

Aus dem Bereich Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Klinische Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Einfluss von Diclofenac auf die Frakturheilung bei alten Mäusen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

Maximilian Stief

geb. am 13.05.1995 in St. Ingbert

Tag der Promotion: 16.03.2022

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

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Tina Histing

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

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Knochen.....	3
2.1.1	Morphologie.....	3
2.1.2	Histologie.....	4
2.1.3	Zellen des Knochens.....	6
2.2	Modeling und Remodeling.....	10
2.2.1	Initiation.....	11
2.2.2	Resorption.....	11
2.2.3	Umkehrung.....	12
2.2.4	Knochenbildung.....	12
2.2.5	Terminierung.....	12
2.3	Ossifikation.....	12
2.3.1	Desmale Ossifikation.....	13
2.3.2	Enchondrale Ossifikation.....	13
2.4	Frakturheilung.....	13
2.4.1	Primäre Frakturheilung.....	14
2.4.2	Sekundäre Frakturheilung.....	15
2.4.3	Phasen der Frakturheilung.....	15
2.4.4	Beeinträchtigung der Frakturheilung.....	17
2.4.5	Rolle von Prostaglandinen während der Frakturheilung.....	18
2.4.6	Biomarker der Frakturheilung.....	20
2.4.7	Frakturmodelle.....	24
2.4.8	Frakturheilung im Alter.....	25
2.5	Hormonelle Regulation des Knochenstoffwechsels.....	27
2.6	Diclofenac.....	28
2.6.1	Historie.....	28
2.6.2	Struktur.....	28
2.6.3	Wirkmechanismus.....	29
2.6.4	Pharmakokinetik.....	30
2.6.5	Indikation.....	31

2.6.6	Nebenwirkungen	32
2.7	Fragestellung und Zielsetzung	34
3	Material und Methoden	35
3.1	Tiermodell	35
3.2	Operation	35
3.3	Biomechanik	42
3.4	Röntgen	44
3.5	Mikro-CT	44
3.6	Histologie	47
3.6.1	Safranin O	48
3.6.2	TRAP	48
3.6.3	Osteocalcin	49
3.6.4	HE	50
3.6.5	Auswertung	50
3.7	Western Blot	53
3.8	Statistik	58
4	Ergebnisse	59
4.1	Postoperativer Verlauf	59
4.2	Biomechanik	59
4.3	Radiologie	60
4.3.1	Röntgen	60
4.3.2	CT	61
4.4	Histologie	63
4.5	Western Blot	71
5	Diskussion	75
5.1	Diskussion der Methoden	75
5.2	Diskussion der Ergebnisse	80
6	Schlussfolgerung	92
7	Literaturverzeichnis	93
8	Publikationen	144
8.1	Kongressvorträge	144
8.2	Publikationen	144
9	Danksagung	145
10	Lebenslauf	146

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata
ATPase	Adenosintriphosphatase
BMP	Bone morphogenetic protein
Cbfa1	Core-binding factor alpha 1
CD31	Cluster of Differentiation 31
cm	Zentimeter
COX	Cyclooxygenase
CYR61	Cysteine-rich protein 61
et al.	et alii
G	Gauge
G	Erdbeschleunigung
g	Gramm
HPF	High power field
IgG	Immunglobulin G
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
M	Molar
M-CSF	Macrophage Colony-stimulating factor
mg	Milligramm
min	Minute
mM	Millimolar
mm	Millimeter
n	Anzahl
N	Newton
NaCl	Natrium-Chlorid
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

Abkürzungsverzeichnis

OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PGE2	Prostaglandin E2
PTH	Parathormon
RANK	Receptor activator of nuclear factor kappa B
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa B-Ligand
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean)
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming growth factor
TRAP	Tartrate resistant acid phosphatase
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vs.	versus
°	Grad
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung Femurknochen.....	4
Abbildung 2: Binnenstruktur des Knochens.	6
Abbildung 3: Osteozytennetzwerk.	8
Abbildung 4: Osteoklast.....	10
Abbildung 5: Resorptionsphase.....	12
Abbildung 6: Primäre und Sekundäre Frakturheilung.....	17
Abbildung 7: Strukturformel Diclofenac.....	29
Abbildung 8: Chirurgische Instrumente.....	38
Abbildung 9: MouseScrew©.	38
Abbildung 10: Operatonsschritte.	40
Abbildung 11: Frakturvorrichtung.....	41
Abbildung 12: Postoperative Überwachung unter der Wärmelampe.....	41
Abbildung 13: Drei-Punkt-Biegevorrichtung.	43
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Drei-Punkt-Biegemessung.	43
Abbildung 15: Kraft-Weg-Diagramm Drei-Punkt-Biegemessung.....	44
Abbildung 16: Auswertung der CT-Bilder.....	47
Abbildung 17: Lokalisation der High-Power-Fields.....	52
Abbildung 18: Drei-Punkt-Biegemessung.	60
Abbildung 19: Goldberg-Score.	61
Abbildung 20: Röntgenaufnahmen der frakturierten Femora.	61
Abbildung 21: 3D-Rekonstruktion der frakturierten Femora.	62
Abbildung 22: Computertomographie.	62
Abbildung 23: Histologieschnitte Safranin-O-Färbung.	64
Abbildung 24: Histo-Score.....	64
Abbildung 25: Morphologische Parameter Histologie.....	65
Abbildung 26: Gewebeanteile innerhalb des Frakturkallus.	66
Abbildung 27: Geflechtknochen und Lamellenknochen.	67
Abbildung 28: Anteil Geflechtknochen und Lamellenknochen.....	67
Abbildung 29: TRAP-Färbung.....	68
Abbildung 30: TRAP-positive Osteoklasten pro HPF.	68
Abbildung 31: Osteocalcin-Färbung.....	69
Abbildung 32: Anzahl GefäÙe pro HPF.....	70
Abbildung 33: Proteinexpression CYR61 und VEGF.	72

Abbildung 34: Proteinexpression PCNA und CD31.	72
Abbildung 35: Proteinexpression BMP-2 und BMP-4.....	73
Abbildung 36: Proteinexpression RANKL und OPG.....	73
Abbildung 37: Proteinexpression Kollagen 2 und Kollagen 10.	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Messwerte histologische Kallusanalyse.	51
Tabelle 2: Berechnete Werte Kallusanalyse.	51
Tabelle 3: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels.	55
Tabelle 4: Primärantikörper Western Blot.	57
Tabelle 5: Sekundärantikörper Western Blot.	57
Tabelle 6: Verteilung der Versuchstiere auf die einzelnen Untersuchungsgruppen.....	59
Tabelle 7: Strukturelle Parameter Computertomographie.	63

1 Zusammenfassung

Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs) gehören zu den meistrezeptierten Medikamenten weltweit. Zur Schmerzbehandlung finden sie auch im Alter und insbesondere nach Frakturen breite Anwendung. Mittlerweile gibt es jedoch Studien, die zeigen konnten, dass NSAIDs die Frakturheilung negativ beeinflussen können. In dieser Studie wurde der Effekt von Diclofenac auf die Frakturheilung im Alter untersucht. Dazu wurde bei 62 Mäusen eine diaphysäre Femurfraktur mit einer intramedullären Zugschraube versorgt. 33 Mäusen wurde über einen Zeitraum von zwei beziehungsweise fünf Wochen täglich 5mg/kg KG Diclofenac subkutan in die Nackenfalte appliziert. Die Kontrollgruppe (n=29) erhielt eine äquivalente Menge Kochsalzlösung. Die Frakturheilung wurde anschließend biomechanisch, radiologisch, histologisch sowie proteinbiochemisch untersucht. Die biomechanische Testung zeigte eine signifikant verminderte Drei-Punkt-Biegesteifigkeit fünf Wochen postoperativ bei den mit Diclofenac behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der computertomographischen Untersuchung war der Knochenanteil innerhalb des Frakturkallus nach fünf Wochen vermindert. In der histologischen Untersuchung zeigte sich ein verminderter Knochenanteil sowie vermehrt Bindegewebe innerhalb des Frakturkallus in der Diclofenac-Gruppe. Zudem war die Umwandlung des neugebildeten Gewebes hin zu reifem Lamellenknochen verzögert. Die Osteoklastenzahl war nach zwei Wochen verringert, nach fünf Wochen jedoch erhöht. Der Osteoklasteninhibitor Osteoprotegerin zeigte sich in der Western-Blot-Untersuchung erhöht. Dagegen wurden die Osteogenesemarker Bone morphogenetic protein 2 und Cystein-rich protein 61 unter Diclofenac-Therapie nur etwa halb so stark exprimiert.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Diclofenac die Frakturheilung bei alten Mäusen durch eine Hemmung des Knochenauf- und umbaus verzögert.

Abstract

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are among the most widely prescribed medications worldwide. They are also widely used to treat pain in the elderly and especially after fractures. However, recent studies have shown that NSAIDs can have a negative impact on fracture healing. In this study, the effect of diclofenac on fracture healing in the elderly was investigated. For this purpose, a diaphyseal femur fracture was treated with an intramedullary screw in 62 mice. 33 mice were given 5mg/kg bw diclofenac subcutaneously daily into the nuchal fold for a period of two and five weeks, respectively. The control group (n=29) received an equivalent amount of saline. The outcome of fracture healing was subsequently studied biomechanically, radiologically, histologically, and protein biochemically. Biomechanical testing revealed significantly decreased three-point bending stiffness five weeks postoperatively in diclofenac-treated animals compared with the control group. In the computed tomography examination, the amount of bone within the fracture callus was reduced after five weeks. Histologic examination showed decreased bone content and increased connective tissue within the fracture callus of the diclofenac group. Moreover, the transformation of the newly formed tissue into mature lamellar bone was delayed. Osteoclast numbers were decreased after two weeks but increased after five weeks. The osteoclast inhibitor osteoprotegerin was found to be increased in the Western blot assay. In contrast, the osteogenesis markers bone morphogenetic protein 2 and cystein-rich protein 61 were expressed only about half as much with diclofenac therapy.

These results suggest that diclofenac delays fracture healing in aged mice by inhibiting bone formation and remodeling.

2 Einleitung

2.1 Knochen

Knochen ist ein sich in ständigem Wandel befindliches Bindegewebe, dessen Hauptaufgabe in der mechanischen Stützfunktion des Körpers liegt. Zusammen mit der Muskulatur bildet Knochen den Bewegungsapparat und erfüllt darüber hinaus viele weitere Funktionen im Körper von Wirbeltieren. So ist das Knochengewebe neben dem Schutz innerer Organe beispielsweise an der Aufrechterhaltung der Kalzium- und Phosphathomöostase sowie an der Blutbildung maßgeblich beteiligt (Taichman, 2005). Darüber hinaus übt Knochen eine regulative Wirkung auf den Energiestoffwechsel aus (Lee & Karsenty, 2008). Das Knochengewebe unterliegt einem kontinuierlichen Prozess aus Modeling und Remodeling (Katsimbri, 2017). Dabei bezeichnet Modeling die Umwandlung des Knochens im Rahmen des Wachstums, wohingegen der Begriff Remodeling für die ständige Anpassung des Knochengewebes an sich ändernde mechanische Belastungen im ausgereiften Skelett steht.

2.1.1 Morphologie

Knochen lässt sich morphologisch in lange Knochen, auch Röhrenknochen genannt, platte Knochen, kurze Knochen und irreguläre Knochen einteilen (Aumüller et al., 2020; Clarke, 2008). Das in dieser Studie untersuchte Femur der Maus ist dabei den Röhrenknochen zugehörig. Makroskopisch werden Röhrenknochen in einen Schaft, die sogenannte Diaphyse, sowie jeweils eine Epiphyse an den beiden Enden des Knochens unterteilt (Lüllmann-Rauch & Asan, 2015). Zwischen Dia- und Epiphyse befindet sich die Metaphyse, eine trichterförmige Erweiterung des Knochens, die von der Epiphyse durch die Wachstumsplatte und spätere Wachstumsfuge getrennt ist (**Abb. 1**).

Innerhalb des reifen Knochens lassen sich zwei Strukturen unterscheiden. Die Kompakta bildet die äußere glatt erscheinende Rindenschicht des Knochens, während im Inneren des Gewebes feine Bälkchen (Trabekel) die sogenannte Spongiosa bilden (Lüllmann-Rauch & Asan, 2015). Die Zwischenräume zwischen den Trabekeln sind mit Knochenmark gefüllt. Trabekel bilden sich stets entlang von Kraft- beziehungsweise Belastungslinien, was eine hohe Stabilität bei gleichzeitig geringem Gewicht garantiert.

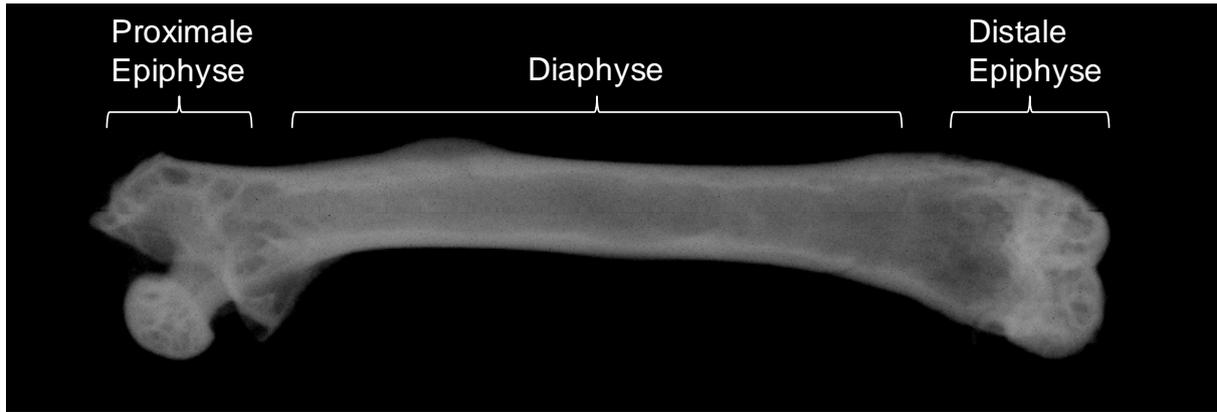


Abbildung 1: Schematische Darstellung Femurknochen. Röntgenaufnahme eines linken Femurknochens mit der proximalen Epiphyse mit Femurkopf auf der linken Bildseite, der Diaphyse in der Bildmitte und der distalen Epiphyse mit Femurkondylen am rechten Bildrand. Zwischen Diaphyse und Epiphyse befindet sich jeweils die Metaphyse. (Quelle: Eigene Aufnahme)

2.1.2 Histologie

Knochen besteht zu 30% aus organischem Material, Zellen und Kollagenfibrillen, und zu 70% aus anorganischem Material, welches sich im Wesentlichen aus Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) zusammensetzt (Felsenberg, 2001). Die Extrazellulärmatrix des Knochens besteht demnach hauptsächlich aus Kollagenfibrillen und Hydroxylapatit-Kristallen. Im reifen Knochen ist diese Matrix sowohl in der Kompakta als auch innerhalb der Spongiosa in mehreren aufeinanderliegenden Schichten, den Lamellen, organisiert (Clarke, 2008). Diese als Lamellenknochen bezeichnete Form steht im Gegensatz zur primitiveren Form des Geflechtknochens, welcher während des Wachstums, aber auch im Rahmen der Frakturheilung eine Vorstufe des Lamellenknochens darstellt. Im Geflechtknochen sind die Kollagenfibrillen nicht in Form von Lamellen, sondern unorganisiert angeordnet, was zu einer geringeren mechanischen Stabilität führt (Clarke, 2008).

Die Blutversorgung des Knochens speist sich aus einer Arteria nutricia, die über die Kortikalis in den Markraum eindringt und sich dort in kleinere Gefäße aufspaltet (Lüllmann-Rauch & Asan, 2015). Diese versorgen die gefäßlosen Spongiosabälkchen per Diffusion und führen radiär wieder zur Kortikalis, wo sie als sogenannte Havers-Gefäße in den Havers-Kanälen verlaufen. Die kortikalen Gefäße haben darüber hinaus Kontakt zu den periostalen Gefäßplexus.

Ein Havers-Gefäß bildet weiterhin das Zentrum einer baulichen Einheit der lamellären Kompakta, des Osteons (Lüllmann-Rauch & Asan, 2015). Ein Osteon besteht aus einem zentralen Havers-Gefäß mit mehreren dieses Gefäß umgebenden Schichten aus Lamellen. Dieser Aufbau ergibt sich aus Umbauprozessen (Remodeling) des lamellären Knochens, bei denen Osteoklasten zylindrische Kanäle in die Kompakta fressen, die im weiteren Verlauf

von Osteoblasten von außen nach innen wieder aufgefüllt werden. Zentral im Bohrkanal wächst eine Gefäßschlinge ein, die das neue Gewebe mit Nährstoffen versorgt. Die Kompakta von Mäusen besitzt im Gegensatz zur menschlichen Kompakta keine Havers-Kanäle (Nunamaker, 1998). Diese Art des Knochenaufbaus kommt phylogenetisch erst bei Kaninchen und größeren Säugetieren vor.

Die gesamte innere Oberfläche des Knochens wird von Endost bedeckt (Lüllmann-Rauch & Asan, 2015). Dieses setzt sich zusammen aus einer Lage Kollagenfibrillen und einem Zellvorrat – sogenannte lining cells – bestehend aus mesenchymalen Stammzellen, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten und Osteoklasten. Diese Zellen können im Bedarfsfall, beispielsweise nach einem Knochenbruch, aktiviert werden und sofort mit den dann erforderlichen Umbaumaßnahmen beginnen.

Die äußere Oberfläche des Knochens ist von Periost bedeckt. Dieses besteht aus einer äußeren Schicht straffen Bindegewebes und einer inneren Schicht, die in Aufbau und Funktion dem Endost gleichgestellt ist. Vor allem dem Periost kommt eine entscheidende Rolle im Rahmen der Frakturheilung zu (Clarke, 2008; Murao et al., 2013), da sich dort befindende mesenchymale Stammzellen und Osteoprogenitorzellen (Nakahara et al., 1990) die enchondrale bzw. desmale Ossifikation einleiten (Einhorn, 1998).

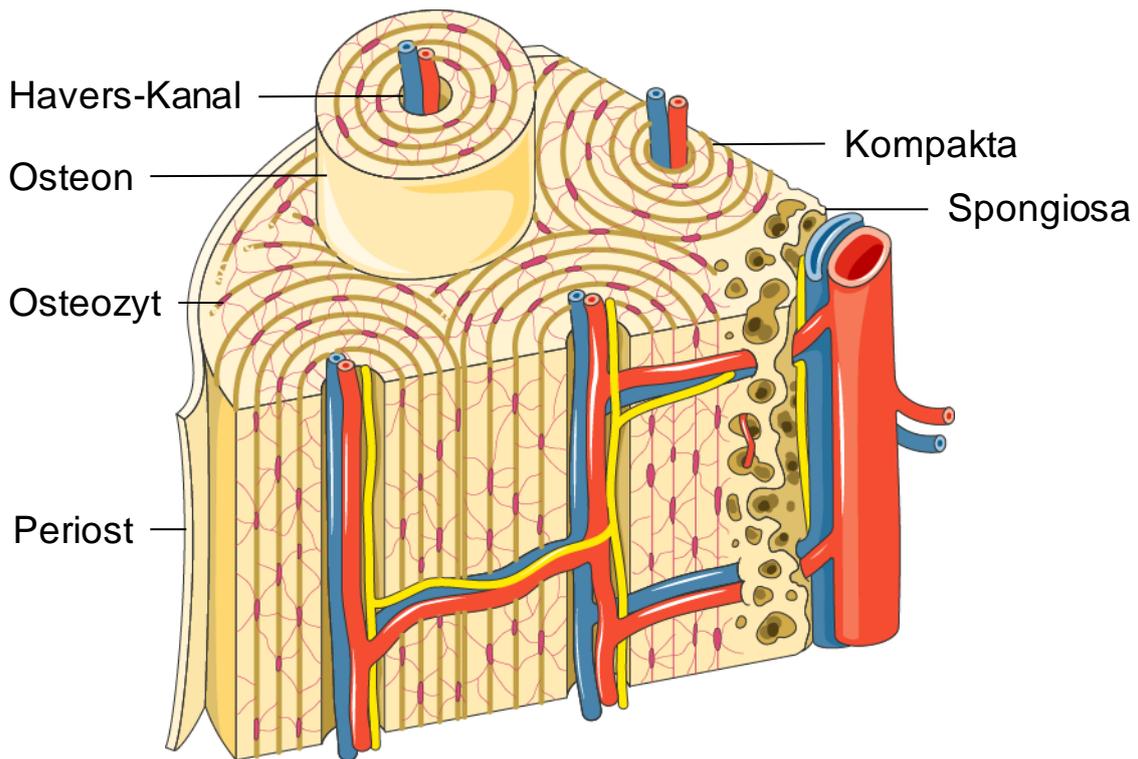


Abbildung 2: Binnenstruktur des Knochens. Die äußere Oberfläche ist von Periost umgeben. Darunter liegt die aus Osteonen aufgebaute Kompakta. Mehrere Lamellen umgeben einen Havers-Kanal, welcher Gefäße (rot = arterielle Gefäße, blau = venöse Gefäße) sowie Nervenfasern (gelb) enthält. Zwischen einzelnen Lamellen befinden sich Osteozyten (violett). Am rechten Bildrand lässt sich ein Teil der aus Knochenbälkchen aufgebauten Spongiosa erkennen. (Quelle: Modifiziert nach: https://smart.servier.com/smart_image/bone-structure-2/)

2.1.3 Zellen des Knochens

2.1.3.1 Osteoblasten

Osteoblasten sind sich aus mesenchymalen Stammzellen über die Zwischenstufe der Osteoprogenitorzellen entwickelnde Zellen, deren Hauptaufgabe in der Bildung neuen Knochens beziehungsweise neuer knöcherner Extrazellulärmatrix besteht (Ducy, 2000).

Eine Reihe verschiedener Faktoren ist entscheidend für die Differenzierung und Regulierung der Osteoblasten. Mitglieder der bone morphogenetic protein (BMP) – Familie steuern beispielsweise die Osteoblastenreifung über Regulierung des Transkriptionsfaktors Core-binding factor alpha 1 (Cbfa 1) (Ducy et al., 1997). Cbfa 1 nimmt darüber hinaus Einfluss auf die Knochenbildung durch Regulierung der Expression von Osteocalcin, welches reife Osteoblasten hemmt (Ducy, 2000). Zudem wird die Osteoblastogenese über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg reguliert (Day et al., 2005).

Im Rahmen des Knochenaufbaus wird jeweils schon vorhandenes Knochengewebe von einer neueren Schicht Knochengewebe überzogen. So kommt es dazu, dass ältere Osteoblasten von der darauffolgenden Generation eingemauert werden und sich teilweise zu Osteozyten differenzieren. Ein weiterer Teil der Osteoblasten, ca. 60 bis 80%, geht durch

Apoptose zugrunde, während wiederum einige in den Ruhezustand zurückkehren (Katsimbri, 2017; Lüllmann-Rauch & Asan, 2015; Manolagas, 2000; Parfitt, 1994).

Osteoblasten produzieren und sezernieren Kollagen I, welches als zunächst unmineralisierte Matrix – auch Osteoid genannt – das Gerüst für die in einem zweiten Schritt stattfindende Mineralisation bildet. Diese erfolgt durch Anreicherung von Ionen, hauptsächlich Kalzium und Phosphat, in von Osteoblasten abgeschnürten Vesikeln. Die alkalische Phosphatase stellt dabei Phosphationen zur Verfügung (Hessle et al., 2002). Innerhalb der Vesikel bilden sich Hydroxylapatitkristalle, die über die Vesikelmembran hinauswachsen und sich den Kollagenfasern anlagern (Lüllmann-Rauch & Asan, 2015).

2.1.3.2 Osteozyten

Osteozyten gehen aus Osteoblasten hervor (Manolagas, 2000) und stellen mit ungefähr 90% die häufigste Zellform des Knochengewebes dar (Nijweide et al., 2002). Sie stehen durch ein System kleiner Kanälchen untereinander in Verbindung und erfüllen dabei die Funktion von Mechanosensoren (Bonewald, 2011; Han et al., 2004; Lanyon, 1993; Pead et al., 1988). Sie nehmen mechanische Änderungen wahr und leiten diese mithilfe parakriner Mediatoren wie Prostaglandinen und Nitraten an Osteoblasten und Osteoklasten weiter (Turner & Pavalko, 1998). So können beispielsweise über die Ausschüttung von PGE2 Osteoblasten aktiviert werden (Ajubi et al., 1996). Dentin-Matrix-Protein 1 (DMP1), ein Osteozyten-spezifisches Protein, wird als ein wichtiger Kopplungsfaktor zwischen mechanischer Stimulation und Knochenbildung gesehen (Cheung et al., 2021). Osteozyten detektieren Mikroverletzungen im Knochen und rekrutieren unter anderem über die Expression des receptor activator of nuclear factor NF- κ B ligand (RANKL) (Nakashima et al., 2011; Xiong et al., 2011) Osteoklastenvorläuferzellen zur Einleitung des Remodelings solcher vorgeschädigter Knochenbereiche (Xu & Teitelbaum, 2013). Osteozyten sezernieren jedoch auch den RANKL-Gegenspieler Osteoprotegerin (OPG), welcher Osteoklasten hemmt (siehe Kapitel 2.4.6.8) (Robling & Bonewald, 2020). Stirbt ein Osteozyt ab, so wird die ihn umgebende Matrix von Osteoklasten abgebaut (Kogianni et al., 2008; Tatsumi et al., 2007). Dabei induzieren apoptotische Osteozyten eine vermehrte RANKL-Sekretion in benachbarten Osteozyten, um so Osteoklasten an den Ort der Schädigung zu locken (W. Y. Cheung et al., 2016). In Knochen eingebettete Osteozyten exprimieren Sclerostin, welches als negativer Regulator des Wnt/ β -Catenin-Wegs den weiteren Knochenaufbau durch Osteoblasten hemmt (Bonewald, 2011; Poole et al., 2005; Sharifi et al., 2015; Winkler et al., 2003). Osteozyten sind darüber hinaus in der Lage, die sie umgebende Matrix auch ohne Hilfe von Osteoblasten oder Osteoklasten zu verändern und damit in den Kalziumstoffwechsel einzugreifen (Robling & Bonewald, 2020).

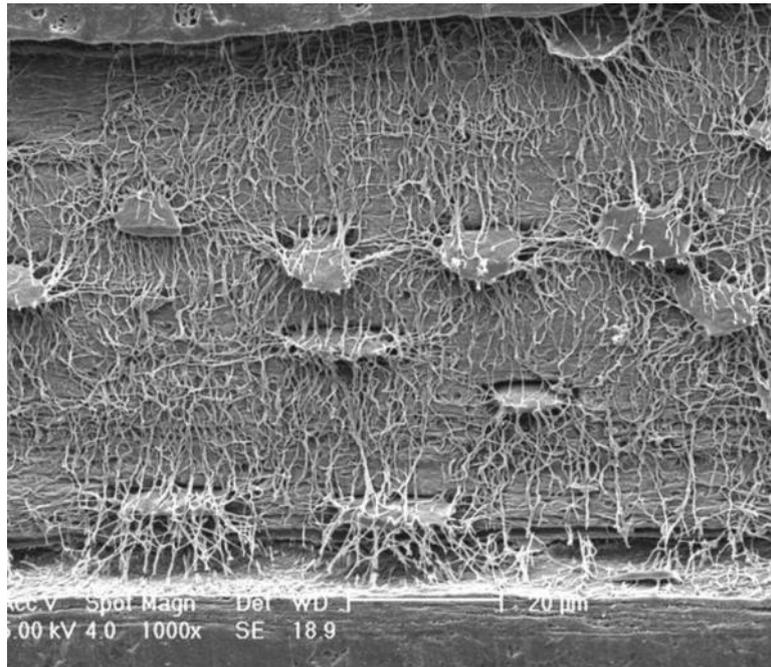


Abbildung 3: Osteozytennetzwerk. Elektronenmikroskopische Aufnahme des Netzwerks aus Osteozyten im murinen Knochen. Die Darstellung wurde durch ein Säureätzverfahren zur Entfernung mineralischer Bestandteile möglich gemacht. (Quelle: Manolagas, S. C. & Parfitt, A. M. (2010). *What old means to bone. Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 21 (6), 369–374. doi:10.1016/j.tem.2010.01.010, nach einem Bild von Lilian Plotkin und Teresita Bellido, Indiana University und Lynda Bonewald, University of Missouri-Kansas City School of Dentistry)

2.1.3.3 Osteoklasten

Osteoklasten sind auf den Knochenabbau spezialisierte Zellen, welche ihren Ursprung im Monozyten-Makrophagen-System haben (Kurihara et al., 1990; Teitelbaum, 2000). Ihre Entstehung und Aktivierung findet immer in räumlichem Bezug zur Knochenoberfläche statt (Boyle et al., 2003). Zur Osteoklastogenese sind zwei Hauptfaktoren, macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) und RANKL essenziell (Kong et al., 1999; Teitelbaum, 2000; Yoshida et al., 1990). M-CSF sorgt dabei primär für eine verstärkte Proliferation von Osteoklastenvorläuferzellen (Xu & Teitelbaum, 2013). RANKL dagegen induziert die Reifung von Osteoklasten und aktiviert reife Osteoklasten zur Knochenresorption (Boyle et al., 2003; Hsu et al., 1999).

Innerhalb des Knochens herrscht ein ständiges Gegenspiel zwischen Osteoblasten und Osteoklasten, die sich gegenseitig über das RANK-RANKL-Osteoprotegerin-System kontrollieren (Boyle et al., 2003). Osteoprotegerin (OPG) ist ein löslicher Rezeptor für RANKL und steht in Konkurrenz zum zellulären Rezeptor RANK. Die RANKL-Wirkung wird somit durch OPG gehemmt (Simonet et al., 1997). Osteoklasten sind mehrkernige Zellen mit einem hohen Energieverbrauch. Ein aktiver Osteoklast liegt der Knochenoberfläche direkt an

und bildet eine sogenannte Versiegelungszone an seinen Rändern (Luxenburg et al., 2007; Xu & Teitelbaum, 2013). Diese dient dazu, zum Knochen hin ein abgekapseltes Milieu schaffen zu können, in dem durch aktive Protonensekretion mit einem pH von bis zu 4,5 die Kalziumverbindungen des Knochens aufgelöst werden können (Blair et al., 1989; Silver, 1988). Die dem Knochen anliegende Oberfläche des Osteoklasten ist durch Fusion intrazellulärer Vesikel mit dieser Membran stark vergrößert (sogenannte ruffled border), was sowohl die Säuresekretion als auch die Sekretion lysosomaler Enzyme erleichtert. Aufgabe dieser Enzyme, unter anderem Cathepsin K und tartrate resistant acid phosphatase (TRAP), ist es, die organische Matrix aufzulösen (Boyle et al., 2003; Väänänen et al., 2000). Knochenfragmente werden mittels Endozytose aufgenommen und durch die Zelle hindurch per Transzytose auf die nicht-resorptive Seite geschleust (Salo, 1997) (Abb.4).

Wenn sich dieselben Zellen mit dem Abbau von mineralisierter Knorpelmatrix beschäftigen, werden sie auch Chondroklasten genannt, sind jedoch in ihrem Aufbau völlig identisch zu Osteoklasten (Lüllmann-Rauch & Asan, 2015).

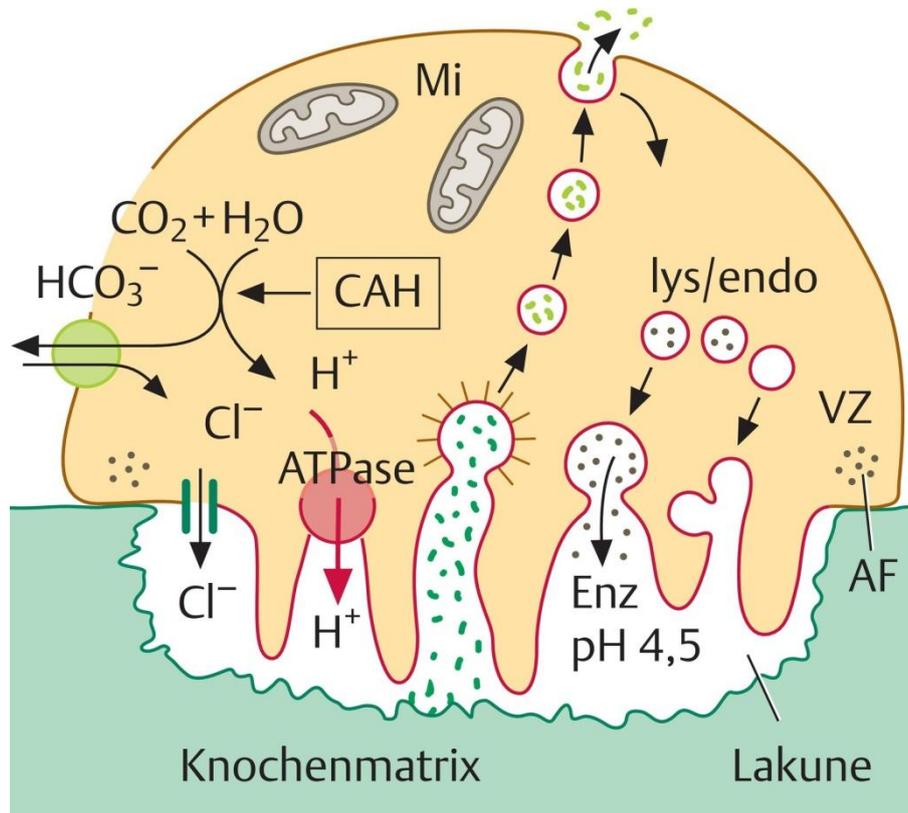


Abbildung 4: Osteoklast. Ein aktivierter Osteoklast liegt der Knochenoberfläche an. Durch die Versiegelungszone (VZ) wird ein abgekapseltes Milieu innerhalb der Resorptionslakune geschaffen. Über einen aktiven Transporter (ATPase) werden von der Carboanhydrase (CAH) bereitgestellte H⁺-Ionen in diesen Raum sezerniert. Endosomen (endo, rote Umrandung) verschmelzen mit der zur Knochenoberfläche hin gefalteten äußeren Zellmembran (ruffled border) und setzen Enzyme zur Knochenresorption frei. Resorbierte Knochenmatrix wird per Transzytose durch die Zelle transportiert. Der sehr hohe Energiebedarf des Osteoklasten wird durch eine Vielzahl an Mitochondrien (Mi) gedeckt. (Quelle: Böhles H. *Aufbau, Knochengewebe und Knochenarten*. In: Böhles H, Hrsg. *Stoffwechselerkrankungen im Kindes- und Jugendalter*. 1. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2016. doi:10.1055/b-004-129990)

2.2 Modeling und Remodeling

Das Knochengewebe unterliegt einem ständigen Veränderungsprozess. Im Laufe des Lebens finden sowohl Modeling als auch Remodeling des Knochens statt. Modeling bezeichnet dabei die Änderung der Knochenbeschaffenheit als Folge von mechanischen oder physiologischen Einflüssen beispielsweise im Rahmen des Wachstums. Remodeling dagegen ist der fortlaufende Umbau des Knochens und der Ersatz alten Knochengewebes durch neues, wobei die äußere Form im Wesentlichen erhalten bleibt (Canalis et al., 2007). Am Umbau des Knochengewebes sind Einheiten aus Osteoblasten und Osteoklasten, sogenannte basic multicellular units (BMU) (Frost, 1969) beteiligt, in denen die Resorption und Formation des Knochens eng gekoppelt sind (Parfitt, 2002). Remodeling dient dem Zweck, Mikroverletzungen vorzubeugen beziehungsweise auf schon vorhandene Schäden zu reagieren. Während im erwachsenen Organismus hauptsächlich Remodeling stattfindet, bildet die Fraktur, in deren Folge große Mengen Knochen neu gebildet werden, eine Ausnahme (Katsimbri, 2017).

2.2.1 Initiation

In diesem ersten Schritt des Remodelings wird der Knochen aus einem Ruhezustand in einen aktiven Zustand versetzt. Dies geschieht entweder durch hormonelle Einflüsse wie Parathormon oder Östrogen oder durch mechanische Einwirkungen auf den Knochen. Diese mechanischen Änderungen werden von Osteozyten wahrgenommen und resultieren in einer Aktivierung des Remodelings. Osteoklastenvorläuferzellen werden aus der Blutstrombahn rekrutiert, differenzieren sich und fusionieren zu Osteoklasten, die an der Knochenoberfläche mit der Knochenresorption beginnen (Katsimbri, 2017; Parfitt, 2002). In der Spongiosa werden dabei jährlich 28% der Knochenmasse umgebaut, in der Kompakta nur 4% (Lüllmann-Rauch & Asan, 2015; Manolagas, 2000), was damit zusammenhängt, dass der spongiöse Knochen zu einem größeren Anteil an der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase beteiligt ist (Parfitt, 2001). Insgesamt werden so etwa 10% des gesamten Skeletts pro Jahr erneuert (Manolagas, 2000).

2.2.2 Resorption

Osteoklasten sezernieren Protonen und aktive Enzyme wie Matrixmetalloproteinasen und Cathepsin K in einen versiegelten Hohlraum an der Knochenoberfläche und resorbieren so nacheinander anorganische sowie organische Matrix. Nach Beendigung ihrer Aufgabe gehen die Osteoklasten in Apoptose über (Katsimbri, 2017). Die Osteoklasten-vermittelte Knochenresorption nimmt insgesamt circa zwei bis vier Wochen während eines Remodeling-Zyklus in Anspruch (Clarke, 2008; Rodan & Martin, 2000). In der Kompakta bauen Osteoklasten das Knochengewebe durch Bildung von Bohrkanälen ab, in der Spongiosa entstehen an der Trabekeloberfläche sogenannte Resorptions- oder Howship-Lakunen (Lüllmann-Rauch & Asan, 2015).

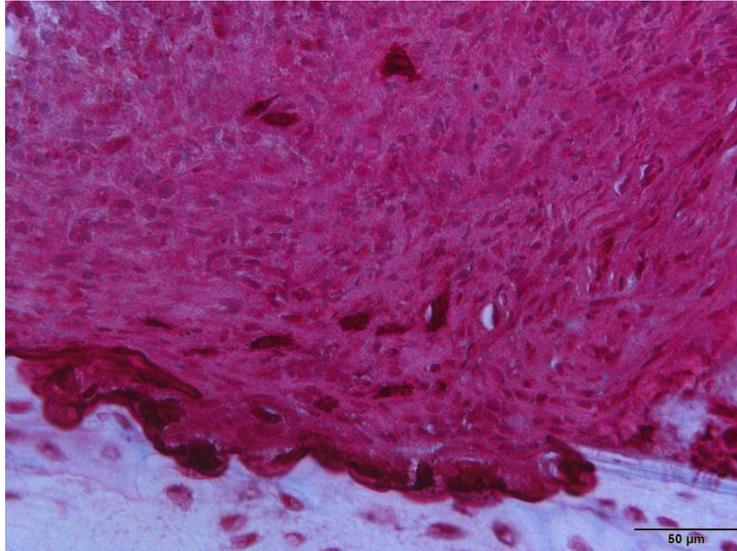


Abbildung 5: Resorptionsphase. Durch Osteoklasten gebildete Resorptionslakunen in der Kompakta des murinen Femurs. TRAP-Färbung, 400-fache Vergrößerung. (Quelle: eigene Aufnahme)

2.2.3 Umkehrung

Diese noch nicht vollständig verstandene Phase beschreibt den Übergang von Resorption zu Knochenbildung. Dazu muss eine ausreichende Zahl an Osteoblasten rekrutiert werden, um den zuvor entstandenen Defekt wieder mit Knochenmatrix aufzufüllen (Parfitt, 1982). Als möglicher Kopplungsfaktor zur Rekrutierung von Osteoblasten wird unter anderem Transforming Growth Factor β (TGF- β) diskutiert (Lind et al., 1995).

2.2.4 Knochenbildung

Diese circa drei bis vier Monate andauernde Phase (Harada & Rodan, 2003; Rodan & Martin, 2000) ist durch die Tätigkeit der Osteoblasten gekennzeichnet, welche neue, zunächst unmineralisierte Matrix produzieren (Clarke, 2008). (s. Kapitel 2.1.3.1)

2.2.5 Terminierung

In diesem letzten Schritt des Remodelings findet die Mineralisierung des Osteoids statt. Der Knochen wird wieder in einen Ruhezustand versetzt. Die Knochenmasse vor und nach Absolvierung des Remodelingprozesses ist gleich geblieben, der Knochen jedoch besser an aktuelle Bedürfnisse angepasst (Katsimbri, 2017).

2.3 Ossifikation

Die Frakturheilung wird abhängig vom Stabilisationsgrad der Fraktur von enchondraler beziehungsweise desmaler Ossifikation dominiert (Thompson et al., 2002).

2.3.1 Desmale Ossifikation

Bei der desmalen oder intramembranösen Ossifikation, die in der Entwicklung vor allem zur Bildung der flachen Schädelknochen beiträgt, differenzieren mesenchymale Stammzellen direkt zu Osteoblasten, welche daraufhin das Knochengewebe aufbauen (Kronenberg, 2003; Lüllmann-Rauch & Asan, 2015).

2.3.2 Enchondrale Ossifikation

Bei der enchondralen Ossifikation erfolgt zunächst die Differenzierung von Mesenchymzellen zu Chondroblasten, die daraufhin ein chondrales Modell des späteren Knochens fertigen (Kronenberg, 2003; Lüllmann-Rauch & Asan, 2015). Die enchondrale Ossifikation kann in eine perichondrale und enchondrale Ossifikation unterteilt werden. Bei der perichondralen Ossifikation wird analog der desmalen Ossifikation um das Knorpelmodell eine Knochenmanschette gebildet. Bei der enchondralen Ossifikation entsteht eine sogenannte knorpelige Wachstumsplatte. Knorpelzellen differenzieren zu hypertrophen Chondrozyten und initiieren eine Mineralisation der Knorpelmatrix. Hypertrophe Chondrozyten sorgen über die Ausschüttung von Angiogenesefaktoren wie VEGF für die Vaskularisierung des Knorpels. Darüber hinaus locken sie Osteoklasten an, die in diese Matrix eindringen und den Weg bereiten für die Einsprossung von Gefäßen. Mit diesen Gefäßen wandern Osteoblastenvorläuferzellen ein, die sich im weiteren Verlauf zu Osteoblasten differenzieren und mit der Bildung von Knochenmatrix beginnen. Es bildet sich primäre Spongiosa. Diese während des Wachstums ablaufenden Vorgänge sind in sehr ähnlicher Form auch an der Frakturheilung beteiligt (Ferguson et al., 1999; Vortkamp et al., 1998).

2.4 Frakturheilung

Übersteigt eine von außen einwirkende Kraft die mechanische Belastungsgrenze des Knochens, kann eine Fraktur entstehen. Frakturen sind Kontinuitätsunterbrechungen des Knochens (Müller, 2019). Diese können durch Traumata, dauerhafte Überlastung sowie eine geschwächte Knochenstruktur durch beispielsweise Tumoren oder eine Osteoporose bedingt sein. Ist die Kontinuität des Knochens noch teilweise erhalten, spricht man von inkompletten Frakturen.

Man unterscheidet geschlossene Frakturen mit erhaltener Weichteildecke und offene Frakturen, bei denen ein Weichteildefekt bis zur Fraktur vorliegt (Gustilo & Anderson, 1976; Gustilo et al., 1984; Oestern & Tscherne, 1982).

Eine genaue Einteilung bezüglich des Orts der Fraktur und ihrer Komplexität erfolgte durch die Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen (Meinberg et al., 2018).

Im Alter ist eine Vielzahl von Frakturen auf eine Osteoporose zurückzuführen. Die Osteoporose ist eine metabolische Erkrankung, bei der die Knochenresorption gegenüber dem Knochenaufbau überwiegt, was in einer erhöhten Frakturrisiko resultiert (Manolagas, 2000). Die Zahl osteoporotisch bedingter Frakturen in den fünf größten europäischen Ländern plus Schweden wird voraussichtlich von 2,7 Millionen im Jahr 2017 auf 3,3 Millionen im Jahr 2030 steigen. Im selben Zeitraum wird für die durch diese Frakturen bedingten Kosten eine Steigerung von 37,5 Milliarden Euro auf 47,4 Milliarden Euro erwartet (Borgström et al., 2020). Diese Zahlen verdeutlichen die enorme gesellschaftliche Bedeutung von Frakturen, besonders im Alter.

Die Knochenheilung ist ein bemerkenswerter Vorgang, an dessen Ende durch das Zusammenspiel komplexer Prozesse keine Narbe, sondern eine fast komplette Wiederherstellung der ursprünglichen Struktur steht (Einhorn, 1998; McKibbin, 1978). Die Frakturheilung stellt dabei ein Zusammenspiel aus anabolen und katabolen Faktoren dar (Little et al., 2007). Im Rahmen dessen werden zum Teil Elemente der embryonalen Entwicklung rekapituliert, teilweise sind die Prozesse jedoch auch spezifisch für die Frakturheilung (Ferguson et al., 1999; Gerstenfeld, Cullinane, et al., 2003; Vortkamp et al., 1998).

Man unterscheidet primäre und sekundäre Frakturheilung (McKibbin, 1978):

2.4.1 Primäre Frakturheilung

Bei korrekter anatomischer Reposition der Frakturrenden und rigider interner Fixierung kann eine primäre Frakturheilung stattfinden (Marsell & Einhorn, 2011; McKibbin, 1978). Die primäre Frakturheilung ist normalerweise kein natürlicher Vorgang, sondern tritt vor allem nach operativer Versorgung einer Fraktur auf (Cottrell & O'Connor, 2010). Eine Ausnahme bilden metaphysäre Frakturen, die in der Regel ohne Ausbildung von Kallusgewebe heilen (Uthoff & Rahn, 1981). Ein Vorteil der operativen Versorgung von Frakturen im Vergleich zur konservativen Therapie konnte vor allem für Femur- und Tibiaschaftfrakturen gezeigt werden (Baertl et al., 2021).

Wenn die Frakturrenden sehr nahe beieinanderstehen, können Osteoklasten direkt in das gegenüberliegende Fragment vordringen. Die daraufhin neu gebildeten Osteone verbinden anschließend die beiden Frakturrenden (McKibbin, 1978). Dabei entsteht ohne Bildung einer chondralen Zwischenstufe sofort Lamellenknochen (Lüllmann-Rauch & Asan, 2015; McKibbin, 1978) (**Abb. 6e,f**). Die primäre Frakturheilung folgt daher den Prinzipien des Remodelings, um die beiden Frakturrenden miteinander zu verbinden.

2.4.2 Sekundäre Frakturheilung

Die Mehrzahl der Frakturen heilt durch sekundäre Frakturheilung (Epari et al., 2010). Diese stellt eine Kombination aus enchondraler und desmaler Ossifikation dar und kann in mehrere sich überlappende Phasen eingeteilt werden (Einhorn, 1998).

2.4.3 Phasen der Frakturheilung

2.4.3.1 *Inflammatorische Phase*

Durch das initiale Trauma der Fraktur bildet sich ein Hämatom rund um den Frakturspalt (McKibbin, 1978) (**Abb. 6a**). Die Unterbrechung der vaskulären Versorgung führt zu einer lokalen Gewebhypoxie, welche zusätzlich die Migration und Proliferation inflammatorischer Zellen zur Säuberung der Wunde befördert (Brighton et al., 1991; Hankenson et al., 2014). Dies umfasst ausreifende Granulozyten, Makrophagen, Monozyten, hämatopoetische Stammzellen, T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen, die zur Frakturstelle wandern und innerhalb des Frakturhämatoms proliferieren (Andrew et al., 1994; Hoff et al., 2016). Eine Entfernung des initialen Hämatoms führt zu einer Verzögerung der Frakturheilung (Park et al., 2002), da die aus dem Knochenmark stammenden inflammatorischen Zellen für die Initiierung der Frakturheilung eine bedeutende Rolle spielen (Colnot et al., 2006). Sie fördern dabei unter anderem die Proliferation periostaler Stammzellen (Ozaki et al., 2000). Dies geschieht allem Anschein nach über die Ausschüttung einer Reihe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren innerhalb des Hämatoms (Bolander, 1992; Einhorn, 1998). An diesen Prozessen sind sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine beteiligt, deren Zusammenspiel als entscheidend für den Ausgang der Frakturheilung angesehen wird (Hoff et al., 2016).

Die akute inflammatorische Reaktion findet ihren Höhepunkt während der ersten 24 Stunden nach Fraktur und ist nach sieben Tagen nahezu abgeschlossen (Marsell & Einhorn, 2011). Ihre Hauptaufgabe besteht insgesamt in der Bereitstellung von Signalmolekülen zur Aufrechterhaltung der Frakturheilung (Simon & O'Connor, 2007).

2.4.3.2 *Formation des weichen Kallus*

Innerhalb der ersten zwei Wochen nach Frakturheilung differenziert sich der vom Periost und anliegenden Weichteilgewebe abstammende bindegewebige Kallus über dem Frakturspalt zu Knorpelgewebe. Dieses Knorpelgewebe wird im weiteren Verlauf durch enchondrale Ossifikation zu hartem ossärem Kallusgewebe umgewandelt werden (Einhorn, 1998). Mit Bildung des weichen Kallus wird dem instabilen Kallusgewebe bereits eine gewisse Stabilität verliehen (Dimitriou et al., 2005) (**Abb. 6b**).

2.4.3.3 Formation des harten Kallus

Gleichzeitig zur Bildung des weichen Kallus wird ausgehend vom Periost an den Kallusrändern durch desmale Ossifikation eine Knochenmanschette aus Geflechtknochen gebildet. Die Kalzifizierung des knorpeligen Frakturkallus läuft als enchondrale Ossifikation sehr ähnlich den Vorgängen während des Wachstums ab. Chondrozyten differenzieren sich ungefähr zwei Wochen nach der Fraktur zu hypertrophen Chondrozyten und beginnen mit der Kalzifizierung der Matrix. In den kalzifizierten Knorpel dringen im weiteren Verlauf Blutgefäße ein. Diese bringen perivaskuläre Zellen mit sich, die zu Osteoblasten differenziert mit der Knochenbildung beginnen. Chondroklasten bauen kalzifizierte Knorpelmatrix ab und es entsteht spongiöser Knochen (Einhorn, 1998). Die enchondrale Osteogenese erfolgt dabei von den Kallusenden ausgehend in Richtung des Frakturspalts (Gerstenfeld et al., 2006). Durch diese Ossifikation des knorpeligen Anteils besteht der Kallus nun gemeinsam mit der periostalen Knochenmanschette vollständig aus Geflechtknochen (Einhorn, 1998) **(Abb. 6c)**.

2.4.3.4 Remodeling

Sobald der Frakturspalt überbrückt wurde, muss sich der gebildete Knochen an seine neue Funktion anpassen (McKibbin, 1978). Das Remodeling während der Knochenheilung entspricht dabei weitgehend den ständig im Knochen ablaufenden Umbauprozessen (McKibbin, 1978). Die Remodeling-Phase ist die längste Phase der Frakturheilung. In dieser Phase werden mechanische und biologische Eigenschaften des Knochens wiederhergestellt. Osteoklasten resorbieren unreifen Geflechtknochen, der im Anschluss durch Lamellenknochen ersetzt wird (Hankenson et al., 2014). In der Spongiosa, wo die beteiligten Zellen ständigen Zugang zur Blutversorgung haben (McKibbin, 1978), erfolgt dieser Prozess an der Oberfläche der Trabekel mit Bildung sogenannter Howship-Lakunen (Lüllmann-Rauch & Asan, 2015). Dagegen sind in der Kompakta größere Strecken zur Aufrechterhaltung der Blutversorgung zu überbrücken und das Remodeling geht mit der Bildung neuer Havers-Systeme einher. Dazu bohren Osteoklasten Tunnel in die Kompakta und ermöglichen so das Einsprießen einer Gefäßschlinge. Mit der Bildung neuer Gefäße erfolgt die Migration von mesenchymalen Zellen, die schließlich zu Osteoblasten differenzieren und den Bohrkanal von innen mit neuer Knochensubstanz auskleiden (McKibbin, 1978) **(Abb. 6d)**.

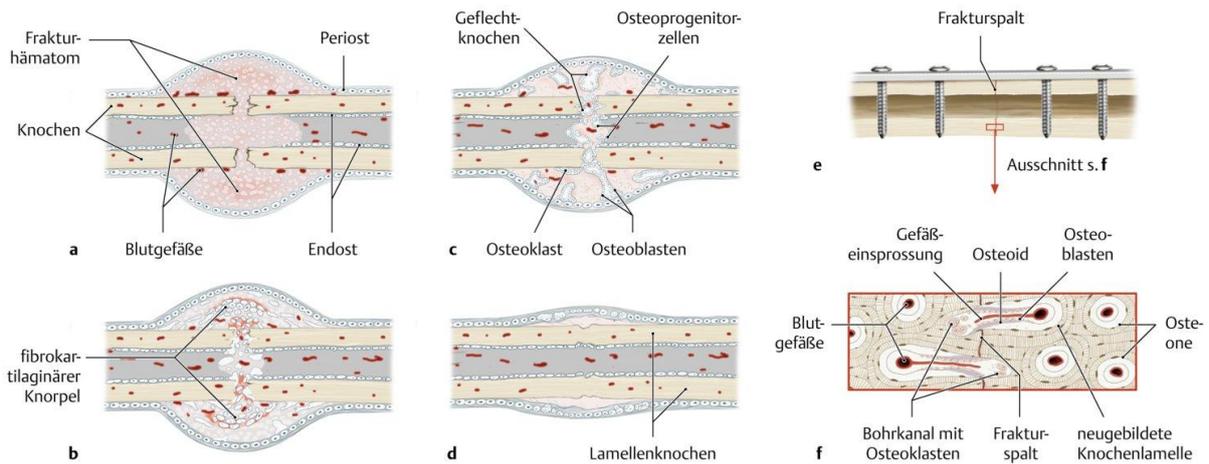


Abbildung 6: Primäre und Sekundäre Frakturheilung. Durch das Trauma der Fraktur bildet sich ein Hämatom (a), welches nach und nach organisiert wird. Eine periostale Knorpelmanschette bietet bereits einen gewissen Stabilitätsgrad (b). Mit Resorption des Knorpels besteht das Kallusgewebe hauptsächlich aus unreifem Geflechtknochen (c). Durch Remodelingprozesse erfolgt dann der Umbau hin zu reifem Lamellenknochen (d). Bei sehr rigider Fixierung der Frakturfragmente beispielsweise mittels Plattenosteosynthese (e) kann eine primäre Knochenheilung stattfinden. Dabei wird der Frakturspalt ohne Bildung von Zwischenstufen direkt durch neue Osteone überbrückt (f). (Quelle: Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. 4.8 Frakturen: Klassifikation, Heilung und Behandlung. In: Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K, Hrsg. Prometheus LernAtlas - Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Thieme; 2018. doi:10.1055/b-006-149643)

2.4.4 Beeinträchtigung der Frakturheilung

Trotz enormer Fortschritte in der Behandlung von Frakturen, tritt in manchen Fällen eine verzögerte oder ausbleibende Frakturheilung in Form einer Pseudarthrose auf (Marsell & Einhorn, 2010). Es wird generell eine Pseudarthrosenrate von fünf bis zehn Prozent angenommen (Einhorn, 1995; Einhorn & Gerstenfeld, 2015), neuere Daten liefern jedoch zum Teil niedrigere Zahlen, von 1,9% (Mills et al., 2017) bis 4,9% (Zura et al., 2016), wobei die Angaben von der Lokalisation der Fraktur abhängig sind (Gómez-Barrena et al., 2015).

Von verzögerter Frakturheilung spricht man, wenn die Fraktur nach vier Monaten noch nicht verheilt ist. Wird ein Zeitraum von sechs Monaten überschritten, liegt eine Pseudarthrose vor (Runkel & Rommens, 2000; Rüter & Mayr, 1999). Pseudarthrosen wiederum können eingeteilt werden in hypertrophe und atrophe Pseudarthrosen (Weber & Cech, 1973). Bei der hypertrophen Pseudarthrose bildet sich überschießendes Kallusgewebe, das den Frakturspalt jedoch nicht hinreichend überbrückt. Die Ursache wird generell in einer mangelnden Fixation der Frakturfragmente gesehen (Gómez-Barrena et al., 2015), sodass zu große Scherkräfte auf den Frakturspalt wirken (Augat et al., 2003; Claes, 2017). Bei der atrophen Pseudarthrose sind die biologischen Voraussetzungen zur Frakturheilung gestört, was zum Beispiel durch eine mangelhafte Vaskularisierung des Frakturkallus oder eine Zerstörung von Endost und Periost bedingt sein kann. Die Therapie der atrophen

Pseudarthrose ist kompliziert und kann beispielsweise in einer Knochentransplantation oder der Substitution von Wachstumsfaktoren bestehen (Gómez-Barrena et al., 2015).

Zur Einteilung und Evaluation der Pseudarthrosen haben Calori et al. (2008, 2014) ein „Non-Union Scoring System“ entwickelt, welches basierend auf dem Schweregrad der Beeinträchtigung konkrete Handlungsempfehlungen zur Therapie gibt.

Generelle Risikofaktoren für eine Beeinträchtigung der Frakturheilung sind unter anderem komplizierte Frakturen, Diabetes mellitus, Rauchen, Adipositas, hohes Alter und eine Reihe an Medikamenten (Zura et al., 2016). Medikamente sind dabei der am besten zu beeinflussende Risikofaktor (Lisowska et al., 2018; Zura et al., 2016). Aus diesem Grund kann die genaue Kenntnis der Auswirkungen von Medikamenten auf die Frakturheilung entscheidend für den Therapieerfolg sein.

2.4.5 Rolle von Prostaglandinen während der Frakturheilung

Prostaglandine gehören zur Gruppe der Prostanoiden, die neben Leukotrienen Teil der Eicosanoide sind. Diesen Stoffen gemeinsam ist ihr Ursprung aus der aus Zellmembranen stammenden Fettsäure Arachidonsäure. Prostaglandine sind dabei das Produkt der Cyclooxygenase, früher auch Prostaglandinsynthase genannt (Herschman, 1996). Die beiden Isoformen der Cyclooxygenase werden dabei in unterschiedlichem Ausmaß in allen Knochenzellen exprimiert (Forwood et al., 1998). Aufgrund der meist hohen Labilität entfalten Prostaglandine ihre Wirkung in der Regel in unmittelbarer Umgebung ihres Syntheseortes autokrin bzw. parakrin (Su & O'Connor, 2013).

Verschiedene Eigenschaften der Prostaglandine und ihrer Rezeptoren machen es nahezu unmöglich eine einfache Rolle der Prostaglandine im Knochen zu definieren (Blackwell et al., 2010). Ihre Wirkung auf den Knochen üben Prostaglandine hauptsächlich in Folge einer Hochregulierung der Cyclooxygenase 2 aus (Wadleigh & Herschman, 1999). Prostaglandine können sowohl die Knochenbildung als auch die Knochenresorption fördern (Kawaguchi et al., 1995; Nefussi & Baron, 1985). Sie werden unter anderem von Osteoblasten synthetisiert (Feyen et al., 1984; Wadleigh & Herschman, 1999) und ihre Expression zum Beispiel durch mechanischen Stress (Klein-Nulend et al., 1997) und andere Stimuli wie inflammatorische Zytokine gesteigert. Die Prostaglandinsynthese im Knochen wird durch mechanische Kräfte, Zytokine, Wachstumsfaktoren und systemische Hormone stark reguliert (Kawaguchi et al., 1995). Prostaglandin E₂ (PGE₂) wird als das hauptsächliche Prostaglandin im Knochen angesehen (Blackwell et al., 2010). Im Tiermodell führte die Gabe von PGE₂ zu einer erhöhten Knochenmasse (Ramirez-Yañez et al., 2004) mit höherer mechanischer Stabilität (Suponitzky & Weinreb, 1998; Weinreb et al., 1997). Es wird vermutet, dass dieser Effekt durch eine Rekrutierung neuer Osteoblasten aus Osteoprogenitorzellen zustande kommt

(Suponitzky & Weinreb, 1998; Weinreb et al., 1997). Zudem hemmt Prostaglandin E über erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel die Apoptose in osteoblastischen Zellen (Machwate et al., 1998). In einer Studie an COX-2-knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die COX-2-Aktivität essenziell für die Initiierung der periostalen kortikalen Knochenheilung ist. COX-2 wird dabei zur Aktivierung und Differenzierung von periostalen Progenitorzellen benötigt (Xie et al., 2008). In der frühen Phase nach Fraktur werden sehr schnell Prostaglandine, vor allem Prostaglandin E und F ausgeschüttet (Dekel et al., 1981). PGE₂ kann über einen positiven Feedback-Mechanismus COX-2 induzieren und damit seine eigene Produktion steigern (Kawaguchi et al., 1994; Sakuma et al., 2004). Es erzielt seine Wirkung in den Zielzellen hauptsächlich über einen cAMP/Proteinkinase A (PKA)-Signalweg, ähnlich dem durch Parathormon (PTH) stimulierten Signalweg (Choudhary et al., 2013). PGE₂ bindet an vier verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptoren, EP1, EP2, EP3 und EP4 (Sugimoto & Narumiya, 2007). Eine Bindung an EP2 und EP4 erhöht dabei den intrazellulären cAMP-Spiegel (Sugimoto & Narumiya, 2007). Über EP1 wird der intrazelluläre Ca²⁺-Spiegel erhöht (Katoh et al., 1995). EP3 hemmt dagegen die Adenylatcyclase und senkt damit den intrazellulären cAMP-Spiegel (Sugimoto & Narumiya, 2007). Die einzelnen Rezeptoren übertragen Signale jedoch nicht exklusiv über die beschriebenen Hauptwege, sondern induzieren oft mehrere G-Proteine beziehungsweise mehrere Signalwege (Sugimoto & Narumiya, 2007). Sowohl die anabolen als auch die resorptiven Effekte von PGE₂ scheinen dabei über EP2 und EP4 vermittelt zu werden (Blackwell et al., 2010). Vergleichbar mit PTH kann auch bei PGE₂ die kontinuierliche Gabe resorptiv wirken, während die intermittierende Gabe den Knochenaufbau fördert (Tian et al., 2008). Der Effekt ist dosisabhängig (Quinn et al., 1997; Ramirez-Yanez & Symons, 2012). Der Haupteffekt auf die Resorption wird dabei indirekt in der Hochregulierung von RANKL und der Hemmung von Osteoprotegerin gesehen. Dadurch verstärken Prostaglandine ebenfalls die Stimulation der Osteoklastendifferenzierung durch andere Resorptionsagonisten (Blackwell et al., 2010; Nukaga et al., 2004). In niedriger Dosierung dagegen moduliert PGE₂ Osteoblasten dahingehend, dass im Gegensatz zu RANKL vermehrt Osteoprotegerin exprimiert wird, wodurch der Knochenabbau gehemmt wird. Gleichzeitig wird über Hochregulierung der Alkalischen Phosphatase der Knochenaufbau gefördert (Ramirez-Yanez & Symons, 2012).

Die genaue Wirkung von Prostaglandinen im Knochen lässt sich schwer vorhersagen und ist letztendlich vom lokalen Milieu und den induzierenden Faktoren abhängig. So verstärkt die Prostaglandininduktion durch BMP-2 sowohl die BMP-2-Stimulation der Differenzierung von Osteoblasten als auch von Osteoklasten. Werden Prostaglandine dagegen durch PTH induziert, verstärken sie die PTH-Stimulation der Osteoklasten und hemmen dagegen die PTH-abhängige Stimulation der Osteoblasten (Blackwell et al., 2010; Choudhary et al., 2013).

2.4.6 Biomarker der Frakturheilung

2.4.6.1 VEGF

Vascular endothelial growth factor (VEGF) gehört zu einer Familie aus Glykoproteinen, die neben VEGF-A (VEGF) außerdem VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und Placental growth factor (PlGF) umfasst (Cross et al., 2003; Ferrara et al., 2003). VEGF ist dabei die häufigste Form und nimmt im Körper eine essenzielle Rolle bei der Regulation der Angiogenese ein (Hu & Olsen, 2016). Es gibt drei verschiedene an Tyrosinkinase gekoppelte VEGF-Rezeptoren, VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3, wobei VEGF nur an VEGFR-1 und VEGFR-2 bindet. VEGFR-2 wird als Hauptmediator der fördernden Effekte des VEGF auf die Proliferation, die Angiogenese und die Gefäßpermeabilität angesehen (Ferrara et al., 2003). Die VEGF-Rezeptoren werden auf osteogenen Vorläuferzellen, Osteoklasten und Endothelzellen exprimiert (Ortega et al., 2004). VEGF wird von einer Reihe von Faktoren reguliert. Unter anderem ist Sauerstoffmangel ein entscheidender Mechanismus, der über den Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 alpha (HIF-1 α) beispielsweise die VEGF-Expression in Osteoblasten erhöht und somit die Angiogenese und Osteogenese im Knochen koppelt (Wang et al., 2007). Auch PGE₂ ist ein Stimulator der VEGF-Expression und fördert damit den für die Knochenbildung entscheidenden Schritt der Angiogenese (Harada et al., 1994). Die durch BMP-2 und BMP-4 induzierte Knochenbildung und Knochenheilung wird durch eine VEGF-abhängige Modulierung der Angiogenese verbessert (Peng et al., 2005). Während der inflammatorischen Phase der Frakturheilung erleichtert VEGF die Chemotaxis von Immunzellen in das Frakturhämatom und sorgt für eine erste Revaskularisierung des geschädigten Areals (Hu & Olsen, 2016). VEGF ist entscheidend an der enchondralen Osteogenese während der Frakturheilung beteiligt (Hu & Olsen, 2016). Es wird dabei von hypertrophen Chondrozyten ausgeschüttet und triggert dadurch die Invasion von Blutgefäßen in das Knorpelgewebe (Carlevaro et al., 2000; Gerber et al., 1999; Karsenty & Wagner, 2002; Zelzer et al., 2001). Somit können Osteoklasten in das hypertrophe Knorpelgewebe einwandern und die Umwandlung des Knorpelgewebes in Knochen einleiten (Engsig et al., 2000; Hu & Olsen, 2016). Durch eine Hemmung von VEGF mittels Antikörpern wird die Invasion von Blutgefäßen sowie die Bildung trabekulären Knochens gestört und die Zone hypertrophen Knorpels nimmt zu (Gerber et al., 1999; Ryan et al., 1999). VEGF wirkt als molekularer Verbindungsfaktor zwischen der Apoptose hypertropher Chondrozyten, der Funktion von Chondroblasten beziehungsweise Osteoklasten, dem Abbau der Knorpelmatrix sowie letztendlich der Knochenbildung (Gerber et al., 1999; Ortega et al., 2004). Während der Frakturheilung ist eine optimale Menge an VEGF nötig um Angiogenese und Osteogenese miteinander zu verbinden (Hu & Olsen, 2016). Zu wenig VEGF kann die Frakturheilung über eine mangelnde Gefäßversorgung und verringerte Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie BMP-2 und BMP-4 beeinträchtigen (Matsubara et al., 2012). Bei

einer zu großen Menge an VEGF werden Osteoblasten gehemmt und Osteoklasten stimuliert, was das Remodeling hin zu reifem Knochen stören kann (Hu & Olsen, 2016).

2.4.6.2 BMP

Bone morphogenetic proteins (BMPs) sind die potentesten bekannten osteoinduktiven Proteine im menschlichen Körper (Bostrom et al., 1995). Sie fördern die Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Osteoblasten und verstärken deren Aktivität (Canalis et al., 2003). BMPs wurden in den 1960er Jahren als endogene Faktoren, die die Reparaturvorgänge des Knochens initiieren, entdeckt (Urist, 1965) und etwa 20 Jahre später schließlich auch in reiner Form dargestellt und genetisch sequenziert (Luyten et al., 1989; Wozney et al., 1988). Ihre Entdeckung revolutioniert bis heute unser Verständnis der Frakturheilung. Als Mitglieder der TGF- β -Superfamilie parakriner Faktoren (Cao & Chen, 2005; Massagué, 1998) aktivieren sie heterodimere Rezeptoren mit Serin-/Thyrosinkinaseaktivität (Kawabata et al., 1998). BMPs spielen eine wichtige Rolle während jeder Phase der enchondralen Ossifikation (Kronenberg, 2003), die wiederum essenzieller Bestandteil der Frakturheilung ist. Sie tragen entscheidend zur mesenchymalen Kondensation bei, die der Knochenbildung vorangeht (Barna & Niswander, 2007). Diese Kondensation bleibt nach Hemmung der BMPs durch den BMP-Antagonist Noggin aus und auch die Differenzierung von Chondrozyten aus Vorläuferzellen wird blockiert (Pizette & Niswander, 2000). In Noggin-defizienten Mäusen zeigt sich dagegen eine Hyperplasie des Knorpels (Brunet et al., 1998). BMP-2 wird unter anderem von osteogenen Vorläuferzellen, Osteoblasten und Osteozyten ausgeschüttet (McBride et al., 2014). Es reguliert die hypertrophe Differenzierung von Knorpelgewebe (Minina et al., 2001). Darüber hinaus scheinen BMP-2 und -4 die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks zu Osteoblasten zu stimulieren und hierüber auch die Bildung neuer Osteoklasten zu fördern (Abe et al., 2000). BMP-2 ist vor allem für die Initiierung der Frakturheilung essenziell. In BMP-2-defizienten Mäusen findet keine Frakturheilung statt. Mesenchymale Vorläuferzellen am Ort der Fraktur können sich ohne BMP-2 nicht differenzieren, was eine Frakturheilung unmöglich macht. Während der Skeletogenese scheint der Mangel an BMP-2 jedoch ausgeglichen werden zu können (Tsuji et al., 2006). Während der Frakturheilung werden BMPs und dabei vor allem BMP-2 und -4 hauptsächlich parallel zur Einleitung der enchondralen Ossifikation von primitiven mesenchymalen Zellen und Knorpelvorläuferzellen an Tag sechs bis Tag 14 nach Fraktur exprimiert. Mit Reifung der chondralen Matrix nimmt die BMP-Konzentration ab, um mit der Bildung von Geflechtknochen durch Osteoblasten von Tag 14 bis 21 wieder zuzunehmen. Mit der Umwandlung des Geflechtknochens zu lamellärem Knochen werden wahrscheinlich weniger BMPs benötigt (Bostrom, 1998). Zudem werden BMPs in der frühen Phase der Frakturheilung an den Kallusenden, wo eine intramembranöse Ossifikation stattfindet, exprimiert. Dort sind vor allem osteogene Zellen des Periosts ihre Quelle (Bostrom, 1998;

Ishidou et al., 1995; Nakase et al., 1994). In einer weiteren Studie zeigte BMP-2 ein Expressionsmaximum am ersten Tag nach der Fraktur, was seine Rolle als Initiator der Frakturheilung unterstreicht. BMP-4, -3, -7 und -8 waren dagegen zwischen Tag 14 und 21 während der Resorption kalzifizierten Knorpels und der Rekrutierung von Osteoblasten erhöht (Cho et al., 2002). BMP-2 scheint zwar die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen zu kontrollieren, deren Rekrutierung ist jedoch wahrscheinlich in größerem Umfang abhängig von der BMP-7-Expression (Bais et al., 2009). Insgesamt ist die osteogene Differenzierung das Resultat eines komplexen Zusammenspiels mehrerer BMPs. In der osteogenen Phase der Knochenheilung werden die BMPs 1, 2, 3, 3a, 4, 5, 6, 7 und 8a exprimiert (Marsell & Einhorn, 2009). BMP-2 kommt dabei eine zentrale Rolle zu, indem es die Aktivität anderer BMPs reguliert (Edgar et al., 2007). Der BMP-2, -4 und -7-Antagonist Noggin wird während der Frakturheilung gemeinsam mit BMP-4 exprimiert, was für eine enge Regulierung der BMP-Funktion zur Verhinderung überschießender Kallusformation spricht (Brunet et al., 1998; Yoshimura et al., 2001). BMPs verbinden schließlich die während der Frakturheilung bedeutungsvollen Phasen der Osteogenese und Angiogenese, indem sie die VEGF-Produktion durch Osteoblasten anregen (Deckers et al., 2002). Während der Knochenbildung regulieren sie jeden der notwendigen Schritte, von Chemotaxis über Mitose, bis hin zur Differenzierung von Knorpel und schließlich Knochen (Reddi, 1997).

2.4.6.3 *CYR61*

Cystein-rich protein 61 (CYR61) ist ein sekretorisches, von einem wachstumsfaktorinduzierbaren Gen kodiertes Protein, dessen Rolle in der Regulation der Chondrogenese und Angiogenese gesehen wird (Babic et al., 1998; O'Brien & Lau, 1992; Wong et al., 1997). Als extrazelluläres Signalmolekül fördert es die Adhäsion, Ausbreitung und Chemotaxis von Fibroblasten, sowie die DNA-Synthese in Fibroblasten und Endothelzellen (Kireeva et al., 1996). Im Frakturkallus von Ratten wird CYR61 von Tag drei bis Tag 21 nach der Fraktur exprimiert, mit einem Maximum an Tag sieben und 10 (Hadjjargyrou et al., 2000), was mit dem Zeitpunkt der maximalen Chondrogenese übereinstimmt (Jingushi et al., 1992; O'Brien & Lau, 1992). CYR61 wird von Osteoblasten, unreifen Osteozyten und proliferierenden Chondrozyten exprimiert, jedoch nicht von hypertrophen Chondrozyten (Hadjjargyrou et al., 2000). Seine Expression wird in fetalen Osteoblasten durch Vitamin D3 induziert und durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und Serum gefördert (Schütze et al., 1998). BMPs steigern die Expression von CYR61 in embryonalen Stammzellen (Hollnagel et al., 1999).

2.4.6.4 *Kollagen 2*

Kollagen 2 ist das Hauptstrukturprotein des Knorpels. Es wird nach Frakturen bei Mäusen und Ratten ungefähr am neunten Tag maximal exprimiert. An Tag 14 wird kein neues

Kollagen 2 mehr exprimiert, da die Chondrozyten zu diesem Zeitpunkt hypertrophieren und die Knorpelmineralisation vorbereiten (Einhorn, 1998).

2.4.6.5 Kollagen 10

Kollagen 10 ist ein Marker für hypertrophe Chondrozyten und wird während der Frakturheilung später als andere Knorpelmarker exprimiert (Einhorn, 1998; Hiltunen, Aro, et al., 1993). Es wird von hypertrophen Chondrozyten in die Extrazellulärmatrix sezerniert (Karsenty & Wagner, 2002; Linsenmayer et al., 1991) und dient dort teilweise als Gerüst für die Matrixmineralisation während der enchondralen Ossifikation (Shen, 2005). Kollagen 2 und 10 werden jeweils ungefähr eine Woche nach Initiierung der Frakturheilung maximal exprimiert. Mit zunehmender Differenzierung der Chondrozyten verschiebt sich das Verhältnis von Kollagen 10 zu Kollagen 2 jedoch hin zu Kollagen 10 mit einer im Vergleich fast fünffach höheren Expression an Tag 14 (Cho et al., 2002).

2.4.6.6 CD31

Cluster of Differentiation 31 (CD31) oder Platelet (endothelial) cell adhesion molecule (P(E)CAM-1) ist ein transmembranöses Glykoprotein, das zur Immunglobulin-Superfamilie gehört. Es wird auf der Oberfläche von Endothelzellen, Thrombozyten und einigen hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. In CD31-negativen Mäusen zeigte sich eine Beeinträchtigung der endothelialen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion mit einer Abschwächung der Zellmigration und Mikroangiogenese, sodass CD31 als wichtiger Modulator der proangiogenetischen Aktivität von Endothelzellen gesehen werden kann (Park et al., 2010). Während Entzündungszuständen spielt CD31 eine wichtige Rolle bei der transendothelialen Migration von Leukozyten (Bogen et al., 1994). Zum Nachweis von Blutgefäßen kann eine Immunfärbung mit Antikörpern gegen CD31 angefertigt werden, da CD31 vor allem in Endothelzellen exprimiert wird (Akdur et al., 2013; Lim et al., 2020; Russell Jones et al., 1995).

2.4.6.7 PCNA

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) ist ein 1978 von Miyachi im Zellkern proliferierender Zellen entdecktes Antigen (Miyachi et al., 1978). Aufgrund seiner Wirkung in der DNA-Replikation, DNA-Reparatur und in der Zellzykluskontrolle findet PCNA heutzutage breite Verwendung als Proliferationsmarker (Juríková et al., 2016). So wird es unter anderem als Tumormarker eingesetzt (Juríková et al., 2016), eignet sich jedoch auch als Marker für die Zellteilung von beispielsweise Osteoblasten (Li et al., 2020).

2.4.6.8 RANKL und OPG

Receptor activator of nuclear factor NF- κ B ligand (RANKL) ist ein Zytokin, welches die Differenzierung, die Aktivierung und das Überleben von Osteoklasten steuert (Kong et al.,

1999; Lacey et al., 1998; Sobacchi et al., 2007). RANKL wird hauptsächlich von Osteozyten gebildet, die so die Resorption osteogener Matrix und dadurch das Remodeling des Knochens regulieren (Xiong et al., 2011). RANKL wird darüber hinaus von hypertrophen Chondrozyten exprimiert, wodurch der Abbau der mineralisierten Knorpelmatrix während der enchondralen Osetogenese gesteuert werden könnte (Xiong et al., 2011). RANKL existiert als lösliche und membrangebundene Form (Lacey et al., 1998).

Osteoprotegerin (OPG) ist ein lösliches Protein der TNF-Rezeptor-Superfamilie. Es hemmt die Reifung von Osteoklasten und damit die Knochenresorption (Simonet et al., 1997; Tsuda et al., 1997; Yasuda et al., 1998). Dies geschieht durch Bindung von RANKL und damit Verhinderung der RANK-RANKL-Interaktion, wodurch die Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung gehemmt wird (Manolagas, 2000). Eine Überexpression oder eine Verabreichung von exogenem OPG führt im Mausmodell zu einer Osteopetrose (Simonet et al., 1997), wohingegen OPG-defiziente Mäuse eine Osteoporose entwickeln (Bucay et al., 1998).

Insgesamt wird die Osteoklastogenese somit durch ein Gleichgewicht zwischen RANKL und OPG kontrolliert (Hofbauer et al., 2000). Während der Frakturheilung zeigt OPG zwei Maxima der Expression, innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Fraktur und an Tag sieben während der Phase maximaler Knorpelbildung. RANKL dagegen wird an Tag drei und 14, wenn die OPG-Konzentration abnimmt, maximal exprimiert (Kon et al., 2001).

2.4.7 Frakturmodelle

Das Studium der Frakturheilung anhand von standardisierten Tiermodellen (Bonnarens & Einhorn, 1984) hat eine Untersuchung jeglicher Aspekte der Frakturheilung wie Biomechanik, Biochemie und Histologie möglich gemacht (Marsell & Einhorn, 2010).

Die Wahl des geeigneten Modells hängt dabei vom Ziel der Studien ab (Roach et al., 1989). Zur Untersuchung von Implantaten sowie der mechanischen Bedingungen der Fraktur sind Großtiermodelle von Vorteil, da ihre Knochenstruktur der menschlichen sehr ähnlich ist und Implantatgrößen sowie chirurgisches Vorgehen relativ leicht auf den Menschen übertragbar sind (Hiltunen, Vuorio, et al., 1993; Histing et al., 2011). Um die Frakturheilung auf zellulärer Ebene zu untersuchen, haben sich jedoch kleinere Tiere wie Mäuse und Ratten bewährt (Hiltunen, Vuorio, et al., 1993). Die Verwendung von Mäusen hat den Vorteil, dass das Genom der Maus vollständig entschlüsselt ist, was die Verwendung von transgenen Stämmen und Knock-out-Modellen möglich macht. Zudem existiert eine Vielzahl an verfügbaren Antikörpern zur genauen Analyse molekularer Aspekte der Frakturheilung. Geringe Kosten ermöglichen größere Gruppenstärken und versprechen damit eine höhere statistische Aussagekraft (Histing et al., 2011; Jacenko & Olsen, 1995; Nunamaker, 1998).

Aufgrund der geringen Größe ist die operative Technik bei Mäusen anspruchsvoller (Histing et al., 2011) und erfordert häufig den Einsatz von Operationsmikroskopen.

Bei Frakturstudien an Mäusen wurden bisher hauptsächlich Rippen, die Tibia und das Femur untersucht (Hiltunen, Vuorio, et al., 1993). Zur biomechanischen Untersuchung eignen sich Rippen und Tibia aufgrund ihrer gebogenen Form und ihres unregelmäßigen Querschnitts jedoch nur bedingt. Das Femur erscheint hier aufgrund seiner Beschaffenheit und Größe geeigneter.

Man unterscheidet zwischen geschlossenen und offenen Frakturmodellen. Geschlossene Frakturmodelle basieren auf dem Modell von Bonnarens und Einhorn (1984), bei dem mit einer Drei-Punkt-Biegevorrichtung eine transverse Fraktur der Schaftmitte mit geringem Weichteiltrauma erzeugt wird. Bei offenen Frakturmodellen wird das Femur über einen meist lateralen Zugang direkt osteotomiert (Park et al., 1999).

In vielen Studien an Mäusen wird zur Stabilisierung der Fraktur ein einfacher Pin verwendet (Manigrasso & O'Connor, 2004). Es ist jedoch bekannt, dass die Stabilität der Versorgung einen entscheidenden Einfluss auf die Frakturheilung hat (Claes et al., 1997; Hagiwara et al., 2015; Histing et al., 2016). Mit Entwicklung der MouseScrew® durch unsere Arbeitsgruppe konnte ein intramedulläres Verfahren mit einer im Gegensatz zu vorherigen Techniken gesteigerten Rotationsstabilität kombiniert werden (Histing et al., 2018; Holstein et al., 2009). Bei Mäusen existieren mittlerweile sowohl intramedulläre Zugschrauben (Holstein et al., 2009), Verriegelungsnägel (Garcia et al., 2011), als auch Plattenosteosynthesen (Histing et al., 2010; Lin et al., 2019; Matthys & Perren, 2009) sowie externe Fixateure (Morse et al., 2015; Röntgen et al., 2010).

Der hohe Weichteilschaden wird als Nachteil offener Verfahren angesehen, da eine Schädigung des Weichteilmantels die Frakturheilung verzögern kann (Claes et al., 2006; Histing et al., 2011).

2.4.8 Frakturheilung im Alter

Mit steigendem Alter ist der Körper physiologischen Änderungen unterworfen, die in einem gesteigerten Frakturrisiko münden (Gruber et al., 2006). So sorgt unter anderem die zunehmende Inzidenz der Osteoporose für eine erhöhte Frakturneigung. Gleichzeitig treten bei älteren Menschen Störungen der Frakturheilung vermehrt auf (Foulke et al., 2016). Frakturen werden dadurch zu einem der wichtigsten Faktoren für Morbidität und Mortalität im Alter, verbunden mit enormen sozioökonomischen Kosten weltweit. Für die nächsten Jahre wird aufgrund der immer älter werdenden Gesellschaft sogar eine noch weitere Zunahme der Fälle prognostiziert (Sánchez-Riera & Wilson, 2017).

Die Frakturheilung im Alter weist einige Besonderheiten auf:

Osteochondrale Stammzellen aus Periost und Knochenmark sind im Alter in ihrer Zahl vermindert. Zudem zeigen sie vermehrt Zeichen oxidativen Stresses sowie eine verminderte Fähigkeit zur Differenzierung. Die Mechanismen, die zu einer beeinträchtigten Frakturheilung im Alter führen, sind jedoch noch nicht in Gänze verstanden. Es können bisher nur einzelne Faktoren der Frakturheilung mit jungen Individuen verglichen werden (Clark et al., 2017). Die inflammatorische Phase mit der Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren scheint eine enorm wichtige Rolle für die Frakturheilung zu spielen. Eine inflammatorische Dysregulation im Alter beeinflusst die Heilung negativ (Hankenson et al., 2014). Im Alter ist darüber hinaus die Vaskularisierung des Frakturkallus beeinträchtigt, was mit einer reduzierten Expression proangiogenetischer Faktoren assoziiert ist (Lu et al., 2008). Für die Angiogenese entscheidende mesenchymale Stammzellen zeigen sich in Anzahl und Funktionalität vermindert (Duscher et al., 2015). Zusätzlich ist die Durchblutung des Knochens im Alter insgesamt reduziert, wodurch die Frakturheilung beeinträchtigt werden könnte (Prisby et al., 2007). Das für die Frakturheilung entscheidende Potenzial des Periosts zur Chondrogenese nimmt bei Untersuchungen an Hasen mit zunehmendem Alter ab (O'Driscoll et al., 2001). Die verzögerte Frakturheilung im Alter geht mit vermehrtem Knorpelgewebe und weniger Knochen einher. Makrophagen in alten Mäusen zeigen altersbedingte Veränderungen und eine Hemmung der Makrophageninfiltration in den Frakturkallus verbessert die Frakturheilung bei alten Mäusen (Clark et al., 2020). Bei Ratten zeigte sich im Alter eine verzögerte Wiederherstellung der mechanischen Stabilität im Gegensatz zu jungen Tieren (Meyer et al., 2001). In alten Mäusen zeigte sich in Studien im Vergleich zu jungen Tieren weniger Kallusgewebe und die Frakturheilung schritt langsamer voran (Lopas et al., 2014; Lu et al., 2005). Dies geht mit einer verminderten Proliferationsrate mesenchymaler Stammzellen im Alter einher. Dennoch entspricht die Stadienfolge der Frakturheilung bei alten Mäusen im Wesentlichen derjenigen junger Mäuse (Lopas et al., 2014). Im Alter nehmen die Verbindungen zwischen Osteozyten und die Lebensfähigkeit der Osteozyten allgemein ab (Knothe Tate et al., 2004; Tomkinson et al., 1997). Dadurch wird die Regulation des Zusammenspiels von Osteoblasten und Osteoklasten gestört, was in einem Überwiegen der Knochenresorption im Alter resultiert (Rocheffort et al., 2010). Diese vermehrte Aktivität von Osteoklasten kann so auch für eine verzögerte Frakturheilung im Alter verantwortlich gemacht werden (Histing et al., 2013). Dies ist mit einer höheren RANKL-Expression und gleichzeitig verminderten OPG-Expression im Alter assoziiert (Lin et al., 2017).

2.5 Hormonelle Regulation des Knochenstoffwechsels

Parathormon (PTH) ist einer der Hauptregulatoren der Calciumhomöostase im menschlichen Körper durch seine Wirkung auf Niere und Knochen (Choudhary et al., 2013). Es setzt dabei Calcium in Reaktion auf einen systemischen Bedarf aus dem Skelett frei (Little et al., 2007). Obwohl vor allem für diesen katabolen Einfluss auf den Knochen bekannt, wurde schon 1932 entdeckt, dass PTH ebenfalls die Knochenformation stimulieren kann (Selye, 1932). Interessanterweise fördert eine kontinuierliche Gabe von PTH den Knochenabbau (Iida-Klein et al., 2005), während eine intermittierende Gabe Osteoblasten stimuliert und damit eine vermehrte Knochenbildung zur Folge hat (Kim et al., 2012; Rodan & Martin, 2000). So konnte beispielsweise durch die intermittierende Gabe von PTH bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose die Knochenmasse erhöht und die Frakturrate gesenkt werden (Lindsay et al., 1997). PTH erzielt dabei sowohl seine katabolen als auch anabolen Wirkungen über Bindung an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor auf Osteoblasten und deren Vorstufen (Potts & Gardella, 2007). In diesen Zellen stimuliert PTH die RANKL-Expression (Suda et al., 1999). PTH ist darüber hinaus ein potenter Induktor der Cyclooxygenase 2 und damit der Prostaglandinsynthese im Knochen (Kawaguchi et al., 1994; Tetradis et al., 1997).

Östrogen erhöht die Expression von OPG und erniedrigt die Expression von RANKL. Dies führt über eine verminderte RANK-Aktivierung zu einer reduzierten Anzahl aktiver Osteoklasten und damit zu weniger Knochenresorption (Boyle et al., 2003; Harada & Rodan, 2003). Ein Mangel an Östrogen, wie er beispielsweise nach der Menopause auftritt, stimuliert dagegen die Osteoklastogenese und wird als Ursache für den vermehrten Knochenabbau beim Krankheitsbild der Osteoporose angesehen (Jilka et al., 1992). Die Stimulation der Osteoklasten erfolgt dabei über erhöhte Spiegel an RANKL, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-11, M-CSF und Prostaglandin E. All diese Zytokine scheinen also jeweils durch Östrogen reguliert zu werden (Jilka et al., 1992; Manolagas & Jilka, 1995; Pacifici, 1998; Rodan & Martin, 2000; Srivastava et al., 1998). Östrogen ist in beiden Geschlechtern für den Schluss der Epiphysenfugen während des Wachstums und für das Erreichen der endgültigen Knochenmasse verantwortlich. Das männliche Sexualhormon Testosteron sorgt durch eine Stimulierung der periostalen Knochenapposition für die bei Männern im Vergleich zu Frauen dickere Kortikalis und insgesamt vermehrte Größe des Skeletts (Riggs et al., 2002).

Calcitonin ist ein Peptidhormon, das in vivo die Knochenresorption hemmt. Dazu wirkt es über den Calcitoninrezeptor direkt an Osteoklasten und deren Vorläuferzellen (Roodman, 1996). Die regulatorische Rolle des Calcitonins auf den Kalziumspiegel ist wahrscheinlich nur während Zuständen der erhöhten Knochenresorption, wie beispielsweise während des Wachstums, wirklich relevant (Martin, 1999; Rodan & Martin, 2000).

Calcitriol (1,25-Dihydroxyvitamin D₃) induziert die Differenzierung von hämatopoetischen Osteoklastenvorläuferzellen zu Osteoklasten (Kurihara et al., 1990). Calcitriol entfaltet seine Wirkung hauptsächlich durch Bindung an nukleäre Rezeptoren in Chondrozyten, Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten. Reife Osteoklasten exprimieren keine Vitamin-D-Rezeptoren (Narbaitz et al., 1983; Stumpf et al., 1994). In Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten fördert Calcitriol die Expression von RANKL (Suda et al., 1999). Vitamin D₃ erhöht die Kalziumresorption aus dem Darm und kann zusammen mit PTH die renale Kalziumwiederaufnahme stimulieren. Zudem verstärkt es die Knochenresorption durch Osteoklasten (Roodman, 1996). Vitamin D₃ wirkt zudem fördernd auf die Angiogenese während des Remodelings und der Frakturheilung durch Erhöhung der VEGF-Expression (Schlaeppli et al., 1997).

2.6 Diclofenac

2.6.1 Historie

1971 konnte John Vane erstmals nachweisen, dass Acetylsalicylsäure und NSAIDs ihre Wirkung über eine Hemmung der Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen entfalten (Vane, 1971). Basierend auf der Analyse der strukturellen und physikochemischen Eigenschaften bis dahin existierender NSAIDs wurde postuliert, dass ein neues antiinflammatorisches Medikament über bestimmte Charakteristika verfügen müsste. Dazu gehörten eine konstante Azidität mit einem pH-Wert zwischen vier und fünf, ein Verteilungskoeffizient von ungefähr 10 und zwei aromatische Ringe, die untereinander verdreht sind (Sallmann, 1986). Diese Informationen führten zur Synthese von Diclofenac durch Alfred Sallmann und Rudolf Pfister. 1973 wurde Diclofenac von Ciba-Geigy, heute Novartis AG, Basel, Schweiz erstmals auf den Markt gebracht (Altman et al., 2015). Diclofenac ist heute das weltweit meistverschriebene NSAID (McGettigan & Henry, 2013).

2.6.2 Struktur

Diclofenac (2-{2-[(2,6-Dichlorphenyl)amino]phenyl}essigsäure) (**Abb. 7**) gehört zur Familie der phenylazetischen Säuren. Es zeichnet sich als schwache Säure durch einen konstanten pH-Wert von vier und einen Verteilungskoeffizienten (zwischen n-Octanol und einem wässrigen Puffer mit einem pH-Wert von 7,4) von 13,4 aus, was für eine partielle Löslichkeit unter sowohl wässrigen als auch hydrophoben Bedingungen spricht (Altman et al., 2015). Diese Eigenschaft ist entscheidend für die gute Passierbarkeit von Membranen zum Beispiel des Gastrointestinaltrakts oder der Synovia von Gelenken (Rainsford et al., 2008). Die Struktur von Diclofenac beinhaltet eine phenylazetische Säuregruppe, eine sekundäre Aminogruppe und einen Phenylring, dessen zwei Orthopositionen mit Chloridatomen besetzt sind. Diese Chloridatome sind für die maximale Drehung des Phenylrings verantwortlich

(Sallmann, 1986). Insgesamt sorgen diese strukturellen Eigenschaften für gute Bindungseigenschaften an der Substratbindungsstelle der COX-Enzyme (Rainsford et al., 2008; Sallmann, 1986).

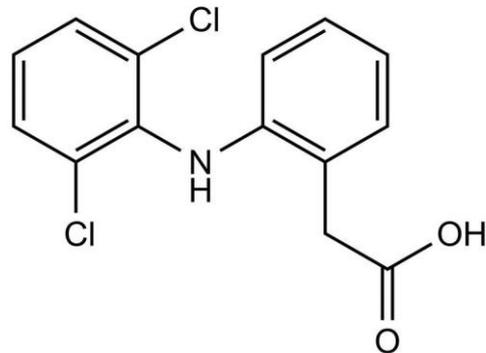


Abbildung 7: Strukturformel Diclofenac. (Quelle: <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/steckbrief-diclofenac-120836/>)

2.6.3 Wirkmechanismus

NSAIDs sind durch ein ähnliches Wirkungsspektrum charakterisiert, welches vor allem analgetische, antiinflammatorische und antipyretische Eigenschaften umfasst. Diclofenac zeigt dabei in allen Bereichen eine sehr gute Wirksamkeit (Menassé et al., 1978). Seine Wirkung entfaltet Diclofenac wie alle NSAIDs hauptsächlich über eine Hemmung der Cyclooxygenase (COX) und damit der Prostaglandinsynthese (Simon, 1996; Vane, 1971). Die Cyclooxygenase existiert in zwei unterschiedlichen Isoformen, COX-1 und COX-2 (Hla & Neilson, 1992; Vane et al., 1998). COX-1 ist ein elementares Enzym, welches beinahe ubiquitär im menschlichen Körper exprimiert wird. Seine Konzentration und Aktivität sind dabei relativ stabil (Alfaro & Davis, 2021; Vane et al., 1998). Seine Funktion besteht im Wesentlichen in der Aufrechterhaltung der Thrombozytenfunktion, des Blutflusses in die Nieren und des Schutzes der gastralen Mukosa gegen Säureeinwirkung (DuBois et al., 1998). COX-2 dagegen ist ein induzierbares Enzym, das vor allem während Zuständen einer Gewebeschädigung und in der Präsenz inflammatorischer Mediatoren, die auch nozizeptive schmerzinduzierende Eigenschaften haben, exprimiert wird (Alfaro & Davis, 2020). Die Cyclooxygenase ist das entscheidende regulatorische Enzym der Prostaglandinsynthese (DuBois et al., 1998). Diclofenac ist ein nichtselektives NSAID und hemmt beide Isoformen der Cyclooxygenase (Altman et al., 2015). Dies geschieht durch eine kompetitive Hemmung der Bindung von Arachidonsäure an COX-1 und COX-2 (Alfaro & Davis, 2021). Dadurch wird die Umwandlung der Arachidonsäure zu PGH₂ als Zwischenstufe (Needleman et al., 1986; Smith et al., 2000) und damit die Bildung von Prostanoiden wie den Prostaglandinen (PG) E₂, F₂ und G₂, Prostacyclin (PGI₂) und Thromboxan (TX) A₂ gehemmt (Ku et al., 1986; Vane, 1971). Diese sind essenzielle Faktoren inflammatorischer und nozizeptiver Reaktionen

(Alfaro & Davis, 2021). Dabei stellt Prostaglandin E₂ den Hauptmediator dar, der während einer Entzündung freigesetzt wird. Seine Hemmung wird als entscheidender Mechanismus der Wirkung von NSAIDs gesehen (Altman et al., 2015). Diclofenac zeigt eine leicht höhere Selektivität zu COX-2 als zu COX-1, vergleichbar mit Celecoxib (FitzGerald & Patrono, 2001) mit einer vierfach höheren Bindung an COX-2 in in-vitro-Experimenten (Alfaro & Davis, 2021; Warner et al., 1999). Diese Selektivität wird jedoch als abhängig von der Plasmakonzentration des Medikaments betrachtet. Die Relevanz für die Klinik scheint zudem fraglich, da bei einer Dosis, die 80% der COX-2-Aktivität hemmt, ebenfalls bereits 70% der COX-1-Aktivität inhibiert wird (Warner et al., 1999). Seine periphere analgetische Wirkung erreicht Diclofenac über die Herunterregulierung von sensibilisierten peripheren Schmerzrezeptoren. Dies scheint über den L-Arginin-Stickstoffmonoxid-cGMP-Stoffwechsel und eine damit verbundene Aktivierung ATP-sensitiver Kaliumkanäle zu funktionieren (Alfaro & Davis, 2021). Diclofenac reduziert außerdem die Konzentration der Substanz P, eines proinflammatorischen Neuropeptids mit nozizeptiven Eigenschaften, in der Synovialflüssigkeit und die Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-6 im Plasma und in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis (Sacerdote et al., 1995).

2.6.4 Pharmakokinetik

Das Medikament Diclofenac wird zur Verabreichung an Natrium, Kalium oder Epolamidsalz gebunden (Alfaro & Davis, 2021). In der hier vorliegenden Arbeit wurde an Natrium gebundenes Diclofenac-sodium verwendet. Diclofenac-sodium kann oral als Tablette oder Suspension, in Lösung intramuskulär oder intravenös, transdermal als Gel oder rektal als Zäpfchen verabreicht werden (Singh et al., 2011). Diclofenac wird nach oraler Aufnahme aus dem Gastrointestinaltrakt vollständig resorbiert (Davies & Anderson, 1997; Riess et al., 1978). Die Rate und Geschwindigkeit der Resorption kann je nach Salzform, pharmazeutischer Zusammensetzung und zeitlicher Beziehung der Gabe zu Mahlzeiten variieren (Altman et al., 2015). Ungefähr 60 % des Wirkstoffs erreichen aufgrund eines First-pass-Effektes der Leber die systemische Zirkulation (Davies & Anderson, 1997; Todd & Sorkin, 1988). Diclofenac wird im Plasma zu mehr als 99% an Protein, vor allem an Albumin, gebunden (Riess et al., 1978; Todd & Sorkin, 1988). In entzündetem Gewebe wird durch das dort vorherrschende schwach saure Milieu die Proteinbindung reduziert. Das dadurch vermehrt verfügbare freie Diclofenac kann somit leichter in intrazelluläre Räume diffundieren und dort seine Wirkung entfalten (Altman et al., 2015). Die Eliminationshalbwertszeit in der Synovialflüssigkeit ist dreifach länger als im Blutplasma und 12 bis 24 Stunden nach der Gabe von Diclofenac lassen sich in der Synovialflüssigkeit höhere Konzentrationen als im Plasma feststellen (Davies & Anderson, 1997). Diclofenac verbleibt so trotz der relativ kurzen Plasmahalbwertszeit lange am Ort der Inflammation, wodurch der auch nach sinkender

Plasmakonzentration andauernde therapeutische Effekt erklärt werden könnte (Todd & Sorkin, 1988). Bei Ratten und Hunden konnte im Gegensatz zum Menschen eine enterohepatische Rezirkulation nachgewiesen werden (Riess et al., 1978). Bei nüchternen Patienten liegt die maximale Plasmakonzentration nach oraler Aufnahme nach 1,5 bis zwei Stunden vor (Small, 1989), nach intramuskulärer Gabe nach 10 bis 20 Minuten und nach rektaler Gabe nach circa 30 Minuten („Voltaren® 100 mg retard Retardtabletten“, 2020). Die Plasmahalbwertszeit beträgt 1,5 Stunden. Diclofenac wird in der Leber metabolisiert und anschließend biliär sowie renal ausgeschieden (Small, 1989). Beim Menschen entstehen durch hepatische Hydroxylierung und Konjugation (Tang, 2003) pharmakologisch inaktive Metabolite des Medikaments, die zu ungefähr 70% als Glukuronide mit dem Urin ausgeschieden werden („Voltaren® 100 mg retard Retardtabletten“, 2020). Die Glukuronidierung in der Leber wird dabei hauptsächlich durch die Uridin-5'-diphosphoglucuronosyl-transferase (UGT) 2B7 vermittelt und die Hydroxylierung durch Cytochrom P 450 (CYP) 2C9 und 3A4 (Tang, 2003). Da die Cytochrom P450-Enzyme durch andere Medikamente induziert bzw. gehemmt werden können, müssen potentielle Wechselwirkungen bedacht werden („Voltaren® 100 mg retard Retardtabletten“, 2020).

Die empfohlene Tageshöchstosis für Diclofenac beim Menschen beträgt 150mg („Voltaren® 100 mg retard Retardtabletten“, 2020).

2.6.5 Indikation

Diclofenac wird zur Behandlung von akuten und chronischen Schmerzzuständen verwendet und dabei vor allem bei Erkrankungen des Muskuloskelettsystems, die mit entzündlichen Veränderungen assoziiert sind, eingesetzt (Alfaro & Davis, 2020). Dazu zählen unter anderem akute und chronische Arthritiden, Spondylitis ankylans (Morbus Bechterew) (Kroon et al., 2015), Reizzustände bei Arthrosen, entzündliche weichteilrheumatische Erkrankungen sowie schmerzhafte Schwellungen oder Entzündungen nach Verletzungen oder Operationen („Voltaren® 100 mg retard Retardtabletten“, 2020).

Vor allem nach totalen Hüftendoprothesen können sogenannte heterotope Ossifikationen, also die Bildung extraskelettalen Knochens in Muskeln und Bindegewebe, auftreten. Zur Verhinderung dieser heterotopen Ossifikationen kann neben Indomethacin und einer Radiotherapie auch Diclofenac verwendet werden (Haffer et al., 2020; Meyers et al., 2019; Migliorini et al., 2021; Sell et al., 2004; Wahlström et al., 1991). Diclofenac scheint dabei ab einer Dosis von 75 mg täglich und einer Dauer der Gabe von neun Tagen effektiv zu sein (Haffer et al., 2020) und auch Celecoxib, ein selektiver COX-2-Inhibitor, besitzt wahrscheinlich eine hohe Wirksamkeit (Migliorini et al., 2021). Die Bestrahlung wird jedoch als effektivste Methode zur Verhinderung einer heterotopen Ossifikation angesehen (Cai et al., 2019).

Eine Pankreatitis stellt eine schwerwiegende Komplikation nach endoskopisch retrograden Cholangiopankreatikographien (ERCP) dar. Zur Prophylaxe kann dabei Diclofenac vor oder kurz nach dem Eingriff rektal verabreicht werden, wodurch sich die Rate dieser Post-ERCP-Pankreatitiden signifikant verringert (Patai et al., 2017).

2.6.6 Nebenwirkungen

Diclofenac hemmt wie andere NSAIDs die COX-1- und COX-2-abhängige Biosynthese von Prostaglandinen. Dabei werden die erwünschten Wirkungen mit der Hemmung von COX-2 assoziiert, während die Nebenwirkungen hauptsächlich auf die Hemmung von COX-1 zurückgeführt werden (Warner et al., 1999). Dies liegt daran, dass protektive Prostaglandine, die die Integrität der gastralen Mukosa sowie die normale Nierenfunktion aufrechterhalten, durch COX-1 produziert werden (Vane et al., 1998). So hat die Gabe von Diclofenac unter anderem renale Nebenwirkungen zur Folge, die bei gesunden Menschen nur sehr selten und in mildem Ausmaß auftreten. Bei Individuen, deren Nierenfunktion Prostaglandin-abhängig ist, können jedoch auch ernsthafte Begleiterscheinungen auftreten. Unter Bedingungen, in denen die Perfusion der Nieren eingeschränkt ist, spielen Prostaglandine eine wichtige kompensatorische Rolle, um eben diese Perfusion aufrecht zu erhalten. Risikopatienten sind demnach Patienten mit einem reduzierten effektiven beziehungsweise relativen Plasmavolumen, zum Beispiel Menschen mit Herzinsuffizienz, Leber- oder Nierenerkrankungen. Bei Hypertonikern kann durch NSAID-Gabe der Blutdruck weiter ansteigen und bei gleichzeitiger Gabe von Medikamenten, die den Kaliumspiegel beeinflussen, kann durch NSAIDs eine Hyperkaliämie verursacht werden (Brater, 2002).

NSAIDs erhöhen das kardiovaskuläre Risiko. Dabei zeigt Diclofenac innerhalb der Gruppe der NSAIDs eine der größten Risikoerhöhungen (Coxib and traditional NSAID Trialists' (CNT) Collaboration et al., 2013; McGettigan & Henry, 2013). Große vaskulatorische Ereignisse treten durch Diclofenacgabe etwa um ein Drittel häufiger auf, vor allem durch eine erhöhte Rate an Myokardinfarkten bedingt. Werden 1000 Patienten über ein Jahr mit Diclofenac oder einem Coxib behandelt, erleiden drei Patienten zusätzlich ein vaskuläres Ereignis, wovon eines tödlich ist (Coxib and traditional NSAID Trialists' (CNT) Collaboration et al., 2013). Die Gefahr des Auftretens von Myokardinfarkten steigt mit höherer Dosis und längerer Therapiedauer der NSAIDs (García Rodríguez et al., 2008). Das Risiko, eine Herzinsuffizienz zu entwickeln, wird durch Initiierung einer NSAID-Therapie ungefähr verdoppelt (Coxib and traditional NSAID Trialists' (CNT) Collaboration et al., 2013; García Rodríguez & Hernández-Díaz, 2003). Dabei zeigt Diclofenac die geringste Erhöhung des relativen Risikos (1,1) innerhalb der Gruppe der NSAIDs (insgesamt 1,6). Eine große dänische Registerstudie kommt 2018 jedoch zu dem Schluss, dass Diclofenac unter den NSAIDs das größte kardiovaskuläre Risiko birgt (Schmidt et al., 2018). Patienten mit

Diabetes, Hypertonus oder vorbekanntem Nierenversagen haben ein erhöhtes Risiko, eine Herzinsuffizienz unter NSAID-Therapie zu entwickeln (García Rodríguez & Hernández-Díaz, 2003). Die kardiovaskulären Nebenwirkungen von Diclofenac scheinen ähnlich derer der selektiven COX-2-Inhibitoren über eine Verringerung des COX-2-abhängigen Prostacyclins (PGI₂) im Endothel der Gefäße vermittelt zu werden. Damit entfällt die protektive Wirkung von Prostacyclin, welches in vivo der Thrombogenese (Moncada et al., 1977), Atherogenese und Hypertension (Grosser et al., 2006) entgegenwirkt. Hohe Dosen Diclofenac (2 x 75 mg täglich) haben allem Anschein nach ähnliche kardiale Nebenwirkungen wie selektive COX-2-Inhibitoren und erhöhen damit vor allem das Risiko für Myokardinfarkte (Coxib and traditional NSAID Trialists' (CNT) Collaboration et al., 2013; Kearney et al., 2006). Die gastralen Nebenwirkungen von NSAIDs entstehen hauptsächlich durch eine Hemmung von COX-1 (Warner et al., 1999). Dadurch werden weniger Prostaglandine produziert, die normalerweise unter anderem durch erhöhte Bikarbonat- und Mukusproduktion die Magenschleimhaut vor Säureeinwirkung schützen (Miller, 1983; Sinha et al., 2013). Verschiedene NSAID-Regime erhöhten in einer großen Meta-Analyse das Risiko für gastrointestinale Blutungen etwa zwei- bis vierfach (Coxib and traditional NSAID Trialists' (CNT) Collaboration et al., 2013). Diclofenac zeigt dabei jedoch in verschiedenen Studien eine höhere gastrointestinale Tolerabilität als andere NSAIDs und verursacht innerhalb der therapeutischen Spanne weniger gastrointestinale Ulzera (Läsionen) und Blutungen (Menassé et al., 1978). Dagegen kommt die 2018 veröffentlichte dänische Kohortenstudie von Schmidt und Kollegen zu dem Schluss, dass Diclofenac nach 30 Tagen Behandlung das Risiko für gastrointestinale Blutungen im Vergleich zu Ibuprofen mehr als verdoppelt (Schmidt et al., 2018). Die gastralen Nebenwirkungen aller NSAIDs sind stark dosisabhängig (Warner et al., 1999).

Im Gegensatz zu Ibuprofen interferiert Diclofenac nicht negativ mit der kardioprotektiven Wirkung von Acetylsalicylsäure (ASS). Ibuprofen blockiert dessen Bindungsstelle an COX-1, was zu einer Verringerung der irreversiblen Hemmung der Thrombozytenaggregation durch ASS führt (Catella-Lawson et al., 2009).

Insgesamt lässt sich sagen, dass mit erhöhter Selektivität für COX-1 die gastralen Nebenwirkungen von NSAIDs zunehmen, während mit zunehmender Selektivität für COX-2 unerwünschte kardiovaskuläre Arzneimittelwirkungen überwiegen (Grosser et al., 2006). Dies erklärt die im Vergleich mit anderen NSAIDs geringen gastralen und ausgeprägteren kardiovaskulären Effekte von Diclofenac.

Da unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Diclofenac dosisabhängig sind (García Rodríguez et al., 2008), sollte Patienten mit entsprechenden Risikofaktoren eine Dosisreduzierung empfohlen werden (Altman et al., 2015).

Für Diclofenac ist im Gegensatz zu anderen NSAIDs auch eine erhöhte Hepatotoxizität bekannt, wobei diese Toxizität sich hauptsächlich auf laborchemisch erhöhte Transaminase-Werte beschränkt und nur selten zu Hospitalisationen oder Beendigungen der Therapie mit Diclofenac führt (Sriuttha et al., 2018).

2.7 Fragestellung und Zielsetzung

Der Körper ist im Alter einer Reihe von Änderungsprozessen ausgesetzt, die unter anderem eine verringerte Fähigkeit zur Regeneration mit sich bringen (Bucher et al., 2019). Trotz einiger Hinweise dafür, dass NSAIDs die Frakturheilung negativ beeinflussen können, ist die Substanzklasse eine der meistverwendeten Medikamentengruppen nach Traumata. Besonders die Auswirkungen auf die Frakturheilung im Alter wurden bisher jedoch nur unzureichend untersucht. Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, ob die Behandlung mit Diclofenac den Heilungsprozess alter Mäuse beeinflusst.

Die Nullhypothese lautet:

„Die Gabe von Diclofenac beeinflusst den Frakturheilungsprozess bei alten Mäusen nicht.“

3 Material und Methoden

3.1 Tiermodell

In dieser Studie wurden 16 Monate alte CD-1-Mäuse mit einem mittleren Gewicht von $42,6\text{g} \pm 1,0\text{g}$ (Kontrolle: $43,3\text{g} \pm 1,4\text{g}$; Diclofenac: $42,0\text{g} \pm 1,5\text{g}$) verwendet. Die Tiere wurden am Institut für klinische und experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, Homburg (Saar) gezüchtet und in einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Ihnen stand jederzeit Leitungswasser sowie Standard-Pelletfutter (Altromin 1328, Altromin, Lage, Deutschland) zur freien Verfügung. Die Versuche wurden unter der Versuchsnummer 45/2015 durch die zuständige Behörde (Landesamt für Verbraucherschutz, Abteilung C: Lebensmittel- und Veterinärwesen – Zentralstelle, Konrad-Zuse-Straße 11, 66115 Saarbrücken) genehmigt. Es wurde nach den Prinzipien der 3R gehandelt (Russel, Burch, The Principles of Humane Experimental Technique, 1959). Ziel dabei ist es, Tierversuche wenn möglich zu vermeiden (replace), die Anzahl der verwendeten Tiere so gering wie möglich zu halten (reduce) und das Leiden der Tiere während der Versuche auf ein Minimum zu beschränken (refine).

Die Einteilung der Versuchstiere erfolgte unter der Maßgabe einer gleichmäßigen Gewichts- und Geschlechterverteilung in vier Untersuchungsgruppen. Die frakturierten Femora der Tiere wurden jeweils zwei beziehungsweise fünf Wochen nach Fraktur analysiert. Die biomechanische, radiologische sowie histologische Auswertung konnte jeweils an denselben Tieren durchgeführt werden. Die Proteinanalyse im Western Blot erforderte zusätzliche Versuchstiere, da dazu Kallusgewebe entnommen und anschließend sofort kryokonserviert werden musste. Die Proteinzusammensetzung des Kallusgewebes wurde nur zwei Wochen nach Fraktur untersucht.

3.2 Operation

Um eine ausreichende Sedierung sowie Schmerzfreiheit während der Operation zu gewährleisten, wurden die Tiere mittels einer intraperitonealen Injektion von 90mg/kg KG Ketamin (Ursotamin 100mg/ml , Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) und 12mg/kg KG Xylazin (Rompun 2%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) narkotisiert. Die ausreichende Tiefe der Narkose wurde dabei durch eine Testung der Zwischenzehenreflexe überprüft.

Vor Beginn der Operation wurde die rechte untere Extremität rasiert und vorhandene Haarreste mit einer Enthaarungscreme (acid-med, Asid Bonz, Herrenberg, Deutschland) entfernt. Zum Schutz der Augen vor Austrocknung wurde eine Dexpanthenolsalbe (Bepanthen® Augen und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH) aufgetragen. Um ein Auskühlen während der Operation zu vermeiden, wurden die Mäuse auf einer beheizbaren Unterlage gelagert.

Sämtliche Operationsschritte wurden unter Sicht durch ein Operationsmikroskop sowie unter aseptischen Konditionen durchgeführt, um größtmögliche Präzision und Sicherheit erreichen zu können. Nach ausführlicher Hautdesinfektion (Octeniderm, Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland) wurde medial der Patella ein ca. 5mm langer Hautschnitt vorgenommen (**Abb.10a**). Anschließend wurde die Kniegelenkscapsel ebenfalls medial eröffnet und die Patella nach lateral luxiert, um einen Zugang zur Fossa intercondylaris zu ermöglichen. Der Markraum wurde über die interkondyläre Notch mittels einer Kanüle (BD Microlance TM 3, 24G 1" - Nr. 17, 0,55 x 25mm, Becton, Dickinson and Company Limited, Drogheda, Irland) eröffnet. Daraufhin wurde eine weitere Kanüle mit geringerem Durchmesser (BD Microlance TM 3, 27G 3/4" - Nr. 20, 0,4 x 19mm, Becton, Dickinson and Company Limited, Drogheda, Irland) über das zuvor gefertigte Bohrloch in den Markraumkanal eingeführt und über diesen das Femur proximal aufgebohrt (**Abb. 10b**). Nach Entnahme dieser Kanüle konnte ein Führungsdraht mit einem Durchmesser von 0,2mm von distal nach proximal in das Femur eingeführt werden und das proximale Ende des Drahtes über einen kleinen Hautschnitt ausgeleitet werden (**Abb. 10c**). Die intramedulläre Lage des Drahtes wurde röntgenologisch kontrolliert (MX-20, Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, Illinois, USA) (**Abb. 10d**). Anschließend wurde das rechte Femur der Maus mit einliegendem Draht in einer speziellen Fraktureinrichtung (Schmidmaier et al., 2004) frakturiert (**Abb.10e**). Dazu wurde in einer eigens dafür angefertigten Guillotine (**Abb. 11**) ein Gewicht von 80g aus einer standardisierten Höhe von 100mm auf die Femurschaftmitte fallen gelassen. Die korrekte mittig diaphysäre Lage der Fraktur, entsprechend einer einfachen Schafffraktur nach AO-Klassifikation (32b-A3), wurde wiederum mittels einer Röntgenaufnahme kontrolliert (**Abb. 10f**). Daraufhin konnte eine Schraube aus medizinischem Stahl (MouseScrew® (RIS.221.103), 17,2mm Länge, 0,5mm Durchmesser; RISystem AG, Davos, Schweiz) (Holstein et al., 2009) (**Abb. 9**) mittels eines Schraubenhalters über das distale Ende des Führungsdrahtes (GuideTube (RIS.521.101), 0,3/0,2mm; RISystem AG) (**Abb. 10g**) in den Markraum eingebracht werden. Unter gleichzeitigem Druck sowohl auf die Schraube von distal als auch auf den Draht von proximal, um eine vorzeitige Diskonnektion zu vermeiden, wurde die Schraube über den Frakturspalt eingeführt und der Draht entfernt. Anschließend konnte die Schraube mit ihrem am Schraubenende befindlichen Gewinde im proximalen

Femur verankert werden. Der konisch zulaufende Schraubenkopf sorgte hierbei für eine distale Verankerung in der Fossa intercondylaris und eine Kompression des Frakturspalts im Sinne einer Zugschraube. Bei röntgenologisch korrekter Lage des Implantats konnte die Schraube an ihrer Sollbruchstelle abgeknickt und der zur Fixierung im Schraubenhalter dienende Teil entfernt werden (**Abb. 10h,i**). Die Schraube schloss dabei bündig mit den Femurkondylen ab (**Abb. 10j**). Abschließend wurde die Patella reponiert und durch eine Naht der Kniegelenkscapsel medial fixiert (**Abb. 10k**). Durch passive Bewegung des Beines im Kniegelenk wurde postoperativ die reibungsarme Funktion des Gelenks getestet. Die Hautschnitte wurden abschließend mit einer resorbierbaren Hautnaht versorgt (5-0 Prolene, Ethicon, San Lorenzo, USA) (**Abb. 10l**). Den Mäusen der Versuchsgruppe wurde zum Ende der Operation 5mg/kg KG Diclofenac (Diclofenac sodium salt, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) in NaCl 0,9% gelöst subkutan injiziert. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten dagegen eine äquivalente Menge NaCl 0,9% (5ml/kg KG). Anschließend wurden die Tiere unter einer Wärmelampe bis zur vollständigen Wiederherstellung des Bewusstseins sorgfältig überwacht (**Abb. 12**).

Zur perioperativen Schmerztherapie wurde bei allen Tieren über einen Zeitraum vom Tag vor der Operation bis drei Tage nach der Operation das frei zur Verfügung stehende Trinkwasser mit Tramadol-Sirup in einer Dosierung von 40 Tropfen entsprechend 1mg pro 100ml versetzt. Dabei wurde sich an der Empfehlung der Gesellschaft für Versuchstierkunde orientiert (Arras et al., 2020).

Die Mäuse wurden über zwei beziehungsweise fünf Wochen täglich gewogen und ihre Wundverhältnisse sowie ihr Verhalten mit besonderem Augenmerk auf das Gangbild beobachtet. Je nach Versuchsgruppe erhielten die Tiere täglich eine subkutane Injektion in die Nackenfalte von 5ml/kg KG Diclofenac-Lösung oder eine NaCl-Injektion von ebenfalls 5ml/kg KG.

Am Ende des Versuchszeitraums wurden die Tiere durch eine Überdosis der Narkosemittel Ketamin und Xylazin sowie anschließende zervikale Dislokation getötet. Das Ergebnis der Frakturheilung wurde mittels einer Röntgenaufnahme kontrolliert.

Die Femora wurden sorgfältig von umgebendem Gewebe befreit und sowohl das unfrakturierte gesunde Femur als auch das frakturierte Femur wurden explantiert. Während dieses Vorgangs fand eine kontinuierliche Benetzung der Knochen mit physiologischer Kochsalzlösung statt, um ein Austrocknen zu vermeiden. Das Implantat konnte mithilfe einer kleinen Zange entfernt werden. Sowohl vor als auch nach der Entfernung der Schraube wurden vergleichende Röntgenaufnahmen der Femora ohne umgebendes Gewebe

angefertigt. Zur weiteren Lagerung wurden die Knochen mit in 0,9-prozentiger Kochsalzlösung getränkten Kompressen umwickelt und bei -80°C eingefroren.



Abbildung 8: Chirurgische Instrumente. Von links nach rechts: Große Pinzette, Schere, feine Pinzette, Kanüle 27G, Kanüle 24 G, Skalpell, obere Reihe: Führungsdraht, MouseScrew®, Schraubendreher. (Quelle: Eigene Aufnahme)

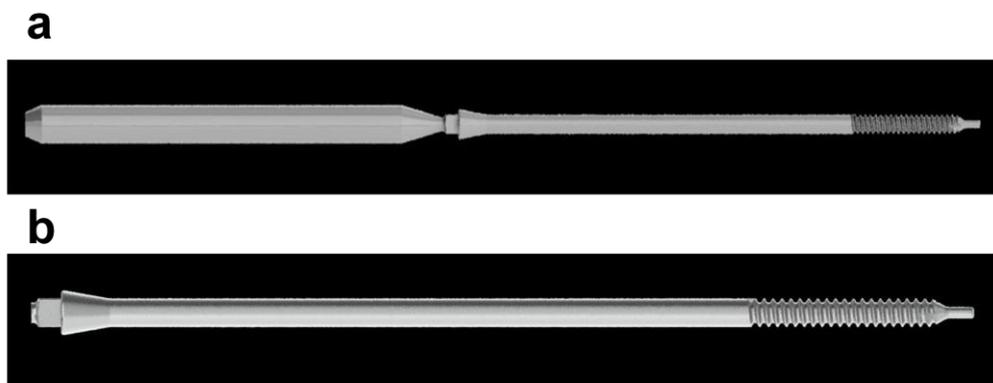
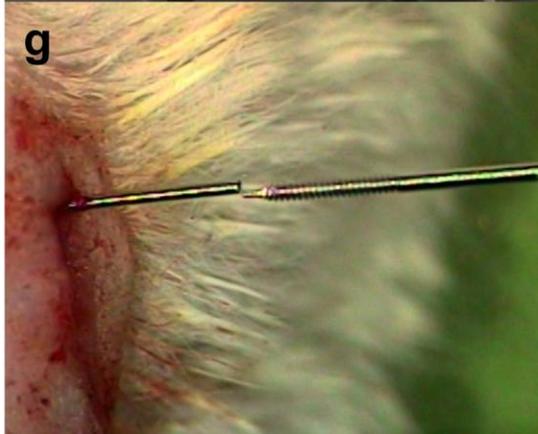
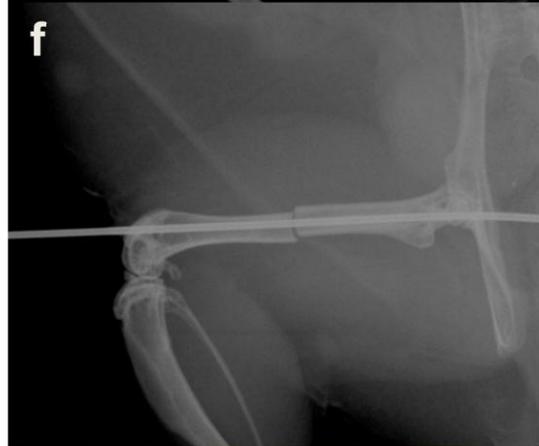
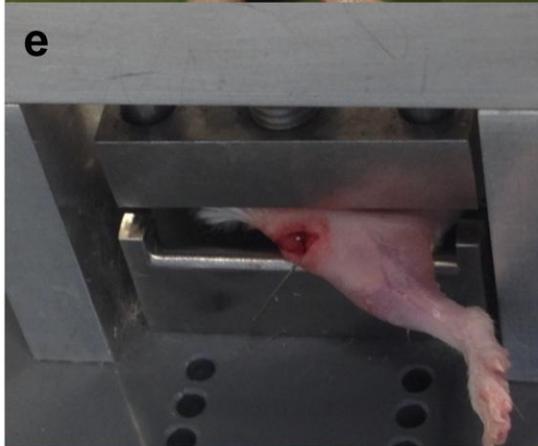


Abbildung 9: MouseScrew®. MouseScrew® mit Halterung für den Schraubendreher (a) sowie nach Entfernung der Halterung durch Diskonnektion an der Sollbruchstelle (b). Zu beachten sind das proximale Gewinde sowie der konische Schraubenkopf, der die Funktion einer Zugschraube ermöglicht. (Quelle: <https://risystem.com/platefixation/mousescrew#&gid=1&pid=1>)



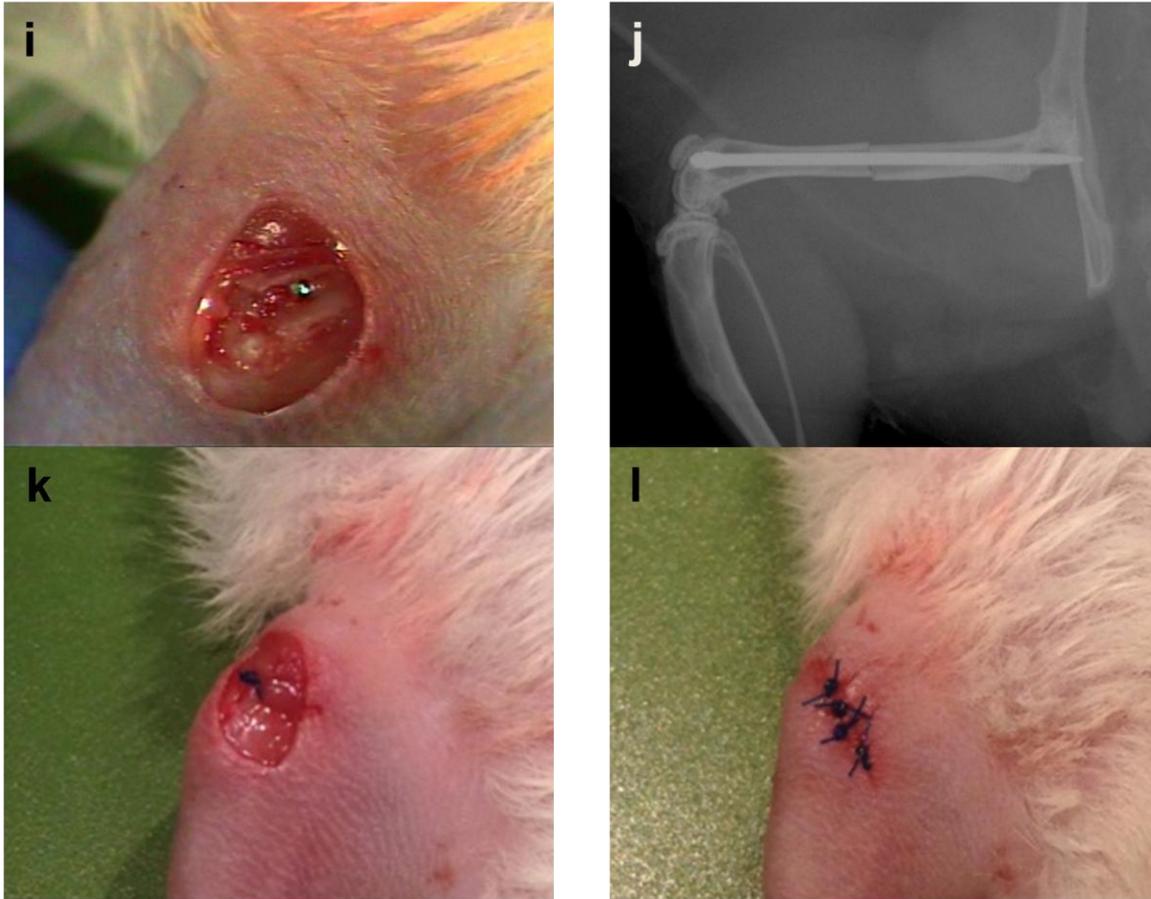


Abbildung 10: Operatonsschritte. Inzision medial der Patella nach Haarentfernung sowie Hautdesinfektion **(a)**. Aufbohrung des proximalen Femurs mittels 27G-Kanüle **(b)**, sodass im nächsten Schritt das Einbringen des Führungsdrahtes möglich wurde **(c)**. Kontrolle der korrekten intramedullären Lage des Führungsdrahtes **(d)** vor Frakturierung des Femurs mittels stumpfer Guillotine **(e)**. Überprüfung der mittodiaphysären Lokalisation des Frakturspalts **(f)**. Konnectieren der Schraubenspitze mit dem Führungsdraht **(g)** und anschließendes Eindrehen der Schraube. Zu sehen ist die eingebrachte Schraube vor **(h)** und nach **(i)** Diskonnektion der Halterung an der Sollbruchstelle. Der Schraubenkonus schließt mit der Knochenoberfläche zwischen den Kondylen ab. Bei korrekter Lage der Schraube in der Röntgenuntersuchung **(j)** konnte die Refixierung der Patella **(k)** und anschließende Hautnaht erfolgen **(l)**. (Quelle: Eigene Aufnahmen)



Abbildung 11: Frakturvorrichtung. Stumpfe Guillotine zur Frakturierung der Femora. (Quelle: Eigene Aufnahme)

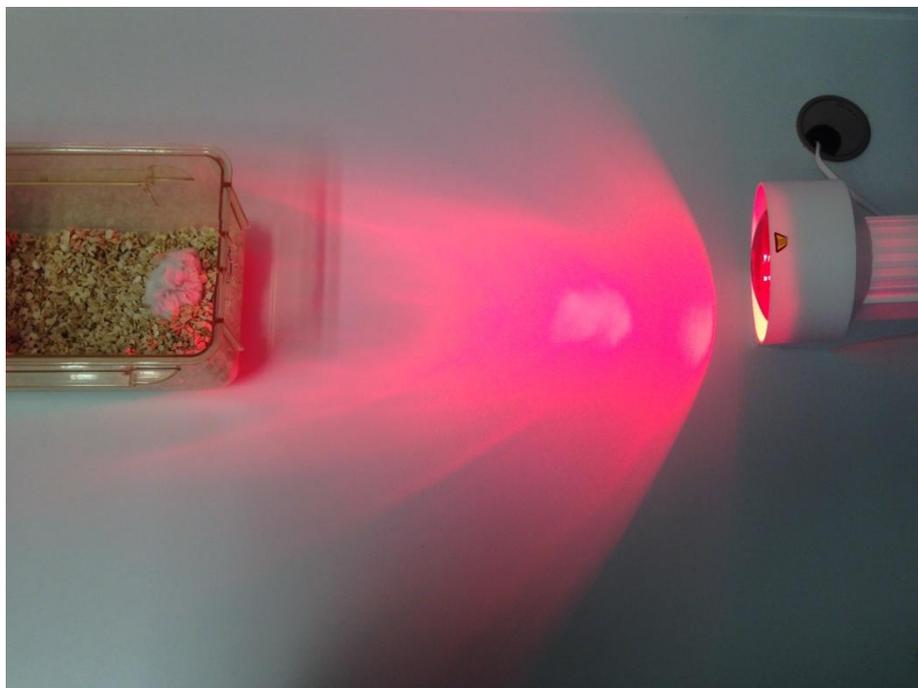


Abbildung 12: Postoperative Überwachung unter der Wärmelampe. (Quelle: Eigene Aufnahme)

3.3 Biomechanik

Die mechanische Stützfunktion stellt eine Hauptaufgabe des Knochengewebes dar. Aus diesem Grund ist die Prüfung der mechanischen Stabilität ein essenzieller Teil der Evaluation der Frakturheilung. Dazu wurde mittels einer Materialprüfmaschine (Mini Zwick Z 2.5, Zwick GmbH, Ulm) die Drei-Punkt-Biegesteifigkeit der Knochen ermittelt (**Abb.13**). Nach einer standardisierten Auftauzeit von fünf Minuten bei Raumtemperatur wurden die Femora mit der ventralen Seite nach oben horizontal auf zwei Auflagepunkten der Messapparatur platziert. Der Abstand der beiden Auflagepunkte betrug 6mm. Anschließend wurde mittels eines Stempels eine Kraft von oben mittig auf den Femurschaft ausgeübt (**Abb. 14**). Die Kraft wurde kontinuierlich gesteigert, wobei sich der Stempel um 1mm/min nach unten bewegte. Die Steigerung der Kraft F auf das Femur wurde dabei durch die Software testXpert V 12.0 gegen die Verformung des Femurs in mm aufgetragen. Die Messung wurde manuell gestoppt, sobald die Abweichung der Verformungskurve von der Linearität mehr als 1% betrug (**Abb. 15**), um so eine zerstörungsfreie Testung zu ermöglichen (Histing et al., 2016; Schoen et al., 2008). Dies ermöglichte eine Reduktion der Versuchstierzahl, da einzelne Knochen für unterschiedliche Untersuchungsmethoden verwendet werden konnten. Die Biegesteifigkeit wurde als die Steigung im linearen Teil der Kurve berechnet (Histing et al., 2009, 2010). Für die Berechnung wurden zwei möglichst weit voneinander entfernte Punkte auf dem linearen Teil der Funktion verwendet. Im Bereich zwischen den beiden Punkten wurde die Änderung der Kraft (ΔF) in Bezug zur Änderung der Verformung (ΔV) gesetzt.

Die Biegesteifigkeit der frakturierten Femora wurde jeweils mit derjenigen der kontralateralen gesunden Femora verglichen. Dazu wurden sowohl absolute Werte als auch die Biegesteifigkeit in Prozent des gesunden Knochens angegeben. Ziel dabei war es, den interindividuellen Unterschieden in der Knochenfestigkeit Rechnung zu tragen und ein größeres Augenmerk auf den reinen Effekt der Frakturheilung zu legen.

Die Knochen wurden während der Messung kontinuierlich mit Kochsalzlösung befeuchtet, um ein Austrocknen zu verhindern.

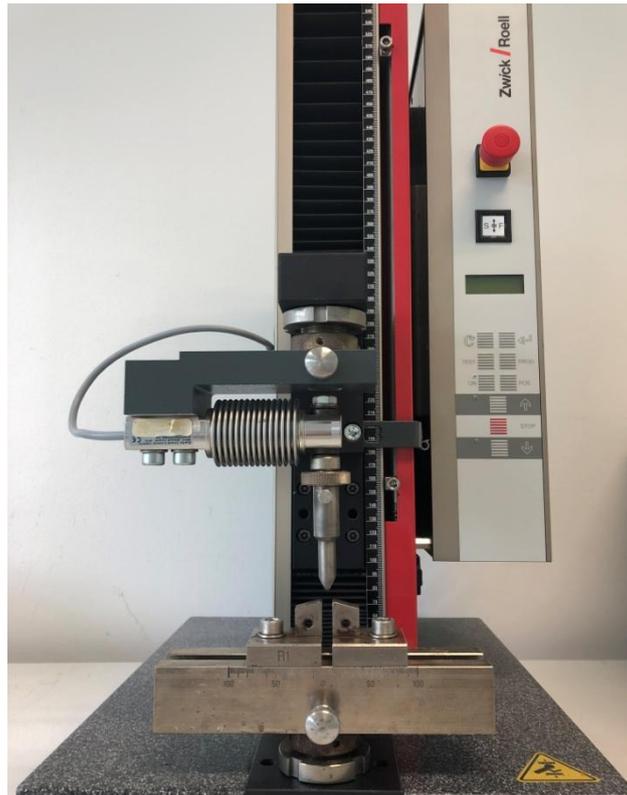


Abbildung 13: Drei-Punkt-Biegevorrichtung. Aufnahme der Vorrichtung zur Drei-Punkt-Biegemessung (Mini Zwick Z 2.5). (Quelle: Eigene Aufnahme)

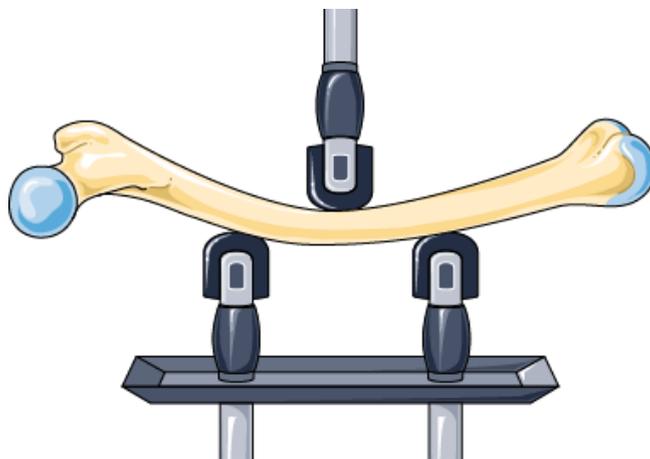


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Drei-Punkt-Biegemessung. (Quelle: Modifiziert nach: https://smart.servier.com/smart_image/compression-test-9/)

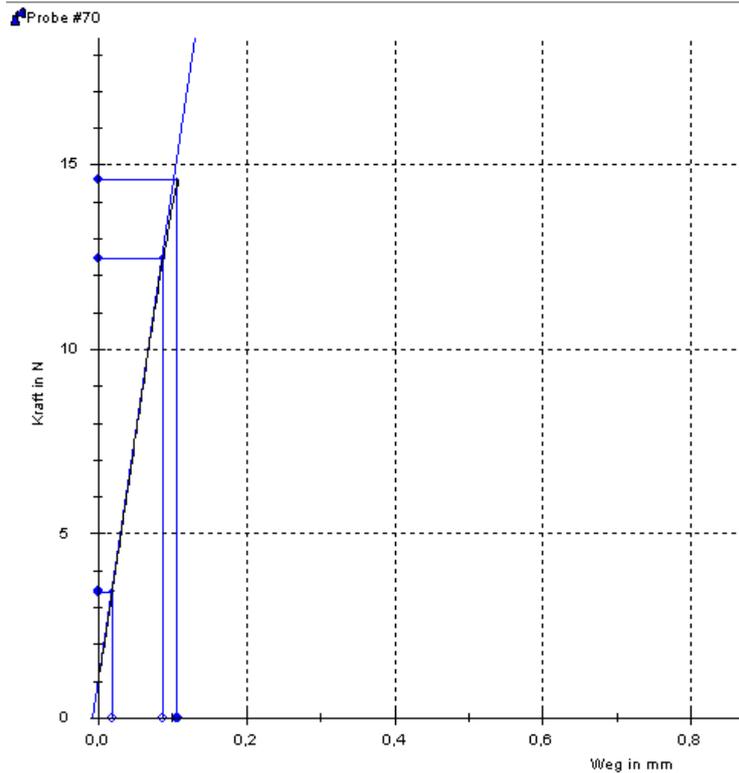


Abbildung 15: Kraft-Weg-Diagramm Drei-Punkt-Biegemessung. Verformung der untersuchten Femora in mm abhängig von der applizierten Kraft. (Quelle: eigene Aufnahme)

3.4 Röntgen

Nach zwei und fünf Wochen wurden die frakturierten Knochen noch einmal radiologisch analysiert. Dazu erfolgte eine seitliche Röntgenaufnahme des frakturierten Femurs in Außenrotationsstellung (Belichtungszeit 10s, Spannung 30kV, Stromstärke 10A, Faxitron MX-20 Cabinet X-ray Systems, Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, Illinois, USA). Die Überbrückung des Frakturspalts wurde anschließend mittels der Klassifikation nach Goldberg eingeteilt. Null Punkte wurden dabei für fehlende knöcherne Durchbauung des Frakturspalts, ein Punkt für eine partielle und zwei Punkte für eine komplette knöcherne Durchbauung des Frakturspalts vergeben (Goldberg et al., 1985).

3.5 Mikro-CT

Zur dreidimensionalen Beurteilung der Kalluszusammensetzung wurden jeweils die frakturierten Knochen nach zwei beziehungsweise fünf Wochen nach vorheriger Entnahme des Implantats in einem Mikro-Computertomographen (Mikro-CT, Skyscan 1172, Bruker, Billerica, MA, USA) gescannt. Die Computertomographie ist eine Technik, bei der aus verschiedenen Winkeln Röntgenbilder einer Probe aufgenommen werden, die dann mathematisch zu Schnittbildern konvertiert werden. Aus diesen Schnittbildern lassen sich wiederum 3D-Bilder rekonstruieren. Dies hat den Vorteil, dass die Mikroarchitektur der

Knochen direkt in ihrer Dreidimensionalität beurteilt werden kann. Die nur näherungsweise Berechnung ausgehend von einzelnen zweidimensionalen Schnitten wird damit hinfällig (bone microCT analysis general handbook, Bruker).

Bei den Einstellungen des Mikro-CTs wurde sich an den Vorschlägen von Bouxsein et al. orientiert (Bouxsein et al., 2010). Zur Akquisition der Bilder wurden die Proben vertikal in eine mit NaCl gefüllte, auf die Größe der Knochen abgestimmte Plastikhalterung des Gerätes gespannt. Der Scan fand bei einer räumlichen Auflösung von $6,5\mu\text{m}$ statt. Die Anodenspannung der Röntgenquelle betrug 100kV , der Stromfluss $100\mu\text{A}$, der Grad der Drehung der Probe zwischen den einzelnen Bildaufnahmen $0,4^\circ$ mit einer Gesamtdrehung von 180° , die Expositionszeit 3500ms . Eine polychromatische Röntgenquelle sendet Strahlung mit unterschiedlichem Energiegehalt aus. Niedrigenergetische Strahlung kann im Verlauf durch die Probe absorbiert werden, wodurch die an der Bildentstehung beteiligte Strahlung sich in ein energiereicheres Spektrum verschiebt. Dieser Beam hardening genannte Effekt ist Ursache für Artefakte. Um das niedrigenergetische Spektrum der Röntgenquelle abzufangen und damit das Phänomen des Beam hardening zu begrenzen, wurde ein $0,5\text{mm}$ -Aluminium-Filter verwendet.

Der so gewonnene Datensatz wurde anschließend zu Schnittbildern rekonstruiert (NRecon Version 1.6.10.6). Dabei wurde gemäß den Empfehlungen der Herstellerfirma (Skyscan Handbuch v25) ein für alle Proben gleichermaßen geltender Bereich der Röntgenhelligkeit festgelegt, in diesem Fall $0 - 0,05$, der anschließend in 256 Graustufen übertragen wurde. Da $0,05$ der höchste gemessene Wert der Röntgenhelligkeit der Proben war, ermöglichte dieser Bereich es, alle relevanten Bildinformationen zu rekonstruieren und damit eine größtmögliche Kontrastierung der fertigen Bilder zu erhalten.

Während der Rekonstruktion wurden verschiedene digitale Werkzeuge verwendet, um die Bildqualität zu verbessern. So wurde die mechanische Ausrichtung durch das sogenannte Post-alignment ausgeglichen und dazu jeweils der vom Computer vorgegebene Korrekturfaktor verwendet. Daneben wurde das Beam-hardening, also die Röntgenabschwächung innerhalb der Probe, teilweise herausgerechnet (Wert: 20%). Ringartefakte wurden ebenfalls korrigiert.

Die rekonstruierten Bilder konnten nun in die Software CTan (Version 1.16.4.1) geladen werden. Dort wurde die Region of Interest (ROI) in einzelnen Schnittbildern von Hand eingezeichnet und teilweise durch den Computer extrapoliert. Sie beinhaltete sämtliches neu geformte Kallusgewebe. Der kortikale Knochen wurde ausgeschlossen, ebenso der durch das Implantat verursachte Bohrkanal (**Abb. 16b**). Um innerhalb der ROI weiter zwischen hoch und niedrig mineralisiertem Knochen zu unterscheiden, wurden in den rekonstruierten 8

Bit-Bildern – resultierend in $2^8 = 256$ möglichen Grauwerten – Helligkeitsschwellenwerte gesetzt. Diese Schwellenwerte sind ursprünglich nach visueller Beurteilung einzelner CT-Bilder und Vergleichen mit histomorphologischen Schnitten entstanden und wurden bereits in mehreren vorausgehenden Studien verwendet (Bosemark et al., 2013; Isaksson et al., 2009; Morgan et al., 2009; Orth et al., 2017). So wurde ein Grauwert zwischen 68 und 97 als niedrig mineralisierter Knochen definiert und Grauwerte von 98 - 255 als hoch mineralisierter Knochen. Der Schwellenwert von 68 - 255, welcher das gesamte Kallusgewebe abbildete, entsprach dabei annähernd auch dem im automatischen Schwellenwertverfahren nach Otsu gefundenen Wert. Insgesamt wurden aus 8-Bit Bildern mit 256 möglichen Graustufen binäre 1-Bit-Bilder, in denen alle Helligkeitswerte innerhalb der Schwellen weiß und der Hintergrund schwarz gefärbt wurden (**Abb. 16c**).

Es erfolgte schließlich innerhalb der ROI die Berechnung von:

- Kallusvolumen
- Knochenanteil
- Anteil hochmineralisierten Knochens
- Anteil niedrigmineralisierten Knochens
- Trabekelanzahl
- Trabekeldicke
- Trabekelabstand

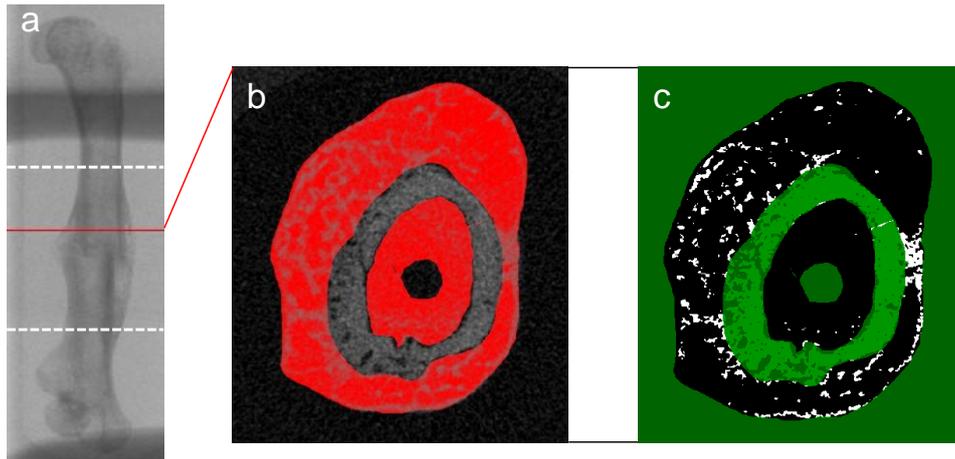


Abbildung 16: Auswertung der CT-Bilder. Repräsentative Röntgen-Übersichtsaufnahme eines frakturierten Femurs nach Explantation der Schraube. Die gestrichelten Linien bilden die Grenzen des Volume of Interest, innerhalb dessen sich das Kallusgewebe befindet (a). Auf Höhe der roten Linie wurde bei einem repräsentativen axialen Schnittbild (b) manuell der periostale und endostale Kallus markiert (Region of Interest (ROI), rote Hervorhebung). Der kortikale Knochen sowie der Bereich des Bohrlochs wurden ausgeschlossen. Durch Berechnungen entsteht aus den 8-Bit-Bildern mit mehreren Graustufen ein binäres 1-Bit-Bild (c). (Quelle: Eigene Aufnahmen)

3.6 Histologie

Nach Testung der Biomechanik und Durchführung der Mikro-CT-Untersuchung wurden die Knochen abschließend weiterhin histologisch analysiert. Dazu wurden jeweils aus dem frakturierten Knochen Schnitte angefertigt und diese mittels Safranin-O-, TRAP- und HE-Färbung sowie einer Antikörperfärbung gegen Osteocalcin eingefärbt.

Die Knochen wurden zunächst über 24 Stunden in Formalin (4% Formaldehyd in isotoner gepufferter Kochsalzlösung) fixiert und anschließend über zwei Wochen in 10% EDTA-Lösung entkalkt. Daraufhin wurden die Knochen in eine Histokinette zur Gewebeeinbettung verbracht. Die Proben wurden in verschiedene Behälter gelegt, in denen jeweils unterschiedliche Flüssigkeiten über je eine Stunde auf sie einwirken konnten. Die Behälter waren nacheinander mit Leitungswasser sowie einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70%, 80%, 90% und dreimal 100% Ethanol zur Entwässerung gefüllt. Abschließend folgte ein dreimaliges Bad in Xylol, um den Alkohol zu entfernen und das Gewebe paraffingängig zu machen. Auf diese Art vorbereitet, konnten die Knochen nun viermal eine Stunde in flüssiges Paraffin gegeben werden. Dort wurden sie mithilfe einer Einbettkassette von Paraffin durchtränkt. Die paraffinierten Knochen wurden dann in einer Ausgießform in einen Paraffinblock eingegossen und anschließend zum Zwecke der Aushärtung auf eine Kühlplatte gegeben. Aus dem ausgehärteten Block konnten im weiteren Verlauf die einzelnen Schnitte gefertigt werden. Dazu wurde das Rotationsmikrotom Leica RM 2265 verwendet, wobei eine Schnittdicke von 2µm eingestellt wurde. Die einzelnen

Gewebeschnitte wurden zunächst zur Glättung in ein Wasserbad gegeben und dann auf einen Objektträger aufgebracht. Die auf dem Objektträger befindlichen Schnitte wurden abschließend über Nacht bei 60°C im Wärmeschrank zur Trocknung aufbewahrt und standen damit zur Färbung bereit. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden immer Schnitte verwendet, die sich möglichst genau in der Mitte des Knochens befanden. Dabei diente der Bohrkanal durch die MouseScrew© als Anhaltspunkt, der, wenn möglich, in seiner ganzen Länge auf dem Schnitt zu sehen sein sollte. Die TRAP-Färbung für einen Knochen wurde immer im Folgeschnitt des für die Safranin-O-Färbung vorgesehenen Schnittes durchgeführt. Vor dem Einstellen der einzelnen Schnitte in die Färbelösungen musste das Paraffin mittels Xylol über zweimal fünf Minuten wieder herausgelöst werden, um eine Aufnahme der wässrigen Lösungen zu gewährleisten. Zum Zwecke der Rehydrierung wurden die Proben außerdem in eine absteigende Alkoholreihe (100% Ethanol für zweimal drei Minuten, 90, 80 und 70% Ethanol jeweils für drei Minuten) und schließlich über fünf Minuten in ein Wasserbad (A. dest.) getaucht.

3.6.1 Safranin O

Zur Fertigung der Safranin-O-Färbung wurden die Schnitte zunächst eine Minute mit Eisenhämatoxylin nach Weigert behandelt. Nach einer anschließenden Spülung mit Aqua dest. wurde die Anfärbung in einer dreiprozentigen Salzsäure-Ethanol-Lösung differenziert, das heißt unspezifische Farbreste herausgelöst. Über fünf Minuten wurde der Schnitt dann in Leitungswasser gebläut, um anschließend noch einmal mit Aqua dest. abgespült zu werden. Der Farbstoff Fast Green 0,02% (Merck, Darmstadt, Deutschland) musste über einen Zeitraum von vier Minuten einwirken gelassen werden. Überschüssige Farbe wurde mit 1% Essigsäure entfernt. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit 0,1% Safranin O über fünf Minuten. Die Schnitte wurden am Ende in einer aufsteigenden Alkoholreihe ab 90% Ethanol entwässert. Der Alkohol wiederum wurde im Xylol-Bad entfernt und die fertig gefärbten Schnitte eingedeckt.

Eisenhämatoxylin nach Weigert (Hersteller: VWR International, Radnor, USA) setzt sich zusammen aus:

- 1g Hämatoxylin in 100 ml Ethanol
- 2,48 g Eisenchlorid-Hexahydrat in 100 ml A. dest.
- 1 ml Salzsäure (HCl)

3.6.2 TRAP

Die Tartrate-resistant-acid-phosphatase (TRAP)-Färbung ist ein etabliertes Verfahren zum Nachweis reifer Osteoklasten (Lacey et al., 1998; Roodman, 1996). Zur Anfärbung der

Osteoklasten musste zunächst die TRAP-Färbelösung hergestellt werden. Diese Lösung besteht aus:

- TRAP Basic Inkubationsmedium: 200ml
- Fast Red Violet LB salt (Sigma: F-3381): 120mg
- Naphtol AS-MX Phosphat Substrat Mix: 1ml

Das TRAP Basic Inkubationsmedium wiederum setzt sich zusammen aus:

- Natrium acetat anhydrous (Sigma: S-2889): 9,2g
- Natrium tartrat dibasic dihydrat: 11,4g
- Aqua dest.: 950ml
- Eisessig: 2,8ml

Das Inkubationsmedium wurde mittels NaOH oder Eisessig auf einen pH-Wert von 4,8-5 eingestellt und dann mit Aqua dest. auf eine Gesamtmenge von einem Liter verdünnt. Das Medium war dann für circa sechs Monate haltbar.

Der Naphtol AS-MX Phosphat Substrat Mix besteht aus:

- Naphtol AS-MX Phosphat (Sigma: N-4875): 20mg
- 2-Ethoxyethanol (Roth: 5127.3): 1ml

Die Färbelösung wurde jeweils frisch angesetzt und zu Beginn im Wasserbad bei 37°C vorgewärmt. Die Schnitte wurden anschließend entparaffiniert und in Aqua dest. gebracht. Das entparaffinierte Gewebe wurde dann in die Farblösung eingestellt und bei 37°C über 45 Minuten inkubiert. Überschüssige Farbe wurde im Anschluss mit Aqua dest. abgespült. Es erfolgte daraufhin eine Kernfärbung mit Hämalaun nach Meyer (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Schnitte wurden schließlich mittels Glyceringelatine und eines Deckglases abgedeckt.

3.6.3 Osteocalcin

Osteocalcin ist das häufigste non-kollagenöse Protein der Knochenmatrix und hemmt die Knochenbildung (Ducy et al., 1996). Da Osteocalcin nur in ausdifferenzierten Osteoblasten exprimiert wird (Ducy, 2000), eignet es sich zum Nachweis dieser Zellen. Als Marker der Osteogenese zeigt es maximale Expressionslevel in einem Zeitraum von Tag 14 bis Tag 21 nach Fraktur (Cho et al., 2002).

Zur Durchführung der Antikörperfärbung gegen Osteocalcin wurden analog zu den weiteren vorgenommenen Färbungen Paraffinschnitte gefertigt, die anschließend entparaffiniert und rehydriert wurden. Um eine möglichst gute Bindung der Antikörper zu gewährleisten, wurden die Schnitte anschließend zunächst zur Epitopdemaskierung in Citracon-Puffer (pH 7,4) im Brutschrank bei 60°C für 17 Stunden eingestellt. Anschließend erfolgte nacheinander eine

Spülung mit A. dest. sowie Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Mithilfe eines dreiprozentigen Ziegenserums in PBS über 30 Minuten sollten unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers vermieden werden. Daraufhin wurde der Primärantikörper (Osteocalcin 1:200 verdünnt in PBS) aufgetragen und die Schnitte über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte eine 10-minütige Spülung mit PBS, bevor der Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen-Biotin) aufgetragen wurde, woraufhin wiederum eine Inkubation bei Raumtemperatur über 60 Minuten folgte. Nach nochmaligem Spülen mit PBS wurde eine Streptavidin-Peroxidase über 15 Minuten einwirken gelassen, bevor abermals mit PBS gespült wurde. Nach dem Auftragen von Chromogen AEC wurde mit A. dest. gespült, bevor eine Kernfärbung mit Hämalaun nach Mayer über fünf Sekunden erfolgte. Nach abschließender Spülung abwechselnd mit A. dest. und Leitungswasser, wurden die Schnitte schließlich mit Glyceringelatine eingedeckt.

3.6.4 HE

Zur Fertigung der HE-Färbung wurden die einzelnen Schnitte nach Entparaffinierung über drei Minuten in Hämatoxilin nach Böhmer inkubiert. Diese Färbelösung besteht aus zwei Bestandteilen:

- Lösung A: 1,0 g Hämatoxilin in 10 ml Ethanol
- Lösung B: 20 g Kaliumaluminiumsulfat in 200 ml warmem A. dest. gelöst, anschließend Filtrierung der erkalteten Lösung

Zur Reifung beziehungsweise Oxidation wurden beide Lösungen gemischt und einige Tage an der offenen Luft stehen gelassen.

Im Anschluss an das Hämatoxilin-Bad wurden die Schnitte mit A. dest. gespült und in einer Salzsäure-Ethanol-Lösung über drei bis fünf Minuten differenziert. Nach abermaliger Spülung erfolgte eine Färbung mit Eosin über 30 Sekunden. Abschließend wurden überschüssige Farbreste noch einmal abgespült, bevor die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe und Xylolbad entwässert und schließlich eingedeckt werden konnten.

3.6.5 Auswertung

Die Auswertung der Safranin-Schnitte erfolgte bei einer Vergrößerung von 12,5x (Olympus BX60 Mikroskop, Olympus, Tokyo, Japan). Die Bilder wurden zunächst mittels der Software Zeiss Axio Cam und Axio Vision 3.1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) digitalisiert. Innerhalb der Bilder wurden mithilfe der Bildauswertungssoftware ImageJ (ImageJ Analysis System, NIH, Bethesda, MD, USA) folgende Werte gemessen:

Tabelle 1: Messwerte histologische Kallusanalyse.

Messwert	Englische Bezeichnung	Abkürzung	Einheit
Femurdurchmesser auf Höhe des Frakturspaltes	Bone diametre	BDm	[mm]
Maximaler Kallusdurchmesser senkrecht zur Kortikalis	Callus diametre	CDm	[mm]
Gesamte periostale Kallusfläche	Callus Area	CAr	[mm ²]
Ossäre Kallusfläche	Total Osseous Tissue Area	TOTAr	[mm ²]
Fläche Lamellärer Knochen	Lamellar Bone Area	LBAr	[mm ²]
Fläche Spongöser Knochen	Woven Bone Area	WBAr	[mm ²]
Kartilaginöse Kallusfläche	Cartilage Area	CgAr	[mm ²]
Fibröse Kallusfläche	Fibrous Tissue Area	FTAr	[mm ²]

Aus diesen Werten konnten im Anschluss strukturelle Indizes modifiziert nach Vorschlägen von Gerstenfeld et al. (Gerstenfeld et al., 2005), basierend auf einer Empfehlung der American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR) (Parfitt et al., 1987) berechnet werden:

Tabelle 2: Berechnete Werte Kallusanalyse.

Berechnete Werte	Abkürzung	Einheit
Kallusfläche gesamt / Femurdurchmesser	CAr / BDm	[mm]
Kallusdruchmesser / Femurdurchmesser	CDm / BDm	[mm]
Ossäre Kallusfläche / Kallusfläche gesamt	TOTAr / CAr	[%]
Fläche Lamellärer Knochen / Ossäre Kallusfläche	LBAr / TOTAr	[%]
Fläche Spongöser Knochen / Ossäre Kallusfläche	WBAr / TOTAr	[%]
Kartilaginöse Kallusfläche / Kallusfläche gesamt	CgAr / CAr	[%]
Fibröse Kallusfläche / Kallusfläche gesamt	FTAr / CAr	[%]

Die mittels TRAP-Färbung behandelten Schnitte wurden bei 400-facher Vergrößerung ebenfalls nach zwei und fünf Wochen im Mikroskop betrachtet und digitalisiert. Dazu wurden innerhalb des Kallusgewebes sogenannte High-Power-Fields (HPFs) definiert (modifiziert nach Histing et al., 2012). In den Knochen der Zwei-Wochen-Tiere wurden jeweils 10 HPFs festgelegt, wobei fünf HPFs auf jeder Seite der Kortikalis im periostalen Kallus gewählt wurden. Davon befand sich jeweils ein HPF auf Höhe des Frakturspalts an der Grenze des kortikalen Knochens zum Kallus und zwei auf jeder Seite jeweils an den proximalen und distalen Übergängen des Kallus in den kortikalen Knochen. Die verbliebenen zwei HPFs waren mittig im Kallusgewebe gelegen. Aufgrund der geringeren Größe des periostalen Kallus nach fünf Wochen wurden zu diesem Zeitpunkt nur drei HPFs auf jeder Seite des Knochens gewählt, entsprechend einer Gesamtzahl von sechs HPFs.

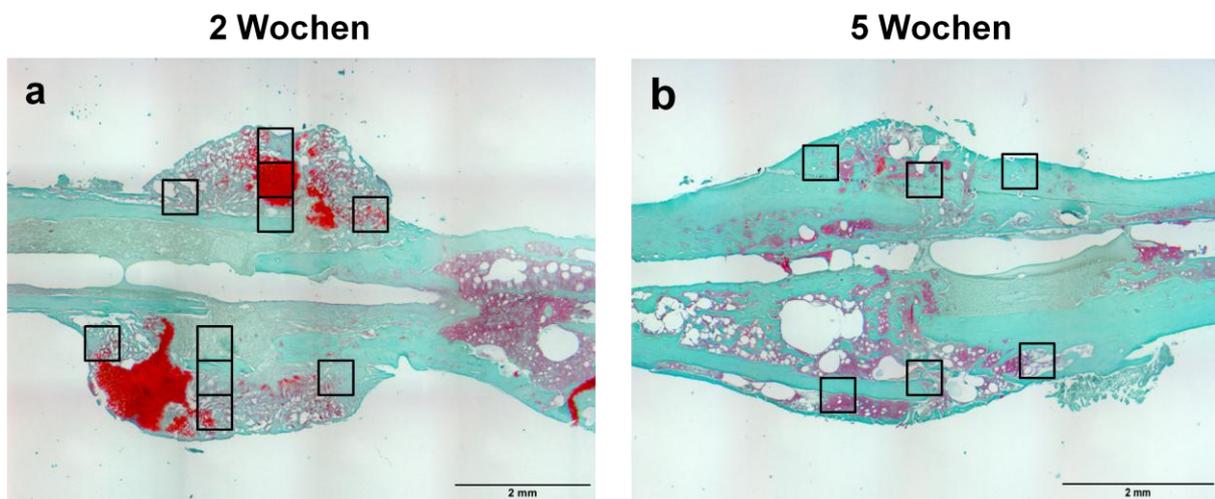


Abbildung 17: Lokalisation der High-Power-Fields. Repräsentative Übersicht der Lokalisation der High-Power-Fields (HPFs) nach zwei Wochen mit jeweils fünf HPFs auf jeder Seite des periostalen Kallus (**a**) und nach fünf Wochen mit je drei HPFs innerhalb des periostalen Kallusgewebes (**b**). (Quelle: Eigene Aufnahmen)

Es wurden jeweils TRAP-positive Zellen mit drei oder mehr Zellkernen gezählt und als Osteoklasten definiert. Die Ergebnisse wurden als Zellen pro HPF angegeben. Auf eine Unterscheidung zwischen Osteoklasten in kartilaginösem und ossärem Gewebe wurde verzichtet.

In den mit Antikörpern gegen Osteocalcin sowie mittels HE-Färbung gefärbten Schnitten wurden ebenfalls High-Power-Fields definiert. In diesem Fall wurden dazu im Längsschnitt insgesamt vier Bereiche innerhalb des Frakturkallus, davon jeweils zwei auf jeder Seite der Kortikalis, gewählt.

Zur Untersuchung der Osteocalcinexpression wurde anschließend innerhalb der HPFs der Flächenanteil gegen Osteocalcin gefärbter Matrix bestimmt. Zusätzlich dazu wurde die Zahl Osteocalcin-positiver Zellen, welche als Osteoblasten definiert wurden, ausgewertet.

Die HE-Färbung diente dem Nachweis der Vaskularisation des Frakturkallus. Hierzu wurden innerhalb der festgelegten HPFs die vorhandenen Gefäße ausgezählt.

3.7 Western Blot

Der Western Blot stellt ein Verfahren zur semiquantitativen Bestimmung von Proteinen dar. Dabei werden Proteine zunächst mittels Gelelektrophorese in einem Polyacrylamidgel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt (sogenanntes SDS-Page, PAGE= Polyacrylamidgel-Elektrophorese), sodass einzelne Proteinbanden entstehen. Diese Proteinbanden werden dann in einem zweiten Schritt mittels eines senkrecht zum Gel stehenden elektrischen Feldes auf eine Membran übertragen. Dort bleiben sie aufgrund molekularer Wechselwirkungen haften und sind für die Bindung detektierender Antikörper zugänglich. Meist erfolgt an einen ersten primären Antikörper die Bindung eines zweiten sekundären Antikörpers, welcher mit einem Enzym gekoppelt ist. Dieses Enzym setzt daraufhin ein Substrat um und sorgt für eine Lichtemission, die anschließend detektiert werden kann. Als interne Kontrolle dient β -Actin, welches als ubiquitär vorhandenes Protein des Zytoskeletts als Proteinkonzentrationsstandard verwendet wird.

Zur Durchführung des Western-Blot-Verfahrens wurde bei je sechs Tieren der Behandlungs- sowie der Kontrollgruppe nach einem Zeitraum von zwei Wochen das frakturierte Femur entnommen. Dieses wurde vorsichtig von umgebendem Muskel- und Bindegewebe befreit. Daraufhin wurde der periostale Kallus vom kortikalen Knochen abgeschabt und die Probe ohne Zeitverlust in ein mit Lyse-Puffer (10mM NaCl, 0,1mM EDTA, 0,5% Triton X 100, 0,02% NaN_3 , 0,2mM PMSF, 10mM Tris, pH 7,5; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland; Protease-Inhibitor-Mischung P8340, 1:100-Verdünnung; Sigma-Aldrich) gefülltes Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf Tube®, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gegeben. In diesem Gefäß wurde sie durch Gabe in flüssigen Stickstoff tiefgefroren und bis zum Zeitpunkt der Analyse bei einer Temperatur von -80°C konserviert. Zur weiteren Bearbeitung wurde das Kallusgewebe anschließend im Homogenisator (Micra D-1/Pico DS-5, Micra, Heitersheim, Deutschland) mechanisch zerkleinert und die Proteine durch 20-sekündiges Einwirken eines Lyse-Puffers (80 μg , 10mM NaCl, 0,1mM EDTA, 0,5% Triton X 100, 0,02% NaN_3 , 0,2mM PMSF, 10mM Tris, pH 7,5; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland; Protease-Inhibitor-Mischung P8340, 1:100 Verdünnung; Sigma-Aldrich) sowohl aus dem Zytosol als auch aus dem Kern der Zellen herausgelöst. Daneben enthält der Lyse-Puffer Detergentien sowie Proteaseinhibitoren, deren Aufgabe es ist, aus den Zellen freigesetzte Proteasen am Abbau

der Proteine zu hindern. Die homogenisierten Proben wurden daraufhin 30 Minuten lang auf Eis inkubiert, um eine optimale Freisetzung der Proteine zu gewährleisten. Eine 30-minütige Zentrifugation bei 4°C und 13000U/min (16000 G) (Heraeus Fresco 21, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland) führte dazu, dass sich am Boden des Gefäßes Zelltrümmer sammelten, während das herausgelöste Nativprotein in Lösung verblieb. Diese Überstände wurde abpipettiert und die Proteine durch die nach Hartree (1972) modifizierte Methode nach Lowry et al. (1951) farblich proportional zur Proteinkonzentration sichtbar gemacht. So konnte die Gesamtproteinmenge im Photometer (595 nm; GeneQuant pro, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) gemessen werden. Durch Verdünnung mit Aqua dest. wurde die Proteinkonzentration in den verschiedenen Proben angeglichen.

Die Denaturierung der Proteine erfolgte durch Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) fünf Minuten im kochenden Wasserbad. Dieser Puffer setzt sich zusammen aus 125mM TRIS, 20% Glycin, 10% β -Mercaptoethanol, 0,004% Bromphenolblau und 4% SDS (anionisches denaturierendes Detergenz Natriumdodecylsulfat) (Sigma-Aldrich).

Schwefelbrückenspaltende Thiolreagenzien entfalten Proteine. SDS (Natriumdodecylsulfat) umhüllt als anionisches Detergenz die entfaltenen Proteine und sorgt dafür, dass sie ihrer nun negativen Ladung entsprechend während der Gelelektrophorese zum positiven Pol wandern. Die Ladung ist dabei proportional zur Masse der Proteine, wodurch diese ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden können.

Nach der Denaturierung wurden die Proben auf Eis abkühlen gelassen und nochmals zentrifugiert, um den Verlust des durch den Kochvorgang gebildeten Kondenswassers zu vermeiden. Dies hätte andernfalls eine Änderung der Verdünnung zur Folge gehabt. Insgesamt dienen diese Schritte zur Konservierung der Proteinextrakte, welche anschließend bei -20°C tiefgefroren wurde.

Die Gele wurden in einem vertikalen Gießstand nach Anleitung des Herstellers (Bio-Rad Laboratories) gegossen. Die Apparatur besteht aus zwei aufrechten Glasplatten, die nach unten hin mit einem Kissen abgedichtet sind. Es wurde zunächst das Trenngel und dann das Sammelgel gegossen. Eventuell vorhandene Fettreste auf dem Glas wurden dazu mit Alkohol entfernt. Daraufhin wurde die Trenngellösung bestehend aus Wasser, Acrylamid, TRIS-Puffer, SDS, Ammoniumsulfat und TEMED (**Tab. 3**) zwischen die in der Gießvorrichtung eingespannten Glasplatten pipettiert. Acrylamid bildet dabei die Netzbasis des späteren Gels, während der TRIS-Puffer als pH-Wert-Puffer benötigt wird, um den pH-Wert des Mediums konstant zu halten, da die Ladung der Proteine sich mit dem pH-Wert ändert. TEMED startet die Polymerisation des Gels durch Interaktion mit Ammoniumsulfat. Eine Schicht aus Alkohol wurde vorsichtig über das Trenngelgemisch gegeben. Dies dient

dazu, die Reaktion luftdicht nach oben hin abzuschließen, dadurch eine Hemmung der Polymerisation durch den Luftsauerstoff zu verhindern, sowie eine glatte Abschlussfläche zwischen Trenngel und Sammelgel zu erreichen. Nach einer Wartezeit von circa 30 Minuten bis zur Aushärtung des Trenngels konnte das Sammelgel gegossen werden. Dazu wurde der Alkohol über dem Trenngel mit einem Filterpapier vorsichtig abgesaugt, um das Sammelgel zwischen die Glasplatten einfüllen zu können. Das Sammelgel besteht im Wesentlichen aus denselben Zutaten wie das Trenngel, es wurde jedoch ein anderer TRIS-Puffer verwendet, wodurch das Gel eine andere Struktur erhält. In die flüssige Sammelgellösung wurde ein Teflonkamm (10 Zähne) zentriert eingesteckt, um so die Geltaschen für die spätere Beladung zu formen. Nach Aushärtung des Sammelgels war der Aufbau nach ca. einer Stunde zur Western-Blot-Analyse verwendbar, konnte jedoch auch bis zur Analyse gekühlt werden. Die Geltaschen wurden mit einem Marker, bestehend aus einer Proteinmischung mit bekannten Molekulargewichten (10µl, Protein-Marker IV, Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) und ansonsten jeweils mit 20µg der zu untersuchenden Proteine beladen.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels. Gegossen nach Anleitung des Herstellers (Bio-Rad Laboratories), Angaben in ml.

Bestandteile	Sammelgel	Trenngel
30 % Acrylamid/ N,N'-Methylenbisacrylamid	0,67	3,3
Sammelgelpuffer (Tris 1 M, pH 6,8)	0,5	-
Trenngelpuffer (Tris 1,5 M, pH 8,8)	-	2,5
A. dest.	2,7	4,0
10 % Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,04	0,1
10 % Ammoniumpersulfat	0,04	0,1
Tetramethylethylendiamin	0,02	0,02

Um die Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Mini-Protean II, Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland) zunächst eine niedrige Spannung (100 Volt für 15 Minuten) zur Konzentration der Proteine im Sammelgel angelegt. Zur eigentlichen Trennung der Proteine wurde diese Spannung im

Verlauf auf 140 Volt während einer Stunde erhöht (Power Pac 200, Bio-Rad Laboratories). Die Separation der Proteine wurde beendet, sobald die Bande des blau gefärbten Proteinmolekulargewichtsstandard das untere Ende des Gels erreicht hatte. Während der gesamten Elektrophorese befanden sich die Gele in einem TRIS/Glycin-Puffer (960mM Glycin, 0,5% SDS, 125mM Tris, pH 8,3; Carl Roth). Nach Beendigung der Auftrennung konnte dieser Puffer abgegossen und die Elektrophoresekammer geöffnet werden. Das Sammelgel wurde abgetrennt und das verbleibende Gel von der Glasplatte getrennt und in einem Transferpuffer (10% Methanol, 39mM Glycin, 48mM Tris, pH 9,2; Carl Roth) äquilibriert.

Die nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine sollten nun auf eine Membran verbracht werden, um dort das Ergebnis der Elektrophorese abbilden zu können und gleichzeitig eine Bindung proteinspezifischer Antikörper zu ermöglichen. In dieser Studie wurde das semi-dry-Verfahren für den elektrophoretischen Transfer der Proteine gewählt. Dazu wurden die Membranen aus Polyvinyliden-Difluorid (PVDF) (Porengröße 0,2µm, Bio-Rad Laboratories) zum Ausgleich der Oberflächenladung im Methanolbad über 20 Sekunden aktiviert, das heißt entladen und damit hydrophob gemacht, um die Proteinbindung zu erleichtern. Anschließend wurden die Membranen sofort mit Aqua dest. abgespült und in dem Puffer, in dem später der Proteintransfer stattfinden würde, 10 Minuten äquilibriert, um sich dessen Milieu anzupassen. Auch das Filterpapier wurde zunächst in Transferpuffer getränkt (semi-dry). Anschließend wurden die Membranen in die Elektrophoresekassette gegeben. Das Gel wurde nochmals gespült und dann auf die Membran gelegt. Darüber wurde eine weitere Schicht Filterpapier gegeben und vorhandene Luftblasen vorsichtig herausgerollt. Die so gefüllte Kassette wurde verschlossen und in die Blotkammer, eine Schublade mit flächigen Elektroden (Trans-Blot-Turbo Transfer-System, Bio-Rad Laboratories), gegeben. Dabei wurde die Kassette so ausgerichtet, dass der angelegte Strom einen Transfer der Proteine von Gel zu PVDF-Membran ermöglichte. Am Gerät wurde die Stromstärke eingestellt, die Spannung von 25 Volt resultierte aus der Stromstärke. Der Vorgang wurde nach sieben Minuten beendet.

Nach dem sogenannten Blotting wurden die mit Protein beladenen Membranen aus der Kassette entnommen und über Nacht bei 4°C in einem TBS-T-Puffer (1% NaCl, 0,01% Polysorbat 20, 10mM Tris, pH 7,5; Carl Roth) zum Entfernen von Transferpuffer und zur Gewöhnung an die nächste Phase eingelagert. Um im darauffolgenden Schritt eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurden freie Proteinbindungsstellen der Probe mit entfetteter Trockenmilch (5% blotting grade non-fat dry milk, Bio-Rad Laboratories) über 30 Minuten blockiert. Gleichzeitig schafft die Milch ein günstiges Milieu für Antikörper und erhält die Proteine. Anschließend wurde die Membran mit Aqua dest. abgespült und auf

einem Horizontalschüttler gelagert. Dort konnte die Beladung mit den folgenden primären Antikörpern und deren Inkubation bei 4°C erfolgen:

Tabelle 4: Primärantikörper Western Blot.

Antikörper	Verdünnung	Ursprungsspezies	Hersteller
BMP2/4	1:50	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
CYR61	1:25	Ziege	Santa Cruz
VEGF	1:25	Kaninchen	Santa Cruz
PCNA	1:1000	Maus	DAKO, Glostrup, Dänemark
CD31	1:300	Ratte	Dianova, Hamburg, Deutschland
OPG	1:100	Kaninchen	Bioss Antibodies, Woburn, USA
RANKL	1:50	Kaninchen	Abcam, Cambridge, England
Kollagen 2	1:100	Kaninchen	Bioss
Kollagen 10	1:100	Kaninchen	Bioss
β-Actin	1:5000	Maus	Sigma-Aldrich

Die mit den Antikörpern gegen BMP2/4, CYR61 und VEGF beladenen Proben wurden im Anschluss noch einmal über vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, sämtliche weiteren Proben über dieselbe Zeitspanne bei 4°C im Kühlschrank. Nachdem die primären Antikörper ausreichend gebunden hatten, konnte die Beladung mit den sekundären Antikörpern, die jeweils mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt waren, durchgeführt werden:

Tabelle 5: Sekundärantikörper Western Blot.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Ziege-anti-Kaninchen-IgG-POD	1:1000	R&D Systems, Minneapolis, USA
Ziege-anti-Maus-IgG-POD	1:1500	DAKO
Kaninchen-anti-Ziege-IgG-POD	1:1000	DAKO
Kaninchen-anti-Ratte-IgG-POD	1:1000	DAKO

Die Inkubation der Antikörper erfolgte jeweils über 90 Minuten. Dann wurde fünfmal fünf Minuten lang mit TBS-T-Puffer gewaschen, um ungebundene Antikörper mit Peroxidase zu

entfernen, damit nur die Peroxidase an gebundenem Antikörper reagieren kann. Die Membranen wurden abschließend mit einem Luminol-basierten Reagenz (ECL, GE Healthcare, Amersham, UK) inkubiert. Die Quantifizierung der Proteine erfolgte durch photometrische Messung der emittierten Photonen im Intas ECL Chemocam Imager (Intas Science Imaging Instrument GmbH, Göttingen, Germany). Die Intensität der einzelnen Proteinbanden wurde mittels des Analyseprogramms Lab Image 1 D Intas 2340 (Intas Science Imaging Instruments) als Integral aufaddiert und die ermittelten Werte entsprechend der Intensität der korrespondierenden β -Actin-Bande korrigiert.

3.8 Statistik

Die Daten wurden mithilfe der Programme Microsoft Excel und Sigma Plot 13 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) analysiert. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (Standard error of the mean, SEM) angegeben. Alle Daten wurden zunächst auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk) und gleiche Varianzen (Brown-Forsythe) hin überprüft. Zur Testung, ob Unterschiede zwischen zwei Gruppen signifikant waren, wurde ein zweiseitiger ungepaarter Student's t-Test durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Daten wurde ein Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Die Differenz wurde dabei ab einem p -Wert $<0,05$ als signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Postoperativer Verlauf

Unmittelbar nach der Operation wurden alle Mäuse unter einer Wärmelampe bis zur vollständigen Wiedererlangung des Bewusstseins überwacht. In der Mehrzahl der Fälle zeigte sich in den ersten postoperativen Tagen ein Entlastungshinken, das in aller Regel nach zwei bis drei Tagen einem physiologischen Gangbild wich. In allen Gruppen fand ein leichter Gewichtsverlust statt, welcher jedoch in keinem Fall zum Abbruch des Experiments führte. Ein zuvor festgelegtes Abbruchkriterium war ein Gewichtsverlust von >20% des Ausgangsgewichts. Dagegen musste in einigen Fällen die Untersuchung aufgrund einer Dislokation des Implantats abgebrochen werden. Dies trat bei vier Tieren der Diclofenac-gruppe sowie einem Tier der Kontrollgruppe auf. Zudem verstarben vier Tiere in Narkose und drei weitere in der ersten postoperativen Woche.

Tabelle 6: Verteilung der Versuchstiere auf die einzelnen Untersuchungsgruppen.

	2 Wochen		5 Wochen	
	Kontrolle	Diclofenac	Kontrolle	Diclofenac
Biomechanik	n = 12	n = 15	n = 11	n = 12
Röntgen	n = 12	n = 15	n = 11	n = 12
CT	n = 12	n = 13	n = 11	n = 12
Histologie	n = 12	n = 14	n = 11	n = 12
Western Blot	n = 6	n = 6		
Gesamt	n = 18	n = 21	n = 11	n = 12

4.2 Biomechanik

Die biomechanischen Eigenschaften der Knochen wurden mittels Drei-Punkt-Biegemessung erfasst. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Diclofenac- und der Kontrollgruppe nach zwei Wochen. Dagegen war nach fünf Wochen die Biegesteifigkeit bei den mit Diclofenac behandelten Tieren signifikant vermindert. Auch die prozentuale Biegesteifigkeit im Bezug zum gesunden kontralateralen Knochen war signifikant vermindert (**Abb. 18**).

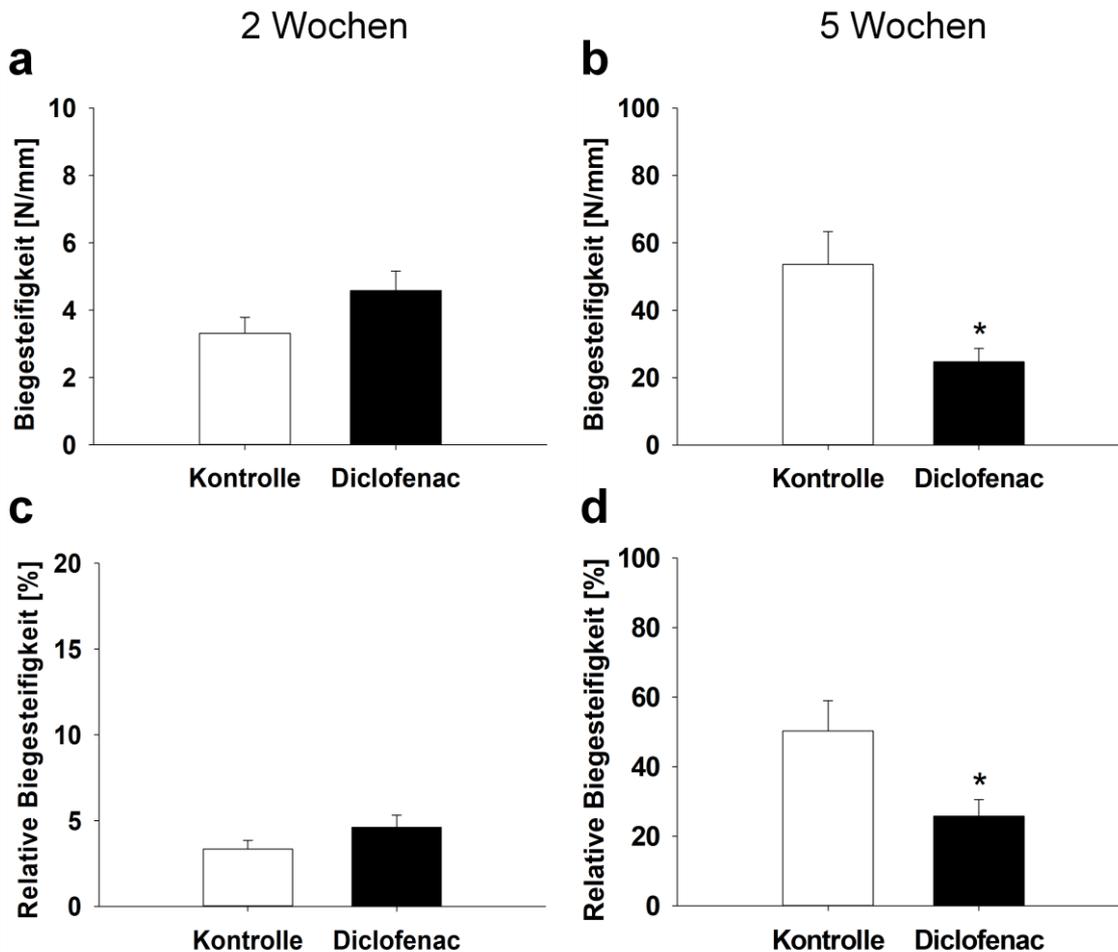


Abbildung 18: Drei-Punkt-Biegemessung. Absolute (a, b) und relative Biegesteifigkeit in Relation zum gesunden kontralateralen Femur (c, d) nach zwei (linke Spalte) und fünf Wochen (rechte Spalte). Kontrollgruppe (weiße Balken) und Diclofenac-Gruppe (schwarze Balken). Mittelwert \pm SEM. (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle)

4.3 Radiologie

4.3.1 Röntgen

Nach jeweils zwei und fünf Wochen wurde bei allen Tieren die knöcherne Überbauung des Frakturspalts auf Röntgenaufnahmen erfasst. Zu beiden Zeitpunkten zeigte sich in der Diclofenac-Gruppe ein geringfügig verminderter Goldberg-Score. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 19).

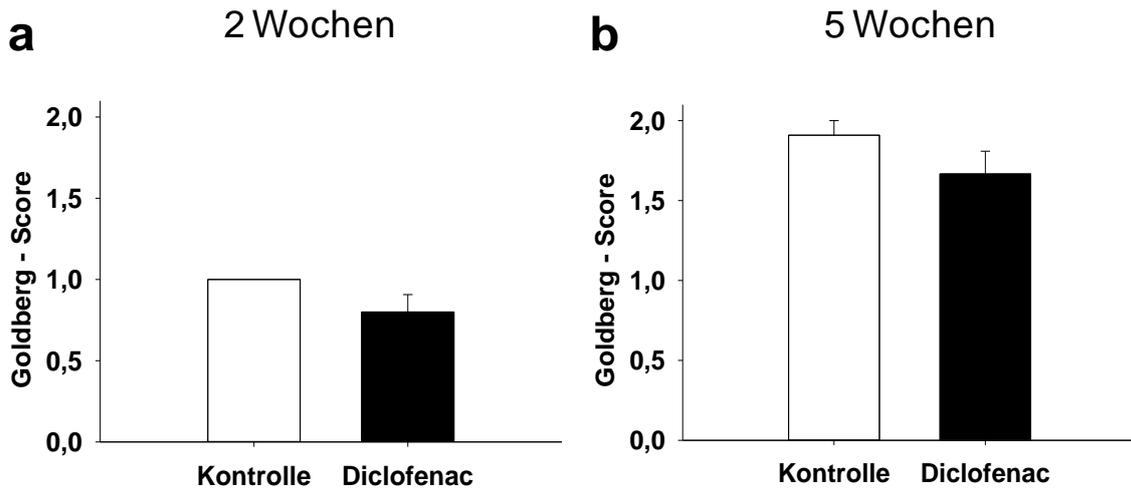


Abbildung 19: Goldberg-Score. Goldberg-Score der frakturierten Knochen nach zwei (a) und fünf (b) Wochen. Null Punkte für fehlende knöcherne Durchbauung, ein Punkt für partielle knöcherne Durchbauung und zwei Punkte für komplette knöcherne Durchbauung des Frakturspalts.

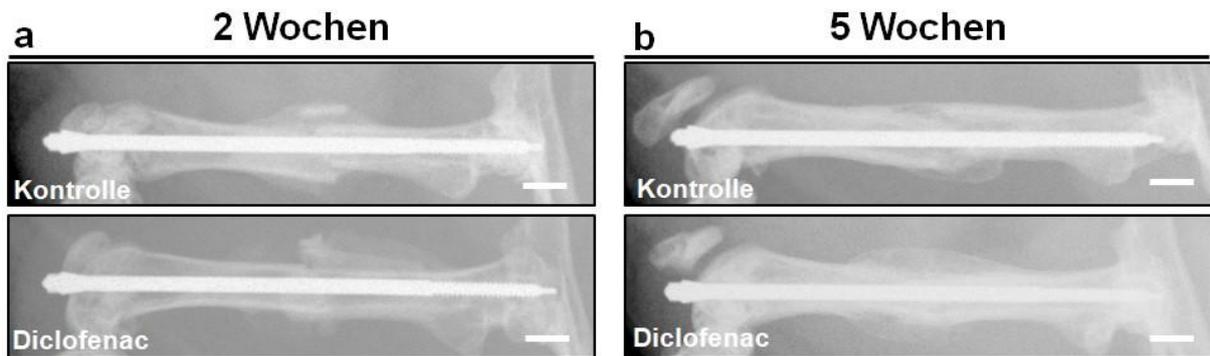


Abbildung 20: Röntgenaufnahmen der frakturierten Femora. Laterale Röntgenaufnahme des rechten Femurknochens 2 Wochen (a) bzw. 5 Wochen (b) nach Fraktur. Der Maßstabsbalken entspricht 1,5mm. (Quelle: Eigene Aufnahmen)

4.3.2 CT

In der CT-Diagnostik zeigte sich ein verminderter Knochenanteil im Kallusgewebe nach Behandlung mit Diclofenac gegenüber der Kontrollgruppe nach fünf Wochen (**Abb. 22b**). Der Anteil des hochmineralisierten Knochens war nach zwei Wochen signifikant und nach fünf Wochen geringfügig vermindert (**Abb. 22c,d**). Strukturelle Parameter wie die Trabekeldicke und der Trabekelabstand waren nach fünf Wochen leicht vermindert, jedoch nicht signifikant (**Tab. 7**).

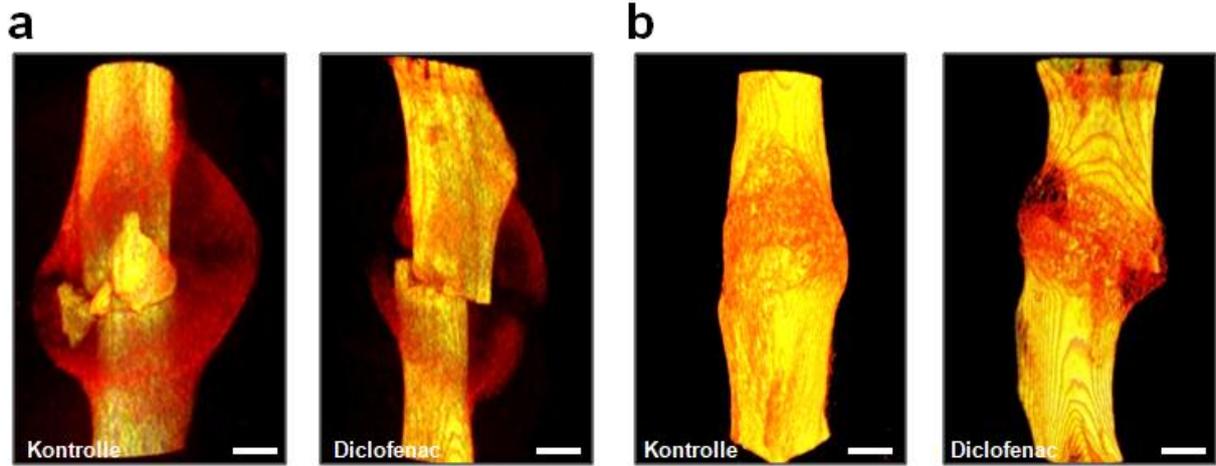


Abbildung 21: 3D-Rekonstruktion der frakturierten Femora. Computertomographische 3D-Rekonstruktion der Frakturstelle mit umgebendem Kallusgewebe 2 Wochen (a) und 5 Wochen (b) nach Fraktur. Der Maßstabsbalken entspricht 1mm.

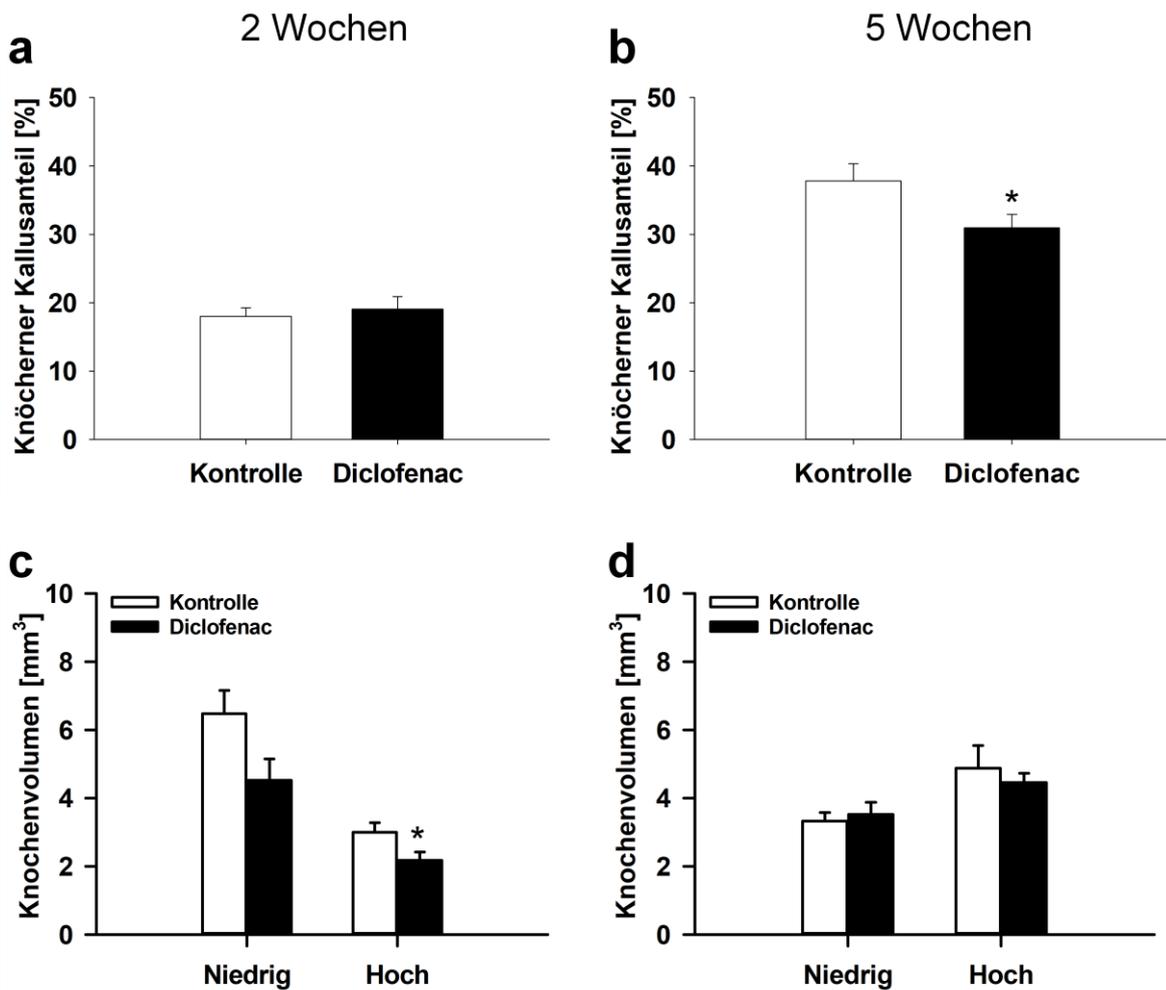


Abbildung 22: Computertomographie. Knöcherner Kallusanteil nach 2 (a) und 5 Wochen (b). Niedrig- und hochmineralisiertes Knochenvolumen nach 2 (c) und 5 Wochen (d). Kontrollgruppe (weiße Balken) und Diclofenac-Gruppe (schwarze Balken). Mittelwert ± SEM. (* p < 0,05 vs. Kontrolle)

Tabelle 7: Strukturelle Parameter Computertomographie.

	2 Wochen		5 Wochen	
	Kontrolle	Diclofenac	Kontrolle	Diclofenac
Trabekeldicke [mm]	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.00
Trabekelanzahl [1/mm]	3.99 ± 0.25	4.45 ± 0.41	4.64 ± 0.26	4.21 ± 0.18
Trabekelabstand [mm]	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.01

4.4 Histologie

Die Kalluszusammensetzung unterschied sich zwischen den beiden Gruppen sowohl nach zwei als auch nach fünf Wochen.

In Gewebeschnitten wurde die Überbauung des Frakturspalts mit einem Punktwert (Histo-Score) beschrieben. Die maximal erreichbare Punktzahl waren dabei vier Punkte pro Knochen bei beidseitiger knöcherner Überbauung. Zwei Punkte wurden jeweils für knöcherner Überbrückung der Fraktur auf einer Seite der Kortikalis vergeben, ein Punkt für Knorpelgewebe und null Punkte für Bindegewebe auf Höhe des Frakturspalts. Die Qualität des Kallusgewebes war zu beiden Zeitpunkten nach Diclofenac-Gabe vermindert (**Abb. 23, 24**).

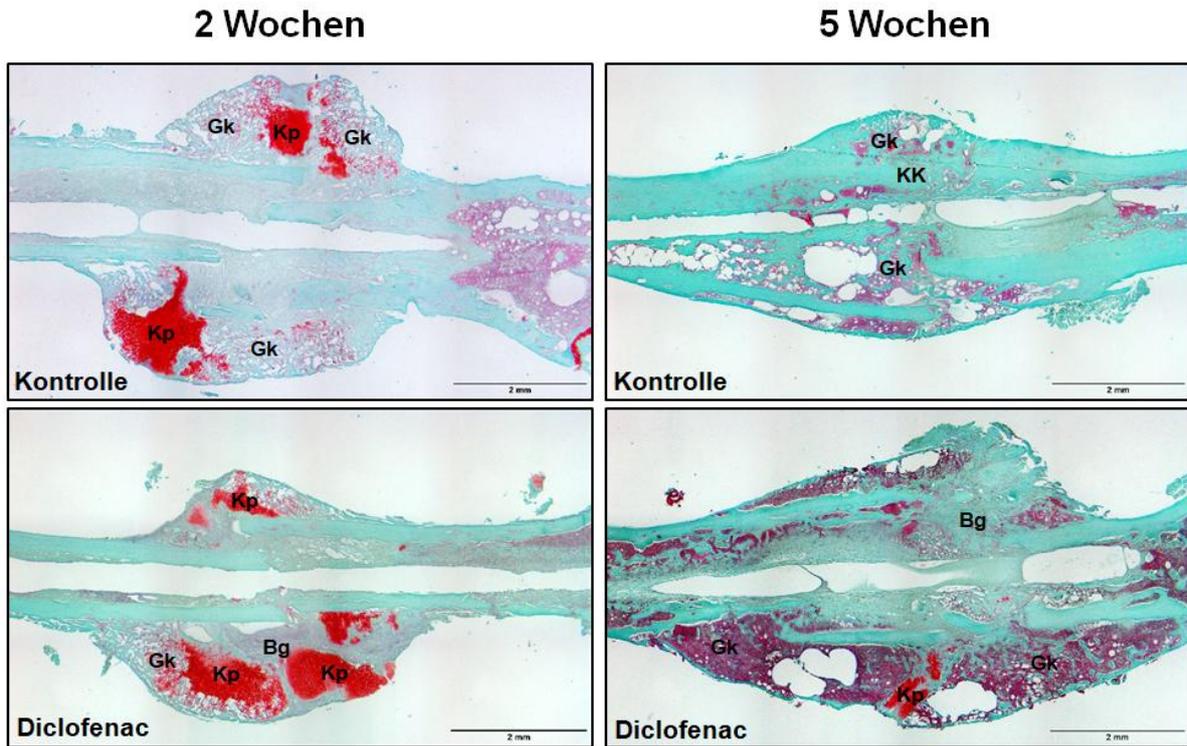


Abbildung 23: Histologieschnitte Safranin-O-Färbung. Schnittbilder in 50-facher Vergrößerung nach zwei und fünf Wochen jeweils von Tieren der Kontroll- sowie der Diclofenacgruppe. Gk = Geflechtknochen, KK = Kortikaler Knochen, Kp = Knorpel, Bg = Bindegewebe (Quelle: eigene Aufnahmen)

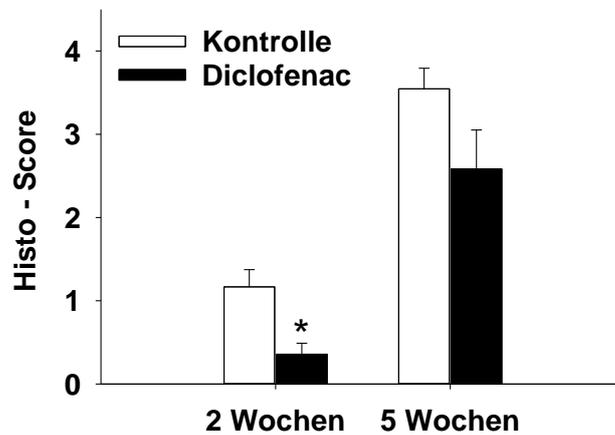


Abbildung 24: Histo-Score. Punktwert der Frakturspaltüberbrückung nach 2 und 5 Wochen. Kontrollgruppe (weiße Balken) und Diclofenac-Gruppe (schwarze Balken). Mittelwert \pm SEM. (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle)

Die Kallusfläche im Verhältnis zum Femurdurchmesser war nach fünf Wochen in der Diclofenacgruppe erhöht. Der Kallusdurchmesser im Verhältnis zum Femurdurchmesser war in der Diclofenacgruppe nach fünf Wochen signifikant größer (**Abb. 25**).

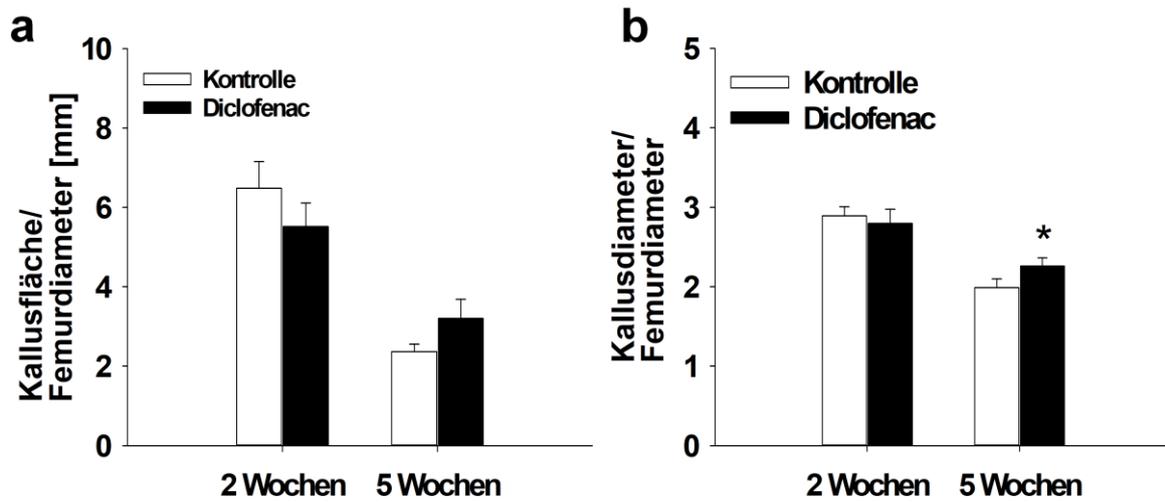


Abbildung 25: Morphologische Parameter Histologie. Kallusfläche in Relation zum Femurdurchmesser (**a**) und Kallusdurchmesser in Relation zum Femurdurchmesser (**b**). Kontrollgruppe (weiße Balken) und Diclofenac-Gruppe (schwarze Balken). Mittelwert \pm SEM. (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle)

Im Kallusgewebe zeigte sich nach zwei Wochen ein verminderter Knochenanteil und nach zwei und fünf Wochen signifikant mehr Bindegewebe in der Diclofenac-Gruppe. Der Knorpelanteil war in beiden Gruppen annähernd gleich (**Abb. 26**).

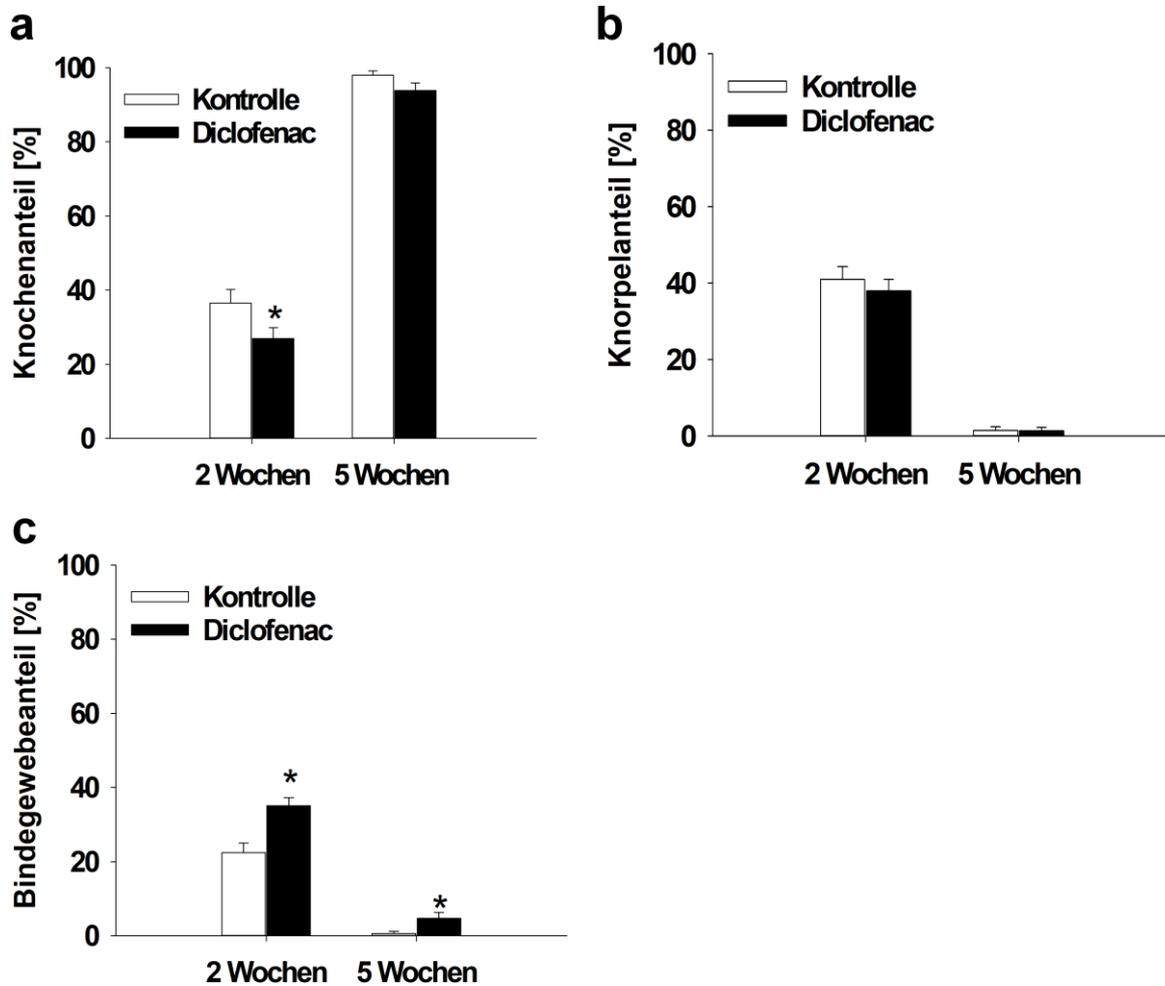


Abbildung 26: Gewebeanteile innerhalb des Frakturkallus. Prozentuale Anteile des Frakturkallus an Knochengewebe (a), Knorpelgewebe (b) und Bindegewebe (c). Kontrollgruppe (weiße Balken) und Diclofenac-Gruppe (schwarze Balken). Mittelwert \pm SEM. (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle)

Nach fünf Wochen zeigte sich zudem in der Diclofenacgruppe signifikant mehr unreifer Geflechtknochen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 27, 28). Der Umbau hin zu reifem lamellären Knochen war verzögert.

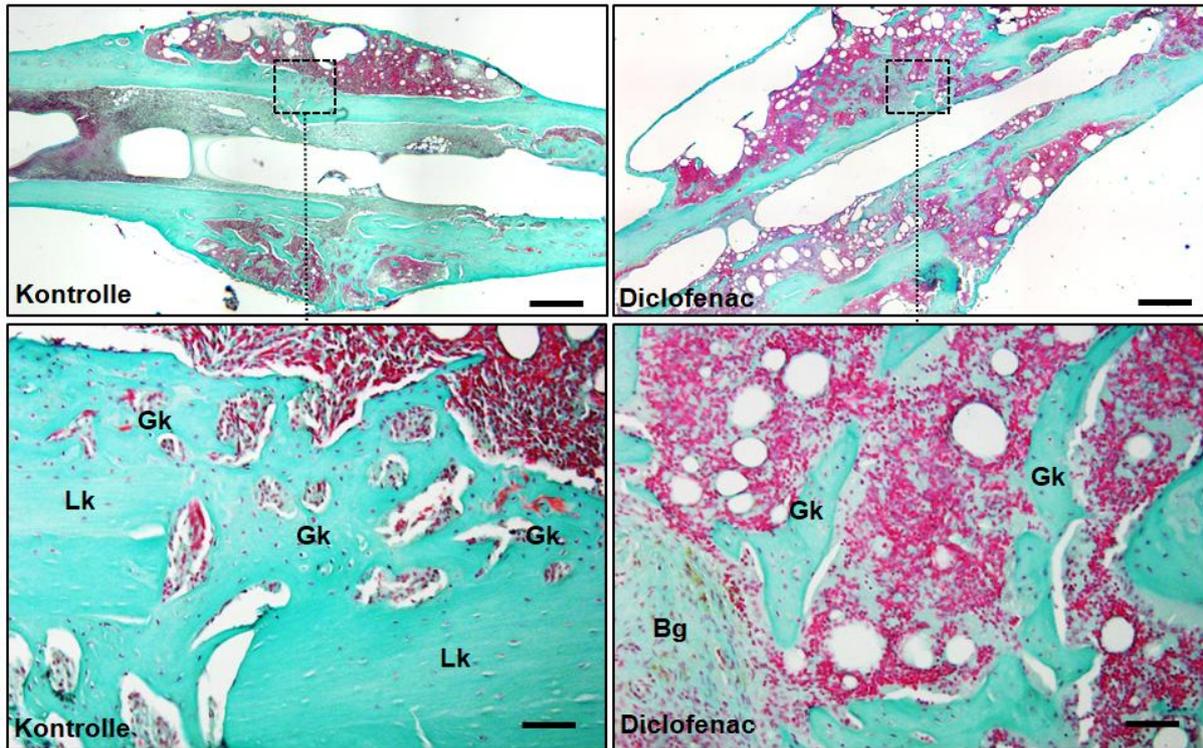


Abbildung 27: Geflechtknochen und Lamellenknochen. Repräsentative Bilder in Safranin-O-Färbung zu einem Zeitpunkt von fünf Wochen nach Fraktur. 50-fache Vergrößerung (obere Reihe), Ausschnitte in 200-facher Vergrößerung (untere Reihe). Gk = Geflechtknochen, Lk = Lamellenknochen. Der Maßstabsbalken entspricht 1mm (obere Reihe) beziehungsweise 25 µm (untere Reihe). (Quelle: Eigene Aufnahmen)

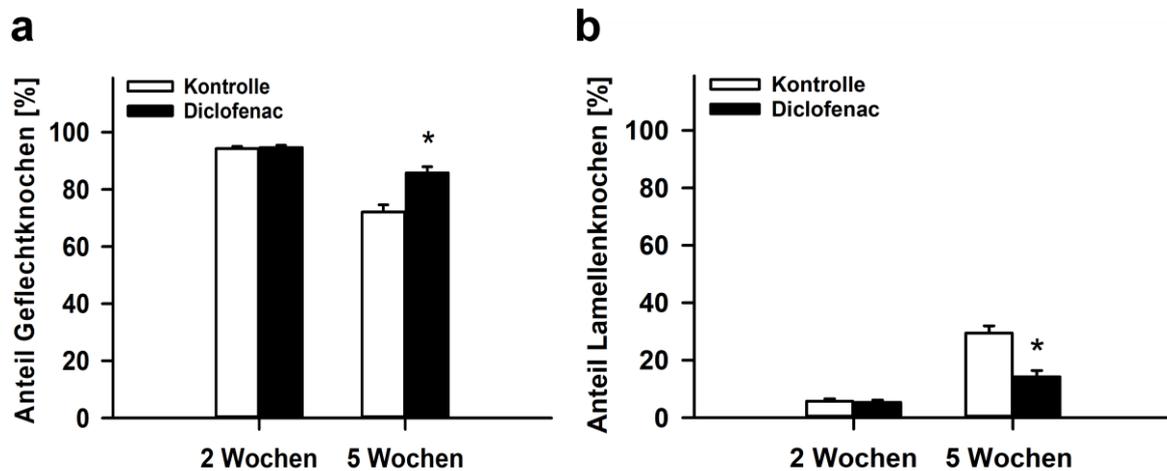


Abbildung 28: Anteil Geflechtknochen und Lamellenknochen. Prozentualer Anteil an Geflechtknochen (a) und Lamellenknochen (b) am knöchernen Kallusgewebe. Kontrollgruppe (weiße Balken) und Diclofenac-Gruppe (schwarze Balken). Mittelwert \pm SEM. (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle)

Zum Nachweis von mehrkernigen Osteoklasten wurde eine TRAP-Färbung angefertigt (**Abb. 29**). Es zeigte sich nach zwei Wochen eine verminderte und nach fünf Wochen eine erhöhte Osteoklastenzahl nach Behandlung mit Diclofenac ($p < 0,05$) (**Abb. 30**).

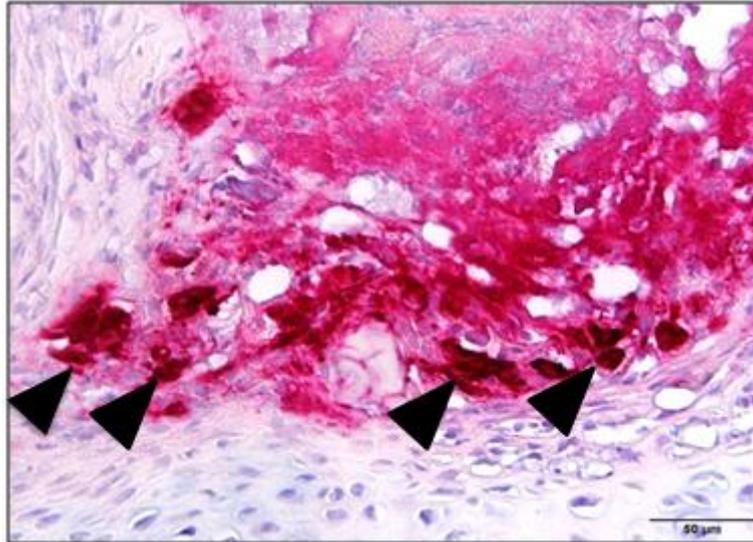


Abbildung 29: TRAP-Färbung. Nachweis mehrkerniger Osteoklasten (schwarze Pfeilspitzen) in der TRAP-Färbung. 400 x Vergrößerung. (Quelle: Eigene Aufnahme)

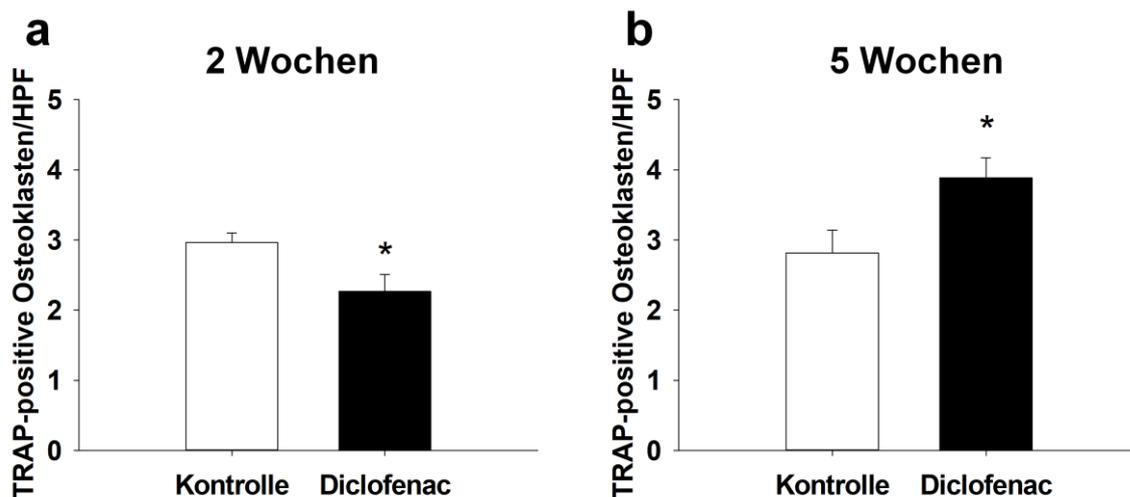


Abbildung 30: TRAP-positive Osteoklasten pro HPF. Anzahl der in der TRAP-Färbung sichtbaren Osteoklasten im Kallusgewebe zwei Wochen (**a**) und fünf Wochen (**b**) nach Fraktur. Kontrollgruppe (weiße Balken) und Diclofenac-Gruppe (schwarze Balken). Mittelwert \pm SEM. (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle)

Die beiden Gruppen unterschieden sich in der Osteocalcin-Färbung nicht signifikant. Der Anteil der mittels Antikörpern gegen Osteocalcin gefärbten Matrix pro High Power Field unterschied sich zu keinem Zeitpunkt zwischen den Untersuchungsgruppen (**Abb. 31a**). Auch in der Zahl der Osteoblasten zeigte sich kein signifikanter Unterschied (**Abb. 31b**).

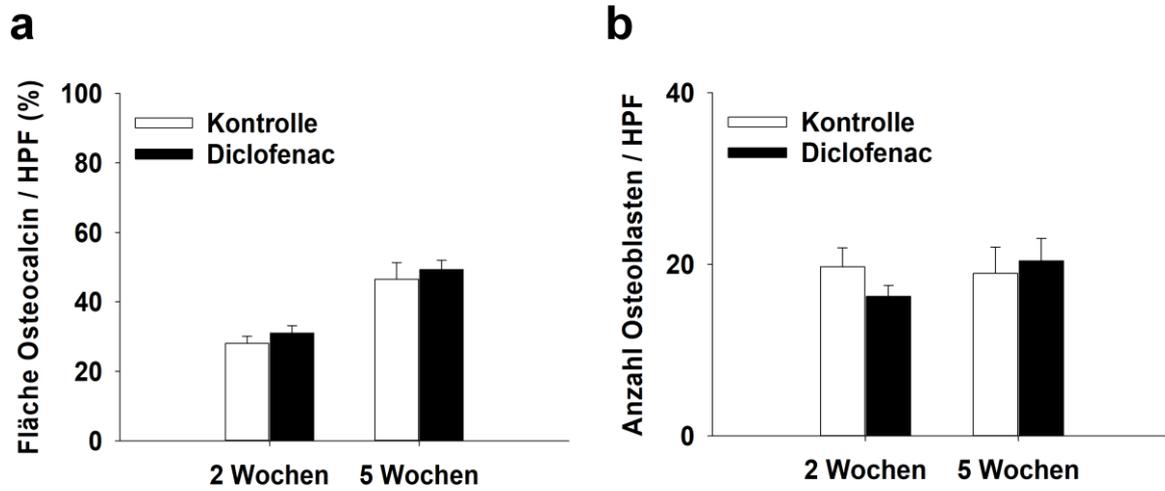


Abbildung 31: Osteocalcin-Färbung. Anteil der Fläche Osteocalcin positiver Matrix an der Fläche der definierten HPFs **(a)**. Anzahl Osteoblasten je HPF **(b)**. Kontrollgruppe (weiße Balken) und Diclofenac-Gruppe (schwarze Balken). Mittelwert \pm SEM.

Die Anzahl der Gefäße pro High-Power-Field unterschied sich in der HE-Färbung weder nach zwei noch nach fünf Wochen signifikant **(Abb. 32)**.

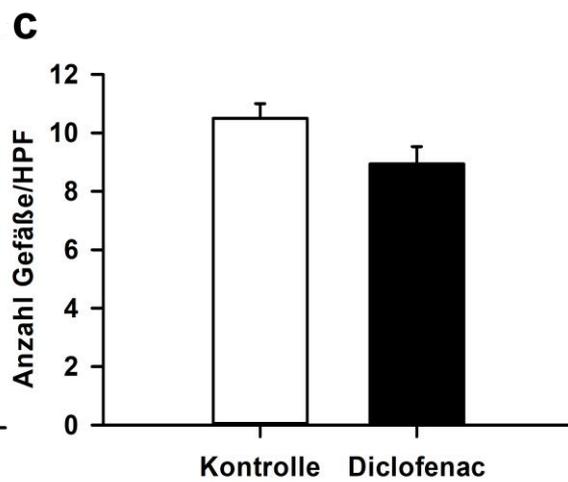
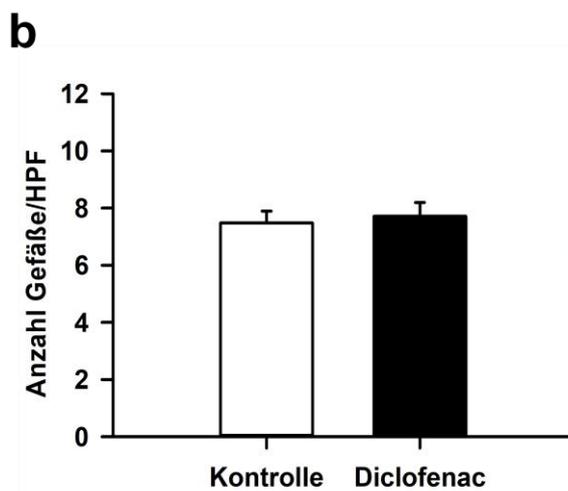
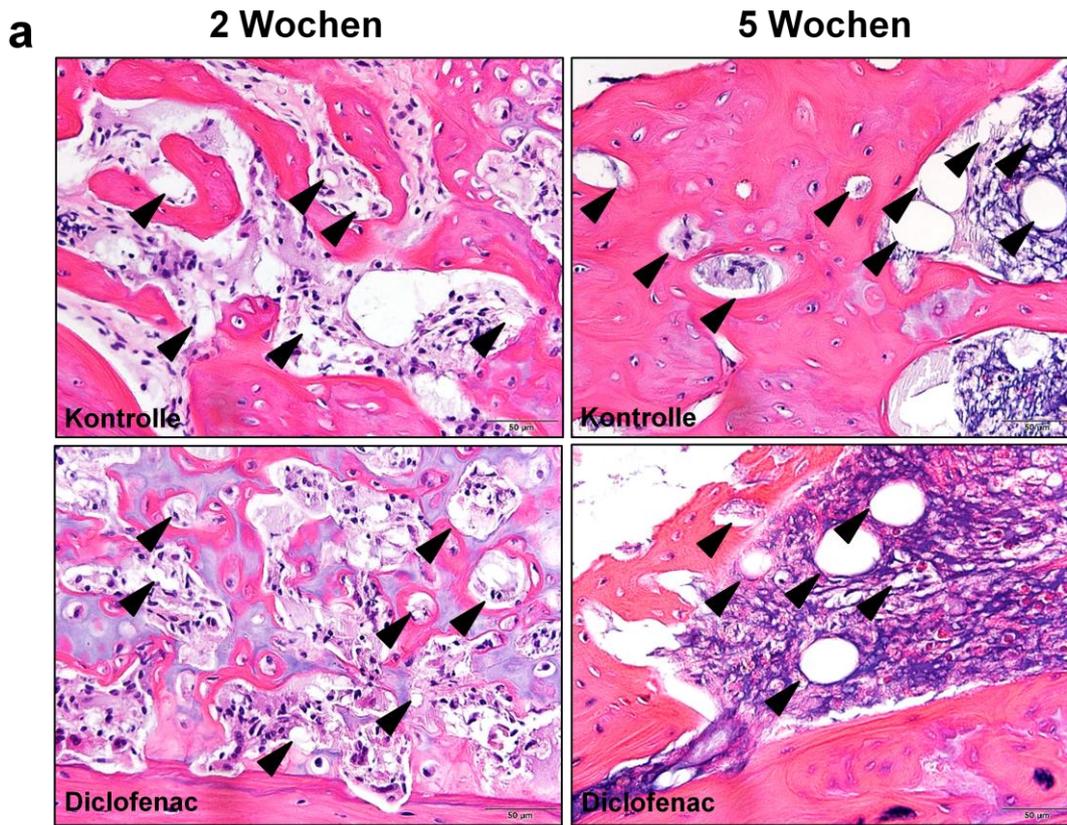


Abbildung 32: Anzahl Gefäße pro HPF. Nachweis von Gefäßen in der HE-Färbung bei 400-facher Vergrößerung (a). Vergleich Anzahl Gefäße/HPF in der Diclofenac- und Kontrollgruppe nach zwei (b) und fünf (c) Wochen. (Quelle: eigene Aufnahme)

4.5 Western Blot

Zwei Wochen nach Fraktur wurde mittels Western Blot die Proteinexpression bestimmt.

Dies umfasste die Untersuchung von VEGF, CD31 und CYR61 als Angiogenesemarker, von BMP-2 und BMP-4 als Marker der Osteogenese, sowie von Kollagen 2 und 10 als Marker der frühen und späten Chondrogenese. Zudem wurde die PCNA-Expression als Hinweis auf allgemeine Proliferation innerhalb des Frakturkallus bestimmt. Die während der Osteoklastogenese als Gegenspieler fungierenden Proteine RANKL und OPG wurden betrachtet, um eine Beurteilung des Remodelings zu ermöglichen.

Die Expression der Angiogenesemarker VEGF, CD31 und CYR61 unterschied sich nach zwei Wochen nicht zwischen beiden Gruppen (**Abb. 33, 34b**). CD31 ($1,216 \pm 0,551$ vs. $0,438 \pm 0,180$) und CYR61 ($0,801 \pm 0,210$ vs. $0,462 \pm 0,093$) wurden in der Diclofenac-Gruppe vermindert exprimiert, jedoch nicht signifikant ($p = 0,093$ für CD31 und $p = 0,39$ für CYR61).

PCNA, ein Protein, welches eine Proliferation anzeigt, wurde in beiden Gruppen etwa gleich stark exprimiert (**Abb. 34a**).

Die Expression von BMP-2 war in der Diclofenac-Gruppe erniedrigt ($5,575 \pm 1,175$ vs. $2,463 \pm 0,860$), jedoch nicht signifikant ($p = 0,06$). In der Expression von BMP-4, eines Knochenformationsmarkers, traten zwei Wochen nach Fraktur keine Unterschiede auf (**Abb. 35**).

Die Analyse ergab eine erhöhte Expression des Osteoklastogenese-Inhibitors Osteoprotegerin. Dies steht im Einklang zur verminderten Osteoklastenzahl in der TRAP-Färbung zum selben Zeitpunkt. Der Osteoklasten-fördernde Faktor RANKL war nicht signifikant verändert (**Abb. 36**).

Kollagen 2, ein Marker der frühen Chondrogenese, war in der Diclofenac-Gruppe signifikant erhöht. Bei Kollagen 10 dagegen zeigte sich keine entsprechende Erhöhung, dagegen sogar eine minimale Erniedrigung (**Abb. 37**).

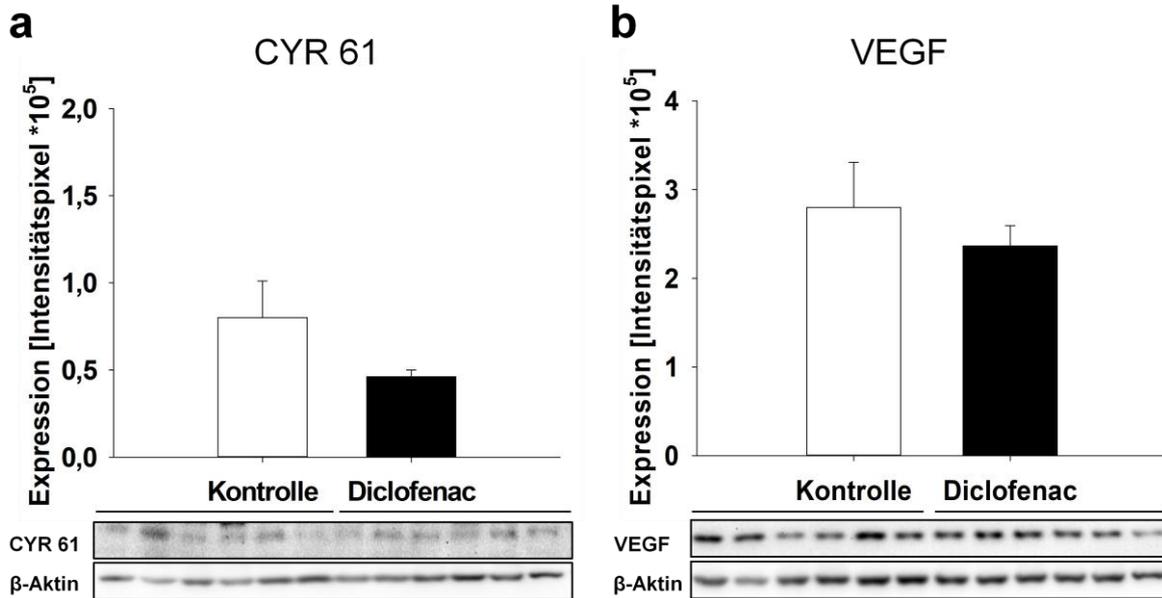


Abbildung 33: Proteinexpression CYR61 und VEGF. Expression der Angiogenesemarker CYR61 (a) und VEGF (b) zwei Wochen nach Fraktur jeweils mit dazugehörigen Western Blots. Kontrollgruppe (weiße Balken) und Diclofenac-Gruppe (schwarze Balken). Mittelwert ± SEM.

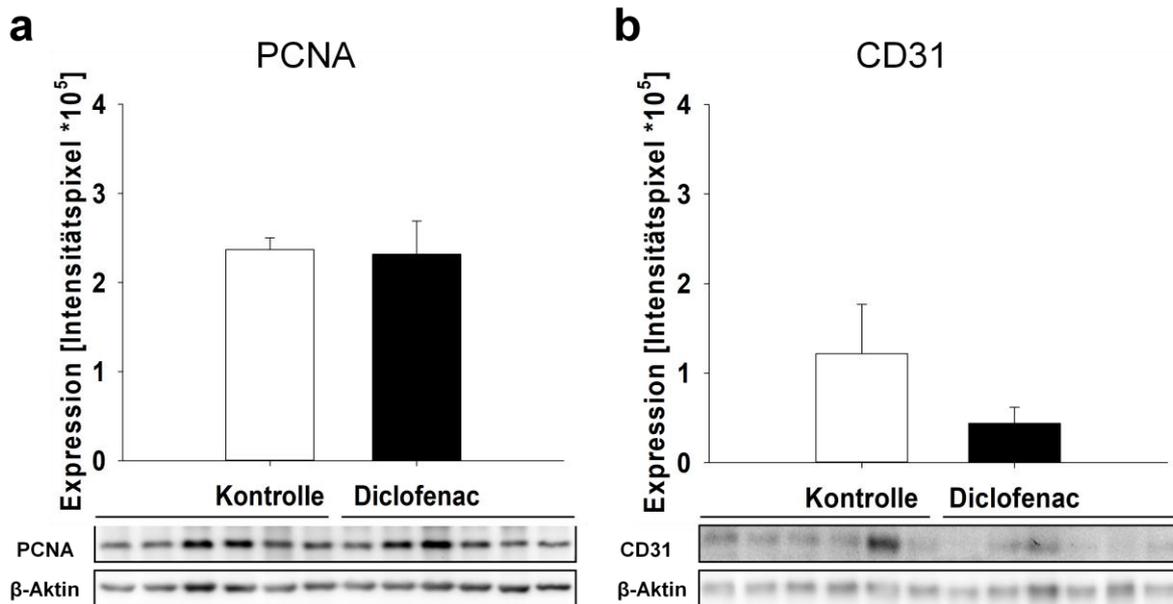


Abbildung 34: Proteinexpression PCNA und CD31. Expression der beiden Proteine PCNA (a) und CD31 (b) zwei Wochen nach Fraktur jeweils mit dazugehörigen Western Blots. Kontrollgruppe (weiße Balken) und Diclofenac-Gruppe (schwarze Balken). Mittelwert ± SEM.

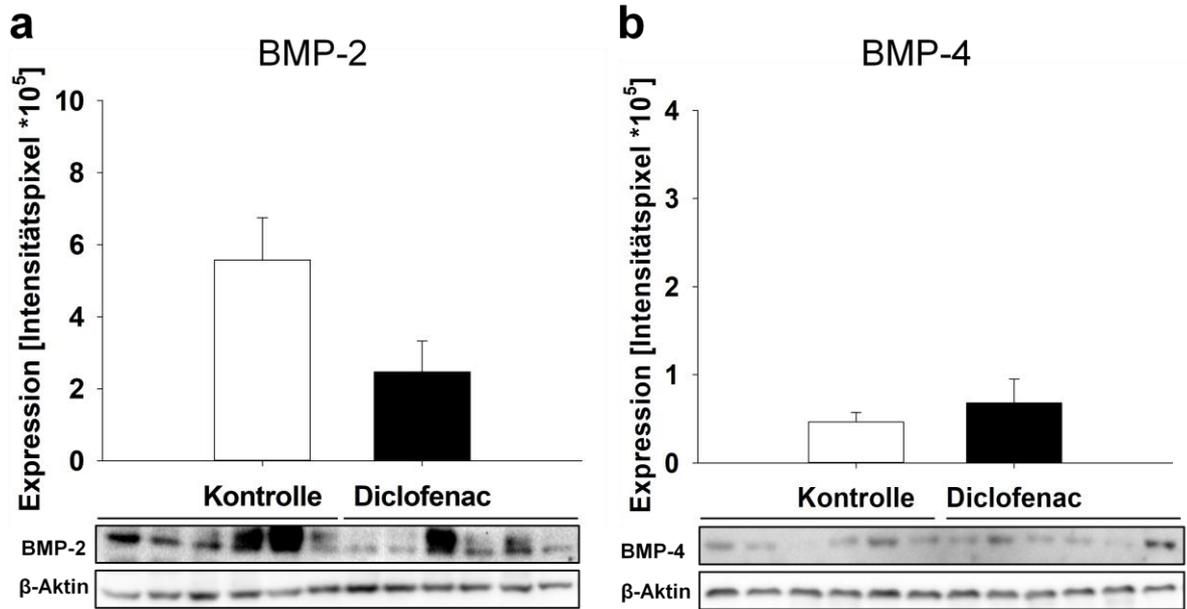


Abbildung 35: Proteinexpression BMP-2 und BMP-4. Expression der Bone morphogenetic proteins 2 (a) und 4 (b) 2 Wochen nach Fraktur jeweils mit dazugehörigen Western Blots. Kontrollgruppe (weiße Balken) und Diclofenac-Gruppe (schwarze Balken). Mittelwert ± SEM.

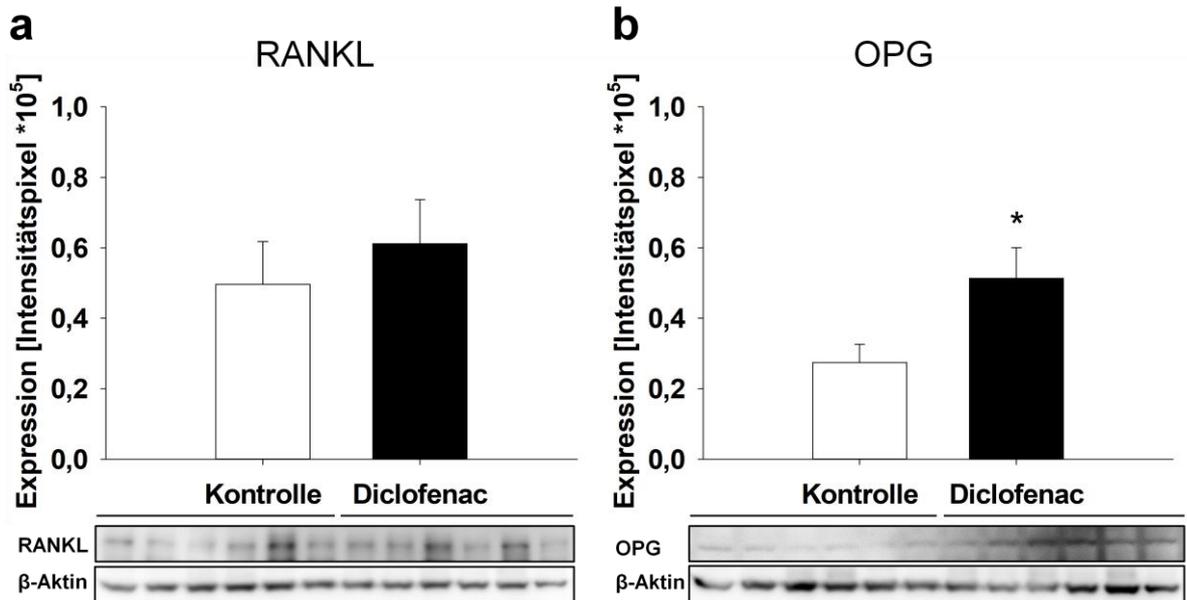


Abbildung 36: Proteinexpression RANKL und OPG. Expression der beiden Proteine RANKL (a) und OPG (b) zwei Wochen nach Fraktur jeweils mit dazugehörigen Western Blots. Kontrollgruppe (weiße Balken) und Diclofenac-Gruppe (schwarze Balken). Mittelwert ± SEM. (* p < 0,05 vs. Kontrolle).

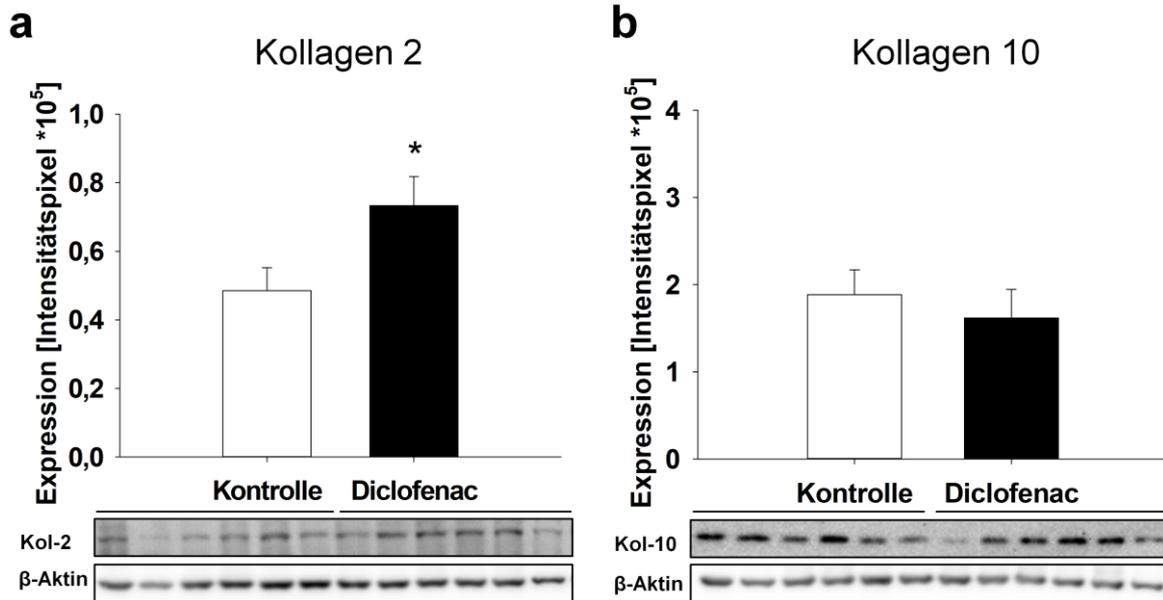


Abbildung 37: Proteinexpression Kollagen 2 und Kollagen 10. Expression der Marker der frühen Chondrogenese, Kollagen 2 (**a**), und der späten Chondrogenese, Kollagen 10 (**b**), zwei Wochen nach Fraktur jeweils mit dazugehörigen Western Blots. Kontrollgruppe (weiße Balken) und Diclofenac-Gruppe (schwarze Balken). Mittelwert ± SEM. (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle).

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

Die komplexen Vorgänge während der Frakturheilung lassen sich bislang in vitro in Zellkulturmodellen noch nicht vollständig reproduzieren, sodass zur Analyse der Knochenheilung weiterhin Studien an Tieren notwendig sind (Ehnert et al., 2020; Haffner-Luntzer et al., 2019).

Kleine Säugetiere wie Mäuse besitzen im Gegensatz zum Menschen eine primitivere Knochenstruktur ohne Havers-Systeme. Stattdessen findet der Knochenumbau über sogenannte Resorptionslakunen an der Knochenoberfläche statt, die im Verlauf von Osteoblasten aufgefüllt werden (Nunamaker, 1998). Dieser Remodelingprozess besitzt dennoch Ähnlichkeiten zur Frakturheilung beim Menschen, sodass das Mausmodell als etabliertes Modell der Frakturheilung breite Anwendung findet.

Vorteile des Mausmodells sind unter anderem die geringen Kosten, die größere Gruppenstärken mit entsprechend höherer statistischer Aussagekraft ermöglichen. Durch das vollständig entschlüsselte Genom der Maus ist eine Vielzahl transgener Stämme verfügbar. Spezifische Antikörper machen darüber hinaus die detaillierten Untersuchungen molekularer Aspekte der Frakturheilung möglich (Histing et al., 2011; Jacenko & Olsen, 1995; Nunamaker, 1998).

In dieser Studie wurde den Tieren Diclofenac in einer Dosierung von 5mg/kg KG einmal täglich subkutan in die Nackenfalte verabreicht. Beim Menschen beträgt die Dosierung 2-3mg/kg KG täglich, aufgeteilt in zwei bis drei Einzeldosen. Nach der von Nair und Jacob (2016) vorgeschlagenen Berechnungsmethode entspräche die Dosierung von 5mg/kg KG bei der Maus circa 0,4mg/kg KG beim Menschen. Das heißt, der Effekt könnte aufgrund der vergleichsweise geringen Dosis unterschätzt werden. Nair und Jacob (2016) verwenden jedoch 20g als Referenzgewicht der Maus, was einer im Vergleich zu den in dieser Studie durchschnittlich 42,6g schweren Tieren relativ größeren Körperoberfläche pro Gramm entspricht. In mehreren vorherigen Studien, die die Wirkung von Diclofenac auf die Frakturheilung bei Ratten untersuchten, wurde ebenfalls eine Dosis von 5mg/kg KG verwendet (Beck et al., 2003; Bissinger et al., 2016; Krischak et al., 2006; Simon & O'Connor, 2007). Zusätzlich muss bei oraler Gabe der First-pass-Effekt der Leber bedacht werden, durch den beim Menschen nur 60% des Wirkstoffs die systemische Zirkulation

erreichen (Davies & Anderson, 1997; Todd & Sorkin, 1988), sodass bei einer subkutanen Gabe eine geringere Dosis notwendig wäre, um äquivalente Plasmaspiegel zu erreichen.

Alle operierten Tiere erhielten zur Schmerzbehandlung Tramadol über das Trinkwasser. Krischak et al. (2006) untersuchten die Wirkung von Tramadol auf die Frakturheilung und fanden keine Beeinträchtigung in der Behandlungsgruppe, allerdings mit einer Dosis von 20mg/kg KG/d. In unserer Studie wurde Tramadol in einer Dosis von 125mg/kg KG während eines Zeitraums von fünf Tagen verwendet. Diese Dosis war jedoch in der Diclofenacgruppe sowie in der Kontrollgruppe identisch.

Das Alter der untersuchten Mäuse betrug im Durchschnitt 16 Monate. In anderen Altersstudien wurden oft 18 Monate alte Mäuse verwendet. CD-1-Mäuse scheinen jedoch schneller zu altern als andere Mausstämme. In einer Studie von Homburger et al. waren nach 16 Monaten bereits 50% der männlichen Mäuse und nach 18 Monaten 50 % der weiblichen Mäuse verstorben. Zudem war mit zunehmendem Alter eine gesteigerte Rate an Neoplasien zu beobachten, wovon die größte Anzahl ab einem Alter von 18 Monaten auftrat (Homburger et al., 1975). Des Weiteren nimmt das Frakturheilungspotenzial zwischen jungen (vier Wochen) und mittelalten Mäusen (sechs Monate) deutlich ab. Ein geringerer Abfall zeigt sich zwischen mittelalten und alten (18 Monate) Mäusen (Lu et al., 2005). Dadurch lässt sich schließen, dass ab einem bestimmten Zeitpunkt eine weitere Alterung nur noch geringfügig Einfluss auf die Frakturheilung nehmen kann. In einigen vorhergehenden Studien an alten Mäusen wurden ebenfalls 16 Monate alte Tiere verwendet (Li et al., 2005; Menger et al., 2020).

In dieser Studie wurde keine geschlechtsspezifische Auswertung vorgenommen. Stattdessen wurde auf eine annähernd gleichmäßige Geschlechtsverteilung zwischen den Untersuchungsgruppen geachtet. Es konnte gezeigt werden, dass sich bei Mäusen die Frakturheilung zwischen männlichen und weiblichen Tieren unterscheiden kann (Histing et al., 2012). Die Knochenheilung verläuft bei weiblichen Tieren langsamer als bei männlichen Tieren (Mehta et al., 2011). In einer Meta-Analyse tierexperimenteller Studien traten jedoch keine signifikanten Unterschiede der Frakturheilung zwischen weiblichen und männlichen Tieren nach Gabe von NSAIDs auf (Al-Waeli et al., 2021).

Es wurden zwei Untersuchungszeiträume der Frakturheilung gewählt, um kurz- und mittelfristige Auswirkungen der Diclofenacgabe auf den Heilungsprozess zu untersuchen. Ein Untersuchungszeitpunkt wurde dazu nach zwei Wochen festgelegt, da in vorhergehenden Studien nach zwei Wochen die größte Kallusausdehnung auftrat (Maningrasso und O'Connor 2004). In derselben Studie kam es nach 28 Tagen zu einer knöchernen

Durchbauung des Frakturspalts und nach sechs Wochen zu einer Umwandlung hin zu lamellärem Knochen.

Histing et al (2011) schlagen zur Untersuchung der Frakturheilung zwei Zeitpunkte vor, ein bis zwei Wochen postoperativ und drei bis fünf Wochen postoperativ. Die Frakturheilung bei alten Mäusen ist jedoch im Vergleich zu jungen Mäusen verzögert (Clark et al., 2020; Lopas et al., 2014; Lu et al., 2005), sodass die Untersuchung zu späteren Zeitpunkten im Rahmen von Altersstudien sinnvoll sein könnte. Dennoch konnte in dieser Studie sowohl die chondrale Phase der Frakturheilung nach zwei Wochen als auch das Remodeling hin zu reifem Knochen nach fünf Wochen beobachtet werden. Damit wurden zwei entscheidende Phasen der Frakturheilung erfasst.

Die mechanischen Gegebenheiten haben einen entscheidenden Einfluss auf die Frakturheilung (Claes et al., 1997, 1998). Aus diesem Grund ist eine Standardisierung der biomechanischen Bedingungen für die Untersuchung der Frakturheilung essenziell (Histing et al., 2011). Die MouseScrew® bietet als intramedulläre Zugschraube eine gewisse axiale sowie Rotationsstabilität (Histing et al., 2009). Da die Schraube keine komplett rigide Fixierungsmethode darstellt und Mikrobewegungen der Fraktarenden weiter ermöglicht, eignet sich dieses Modell besonders zur Analyse der enchondralen Frakturheilung (Histing et al., 2018). Untersuchungen haben gezeigt, dass durch eine geringe axiale Beweglichkeit der Frakturfragmente die Kallusbildung, Vaskularisation und schließlich die Knochenheilung gefördert wird, während zu starke interfragmentäre Bewegungen und Scherstress die Knochenheilung verzögern (Claes, 2021). Sowohl das Frakturierungsverfahren als auch die Insertion der MouseScrew® wurden bisher erfolgreich in einer Reihe von Studien angewendet (Herath et al., 2015; T. Histing, Stenger, et al., 2012; Histing et al., 2016, 2018; Holstein et al., 2009; Klein et al., 2015; Menger et al., 2020).

Die intramedulläre Stabilisierung der Fraktur mittels MouseScrew® nach stumpfer geschlossener Frakturierung stellt ein weniger invasives Verfahren als eine offene Osteotomie dar. Zudem konnte gezeigt werden, dass nach offener Osteotomie im Gegensatz zu geschlossener (Kratzel et al., 2008; Park et al., 1999) sowie offener Frakturierung eine verzögerte Frakturheilung resultiert (Klein et al., 2015), was darauf schließen lässt, dass neben dem operativen Trauma eines offenen Zugangswegs auch die Osteotomie an sich eine Verzögerung der Frakturheilung hervorruft. Aus diesem Grund wurde sich hier für eine geschlossene Frakturierung entschieden, welche dem Frakturmechanismus beim Menschen am nächsten kommt. Nachteil der intramedullären Frakturversorgung ist sicherlich die Schädigung des Markraums durch die eingebrachte Schraube. Dennoch werden auch beim Menschen Marknägel zur Versorgung von Femurschaftfrakturen mit guten Ergebnissen

verwendet (Gösling & Krettek, 2019). Es besteht also durch das Einbringen einer intramedullären Zugschraube große Ähnlichkeit zu klinischen Szenarien. Die Frakturierung der Femora mittels stumpfer Guillotine verursacht einen Weichteilschaden, der Einfluss auf die Frakturheilung nimmt. Der Weichteilschaden ist jedoch durch das standardisierte Frakturverfahren in beiden Gruppen vergleichbar.

Durch die starke muskuläre Ummantelung des Femurs kann die standardisierte Frakturierung mittels Drei-Punkt-Biegung erschwert sein (Histing et al., 2011). In perioperativen Röntgenkontrollen traten jedoch nur minimale Variationen der Frakturlokalisierung auf.

Es existieren standardisierte Frakturmodelle sowohl für das Femur als auch für die Tibia. Vorteil des Femurs ist dabei seine homogene Form, die eine gut vergleichbare biomechanische Testung möglich macht. Die Messung der biomechanischen Eigenschaften der Tibia ist dagegen durch den von distal nach proximal zuehmenden und im Verlauf inhomogenen, dreieckigen Querschnitt erschwert (Cheung et al., 2003). Es kann zudem bei Frakturierung der Tibia zusätzlich zu einer Fibulafraktur kommen, was die Frakturheilung nachweislich negativ beeinflusst (Shefelbine et al., 2005). Zusätzlich dazu erleichtert die Größe des Femurs das chirurgische Verfahren im Gegensatz zur Tibia (T. Histing et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Fraktur der Diaphyse untersucht. Osteoporotische Frakturen im Alter sind jedoch vorwiegend metaphysäre Frakturen, da durch die Osteoporose vor allem die trabekulären Strukturen in der Metaphyse langer Röhrenknochen und in Wirbelkörpern geschwächt werden (W. H. Cheung et al., 2016; Larsson, 2002). Osteoporosebedingte Frakturen treten deshalb vor allem im proximalen Femur, proximalen Humerus, distalen Radius oder in Wirbelkörpern auf (Alt et al., 2013). Trotz einiger Modelle zur Untersuchung metaphysärer Frakturheilung (Claes et al., 2009; Haffner-Luntzer et al., 2020; Histing et al., 2012; Wong et al., 2019, 2018) ist die metaphysäre Frakturheilung noch nicht in Gänze verstanden (Wong et al., 2019). Es existieren einige Unterschiede zur diaphysären Frakturheilung (Liu et al., 2019; Sandberg et al., 2017; Sandberg & Aspenberg, 2015; Steen & Fjeld, 1989; Tätting et al., 2018), was bei der Beurteilung der Ergebnisse dieser Arbeit bedacht werden sollte.

Zur Messung der biomechanischen Eigenschaften der Knochen wurde ein zerstörungsfreies Drei-Punkt-Biegemessungsverfahren verwendet. Durch die zerstörungsfreie Messung konnte die Zahl der Versuchstiere deutlich verringert werden. Vorteil der Drei-Punkt-Biegemessung ist die einfache Anwendung, die jedoch mit hohen Scherkräften in der Knochenmitte einhergeht (Turner & Burr, 1993). Bei der Vier-Punkt-Biegemessung besteht die

Schwierigkeit darin, dass bei unregelmäßiger Form der Proben keine gleichmäßige Lastverteilung auf beide Prüfstempel gelingt, weshalb zur Untersuchung von Knochen die Drei-Punkt-Biegemessung häufiger angewendet wird (Turner & Burr, 1993). Die Drei-Punkt-Biegemessung stellt das häufigste Messverfahren zur Überprüfung biomechanischer Eigenschaften der Knochen kleiner Säugetiere dar (Leppänen et al., 2006; Osuna et al., 2020). Bei beiden Verfahren, sowohl bei der Drei- als auch bei der Vier-Punkt-Biegemessung, reicht ein geringes Verdrehen aus, um die Messwerte zu verändern (Lind et al., 2001). Dies konnte durch Lagerung der Knochen auf den Kondylen teilweise verhindert werden.

Die Computertomographie ist ein etabliertes Untersuchungsverfahren der Knochenheilung (Bissinger et al., 2016; Bouxsein et al., 2010; Effendy et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde sich zur Akquise einer optimalen Bildqualität an den Empfehlungen von Bouxsein et al. (2010) orientiert. Die Anodenspannung wurde zur besseren Darstellbarkeit der Kallusgrenzen bei 100kV festgelegt. Die Ergebnisse und bildmorphologischen Eigenschaften waren dennoch mit denen vorhergehender Studien vergleichbar (Klein et al., 2015; Menger et al., 2020).

Die histologische Untersuchung ist immer noch der Goldstandard zur Untersuchung der Frakturheilung. Die hier verwendeten Messparameter wurden nach Empfehlungen der American Society of Bone and Mineral Research (Parfitt et al., 1987) in Anlehnung an Gerstenfeld und Kollegen (Gerstenfeld et al., 2005) gewählt. Die Schnittführung des Mikrotoms zur Erlangung der einzelnen histologischen Schnitte erfolgte entlang des Bohrkanals der Schraube. Dies ermöglichte die Auswertung vergleichbarer Bereiche der frakturierten Knochen. Dennoch wird durch Auswertung einzelner longitudinaler Schnitte nicht die gesamte Heterogenität des Frakturkallus erfasst, da beispielsweise die Verteilung des Knorpelgewebes innerhalb des Frakturkallus in keiner Ebene gleichmäßig ausgeprägt ist (Gerstenfeld et al., 2005). Dies könnte zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt haben.

Schnitte dekalzifizierter Knochen, wie sie auch in dieser Studie anfertigt wurden, erlauben die Betrachtung einer Vielzahl immunhistologischer Färbungen. Der Nachteil einer Dekalzifikation besteht jedoch darin, dass keine Aussage über den Mineralisationsgehalt der Knochen mehr getroffen werden kann. Die Beschaffenheit kalzifizierter Gewebeanteile wurde jedoch bereits in der Computertomographie untersucht.

Die Untersuchung der Proteinkonzentrationen verschiedener Wachstumsfaktoren in dieser Studie stellt nur eine Momentaufnahme zu zwei fest definierten Zeitpunkten dar. Der Verlauf außerhalb dieser Zeitpunkte wurde nicht untersucht und kann erheblich von den erhobenen Befunden abweichen. Die Expression verschiedener Proteine während der Frakturheilung ist

komplex und kann als Resultat des Zusammenspiels von über 13000 Genen deutlichen zeitlichen und quantitativen Schwankungen unterworfen sein (Cho et al., 2002; Wang et al., 2006).

5.2 Diskussion der Ergebnisse

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Diclofenac die Frakturheilung bei alten Mäusen negativ beeinflusst.

Die Biegesteifigkeit frakturierter Knochen war nach fünfwöchiger Diclofenacbehandlung signifikant vermindert. Zum selben Zeitpunkt wurde im CT ein verminderter Knochenanteil des Kallusgewebes nachgewiesen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen zweier vorhergehender Studien, die den Einfluss von Diclofenac auf die Frakturheilung bei Ratten untersucht haben (Beck et al., 2003; Bissinger et al., 2016). In diesen Studien wurden ebenfalls eine veränderte Kalluszusammensetzung im CT sowie eine verminderte Biegesteifigkeit nach Behandlung mit Diclofenac deutlich.

Zu einem Zeitpunkt nach zwei Wochen zeigte sich kein Unterschied in den biomechanischen Eigenschaften der Kontroll- und der Behandlungsgruppe, was jedoch aus einer erhöhten statistischen Variabilität der biomechanischen Ergebnisse während der beginnenden Frakturheilung im Gegensatz zu späteren Zeitpunkten resultieren könnte. Dies führen Gerstenfeld und Kollegen (2006) auf die Komplexität und Heterogenität besonders dieser frühen Phase der Frakturheilung zurück.

Der Einfluss von NSAIDs auf die Frakturheilung wurde bereits früh untersucht. Erste Hinweise auf eine Verzögerung der Frakturheilung durch NSAIDs im Tiermodell zeigten Untersuchungen aus dem Jahr 1976 (Rø et al., 1976; Sudmann et al., 1979) und bei Menschen 1996 (Butcher & Marsh, 1996).

Trotz vieler Hinweise für eine Beeinträchtigung der Frakturheilung sind NSAIDs aufgrund ihrer sehr guten analgetischen und antiinflammatorischen Eigenschaften weltweit auch im Alter in großem Umfang verwendete Medikamente (Zhou et al., 2014). Sie bleiben essenzieller Bestandteil des WHO-Stufenschemas zur Schmerzbehandlung. Diclofenac im Speziellen macht dabei mit Abstand den größten Anteil an verwendeten NSAIDs aus, unabhängig von der Betrachtung ärmerer oder reicher Länder (McGettigan & Henry, 2013).

Direkt im Anschluss an eine Fraktur findet eine Phase der Entzündung statt. Dabei ist die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine entscheidend für die Initiierung und den Ausgang einer adäquaten Frakturheilung (Gerstenfeld et al., 2001).

Es ist jedoch auch eine hemmende Wirkung auf die Frakturheilung durch eine vermehrte Entzündung beschrieben. Beim Menschen zeigt sich eine verzögerte Heilung bei Zuständen, die mit gesteigerter Entzündung assoziiert sind, wie Diabetes, Rauchen und hohes Alter (Hankenson et al., 2014). Durch eine Blockierung des Notch-Signalwegs konnte gezeigt werden, dass eine verlängerte Entzündungsphase zu einer Hemmung der Frakturheilung mit verzögerter Chondrogenese und reduzierter Kallusgröße führt (Dishowitz et al., 2013).

Die Transplantation von juvenilem Knochenmark in ältere Mäuse (12 Monate) führte zu einer schnelleren Auflösung der Entzündung mit beschleunigter Frakturheilung (Xing et al., 2010). In einer weiteren Studie hatte die Inhibierung von Makrophagen in alten Mäusen eine verbesserte Frakturheilung zur Folge (Slade Shantz et al., 2014). Dies führt zu der These, dass im Alter Immunzellen weniger dazu in der Lage sind, ein für die Frakturheilung entscheidendes Gleichgewicht der Entzündung aufrecht zu erhalten (Hankenson et al., 2014).

Naik und Kollegen (2009) konnten jedoch zeigen, dass die beeinträchtigte Frakturheilung alter Mäuse im Vergleich zu jungen Mäusen mit einer bereits reduzierten COX-2-Expression assoziiert ist. Die COX-2-Expression in jungen Mäusen fand ihren Höhepunkt am fünften Tag der Frakturheilung gleichzeitig mit Beginn der enchondralen Osteogenese. Die lokale Gabe eines Prostaglandin-EP4-Rezeptor-Agonisten an den Ort der Fraktur bei alten Mäusen erhöhte die Chondrogenese sowie die Knochenbildung auf Level ähnlich derer junger Mäuse (Naik et al., 2009). So könnte die Gabe von Diclofenac ein bestehendes Defizit an durch COX-2 regulierten Signalmolekülen der Frakturheilung im Alter noch weiter verstärken.

Zhang et al. (2002) machten in ihrer Studie an COX-2-Knockout-Mäusen deutlich, dass die Frakturheilung in COX-2-defizienten Mäusen verzögert und durch eine verminderte Osteoblastogenese sowie vermehrt bindegewebige Pseudarthrosen gekennzeichnet ist. Dies steht im Einklang mit dem erhöhten Bindegewebsanteil im Kallusgewebe der Diclofenacgruppe in unserer Studie. Im Zellkulturmodell konnte die verminderte Osteogenese COX-2-negativer Zellen durch Gabe von PGE-2 aufgehoben werden und durch zusätzliche Gabe von BMP-2 sogar noch gesteigert werden (Zhang et al., 2002). Dies spricht dafür, dass die Wirkung von COX-2 über PGE2 und BMP-2 stattfindet. Auch Simon et al. (2002) konnten zeigen, dass bei COX-2-defizienten Mäusen eine beeinträchtigte Frakturheilung zu beobachten ist, während sie bei COX-1-Knockout-Mäusen nicht beeinflusst war.

In einer Studie an seneszenten Prostaglandin-EP4-Rezeptor-Knockout-Mäusen konnte eine geringere Knochenmasse im Gegensatz zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Li et al., 2005). Vor allem das trabekuläre Knochenvolumen war vermindert, während die Zahl der

Osteoklasten erhöht war. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit, wo die Osteoklastenzahl nach fünfwöchiger Diclofenac-Gabe erhöht war. Zudem konnten wir ebenfalls ein geringeres Knochenvolumen und einen geringeren Anteil an Knochengewebe nachweisen. Sowohl bei EP4-Knockout-Mäusen als auch in unserer Studie nach Gabe von Diclofenac zeigten sich eine beeinträchtigte Kalluszusammensetzung und eine geringere knöchernen Überbauung des Frakturspalts im Gegensatz zur Kontrollgruppe. Die Diclofenac-bedingte Hemmung der Prostaglandinsynthese ruft somit wahrscheinlich ähnliche Effekte hervor wie eine Hemmung des Prostaglandin-Rezeptors EP4.

Kaspar et al. (2005) inkubierten die Osteoblasten-ähnliche Zellreihe SaOS-2 mit 50µg/ml Diclofenac. Zwei Tage nach 24-stündiger Inkubation war sowohl die Proliferation als auch die Expression von Kollagen I vermindert. Dieser Effekt war jedoch nach neun und 16 Tagen nicht mehr nachweisbar. Dagegen war die Expression der alkalischen Phosphatase erst zu den beiden späteren Zeitpunkten vermindert. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass osteogene Aktivität nach einer Einmalgabe Diclofenac über einen längeren Zeitraum gehemmt wird. Auch in der hier vorliegenden Arbeit war die Knochenbildung durch Diclofenacgabe vermindert. Der Effekt war in der Studie von Kaspar und Kollegen dosisabhängig (Kaspar et al., 2005). Die Prostaglandinaktivität, die als essenziell für die Reifung von Osteoblasten in der frühen Phase der Frakturheilung betrachtet wird, scheint durch Diclofenac vermindert zu sein.

Es lässt sich jedoch vermuten, dass auch prostaglandinunabhängige Effekte von NSAIDs auf Osteoblasten existieren. So sorgten NSAIDs in Osteoblastenzellkulturen für eine Hemmung der Proliferation dieser Osteoblasten und einen Arrest des Zellzyklus durch eine Veränderung von Regulatorproteinen. Diese Hemmung der Proliferation war durch die Zugabe von Prostaglandinen nicht reversibel (Chang et al., 2009). Zudem scheint Celecoxib direkt den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Weg zu hemmen, der eine wichtige Rolle in der Osteoblastenproliferation und -differenzierung spielt. Über diesen Mechanismus wird wahrscheinlich auch die osteoblastäre Mineralisation der Matrix gehemmt, da die alkalische Phosphatase ein Endprodukt dieses Signalwegs ist (Nagano et al., 2017). Wnt wird darüber hinaus eine entscheidende Regulatorfunktion bei der enchondralen Ossifikation sowie bei der Frakturheilung nachgesagt (Macasai et al., 2008) und PGE2 scheint den Wnt/ β -Catenin-Weg aktivieren zu können (Castellone et al., 2005). Somit stellt die Hemmung dieses Signalwegs einen möglichen Mechanismus für die negative Wirkung von NSAIDs auf die Frakturheilung dar (Nagano et al., 2017).

Sell et al. (1999) inkubierten Osteoblasten sowie stromale Knochenmarkszellen mit Diclofenac. Sie postulieren eine Störung des anabolen Knochenstoffwechsels durch erhöhte

Expression von Osteocalcin. Osteocalcin hemmt dabei vermutlich die kollagene Matrixablage. In dieser Studie war der Anteil der mittels Antikörpern gegen Osteocalcin gefärbten Matrix in der Diclofenac-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe minimal, jedoch nicht signifikant, erhöht. Sollte der Effekt dennoch nicht durch Zufall entstanden sein, könnte dies den von Sell und Kollegen (1999) vorgeschlagenen Pathomechanismus bestätigen.

Knochenmarkszellkulturen von COX-2-defizienten Mäusen produzieren weniger Osteoblasten als von Wildtyp-Tieren stammende Kulturen (Zhang et al., 2002). COX-2 trägt zudem wesentlich zur BMP-2 induzierten Osteoblastendifferenzierung in vivo und in vitro bei (Chikazu et al., 2002). Dennoch kann die Osteoblastendifferenzierung nicht alleine von COX-2 abhängig sein, da COX-2-Knockout-Mäuse ein normales Skelett entwickeln (Simon et al., 2002). Darüberhinaus hemmen NSAIDs in einigen Untersuchungen nicht die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten, sondern die Differenzierung zu Chondrozyten (Pountos et al., 2011).

In einer aktuellen in-vitro-Studie verringerte Diclofenac die Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen zu Chondrozyten (Pountos et al., 2021). Dies ging einher mit einer starken Hemmung der PGE₂-Expression, der Effekt war jedoch nicht durch Substitution von PGE₂ reversibel, was einen Prostaglandin-unabhängigen Mechanismus nahelegt. Auffällig war eine starke Verringerung von TGF- β 3 durch die Diclofenacapplikation. Interessanterweise war die hemmende Wirkung auf die chondrale Differenzierung identisch nach nur einwöchiger Gabe zu Beginn des Experiments oder der kontinuierlichen Gabe über drei Wochen.

Simon et al. (2002) wiesen nach, dass die Aktivität der Cyclooxygenase 2 essenziell für die enchondrale Ossifikation während der Frakturheilung ist. In ihrer Studie wurde eine beeinträchtigte Differenzierung der Chondrozyten nach Hemmung von COX-2 deutlich. COX-2-negative Chondrozyten waren nicht in der Lage, eine mineralisierte Matrix zu bilden und die enchondrale Osteogenese war gestört.

Welting und Kollegen (2011) konnten darüber hinaus zeigen, dass eine medikamentöse Hemmung von COX-2 die BMP-2-vermittelte hypertrophe Differenzierung in verschiedenen chondrogenen Modellen in vitro und in vivo reduziert. Dadurch könnte eine inhibierende Wirkung von NSAIDs auf die hypertrophe Phase der enchondralen Osteogenese erklärt werden. Die frühe Chondrogenese blieb von einer COX-2-Hemmung unbeeinflusst (Welting et al., 2011), was dazu passt, dass COX-1-Knockout-Mäuse und COX-2-Knockout-Mäuse Chondrozyten im Frakturkallus exprimieren, diese Enzyme also nicht essenziell für die Chondrozytendifferenzierung sein können (Simon & O'Connor, 2007; Su & O'Connor, 2013).

Auch die Knorpelbildung innerhalb des Frakturkallus mit Diclofenac behandelte Tiere in der hier vorliegenden Arbeit war nicht beeinträchtigt.

Genexpressionsuntersuchungen im Frakturkallus von mit Celecoxib behandelten Ratten ergaben eine stark erhöhte Kollagen-2-Expression, jedoch keine ebenso erhöhte Expression von Kollagen 10, was dafür spricht, dass vermehrt Knorpel gebildet wird, dieser aber nicht hypertrophiert (Cottrell & O'Connor, 2009). Damit ist ein wichtiger Schritt der enchondralen Ossifikation beeinträchtigt, was eine gestörte Frakturheilung erklären könnte. In unserer Studie war die Expression von Kollagen 2, welches vor allem in der frühen knorpelbildenden Phase der Frakturheilung vorkommt (Multimäki et al., 1987), nach Diclofenacgabe ebenfalls signifikant erhöht, während Kollagen 10, ein Marker für die Mineralisation hypertropher Chondrozyten (Grant et al., 1987), leicht vermindert exprimiert wurde. Dies spricht dafür, dass auch durch Diclofenac die enchondrale Ossifikation beeinträchtigt wird.

Die Angiogenese ist ein entscheidender Prozess der Frakturheilung (Vu et al., 1998; Winet, 1996). Vor allem die Osteogenese ist abhängig von einer ausreichenden Blutversorgung (Schlaeppli et al., 1997). Besonders COX-2 spielt eine wichtige Rolle bei der Förderung der Angiogenese während der Frakturheilung (Cottrell & O'Connor, 2010; Su & O'Connor, 2013). Während der Frakturheilung schütten hypertrophe Chondrozyten angiogene Faktoren wie VEGF und CYR61 aus, um Osteoklasten anzulocken und damit den Umbau der kartilaginären Matrix hin zu Knochen voranzutreiben (Engsig et al., 2000; Gerber et al., 1999; Ortega et al., 2004; Su & O'Connor, 2013). Die CD31-Expression war in der Diclofenac-Gruppe deutlich, jedoch nicht signifikant erniedrigt. Mit einem Mangel an CD31 wird eine Störung der Endothelzellmigration und Mikroangiogenese assoziiert (Park et al., 2010). Die verminderte Expression von CD31 könnte so die verzögerte Frakturheilung nach Behandlung mit Diclofenac mitbedingen.

CYR61 spielt eine Schlüsselrolle in der enchondralen Ossifikation, da es vor allem während der Chondrogenese exprimiert wird (Hadjiargyrou et al., 2000) und zur Angiogenese beiträgt (Babic et al., 1998). VEGF induziert die Expression von CYR61 in Osteoblasten, wodurch die Vaskularisierung des Frakturkallus gefördert wird (Athanasopoulos et al., 2007). In vorhergehenden Studien unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine Therapie mit Sildenafil (Histing et al., 2011) sowie Cilostazol (Herath et al., 2015) durch eine erhöhte CYR61-Expression die Frakturheilung verbessern kann. In unserer Studie war die verschlechterte Frakturheilung durch Diclofenac-Gabe mit einer verminderten CYR61-Expression vergesellschaftet. Auch an der osteoblastären Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen durch den kanonischen Wnt-Signalweg ist CYR61 beteiligt (Si et al., 2006). In einer Studie an Kaninchen verbesserte die lokale Gabe einer mit CYR61

angereicherten Matrix die Frakturheilung sowohl histologisch, als auch in radiologischen und biomechanischen Auswertungen (Frey et al., 2012). Zudem hat CYR61 Einfluss auf eine Reihe anderer an der Frakturheilung beteiligter Faktoren wie TNF- α , TGF- β , VEGF, Wnt-Proteine und BMPs und kann somit eine über seine direkte Wirkung hinausgehende Regulatorfunktion einnehmen (Chen & Lau, 2009).

Auch die Expression von BMP-2 war nach Diclofenacgabe vermindert. Die Expression von BMP-2 wird über die PGE-2-Produktion und dessen Bindung an den EP4-Rezeptor durch COX-2 reguliert (Arikawa et al., 2004; Welting et al., 2011). Eine BMP-2-Gabe wiederum erhöht die Expression von COX-2 (Caron et al., 2012; Welting et al., 2011). Daraus lassen sich Schlüsse auf einen positiven Feedbackmechanismus *in vivo* ziehen. NSAIDs wie Diclofenac sind also über eine Hemmung der Prostaglandinsynthese in der Lage, die Expression von BMPs zu hemmen. Mehrere Studien haben darüber hinaus gezeigt, dass durch eine BMP-2-Substitution die Frakturheilung verbessert werden kann (Cheng et al., 2016; Huang et al., 2018; Orth et al., 2017). In BMP-2-Knockout-Mäusen findet keine Frakturheilung statt, dagegen ist bei für BMP-2 heterozygoten Mäusen die Frakturheilung nur beeinträchtigt (Tsuji et al., 2006). So könnte durch eine verminderte BMP-2-Expression durch Diclofenac eine Verzögerung der Frakturheilung erklärt werden.

Hypertrophe Chondrozyten exprimieren RANKL und initiieren damit die Resorption der mineralisierten Knorpelmatrix durch Osteoklasten (Xiong et al., 2011). Wenn die Differenzierung von hypertrophen Chondrozyten durch Diclofenac gestört ist, lässt sich so auch die verminderte Osteoklastenzahl nach zwei Wochen erklären. In den histologischen Untersuchungen dieser Studie war die Osteoklastenzahl nach zwei Wochen vermindert und nach fünf Wochen erhöht. Dies spricht für eine Verzögerung des Remodelings mit vermehrter Resorption nach fünf Wochen.

Passend zur verminderten Osteoklastenzahl nach zwei Wochen war die Expression von Osteoprotegerin als Osteoklastogeneseinhibitor erhöht. Pathophysiologisch könnte die verstärkte Expression von Osteoprotegerin in Osteoblasten durch niedrige Prostaglandinlevel erklärt werden (Ramirez-Yanez & Symons, 2012), die wiederum Folge der NSAID-Wirkung sind. Karakawa et al. (2009) wiesen nach, dass Diclofenac im Zellkulturmodell die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu Osteoklasten inhibiert. Nach einer 48-stündigen Inkubation mit Diclofenac war die Anzahl TRAP-positiver Osteoklasten vermindert. Auch die Resorptionsfähigkeit war reduziert, was durch eine verminderte mRNA-Expression von Cathepsin K unterstrichen wurde. Unter Einfluss von Diclofenac wurde außerdem NF- κ B supprimiert, ein Faktor, der die Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung sowie die Expression von Cathepsin K

kontrolliert. Dies geschah über eine Akkumulation von IKB (Inhibitor of kappa beta) im Zytosol, was zu einer Supprimierung von NF- κ B und phosphoryliertem NF- κ B führte. In unserer Arbeit war die Osteoklastenzahl nach zwei Wochen signifikant erniedrigt, was durch die Hemmung der Osteoklastendifferenzierung durch Diclofenac erklärt werden könnte. Die erhöhte Osteoklastenzahl nach fünf Wochen würde dafür sprechen, dass Diclofenac die Osteoklastendifferenzierung nur verzögert, jedoch nicht verhindert.

Mehta et al. (2010) wiesen eine erhöhte Osteoklastenzahl bei Frakturheilung alter Ratten nach, welche mit einer verminderten Knochendichte und veränderten Trabekelstruktur assoziiert war. Dieser Effekt könnte durch Diclofenac verstärkt werden, da die erhöhte Osteoklastenzahl fünf Wochen nach Fraktur in der hier vorliegenden Arbeit mit einer gesteigerten Knochenresorption einherging. Endogene, durch COX-2-Induktion produzierte Prostaglandine verstärken die Stimulation der Osteoklastendifferenzierung durch verschiedene humorale Faktoren wie Interleukine, PTH oder BMP-2. Die fördernde Wirkung von PGE₂ auf die Knochenresorption wird durch eine indirekte Stimulierung über Induktion von RANKL und Inhibierung von OPG beschrieben (Blackwell et al., 2010). In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte OPG-Expression in Tieren, die mit Diclofenac behandelt wurden, festgestellt werden. Dies lässt sich sehr wahrscheinlich auf eine verminderte Prostaglandinproduktion zurückführen.

Spiro et al. untersuchten den Effekt von Diclofenac auf die Frakturheilung junger Mäuse. Dabei zeigte sich eine beeinträchtigte Frakturheilung in der Diclofenacgruppe in der computertomographischen sowie in der biomechanischen Analyse. Diesen Effekt führten die Autoren auf eine verminderte Expression des Osteogenese-fördernden Faktors BMP-7 über eine Hemmung von COX-2 zurück. In der gleichen Studie reduzierte Diclofenac die Trabekelzahl und Knochenmasse in zuvor induzierten ektopen Knochenformationen durch eine verminderte Osteoblastenzahl und -aktivität (Spiro et al., 2010). Gerstenfeld et al. (2003) untersuchten bei Ratten die mRNA-Expression von COX-1 und COX-2 während eines Zeitraums bis 42 Tage nach Fraktur. Die COX-1-Expression blieb dabei über den gesamten Zeitraum konstant, während die COX-2-Expression vor allem während der ersten 14 Tage erhöht war und an Tag 21 wieder das Ausgangsniveau erreicht hatte. Dennoch zeigte sich in derselben Studie eine stärkere Hemmung der Frakturheilung durch den nichtselektiven Cyclooxygenasehemmer Keterolac im Gegensatz zum selektiven COX-2-Hemmer Parecoxib. Die geringere Wirkung von Parecoxib führt Aspenberg jedoch auf eine nur zeitweise Hemmung von COX-2 durch Parecoxib aufgrund der kurzen Eliminationshalbwertszeit in Ratten zurück (Aspenberg, 2004).

In einer Studie, die die Versicherungsdaten von über 300000 Patienten mit Frakturen in den USA auswertete, wurden Risikofaktoren für die Ausbildung von Pseudarthrosen nach Fraktur betrachtet. Dabei zeigte sich das höchste Risiko für Patienten mit mehreren Frakturen, gefolgt von gleichzeitiger Einnahme von NSAIDs und Opioiden, Operationen, offenen Frakturen und Einnahme von Antikoagulantien. Osteoarthritis, die Einnahme von Antikonvulsiva, Diabetes, hochenergetische Traumata, Rauchen und Übergewicht waren weitere Risikofaktoren. Die Einnahme von NSAIDs alleine zeigte sogar ein leicht verringertes Risiko, während Opioide das Risiko erhöhten (Zura et al., 2016). Es wurde jedoch nicht zwischen selektiven und unselektiven NSAIDs unterschieden. Es kann zudem vermutet werden, dass der Effekt von Opioiden überschätzt wird, da andere Risikofaktoren wie eine hohe Anzahl an Frakturen, Operationen und hochenergetische Traumata mit einem erhöhten Gebrauch an Opioiden einhergehen. George et al. (2020) untersuchten ebenfalls Versicherungsdaten von über 300000 Patienten aus den USA in einem Zeitraum von 2000 bis 2015. Dabei wurden nur Frakturen an langen Röhrenknochen betrachtet. Pseudarthrosen mit notwendiger Therapie traten dabei innerhalb eines Jahres in 2,996% der Fälle auf. Unspezifische NSAIDs waren dabei nicht mit einem höheren Risiko für Pseudarthrosen verbunden (Odds-Ratio 1.07 [95 %-Konfidenzintervall (KI) 0.93 - 1.23]). Dagegen zeigte sich durch COX-2-Inhibitoren eine Erhöhung des Risikos (OR 1.84 [95 %-KI 1.38 - 2.46]). Auch Opioide waren mit einem erhöhten Risiko verbunden (OR 1.69 [95 %-KI: 1.53 - 1.86]), was jedoch Folge von mehr Hochenergie-Traumata in dieser Gruppe sein kann. Wurden NSAIDs oder COX-2-Inhibitoren schon vor der Fraktur eingenommen, lag ebenfalls ein erhöhtes Risiko vor. Limitation dieser Studie ist, dass nur verschreibungspflichtige Medikamente erfasst wurden. Rezeptfreie NSAIDs konnten nicht berücksichtigt werden. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass die Verwendung unspezifischer NSAIDs in üblichen Dosierungen wahrscheinlich sicher ist, die Einnahme von COX-2-Inhibitoren und Opioiden jedoch mit einem erhöhten Risiko für Pseudarthrosen nach Fraktur vergesellschaftet sein kann (George et al., 2020). Zwei weitere Arbeiten sehen den Zusammenhang zwischen NSAIDs und einer erhöhten Rate an Pseudarthrosen eher in einem chronischen Gebrauch von NSAIDs vor Eintreten der Fraktur (Buchheit et al., 2018; Hernandez et al., 2012). Eine epidemiologische Studie zeigte eine Korrelation zwischen der Verschreibung von COX-2-Inhibitoren und Pseudarthrosen. Die Rate der Pseudarthrosen fiel demnach nach dem Rückruf einiger COX-2-Inhibitoren im Jahr 2004 stark ab. Ebenfalls sank die Pseudarthrosenrate während eines Zeitraums verminderter NSAID-Verschreibungen, was für einen Zusammenhang sprechen könnte (Wang & Bhattacharyya, 2015). Eine prospektive Untersuchung an Patienten mit Tibiafrakturen zeigte dagegen keine Korrelation zwischen der Verwendung von NSAIDs und einer verschlechterten Frakturheilung (Schemitsch et al., 2012). Borgeat und Kollegen führten ein Review aus drei prospektiven kontrolliert

randomisierten Studien und 13 retrospektiven Kohortenstudien, die die Auswirkungen von NSAIDs auf die Frakturheilung beim Menschen untersucht hatten, durch. Sie konstatieren, dass die Qualität der Studien insgesamt eher niedrig ist und es keine starke Evidenz für einen negativen Effekt von NSAIDs auf die Frakturheilung gibt. Die Ergebnisse einzelner Studien waren jedoch sehr unterschiedlich, sodass es weiterer Untersuchungen bedarf (Borgeat et al., 2018). Eine weitere Metaanalyse konnte insgesamt ein erhöhtes Risiko für Pseudarthrosen durch NSAIDs nachweisen. Unter Betrachtung von qualitativ hochwertigeren Studien war dieser Effekt jedoch nicht mehr signifikant (Dodwell et al., 2010).

In einer kürzlich veröffentlichten Meta-Analyse tierexperimenteller Studien zur Frakturheilung unter Einfluss von NSAIDs zeigte sich eine Verschlechterung biomechanischer Eigenschaften sowie ein geringeres Knochenvolumen in computertomographischen Untersuchungen (Al-Waeli et al., 2021). Histologische Parameter zeigten keine signifikanten Unterschiede. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit. Wir konnten ebenfalls zeigen, dass die biomechanische Stabilität in der Drei-Punkt-Biegemessung sowie der Anteil an Knochengewebe in der Computertomographie nach Diclofenac-Gabe vermindert waren. Die Autoren der Meta-Analyse weisen wiederum auf eine generell hohe Heterogenität sowie geringe Qualität bisher verfügbarer Studien hin.

Da Diclofenac eine ähnliche Selektivität für COX-2 wie Celecoxib aufweist (FitzGerald & Patrono, 2001), muss die Substanz eventuell auch in die Gruppe der selektiven COX-2-Inhibitoren eingeordnet werden, was die Beeinflussung der Frakturheilung angeht. In Untersuchungen an menschlichen Frakturkallusgeweben zeigte sich im Falle einer Pseudarthrose eine verminderte COX-2-Expression sowie eine reduzierte Immunantwort im Vergleich zu normal heilenden Frakturen. Celecoxib reduzierte zudem *in vitro* das osteogene Potential von Osteoprogenitorzellen (Daluiski et al., 2006). Dieser Pathomechanismus könnte so auch für Diclofenac zutreffen.

Simon und Kollegen berichten in ihrer Studie an Ratten über vermehrte Dislokation des intramedullären Pins nach einer COX-2-Hemmung (Simon et al., 2002). Auch in der hier vorliegenden Arbeit konnten vermehrt Implantatdislokationen in der Diclofenac-Gruppe beobachtet werden (4 vs. 1 in der Kontrollgruppe).

In der Literatur finden sich vermehrt Hinweise für einen zeit- und dosisabhängigen Effekt von NSAIDs auf die Frakturheilung. So wurde in einer aktuellen Studie die zytotoxische Wirkung von Diclofenac auf Kulturen humaner Osteoblasten untersucht (Aguirre et al., 2021). Dabei konnte sowohl ein zeit- als auch dosisabhängiger Effekt beobachtet werden. Geusens et al. (2013) kommen in ihrem Review zu dem Schluss, dass in Tierstudien ein negativer Effekt von NSAIDs auf die Frakturheilung bei Gabe einer hohen Dosis über einen langen Zeitraum

zu beobachten war. Eine kurzzeitige Gabe blieb jedoch ohne negative Auswirkungen. Der Effekt auf die Knochenheilung war dabei auch abhängig von der Analysemethode. In histologischen Analysen zeigte sich seltener ein negativer Einfluss von Cyclooxygenasehemmern als in Fällen, in denen die Knochendichte (BMD) und die Biegesteifigkeit untersucht wurden. Auch beim Menschen ist die Datenlage nicht ganz eindeutig. Eine kurzzeitige Gabe übt jedoch auch hier wahrscheinlich keine wesentlichen negativen Effekte aus. Simon und O'Connor (2007) berichten über zeit- und dosisabhängige Effekte von COX-2-Inhibitoren auf die Frakturheilung. So zeigte die Gabe von Celecoxib vor Fraktur bzw. ab einem Zeitpunkt zwei Wochen nach Fraktur keinen Effekt. Wurde der selektive COX-2-Hemmer jedoch in der frühen inflammatorischen Phase der Frakturheilung verabreicht, zeigte sich eine verringerte mechanische Stabilität sowie eine erhöhte Rate an Pseudarthrosen. Gerstenfeld et al (2007) konnten diese zeit- und dosisabhängige Wirkung einer COX-2-Hemmung auf die Frakturheilung bestätigen. Sie untersuchten den Effekt des nichtselektiven NSAIDs Keterolac und des COX-2-Hemmers Valdecoxib auf die Frakturheilung bei Ratten. Sowohl nach sieben- als auch nach 21-tägiger Behandlung traten unter beiden Medikamenten mehr Pseudarthrosen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Der Effekt war jedoch zwei Wochen, nachdem die Medikamentengabe beendet wurde, reversibel. Die Prostaglandinlevel erholten sich und die mechanische Stabilität des Kallusgewebes glich sich derjenigen der Kontrollgruppe an. Interessanterweise senkte Keterolac den Prostaglandin-E2-Spiegel stärker ab als Valdecoxib, während unter Valdecoxib mehr Pseudarthrosen auftraten (Gerstenfeld et al., 2007). Krischak und Kollegen (2006) wiesen in histologischen Analysen die Abhängigkeit des Effekts von Diclofenac auf die Frakturheilung von der Dauer der Verabreichung nach. So war bei Ratten die Frakturheilung nach 21-tägiger Diclofenac-Gabe beeinträchtigt, eine kürzere Applikationsdauer von sieben Tagen zeigte jedoch keinen Einfluss. Kurmis et al. (2012) postulieren in ihrem Review von 316 Arbeiten, dass die kurzzeitige Gabe von NSAIDs keinen negativen Effekt auf die Frakturheilung beim Menschen auszuüben scheint. Die genaue Dauer einer kurzzeitigen Gabe wird jedoch leider nicht spezifiziert und die Autoren weisen auf einen Mangel an Evidenz hin, um Therapieregime bei gesunden Individuen zu verändern beziehungsweise gesunden Patienten NSAIDs zur Schmerztherapie nach Frakturen vorzuenthalten. Marquez-Lara und Kollegen (2016) haben sich in ihrem Review vor allem mit der Qualität der Studien zum Thema NSAIDs und Knochenheilung beschäftigt. Sie konstatieren, dass es bisher keine klare Evidenz gibt, die eine Vermeidung von NSAIDs nach Frakturen rechtfertigen würde und unterstreichen noch einmal die Forderung nach großen klinischen Studien zur Untersuchung der Auswirkungen von NSAIDs auf die Frakturheilung. Fader et al. (2018) haben retrospektiv die Einnahme von Opioiden mit der Einnahme von NSAIDs bezüglich der Effekte auf die Frakturheilung nach Tibiafrakturen verglichen. Dabei

traten keine Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen auf, was als Hinweis für eine sichere Verwendung von NSAIDs zumindest in einem kurzen Zeitraum direkt nach Fraktur gewertet werden könnte. Wheatley und Kollegen (2019) führten eine Metaanalyse von Studien durch, welche insgesamt über 15000 frakturierte Knochen einschließen. Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, dass NSAIDs die Frakturheilung im Erwachsenenalter, jedoch nicht im Kindesalter verzögern. Der Effekt ist zudem wahrscheinlich abhängig von Dosis und Dauer der Verabreichung. So zeigte sich bei niedrigen Dosen – im Falle von Diclofenac weniger als 125mg/Tag – und einer geringen Verabreichungsdauer – weniger als zwei Wochen – keine negativen Auswirkungen auf die Frakturheilung. Erklärung dafür könnte sein, dass eine geringere oder kürzere Hemmung der Prostaglandinsynthese eine Erholung beziehungsweise ein langsames Fortschreiten der Frakturheilung ermöglicht. Die Autoren bemängeln jedoch auch, dass die zur Verfügung stehenden Daten sehr heterogen sind.

Die Assoziation einer NSAID-Einnahme an Tag 61 bis 90 nach Fraktur mit einer erhöhten Rate an Pseudarthrosen ist mit ziemlicher Sicherheit auf einen erhöhten Analgetikabedarf bei Patienten mit Heilungsstörungen zurückzuführen und spiegelt nicht den Effekt von NSAIDs auf die Frakturheilung wieder (Bhattacharyya et al., 2005).

Aufgrund ihrer Eigenschaften als Inhibitor ektoper Knochenbildung werden NSAIDs zur Prophylaxe heterotoper Kalzifikationen nach Hüftoperationen eingesetzt (Grohs et al., 2007). Diclofenac scheint dabei ab einer Verabreichungsdauer von neun Tagen effektiv eine heterotop Ossifikation zu verhindern (Haffer et al., 2020; Winkler et al., 2016). Dies könnte darauf schließen lassen, dass ab dieser Dauer auch die Knochenbildung während der Frakturheilung gehemmt würde. Ein Zeitraum geringer als neun Tage könnte dann eventuell als unbedenklicher in Hinblick auf die Beeinflussung der Frakturheilung gewertet werden.

Es existiert die Theorie, dass eine Hemmung der Cyclooxygenase Arachidonsäure eher dem Leukotrienpfad zuführt. Leukotriene sind dafür bekannt, die Osteoblastenproliferation und -aktivität zu hemmen, während sie die Osteoklastenproliferation und -aktivität steigern. So könnte durch eine Hemmung der Cyclooxygenase der hemmende Einfluss der Leukotriene auf die Frakturheilung überwiegen (Cottrell & O'Connor, 2009, 2010). Die Leukotrienkonzentration wurde in der hier vorliegenden Studie nicht gemessen, sodass sich dieser mögliche Pathomechanismus nicht überprüfen lässt.

In unserer Studie wurde nicht untersucht, ob der Effekt einer zweiwöchigen Behandlung mit Diclofenac reversibel ist. Die tägliche Gabe über fünf Wochen entspricht nicht klinischen Szenarien, in denen NSAIDs eher für die Behandlung akuter Schmerzen und Schwellungen nach Fraktur eingesetzt werden.

Unspezifische NSAIDs wie Indomethacin scheinen die Frakturheilung nur zu verzögern, nicht vollständig aufzuhalten. So waren die mechanischen Eigenschaften in Studien bei mit Indomethacin behandelten Tieren zu Beginn eingeschränkt, jedoch zu einem Zeitpunkt von acht beziehungsweise 12 Wochen nach Fraktur wieder mit den Eigenschaften von Tieren der Kontrollgruppe vergleichbar (Brown et al., 2004; Mullis et al., 2006; Simon et al., 2002). Dies könnte auch zu einem späteren Zeitpunkt der Frakturheilung auf eine Behandlung mit Diclofenac zutreffen.

In dieser Arbeit wurde aufgrund interfragmentärer Bewegungen nur die sekundäre Knochenheilung untersucht, nicht die primäre Knochenheilung. Die Wirkungen von NSAIDs auf beide Formen könnten jedoch unterschiedlich sein (Su & O'Connor, 2013).

Mit zunehmender Alterung der Gesellschaft wird auch der Gebrauch an NSAIDs in gleichem Maße wie die Prävalenz schmerzhafter muskuloskelettaler Degeneration zunehmen (Abdul-Hadi et al., 2009). Dadurch wird auch eine abschließende Aussage hinsichtlich der Sicherheit von NSAIDs nach Frakturen immer mehr an Bedeutung gewinnen. Bis eindeutige klinische Evidenz existiert, wird die Verwendung von NSAIDs weiterhin umstritten bleiben. Bei NSAID-Gabe müssen deshalb die Risiken gegenüber dem Nutzen abgewogen werden, vor allem bei Patienten mit Risikofaktoren.

Zur Prophylaxe gastrointestinaler Ulzera werden NSAIDs meist mit Protoneninhibitoren wie Pantoprazol kombiniert. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass Pantoprazol sowohl bei jungen als auch bei alten Tieren (Histing et al., 2012; Menger et al., 2020) die Frakturheilung negativ beeinflusst. Es bleibt zu untersuchen, ob sich die negativen Effekte einer NSAID-Therapie mit denen einer Pantoprazol-Therapie gegenseitig addieren.

Goldstandard in der Schmerztherapie nach Frakturen sollte sicherlich eine multimodale Schmerztherapie inklusive regionalanästhetischer Verfahren sein, bei welcher sich die Effekte einzelner Substanzen synergistisch und additiv ergänzen und so Nebenwirkungen reduziert werden können (Abualnadi et al., 2019; Kumar et al., 2017; Mavrogenis et al., 2018; Saranteas et al., 2019).

6 Schlussfolgerung

Diclofenac beeinträchtigt die Frakturheilung bei alten Mäusen. Eine Behandlung mit Diclofenac verringert die mechanische Stabilität frakturierter Knochen in der Drei-Punkt-Biegemessung. Darüber hinaus ist die Knochenneubildung vermindert, was durch einen geringeren Knochenanteil in computertomographischen Bildern deutlich wird. Die histologische Analyse zeigt eine Verzögerung des Remodelings mit einem geringeren Anteil an reifem Lamellenknochen. Dies geht einher mit einer verminderten Osteoklastenzahl nach zwei Wochen und einer erhöhten Osteoklastenzahl nach fünf Wochen, sehr wahrscheinlich bedingt durch eine Beeinflussung des OPG/RANK/RANKL-Systems. Die verminderte Expression der Knochenformationsmarker BMP-2 und CYR61 könnte mitverantwortlich für die verzögerte Frakturheilung durch eine Therapie mit Diclofenac sein.

Die Ergebnisse tierexperimenteller Studien können immer nur bedingt auf den Menschen übertragen werden. Dennoch unterstützt diese Arbeit bereits vorhandene Bedenken bei der Verwendung von NSAIDs im Zusammenhang mit der Frakturheilung. Die Behandlung mit Diclofenac bei älteren Patienten sollte daher kritisch beurteilt werden.

7 Literaturverzeichnis

- Abdul-Hadi, O., Parvizi, J., Austin, M. S., Viscusi, E. & Einhorn, T. (2009). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in orthopaedics. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 91 (8), 2020–2027.
- Abe, E., Yamamoto, M., Taguchi, Y., Lecka-Czernik, B., O'Brien, C. A., Economides, A. N. et al. (2000). Essential Requirement of BMPs-2/4 for Both Osteoblast and Osteoclast Formation in Murine Bone Marrow Cultures from Adult Mice: Antagonism by Noggin. *Journal of Bone and Mineral Research*, 15 (4), 663–673. doi:10.1359/jbmr.2000.15.4.663
- Abualnadi, N., Dizon, A. M. & Schiff, L. (2019). Opioid Adjuncts: Optimizing Opioid Therapy With Nonopioid Medications. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 62 (1), 37–47. doi:10.1097/GRF.0000000000000423
- Aguirre, J., Bonvini, J. M., Rupnik, B., Camponovo, C., Saporito, A. & Borgeat, A. (2021). Inflammation reduces osteoblast cytotoxicity induced by diclofenac: An in vitro study. *European Journal of Anaesthesiology | EJA*, 38, S24. doi:10.1097/EJA.0000000000001363
- Ajubi, N. E., Klein-Nulend, J., Nijweide, P. J., Vrijheid-Lammers, T., Alblas, M. J. & Burger, E. H. (1996). Pulsating fluid flow increases prostaglandin production by cultured chicken osteocytes--a cytoskeleton-dependent process. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 225 (1), 62–68. doi:10.1006/bbrc.1996.1131
- Akdur, N. C., Donmez, M., Gozel, S., Ustun, H. & Hucumenoglu, S. (2013). Intravascular papillary endothelial hyperplasia: histomorphological and immunohistochemical features. *Diagnostic Pathology*, 8 (1), 167. doi:10.1186/1746-1596-8-167
- Alfaro, R. A. & Davis, D. D. (2020). *Diclofenac. StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. Zugriff am 6.5.2021. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557879/>

- Alfaro, R. A. & Davis, D. D. (2021). Diclofenac. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Zugriff am 9.6.2021. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557879/>
- Alt, V., Thormann, U., Ray, S., Zahner, D., Dürselen, L., Lips, K. et al. (2013). A new metaphyseal bone defect model in osteoporotic rats to study biomaterials for the enhancement of bone healing in osteoporotic fractures. *Acta Biomaterialia*, 9 (6), 7035–7042. doi:10.1016/j.actbio.2013.02.002
- Altman, R., Bosch, B., Brune, K., Patrignani, P. & Young, C. (2015). Advances in NSAID Development: Evolution of Diclofenac Products Using Pharmaceutical Technology. *Drugs*, 75 (8), 859–877. doi:10.1007/s40265-015-0392-z
- Al-Waeli, H., Reboucas, A. P., Mansour, A., Morris, M., Tamimi, F. & Nicolau, B. (2021). Non-steroidal anti-inflammatory drugs and bone healing in animal models—a systematic review and meta-analysis. *Systematic Reviews*, 10, 201. doi:10.1186/s13643-021-01690-w
- Andrew, J. G., Andrew, S. M., Freemont, A. J. & Marsh, D. R. (1994). Inflammatory cells in normal human fracture healing. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 65 (4), 462–466. Taylor & Francis. doi:10.3109/17453679408995493
- Arikawa, T., Omura, K. & Morita, I. (2004). Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 200 (3), 400–406. doi:<https://doi.org/10.1002/jcp.20031>
- Arras, M., Becker, K., Bergadano, A., Durst, M., Eberspächer-Schweda, E., Fleischmann, T. et al. (2020). Schmerztherapie bei Versuchstieren: Fachinformation aus dem Ausschuss für Anästhesie der GV-SOLAS in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis 4 in der TVT. *Schmerztherapie bei Versuchstieren*. Die Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS).
- Aspenberg, P. (2004). Differential inhibition of fracture healing by non-selective and cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of*

- Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 22 (3), 684; author reply 685. doi:10.1016/j.orthres.2004.01.002
- Athanasopoulos, A. N., Schneider, D., Keiper, T., Alt, V., Pendurthi, U. R., Liegibel, U. M. et al. (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced up-regulation of CCN1 in osteoblasts mediates proangiogenic activities in endothelial cells and promotes fracture healing. *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (37), 26746–26753. doi:10.1074/jbc.M705200200
- Augat, P., Burger, J., Schorlemmer, S., Henke, T., Peraus, M. & Claes, L. (2003). Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model. *Journal of Orthopaedic Research*, 21 (6), 1011–1017. doi:10.1016/S0736-0266(03)00098-6
- Aumüller, G., Aust, G., Conrad, A., Engele, J. & Kirsch, J. (2020). *Duale Reihe Anatomie* (Band 1). Thieme.
- Babic, A. M., Kireeva, M. L., Kolesnikova, T. V. & Lau, L. F. (1998). CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (11), 6355–6360.
- Baertl, S., Alt, V. & Rupp, M. (2021). Surgical enhancement of fracture healing – operative vs. nonoperative treatment. *Injury*, 52, S12–S17. Elsevier. doi:10.1016/j.injury.2020.11.049
- Bais, M. V., Wigner, N., Young, M., Toholka, R., Graves, D. T., Morgan, E. F. et al. (2009). BMP2 is essential for post natal osteogenesis but not for recruitment of osteogenic stem cells. *Bone*, 45 (2), 254–266. doi:10.1016/j.bone.2009.04.239
- Barna, M. & Niswander, L. (2007). Visualization of Cartilage Formation: Insight into Cellular Properties of Skeletal Progenitors and Chondrodysplasia Syndromes. *Developmental Cell*, 12 (6), 931–941. doi:10.1016/j.devcel.2007.04.016
- Beck, A., Krischak, G., Sorg, T., Augat, P., Farker, K., Merkel, U. et al. (2003). Influence of diclofenac (group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs) on fracture healing.

- Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 123 (7), 327–332.
doi:10.1007/s00402-003-0537-5
- Bhattacharyya, T., Levin, R., Vrahas, M. S. & Solomon, D. H. (2005). Nonsteroidal antiinflammatory drugs and nonunion of humeral shaft fractures. *Arthritis and Rheumatism*, 53 (3), 364–367. doi:10.1002/art.21170
- Bissinger, O., Kreutzer, K., Götz, C., Hapfelmeier, A., Pautke, C., Vogt, S. et al. (2016). A biomechanical, micro-computertomographic and histological analysis of the influence of diclofenac and prednisolone on fracture healing in vivo. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 17 (1), 383. doi:10.1186/s12891-016-1241-2
- Blackwell, K. A., Raisz, L. G. & Pilbeam, C. C. (2010). Prostaglandins in Bone: Bad Cop, Good Cop? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 21 (5), 294–301. doi:10.1016/j.tem.2009.12.004
- Blair, H., Teitelbaum, S., Ghiselli, R. & Gluck, S. (1989). Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science*, 245 (4920), 855–857. doi:10.1126/science.2528207
- Bogen, S., Pak, J., Garifallou, M., Deng, X. & Muller, W. A. (1994). Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 179 (3), 1059–1064. doi:10.1084/jem.179.3.1059
- Bolander, M. E. (1992). Regulation of fracture repair by growth factors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 200 (2), 165–170. doi:10.3181/00379727-200-43410a
- Bonewald, L. F. (2011). The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26 (2), 229–238. doi:10.1002/jbmr.320
- Bonnarens, F. & Einhorn, T. A. (1984). Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *Journal of Orthopaedic Research*, 2 (1), 97–101. doi:10.1002/jor.1100020115
- Borgeat, A., Ofner, C., Saporito, A., Farshad, M. & Aguirre, J. (2018). The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on bone healing in humans: A qualitative,

- systematic review. *Journal of Clinical Anesthesia*, 49, 92–100.
doi:10.1016/j.jclinane.2018.06.020
- Borgström, F., Karlsson, L., Ortsäter, G., Norton, N., Halbout, P., Cooper, C. et al. (2020). Fragility fractures in Europe: burden, management and opportunities. *Archives of Osteoporosis*, 15 (1), 59. doi:10.1007/s11657-020-0706-y
- Bosemark, P., Isaksson, H., McDonald, M. M., Little, D. G. & Tägil, M. (2013). Augmentation of autologous bone graft by a combination of bone morphogenic protein and bisphosphonate increased both callus volume and strength. *Acta Orthopaedica*, 84 (1), 106–111. doi:10.3109/17453674.2013.773123
- Bostrom, M. P. G. (1998). Expression of Bone Morphogenetic Proteins in Fracture Healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 355, S116.
- Bostrom, M. P., Lane, J. M., Berberian, W. S., Missri, A. A., Tomin, E., Weiland, A. et al. (1995). Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 13 (3), 357–367. doi:10.1002/jor.1100130309
- Bouxsein, M. L., Boyd, S. K., Christiansen, B. A., Guldberg, R. E., Jepsen, K. J. & Müller, R. (2010). Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25 (7), 1468–1486. doi:10.1002/jbmr.141
- Boyle, W. J., Simonet, W. S. & Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423 (6937), 337–342. doi:10.1038/nature01658
- Brater, D. C. (2002). Anti-inflammatory agents and renal function. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 32 (3, Supplement), 33–42. doi:10.1053/sarh.2002.37216
- Brighton, C. T., Schaffer, J. L., Shapiro, D. B., Tang, J. J. S. & Clark, C. C. (1991). Proliferation and macromolecular synthesis by rat calvarial bone cells grown in various oxygen tensions. *Journal of Orthopaedic Research*, 9 (6), 847–854. doi:https://doi.org/10.1002/jor.1100090610

- Brown, K. M., Saunders, M. M., Kirsch, T., Donahue, H. J. & Reid, J. S. (2004). Effect of COX-2-Specific Inhibition on Fracture-Healing in the Rat Femur. *JBJS*, 86 (1), 116–123.
- Brunet, L. J., McMahon, J. A., McMahon, A. P. & Harland, R. M. (1998). Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science (New York, N.Y.)*, 280 (5368), 1455–1457. doi:10.1126/science.280.5368.1455
- Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C. R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C. et al. (1998). osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes & Development*, 12 (9), 1260–1268. doi:10.1101/gad.12.9.1260
- Bucher, C. H., Schlundt, C., Wulsten, D., Sass, F. A., Wendler, S., Ellinghaus, A. et al. (2019). Experience in the Adaptive Immunity Impacts Bone Homeostasis, Remodeling, and Healing. *Frontiers in Immunology*, 10, 797. doi:10.3389/fimmu.2019.00797
- Buchheit, T., Zura, R., Wang, Z., Mehta, S., Della Rocca, G. J. & Steen, R. G. (2018). Opioid exposure is associated with nonunion risk in a traumatically injured population: An inception cohort study. *Injury*, 49 (7), 1266–1271. doi:10.1016/j.injury.2018.05.004
- Butcher, C. K. & Marsh, D. R. (1996). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs delay tibial fracture union. *Injury*, 27 (5), 375. doi:10.1016/0020-1383(96)86874-4
- Cai, L., Wang, Z., Luo, X., She, W. & Zhang, H. (2019). Optimal strategies for the prevention of heterotopic ossification after total hip arthroplasty: A network meta-analysis. *International Journal of Surgery*, 62, 74–85. doi:10.1016/j.ijssu.2018.12.011
- Calori, G. M., Colombo, M., Mazza, E. L., Mazzola, S., Malagoli, E., Marelli, N. et al. (2014). Validation of the Non-Union Scoring System in 300 long bone non-unions (Update in Traumatology: The Italian Perspective). *Injury*, 45, S93–S97. doi:10.1016/j.injury.2014.10.030
- Calori, G. M., Phillips, M., Jeetle, S., Tagliabue, L. & Giannoudis, P. V. (2008). Classification of non-union: Need for a new scoring system? (5th European Symposium on Tissue

- Engineering: Bone Biology Congress 2008). *Injury*, 39, S59–S63. doi:10.1016/S0020-1383(08)70016-0
- Canalis, E., Economides, A. N. & Gaggero, E. (2003). Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocrine Reviews*, 24 (2), 218–235. doi:10.1210/er.2002-0023
- Canalis, E., Giustina, A. & Bilezikian, J. P. (2007). Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. *The New England Journal of Medicine*, 357 (9), 905–916. doi:10.1056/NEJMra067395
- Cao, X. & Chen, D. (2005). The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene*, 357 (1), 1–8. doi:10.1016/j.gene.2005.06.017
- Carlevaro, M. F., Cermelli, S., Cancedda, R. & Descalzi Cancedda, F. (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *Journal of Cell Science*, 113 (Pt 1), 59–69.
- Caron, M. M. J., Emans, P. J., Surtel, D. A. M., Cremers, A., Voncken, J. W., Welting, T. J. M. et al. (2012). Activation of NF- κ B/p65 Facilitates Early Chondrogenic Differentiation during Endochondral Ossification. (F. Beier, Hrsg.) *PLoS ONE*, 7 (3), e33467. doi:10.1371/journal.pone.0033467
- Castellone, M. D., Teramoto, H., Williams, B. O., Druey, K. M. & Gutkind, J. S. (2005). Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science (New York, N.Y.)*, 310 (5753), 1504–1510. doi:10.1126/science.1116221
- Catella-Lawson, F., Reilly, M. P., Kapoor, S. C., Cucchiara, A. J., DeMarco, S., Tournier, B. et al. (2009, August 20). Cyclooxygenase Inhibitors and the Antiplatelet Effects of Aspirin. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa003199>. research-article, Massachusetts Medical Society. doi:10.1056/NEJMoa003199
- Chang, J.-K., Li, C.-J., Liao, H.-J., Wang, C.-K., Wang, G.-J. & Ho, M.-L. (2009). Anti-inflammatory drugs suppress proliferation and induce apoptosis through altering

- expressions of cell cycle regulators and pro-apoptotic factors in cultured human osteoblasts. *Toxicology*, 258 (2), 148–156. doi:10.1016/j.tox.2009.01.016
- Chen, C.-C. & Lau, L. F. (2009). Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41 (4), 771–783. doi:10.1016/j.biocel.2008.07.025
- Cheng, T. L., Schindeler, A. & Little, D. G. (2016). BMP-2 delivered via sucrose acetate isobutyrate (SAIB) improves bone repair in a rat open fracture model. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 34 (7), 1168–1176. doi:10.1002/jor.23131
- Cheung, K. M. C., Kaluarachi, K., Andrew, G., Lu, W., Chan, D. & Cheah, K. S. E. (2003). An externally fixed femoral fracture model for mice. *Journal of Orthopaedic Research*, 21 (4), 685–690. doi:https://doi.org/10.1016/S0736-0266(03)00026-3
- Cheung, W. H., Miclau, T., Chow, S. K.-H., Yang, F. F. & Alt, V. (2016). Fracture healing in osteoporotic bone (Osteoporotic fracture fixation — a biomechanical perspective). *Injury*, 47, S21–S26. doi:10.1016/S0020-1383(16)47004-X
- Cheung, W. H., Wong, R. M. Y., Choy, V. M. H., Li, M. C. M., Cheng, K. Y. K. & Chow, S. K. H. (2021). Enhancement of osteoporotic fracture healing by vibration treatment: The role of osteocytes. *Injury*, 52, S97–S100. Elsevier. doi:10.1016/j.injury.2020.05.020
- Cheung, W. Y., Fritton, J. C., Morgan, S. A., Seref-Ferlengez, Z., Basta-Pljakic, J., Thi, M. M. et al. (2016). Pannexin-1 and P2X7-Receptor Are Required for Apoptotic Osteocytes in Fatigued Bone to Trigger RANKL Production in Neighboring Bystander Osteocytes. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 31 (4), 890–899. doi:10.1002/jbmr.2740
- Chikazu, D., Li, X., Kawaguchi, H., Sakuma, Y., Voznesensky, O. S., Adams, D. J. et al. (2002). Bone Morphogenetic Protein 2 Induces Cyclo-oxygenase 2 in Osteoblasts via a Cbfa1 Binding Site: Role in Effects of Bone Morphogenetic Protein 2 In Vitro and In Vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17 (8), 1430–1440. doi:10.1359/jbmr.2002.17.8.1430

- Cho, T.-J., Gerstenfeld, L. C. & Einhorn, T. A. (2002). Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 17 (3), 513–520. doi:10.1359/jbmr.2002.17.3.513
- Choudhary, S., Blackwell, K., Voznesensky, O., Roy, A. D. & Pilbeam, C. (2013). Prostaglandin E2 acts via bone marrow macrophages to block PTH-stimulated osteoblast differentiation in vitro. *Bone*, 56 (1), 31–41. doi:10.1016/j.bone.2013.04.017
- Claes, L. (2017). Mechanobiologie der Frakturheilung Teil 1. *Der Unfallchirurg*, 120 (1), 14–22. doi:10.1007/s00113-016-0280-3
- Claes, L. (2021). Improvement of clinical fracture healing – What can be learned from mechano-biological research? *Journal of Biomechanics*, 115, 110148. doi:10.1016/j.jbiomech.2020.110148
- Claes, L., Augat, P., Suger, G. & Wilke, H. J. (1997). Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 15 (4), 577–584. doi:10.1002/jor.1100150414
- Claes, L. E., Heigele, C. A., Neidlinger-Wilke, C., Kaspar, D., Seidl, W., Margevicius, K. J. et al. (1998). Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (355 Suppl), S132-147. doi:10.1097/00003086-199810001-00015
- Claes, L., Maurer-Klein, N., Henke, T., Gerngross, H., Melnyk, M. & Augat, P. (2006). Moderate soft tissue trauma delays new bone formation only in the early phase of fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research*, 24 (6), 1178–1185. doi:10.1002/jor.20173

- Claes, L., Veeseer, A., Göckelmann, M., Simon, U. & Ignatius, A. (2009). A novel model to study metaphyseal bone healing under defined biomechanical conditions. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 129 (7), 923–928. doi:10.1007/s00402-008-0692-9
- Clark, D., Brazina, S., Yang, F., Hu, D., Hsieh, C. L., Niemi, E. C. et al. (2020). Age-related changes to macrophages are detrimental to fracture healing in mice. *Aging Cell*, 19 (3). doi:10.1111/acer.13112
- Clark, D., Nakamura, M., Miclau, T. & Marcucio, R. (2017). Effects of Aging on Fracture Healing. *Current Osteoporosis Reports*, 15 (6), 601–608. doi:10.1007/s11914-017-0413-9
- Clarke, B. (2008). Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3 (Supplement 3), S131–S139. doi:10.2215/CJN.04151206
- Colnot, C., Huang, S. & Helms, J. (2006). Analyzing the cellular contribution of bone marrow to fracture healing using bone marrow transplantation in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 350 (3), 557–561. doi:10.1016/j.bbrc.2006.09.079
- Cottrell, J. A. & O'Connor, J. P. (2009). Pharmacological inhibition of 5-lipoxygenase accelerates and enhances fracture-healing. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 91 (11), 2653–2665. doi:10.2106/JBJS.H.01844
- Cottrell, J. & O'Connor, J. P. (2010). Effect of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on Bone Healing. *Pharmaceuticals*, 3 (5), 1668–1693. doi:10.3390/ph3051668
- Coxib and traditional NSAID Trialists' (CNT) Collaboration, Bhala, N., Emberson, J., Merhi, A., Abramson, S., Arber, N. et al. (2013). Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials. *Lancet (London, England)*, 382 (9894), 769–779. doi:10.1016/S0140-6736(13)60900-9
- Cross, M. J., Dixelius, J., Matsumoto, T. & Claesson-Welsh, L. (2003). VEGF-receptor signal transduction. *Trends in Biochemical Sciences*, 28 (9), 488–494. doi:10.1016/S0968-0004(03)00193-2

- Daluiski, A., Ramsey, K. E., Shi, Y., Bostrom, M. P., Nestor, B. J., Martin, G. et al. (2006). Cyclooxygenase-2 inhibitors in human skeletal fracture healing. *Orthopedics*, 29 (3), 259–261. doi:10.3928/01477447-20060301-02
- Davies, N. M. & Anderson, K. E. (1997). Clinical Pharmacokinetics of Diclofenac: Therapeutic Insights and Pitfalls. *Clinical Pharmacokinetics*, 33 (3), 184–213. doi:10.2165/00003088-199733030-00003
- Day, T. F., Guo, X., Garrett-Beal, L. & Yang, Y. (2005). Wnt/ β -Catenin Signaling in Mesenchymal Progenitors Controls Osteoblast and Chondrocyte Differentiation during Vertebrate Skeletogenesis. *Developmental Cell*, 8 (5), 739–750. Elsevier. doi:10.1016/j.devcel.2005.03.016
- Deckers, M. M. L., van Bezooijen, R. L., van der Horst, G., Hoogendam, J., van Der Bent, C., Papapoulos, S. E. et al. (2002). Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology*, 143 (4), 1545–1553. doi:10.1210/endo.143.4.8719
- Dekel, S., Lenthall, G. & Francis, M. (1981). Release of prostaglandins from bone and muscle after tibial fracture. An experimental study in rabbits. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume*, 63-B (2), 185–189. The British Editorial Society of Bone & Joint Surgery. doi:10.1302/0301-620X.63B2.7217139
- Dimitriou, R., Tsiridis, E. & Giannoudis, P. V. (2005). Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*, 36 (12), 1392–1404. doi:10.1016/j.injury.2005.07.019
- Dishowitz, M. I., Mutyaba, P. L., Takacs, J. D., Barr, A. M., Engiles, J. B., Ahn, J. et al. (2013). Systemic Inhibition of Canonical Notch Signaling Results in Sustained Callus Inflammation and Alters Multiple Phases of Fracture Healing. (S. Gronthos, Hrsg.) *PLoS ONE*, 8 (7), e68726. doi:10.1371/journal.pone.0068726
- Dodwell, E. R., Latorre, J. G., Parisini, E., Zwettler, E., Chandra, D., Mulpuri, K. et al. (2010). NSAID exposure and risk of nonunion: a meta-analysis of case-control and cohort studies. *Calcified Tissue International*, 87 (3), 193–202. doi:10.1007/s00223-010-9379-7

- DuBois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. A., Simon, L. S., Putte, L. B. A. et al. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB Journal*, 12 (12), 1063–1073. doi:10.1096/fasebj.12.12.1063
- Ducy, P. (2000). The Osteoblast: A Sophisticated Fibroblast under Central Surveillance. *Science*, 289 (5484), 1501–1504. doi:10.1126/science.289.5484.1501
- Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C. et al. (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*, 382 (6590), 448–452. doi:10.1038/382448a0
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L. & Karsenty, G. (1997). *Osf2/Cbfa1*: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. *Cell*, 89 (5), 747–754. doi:10.1016/S0092-8674(00)80257-3
- Duscher, D., Rennert, R. C., Januszyk, M., Anghel, E., Maan, Z. N., Whittam, A. J. et al. (2015). Aging disrupts cell subpopulation dynamics and diminishes the function of mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*, 4 (1), 7144. doi:10.1038/srep07144
- Edgar, C. M., Chakravarthy, V., Barnes, G., Kakar, S., Gerstenfeld, L. C. & Einhorn, T. A. (2007). Autogenous regulation of a network of bone morphogenetic proteins (BMPs) mediates the osteogenic differentiation in murine marrow stromal cells. *Bone*, 40 (5), 1389–1398. doi:10.1016/j.bone.2007.01.001
- Effendy, N. M., Khamis, M. F. & Shuid, A. N. (2013). Micro-CT assessments of potential anti-osteoporotic agents. *Current Drug Targets*, 14 (13), 1542–1551. doi:10.2174/13894501113149990196
- Ehnert, S., Rinderknecht, H., Aspera-Werz, R. H., Häussling, V. & Nussler, A. K. (2020). Use of in vitro bone models to screen for altered bone metabolism, osteopathies, and fracture healing: challenges of complex models. *Archives of Toxicology*, 94 (12), 3937–3958. doi:10.1007/s00204-020-02906-z
- Einhorn, T. A. (1995). Enhancement of fracture-healing. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 77 (6), 940–956. doi:10.2106/00004623-199506000-00016

- Einhorn, T. A. (1998). The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing: *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 355S, S7–S21. doi:10.1097/00003086-199810001-00003
- Einhorn, T. A. & Gerstenfeld, L. C. (2015). Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nature reviews. Rheumatology*, 11 (1), 45–54. doi:10.1038/nrrheum.2014.164
- Engsig, M. T., Chen, Q. J., Vu, T. H., Pedersen, A. C., Therkidsen, B., Lund, L. R. et al. (2000). Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *The Journal of Cell Biology*, 151 (4), 879–889. doi:10.1083/jcb.151.4.879
- Epari, D. R., Duda, G. N. & Thompson, M. S. (2010). Mechanobiology of bone healing and regeneration: in vivo models. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of Engineering in Medicine*, 224 (12), 1543–1553. doi:10.1243/09544119JEIM808
- Fader, L., Whitaker, J., Lopez, M., Vivace, B., Parra, M., Carlson, J. et al. (2018). Tibia fractures and NSAIDs. Does it make a difference? A multicenter retrospective study. *Injury*, 49 (12), 2290–2294. doi:10.1016/j.injury.2018.09.024
- Felsenberg, D. (2001). Struktur und Funktion des Knochens: Stützwerk aus Kollagen und Hydroxylapatit. *Pharmazie in unserer Zeit*, 30 (6), 488–494. doi:10.1002/1615-1003(200111)30:6<488::AID-PAUZ488>3.0.CO;2-U
- Ferguson, C., Alpern, E., Miclau, T. & Helms, J. A. (1999). Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mechanisms of Development*, 87 (1–2), 57–66. doi:10.1016/s0925-4773(99)00142-2
- Ferrara, N., Gerber, H.-P. & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9 (6), 669–676. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nm0603-669
- Feyen, J. H. M., van der Wilt, G., Moonen, P., Di Bon, A. & Nijweide, P. J. (1984). Stimulation of arachidonic acid metabolism in primary cultures of osteoblast-like cells by hormones and drugs. *Prostaglandins*, 28 (6), 769–781. doi:10.1016/0090-6980(84)90034-0

- FitzGerald, G. A. & Patrono, C. (2001). The Coxibs, Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2. (A.J.J. Wood, Hrsg.) *New England Journal of Medicine*, 345 (6), 433–442. doi:10.1056/NEJM200108093450607
- Forwood, M. R., Kelly, W. L. & Worth, N. F. (1998). Localisation of prostaglandin endoperoxide H synthase (PGHS)-1 and PGHS-2 in bone following mechanical loading in vivo. *The Anatomical Record*, 252 (4), 580–586. doi:10.1002/(SICI)1097-0185(199812)252:4<580::AID-AR8>3.0.CO;2-S
- Foulke, B. A., Kendal, A. R., Murray, D. W. & Pandit, H. (2016). Fracture healing in the elderly: A review. *Maturitas*, 92, 49–55. doi:10.1016/j.maturitas.2016.07.014
- Frey, S. P., Doht, S., Eden, L., Dannigkeit, S., Schuetze, N., Meffert, R. H. et al. (2012). Cysteine-rich matricellular protein improves callus regenerate in a rabbit trauma model. *International Orthopaedics*, 36 (11), 2387–2393. doi:10.1007/s00264-012-1659-6
- Frost, H. M. (1969). Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcified Tissue Research*, 3 (1), 211–237. doi:10.1007/BF02058664
- Garcia, P., Herwerth, S., Matthys, R., Holstein, J. H., Histing, T., Menger, M. D. et al. (2011). The LockingMouseNail--a new implant for standardized stable osteosynthesis in mice. *The Journal of Surgical Research*, 169 (2), 220–226. doi:10.1016/j.jss.2009.11.713
- García Rodríguez, L. A. & Hernández-Díaz, S. (2003). Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs as a Trigger of Clinical Heart Failure. *Epidemiology*, 14 (2), 240–246. doi:10.1097/01.EDE.0000034633.74133.C3
- García Rodríguez, L. A., Tacconelli, S. & Patrignani, P. (2008). Role of Dose Potency in the Prediction of Risk of Myocardial Infarction Associated With Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in the General Population. *Journal of the American College of Cardiology*, 52 (20), 1628–1636. doi:10.1016/j.jacc.2008.08.041
- George, M. D., Baker, J. F., Leonard, C. E., Mehta, S., Miano, T. A. & Hennessy, S. (2020). Risk of Nonunion with Nonselective NSAIDs, COX-2 Inhibitors, and Opioids. *The*

- Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 102 (14), 1230–1238.
doi:10.2106/JBJS.19.01415
- Gerber, H.-P., Vu, T. H., Ryan, A. M., Kowalski, J., Werb, Z. & Ferrara, N. (1999). VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Medicine*, 5 (6), 623–628. Nature Publishing Group. doi:10.1038/9467
- Gerstenfeld, L. C., Al-Ghawas, M., Alkhiary, Y. M., Cullinane, D. M., Krall, E. A., Fitch, J. L. et al. (2007). Selective and Nonselective Cyclooxygenase-2 Inhibitors and Experimental Fracture-Healing: Reversibility of Effects After Short-Term Treatment. *JBJS*, 89 (1), 114–125. doi:10.2106/JBJS.F.00495
- Gerstenfeld, L. C., Alkhiary, Y. M., Krall, E. A., Nicholls, F. H., Stapleton, S. N., Fitch, J. L. et al. (2006). Three-dimensional Reconstruction of Fracture Callus Morphogenesis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 54 (11), 1215–1228. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. doi:10.1369/jhc.6A6959.2006
- Gerstenfeld, L. C., Cho, T.-J., Kon, T., Aizawa, T., Cruceta, J., Graves, B. D. et al. (2001). Impaired Intramembranous Bone Formation during Bone Repair in the Absence of Tumor Necrosis Factor-Alpha Signaling. *Cells Tissues Organs*, 169 (3), 285–294. doi:10.1159/000047893
- Gerstenfeld, L. C., Cullinane, D. M., Barnes, G. L., Graves, D. T. & Einhorn, T. A. (2003). Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88 (5), 873–884. doi:10.1002/jcb.10435
- Gerstenfeld, L. C., Thiede, M., Seibert, K., Mielke, C., Phippard, D., Svagr, B. et al. (2003). Differential inhibition of fracture healing by non-selective and cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Orthopaedic Research*, 21 (4), 670–675. doi:https://doi.org/10.1016/S0736-0266(03)00003-2

- Gerstenfeld, L. C., Wronski, T. J., Hollinger, J. O. & Einhorn, T. A. (2005). Application of Histomorphometric Methods to the Study of Bone Repair. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20 (10), 1715–1722. doi:10.1359/JBMR.050702
- Geusens, P., Emans, P. J., de Jong, J. J. A. & van den Bergh, J. (2013). NSAIDs and fracture healing. *Current Opinion in Rheumatology*, 25 (4), 524–531. doi:10.1097/BOR.0b013e32836200b8
- Goldberg, V. M., Powell, A., Shaffer, J. W., Zika, J., Bos, G. D. & Heiple, K. G. (1985). Bone grafting: Role of histocompatibility in transplantation. *Journal of Orthopaedic Research*, 3 (4), 389–404. doi:10.1002/jor.1100030401
- Gómez-Barrena, E., Rosset, P., Lozano, D., Stanovici, J., Ermthaller, C. & Gerbhard, F. (2015). Bone fracture healing: Cell therapy in delayed unions and nonunions (Stem Cells and Bone). *Bone*, 70, 93–101. doi:10.1016/j.bone.2014.07.033
- Gösling, T. & Krettek, C. (2019). Femurschaftfraktur. *Der Unfallchirurg*, 122 (1), 59–75. doi:10.1007/s00113-018-0591-7
- Grant, W. T., Wang, G. J. & Balian, G. (1987). Type X collagen synthesis during endochondral ossification in fracture repair. *The Journal of Biological Chemistry*, 262 (20), 9844–9849.
- Grohs, J. G., Schmidt, M. & Wanivenhaus, A. (2007). Selective COX-2 inhibitor versus indomethacin for the prevention of heterotopic ossification after hip replacement: A double-blind randomized trial of 100 patients with 1-year follow-up. *Acta Orthopaedica*, 78 (1), 95–98. doi:10.1080/17453670610013484
- Grosser, T., Fries, S. & FitzGerald, G. A. (2006). Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *Journal of Clinical Investigation*, 116 (1), 4–15. doi:10.1172/JCI27291
- Gruber, R., Koch, H., Doll, B. A., Tegtmeier, F., Einhorn, T. A. & Hollinger, J. O. (2006). Fracture healing in the elderly patient. *Experimental Gerontology*, 41 (11), 1080–1093. doi:10.1016/j.exger.2006.09.008

- Gustilo & Anderson. (1976). Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones. *J Bone Joint Surg Am*, 58, 453–458.
- Gustilo, R. B., Mendoza, R. M. & Williams, D. N. (1984). Problems in the management of type III (severe) open fractures: a new classification of type III open fractures. *The Journal of Trauma*, 24 (8), 742–746. doi:10.1097/00005373-198408000-00009
- Hadijargyrou, M., Ahrens, W. & Rubin, C. T. (2000). Temporal Expression of the Chondrogenic and Angiogenic Growth Factor CYR61 During Fracture Repair. *Journal of Bone and Mineral Research*, 15 (6), 1014–1023. doi:10.1359/jbmr.2000.15.6.1014
- Haffer, H., Müller, M., Ascherl, R., Perka, C. & Winkler, T. (2020). Diclofenac for prophylaxis of heterotopic ossification after hip arthroplasty: a systematic review. *HIP International*, 1120700020978194. SAGE Publications. doi:10.1177/1120700020978194
- Haffner-Luntzer, M., Hankenson, K. D., Ignatius, A., Pfeifer, R., Khader, B. A., Hildebrand, F. et al. (2019). Review of Animal Models of Comorbidities in Fracture-Healing Research. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 37 (12), 2491–2498. doi:10.1002/jor.24454
- Haffner-Luntzer, M., Weber, B., Lam, C., Fischer, V., Lackner, I., Ignatius, A. et al. (2020). A novel mouse model to study fracture healing of the proximal femur. *Journal of Orthopaedic Research*, 38 (10), 2131–2138. doi:10.1002/jor.24677
- Hagiwara, Y., Dymont, N. A., Jiang, X., Jiang Ping, H., Ackert-Bicknell, C., Adams, D. J. et al. (2015). Fixation stability dictates the differentiation pathway of periosteal progenitor cells in fracture repair. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 33 (7), 948–956. doi:10.1002/jor.22816
- Han, Y., Cowin, S. C., Schaffler, M. B. & Weinbaum, S. (2004). Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (47), 16689–16694. doi:10.1073/pnas.0407429101

- Hankenson, K. D., Zimmerman, G. & Marcucio, R. (2014). Biological perspectives of delayed fracture healing. *Injury*, 45, S8–S15. doi:10.1016/j.injury.2014.04.003
- Harada, S., Nagy, J. A., Sullivan, K. A., Thomas, K. A., Endo, N., Rodan, G. A. et al. (1994). Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *The Journal of Clinical Investigation*, 93 (6), 2490–2496. American Society for Clinical Investigation. doi:10.1172/JCI117258
- Harada, S. & Rodan, G. A. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, 423 (6937), 349–355. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nature01660
- Hartree, E. F. (1972). Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, 48 (2), 422–427. doi:10.1016/0003-2697(72)90094-2
- Herath, S. C., Lion, T., Klein, M., Stenger, D., Scheuer, C., Holstein, J. H. et al. (2015). Stimulation of angiogenesis by cilostazol accelerates fracture healing in mice. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 33 (12), 1880–1887. doi:10.1002/jor.22967
- Hernandez, R. K., Do, T. P., Critchlow, C. W., Dent, R. E. & Jick, S. S. (2012). Patient-related risk factors for fracture-healing complications in the United Kingdom General Practice Research Database. *Acta Orthopaedica*, 83 (6), 653–660. doi:10.3109/17453674.2012.747054
- Herschman, H. R. (1996). Prostaglandin synthase 2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1299 (1), 125–140. doi:10.1016/0005-2760(95)00194-8
- Hessle, L., Johnson, K. A., Anderson, H. C., Narisawa, S., Sali, A., Goding, J. W. et al. (2002). Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (14), 9445–9449. doi:10.1073/pnas.142063399

- Hiltunen, A., Aro, H. T. & Vuorio, E. (1993). Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (297), 23–27.
- Hiltunen, A., Vuorio, E. & Aro, H. T. (1993). A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 11 (2), 305–312. doi:10.1002/jor.1100110219
- Histing, T., Stenger, D., Kuntz, S., Scheuer, C., Tami, A., Garcia, P. et al. (2012). Increased osteoblast and osteoclast activity in female senescence-accelerated, osteoporotic SAMP6 mice during fracture healing. *The Journal of Surgical Research*, 175 (2), 271–277. doi:10.1016/j.jss.2011.03.052
- Histing, T., Bremer, P., Rollmann, M. F., Herath, S., Klein, M., Pohlemann, T. et al. (2018). A Minimally Invasive Model to Analyze Endochondral Fracture Healing in Mice Under Standardized Biomechanical Conditions. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (133), 57255. doi:10.3791/57255
- Histing, T., Garcia, P., Holstein, J. H., Klein, M., Matthys, R., Nuetzi, R. et al. (2011). Small animal bone healing models: Standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone*, 49 (4), 591–599. doi:10.1016/j.bone.2011.07.007
- Histing, T., Garcia, P., Matthys, R., Leidinger, M., Holstein, J. H., Kristen, A. et al. (2010). An internal locking plate to study intramembranous bone healing in a mouse femur fracture model. *Journal of Orthopaedic Research*, 28 (3), 397–402. doi:10.1002/jor.21008
- Histing, T., Heerschof, K., Klein, M., Scheuer, C., Stenger, D., Holstein, J. H. et al. (2016). Characterization of the healing process in non-stabilized and stabilized femur fractures in mice. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 136 (2), 203–211. doi:10.1007/s00402-015-2367-7
- Histing, T., Holstein, J. H., Garcia, P., Matthys, R., Kristen, A., Claes, L. et al. (2009). Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture. *Journal of Orthopaedic Research*, 27 (9), 1152–1156. doi:10.1002/jor.20849

- Histing, T., Klein, M., Stieger, A., Stenger, D., Steck, R., Matthys, R. et al. (2012). A new model to analyze metaphyseal bone healing in mice. *Journal of Surgical Research*, 178 (2), 715–721. doi:10.1016/j.jss.2012.04.007
- Histing, T., Kuntz, S., Stenger, D., Scheuer, C., Garcia, P., Holstein, J. H. et al. (2013). Delayed fracture healing in aged senescence-accelerated P6 mice. *Journal of Investigative Surgery: The Official Journal of the Academy of Surgical Research*, 26 (1), 30–35. doi:10.3109/08941939.2012.687435
- Histing, T., Marciniak, K., Scheuer, C., Garcia, P., Holstein, J. H., Klein, M. et al. (2011). Sildenafil accelerates fracture healing in mice. *Journal of Orthopaedic Research*, 29 (6), 867–873. doi:10.1002/jor.21324
- Histing, T., Stenger, D., Scheuer, C., Metzger, W., Garcia, P., Holstein, J. H. et al. (2012). Pantoprazole, a Proton Pump Inhibitor, Delays Fracture Healing in Mice. *Calcified Tissue International*, 90 (6), 507–514. doi:10.1007/s00223-012-9601-x
- Hla, T. & Neilson, K. (1992). Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89 (16), 7384–7388. National Academy of Sciences. doi:10.1073/pnas.89.16.7384
- Hofbauer, L. C., Khosla, S., Dunstan, C. R., Lacey, D. L., Boyle, W. J. & Riggs, B. L. (2000). The Roles of Osteoprotegerin and Osteoprotegerin Ligand in the Paracrine Regulation of Bone Resorption. *Journal of Bone and Mineral Research*, 15 (1), 2–12. doi:10.1359/jbmr.2000.15.1.2
- Hoff, P., Gaber, T., Strehl, C., Schmidt-Bleek, K., Lang, A., Huscher, D. et al. (2016). Immunological characterization of the early human fracture hematoma. *Immunologic Research*, 64 (5–6), 1195–1206. doi:10.1007/s12026-016-8868-9
- Hollnagel, A., Oehlmann, V., Heymer, J., Rütter, U. & Nordheim, A. (1999). Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (28), 19838–19845. doi:10.1074/jbc.274.28.19838

- Holstein, J. H., Matthys, R., Histing, T., Becker, S. C., Fiedler, M., Garcia, P. et al. (2009). Development of a Stable Closed Femoral Fracture Model in Mice. *Journal of Surgical Research*, 153 (1), 71–75. doi:10.1016/j.jss.2008.02.042
- Homburger, F., Russfield, A. B., Weisburger, J. H., Lim, S., Chak, S. P. & Weisburger, E. K. (1975). Aging Changes in CD®-1 HaM/ICR Mice Reared Under Standard Laboratory Conditions. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 55 (1), 37–45. doi:10.1093/jnci/55.1.37
- Hsu, H., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Solovyev, I., Colombero, A., Timms, E. et al. (1999). Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (7), 3540–3545. doi:10.1073/pnas.96.7.3540
- Hu, K. & Olsen, B. R. (2016). The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone*, 91, 30–38. doi:10.1016/j.bone.2016.06.013
- Huang, K., Wu, G., Zou, J. & Peng, S. (2018). Combination therapy with BMP-2 and psoralen enhances fracture healing in ovariectomized mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16 (3), 1655–1662. doi:10.3892/etm.2018.6353
- Iida-Klein, A., Lu, S. S., Kapadia, R., Burkhart, M., Moreno, A., Dempster, D. W. et al. (2005). Short-term continuous infusion of human parathyroid hormone 1-34 fragment is catabolic with decreased trabecular connectivity density accompanied by hypercalcemia in C57BL/J6 mice. *The Journal of Endocrinology*, 186 (3), 549–557. doi:10.1677/joe.1.06270
- Isaksson, H., Gröngröft, I., Wilson, W., van Donkelaar, C. C., van Rietbergen, B., Tami, A. et al. (2009). Remodeling of fracture callus in mice is consistent with mechanical loading and bone remodeling theory. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 27 (5), 664–672. doi:10.1002/jor.20725
- Ishidou, Y., Kitajima, I., Obama, H., Maruyama, I., Murata, F., Imamura, T. et al. (1995). Enhanced expression of type I receptors for bone morphogenetic proteins during

- bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 10 (11), 1651–1659. doi:10.1002/jbmr.5650101107
- Jacenko, O. & Olsen, B. R. (1995). Transgenic mouse models in studies of skeletal disorders. *The Journal of Rheumatology. Supplement*, 43, 39–41.
- Jilka, R. L., Hangoc, G., Girasole, G., Passeri, G., Williams, D. C., Abrams, J. S. et al. (1992). Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*, 257 (5066), 88–91. American Association for the Advancement of Science. doi:10.1126/science.1621100
- Jingushi, S., Joyce, M. E. & Bolander, M. E. (1992). Genetic expression of extracellular matrix proteins correlates with histologic changes during fracture repair. *Journal of Bone and Mineral Research*, 7 (9), 1045–1055. doi:10.1002/jbmr.5650070907
- Juríková, M., Danihel, L., Polák, Š. & Varga, I. (2016). Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochemica*, 118 (5), 544–552. doi:10.1016/j.acthis.2016.05.002
- Karakawa, A., Fukawa, Y., Okazaki, M., Takahashi, K., Sano, T., Amano, H. et al. (2009). Diclofenac Sodium Inhibits NFκB Transcription in Osteoclasts. *Journal of Dental Research*, 88 (11), 1042–1047. doi:10.1177/0022034509346147
- Karsenty, G. & Wagner, E. F. (2002). Reaching a Genetic and Molecular Understanding of Skeletal Development. *Developmental Cell*, 2 (4), 389–406. Elsevier. doi:10.1016/S1534-5807(02)00157-0
- Kaspar*, D., Hedrich*, C. M., Schmidt, C., Liedert, A., Claes, L. E. & Ignatius, A. A. (2005). Diclofenac hemmt die Proliferation und Matrixbildung osteoblastärer Zellen. *Der Unfallchirurg*, 108 (1), 18–24. doi:10.1007/s00113-004-0858-z
- Katoh, H., Watabe, A., Sugimoto, Y., Ichikawa, A. & Negishi, M. (1995). Characterization of the signal transduction of prostaglandin E receptor EP1 subtype in cDNA-transfected Chinese hamster ovary cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1244 (1), 41–48. doi:10.1016/0304-4165(94)00182-W

- Katsimbri, P. (2017). The biology of normal bone remodelling. *European Journal of Cancer Care*, 26 (6), e12740. doi:10.1111/ecc.12740
- Kawabata, M., Inoue, H., Hanyu, A., Imamura, T. & Miyazono, K. (1998). Smad proteins exist as monomers in vivo and undergo homo- and hetero-oligomerization upon activation by serine/threonine kinase receptors. *The EMBO journal*, 17 (14), 4056–4065. doi:10.1093/emboj/17.14.4056
- Kawaguchi, H., Pilbeam, C. C., Harrison, J. R. & Raisz, L. G. (1995). The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (313), 36–46.
- Kawaguchi, H., Raisz, L. G., Voznesensky, O. S., Alander, C. B., Hakeda, Y. & Pilbeam, C. C. (1994). Regulation of the two prostaglandin G/H synthases by parathyroid hormone, interleukin-1, cortisol, and prostaglandin E2 in cultured neonatal mouse calvariae. *Endocrinology*, 135 (3), 1157–1164. doi:10.1210/endo.135.3.8070358
- Kearney, P. M., Baigent, C., Godwin, J., Halls, H., Emberson, J. R. & Patrono, C. (2006). Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials. *BMJ*, 332 (7553), 1302–1308. doi:10.1136/bmj.332.7553.1302
- Kim, S. W., Pajevic, P. D., Selig, M., Barry, K. J., Yang, J.-Y., Shin, C. S. et al. (2012). Intermittent PTH Administration Converts Quiescent Lining Cells to Active Osteoblasts. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 27 (10), 2075–2084. doi:10.1002/jbmr.1665
- Kireeva, M. L., Mo, F. E., Yang, G. P. & Lau, L. F. (1996). Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. *Molecular and Cellular Biology*, 16 (4), 1326–1334. doi:10.1128/MCB.16.4.1326
- Klein, M., Stieger, A., Stenger, D., Scheuer, C., Holstein, J. H., Pohlemann, T. et al. (2015). Comparison of healing process in open osteotomy model and open fracture model:

- Delayed healing of osteotomies after intramedullary screw fixation. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 33 (7), 971–978. doi:10.1002/jor.22861
- Klein-Nulend, J., Burger, E. H., Semeins, C. M., Raisz, L. G. & Pilbeam, C. C. (1997). Pulsating fluid flow stimulates prostaglandin release and inducible prostaglandin G/H synthase mRNA expression in primary mouse bone cells. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 12 (1), 45–51. doi:10.1359/jbmr.1997.12.1.45
- Knothe Tate, M. L., Adamson, J. R., Tami, A. E. & Bauer, T. W. (2004). The osteocyte. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36 (1), 1–8. doi:10.1016/S1357-2725(03)00241-3
- Kogianni, G., Mann, V. & Noble, B. S. (2008). Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 23 (6), 915–927. doi:10.1359/jbmr.080207
- Kon, T., Cho, T.-J., Aizawa, T., Yamazaki, M., Nooh, N., Graves, D. et al. (2001). Expression of Osteoprotegerin, Receptor Activator of NF- κ B Ligand (Osteoprotegerin Ligand) and Related Proinflammatory Cytokines During Fracture Healing. *Journal of Bone and Mineral Research*, 16 (6), 1004–1014. doi:10.1359/jbmr.2001.16.6.1004
- Kong, Y.-Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H.-L., Timms, E., Capparelli, C. et al. (1999). OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 397 (6717), 315–323. Nature Publishing Group. doi:10.1038/16852
- Kratzel, C., Bergmann, C., Duda, G., Greiner, S., Schmidmaier, G. & Wildemann, B. (2008). Characterization of a rat osteotomy model with impaired healing. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 9 (1), 135. doi:10.1186/1471-2474-9-135
- Krischak, G. D., Augat, P., Sorg, T., Blakytyn, R., Kinzl, L., Claes, L. et al. (2006). Effects of diclofenac on periosteal callus maturation in osteotomy healing in an animal model.

- Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 127 (1), 3–9. doi:10.1007/s00402-006-0202-x
- Kronenberg, H. M. (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, 423 (6937), 332–336. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nature01657
- Kroon, F. P. B., van der Burg, L. R. A., Ramiro, S., Landewé, R. B. M., Buchbinder, R., Falzon, L. et al. (2015). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for axial spondyloarthritis (ankylosing spondylitis and non-radiographic axial spondyloarthritis). *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (7), CD010952. doi:10.1002/14651858.CD010952.pub2
- Ku, E. C., Lee, W., Kothari, H. V. & Scholer, D. W. (1986). Effect of diclofenac sodium on the arachidonic acid cascade (Inflammatory Disease and the Role of Voltaren (Diclofenac Sodium)). *The American Journal of Medicine*, 80 (4, Supplement 2), 18–23. doi:10.1016/0002-9343(86)90074-4
- Kumar, K., Kirksey, M. A., Duong, S. & Wu, C. L. (2017). A Review of Opioid-Sparing Modalities in Perioperative Pain Management: Methods to Decrease Opioid Use Postoperatively. *Anesthesia & Analgesia*, 125 (5), 1749–1760. doi:10.1213/ANE.0000000000002497
- Kurihara, N., Chenu, C., Miller, M., Civin, C. & Roodman, G. D. (1990). Identification of Committed Mononuclear Precursors for Osteoclast-Like Cells Formed in Long Term Human Marrow Cultures*. *Endocrinology*, 126 (5), 2733–2741. doi:10.1210/endo-126-5-2733
- Kurmis, A. P., Kurmis, T. P., O'Brien, J. X. & Dalén, T. (2012). The Effect of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Administration on Acute Phase Fracture-Healing: A Review. *JBJS*, 94 (9), 815–823. doi:10.2106/JBJS.J.01743
- Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H.-L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T. et al. (1998). Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell*, 93 (2), 165–176. doi:10.1016/S0092-8674(00)81569-X

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680–685. doi:10.1038/227680a0
- Lanyon, L. E. (1993). Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcified Tissue International*, 53 Suppl 1, S102-106; discussion S106-107. doi:10.1007/BF01673415
- Larsson, S. (2002). Treatment of Osteoporotic Fractures. *Scandinavian Journal of Surgery*, 91 (2), 140–146. doi:10.1177/145749690209100202
- Lee, N. K. & Karsenty, G. (2008). Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 19 (5), 161–166. doi:10.1016/j.tem.2008.02.006
- Leppänen, O., Sievänen, H., Jokihaara, J., Pajamäki, I. & Järvinen, T. L. (2006). Three-Point Bending of Rat Femur in the Mediolateral Direction: Introduction and Validation of a Novel Biomechanical Testing Protocol. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21 (8), 1231–1237. doi:10.1359/jbmr.060511
- Li, M., Healy, D. R., Li, Y., Simmons, H. A., Crawford, D. T., Ke, H. Z. et al. (2005). Osteopenia and impaired fracture healing in aged EP4 receptor knockout mice. *Bone*, 37 (1), 46–54. doi:10.1016/j.bone.2005.03.016
- Li, Z., Zheng, J., Wan, D. & Yang, X. (2020). Uniaxial Static Strain Promotes Osteoblast Proliferation and Bone Matrix Formation in Distraction Osteogenesis In Vitro. *BioMed Research International*, 2020, 3906426. doi:10.1155/2020/3906426
- Lim, T., Tang, Q., Wang, Q., Zhu, Z., Wei, X., Feng, Y. et al. (2020). Histopathological Findings of Failed Free Vascularized Fibular Grafting for Osteonecrosis of the Femoral Head after Long-Term Follow-Up. *BioMed Research International*, 2020. doi:10.1155/2020/6493585
- Lin, M. C., Hu, D., Marmor, M., Herfat, S. T., Bahney, C. S. & Maharbiz, M. M. (2019). Smart bone plates can monitor fracture healing. *Scientific Reports*, 9 (1), 2122. doi:10.1038/s41598-018-37784-0

- Lin, T.-H., Gibon, E., Loi, F., Pajarinen, J., Córdova, L. A., Nabeshima, A. et al. (2017). Decreased osteogenesis in mesenchymal stem cells derived from the aged mouse is associated with enhanced NF-κB activity. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 35 (2), 281–288. doi:10.1002/jor.23270
- Lind, M., Deleuran, B., Thestrup-Pedersen, K., Søballe, K., Eriksen, E. F. & Bünger, C. (1995). Chemotaxis of human osteoblasts. Effects of osteotropic growth factors. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 103 (2), 140–146.
- Lind, P. M., Lind, L., Larsson, S. & Öberg, J. (2001). Torsional testing and peripheral quantitative computed tomography in rat humerus. *Bone*, 29 (3), 265–270. doi:10.1016/S8756-3282(01)00576-2
- Lindsay, R., Nieves, J., Formica, C., Henneman, E., Woelfert, L., Shen, V. et al. (1997). Randomised controlled study of effect of parathyroid hormone on vertebral-bone mass and fracture incidence among postmenopausal women on oestrogen with osteoporosis. *Lancet (London, England)*, 350 (9077), 550–555. doi:10.1016/S0140-6736(97)02342-8
- Linsenmayer, T. F., Chen, Q. A., Gibney, E., Gordon, M. K., Marchant, J. K., Mayne, R. et al. (1991). Collagen types IX and X in the developing chick tibiotarsus: analyses of mRNAs and proteins. *Development (Cambridge, England)*, 111 (1), 191–196.
- Lisowska, B., Kosson, D. & Domaracka, K. (2018). Positives and negatives of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in bone healing: the effects of these drugs on bone repair. *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 1809–1814. doi:10.2147/DDDT.S164565
- Little, D. G., Ramachandran, M. & Schindeler, A. (2007). The anabolic and catabolic responses in bone repair. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume*, 89-B (4), 425–433. doi:10.1302/0301-620X.89B4.18301

- Liu, D., He, S., Chen, S., Yang, L., Yang, J., Bao, Q. et al. (2019). Different effects of Wnt/ β -catenin activation and parathyroid hormone on diaphyseal and metaphyseal in the early phase of femur bone healing of mice. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 46 (7), 652–663. doi:10.1111/1440-1681.13088
- Lopas, L. A., Belkin, N. S., Mutyaba, P. L., Gray, C. F., Hankenson, K. D. & Ahn, J. (2014). Fractures in Geriatric Mice Show Decreased Callus Expansion and Bone Volume. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 472 (11), 3523–3532. doi:10.1007/s11999-014-3829-x
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193 (1), 265–275.
- Lu, C., Hansen, E., Sapozhnikova, A., Hu, D., Miclau, T. & Marcucio, R. S. (2008). Effect of age on vascularization during fracture repair. *Journal of Orthopaedic Research*, 26 (10), 1384–1389. doi:10.1002/jor.20667
- Lu, C., Miclau, T., Hu, D., Hansen, E., Tsui, K., Puttlitz, C. et al. (2005). Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *Journal of Orthopaedic Research*, 23 (6), 1300–1307. doi:https://doi.org/10.1016/j.orthres.2005.04.003.1100230610
- Lüllmann-Rauch, R. & Asan, E. (2015). *Taschenlehrbuch Histologie* (Thieme E-Book Library Studium & Lehre) (5., vollständig überarbeitete Auflage.). Stuttgart ; New York: Georg Thieme Verlag. doi:10.1055/b-003-124637
- Luxenburg, C., Geblinger, D., Klein, E., Anderson, K., Hanein, D., Geiger, B. et al. (2007). The Architecture of the Adhesive Apparatus of Cultured Osteoclasts: From Podosome Formation to Sealing Zone Assembly. (N. Cordes, Hrsg.) *PLoS ONE*, 2 (1), e179. doi:10.1371/journal.pone.0000179
- Luyten, F. P., Cunningham, N. S., Ma, S., Muthukumaran, N., Hammonds, R. G., Nevins, W. B. et al. (1989). Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 264 (23), 13377–13380.

- Machwate, M., Rodan, S. B., Rodan, G. A. & Harada, S.-I. (1998). Sphingosine Kinase Mediates Cyclic AMP Suppression of Apoptosis in Rat Periosteal Cells. *Molecular Pharmacology*, 54 (1), 70–77. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. doi:10.1124/mol.54.1.70
- Macasai, C. E., Foster, B. K. & Xian, C. J. (2008). Roles of Wnt signalling in bone growth, remodelling, skeletal disorders and fracture repair. *Journal of Cellular Physiology*, 215 (3), 578–587. doi:10.1002/jcp.21342
- Manigrasso, M. B. & O'Connor, J. P. (2004). Characterization of a closed femur fracture model in mice. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 18 (10), 687–695. doi:10.1097/00005131-200411000-00006
- Manolagas, S. C. (2000). Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis*. *Endocrine Reviews*, 21 (2), 115–137. doi:10.1210/edrv.21.2.0395
- Manolagas, S. C. & Jilka, R. L. (1995). Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *The New England Journal of Medicine*, 332 (5), 305–311. doi:10.1056/NEJM199502023320506
- Marquez-Lara, A., Hutchinson, I. D., Nuñez, F. J., Smith, T. L. & Miller, A. N. (2016). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Bone-Healing: A Systematic Review of Research Quality. *JBJS Reviews*, 4 (3), e4. doi:10.2106/JBJS.RVW.O.00055
- Marsell, R. & Einhorn, T. A. (2009). The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair (Bone Morphogenetic Proteins: Applications in Orthopaedic and Trauma Surgery). *Injury*, 40, S4–S7. doi:10.1016/S0020-1383(09)70003-8
- Marsell, R. & Einhorn, T. A. (2010). Emerging bone healing therapies. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 24 Suppl 1, S4-8. doi:10.1097/BOT.0b013e3181ca3fab
- Marsell, R. & Einhorn, T. A. (2011). The biology of fracture healing (Bone Regeneration in the 21st Century). *Injury*, 42 (6), 551–555. doi:10.1016/j.injury.2011.03.031
- Martin, T. J. (1999). Calcitonin, an update. *Bone*, 24 (5, Supplement 1), 63S-65S. doi:10.1016/S8756-3282(99)00068-X

- Massagué, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 753–791. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.753
- Matsubara, H., Hogan, D. E., Morgan, E. F., Mortlock, D. P., Einhorn, T. A. & Gerstenfeld, L. C. (2012). Vascular tissues are a primary source of BMP2 expression during bone formation induced by distraction osteogenesis. *Bone*, 51 (1), 168–180. doi:10.1016/j.bone.2012.02.017
- Matthys, R. & Perren, S. M. (2009). Internal fixator for use in the mouse. *Injury*, 40 Suppl 4, S103-109. doi:10.1016/j.injury.2009.10.044
- Mavrogenis, A. F., Igoumenou, V. G., Kostroglou, A., Kostopanagioutou, K. & Saranteas, T. (2018). The ABC and pain in trauma. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*, 28 (4), 545–550. doi:10.1007/s00590-018-2123-0
- McBride, S. H., McKenzie, J. A., Bedrick, B. S., Kuhlmann, P., Pasteris, J. D., Rosen, V. et al. (2014). Long bone structure and strength depend on BMP2 from osteoblasts and osteocytes, but not vascular endothelial cells. *PloS One*, 9 (5), e96862. doi:10.1371/journal.pone.0096862
- McGettigan, P. & Henry, D. (2013). Use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs That Elevate Cardiovascular Risk: An Examination of Sales and Essential Medicines Lists in Low-, Middle-, and High-Income Countries. (F.M. Turnbull, Hrsg.) *PLoS Medicine*, 10 (2), e1001388. doi:10.1371/journal.pmed.1001388
- McKibbin, B. (1978). The biology of fracture healing in long bones. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume*, 60-B (2), 150–162. The British Editorial Society of Bone & Joint Surgery. doi:10.1302/0301-620X.60B2.350882
- Mehta, M., Schell, H., Schwarz, C., Peters, A., Schmidt-Bleek, K., Ellinghaus, A. et al. (2011). A 5-mm femoral defect in female but not in male rats leads to a reproducible atrophic non-union. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 131 (1), 121–129. doi:10.1007/s00402-010-1155-7
- Mehta, M., Strube, P., Peters, A., Perka, C., Hutmacher, D., Fratzl, P. et al. (2010). Influences of age and mechanical stability on volume, microstructure, and

- mineralization of the fracture callus during bone healing: is osteoclast activity the key to age-related impaired healing? *Bone*, 47 (2), 219–228. doi:10.1016/j.bone.2010.05.029
- Meinberg, E. G., Agel, J., Roberts, C. S., Karam, M. D. & Kellam, J. F. (2018). Fracture and Dislocation Classification Compendium—2018. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 32, S1. doi:10.1097/BOT.0000000000001063
- Menassé, R., Hedwall, P. R., Kraetz, J., Pericin, C., Riesterer, L., Sallmann, A. et al. (1978). Pharmacological Properties of Diclofenac Sodium and Its Metabolites. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 7 (sup22), 5–16. doi:10.3109/03009747809097211
- Menger, M. M., Bremer, P., Scheuer, C., Rollmann, M. F., Braun, B. J., Herath, S. C. et al. (2020). Pantoprazole impairs fracture healing in aged mice. *Scientific Reports*, 10 (1), 22376. Nature Publishing Group. doi:10.1038/s41598-020-79605-3
- Meyer, R. A., Tshakis, P. J., Martin, D. F., Banks, D. M., Harrow, M. E. & Kiebzak, G. M. (2001). Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 19 (3), 428–435. doi:10.1016/S0736-0266(00)90034-2
- Meyers, C., Lisiecki, J., Miller, S., Levin, A., Fayad, L., Ding, C. et al. (2019). Heterotopic Ossification: A Comprehensive Review. *JBMR Plus*, 3 (4). doi:10.1002/jbm4.10172
- Migliorini, F., Trivellas, A., Eschweiler, J., Driessen, A., Tingart, M. & Maffulli, N. (2021). NSAIDs for Prophylaxis for Heterotopic Ossification After Total Hip Arthroplasty: A Bayesian Network Meta-analysis. *Calcified Tissue International*, 108 (2), 196–206. doi:10.1007/s00223-020-00763-7
- Miller, T. A. (1983). Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage: current knowledge and proposed mechanisms. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 245 (5), G601–G623. doi:10.1152/ajpgi.1983.245.5.G601

- Mills, L. A., Aitken, S. A. & Simpson, A. H. R. W. (2017). The risk of non-union per fracture: current myths and revised figures from a population of over 4 million adults. *Acta Orthopaedica*, 88 (4), 434–439. Taylor & Francis. doi:10.1080/17453674.2017.1321351
- Minina, E., Wenzel, H. M., Kreschel, C., Karp, S., Gaffield, W., McMahon, A. P. et al. (2001). BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development (Cambridge, England)*, 128 (22), 4523–4534.
- Miyachi, K., Fritzler, M. J. & Tan, E. M. (1978). Autoantibody to a Nuclear Antigen in Proliferating Cells. *The Journal of Immunology*, 121 (6), 2228–2234. American Association of Immunologists.
- Moncada, S., Higgs, E. A. & Vane, J. R. (1977). Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin x), a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet (London, England)*, 1 (8001), 18–20. doi:10.1016/s0140-6736(77)91655-5
- Morgan, E. F., Mason, Z. D., Chien, K. B., Pfeiffer, A. J., Barnes, G. L., Einhorn, T. A. et al. (2009). Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone*, 44 (2), 335–344. doi:10.1016/j.bone.2008.10.039
- Morse, A., Yu, N. Y. C., Peacock, L., Mikulec, K., Kramer, I., Kneissel, M. et al. (2015). Endochondral fracture healing with external fixation in the Sost knockout mouse results in earlier fibrocartilage callus removal and increased bone volume fraction and strength. *Bone*, 71, 155–163. doi:10.1016/j.bone.2014.10.018
- Müller, M. (2019). *Chirurgie für Studium und Praxis: unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen*. Medizinische Verlag-und Inform.-Dienste.
- Mullis, B. H., Copland, S. T., Weinhold, P. S., Miclau, T., Lester, G. E. & Bos, G. D. (2006). Effect of COX-2 inhibitors and non-steroidal anti-inflammatory drugs on a mouse fracture model. *Injury*, 37 (9), 827–837. doi:10.1016/j.injury.2005.12.018

- Multimäki, P., Aro, H. & Vuorio, E. (1987). Differential expression of fibrillar collagen genes during callus formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 142 (2), 536–541. doi:10.1016/0006-291x(87)90307-x
- Murao, H., Yamamoto, K., Matsuda, S. & Akiyama, H. (2013). Periosteal cells are a major source of soft callus in bone fracture. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 31 (4), 390–398. doi:10.1007/s00774-013-0429-x
- Nagano, A., Arioka, M., Takahashi-Yanaga, F., Matsuzaki, E. & Sasaguri, T. (2017). Celecoxib inhibits osteoblast maturation by suppressing the expression of Wnt target genes. *Journal of Pharmacological Sciences*, 133 (1), 18–24. doi:10.1016/j.jphs.2016.11.003
- Naik, A. A., Xie, C., Zuscik, M. J., Kingsley, P., Schwarz, E. M., Awad, H. et al. (2009). Reduced COX-2 Expression in Aged Mice Is Associated With Impaired Fracture Healing. *Journal of Bone and Mineral Research*, 24 (2), 251–264. doi:10.1359/jbmr.081002
- Nair, A. B. & Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 7 (2), 27–31. doi:10.4103/0976-0105.177703
- Nakahara, H., Bruder, S. P., Haynesworth, S. E., Holecek, J. J., Baber, M. A., Goldberg, V. M. et al. (1990). Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone*, 11 (3), 181–188. doi:10.1016/8756-3282(90)90212-h
- Nakase, T., Nomura, S., Yoshikawa, H., Hashimoto, J., Hirota, S., Kitamura, Y. et al. (1994). Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 9 (5), 651–659. doi:10.1002/jbmr.5650090510

- Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kurata, K., Oh-Hora, M., Feng, J. Q. et al. (2011). Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nature Medicine*, 17 (10), 1231–1234. doi:10.1038/nm.2452
- Narbaitz, R., Stumpf, W. E., Sar, M., Huang, S. & DeLuca, H. F. (1983). Autoradiographic localization of target cells for 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in bones from fetal rats. *Calcified Tissue International*, 35 (2), 177–182. doi:10.1007/BF02405028
- Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B. A., Morrison, A. R. & Lefkowitz, J. B. (1986). Arachidonic acid metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, 55, 69–102. doi:10.1146/annurev.bi.55.070186.000441
- Nefussi, J.-R. & Baron, R. (1985). PGE2 stimulates both resorption and formation of bone in vitro: Differential responses of the periosteum and the endosteum in fetal rat long bone cultures. *The Anatomical Record*, 211 (1), 9–16. doi:https://doi.org/10.1002/ar.1092110103
- Nijweide, P. J., Burger, E. H. & Klein-Nulend, J. (2002). Chapter 6 - The Osteocyte. In J.P. Bilezikian, L.G. Raisz & G.A. Rodan (Hrsg.), *Principles of Bone Biology (Second Edition)* (S. 93–107). San Diego: Academic Press. doi:10.1016/B978-012098652-1.50108-6
- Nukaga, J., Kobayashi, M., Shinki, T., Song, H., Takada, T., Takiguchi, T. et al. (2004). Regulatory effects of interleukin-1beta and prostaglandin E2 on expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontology*, 75 (2), 249–259. doi:10.1902/jop.2004.75.2.249
- Nunamaker, D. M. (1998). Experimental Models of Fracture Repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 355, S56.
- O'Brien, T. P. & Lau, L. F. (1992). Expression of the growth factor-inducible immediate early gene *cyr61* correlates with chondrogenesis during mouse embryonic development. *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*, 3 (9), 645–654.

- O'Driscoll, S. W., Saris, D. B., Ito, Y. & Fitzimmons, J. S. (2001). The chondrogenic potential of periosteum decreases with age. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 19 (1), 95–103. doi:10.1016/S0736-0266(00)00014-0
- Oestern, H.-J. & Tscherne, H. (1982). Klassifizierung der Frakturen mit Weichteilschaden. *Langenbecks Archiv für Chirurgie*, 358 (1), 483–483. doi:10.1007/BF01271894
- Ortega, N., Behonick, D. J. & Werb, Z. (2004). Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends in cell biology*, 14 (2), 86–93. doi:10.1016/j.tcb.2003.12.003
- Orth, M., Kruse, N. J., Braun, B. J., Scheuer, C., Holstein, J. H., Khalil, A. et al. (2017). BMP-2-coated mineral coated microparticles improve bone repair in atrophic non-unions. *European Cells & Materials*, 33, 1–12. doi:10.22203/eCM.v033a01
- Osuna, L. G. G., Soares, C. J., Vilela, A. B. F., Irie, M. S., Versluis, A. & Soares, P. B. F. (2020). Influence of bone defect position and span in 3-point bending tests: experimental and finite element analysis. *Brazilian Oral Research*, 35. Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO. doi:10.1590/1807-3107bor-2021.vol35.0001
- Ozaki, A., Tsunoda, M., Kinoshita, S. & Saura, R. (2000). Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. *Journal of Orthopaedic Science*, 5 (1), 64–70. doi:10.1007/s007760050010
- Pacifici, R. (1998). Editorial: Cytokines, Estrogen, and Postmenopausal Osteoporosis—The Second Decade. *Endocrinology*, 139 (6), 2659–2661. doi:10.1210/endo.139.6.6087
- Parfitt, A. M. (1982). The coupling of bone formation to bone resorption: A critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. *Metabolic Bone Disease and Related Research*, 4 (1), 1–6. doi:10.1016/0221-8747(82)90002-9
- Parfitt, A. M. (1994). Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *Journal of Cellular Biochemistry*, 55 (3), 273–286. doi:10.1002/jcb.240550303

- Parfitt, A. M. (2001). Chapter 15 - Skeletal Heterogeneity and the Purposes of Bone Remodeling: Implications for the Understanding of Osteoporosis. In R. Marcus, D. Feldman & J. Kelsey (Hrsg.), *Osteoporosis (Second Edition)* (S. 433–447). San Diego: Academic Press. doi:10.1016/B978-012470862-4/50016-7
- Parfitt, A. M. (2002). Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone*, 30 (1), 5–7. doi:10.1016/S8756-3282(01)00642-1
- Parfitt, A. M., Drezner, M. K., Glorieux, F. H., Kanis, J. A., Malluche, H., Meunier, P. J. et al. (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 2 (6), 595–610. doi:10.1002/jbmr.5650020617
- Park, S., DiMaio, T. A., Scheef, E. A., Sorenson, C. M. & Sheibani, N. (2010). PECAM-1 regulates proangiogenic properties of endothelial cells through modulation of cell-cell and cell-matrix interactions. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 299 (6), C1468–C1484. doi:10.1152/ajpcell.00246.2010
- Park, S. H., O'Connor, K., Sung, R., McKellop, H. & Sarmiento, A. (1999). Comparison of healing process in open osteotomy model and closed fracture model. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 13 (2), 114–120. doi:10.1097/00005131-199902000-00008
- Park, S.-H., Silva, M., Bahk, W.-J., McKellop, H. & Lieberman, J. R. (2002). Effect of repeated irrigation and debridement on fracture healing in an animal model. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 20 (6), 1197–1204. doi:10.1016/S0736-0266(02)00072-4
- Patai, Á., Solymosi, N., Mohácsi, L. & Patai, Á. V. (2017). Indomethacin and diclofenac in the prevention of post-ERCP pancreatitis: a systematic review and meta-analysis of prospective controlled trials. *Gastrointestinal Endoscopy*, 85 (6), 1144-1156.e1. doi:10.1016/j.gie.2017.01.033

- Pead, M. J., Suswillo, R., Skerry, T. M., VEDI, S. & Lanyon, L. E. (1988). Increased 3H-uridine levels in osteocytes following a single short period of dynamic bone loading in vivo. *Calcified Tissue International*, 43 (2), 92–96. doi:10.1007/BF02555153
- Peng, H., Usas, A., Olshanski, A., Ho, A. M., Gearhart, B., Cooper, G. M. et al. (2005). VEGF Improves, Whereas sFlt1 Inhibits, BMP2-Induced Bone Formation and Bone Healing Through Modulation of Angiogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20 (11), 2017–2027. doi:10.1359/JBMR.050708
- Pizette, S. & Niswander, L. (2000). BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. *Developmental Biology*, 219 (2), 237–249. doi:10.1006/dbio.2000.9610
- Poole, K. E. S., Bezooijen, R. L. V., Loveridge, N., Hamersma, H., Papapoulos, S. E., Löwik, C. W. et al. (2005). Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *The FASEB Journal*, 19 (13), 1842–1844. doi:10.1096/fj.05-4221fje
- Potts, J. T. & Gardella, T. J. (2007). Progress, Paradox, and Potential. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1117 (1), 196–208. doi:https://doi.org/10.1196/annals.1402.088
- Pountos, I., Giannoudis, P. V., Jones, E., English, A., Churchman, S., Field, S. et al. (2011). NSAIDs inhibit in vitro MSC chondrogenesis but not osteogenesis: implications for mechanism of bone formation inhibition in man. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15 (3), 525–534. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01006.x
- Pountos, I., Panteli, M., Walters, G. & Giannoudis, P. V. (2021). NSAIDs inhibit bone healing through the downregulation of TGF- β 3 expression during endochondral ossification. *Injury*, 52 (6), 1294–1299. Elsevier. doi:10.1016/j.injury.2021.01.007
- Prisby, R. D., Ramsey, M. W., Behnke, B. J., Dominguez, J. M., Donato, A. J., Allen, M. R. et al. (2007). Aging Reduces Skeletal Blood Flow, Endothelium-Dependent Vasodilation, and NO Bioavailability in Rats. *Journal of Bone and Mineral Research*, 22 (8), 1280–1288. doi:10.1359/jbmr.070415

- Quinn, J. M., Sabokbar, A., Denne, M., de Vernejoul, M. C., McGee, J. O. & Athanasou, N. A. (1997). Inhibitory and stimulatory effects of prostaglandins on osteoclast differentiation. *Calcified Tissue International*, 60 (1), 63–70. doi:10.1007/s002239900187
- Rainsford, K. D., Kean, W. F. & Ehrlich, G. E. (2008). Review of the pharmaceutical properties and clinical effects of the topical NSAID formulation, diclofenac epolamine. *Current Medical Research and Opinion*, 24 (10), 2967–2992. Taylor & Francis. doi:10.1185/03007990802381364
- Ramirez-Yañez, G. O., Seymour, G. J., Walsh, L. J., Forwood, M. R. & Symons, A. L. (2004). Prostaglandin E2 enhances alveolar bone formation in the rat mandible. *Bone*, 35 (6), 1361–1368. doi:10.1016/j.bone.2004.08.006
- Ramirez-Yanez, G. O. & Symons, A. L. (2012). Prostaglandin E2 affects osteoblast biology in a dose-dependent manner: An in vitro study. *Archives of Oral Biology*, 57 (9), 1274–1281. doi:10.1016/j.archoralbio.2012.03.003
- Reddi, A. H. (1997). Bone morphogenetic proteins: An unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 8 (1), 11–20. doi:10.1016/S1359-6101(96)00049-4
- Riess, W., Stierlin, H., Degen, P., Faigle, J. W., Gerardin, A., Moppert, J. et al. (1978). Pharmacokinetics and Metabolism of the Anti-Inflammatory Agent Voltaren. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 7 (sup22), 17–29. doi:10.3109/03009747809097212
- Riggs, B. L., Khosla, S. & Melton, L. J., III. (2002). Sex Steroids and the Construction and Conservation of the Adult Skeleton. *Endocrine Reviews*, 23 (3), 279–302. doi:10.1210/edrv.23.3.0465
- Rø, J., Sudmann, E. & Marton, P. F. (1976). Effect of Indomethacin on Fracture Healing in Rats. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 47 (6), 588–599. doi:10.3109/17453677608988744

- Roach, H. I., Shearer, J. R. & Archer, C. (1989). The choice of an experimental model. A guide for research workers. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 71 (4), 549–553. The British Editorial Society of Bone and Joint Surgery.
- Robling, A. G. & Bonewald, L. F. (2020). The Osteocyte: New Insights. *Annual Review of Physiology*, 82 (1), 485–506. Annual Reviews. doi:10.1146/annurev-physiol-021119-034332
- Rochefort, G. Y., Pallu, S. & Benhamou, C. L. (2010). Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporosis International*, 21 (9), 1457–1469. doi:10.1007/s00198-010-1194-5
- Rodan, G. A. & Martin, T. J. (2000). Therapeutic Approaches to Bone Diseases. *Science*, 289 (5484), 1508–1514. American Association for the Advancement of Science. doi:10.1126/science.289.5484.1508
- Röntgen, V., Blakytyn, R., Matthys, R., Landauer, M., Wehner, T., Göckelmann, M. et al. (2010). Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 28 (11), 1456–1462. doi:10.1002/jor.21148
- Roodman, G. D. (1996). Advances in Bone Biology: The Osteoclast', 17 (4), 25.
- Runkel, M. & Rommens, P. M. (2000). Pseudarthrosen. *Der Unfallchirurg*, 103 (1), 51–63. doi:10.1007/s001130050008
- Russell Jones, R., Orchard, G., Zelger, B. & Wilson Jones, E. (1995). Immunostaining for CD31 and CD34 in Kaposi sarcoma. *Journal of Clinical Pathology*, 48 (11), 1011–1016. doi:10.1136/jcp.48.11.1011
- Rüter, A. & Mayr, E. (1999). Pseudarthrosen. *Der Chirurg*, 70 (11), 1239–1245. doi:10.1007/s001040050775
- Ryan, A. M., Eppler, D. B., Hagler, K. E., Bruner, R. H., Thomford, P. J., Hall, R. L. et al. (1999). Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody. *Toxicologic Pathology*, 27 (1), 78–86. doi:10.1177/019262339902700115

- Sacerdote, P., Carrabba, M., Galante, A., Pisati, R., Manfredi, B. & Panerai, A. E. (1995). Plasma and synovial fluid interleukin-1, interleukin-6 and substance P concentrations in rheumatoid arthritis patients: effect of the nonsteroidal anti inflammatory drugs indomethacin, diclofenac and naproxen. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, 44 (11), 486–490. doi:10.1007/BF01837915
- Sakuma, Y., Li, Z., Pilbeam, C. C., Alander, C. B., Chikazu, D., Kawaguchi, H. et al. (2004). Stimulation of cAMP production and cyclooxygenase-2 by prostaglandin E(2) and selective prostaglandin receptor agonists in murine osteoblastic cells. *Bone*, 34 (5), 827–834. doi:10.1016/j.bone.2003.12.007
- Sallmann, A. R. (1986). The history of diclofenac (Inflammatory Disease and the Role of Voltaren (Diclofenac Sodium)). *The American Journal of Medicine*, 80 (4, Supplement 2), 29–33. doi:10.1016/0002-9343(86)90076-8
- Salo, J. (1997). Removal of Osteoclast Bone Resorption Products by Transcytosis. *Science*, 276 (5310), 270–273. doi:10.1126/science.276.5310.270
- Sánchez-Riera, L. & Wilson, N. (2017). Fragility Fractures & Their Impact on Older People. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 31 (2), 169–191. doi:10.1016/j.berh.2017.10.001
- Sandberg, O. & Aspenberg, P. (2015). Different effects of indomethacin on healing of shaft and metaphyseal fractures. *Acta Orthopaedica*, 86 (2), 243–247. doi:10.3109/17453674.2014.973328
- Sandberg, O., Bernhardsson, M. & Aspenberg, P. (2017). Earlier effect of alendronate in mouse metaphyseal versus diaphyseal bone healing. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 35 (4), 793–799. doi:10.1002/jor.23316
- Saranteas, T., Koliantzaki, I., Savvidou, O., Tsoumpa, M., Eustathiou, G., Kontogeorgakos, V. et al. (2019). Acute pain management in trauma: anatomy, ultrasound-guided

- peripheral nerve blocks and special considerations. *Minerva Anesthesiologica*, 85 (7), 763–773. doi:10.23736/S0375-9393.19.13145-8
- Schemitsch, E. H., Bhandari, M., Guyatt, G., Sanders, D. W., Swiontkowski, M., Tornetta, P. et al. (2012). Prognostic factors for predicting outcomes after intramedullary nailing of the tibia. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 94 (19), 1786–1793. doi:10.2106/JBJS.J.01418
- Schlaeppli, J. M., Gutzwiller, S., Finkenzeller, G. & Fournier, B. (1997). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces the expression of vascular endothelial growth factor in osteoblastic cells. *Endocrine Research*, 23 (3), 213–229. doi:10.3109/07435809709031855
- Schmidmaier, G., Wildemann, B., Melis, B., Krummrey, G., Einhorn, T. A., Haas, N. P. et al. (2004). Development and Characterization of a Standard Closed Tibial Fracture Model in the Rat. *European Journal of Trauma*, 30 (1), 35–42. doi:10.1007/s00068-004-1322-z
- Schmidt, M., Sørensen, H. T. & Pedersen, L. (2018). Diclofenac use and cardiovascular risks: series of nationwide cohort studies. *BMJ*, 362, k3426. British Medical Journal Publishing Group. doi:10.1136/bmj.k3426
- Schoen, M., Rotter, R., Schattner, S., Mittlmeier, T., Claes, L., Vollmar, B. et al. (2008). Introduction of a new interlocked intramedullary nailing device for stabilization of critically sized femoral defects in the rat: A combined biomechanical and animal experimental study. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 26 (2), 184–189. doi:10.1002/jor.20501
- Schütze, N., Lechner, A., Groll, C., Siggelkow, H., Hübner, M., Köhrle, J. et al. (1998). The human analog of murine cystein rich protein 61 [correction of 16] is a 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 responsive immediate early gene in human fetal osteoblasts: regulation by cytokines, growth factors, and serum. *Endocrinology*, 139 (4), 1761–1770. doi:10.1210/endo.139.4.5954

- Sell, S., Phillips, O. & Handel, M. (2004). No difference between two doses of diclofenac in prophylaxis of heterotopic ossifications after total hip arthroplasty. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 75 (1), 45–49. doi:10.1080/00016470410001708080
- Sell, S., Teschner, M., Gaissmaier, C., Martini, F., Weidner, S. A. & Küsswetter†, W. (1999). Wirkung von Diclofenac auf humane Osteoblasten und stromale Knochenmarkzellen in vitro in bezug auf die Endoprothetik. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 58 (1), 13–20. doi:10.1007/s003930050148
- Selye, H. (1932). On the stimulation of new bone-formation with parathyroid extract and irradiated ergosterol. *Endocrinology*, 16 (5), 547–558. Endocrine Society.
- Sharifi, M., Ereifej, L. & Lewiecki, E. M. (2015). Sclerostin and skeletal health. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 16 (2), 149–156. doi:10.1007/s11154-015-9311-6
- Shefelbine, S. J., Augat, P., Claes, L. & Beck, A. (2005). Intact fibula improves fracture healing in a rat tibia osteotomy model. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 23 (2), 489–493. doi:10.1016/j.orthres.2004.08.007
- Shen, G. (2005). The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthodontics & Craniofacial Research*, 8 (1), 11–17. doi:10.1111/j.1601-6343.2004.00308.x
- Si, W., Kang, Q., Luu, H. H., Park, J. K., Luo, Q., Song, W.-X. et al. (2006). CCN1/Cyr61 is regulated by the canonical Wnt signal and plays an important role in Wnt3A-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Molecular and Cellular Biology*, 26 (8), 2955–2964. doi:10.1128/MCB.26.8.2955-2964.2006
- Silver, I. (1988). Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Experimental Cell Research*, 175 (2), 266–276. doi:10.1016/0014-4827(88)90191-7
- Simon, A. M., Manigrasso, M. B. & O'Connor, J. P. (2002). Cyclo-Oxygenase 2 Function Is Essential for Bone Fracture Healing. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17 (6), 963–976. doi:https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.6.963

- Simon, A. M. & O'Connor, J. P. (2007). Dose and time-dependent effects of cyclooxygenase-2 inhibition on fracture-healing. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 89 (3), 500–511. doi:10.2106/JBJS.F.00127
- Simon, L. S. (1996). Actions and toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Current Opinion in Rheumatology*, 8 (3), 169–175.
- Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M.-S., Lüthy, R. et al. (1997). Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell*, 89 (2), 309–319. doi:10.1016/S0092-8674(00)80209-3
- Singh, R., Bansal, D., Baduni, N. & Vajifdar, H. (2011). Anaphylactic reaction to intravenous diclofenac. *Indian Journal of Critical Care Medicine: Peer-reviewed, Official Publication of Indian Society of Critical Care Medicine*, 15 (1), 37–39. doi:10.4103/0972-5229.78222
- Sinha, M., Gautam, L., Shukla, P. K., Kaur, P., Sharma, S. & Singh, T. P. (2013). Current Perspectives in NSAID-Induced Gastropathy. *Mediators of Inflammation*, 2013. doi:10.1155/2013/258209
- Slade Shantz, J. A., Yu, Y.-Y., Andres, W., Miclau, T. & Marcucio, R. (2014). Modulation of Macrophage Activity During Fracture Repair Has Differential Effects in Young Adult and Elderly Mice. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 28 (Supplement 1), S10–S14. doi:10.1097/BOT.0000000000000062
- Small, R. E. (1989). Diclofenac sodium. *Clinical Pharmacy*, 8 (8), 545–558.
- Smith, W. L., DeWitt, D. L. & Garavito, R. M. (2000). Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annual Review of Biochemistry*, 69 (1), 145–182. Annual Reviews. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.145
- Sobacchi, C., Frattini, A., Guerrini, M. M., Abinun, M., Pangrazio, A., Susani, L. et al. (2007). Osteoclast-poor human osteopetrosis due to mutations in the gene encoding RANKL. *Nature Genetics*, 39 (8), 960–962. Nature Publishing Group. doi:10.1038/ng2076
- Spiro, A. S., Beil, F. T., Baranowsky, A., Barvencik, F., Schilling, A. F., Nguyen, K. et al. (2010). BMP-7–induced ectopic bone formation and fracture healing is impaired by

- systemic NSAID application in C57BL/6-mice. *Journal of Orthopaedic Research*, 28 (6), 785–791. doi:<https://doi.org/10.1002/jor.21044>
- Sriuttha, P., Sirichanchuen, B. & Permsuwan, U. (2018). Hepatotoxicity of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *International Journal of Hepatology*, 2018. doi:10.1155/2018/5253623
- Srivastava, S., Weitzmann, M. N., Kimble, R. B., Rizzo, M., Zahner, M., Milbrandt, J. et al. (1998). Estrogen blocks M-CSF gene expression and osteoclast formation by regulating phosphorylation of Egr-1 and its interaction with Sp-1. *Journal of Clinical Investigation*, 102 (10), 1850–1859.
- Steen, H. & Fjeld, T. O. (1989). Lengthening osteotomy in the metaphysis and diaphysis. An experimental study in the ovine tibia. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (247), 297–305.
- Stumpf, W. E., Koike, N., Hayakawa, N., Tokuda, K., Nishimiya, K., Tsuchiya, Y. et al. (1994). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and 22-oxa-1,25-dihydroxyvitamin D₃ in vivo nuclear receptor binding in developing bone during endochondral and intramembranous ossification. *Histochemistry*, 102 (3), 183–194. doi:10.1007/BF00268895
- Su, B. & O'Connor, J. P. (2013). NSAID therapy effects on healing of bone, tendon, and the enthesis. *Journal of Applied Physiology*, 115 (6), 892–899. doi:10.1152/jappphysiol.00053.2013
- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M. T. & Martin, T. J. (1999). Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine Reviews*, 20 (3), 345–357. doi:10.1210/edrv.20.3.0367
- Sudmann, E., Dregelid, E., Bessesen, A. & Mørland, J. (1979). Inhibition of fracture healing by indomethacin in rats. *European Journal of Clinical Investigation*, 9 (5), 333–339. doi:10.1111/j.1365-2362.1979.tb00893.x

- Sugimoto, Y. & Narumiya, S. (2007). Prostaglandin E receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (16), 11613–11617. doi:10.1074/jbc.R600038200
- Suponitzky, I. & Weinreb, M. (1998). Differential effects of systemic prostaglandin E2 on bone mass in rat long bones and calvariae. *Journal of Endocrinology*, 156 (1), 51–57. BioScientifica. doi:10.1677/joe.0.1560051
- Taichman, R. S. (2005). Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*, 105 (7), 2631–2639. doi:10.1182/blood-2004-06-2480
- Tang, W. (2003). The metabolism of diclofenac--enzymology and toxicology perspectives. *Current Drug Metabolism*, 4 (4), 319–329. doi:10.2174/1389200033489398
- Tatsumi, S., Ishii, K., Amizuka, N., Li, M., Kobayashi, T., Kohno, K. et al. (2007). Targeted Ablation of Osteocytes Induces Osteoporosis with Defective Mechanotransduction. *Cell Metabolism*, 5 (6), 464–475. doi:10.1016/j.cmet.2007.05.001
- Tätting, L., Sandberg, O., Bernhardsson, M., Ernerudh, J. & Aspenberg, P. (2018). Different composition of leucocytes in cortical and cancellous bone healing in a mouse model. *Bone & Joint Research*, 7 (12), 620–628. doi:10.1302/2046-3758.712.BJR-2017-0366.R2
- Teitelbaum, S. L. (2000). Bone Resorption by Osteoclasts. *Science*, 289 (5484), 1504–1508. doi:10.1126/science.289.5484.1504
- Tetradis, S., Pilbeam, C. C., Liu, Y., Herschman, H. R. & Kream, B. E. (1997). Parathyroid Hormone Increases Prostaglandin G/H Synthase-2 Transcription by a Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-Mediated Pathway in Murine Osteoblastic MC3T3-E1 Cells*. *Endocrinology*, 138 (9), 3594–3600. doi:10.1210/endo.138.9.5391
- Thompson, Z., Miclau, T., Hu, D. & Helms, J. A. (2002). A model for intramembranous ossification during fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research*, 20 (5), 1091–1098. doi:10.1016/S0736-0266(02)00017-7
- Tian, X. Y., Zhang, Q., Zhao, R., Setterberg, R. B., Zeng, Q. Q., Iturria, S. J. et al. (2008). Continuous PGE2 leads to net bone loss while intermittent PGE2 leads to net bone

- gain in lumbar vertebral bodies of adult female rats. *Bone*, 42 (5), 914–920.
doi:10.1016/j.bone.2007.12.228
- Todd, P. A. & Sorkin, E. M. (1988). Diclofenac Sodium. *Drugs*, 35 (3), 244–285.
doi:10.2165/00003495-198835030-00004
- Tomkinson, A., Reeve, J., Shaw, R. W. & Noble, B. S. (1997). The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82 (9), 3128–3135. doi:10.1210/jcem.82.9.4200
- Tsuda, E., Goto, M., Mochizuki, S., Yano, K., Kobayashi, F., Morinaga, T. et al. (1997). Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 234 (1), 137–142. doi:10.1006/bbrc.1997.6603
- Tsuji, K., Bandyopadhyay, A., Harfe, B. D., Cox, K., Kakar, S., Gerstenfeld, L. et al. (2006). BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nature Genetics*, 38 (12), 1424–1429. doi:10.1038/ng1916
- Turner, C. H. & Burr, D. B. (1993). Basic biomechanical measurements of bone: A tutorial. *Bone*, 14 (4), 595–608. doi:10.1016/8756-3282(93)90081-K
- Turner, C. H. & Pavalko, F. M. (1998). Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *Journal of Orthopaedic Science: Official Journal of the Japanese Orthopaedic Association*, 3 (6), 346–355. doi:10.1007/s007760050064
- Uthoff, H. K. & Rahn, B. A. (1981). Healing patterns of metaphyseal fractures. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (160), 295–303.
- Urist, M. R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science (New York, N.Y.)*, 150 (3698), 893–899. doi:10.1126/science.150.3698.893
- Väänänen, H. K., Zhao, H., Mulari, M. & Halleen, J. M. (2000). The cell biology of osteoclast function. *Journal of Cell Science*, 113 (Pt 3), 377–381.

- Vane, J. R. (1971). Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-like Drugs. *Nature New Biology*, 231 (25), 232–235. Nature Publishing Group. doi:10.1038/newbio231232a0
- Vane, J. R., Bakhle, Y. S. & Botting, R. M. (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 38 (1), 97–120. Annual Reviews. doi:10.1146/annurev.pharmtox.38.1.97
- Voltaren® 100 mg retard Retardtabletten. (2020). , 003, 6.
- Vortkamp, A., Pathi, S., Peretti, G. M., Caruso, E. M., Zaleske, D. J. & Tabin, C. J. (1998). Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mechanisms of Development*, 71 (1–2), 65–76. doi:10.1016/s0925-4773(97)00203-7
- Vu, T. H., Shipley, J. M., Bergers, G., Berger, J. E., Helms, J. A., Hanahan, D. et al. (1998). MMP-9/Gelatinase B Is a Key Regulator of Growth Plate Angiogenesis and Apoptosis of Hypertrophic Chondrocytes. *Cell*, 93 (3), 411. NIH Public Access.
- Wadleigh, D. J. & Herschman, H. R. (1999). Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene by diverse ligands in murine osteoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 264 (3), 865–870. doi:10.1006/bbrc.1999.1606
- Wahlström, O., Risto, O., Djerf, K. & Hammerby, S. (1991). Heterotopic bone formation prevented by diclofenac. Prospective study of 100 hip arthroplasties. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 62 (5), 419–421. doi:10.3109/17453679108996636
- Wang, K., Vishwanath, P., Eichler, G. S., Al-Sebaei, M. O., Edgar, C. M., Einhorn, T. A. et al. (2006). Analysis of fracture healing by large-scale transcriptional profile identified temporal relationships between metalloproteinase and ADAMTS mRNA expression. *Matrix Biology*, 25 (5), 271–281. doi:10.1016/j.matbio.2006.02.001
- Wang, Y., Wan, C., Deng, L., Liu, X., Cao, X., Gilbert, S. R. et al. (2007). The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal

- development. *The Journal of Clinical Investigation*, 117 (6), 1616–1626.
doi:10.1172/JCI31581
- Wang, Z. & Bhattacharyya, T. (2015). Trends of non-union and prescriptions for non-steroidal anti-inflammatory drugs in the United States, 1993–2012. *Acta Orthopaedica*, 86 (5), 632–637. doi:10.3109/17453674.2015.1028860
- Warner, T. D., Giuliano, F., Vojnovic, I., Bukasa, A., Mitchell, J. A. & Vane, J. R. (1999). Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: A full in vitro analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (13), 7563–7568.
- Weber, B. G. & Cech, O. P. (1973). Pathophysiologie, biomechanik, therapie, ergebnisse. *Bern-Stuttgart-Wien: Hans Huber*.
- Weinreb, M., Saponitzky, I. & Keila, S. (1997). Systemic administration of an anabolic dose of PGE2 in young rats increases the osteogenic capacity of bone marrow. *Bone*, 20 (6), 521–526. doi:10.1016/S8756-3282(97)00033-1
- Welting, T. J. M., Caron, M. M. J., Emans, P. J., Janssen, M. P. F., Sanen, K., Coolen, M. M. E. et al. (2011). Inhibition of cyclooxygenase-2 impacts chondrocyte hypertrophic differentiation during endochondral ossification. *European Cells & Materials*, 22, 420–436; discussion 436-437. doi:10.22203/ecm.v022a31
- Wheatley, B. M., Nappo, K. E., Christensen, D. L., Holman, A. M., Brooks, D. I. & Potter, B. K. (2019). Effect of NSAIDs on Bone Healing Rates: A Meta-analysis. *JAAOS - Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 27 (7), e330. doi:10.5435/JAAOS-D-17-00727
- Winet, H. (1996). The role of microvasculature in normal and perturbed bone healing as revealed by intravital microscopy. *Bone*, 19 (1 Suppl), 39S-57S. doi:10.1016/s8756-3282(96)00133-0

- Winkler, D. G., Sutherland, M. K., Geoghegan, J. C., Yu, C., Hayes, T., Skonier, J. E. et al. (2003). Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *The EMBO Journal*, 22 (23), 6267–6276. doi:10.1093/emboj/cdg599
- Winkler, S., Springorum, H.-R., Vaitl, T., Handel, M., Barta, S., Kehl, V. et al. (2016). Comparative clinical study of the prophylaxis of heterotopic ossifications after total hip arthroplasty using etoricoxib or diclofenac. *International Orthopaedics*, 40 (4), 673–680. doi:10.1007/s00264-015-3077-z
- Wong, M., Kireeva, M. L., Kolesnikova, T. V. & Lau, L. F. (1997). Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate-early gene, regulates chondrogenesis in mouse limb bud mesenchymal cells. *Developmental Biology*, 192 (2), 492–508. doi:10.1006/dbio.1997.8766
- Wong, R. M. Y., Choy, M. H. V., Li, M. C. M., Leung, K.-S., K-H Chow, S., Cheung, W.-H. et al. (2018). A systematic review of current osteoporotic metaphyseal fracture animal models. *Bone & Joint Research*, 7 (1), 6–11. doi:10.1302/2046-3758.71.BJR-2016-0334.R2
- Wong, R., Thormann, U., Choy, M., Chim, N., Li, M., Wang, J. et al. (2019). A metaphyseal fracture rat model for mechanistic studies of osteoporotic bone healing. *European Cells and Materials*, 37, 420–430. doi:10.22203/eCM.v037a25
- Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitsock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W. et al. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science (New York, N.Y.)*, 242 (4885), 1528–1534. doi:10.1126/science.3201241
- Xie, C., Ming, X., Wang, Q., Schwarz, E. M., Guldberg, R. E., O’Keefe, R. J. et al. (2008). COX-2 from the injury milieu is critical for the initiation of periosteal progenitor cell mediated bone healing. *Bone*, 43 (6), 1075–1083. doi:10.1016/j.bone.2008.08.109
- Xing, Z., Lu, C., Hu, D., Miclau, T. & Marcucio, R. S. (2010). Rejuvenation of the inflammatory system stimulates fracture repair in aged mice. *Journal of Orthopaedic Research*, 28 (8), 1000–1006. doi:https://doi.org/10.1002/jor.21087

- Xiong, J., Onal, M., Jilka, R. L., Weinstein, R. S., Manolagas, S. C. & O'Brien, C. A. (2011). Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nature Medicine*, 17 (10), 1235–1241. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nm.2448
- Xu, F. & Teitelbaum, S. L. (2013). Osteoclasts: New Insights. *Bone Research*, 1 (1), 11–26. doi:10.4248/BR201301003
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Mochizuki, S.-I., Yano, K., Fujise, N. et al. (1998). Identity of Osteoclastogenesis Inhibitory Factor (OCIF) and Osteoprotegerin (OPG): A Mechanism by which OPG/OCIF Inhibits Osteoclastogenesis in Vitro*. *Endocrinology*, 139 (3), 1329–1337. doi:10.1210/endo.139.3.5837
- Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H. et al. (1990). The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature*, 345 (6274), 442–444. doi:10.1038/345442a0
- Yoshimura, Y., Nomura, S., Kawasaki, S., Tsutsumimoto, T., Shimizu, T. & Takaoka, K. (2001). Colocalization of noggin and bone morphogenetic protein-4 during fracture healing. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 16 (5), 876–884. doi:10.1359/jbmr.2001.16.5.876
- Zelzer, E., Glotzer, D. J., Hartmann, C., Thomas, D., Fukai, N., Soker, S. et al. (2001). Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mechanisms of Development*, 106 (1–2), 97–106. doi:10.1016/s0925-4773(01)00428-2
- Zhang, X., Schwarz, E. M., Young, D. A., Puzas, J. E., Rosier, R. N. & O'Keefe, R. J. (2002). Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *Journal of Clinical Investigation*, 109 (11), 1405–1415. doi:10.1172/JCI0215681
- Zhou, Y., Boudreau, D. M. & Freedman, A. N. (2014). Trends in the use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the general U.S. population. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 23 (1), 43–50. doi:10.1002/pds.3463

Zura, R., Xiong, Z., Einhorn, T., Watson, J. T., Ostrum, R. F., Prayson, M. J. et al. (2016).
Epidemiology of Fracture Nonunion in 18 Human Bones. *JAMA Surgery*, 151 (11),
e162775. doi:10.1001/jamasurg.2016.2775

8 Publikationen

8.1 Kongressvorträge

M. Stief, M.M. Menger, C. Scheuer, B.J. Braun, S.C. Herath, M.F. Rollmann, T. Pohlemann, M.D. Menger, T. Histing. **Diclofenac, a NSAID, delays fracture healing in aged mice.** Deutscher Chirurgen Kongress, Mainz, 2021.

8.2 Publikationen

M.M. Menger, **M. Stief**, C. Scheuer, M.F. Rollmann, S.C. Herath, B.J. Braun, S. Ehnert, A. K. Nussler, M.D. Menger, M.W. Laschke, T. Histing. **Diclofenac, a NSAID, delays callus remodeling and fracture healing in aged mice.** Publikation angefertigt, Einreichung bei Experimental Gerontology ausstehend.

M. Stief, M.M. Menger, C. Scheuer, B.J. Braun, S.C. Herath, M.F. Rollmann, T. Pohlemann, M.D. Menger, T. Histing. **Diclofenac, a NSAID, delays fracture healing in aged mice.** Angenommen zur Veröffentlichung bei European Surgical Research.

9 Danksagung

Besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Tina Histing für die Bereitstellung des Themas, ihre Ideen und Ratschläge sowie ihre motivierende Unterstützung während der gesamten Zeit dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich Prof. Dr. med. Michael D. Menger und Prof. Dr. med. Matthias W. Laschke für die großzügige Erlaubnis zur Nutzung der Räumlichkeiten und technischen Geräte im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie sowie das bereitwillige Teilen ihrer wissenschaftlichen Expertise danken.

Dr. med. Maximilian M. Menger danke ich für seine ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei der Auswertung der Experimente.

Dr. med. Philipp Bremer möchte ich für die große Hilfe bei dem Erlernen der Operationstechnik danken.

Dr. rer. nat. Ahsan Raza danke ich für seine außergewöhnliche Freundlichkeit und seine Hilfe bei der Anfertigung der computertomographischen Bilder.

Dr. med. vet. Christina Körbel gebührt besonderer Dank für ihre Ratschläge zur Narkose und den Umgang mit den Mäusen. Dr. med. vet. Monika Frings danke ich für ihren Rat sowie die Beaufsichtigung der Versuche.

Janine Becker, Julia Parakenings und Dr. med. Claudia Scheuer möchte ich für ihre großartige Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Schnitte und Auswertung der Proteinkonzentrationen im Western Blot danken.

Sämtliche Kollegen im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie haben eine wunderbare Arbeitsatmosphäre geschaffen und standen mir bei Fragen jederzeit zur Seite.

Ohne die Geduld und Unterstützung meiner Familie, meiner Freundin und meiner Freunde wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Vielen Dank!

10 Lebenslauf

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