai T, Ohsako M, Saura R, Hatta H, Atomi Y. Tissue stiffness induced by prolonged immobilization of the rat knee joint and relevance of AGEs (pentosidine). *Connect Tissue Res.* 2010;51(6):467-77.
304. Nagai M, Aoyama T, Ito A, Iijima H, Yamaguchi S, Tajino J, et al. Contributions of biarticular myogenic components to the limitation of the range of motion after immobilization of rat knee joint. *BMC Musculoskelet Disord.* 2014;15:224.
305. Kaneguchi A, Ozawa J, Kawamata S, Yamaoka K. Development of arthrogenic joint contracture as a result of pathological changes in remobilized rat knees. *J Orthop Res.* 2017;35(7):1414-23.
306. Trudel G, Laneuville O, Coletta E, Goudreau L, Uthoff HK. 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):730-7.
307. Werner BC, Cancienne JM, Miller MD, Gwathmey FW. Incidence of Manipulation Under Anesthesia or Lysis of Adhesions After Arthroscopic Knee Surgery. *Am J Sports Med.* 2015;43(7):1656-61.
308. Hildebrand KA, Sutherland C, Zhang M. Rabbit knee model of post-traumatic joint contractures: the long-term natural history of motion loss and myofibroblasts. *J Orthop Res.* 2004;22(2):313-20.
309. Nesterenko S, Morrey ME, Abdel MP, An KN, Steinmann SP, Morrey BF, et al. New rabbit knee model of posttraumatic joint contracture: indirect capsular damage induces a severe contracture. *J Orthop Res.* 2009;27(8):1028-32.
310. Kallianos SA, Singh V, Henry DS, Berkoff DJ, Arendale CR, Weinhold PS. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits arthrofibrosis in a post-traumatic knee immobilization model. *Knee.* 2021;33:210-5.
311. Zhu Z, Gao S, Zhu H, Chen Y, Wu D, Chen Z, et al. Metformin improves fibroblast metabolism and ameliorates arthrofibrosis in rats. *J Orthop Translat.* 2023;40:92-103.
312. Gill HS, Prausnitz MR. Does needle size matter? *J Diabetes Sci Technol.* 2007;1(5):725-9.
313. Jeffs AD, Boyd M, Larabee L, Shelton M, Bassil A, Taylor R, et al. The role of leukotriene inhibition using a 5-lipoxygenase (5-LO) inhibitor in a joint contracture model. *J Exp Orthop.* 2023;10(1):64.

314. Chen C. COX-2's new role in inflammation. *Nat Chem Biol.* 2010;6(6):401-2.
315. Saxena P, Sharma PK, Purohit P. A journey of celecoxib from pain to cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2020;147:106379.
316. Mayoral K, Lizano-Barrantes C, Zamora V, Pont A, Miret C, Barrufet C, et al. Montelukast in paediatric asthma and allergic rhinitis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir Rev.* 2023;32(170).
317. 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):1409-23.
318. Zhou Y, Zhang QB, Zhong HZ, Liu Y, Li J, Lv H, et al. Rabbit Model of Extending Knee Joint Contracture: Progression of Joint Motion Restriction and Subsequent Joint Capsule Changes after Immobilization. *J Knee Surg.* 2020;33(1):15-21.
319. Trudel G, Uthoff HK, Goudreau L, Laneville O. Quantitative analysis of the reversibility of knee flexion contractures with time: an experimental study using the rat model. *BMC Musculoskelet Disord.* 2014;15:338.
320. Pinol-Jurado P, Suarez-Calvet X, Fernandez-Simon E, Gallardo E, de la Oliva N, Martinez-Muriana A, et al. Nintedanib decreases muscle fibrosis and improves muscle function in a murine model of dystrophinopathy. *Cell Death Dis.* 2018;9(7):776.
321. William Moy Stratton Russell RLB. *The Principles of Humane Experimental Technique*: Methuen & Co. Limited; 1959.
322. Taylor K, Rego Alvarez L, Grange E. The Prevalence of Reported Gavage Incidents in Repeated Dose Toxicity Studies Involving Rats Conducted Between 2004–2023. *Alternatives to Laboratory Animals.* 2025;53(3):154-67.
323. Union EPaCotE. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union.* 2010:L276:33–79.
324. Umbarkar P, Singh AP, Tousif S, Zhang Q, Sethu P, Lal H. Repurposing Nintedanib for pathological cardiac remodeling and dysfunction. *Pharmacol Res.* 2021;169:105605.

## **9 Danksagung**

**10 Anhang**10.1 Mess- und Analysegeräte

<b>Elektronisches Gerät</b>	<b>Produkt Herstellername Anschrift</b>
<b>Akku-Schermaschine/Trimmer</b>	Isis Schermaschine/Trimmer Aesculap Schermaschinen GmbH Suhl, Deutschland
<b>Arthrometer</b>	Arthrometer Hochschule RheinMain Wiesbaden, Deutschland
<b>Autoklav – Sterilisation</b>	Systemc DX-45 Systemc GmbH & Co. KG Linden, Deutschland
<b>Digitale Waage</b>	SI- 234 Analysewaage Denver Instrument Denver, Vereinigte Staaten von Amerika
<b>Elektrischer Bohrer</b>	Dremel Multifunktionswerkzeug Dremel Europe Bosch Power Tools B.V Breda, Niederlande
<b>Kühlschrank / Gefrierschrank</b>	Laborkühlgerät MediLine Liebherr-Hausgeräte GmbH Ochsenhausen, Deutschland
<b>Laborspülmaschine- Thermodesinfektionsgerät</b>	G 7883 CD Miele Vertriebsgesellschaft Deutschland KG Gütersloh, Deutschland

<b>Linearschlitten, Servocontroller</b>	Linearschlitten, Servocontroller Jenny Science Rain, Schweiz
<b>Röntgengerät</b>	Faxitron MX- 20 Cabinet X-ray System Faxitron X- Ray LLC Lincolnshire, USA
<b>Wärmeplatte</b>	BW03 Baxter Deutschland GmbH Unterschleißheim, Deutschland

10.2 Flüssigkeiten

<b>Flüssigkeit</b>	<b>Produkt</b> <b>Herstellername</b> <b>Anschrift</b>
<b>Desinfektion Haut, Schleimhaut</b>	Braunol, 7,5 % PVP-Iod-Lösung, 100 ml B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
<b>Desinfektion Hände</b>	Sterillium Händedesinfektionsmittel BODE Chemie GmbH Hamburg, Deutschland
<b>Desinfektion Oberflächen</b>	Incidin Premium Wipes Ecolab Deutschland GmbH Monheim am Rhein, Deutschland
<b>Desinfektion OP-Instrumente</b>	Gigasept Instru AF Schülke & Mayr Norderstedt, Deutschland

<b>Isotone Kochsalzlösung (NaCl 0,9%)</b>	250 ml isotone Kochsalzlösung (0,9%) B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
<b>Waschlotion</b>	Lifosan soft B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland

10.3 Medikamente

<b>Medikament</b>	<b>Produkt</b> <b>Herstellername</b> <b>Anschrift</b>
<b>Atipamezol</b>	Alzane 5 mg/ml Zoetis Deutschland GmbH Berlin, Deutschland
<b>Bosentan</b>	Bosentan beta 125 mg betapharm Arzneimittel GmbH Augsburg, Deutschland
<b>Corneagel</b>	Corneregel 50mg/g Dexpanthenol Augengel Bausch & Lomb 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</b>	IsoFlo 100% w/w Flüssigkeit Zoetis Deutschland GmbH Berlin, 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>Nintedanib</b>	Nintedanib 5 mg Boehringer Ingelheim International GmbH Ingelheim am Rhein, 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 Operationsmaterialien

<b>Einmalmaterial</b>	<b>OP- Instrumente</b>
Abdecktuch 90 cm x 75 cm steril	Elektrischer Bohrer
Bohrer Ø 1,0 mm steril	Chirurgische Wundpinzette, spitz
Einmalhandschuhe Gr. L	Elevatorium nach Freer
ETHILON 4-0 FS-2 Hautfaden	Kocherklemme gerade, chirurgisch
Hautmarker steril	Mosquitoklemme gebogen, anatomisch
Kirschner-Draht Ø 0,6 mm steril	Nadelhalter nach De Bakey
Kittel steril (fakult.)	Nierenschale
Knopfkanüle steril	Präparierschere, spitz
Lochtuch 60 cm x 50 cm steril	Schere nach Metzenbaum, stumpf
Mini-Spike	Seitenschneider
Multikompressen 10 cm x 10 cm steril	Wundpinzette anatomisch
OP-Handschuhe Gr. 8 steril	Wundspreizer nach Finsen, 2x3 Zähne, spitz
OPSITE Pflaster flüssig	
Skalpell 10 Haut	
Skalpell 15 subkutan/Faszie	
Spritze Luer 5 ml	
Tupfer 3 cm steril	
VICRYL 3-0 SH-1 plus Faszie	

10.5 Score-Sheet Ratten

<b>1. Körpergewicht</b>		<b>Score</b>
<b>Das letzte Gewicht vor einer kontinuierlicher Gewichtsabnahme</b>		
- Unbeeinflusst oder Anstieg		<b>0</b>
- Reduktion > 10%		<b>10</b>
- Reduktion > 20%		<b>20</b>
<b>2. Allgemeinzustand</b>		
- Fell glatt, glänzend und anliegend, Augen glänzend, Körperöffnungen sauber		<b>0</b>
- Fell matt, Augen trüb,		<b>5</b>
- Fell stumpf, Augen eingesunken trüb, verklebte oder feuchte Körperöffnungen		<b>10</b>
- Fell gesträubt, Tier fühlt sich kalt an, Augen geschlossen, Krämpfe, Lähmungen, Atemgeräusche, bläuliche Schleimhäute		<b>20</b>
<b>3. Spontanverhalten</b>		
- aufmerksam, neugierig, Aufrichten, flinke Bewegungen		<b>0</b>
- ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte oder reduzierte Bewegung oder Überaktivität, reduziertes Explorationsverhalten		<b>5</b>
- Isolation, Koordinationsstörungen, ausgeprägte Stereotypen oder Hyperkinetik		<b>10</b>
- Apathie, Automutilation, Nekrosen, Rektumprolaps, Wund- oder Gelenkinfektion		<b>20</b>
<b>4. Aggressivität bei Palpation</b>		<b>20</b>
<b>5. Abnorme Körperhaltung</b>		<b>20</b>
<b>6. Materialversagen</b>		<b>20</b>
- Cerclagendislokation, Cerclagenbruch und periosteosynthetische Fraktur		
<b>Bewertung</b>	<b>Maßnahme</b>	
Keine Belastung	<i>1 x tägl. beobachten, kein Score Sheet nötig</i>	<b>0</b>
Geringgradige Belastung:	<i>1 x tägl. beobachten, Score Sheet alle 2 Tag bis Besserung</i>	<b>1-9</b>

Mittelgradige Belastung:	1 x tägl. beobachten, Versuchsleiter und zuständigen Tierarzt informieren, z. B. Glucosegabe ins Trinkwasser, Tramadol über Trinkwasser über 4 Tage, andauernde mgl. Belastung Score Sheet tägl.	<b>10-19</b>
Hochgradige Belastung	Unverzögliche Meldung an unten genannte Person und Tierschutzbeauftragten. Revaluation durch unten genannte Person, bei Bestätigung der Belastung sofortiger Abbruch	<b>20</b>
<b>Summe oder Einzelpunktzahl; <math>\geq 20</math> Punkte = Abbruch für Versuchstier (Abbruch = Tötung)</b>		

Bei Erfüllung der Abbruchkriterien (> 20 Punkte) bitte umgehend Meldung an Dr. med. E. Wegner. Eine Revaluation bzw. ein Abbruch wird entsprechend durch Dr. med. E. Wegner unternommen.

Kontakt:

Funk: 194 6996

Telefon: 0160 944 152 47

E-Mail: erik.wegner@unimedizin-mainz.de

### 10.6 Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Produkt Herstellername Anschrift</b>
<b>Abdecktuch, steril</b>	Abdecktuch 75 cm x 90 cm Medline International Germany GmbH Kleve, Deutschland
<b>Abdecktuch mit selbstklebendem OP Fenster, steril</b>	Lochtuch 50 cm x 60 cm, Ø 5 cm Medline International Germany GmbH Kleve, Deutschland
<b>Aufziehkanüle rot, steril</b>	BD Blunt Fill Needle, G18 x 1 ½, 1,2 mm x 40 mm BD, Becton Dickinson GmbH Heidelberg, Deutschland

<b>Einmalhandschuhe, nicht steril</b>	VWR Latex Powder Free Gloves, Größe L VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland
<b>Entnahme- und Zuspritzspike, steril</b>	Mini-Spike B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
<b>Hautmarker, steril</b>	Hautmarker ultrafine mit Lineal Viscot Medical LLC East Hanover, Vereinigte Staaten von Amerika
<b>Injektionskanüle, steril</b>	BD Microlance 3, 30 G x ½, 0,29 x 13 mm BD, Becton Dickinson GmbH Heidelberg, Deutschland
<b>Kirschner-Draht, steril</b>	Kirschner-Draht Ø 0,6 mm+ Ø 1,0 mm, 70 mm Länge Johnson & Johnson Medical GmbH Norderstedt, Deutschland
<b>Mullkompressen, steril</b>	Mullkompressen 10 cm x 10 cm, 5 Stück Fuhrmann GmbH Much, Deutschland
<b>Nahtmaterial (Fasziennaht) , steril</b>	VICRYL 3-0 SH-1 plus 70 cm, resorbierbar ETHICON Johnson & Johnson Medical GmbH Norderstedt, Deutschland
<b>Nahtmaterial (Hautnaht), steril</b>	ETHILON 4-0 FS-2 75 cm, nicht resorbierbar ETHICON Johnson & Johnson Medical GmbH Norderstedt, Deutschland
<b>Nahtmaterial (Ligatur Arthrometer), steril</b>	VICRYL 4-0 3x 45 cm resorbierbar

	Johnson & Johnson Medical GmbH Norderstedt, Deutschland
<b>Operationshandschuhe, steril</b>	Vasco OP Sensitive Gr. 8 B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
<b>Operationskittel, steril</b>	OP- Kittel „Essential“ unverstärkt, L-XL Medline International Germany GmbH Kleve, Deutschland
<b>OPSITE Spray, nicht steril</b>	OPSITE Sprühverband, 100 ml Smith & Nephew Deutschland GmbH Hamburg, Deutschland
<b>Eppi Reaktionsgefäß, nicht steril</b>	Safe-Lock-Tube, 1,5 ml Eppendorf SE Hamburg, Deutschland
<b>Skalpell, steril</b>	10er und 15er Einweg- Skalpell FEATHER Safety Razor Co. Ltd. Osaka, Japan
<b>Spritze Luer, steril</b>	2 ml, 3 ml und 5 ml Injekt Luer Solo Spritze B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
<b>Spülsonde, steril</b>	Einmal-Knopfkanüle Ø 0,8 mm, 70 mm Länge Interlock Medizintechnik GmbH Lensahn, Deutschland
<b>Tupfer, steril</b>	Schlinggazetupfer 20 cm x 20 cm, 3 Stück Fuhrmann GmbH Much, Deutschland

## **11 Tabellarischer Lebenslauf**