

Aus dem Bereich Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Klinische Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

# **Einfluss von Pantoprazol auf die Frakturheilung im Alter**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

vorgelegt von: Philipp Bremer

geb. am: 09.07.1995 in Grevenbroich

Dekan: Prof. Dr. med. Michael Menger

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Henning Madry

Tag der Promotion: 25.11.2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1	Knochen	3
2.1.1	Knochenfunktion	3
2.1.2	Makroskopische Anatomie	3
2.1.3	Histologie	4
2.1.4	Osteogenese	6
2.1.5	Knochenstoffwechsel	7
2.1.6	Regulation des Knochenstoffwechsels	7
2.2	Frakturheilung	10
2.2.1	Indirekte Frakturheilung	10
2.2.2	Direkte Frakturheilung	12
2.2.3	Regulation der Frakturheilung	12
2.2.4	Biomarker der Frakturheilung	13
2.2.5	Tiermodelle der Frakturheilung	15
2.2.6	Frakturheilung im Alter	16
2.3	Pantoprazol	17
2.3.1	Pharmakokinetik	17
2.3.2	Pharmakodynamik	17
2.3.3	Klinische Anwendung	18
2.3.4	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen	19
2.4	Fragestellung und Zielsetzung	20
<b>3</b>	<b>Material und Methodik</b>	<b>21</b>
3.1	Studiendesign	21
3.2	Tiermodell	21
3.3	Versuchsdurchführung	22
3.3.1	Anästhesie	22
3.3.2	Operation	23

3.3.3	Postoperativer Verlauf	26
3.3.4	Medikamentenapplikation	26
3.3.5	Tötung der Versuchstiere	26
3.3.6	Präparation der Knochen	26
3.4	Zielkriterien und Auswertung	27
3.4.1	Radiologie	27
3.4.2	Biomechanik	28
3.4.3	Histologie	29
3.4.4	Proteinanalyse	31
3.5	Statistik	34
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
4.1	Postoperativer Verlauf	35
4.2	Radiologie	35
4.3	Biomechanik	39
4.4	Histologie	40
4.5	Proteinanalyse	43
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>47</b>
5.1	Diskussion der Methoden	47
5.2	Diskussion der Ergebnisse	51
5.3	Schlussfolgerungen	59
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>Publikationen</b>	<b>70</b>
7.1	Publikationen	70
7.2	Kongressbeiträge	70
<b>8</b>	<b>Dank</b>	<b>71</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>72</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata
ATPase	Adenosintriphosphatase
BMP	Bone morphogenetic protein
cm	Zentimeter
CYR61	Cysteine-rich protein 61
et al.	et alii
G	Gauge
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
HPF	High power field
IgG	Immunglobulin G
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
mg	Milligramm
min	Minute
M	Molar
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MSCs	Mesenchymale Stammzellen (mesenchymal stem cells)
n	Anzahl

N	Newton
NFATc1	Nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1
OPG	Osteoprotegerin
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PPI	Protonenpumpeninhibitoren
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)
S1P	Sphingosin-1-phosphat
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming growth factor
TRAP	Tartrate resistant acid phosphatase
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
μm	Mikrometer

# 1 Zusammenfassung

Protonenpumpeninhibitoren wie Pantoprazol gehören zu den am häufigsten verschriebenen Medikamenten. Ihre Einnahme ist mit einem erhöhten Frakturrisiko assoziiert. Bei jungen Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Frakturheilung durch Gabe von Pantoprazol beeinträchtigt wird. Ob die Frakturheilung auch im Alter beeinflusst wird, wurde bisher nicht untersucht. Daher war es Ziel dieser Studie, den Einfluss von Pantoprazol auf die Frakturheilung bei alten Mäusen zu untersuchen. Hierfür wurden die Femora von sechzig 16 Monate alten Mäusen geschlossen frakturiert und mit einer intramedullären Zugschraube stabilisiert. Die Applikation von Pantoprazol (n = 31) erfolgte durch eine tägliche intraperitoneale Injektion von 100 mg/kg Körpergewicht gelöst in isotoner Kochsalzlösung. Die Kontrollgruppe (n = 29) erhielt eine äquivalente Menge einer isotonen Kochsalzlösung. Die Frakturheilung wurde mittels biomechanischer, radiologischer, histologischer und proteinbiochemischer Analysen untersucht. Die Biegesteifigkeit war in der Pantoprazolgruppe erniedrigt. Dies war mit einem geringeren Anteil an Knochengewebe, einer verminderten Trabekeldicke und einem erhöhten Anteil an Bindegewebe innerhalb des Frakturkallus assoziiert. Die proteinbiochemische Analyse ergab eine verminderte Expression des Knochenformationsmarkers bone morphogenetic protein 4 sowie ein vermindertes Verhältnis von bone morphogenetic protein 4 zu vascular endothelial growth factor. Des Weiteren zeigte sich ein erhöhtes Verhältnis von receptor activator of nuclear factor kappa B zu Osteoprotegerin. Entsprechend war die Anzahl an Osteoklasten nach 2 Wochen erhöht. Nach 5 Wochen war deren Anzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe hingegen erniedrigt. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Pantoprazol die Frakturheilung bei alten Mäusen beeinträchtigt. Es zeigte sich sowohl eine Störung der Knochenformation als auch der Knochenresorption.

## **The Influence of Pantoprazole on Fracture Healing in the Elderly**

Proton pump inhibitors such as pantoprazole are among the most frequently prescribed drugs. Their use is associated with an increased fracture risk and one study could demonstrate that pantoprazole impairs fracture healing in young mice. It has not yet been investigated whether proton pump inhibitors affect fracture healing in the elderly. Therefore, this research aimed to determine the influence of pantoprazole on fracture healing in aged mice. Closed femur fractures were created in sixty 16-month-old mice and stabilised with an intramedullary compression screw. Pantoprazole (n = 31) was administered by a daily intraperitoneal injection of 100 mg/kg body weight dissolved in normal saline. The control group (n = 29) received an equivalent amount of normal saline. Fracture healing was investigated using biomechanical, radiological, histological and protein biochemical analyses. Bending stiffness was reduced in pantoprazole treated animals. This was associated with a reduced amount of bony tissue, a reduced trabecular thickness and an elevated amount of fibrous tissue within the fracture callus. The protein biochemical analysis revealed a decreased expression of the bone formation marker bone morphogenetic protein 4 and a decreased ratio of bone morphogenetic protein 4 to vascular endothelial growth factor. Moreover, the ratio of receptor activator of nuclear factor kappa B to osteoprotegerin was elevated. Correspondingly, the number of osteoclasts was elevated after 2 weeks. After 5 weeks, however, their number was reduced in comparison to the control group. In conclusion, this study has shown that pantoprazole impairs fracture healing in aged mice. Both bone formation and resorption were disturbed.



## 2 Einleitung

### 2.1 Knochen

#### 2.1.1 Knochenfunktion

Knochen sind Bestandteil des menschlichen Skelettsystems. Sie erfüllen eine Stützfunktion im Bewegungsapparat und eine Schutzfunktion für innere Organe (Schmidt, 2017). Ferner haben sie eine Speicherfunktion im Calcium-Phosphat-Stoffwechsel und sind auch an dessen Regulation beteiligt (Schwab, Oberleithner, 2019). Teile des Knochenmarkes sind zudem maßgeblich an der Blutbildung beteiligt (Lüllmann-Rauch, Asan, 2019).

#### 2.1.2 Makroskopische Anatomie

Makroskopisch werden Knochen unterteilt in lange Knochen (Röhrenknochen) wie das Femur, kurze Knochen wie Handwurzelknochen, platte Knochen wie die Scapula und pneumatisierte Knochen wie die Maxilla. Nicht alle Knochen sind hierbei eindeutig zuzuordnen und werden daher unter den unregelmäßigen Knochen zusammengefasst (Schmidt, 2017).

Adulte Röhrenknochen haben einen charakteristischen makroskopischen Aufbau aus Epiphysen und Diaphyse. Am proximalen und distalen Ende befinden sich die Epiphysen, welche die Gelenkflächen bilden. Dazwischen befindet sich die Diaphyse. Sie wird eingeteilt in eine proximal und eine distal gelegene Metaphyse sowie den dazwischenliegenden Knochenschaft. Zudem gibt es bei langen Knochen Apophysen. Dies sind ursprünglich separate Knochenvorsprünge, an denen Sehnen oder Bänder inserieren. Mit Ausnahme einiger Insertionsstellen und der Gelenkflächen sind Röhrenknochen von außen mit Periost bedeckt. Unterhalb des Periosts befindet sich die Corticalis (Eckstein et al., 2010). Diese dichte Knochenschicht erreicht eine Dicke von bis zu 10 mm (Pufe, 2017). Sie wird durchbrochen von einem oder mehreren Foramina nutricia, welche die Vasa nutricia enthalten. Die hohlzylinderförmige Corticalis des Knochenschaftes begrenzt die Cavitas medullaris. Im Bereich der Epiphyse und Metaphyse befindet sich subcortical hingegen die Spongiosa. Diese besteht aus Knochentrabekeln mit einer mittleren Dicke von 150 µm, welche entlang von mechanischen Belastungslinien ausgerichtet sind. Der Raum zwischen den Knochentrabekeln der Spongiosa ist, wie auch die Cavitas medullaris, mit Knochenmark ausgefüllt (Eckstein et al., 2010).

### 2.1.3 Histologie

Knochengewebe besteht aus extrazellulärer Knochenmatrix und verschiedenen Zellen, welche diese Knochenmatrix aufbauen und modifizieren können. Hierzu gehören Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten. Zudem können die Knochenhüllen und das Knochenmark histologisch abgegrenzt werden (Lüllmann-Rauch, Asan, 2019).

#### 2.1.3.1 *Aufbau der Knochenmatrix*

Die Knochenmatrix des reifen Knochengewebes besteht zu etwa 45 % aus kristallinen Salzen, 30 % organischem Material und 25 % Wasser (Massenanteil). Der organische Anteil besteht zu etwa 90 % aus Typ-I-Kollagen und der kristalline Anteil größtenteils aus Hydroxylapatit (Welsch, Kummer, 2018a). Die Hydroxylapatit-Kristalle sind dabei entlang der Kollagenfibrillen ausgerichtet und bilden so eine biegefesteste Verbundstruktur. Abhängig von der Anordnung der Kollagenfibrillen wird zwischen Geflecht- und Lamellenknochen differenziert. Im Geflechtknochen haben die Kollagenfibrillen keine einheitliche Ausrichtung, sondern sind miteinander verwoben (Lüllmann-Rauch, Asan, 2019). Dieses primäre, unreife Knochengewebe hat einen geringeren Mineralisierungsgrad und einen höheren zellulären Anteil (Spanel-Borowski, Mayerhofer, 2017). Der Geflechtknochen entsteht bei der Neubildung von Knochengewebe und wird anschließend durch den biomechanisch stabileren Lamellenknochen ersetzt. Im Lamellenknochen verlaufen die Kollagenfibrillen parallel zueinander in Lamellen mit einer Dicke von 3-5  $\mu\text{m}$  (Lüllmann-Rauch, Asan, 2019).

Die Anordnung der Lamellen unterscheidet sich innerhalb eines Knochens. In der Spongiosa sind die Lamellen flächig und parallel zur Oberfläche der Trabekel ausgerichtet. Im Bereich der Corticalis ist die Knochenmatrix hingegen hauptsächlich durch Osteone und Schaltlamellen aufgebaut. Osteone bestehen aus einem gefäßführenden Knochenkanal (Havers-Kanal), welcher von bis zu 20 zylindrischen Knochenlamellen umgeben ist. Diese haben helikal ausgerichtete Kollagenfibrillen, deren Drehrichtung zwischen benachbarten Lamellen alterniert. Die Havers-Kanäle verlaufen entlang der Längsachse eines Röhrenknochens, können sich verzweigen und sind zudem durch ebenfalls gefäßführende Volkmann-Kanäle quervernetzt. Die corticalen Gefäße werden von Ästen der Vasa nutricia sowie periostalen Gefäßen gespeist und drainiert. Zwischen den Osteonen befinden sich die Schaltlamellen. Dies sind Überreste ehemaliger Osteone, welche durch den Knochenumbau größtenteils abgebaut wurden. Den Osteonen und Schaltlamellen liegen die äußeren Generallamellen auf. Diese flächigen Lamellen bilden die äußere Knochenoberfläche. Teilweise existieren auch innere Generallamellen (Lüllmann-Rauch, Asan, 2019). Sie sind jedoch weniger zahlreich und gehen teilweise in die Spongiosa über (Spanel-Borowski, Mayerhofer, 2017).

### 2.1.3.2 Knochenhüllen

Den äußeren Generallamellen liegt das schmerzempfindliche Periost auf. Es gliedert sich in eine stark vaskularisierte äußere Adventitia, das Stratum fibrosum und das innenliegende Stratum osteogenicum. Das Stratum fibrosum besteht aus straffem Bindegewebe und befestigt das Periost über die kollagenen Sharpey-Fasern, welche in die Corticalis einstrahlen. Das Stratum osteogenicum liegt zwischen dem Stratum fibrosum und der Corticalis. Es enthält mesenchymale Stammzellen (MSCs), Osteoprogenitorzellen und Präosteoblasten (Pufe, 2017).

Alle inneren Knochenoberflächen sind mit Endost ausgekleidet. Es besteht aus nicht-mineralisierten Kollagenfibrillen und flachen Knochendeckzellen. Dies sind hauptsächlich ruhende Osteoblasten und Osteoprogenitorzellen (Lüllmann-Rauch, Asan, 2019). Es finden sich aber auch ruhende Osteoklasten und MSCs (Pufe, 2017). An das Endost angrenzend kommen zudem Osteoklastenvorläuferzellen vor (Welsch, Kummer, 2018a).

### 2.1.3.3 Knochenzellen

Osteoblasten sind knochenbildende Zellen. Sie leiten sich von Osteoprogenitorzellen ab, welche sich wiederum von MSCs ableiten (Pufe, 2017). Aktive Osteoblasten kommen meist in Gruppen vor, welche über *gap junctions* miteinander verbunden sind und somit ein funktionelles Synzytium darstellen. Sie enthalten viel raues endoplasmatisches Retikulum und einen großen Golgi-Apparat zur Synthese der Knochenmatrix. Diese wird schrittweise aufgebaut, wobei zunächst nicht-mineralisierte Knochenmatrix (Osteoid) sezerniert wird. Für die anschließende Mineralisierung produzieren die Osteoblasten etwa 70 nm große Matrixvesikel, welche durch Ausstülpung der Zellmembran entstehen (Lüllmann-Rauch, Asan, 2019). Sie schnüren sich von Zellfortsätzen ab, die in das Osteoid hineinragen (Welsch, Kummer, 2018a). In den Matrixvesikeln bilden sich Hydroxylapatit-Kristalle, welche die Vesikelmembran durch ihr Wachstum aufreißen. Anschließend lagern sich die Kristalle den Kollagenfibrillen an und wachsen extrazellulär weiter. Das für die Mineralisierung benötigte anorganische Phosphat wird dabei überwiegend von der alkalischen Phosphatase zur Verfügung gestellt. Sie ist an die äußere Oberfläche der Zell- und Vesikelmembran gebunden. Nach Abschluss der Knochenformation gehen die Osteoblasten in Apoptose, einen Ruhezustand oder differenzieren sich zu Osteozyten (Lüllmann-Rauch, Asan, 2019).

Osteozyten sind mit einem Anteil von 90-95 % die häufigsten Zellen des Knochens und erfüllen eine zentrale Steuerungsfunktion im Knochenstoffwechsel. Sie liegen in Lakunen zwischen den Lamellen der Knochenmatrix und haben bis zu 100 dendritische Fortsätze, welche in schmalen Knochenkanälchen verlaufen. Diese Fortsätze verbinden die Osteozyten über *gap junctions* untereinander sowie mit anderen benachbarten Zellen wie Osteoblasten und Osteoklasten (Rupp et al., 2019). Eine Hauptfunktion der Osteozyten besteht in der Transduktion biomechanischer Belastung. Dabei ist der genaue Mechanismus der Detektion bisher nicht abschließend geklärt. Zur Beeinflussung des Knochenstoffwechsels

produzieren Osteozyten verschiedene lokalwirkende Faktoren. Sie können aber auch eigenständig die Knochenmatrix modifizieren. Ferner handelt es sich bei Osteozyten um endokrin sezernierende Zellen. So stimulieren sie die renale Phosphat-Exkretion und inhibieren die Hydroxylierung von Calcidiol zu Calcitriol durch Sekretion von *fibroblast growth factor 23* (Robling, Bonewald, 2020).

Bei den knochenabbauenden Osteoklasten handelt es sich um bis zu 150 µm große, multinukleäre Synzytien aus mehreren Osteoklastenvorläuferzellen (Welsch, Kummer, 2018a). Diese leiten sich von hämatopoetischen Stammzellen ab und haben dieselben Vorläuferzellen wie Monozyten. Osteoklasten liegen wie Osteoblasten der freien Knochenfläche auf (Pufe, 2017). Dabei bildet jeder aktive Osteoklast eine Resorptionslakune, an deren Rändern dieser über Integrine fest mit der Knochenmatrix verbunden ist, sodass sich ein abgeschlossenes extrazelluläres Kompartiment bildet. In dieses Kompartimenten sezernieren Osteoklasten Protonen über eine Protonen-Adenosintriphosphatase (H<sup>+</sup>-ATPase). Durch die Ansäuerung gehen die Hydroxylapatit-Kristalle in Lösung und es bleibt Osteoid zurück. Dieses wird anschließend durch lysosomale Enzyme wie Cathepsin K abgebaut, welche die Osteoklasten in ihre Resorptionslakunen sezernieren (Deutzmann, Bruckner, 2014).

#### 2.1.3.4 Knochenmark

Knochenmark lässt sich in gelbes und blutbildendes rotes Knochenmark unterteilen. Beide bestehen aus einem Grundgerüst retikulären Bindegewebes, in dem hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen vorkommen. Rotes Knochenmark enthält zudem Blutzellen unterschiedlicher Reifungsstadien. Das gelbe Knochenmark hat stattdessen einen höheren Anteil fett-speichernder Retikulumzellen (Welsch, Kummer, 2018b). Im adulten Skelett kommt rotes Knochenmark meist nur noch in platten Knochen, Wirbelkörpern sowie den proximalen Enden von Humerus und Femur vor. Bei Bedarf kann gelbes Knochenmark jedoch wieder in rotes Knochenmark umgewandelt werden (Lüllmann-Rauch, Asan, 2019).

#### 2.1.4 Osteogenese

Es gibt zwei Formen der Osteogenese. Bei der desmalen Osteogenese wird ausgehend von appositionell wachsenden Knochenkernen unmittelbar Knochengewebe gebildet (desmale Ossifikation). Bei der chondralen Osteogenese wird hingegen zunächst ein kontinuierlich wachsendes Modell aus hyalinem Knorpel geformt. Um dieses wird eine desmal entstehende Knochenmanschette gebildet (perichondrale Ossifikation) und das Knorpelgewebe zusätzlich von innen heraus durch Knochengewebe ersetzt (enchondrale Ossifikation). Die Genese der Röhrenknochen verläuft chondral. Epiphyse und Diaphyse haben hierbei separate Knochenkerne und werden bis zum Abschluss des Längenwachstums durch eine knorpelige Wachstumsplatte (Epiphysenfuge) voneinander getrennt (Lüllmann-Rauch, Asan, 2019).

### 2.1.5 Knochenstoffwechsel

Knochengewebe ist auch nach dem Schluss der Epiphysenfugen weiterhin ein dynamisches Gewebe, in dem es zeitlebens zu Knochenformation und Knochenresorption kommt. Dieser Knochenumbau ist für die Aufrechterhaltung der biomechanischen Funktion sowie die Elektrolythomöostase von Bedeutung (Pufe, 2017). Er wird in *Modelling* und *Remodelling* unterteilt (Lüllmann-Rauch, Asan, 2019).

Beim *Modelling* finden Knochenformation und Knochenresorption an unterschiedlichen Knochenoberflächen statt. (Lüllmann-Rauch, Asan, 2019). Es findet beispielsweise beim appositionellen Dickenwachstum durch periostale Knochenformation und endostale Knochenresorption statt (Eckstein et al., 2010). Auch die Änderungen der trabekulären Architektur entsprechend einer geänderten mechanischen Belastung erfolgt durch *Modelling* (Lüllmann-Rauch, Asan, 2019).

Beim *Remodelling* finden Knochenformation und Knochenresorption an einer gemeinsamen Knochenoberfläche statt (Lüllmann-Rauch, Asan, 2019). Es wird von *basic multicellular units* (BMU) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um örtlich und zeitlich aufeinander abgestimmte Osteoklasten- und Osteoblastengruppen, die sich etwa 50 µm pro Tag vorwärtsbewegen. Im Bereich der Corticalis bohren die voranschreitenden Osteoklasten ein Resorptionskanal mit dem Durchmesser eines Osteons in die Knochenmatrix. Dieser Resorptionskanal wird von den nachfolgenden Osteoblasten schichtweise mit Lamellen ausgekleidet bis ein Havers-Kanal zurückbleibt. (Welsch, Kummer, 2018a). Der Aufbau und die vollständige Mineralisierung eines so neu gebildeten Osteons dauert insgesamt mehrere Monate (Pufe, 2017). Im Bereich der Spongiosa resorbieren die Osteoklasten die Knochenmatrix oberflächlich, wodurch sich eine flächige Howship-Lakune bildet. Diese wird von Osteoblasten mit neuen Knochenlamellen aufgefüllt (Welsch, Kummer, 2018a). Insgesamt werden auf diese Weise jährlich etwa 28 % der Spongiosa und 4 % der Corticalis ersetzt. (Pufe, 2017).

Als perilakunäres *Remodelling* wird die Resorption und der schichtweise Wiederaufbau der perilakunären Knochenmatrix durch Osteozyten bezeichnet. Diese Form des *Remodelling* dient insbesondere der Calciumhomöostase (Robling, Bonewald, 2020).

### 2.1.6 Regulation des Knochenstoffwechsels

Der Knochenstoffwechsel wird durch verschiedene lokalwirkende Signalmoleküle gesteuert und unterliegt zudem einer zentralen Regulation durch mehrere Hormone. Eine bedeutende Rolle haben hierbei Osteozyten, deren Aktivität unter anderem von der mechanischen Belastung abhängig ist (Lüllmann-Rauch, Asan, 2019).

### 2.1.6.1 Lokale Signalmoleküle

Die Genese und Aktivität von Osteoklasten wird maßgeblich durch den RANK-Signalweg reguliert (Rupp et al., 2019). Hierbei werden Osteoklastenvorläufer und Osteoklasten über den *receptor activator of nuclear factor kappa B* (RANK) durch Bindung des RANK-Liganden (RANKL) stimuliert. Dies führt zur Fusion der Osteoklastenvorläufer zu Osteoklasten beziehungsweise der Aktivierung reifer Osteoklasten. Da RANKL zellmembrangebunden ist, wird hierfür ein direkter Zellkontakt benötigt (Lüllmann-Rauch, Asan, 2019). Die Hauptquelle von RANKL sind dabei Osteozyten (Nakashima et al., 2011; Xiong et al., 2015). Funktioneller Antagonist von RANKL ist Osteoprotegerin (OPG). Dieses frei lösliche, rezeptorähnliche Protein bindet RANKL, sodass es zu einer kompetitiven Hemmung kommt (Deutzmann, Bruckner, 2014). OPG wird ebenfalls von Osteozyten sezerniert. Diese können zudem den *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) sezernieren, welcher die Bildung von Osteoklastenvorläuferzellen stimuliert (Lüllmann-Rauch, Asan, 2019).

Wie beschrieben folgen Osteoblasten innerhalb einer BMU den Osteoklasten. Durch welche Mechanismen diese Kopplung maßgeblich reguliert wird, ist bisher nicht abschließend geklärt (Lüllmann-Rauch, Asan, 2019). Zu den diskutierten Kopplungsfaktoren gehören Wachstumsfaktoren wie der *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$ 1, die bei der Resorption der Knochenmatrix freigesetzt werden. Es werden jedoch auch von Osteoklasten produzierte Kopplungsfaktoren diskutiert. Hierzu gehören Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Vesikel-gebundenes RANK (Kim, Koh, 2019). Letzteres stimuliert die Knochenformation durch Bindung an osteoblastisches RANKL (Ikebuchi et al., 2018). S1P stimuliert durch Bindung an S1P-Rezeptoren die Migration und weitere Differenzierung von Osteoblastenvorläuferzellen. Zudem stimuliert S1P die Proliferation von (Prä-)Osteoblasten und inhibiert deren Apoptose (Sartawi et al., 2017).

Die osteoblastische Aktivität wird zudem direkt durch Osteozyten beeinflusst. Bedeutend sind hierbei die von Osteozyten sezernierten Antagonisten des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs wie Sclerostin. Dieses hemmt die Osteoblastogenese und osteoblastische Knochenformation. Es wirkt jedoch auch auf die Osteozyten selbst. So hemmt Sclerostin die OPG-Expression und stimuliert die RANKL-Expression sowie die osteozytäre Knochenresorption (Rupp et al., 2019).

### 2.1.6.2 Hormone

Die hormonelle Regulation des Knochenstoffwechsels ist eng mit der Regulation des Calcium-Phosphat-Haushaltes verknüpft. Neben den zentralen Hormonen des Calcium-Phosphat-Haushaltes Parathormon (PTH), Calcitonin und Calcitriol wird der Knochenstoffwechsel jedoch auch durch andere Hormone beeinflusst (Niethard et al., 2017).

PTH erhöht die Plasmacalciumkonzentration (Deutzmann, 2016). Im Knochengewebe bindet es an osteozytäre PTH-Rezeptoren. Dies führt zur Stimulation der perilakunären Knochenresorption und RANKL-Expression, sowie zur Inhibition der Sclerostin-Expression. Hierdurch wird sowohl die Knochenresorption als auch die Knochenformation stimuliert (Wein, 2018). Diverse weitere Wirkungen von PTH auf den Knochenstoffwechsel sind bekannt. Hierzu gehören eine direkte Stimulation der Osteoblastogenese und eine Hemmung der Apoptose von Osteoblasten (Wein, Kronenberg, 2018). Der insgesamt durch PTH vermittelte Einfluss auf den Knochenstoffwechsel ist anscheinend vom Modus der Stimulation abhängig. So führen dauerhaft erhöhte PTH-Plasmakonzentrationen überwiegend zur Stimulation der Knochenresorption, während bei diskontinuierlicher Gabe von PTH die Stimulation der Knochenformation überwiegt (Silva et al., 2011).

Calcitonin senkt die Plasmacalciumkonzentration (Deutzmann, 2016). Im Knochengewebe bindet es an Calcitonin-Rezeptoren auf Osteoklasten und Osteozyten. An Osteoklasten inhibiert es deren knochenresorptive Aktivität und die Sekretion von S1P. An Osteozyten inhibiert es die perilakunäre Knochenresorption und stimuliert die Sclerostin-Sekretion. Somit beeinflusst Calcitonin sowohl die Knochenresorption als auch die Knochenformation. Welchen Einfluss Calcitonin insgesamt auf den Knochenstoffwechsel hat, ist nicht abschließend geklärt. Physiologischerweise hemmt Calcitonin offenbar überwiegend die Knochenformation. Pharmakologisch wird Calcitonin hingegen eingesetzt, um die Knochenresorption zu hemmen (Naot et al., 2018).

Calcitriol stimuliert die intestinale und renale Resorption von Calcium und Phosphat. Hierdurch stellt es die Grundsubstanzen für die Mineralisierung der Knochenmatrix zur Verfügung. Durch die Erhöhung der Calcium-Konzentration wird zudem die Sekretion von Calcitonin stimuliert und die Sekretion von PTH inhibiert. Letzteres wird auch direkt durch Calcitriol vermittelt. Neben diesen indirekten Mechanismen beeinflusst Calcitriol den Knochenstoffwechsel auch durch direkte Wirkung an Knochenzellen (Deutzmann, 2016). Dabei kann Calcitriol die Knochenformation und -resorption abhängig von der Plasmacalciumkonzentration und dem Differenzierungsgrad der Zielzellen sowohl stimulieren als auch hemmen. Es wird jedoch angenommen, dass Calcitriol den Knochenstoffwechsel hauptsächlich indirekt beeinflusst (Christakos et al., 2016).

Testosteron und Östrogene sind ebenfalls von zentraler Bedeutung für die Knochenhomöostase. Dabei haben Östrogene bei beiden Geschlechtern den größeren Einfluss und Testosteron hat bei Frauen kaum Einfluss auf den Knochenstoffwechsel. Beide Hormone hemmen das *Remodelling* und wirken insgesamt osteoanabol. Die genauen Mechanismen sind insbesondere bei Testosteron noch unklar. Bisher ist bekannt, dass Östrogene die Expression von Sclerostin und RANKL inhibieren (Khosla, Monroe, 2018).

## 2.2 Frakturheilung

Frakturen sind vollständige Kontinuitätsunterbrechungen eines Knochens. Sie entstehen durch eine äußere Krafteinwirkung, welche die Bruchfestigkeit des Knochens übersteigt. Die Fraktur kann dabei am Ort der einwirkenden Kraft auftreten (direkte Fraktur) oder durch die interne Spannungsverteilung an einem entfernteren Ort auftreten (indirekte Fraktur). Ist die Bruchfestigkeit beispielsweise im Rahmen einer Osteoporose herabgesetzt, so reicht zur Frakturierung bereits eine relativ geringe Krafteinwirkung. Die resultierende Fraktur wird pathologische Fraktur genannt. Davon abzugrenzen ist die Ermüdungsfraktur, welche schrittweise durch langfristige Überbeanspruchung entsteht (Niethard et al., 2017).

Unmittelbar nach Entstehung einer Fraktur beginnt die Frakturheilung. Sie kann nach dem Muster der direkten oder der indirekten Frakturheilung erfolgen. Die direkte Frakturheilung findet jedoch meist nur nach bestimmten operativen Maßnahmen statt (Raschke, Haas, 2012), während die indirekte Frakturheilung den normalen Heilungsmechanismus darstellt (Niethard et al., 2017). Beide Mechanismen können die Kontinuität des Knochens ohne zurückbleibendes Narbengewebe wiederherstellen. Stattdessen folgen sie Mustern der Osteogenese und des Knochenumbaus, wodurch die biomechanischen Eigenschaften vollständig wiederhergestellt werden können (Marsell, Einhorn, 2011). Teilweise kommt es jedoch zu Störungen der Frakturheilung wie verzögerter Frakturheilung oder Pseudarthrosen. Ersteres entspricht einer ausbleibenden knöchernen Überbrückung nach 4-6 Monaten und Letzteres nach mehr als 6 Monaten (Niethard et al., 2017). Die Prävalenz von Pseudarthrosen wurde ursprünglich auf 5-10 % aller Frakturen geschätzt (Pountos et al., 2013). Bei neueren, umfangreichen Studien zeigte sich hingegen eine Prävalenz von 2-5 % (Mills et al., 2017; Reahl et al., 2020; Zura et al., 2016).

### 2.2.1 Indirekte Frakturheilung

Die indirekte Frakturheilung folgt in weiten Teilen dem Muster der chondralen Osteogenese (Marsell, Einhorn, 2011). Hierbei werden die Frakturrenden zunächst durch eine Konstruktion aus biomechanisch instabilerem Gewebe verbunden. Diese temporäre Gewebekonstruktion (Frakturkallus) wird kontinuierlich umgebaut und dabei schrittweise durch stabileres Gewebe ersetzt, bis eine normale Knochenstruktur zurückbleibt. Der zugrundeliegende Prozess kann vereinfacht in drei sich überlappende Phasen unterteilt werden: Inflammation, Kallusformation und *Remodelling* (Loi et al., 2016).

Initial kommt es an den Frakturrenden durch eine Ruptur der Gefäße des Knochens und teils auch des umliegenden Weichteilgewebes zur Ausbildung eines Hämatoms. In dieses wandern im Rahmen einer akuten Entzündungsreaktion verschiedene Entzündungszellen wie Makrophagen ein. Diese



phagozytieren den nicht-mineralisierten Detritus und sezernieren Faktoren, welche die Angiogenese sowie die Migration, Differenzierung und Proliferation weiterer relevanter Zellen wie MSCs stimulieren. Der mineralisierte Detritus wird hingegen durch Osteoklasten abgebaut (Loi et al., 2016). Analog zur Wundheilung wird das Frakturhämatom durch Fibrozyten mit Granulationsgewebe ersetzt, in welches neue Blutgefäße einwachsen (Harwood et al., 2010).

Zu Beginn der Kallusformation bilden Chondrozyten im Frakturspalt und um die Frakturrenden herum avaskuläres Knorpelgewebe (Marsell, Einhorn, 2011). Hierbei entstehen an beiden Frakturrenden separate halbmondförmige Knorpelmanschetten um den Knochen (Gerstenfeld et al., 2003). Das Granulationsgewebe wird dabei entweder direkt durch Knorpelgewebe ersetzt oder als Zwischenschritt zunächst durch kollagenes Bindegewebe ersetzt. Auf diese Weise wird ein fibrokartilaginärer weicher Kallus geformt (Schindeler et al., 2008).

Die Formation des knöchernen harten Kallus dauert insgesamt mehrere Wochen bis Monate (Niethard et al., 2017) und beginnt zeitgleich mit der Formation des weichen Kallus (Marsell, Einhorn, 2011). Hierbei wird ausgehend vom Periost in einiger Entfernung zum Frakturspalt desmal Geflechtknochen gebildet. Dieser wächst in Richtung der Frakturrenden und formt ähnlich zur perichondralen Ossifikation eine Knochenmanschette um den Kallus. Zudem wird der harte Kallus analog zu den Mechanismen der enchondralen Ossifikation in der Wachstumsplatte gebildet (Loi et al., 2016). Bei der Frakturheilung wird dieser Prozess auch als *Remodelling* des weichen Kallus bezeichnet. Dabei wird der kartilaginäre Kallus schrittweise durch Geflechtknochen ersetzt, während gleichzeitig neue Gefäße in den Kallus einwachsen (Schindeler et al., 2008). Letzteres wird durch hypertrophe Chondrozyten stimuliert. Diese exprimieren zudem Matrixmetalloproteasen und bauen so die ursprüngliche Knorpelmatrix ab, während sie zugleich mit der Mineralisierung der Extrazellulärmatrix beginnen (Bahney et al., 2015). Die Extrazellulärmatrix wird außerdem durch Osteoklasten/Chondroklasten (Gerstenfeld et al., 2009; Ota et al., 2009) und Gefäßzellen abgebaut (Bahney et al., 2015; Gerstenfeld et al., 2009). Lange Zeit wurde angenommen, dass alle hypertrophen Chondrozyten im weiteren Verlauf in Apoptose gehen und damit Platz für das Einwachsen von Gefäßen schaffen (Marsell, Einhorn, 2011). Dies wird mit der Invasion von Osteoblastenvorläuferzellen assoziiert (Maes et al., 2010). Offenbar entsteht ein großer Teil der Osteoblasten jedoch aus Chondrozyten (Hu et al., 2017; Zhou et al., 2014). Unabhängig von ihrer Genese bilden die Osteoblasten im Randbereich des kartilaginären Kallus Knochenmatrix (Bahney et al., 2019).

Der initial gebildete Geflechtknochen des harten Kallus wird analog zum *Remodelling* des normalen Knochenstoffwechsels durch Osteoklasten abgebaut und durch an diese gekoppelte Osteoblasten mit Lamellenknochen ersetzt (Harwood et al., 2010). Bis die ursprüngliche Knochenstruktur durch das *Remodelling* des harten Kallus vollständig wiederhergestellt ist, dauert es bis zu 2 Jahre (Niethard et al., 2017).

## 2.2.2 Direkte Frakturheilung

Die direkte Frakturheilung kann nach dem Muster der Kontakt- und der Spaltheilung erfolgen. Die Kontaktheilung findet bei einem Frakturspalt von weniger als 0,01 mm statt. Hierbei werden die Frakturrenden direkt durch Lamellenknochen verbunden, welcher entsprechend den Mechanismen des normalen Knochenbaus gebildet wird. Die Spaltheilung findet bei einem größeren Frakturspalt statt, welcher jedoch kleiner als 1 mm ist (Marsell, Einhorn, 2011). Dabei wird der Frakturspalt zunächst mit desmal gebildetem Geflechtknochen überbrückt und anschließend durch *Remodelling* mit Lamellenknochen ersetzt (Loi et al., 2016). Die direkte und indirekte Frakturheilung dauern insgesamt in etwa gleich lang (Raschke, Haas, 2012).

## 2.2.3 Regulation der Frakturheilung

Der Ablauf der Frakturheilung ist maßgeblich von den biomechanischen Bedingungen abhängig. So kommt es nur bei sogenannter absoluter Stabilität der Fraktur zur direkten Frakturheilung. Diese kann durch die anatomische Reposition und anschließende Kompression mittels Plattenosteosynthese erreicht werden (Harwood et al., 2010). Die direkte Frakturheilung wird jedoch auch physiologischerweise bei Fissuren (Raschke, Haas, 2012) und metaphysären Frakturen beobachtet (Loi et al., 2016). Wird nur eine relative Stabilität erreicht, kommt es zur indirekten Frakturheilung. Hierbei wird angenommen, dass ein Gewebetyp nur entstehen kann, wenn die Belastung am Ort der Entstehung geringer ist als die Belastungsgrenze des jeweiligen Gewebetyps. In Bezug auf die Kallusformation wird daraus gefolgert, dass die Bildung eines elastischen Gewebetyps die Stabilität soweit erhöht, bis ein weniger elastischer Gewebetyp gebildet werden kann. Hinsichtlich der Translation der biomechanischen Belastung legen mehrere in-vitro-Experimente eine direkte Beeinflussung beteiligter Zellen nahe (Harwood et al., 2010). So kann die Differenzierung von MSCs zu Fibroblasten, Chondrozyten oder Osteoblasten durch jeweils unterschiedliche Belastungen gefördert werden. Auch die Proliferation und Aktivität der genannten differenzierten Zellen wird durch die biomechanischen Belastung beeinflusst (Jagodzinski, Krettek, 2007).

Die Frakturheilung wird zudem durch zahlreiche Signalmoleküle beeinflusst (Lukač et al., 2020). Für die Initiierung der Frakturheilung sind einige von Entzündungszellen sezernierte Faktoren wie bestimmte Interleukine, der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und mehrere Wachstumsfaktoren von Bedeutung (Bahney et al., 2019; Harwood et al., 2010). Auch einige *bone morphogenetic proteins* (Marsell, Einhorn, 2009) sowie der *vascular endothelial growth factor* (Marsell, Einhorn, 2011) werden als bedeutend für die Regulation der Frakturheilung eingeschätzt (siehe Kapitel 2.2.4). Darüber hinaus werden die beteiligten Knochenzellen auch während der Frakturheilung weiterhin durch die Botenstoffe des normalen Knochenstoffwechsels beeinflusst (siehe Kapitel 2.1.6). Das genaue Zusammenspiel der beteiligten Signalmoleküle ist allerdings nicht vollständig verstanden (Lukač et al., 2020).

## 2.2.4 Biomarker der Frakturheilung

Im Folgenden werden verschiedene Proteine beschrieben, die in dieser Studie als Biomarker der Frakturheilung genutzt wurden. Dazu gehören auch die Proteine RANKL und OPG, deren Wirkmechanismus bereits in Kapitel 2.1.6.1 beschrieben wurde.

### 2.2.4.1 *Vascular Endothelial Growth Factor*

Unter der Bezeichnung *vascular endothelial growth factor* (VEGF) werden mehrere Wachstumsfaktoren zusammengefasst, welche die Vaskulogenese und Angiogenese regulieren. Dabei ist insbesondere VEGF-A maßgeblich an der Regulation der Angiogenese beteiligt. Es bindet an die VEGF-Rezeptoren 1 und 2, welche hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert werden. Die Bindung von VEGF an diese Rezeptoren führt zu einer Signaltransduktion nach dem Muster der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Letztlich stimuliert VEGF hierdurch die Proliferation, Migration und Viabilität der jeweiligen Zielzelle sowie die Permeabilität des Endothels (Apte et al., 2019). Die durch VEGF induzierte Angiogenese ist dabei unter anderem von lokalen VEGF-Gradienten abhängig (Blanco, Gerhardt, 2013). Im Frakturkallus werden VEGF-A, -B, -C, und -D exprimiert (Gerstenfeld et al., 2003). VEGF-B bindet an VEGF-Rezeptor-1, während VEGF-C und -D an VEGF-Rezeptor-2 und -3 binden. Letzterer ist allerdings hauptsächlich für die Lymphangiogenese von Bedeutung (Apte et al., 2019). Ihr Maximum erreicht die VEGF-Expression bei der murinen Frakturheilung nach etwa 10 Tagen (Komatsu, Hadjiargyrou, 2004). Wichtige Quellen von VEGF sind dabei Makrophagen (Loi et al., 2016), hypertrophe Chondrozyten (Bahney et al., 2015) und Zellen der osteoblastischen Zellreihe (Buettmann et al., 2019). Es wird angenommen, dass die Vaskularisierung des Frakturkallus hauptsächlich durch VEGF reguliert wird (Marsell, Einhorn, 2011). So führt die Inhibition von VEGF während der Frakturheilung zu einer verminderten Vaskularisierung des Frakturkallus, während die lokale Applikation von VEGF zu einer vermehrten Vaskularisierung führt. Zudem wird bei Ersterem eine verminderte Mineralisierung und bei Letzterem eine vermehrte Mineralisierung des Frakturkallus beobachtet (Street et al., 2002). Daher wird angenommen, dass die VEGF-induzierte Vaskularisierung für das *Remodelling* des weichen Kallus zum hartem Kallus benötigt wird (Bahney et al., 2015).

### 2.2.4.2 *Bone Morphogenetic Proteins*

*Bone morphogenetic proteins* (BMPs) sind extrazelluläre Signalmoleküle, welche maßgeblich an der Regulation der Osteogenese beteiligt sind (Salazar et al., 2016). Teils werden über 20 Proteine zur Gruppe der BMPs gezählt, von denen die meisten zur TGF- $\beta$ -Familie gehören (Lowery, Rosen, 2018). Sie binden an BMP-Rezeptorkomplexe und führen dadurch zur SMAD-abhängigen Modifikation der Genexpression in der Zielzelle. Dabei wirkt BMP-3 jedoch antagonistisch zu den übrigen BMPs (Salazar et al., 2016) und BMP-1 interagiert als Metalloprotease nicht eigenständig mit BMP-Rezeptoren (Lowery, Rosen, 2018), sondern baut BMP-Antagonisten ab (Marsell, Einhorn, 2009).

Für manche BMPs konnte gezeigt werden, dass sie auch an der Frakturheilung beteiligt sind. Hierzu gehören auch BMP-2 und BMP-4, welche in dieser Studie als Biomarker verwendet wurden (Marsell, Einhorn, 2009). Sie werden während der Frakturheilung durch diverse Zellen exprimiert (Bahney et al., 2019; Huntley et al., 2019; Loi et al., 2016). Die Expression von BMP-2 nimmt im Mausmodell innerhalb der ersten 24 Stunden nach einer Fraktur maximal zu (Cho et al., 2002). Wird die BMP-2-Expression vollständig ausgeschaltet, bleibt die Formation des Frakturkallus weitestgehend aus (Tsuji et al., 2006). Daher wird angenommen, dass BMP-2 für die Initiierung der Frakturheilung von Bedeutung ist. Möglicherweise auch durch die Modulation der Expression anderer BMPs (Marsell, Einhorn, 2009). Das globale Maximum der BMP-2-Expression wird nach etwa 21 Tagen erreicht. Die BMP-4-Expression erreicht ihr Maximum bei der murinen Frakturheilung nach einem langsamen Anstieg etwa 14 Tage nach der Frakturierung. Beide Maxima befinden sich im Zeitraum der maximalen Knochenformation (Cho et al., 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass BMPs an der Regulation der Chondrozytogenese und Osteoblastogenese beteiligt sind. Sie sind daher offenbar insbesondere für die Regulation der enchondralen Knochenformation von Bedeutung. Die genaue Rolle der einzelnen BMPs bei der Frakturheilung ist allerdings weiterhin nicht abschließend geklärt (Bahney et al., 2019). Ferner sind BMPs auch an der Regulation der Angiogenese beteiligt (Mack, Iruela-Arispe, 2018; Mouillesseaux et al., 2016). Die Wirkung von BMPs auf Endothelzellen wird durch den Notch-Signalweg moduliert, welcher wiederum durch VEGF induziert wird (Mack, Iruela-Arispe, 2018). Das Zusammenspiel dieser Signalwege reguliert die Strukturierung von sich neubildenden Gefäßnetzwerken (Mack, Iruela-Arispe, 2018; Mouillesseaux et al., 2016). Sowohl BMP-2 als auch BMP-4 wirken proangiogenetisch (García de Vinuesa et al., 2016).

#### 2.2.4.3 *Cysteine-rich Protein 61*

Das *cysteine-rich protein 61* (CYR61) ist ein extrazelluläres Signalmolekül, welches für die Reparaturprozesse zahlreicher Organe von Bedeutung ist (Kim et al., 2018). Auch im Frakturkallus wird CYR61 exprimiert (Hadjiargyrou et al., 2000; Lienau et al., 2006). Die Gabe von exogenem CYR61, führt zu einer beschleunigten Frakturheilung (Frey et al., 2012), während eine Inhibition von CYR61 die Frakturheilung beeinträchtigt (Athanasopoulos et al., 2007). Hinsichtlich der zugrundeliegenden Mechanismen konnte bisher gezeigt werden, dass CYR61 die Migration von MSCs, deren Differenzierung zu Osteoblasten (Si et al., 2006) sowie die Proliferation von (Prä-)Osteoblasten stimuliert (Schütze et al., 2005). CYR61 hemmt zudem die Osteoklastogenese RANK-unabhängig (Crockett et al., 2007) sowie durch Inhibition der RANKL-Expression in Osteozyten und Osteoblasten (Zhao et al., 2018). Ferner wirkt CYR61 proangiogenetisch (Zhao et al., 2018). Es induziert wie VEGF den Notch-Signalweg in Endothelzellen (Chintala et al., 2015) und stimuliert zudem die Expression von VEGF-A in Osteozyten und Osteoblasten (Zhao et al., 2018) sowie die Reifung von Chondrozyten zu hypertrophen Chondrozyten (Zhang et al., 2016). Diese produzieren im Gegensatz zu Ersteren VEGF (Hu et al., 2017). Auch die Chondrozytogenese selbst wird durch CYR61 stimuliert (Wong et al., 1997).

#### 2.2.4.4 *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand und Osteoprotegerin*

RANKL und OPG werden während der Frakturheilung vermehrt exprimiert (Kon et al., 2001). Aufgrund ihres funktionellen Antagonismus wird oftmals das Verhältnis von RANKL zu OPG als Biomarker der Osteoklastogenese und Osteoklastenaktivität genutzt (Loi et al., 2016). Die Expression beider Proteine steigt im Mausmodell innerhalb der ersten 24 Stunden nach einer Fraktur maximal an und erreicht ihr globales Maximum. Die OPG-Expression hat ein lokales Minimum an Tag 3 und ein lokales Maximum an Tag 7. Die RANKL-Expression hat ein lokales Minimum an Tag 7 und ein lokales Maximum an Tag 14. Dabei überwiegt die OPG-Expression während der maximalen Knorpelformation an Tag 7 und die RANKL-Expression während der maximalen Knorpelresorption an Tag 14 (Kon et al., 2001). Daher wird angenommen, dass RANKL und OPG das *Remodelling* des weichen Kallus regulieren (Gerstenfeld et al., 2003; Kon et al., 2001). Konsistent hierzu führt die Inhibition von RANKL zu einem verzögerten Abbau des Knorpelgewebes (Gerstenfeld et al., 2009), während die Genausschaltung von OPG in murinen Chondrozyten dies beschleunigt (Ota et al., 2009). Obwohl die Expression beider Proteine während des *Remodelling* des harten Kallus abfällt, ist ihre Expression weiterhin erhöht (Kon et al., 2001). Daher wird vermutet, dass RANKL und OPG auch an dessen Regulation beteiligt sind (Gerstenfeld et al., 2003; Kon et al., 2001). Diese Vermutung liegt nahe, da das *Remodelling* des harten Kallus denselben Mechanismen folgt wie das *Remodelling* des normalen Knochenstoffwechsels (Gerstenfeld et al., 2003; Harwood et al., 2010).

#### 2.2.4.5 *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

Das *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) ist ein zentrales Protein der DNA-Replikation und folglich der Zellproliferation. Als sogenannter Gleitring verankert das zirkuläre Protein DNA-Polymerasen an der DNA und erhöht so deren Prozessivität. Auf diese Weise ist es auch an der DNA-Reparatur beteiligt. Darüber hinaus ist es für die Steuerung der Apoptose von Bedeutung. So inhibiert es die Bildung mehrerer Caspasen durch Bindung an die entsprechenden Procaspasen (Choe, Moldovan, 2017). Aufgrund seiner Funktion findet PCNA breite Anwendung als Proliferationsmarker (Wang, 2014). Auch bei der Untersuchung der Frakturheilung wurde es hierfür bereits verwendet (Histing et al., 2012; Holstein et al., 2008).

### 2.2.5 Tiermodelle der Frakturheilung

Tiermodelle ermöglichen die Untersuchung der Frakturheilung unter standardisierten Bedingungen (Holstein et al., 2009). Da es sich bei der Frakturheilung um einen komplexen physiologischen Prozess handelt, welcher nicht vollständig durch in-vitro-Experimente abgebildet werden kann, sind sie weiterhin der Goldstandard bei deren Untersuchung (Peric et al., 2015). Ursprünglich wurden dabei hauptsächlich größere Tiere wie Hunde und Schafe verwendet, da angenommen wird, dass die Frakturheilung bei diesen Tieren der menschlichen Frakturheilung am nächsten kommt. Unterdessen

werden jedoch überwiegend murine Frakturmodelle genutzt (Histing et al., 2011; O'Loughlin et al., 2008). Solche Kleintiermodelle sind kostengünstiger und ermöglichen dadurch größere Studiengruppen. Bei Mäusen können zudem relativ unkompliziert genetische Veränderungen vorgenommen werden und es stehen zahlreiche monoklonale Antikörper zur Verfügung, wodurch die Rolle einzelner endogener Moleküle bei der Frakturheilung untersucht werden kann (Histing et al., 2011; Holstein et al., 2009).

Bei den bisher etablierten Frakturmodellen der Maus wird die Fraktur entweder über einen offenen Zugangsweg durch eine Osteotomie erzeugt oder ohne Freilegung des Knochens durch 3-Punkt-Biegung. Bei letztgenanntem Vorgehen wird die Fraktur anschließend über einen minimalinvasiven Zugang versorgt. Durch ein solches geschlossenes Frakturmodell kann das Weichteiltrauma reduziert werden (Histing et al., 2011; Holstein et al., 2009). Wie bereits besprochen, ist die Frakturheilung von den biomechanischen Bedingungen abhängig (siehe Kapitel 2.2.3). Daher wurden einige Stabilisierungsmethoden für die jeweiligen Tiermodelle entwickelt. Im Mausmodell werden intramedulläre Nägel, Verriegelungsnägel und Kompressionsschrauben verwendet. Auch eine Versorgung mittels Plattenosteosynthese oder Fixateur externe ist möglich. Die genannten Methoden unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Invasivität und des Stabilisierungsgrades, weswegen auch Unterschiede bei der Frakturheilung beobachtet werden (Histing et al., 2011). Von den derzeit verfügbaren Methoden kann durch einen Fixateur externe die größte Stabilität erreicht werden, während intramedulläre Nägel nur eine geringe Stabilität bieten (Gunderson et al., 2020).

## 2.2.6 Frakturheilung im Alter

Im Alter steigt das Risiko für Frakturen. Dies betrifft insbesondere Oberschenkelhalsfrakturen, Wirbelsäulenfrakturen und bei Frauen distale Radiusfrakturen. Eine Ursache hierfür ist die steigende Prävalenz der Osteoporose im Alter, welche die Bruchfestigkeit der Knochen reduziert (Ensrud, 2013). Allerdings nimmt die Elastizität und Bruchfestigkeit der Knochen mit steigendem Alter auch generell ab (Zioupos et al., 2020). Zudem kommt es im Alter vermehrt zu Stürzen, welche den häufigsten Unfallmechanismus bei Frakturen im Alter darstellen. So stürzen etwa 30-40 % der über 65-jährigen mindestens einmal pro Jahr. Als Ursache hierfür wird die steigende Prävalenz von stabilitäts-reduzierenden Erkrankungen wie orthostatische Hypotonie, Schlaganfälle oder Parkinson-Syndrome angenommen. Zudem können zahlreiche Medikamente die Sturzneigung erhöhen, welche vermehrt von älteren Patienten eingenommen werden (Ambrose et al., 2015).

Gleichzeitig wird höheres Alter als Risikofaktor für Störungen der Frakturheilung angesehen (Foulke et al., 2016; Hak et al., 2014). Die Hospitalisierungsdauer nach Frakturen nimmt mit steigendem Alter zu (Gruber et al., 2006) und nach altersassoziierten Frakturen wird eine erhöhte Mortalität beobachtet (Clark et al., 2017). Im Tiermodell konnte eine verzögerte Frakturheilung im Alter bereits nachgewiesen werden (Lopas et al., 2014; Lu et al., 2005; Meyer et al., 2001). Zahlreiche potentielle Ursachen hierfür werden diskutiert. So könnten altersbedingte Veränderungen im Immunsystem die Inflammationsphase

der Frakturheilung beeinträchtigen (Bahney et al., 2019; Clark et al., 2017). Ferner ist die Differenzierung von Osteoblasten und Chondrozyten im Alter beeinträchtigt. Dies könnte eine verminderte Kallusformation und ein verzögertes *Remodelling* bedingen (Clark et al., 2017). Auch die Vaskularisierung des Kallus ist im Alter beeinträchtigt (Lu et al., 2008). Zudem konnten Ode et al. (2014) zeigen, dass die Expression zahlreicher Proteine bei der Frakturheilung im Alter verändert ist.

## 2.3 Pantoprazol

Pantoprazol gehört zur Gruppe der Protonenpumpeninhibitoren (PPI), welche zur Therapie und Prophylaxe magensäureassoziierter Erkrankungen eingesetzt werden (Holzer, 2017). PPI gehören zu den am häufigsten verordneten Medikamenten in Deutschland. Alleine im Jahr 2018 wurde die Verordnung von insgesamt 3,55 Milliarden Tagesdosen über die gesetzlichen Krankenversicherungen abgerechnet. Mit 2,68 Milliarden Tagesdosen war Pantoprazol hierbei der häufigste verschriebene PPI-Wirkstoff (Lohse, Mössner, 2019) und mit 21,2 Millionen Verordnungen der vierthäufigste verschriebene Wirkstoff insgesamt (Knecht et al., 2019). Weitere Wirkstoffe, die zu Gruppe der PPI gehören, sind Omeprazol, Esomeprazol, Rabeprazol, Lansoprazol (Mutschler et al., 2013) und Dexlansoprazol (Hansen et al., 2019).

### 2.3.1 Pharmakokinetik

PPI können intravenös oder oral appliziert werden. Für Letzteres werden magensaftresistente Arzneiformen benötigt. Nach oraler Einnahme werden PPI im Dünndarm resorbiert und erreichen nach 1-3 Stunden die maximale Plasmakonzentration (Holzer, 2017). Dabei hat Pantoprazol eine orale Bioverfügbarkeit von 77 %, eine Plasmaeiweißbindung von 98 % (Graefe, 2016) und eine Halbwertszeit von 0,9-1,9 Stunden. Im Magen werden PPI über die basolaterale Zellmembran der Belegzellen aus dem Blut aufgenommen und akkumulieren anschließend in den luminal gelegenen Canaliculi. Dort wird die PPI-Prodrug (ein Benzimidazol-Derivat) protoniert, wodurch eine Sulfensäure entsteht. Diese wird durch Abspaltung von Wasser zu zyklischem Sulfenamid, welches der aktive Metabolit ist. Der Wirkstoffanteil, welcher nicht auf diese Weise metabolisiert wurde, wird in der Leber durch CYP2C19 und CYP3A metabolisiert (Mutschler et al., 2013). Die entstehenden inaktiven Metaboliten werden überwiegend renal ausgeschieden. Zyklisches Sulfenamid ist hingegen nicht membrangängig und verbleibt daher in den Canaliculi (Holzer, 2017).

### 2.3.2 Pharmakodynamik

In der apikalen Zellmembran der Belegzellen befinden sich  $H^+/K^+$ -ATPasen, welche Protonen im Austausch gegen Kaliumionen in das Magenlumen sezernieren. Das zyklische Sulfenamid bindet unter

Ausbildung einer Disulfidbrücke kovalent an extrazelluläre Cysteinreste der  $\alpha$ -Untereinheit dieser  $H^+/K^+$ -ATPasen. Hierdurch kommt es zu deren irreversibler Hemmung (Offermanns, 2016). Die Säuresekretion wird dabei durch übliche Tagesdosen erst nach 3- bis 5-tägiger Gabe maximal gehemmt. Dies entspricht einer Hemmung von etwa 90 % der basalen und mahlzeitinduzierten Säuresekretion. Die hierdurch bedingte Erhöhung des pH-Werts im Magen führt zu einer verminderten Bildung von Pepsin aus Pepsinogen (Holzer, 2017). Aufgrund der irreversiblen Hemmung ist zur Steigerung der Säuresekretion eine Neubildung der  $H^+/K^+$ -ATPasen notwendig (Offermanns, 2016). Daher kommt es erst 3-4 Tage nach dem Absetzen zu einer vollständigen Normalisierung der Magensäuresekretion (Holzer, 2017). Es kann auch zu einer verstärkten Produktion von Magensäure im Sinne eines Rebound-Effekts kommen, wenn die Gastrin-Plasmakonzentration nach dem Absetzen von PPI erst verzögert auf das basale Niveau absinkt (Helgadóttir et al., 2020; Holzer, 2017).

### 2.3.3 Klinische Anwendung

PPI werden bei Erkrankungen des Ösophagus, Magens und Duodenums eingesetzt, welche mit einem Ungleichgewicht zwischen den protektiven Faktoren der Schleimhaut (Bicarbonat, Schleimschicht) und exogenen oder endogenen Noxen wie Salzsäure und Pepsin assoziiert sind (Mutschler et al., 2013). So werden PPI bei der gastroösophagealen Refluxkrankheit und gastroduodenalen Ulzera als Mittel der ersten Wahl eingesetzt (Lüllmann et al., 2016). Letztere sind größtenteils mit einer Helicobacter-pylori-Infektion assoziiert. Zur Eradikation dieser Infektion werden PPI zusammen mit Antibiotika gegeben. Die zweithäufigste Ursache gastroduodenaler Ulzera sind unselektive Cyclooxygenase-Hemmer wie Acetylsalicylsäure, weswegen PPI auch zur Prophylaxe bei deren Einnahme gegeben werden. Sie werden zudem bei der Therapie des Zollinger-Ellison-Syndroms sowie zur Rezidivprophylaxe der Refluxösophagitis und gastroduodenaler Ulzera verwendet, sodass es zu einer Langzeitanwendung kommt (Mutschler et al., 2013). Der Anteil der Langzeitanwendungen wird auf über 90 % geschätzt (Lüllmann et al., 2016). Es wird allerdings angenommen, dass ein großer Teil hiervon nicht indiziert ist (Helgadóttir et al., 2020; McColl, Gillen, 2009).

PPI werden insbesondere bei älteren Patienten eingesetzt. So konnten eine isländische und eine dänische Studie zeigen, dass der Anteil der jeweiligen Gesamtbevölkerung, welcher mindestens einmal innerhalb eines Jahres PPI einnimmt, mit steigendem Alter kontinuierlich zunimmt. Dies entsprach einem Anteil von unter 2 % respektive unter 10 % bei unter-40-Jährigen sowie über 20 % respektive über 30 % bei über-80-Jährigen. Gleichzeitig nimmt in diesen Ländern mit steigendem Alter auch der Anteil der Patienten zu, welche eine Therapie mit PPI nach deren Initiierung länger als ein Jahr fortführen (Hálfðánarson et al., 2018; Pottegård et al., 2016).



### 2.3.4 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen

Insgesamt werden PPI meist als gut verträglich beurteilt. Zu den beschriebenen unerwünschten Arzneimittelwirkungen gehören Kopfschmerzen, Schlafstörungen, Vertigo, Nausea, Emesis, Obstipation, Flatulenz, Diarrhoe, Hautausschläge, reversible Seh-, Hör- und Geschmacksstörungen sowie reversibel erhöhte Leberenzyme (Holzer, 2017). Am häufigsten werden gastrointestinale Beschwerden angegeben. Sie betreffen 1-2 % der Patienten (Lüllmann et al., 2016). Die Störungen der Sinneswahrnehmung treten gehäuft nach intravenöser Gabe auf (Holzer, 2017).

Ferner führt die Applikation von PPI zu einer Hypergastrinämie, welche durch die PPI-induzierte Hypoazidität des Magens ausgelöst wird (Helgadóttir, Björnsson, 2019; Holzer, 2017). So wird von einem mittleren Anstieg auf das 1,3- bis 2,9-Fache der basalen Gastrin-Plasmakonzentration nach langjähriger PPI-Einnahme berichtet (Lundell et al., 2015). Das Ausmaß der Hypergastrinämie korreliert dabei mit der Dosis (Helgadóttir et al., 2020). Langfristig führt die Hypergastrinämie zur Hypertrophie der Enterochromaffin-ähnlichen Zellen des Magens (Holzer, 2017). Dies wird bei bis zu 54 % der Patienten nach 5-jähriger PPI-Einnahme beobachtet (Lundell et al., 2015). Auch eine konsekutive maligne Entartung dieser Zellen wird diskutiert (Cheung, Leung, 2019).

Als weitere Folgen der Hypoazidität wird eine verminderte enterale Resorption von Calcium, Magnesium, Eisen und Cobalamin diskutiert (Freedberg et al., 2017; Vaezi et al., 2017). Ein hierdurch bedingter Eisen- oder Cobalaminmangel könnte langfristig zu einer Anämie führen (Vaezi et al., 2017). Diese wird in manchen Studien mit einer PPI-Einnahme assoziiert (Haastrup et al., 2018). Eine reduzierte Calciumresorption könnte den Knochenstoffwechsel beeinflussen und langfristig zu Osteoporose führen. Dies könnte eine Assoziation zwischen PPI-Einnahme und einem erhöhten Frakturrisiko erklären (Haastrup et al., 2018; Vaezi et al., 2017), welche in manchen Studien gezeigt werden konnte (Corley et al., 2010; Khalili et al., 2012; Zhou et al., 2016). Aber auch eine anderweitige Beeinflussung des Knochenstoffwechsels wird als ursächlich angenommen (Graefe, 2016; Holzer, 2017). So werden auch eine Hemmung der osteoklastischen Protonenpumpe (Graefe, 2016; Vaezi et al., 2017), ein Cobalaminmangel und Veränderungen der Regulation des Knochenstoffwechsels in Folge einer Hypergastrinämie als potentielle Mechanismen diskutiert (Vaezi et al., 2017).

Zudem wird ein erhöhtes Risiko für bakterielle Enteritiden bei Langzeitanwendung von PPI angenommen (Holzer, 2017; Offermanns, 2016). So wird die PPI-Einnahme in einigen Studien mit einem erhöhten Risiko für Infektionen mit *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* und *Clostridium difficile* assoziiert (Bavishi, DuPont, 2011). Dies wird mit einer verminderten Schutzbarriere in Folge der Hypoazidität des Magens, daraus resultierenden Veränderungen des physiologischen Magen- und Darmmikrobioms, sowie einer Beeinflussung neutrophiler Granulozyten durch PPI begründet (Bavishi, DuPont, 2011; Vaezi et al., 2017).

Als weitere potentielle Nebenwirkungen von PPI werden ein erhöhtes Risiko für bakterielle Pneumonien, spontan bakterielle Peritonitiden, akutes und chronisches Nierenversagen, Myokardinfarkte sowie für Demenz diskutiert (Freedberg et al., 2017; Vaezi et al., 2017). Es ist allerdings umstritten, ob tatsächlich kausale Zusammenhänge bestehen oder die in diesem Kapitel genannten Assoziationen durch Konfundierungseffekte zustande gekommen sind (Nehra et al., 2018; Vaezi et al., 2017).

## 2.4 Fragestellung und Zielsetzung

Die Einnahme von PPI ist mit einem erhöhten Frakturrisiko assoziiert. Als eine Ursache hierfür werden PPI-induzierte Veränderungen des Knochenstoffwechsels angenommen (Holzer, 2017). Diese Veränderungen könnten auch die Frakturheilung beeinflussen. Während gezeigt werden konnte, dass die Frakturheilung bei jungen Mäusen durch Gabe von Pantoprazol beeinträchtigt wird (Histing et al., 2012), gibt es bisher keine Beweise für eine Beeinflussung der Frakturheilung im Alter. PPI werden jedoch insbesondere bei älteren Patienten eingesetzt (Hálfánarson et al., 2018). Diese haben ein erhöhtes Risiko für Frakturen (Ensrud, 2013) und Frakturheilungsstörungen (Foulke et al., 2016). Auch der Frakturheilungsprozess selbst ist im Alter verändert (Clark et al., 2017).

Ziel dieser Studie war es daher, zu bestimmen, ob Pantoprazol die Frakturheilung bei alten Mäusen beeinflusst.

Die Nullhypothese lautet: „Die Gabe von Pantoprazol beeinflusst den Frakturheilungsprozess bei alten Mäusen nicht.“

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Studiendesign

Die Versuche wurden im Rahmen des Versuchsvorhabens mit der Nummer 45/2015 von der zuständigen Behörde (Landesamt für Verbraucherschutz, Abteilung C: Lebensmittel- und Veterinärwesen – Zentralstelle, Konrad-Zuse-Straße 11, 66115 Saarbrücken) genehmigt. Die Durchführung erfolgte am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes.

Die insgesamt 60 verwendeten Versuchstiere wurden unter Berücksichtigung einer gleichmäßigen Gewichts- und Geschlechterverteilung in 4 Gruppen eingeteilt (Tab. 1). Die Untersuchungen erfolgten post mortem 2 beziehungsweise 5 Wochen nach einer Fraktur. Die biomechanischen, radiologischen und histologischen Untersuchungen wurden jeweils am selben Tier durchgeführt. Für die Proteinanalyse mussten hingegen zusätzliche Tiere verwendet werden, wobei auf eine Untersuchung nach 5 Wochen verzichtet wurde.

Tab. 1: Anzahl untersuchter Versuchstiere pro Gruppe (ohne ausgeschlossene Versuchstiere (n=6), siehe Kapitel 4.1).

	Pantoprazol		Kontrolle	
	2 Wochen	5 Wochen	2 Wochen	5 Wochen
Biomechanik/Radiologie/Histologie	n=11	n=11	n=10	n=12
Proteinanalyse	n=5		n=5	
Insgesamt	n=16	n=11	n=15	n=12

#### 3.2 Tiermodell

Es wurden ausschließlich 16 Monate alte CD-1-Mäuse beider Geschlechter mit einem mittleren Körpergewicht (KG) von  $42,7 \pm 1,3$  g (Pantoprazol:  $41,3 \pm 1,9$  g; Kontrolle:  $44,1 \pm 1,8$  g) verwendet. Die Tierhaltung erfolgte im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes unter klimatisierten Raumbedingungen (Lufttemperatur 22-24 °C, relative Luftfeuchtigkeit etwa 60 %) bei einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus. Den Tieren stand stets Trinkwasser und Standarddiätfutter (Altromin 1328, Altromin, Lage, Deutschland) ad libidum zur Verfügung.

Zur Untersuchung der Frakturheilung wurde ein geschlossenes Frakturmodell gewählt. Hierbei wurde die Fraktur mittels einer stumpfen Guillotine (Abb. 1) im Bereich des femoralen Knochenschafts gesetzt und anschließend mit einer intramedullären Zugschraube (Abb. 2) osteosynthetisch versorgt.

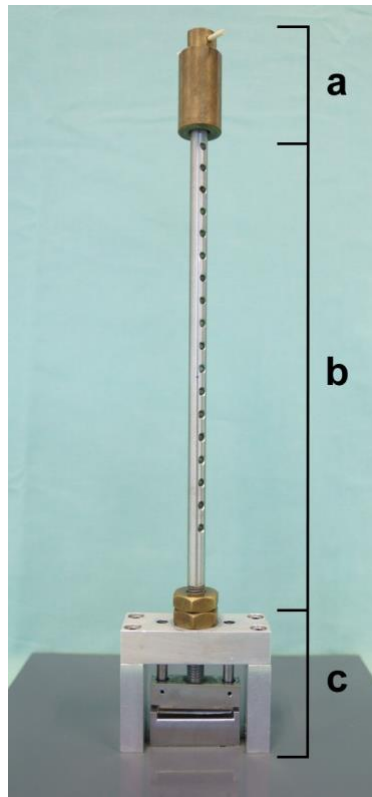


Abb. 1: Stumpfe Guillotine. Fallgewicht, 80 g (a), Führungsstange (b), 3-Punkt-Biegevorrichtung (c).

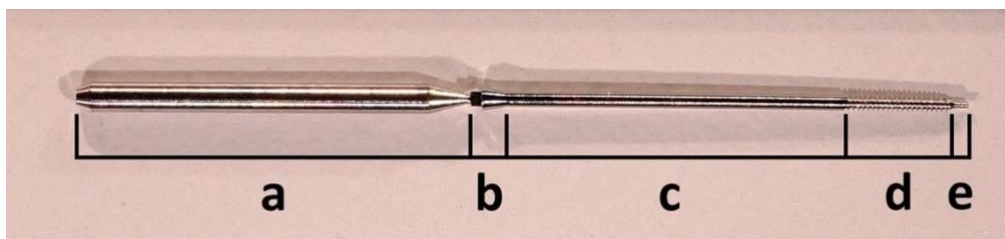


Abb. 2: Intramedulläre Zugschraube (Länge: 17,2 mm, Durchmesser: 0,5 mm), verbunden über eine Sollbruchstelle mit dem Adapterstück zum Schraubendreher (a), bestehend aus: Konus (b), Schaft (c), Gewinde (d) und Adapterstück zum Führungsdraht (e). MouseScrew, RISystem, Davos, Schweiz.

### 3.3 Versuchsdurchführung

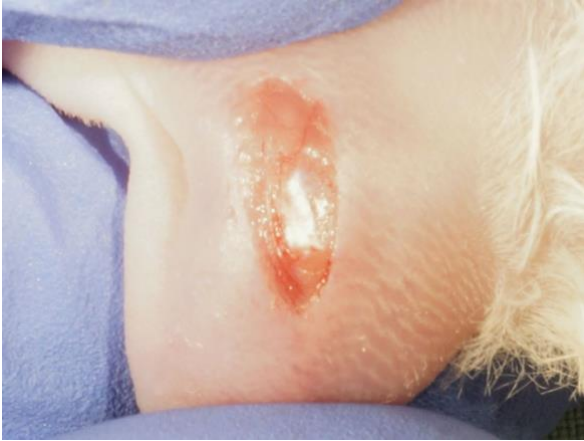
#### 3.3.1 Anästhesie

Zur Narkose wurden 12 mg/kg KG Xylazin (Rompun 2 %, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) und 90 mg/kg KG Ketamin (Urostamin 100 mg/ml, Serumwerk Bernburg, Bernburg, Deutschland) intraperitoneal injiziert. Die Narkosetiefe wurde regelmäßig durch Testung des Zwischenzehenreflexes

überprüft und die Dosis der Anästhetika nötigenfalls angepasst. Um ein Austrocknen der Augen während der Narkose zu vermeiden, wurde Dexpanthenol-Salbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital) auf die Augen aufgetragen. Zudem wurde eine Wärmeunterlage verwendet, um ein Auskühlen der Versuchstiere zu verhindern. Zur ergänzenden intraoperativen sowie postoperativen Analgesie wurde dem Trinkwasser einen Tag vor der Operation bis 7 Tage nach der Operation Tramadol zugesetzt (1 mg Tramadol pro ml Trinkwasser; Tramal 100 mg/ml, Grünenthal, Aachen, Deutschland).

### 3.3.2 Operation

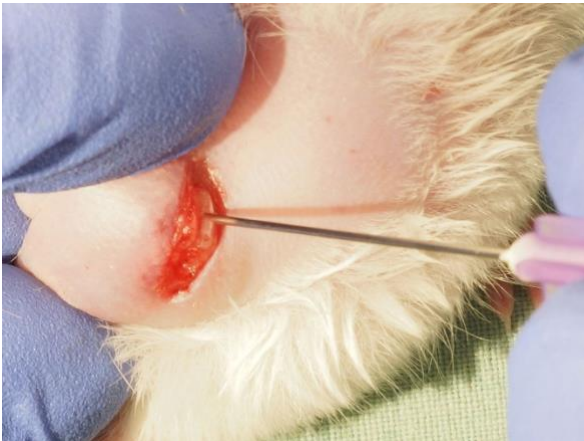
Zur Operationsvorbereitung wurden die Haare des rechten Hinterbeins durch elektrische Rasur und Anwendung einer Enthaarungscreme (acid-med, ASID BONZ, Herrenberg, Deutschland) entfernt. Nach Säuberung des Beines unter fließendem Wasser wurde die Haut desinfiziert (Octeniderm, Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland). Danach wurde die Maus auf dem Rücken gelagert und das rechte Hinterbein mit der linken Hand fixiert. Zu Beginn der Operation wurde medial der Patella eine etwa 10 mm lange Hautinzision mit einer Skalpellklinge (Carbon Steel Skalpellklingen #15, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) durchgeführt (Abb. 3). Indem nachfolgend die Kniegelenkscapsel medial der Patellarsehne scharf eröffnet wurde, konnte die Patella mit Hilfe einer feinen anatomischen Pinzette nach lateral luxiert werden (Abb. 4). Hierbei wurde darauf geachtet, die Patellarsehne selbst nicht zu verletzen. In der Mitte der nun freiliegenden Fossa intercondylaris wurde mit Hilfe einer 24 G Kanüle (Microlance 3 - 24 G, 0,55 x 25 mm, Becton Dickinson, Drogheda, Irland) die Markhöhle aufgebohrt (Abb. 5). Anschließend wurde eine 27 G Kanüle (Microlance 3 - 27 G, 0,4 x 19 mm, Becton Dickinson) durch die Bohrung in die Markhöhle eingebracht und bis zum Trochanter major vorgeschoben. Dort wurde die proximale Corticalis mithilfe der Kanüle durchbohrt (Abb. 6). Nach Entfernung der Kanüle wurde ein kanülierter Führungsdraht (Guide tube 0,3/0,2 mm, RISystem) in die Markhöhle eingebracht und in Seitenlagerung vorgeschoben, bis dieser an der Hüfte unterhalb der Haut tastbar war. Oberhalb des Führungsdrahtes wurde eine etwa 2 mm lange Hautinzision durchgeführt. Der Führungsdraht wurde durch diese weiter vorgeschoben, sodass beide Enden des Führungsdrahtes etwa 1 cm aus dem Operationssitus herausragten (Abb. 7). Die Position des Führungsdrahtes wurde radiologisch kontrolliert (Abb. 8). Danach wurde das rechte Femur mittig unter der stumpfen Guillotine positioniert und durch 3-Punkt-Biegung geschlossen frakturiert (Abb. 9). Dabei wurde darauf geachtet, Crus, Pelvis und Abdomen nicht zu verletzen. Die Fraktur wurde radiologisch kontrolliert (Abb. 10). Nachfolgend wurde die Zugschraube in Seitenlagerung mit Hilfe eines Schraubendrehers über den Führungsdraht implantiert (Abb. 11). Hierbei wurde die Zugschraube durch die distale Bohrung bis zur proximalen Bohrung vorgeschoben, wo diese eingeschraubt wurde. Die Schraube wurde an der Sollbruchstelle abgebrochen, nachdem der Konus im distalen Bohrloch versenkt und eine ausreichende Klemmkraft erreicht wurde (Abb. 12). Im Anschluss wurde die Patella reponiert und die Kniegelenkscapsel durch eine Naht mit 5-0 Prolene (Ethicon, San Lorenzo, USA) verschlossen (Abb. 13). Nach abschließender Hautnaht mit 5-0 Prolene wurde die Position der Schraube radiologisch kontrolliert (Abb. 14).



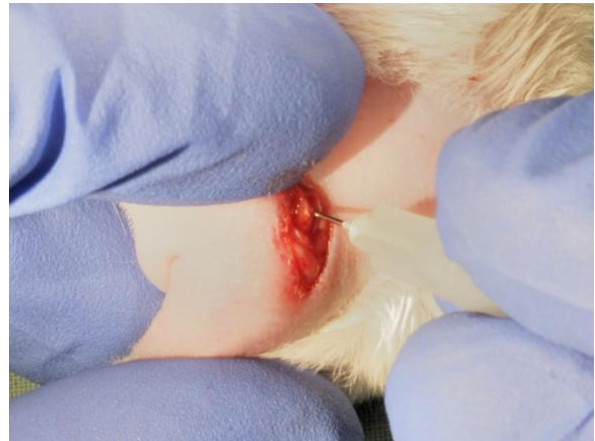
*Abb. 3: Hautinzision. Sicht auf die Patellarsehne.*



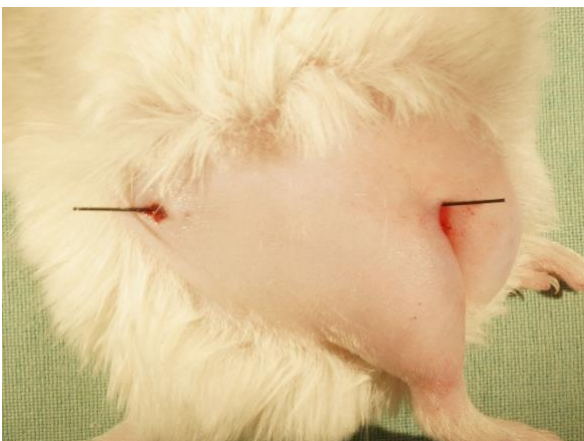
*Abb. 4: Luxierte Patella. Sicht auf die Fossa intercondylaris.*



*Abb. 5: Eröffnung der Markhöhle.*



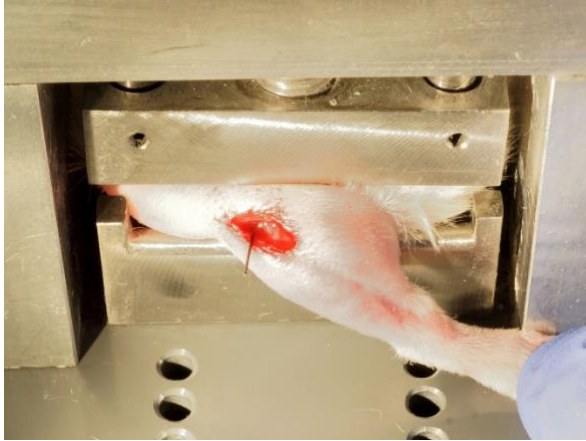
*Abb. 6: Perforation der proximalen Corticalis.*



*Abb. 7: Eingebrachter Führungsdraht.*



*Abb. 8: Röntgenkontrolle des Führungsdrahtes.*



*Abb. 9: Fraktur mittels stumpfer Guillotine.*



*Abb. 10: Röntgenkontrolle der Fraktur.*



*Abb. 11: Implantation der Zugschraube über den Führungsdraht.*



*Abb. 12: Sicht auf die Fossa intercondylaris. Schraubenkonus schließt mit dem Knochen ab.*



*Abb. 13: Refixierung der Patella.*



*Abb. 14: postoperative Röntgenkontrolle.*

### 3.3.3 Postoperativer Verlauf

Während der Aufwachphase wurden die Versuchstiere in Bauchlage unter einer Wärmelampe gelagert und regelmäßig beobachtet. Über die gesamte Dauer des Experimentes wurden die Tiere täglich beobachtet und gewogen. Hierbei wurde insbesondere auf Zeichen einer Infektion oder anhaltender Schmerzen sowie sonstige Bewegungseinschränkungen und Verhaltensänderungen geachtet. Auf Grundlage dieser Beobachtungen wurde die Notwendigkeit weiterer Maßnahmen oder eines Abbruches des Experimentes beurteilt. Ergänzend wurde die Dislokation des Implantats als Abbruchkriterium definiert.

### 3.3.4 Medikamentenapplikation

Die Versuchsgruppe erhielt ab dem Tag der Operation bis zur Tötung täglich 100 mg/kg KG Pantoprazol (Pantoprazol Carino 40 mg, Carinopharm, Elze, Deutschland) gelöst in isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %, B. Braun, Melsungen, Deutschland) durch intraperitoneale Injektion. Der Kontrollgruppe wurde eine äquivalente Menge isotoner Kochsalzlösung verabreicht.

### 3.3.5 Tötung der Versuchstiere

Die Tötung der Versuchstiere erfolgte 2 respektive 5 Wochen postoperativ durch zervikale Dislokation in Narkose (siehe Kapitel 3.3.1).

### 3.3.6 Präparation der Knochen

Im Anschluss an die Tötung der Versuchstiere erfolgte die Explantation beider Femora. Hierzu wurden die Femora nach großzügiger Inzision der Cutis zunächst im Kniegelenk exartikuliert, indem Patellarsehne, Kniegelenkspalt und angrenzende Muskulatur scharf durchtrennt wurden. Als nächstes wurde die Oberschenkelmuskulatur mit Hilfe einer Skalpellklinge und einer feinen chirurgischen Pinzette von distal nach proximal bis zum Hüftgelenk abpräpariert. Durch scharfe Eröffnung der Hüftgelenkscapsel wurden die Femora auch im Hüftgelenk exartikuliert. Danach wurde das Implantat unter Zuhilfenahme eines Nadelhalters vorsichtig gelöst und entfernt. Die Femora wurden während der Präparation mit isotoner Kochsalzlösung befeuchtet und anschließend in eine hiermit befeuchtete Kompresse eingewickelt, um Austrocknung zu vermeiden. Abweichend von der beschriebenen Vorgehensweise wurde bei den für die Proteinanalyse vorgesehenen Versuchstieren nur das frakturierte Femur explantiert sowie das Kallusgewebe ohne vorherige Entfernung des Implantats scharf gelöst und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Proben wurden bei -80 °C aufbewahrt.



## 3.4 Zielkriterien und Auswertung

### 3.4.1 Radiologie

#### 3.4.1.1 Konventionelles Röntgen

Unmittelbar vor der Explantation der Femora erfolgte jeweils eine seitliche Röntgenaufnahme des frakturierten rechten Femurs (Belichtungszeit 10 s, Spannung 30 kV, Stromstärke 10 A; Faxitron MX-20 Cabinet X-ray Systems, Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, Illinois, USA). Die Frakturheilung wurde mittels Goldberg-Score (Tab. 2) beurteilt, welcher die bildmorphologisch erkennbare Überbrückung des Frakturspaltes einem Punktwert zuordnet (Goldberg et al., 1985).

Tab. 2: Goldberg-Score.

Überbrückung der Frakturspaltes	Punkte
keine knöchernen Verbindung	0
partielle knöchernen Verbindung	1
knöchernen Verbindung	2

#### 3.4.1.2 Computertomographie

Von den explantierten rechten Femora wurden computertomographische Aufnahmen angefertigt (Skyscan 1172 X-Ray Microtomograph, Skyscan/Bruker microCT, Kontich, Belgien). Hierzu wurden die Femora jeweils in einen mit isotoner Kochsalzlösung gefüllten Plastikbehälter gestellt und dieser in der Probenhalterung des Computertomographen eingespannt. Für die Aufnahmen wurde eine Röntgenröhre mit einem Kathodenstrom von 200  $\mu$ A und einer Beschleunigungsspannung von 49 kV unter Vorschaltung eines 0,5 mm dicken Aluminiumfilters verwendet. Die Einzelaufnahmen erfolgten bei einer Gesamtrotation von 180° in 0,4°-Schritten um die geneigte Längsachse des Femurs und einer Integrationszeit von je 500 ms. Die Auflösung der Röntgenkamera entsprach 860 x 1336 Pixel bei einer Pixelgröße von 8,6  $\mu$ m pro Pixel. Zur Rekonstruktion erfolgte eine multiplanare Reformation der Röntgenprojektionen zu einem dreidimensionalen Datensatz, bestehend aus axialen 8-bit-Graustufen-Schnittbildern (Abb. 15 A; NRecon 1.6.9.8; Skyscan/Bruker microCT). Hierbei wurde ein einheitliches Kontrastverhältnis festgelegt sowie eine einheitliche Bildglättung und mathematische Reduktion von Ring- und Aufhärtungsartefakten durchgeführt.

Die Analyse des erstellten dreidimensionalen Datensatzes erfolgte mittels der Software CT Analyser (Version 1.14.4.1, Skyscan/Bruker microCT). Dabei wurde das endostale und periostale Kallusvolumen als *volume of interest* definiert und dieses manuell eingezeichnet. Zur Differenzierung zwischen

Knochengewebe und sonstigen Kallusbestandteilen erfolgte eine Segmentierung durch ein globales Schwellenwertverfahren, bei dem der Graustufenbereich von 67 bis 255 als Knochengewebe definiert wurde (Abb. 15 B). Der Schwellenwert wurde dabei anhand der Übereinstimmung erstellter Binärbilder mit den zugehörigen Graustufenbildern im visuellen Vergleich festgelegt. Folgende Zielkriterien wurden festgelegt:

- Kallusvolumen
- Knochenanteil
- Trabekelanzahl
- Trabekeldicke
- Trabekelabstand

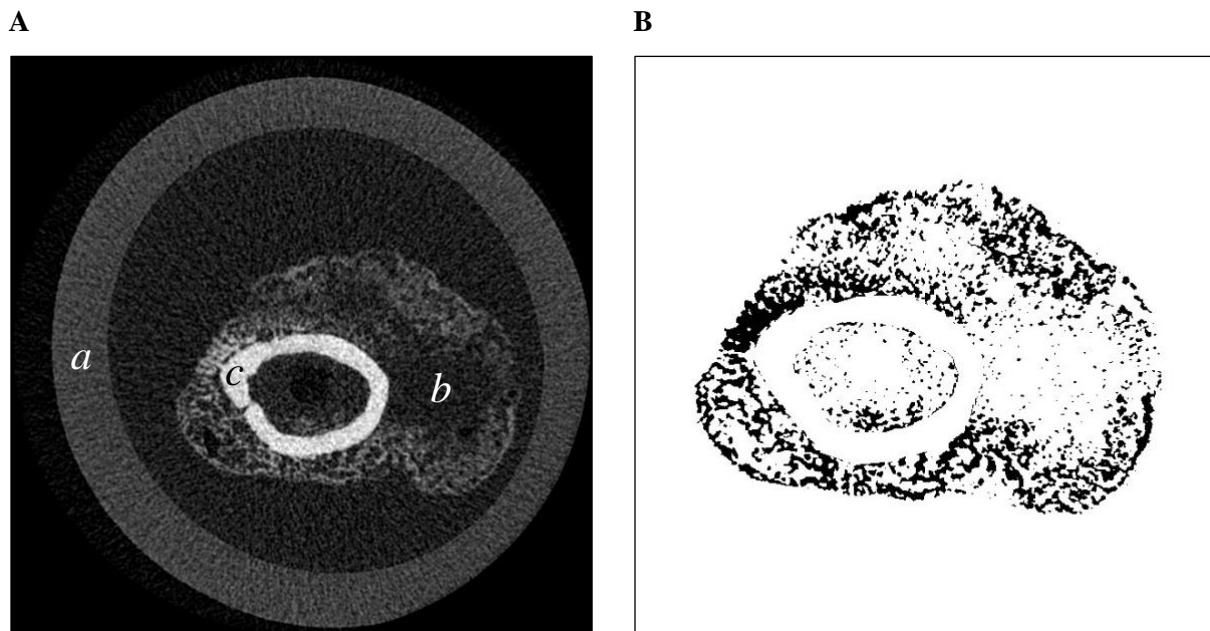


Abb. 15: **A:** Exemplarisches axiales 8-bit-Graustufen-Schnittbild auf Höhe des Frakturkallus. Plastikbehälter (a), Kallus (b), Corticalis (c). **B:** Zugehöriges segmentiertes Schnittbild des volume of interest (farbinvertiert).

### 3.4.2 Biomechanik

Die zerstörungsfreie biomechanische Testung erfolgte bei Raumtemperatur mittels 3-Punkt-Biegung (Mini-Zwick Z 2.5; Zwick, Ulm, Deutschland). Hierzu wurden die Femora mittig, mit der ventralen Seite nach oben auf zwei Auflagestempeln in der Prüfvorrichtung positioniert (Abb. 16). Bei der Messung wurde durch einen mittigen Prüfstempel von oben Druck auf den Knochen ausgeübt. Der Prüfstempel bewegte sich dabei mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1 mm/min. Die hierfür notwendige Kraft wurde gemessen und als Funktion der Strecke graphisch dargestellt. Die Steigung im linearen Anteil des Graphen wurde als die Biegesteifigkeit der Probe definiert. Als Zielkriterien wurden die Biegesteifigkeit der frakturierten Femora sowie die relative Biegesteifigkeit im Vergleich zum zugehörigen unfrakturierten Femur festgelegt.

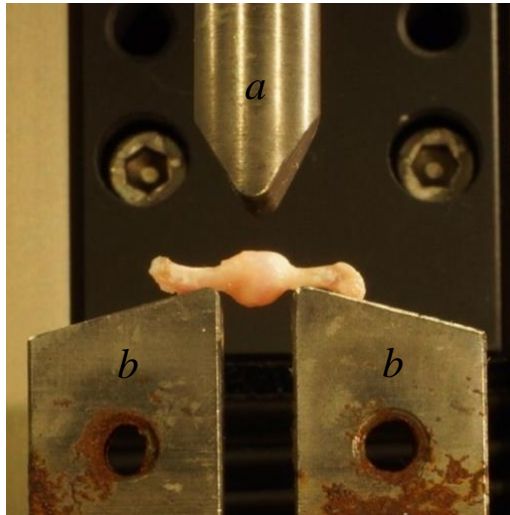


Abb. 16: Biomechanische Prüfvorrichtung mit Femur. Prüfstempel (a). Auflagestempel (b), Abstand: 6 mm.

### 3.4.3 Histologie

#### 3.4.3.1 Anfertigung der Präparate

Zur Herstellung der histologischen Präparate wurden die frakturierten Femora zunächst für 24 Stunden in einer zinkbasierten Lösung fixiert (IHC Zinc Fixative, BD Pharmingen, San Diego, USA) und anschließend für 2 Wochen bei 4 °C in 13-prozentiger EDTA-Lösung entkalkt. Im Anschluss wurden die Knochen in einer aufsteigenden Ethanolreihe (je eine Stunde in 70 %, 80 % und 90 % Ethanol sowie viermal eine Stunde in 100 % Ethanol) entwässert und das Ethanol nachfolgend durch Xylol als Intermedium ersetzt (dreimal eine Stunde in einem Xylol-Isomerengemisch). Danach wurden die Knochen in Paraffin eingebettet. Im Bereich des maximalen Kallusdurchmessers wurden longitudinal ausgerichtete Schnitte mit einer Dicke von 5 µm mittels Mikrotom angefertigt. Abschließend wurden an separaten Schnitten eine Safranin O-Färbung und eine *tartrate-resistant acid phosphatase*-(TRAP)-Färbung durchgeführt.

Für die Safranin O-Färbung wurden die Schnitte zunächst für eine Minute in einer Eisenhämatoxylin-Lösung nach Weigert (Tab. 3) gefärbt und dann nacheinander mit destilliertem Wasser (A. dest.) sowie einer 3-prozentigen Salzsäure-Ethanol-Lösung differenziert. Zur Anhebung des pH-Werts wurden die Schnitte danach für 5 Minuten in Leitungswasser gelegt. Anschließend wurde eine 4-minütige Färbung mit 0,02 % *Fast Green* (Merck, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Nach Differenzierung mit einprozentiger Essigsäure erfolgte die 5-minütige Färbung mit 0,1-prozentiger Safranin O-Lösung (Merck). Zur Anfertigung von Dauerpräparaten wurden die Schnitte danach erneut mit Ethanol und Xylol behandelt und mit Einschlussharz eingedeckt.

Für die TRAP-Färbung wurden die Schnitte zunächst mit Xylol entparaffiniert, für 45 Minuten bei 37 °C mit einer vorab angesetzten TRAP-Färbelösung (Tab. 3) inkubiert und anschließend mit A. dest. gespült. Danach wurden die Schnitte mit Häkalaun-Lösung nach Mayer (Merck) gegengefärbt und mit Glyceringelatine eingedeckt.

Tab. 3: Zusammensetzung verwendeter Färbelösungen.

Färbelösung	Bestandteile	Hersteller
Eisenhämatoxylin nach Weigert	1 g Hämatoxylin in 100 ml Ethanol, 2,48 g Eisenchlorid-Hexahydrat in 100 ml A. dest., 1 ml Salzsäure	VWR International, Radnor, USA
TRAP-Färbelösung	5 mg Naphtol-AS-MX-Phosphat, 11 mg <i>Fast Red Violet LB salt</i> in 10 ml 0,2 M Natriumacetat-Puffer, pH 5,0	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland

### 3.4.3.2 Histologische Auswertung

Es erfolgte eine histomorphometrische Auswertung in Anlehnung an Gerstenfeld et al. (2005). Hierzu wurden die Safranin O-gefärbten Präparate unter Verwendung einer 1,25-fachen Vergrößerung (Olympus BX60 Mikroskop; Olympus, Tokio, Japan) mittels einer angeschlossenen Kamera digitalisiert (Zeiss Axio Cam, Axio Vision 3.1; Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Bei der anschließenden Bildauswertung (ImageJ; National Institutes of Health, Bethesda, USA) wurden folgende Zielkriterien festgelegt:

- Periostale Kallusfläche/Femurdurchmesser
- Knochenanteil der periostalen Kallusfläche
- Knorpelanteil der periostalen Kallusfläche
- Bindegewebeanteil der periostalen Kallusfläche

Ferner erfolgte anhand der TRAP-gefärbten Präparate eine histologische Untersuchung der Osteoklasten im Frakturkallus. Hierfür wurden 11 respektive 7 „high power fields“ (HPFs) als repräsentative Areale im Frakturkallus definiert, wovon eines endostal gelegen war und die restlichen HPFs gleichmäßig auf die periostale Kallusfläche verteilt wurden. Diese Fläche war 5 Wochen postoperativ kleiner, weswegen auch weniger HPFs definiert wurden. In jedem dieser HPFs wurde bei 400-facher Vergrößerung die Anzahl der TRAP-positiven Zellen mit mindestens 3 Zellkernen bestimmt (Abb. 17). Diese Zellen wurden als Osteoklasten definiert. Als Zielkriterien wurden die Anzahl der Osteoklasten pro HPF sowie deren Verteilung auf das Knorpel- und Knochengewebe festgelegt.

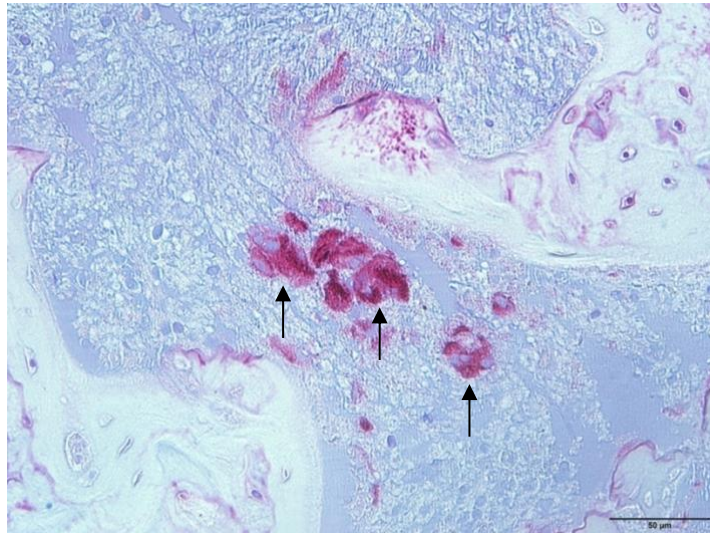


Abb. 17: TRAP-positive multinukleäre Zellen.

### 3.4.4 Proteinanalyse

Es wurde eine Proteinanalyse der Kallusgewebeprobe mittels Western-Blot-Technik durchgeführt. Hierfür wurden die Kallusproteine extrahiert, quantifiziert, elektrophoretisch getrennt und auf eine Blotmembran transferiert. Anschließend wurde die Expression von BMP-2, BMP-4, CYR61, OPG, PCNA, RANKL und VEGF durch Immundetektion quantitativ bestimmt. Als ergänzende Zielkriterien wurden das Verhältnis der Expression von RANKL zu OPG sowie von BMP-2 und BMP-4 zu CYR61 und VEGF festgelegt.

Zuerst wurde jede Probe homogenisiert. Hierfür wurden die Proben mechanisch zerkleinert (Homogenisator, Micra D-1/Pico DS-5, Micra, Heitersheim, Deutschland) und mit 80 µl Lysepuffer (10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5 % Triton X 100, 0,02 % NaN<sub>3</sub>, 0,2 mM PMSF, 10 mM Tris, pH 7,5; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland; Protease-Inhibitor-Mischung „P8340“, 1:100-Verdünnung; Sigma-Aldrich Chemie) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Ultrazentrifugation der Proben mit einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 16000 g bei einer Temperatur von 4 °C (Heraeus Fresco 21, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland). Die Überstände wurden abpipettiert und bei -20 °C kryokonserviert. Das Pellet wurde verworfen.

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte mittels eines nach Hartree (1972) modifizierten Lowry-Assays. Hierzu wurden je 50 µl Proteinextrakt mit 250 µl einer Lösung aus Reagenz A und Reagenz B (50+1, Tab. 4) gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 25 µl von Reagenz C (Tab. 4) hinzugefügt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption des Ansatzes photometrisch gegen A. dest. gemessen (595 nm; GeneQuant pro, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Rinderalbumin-Standardkurve bestimmt und die Proben anschließend mit A. dest. auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt.

Tab. 4: Reagenzien des modifizierten Lowry-Assays.

Reagenzien	Bestandteile	Hersteller
Reagenz A	10 g Natriumcarbonat/500 ml, 100 mM NaOH	Carl Roth
Reagenz B	0,25 g Kupfersulfat-Pentahydrat/50 ml 0,5 g Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat/50 ml,	Merck
Reagenz C	Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz, verdünnt mit A. dest (1:2)	Sigma-Aldrich Chemie

Die Proteine wurden mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt. Hierfür wurden die Proben zunächst mit Laemmli-Puffer (1:2; 4 % SDS, 20 % Glycerin, 10 %  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,004% Bromphenolblau, 125 mM Tris, pH 6,8; Sigma-Aldrich Chemie) für 5 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert. Danach wurden je 20  $\mu$ g Protein pro Geltasche auf das Sammelgel aufgetragen (Tab. 5). In gleicher Weise wurden 10  $\mu$ l eines Komigrationsstandards (Protein-Marker IV, Peqlab Biotechnologie, Erlangen) denaturiert und aufgetragen. Die an der Elektrophoresekammer (Mini-Protean II, Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland) angelegte Spannung entsprach 100 V für 15 Minuten und anschließend 140 V für etwa eine Stunde (Power Pac 200, Bio-Rad Laboratories). Es wurde ein Glycin-haltiger Elektrodenpuffer verwendet (960 mM Glycin, 0,5 % SDS, 125 mM Tris, pH 8,3; Carl Roth). Die Elektrophorese wurde beendet, nachdem die erste Bande das anodennahe Gelende erreicht hatte. Das Gel wurde anschließend in einem Transferpufferbad äquilibriert (10 % Methanol, 39 mM Glycin, 48 mM Tris pH 9,2; Carl Roth).

Tab. 5: Zusammensetzung der Gelmedien, Angaben in ml. Gegossen nach Anleitung des Herstellers (Bio-Rad Laboratories).

Zusätze	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

Die Proteinbanden wurden durch Semidry-Elektroblotting auf eine Polivinylidenfluorid-Membran (0,2 µm Porengröße, Bio-Rad Laboratories) transferiert. Die Blotmembran wurde vorab mit Methanol benetzt und in Transferpuffer äquilibriert. Die an der Blottingkammer (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad Laboratories) angelegte Spannung betrug 25 V. Das Blotting wurde nach 7 Minuten beendet und die Membran über Nacht bei 4 °C in TBS-T-Puffer (1 % NaCl, 0,01 % Polysorbat 20 10 mM Tris, pH 7,5; Carl Roth) gelagert.

Die Immundetektion erfolgte mittels eines Chemolumineszenz-basierten indirekten Bindungstestes, wobei Target-Proteine ähnlichen Molekulargewichts auf verschiedenen Blotmembranen angefärbt wurden. Die Membranen wurden zunächst zur Blockade der verbliebenen freien Bindungsstellen in TBS-T-Puffer unter Zugabe von Magermilchpulver (5 %, blotting grade blocker non-fat dry milk, Bio-Rad Laboratories) für 30 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T-Puffer erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern (Tab. 6). Danach wurden die Membranen erneut dreimal mit TBS-T-Puffer gewaschen und mit den Sekundärantikörpern inkubiert (Tab. 7). Nach fünfmaligem Waschen mit TBS-T-Puffer wurden die Membranen für eine Minute mit einer Luminol-basierten Reagenz (ECL, GE Healthcare, Amersham, UK) inkubiert. Die emittierten Photonen wurden photographisch registriert (ECL Chemocam Imager, Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland). Für die Auswertung wurde die integrierte Intensität der jeweiligen Target-Protein-Bande erfasst (LabImage 1D, Intas Science Imaging Instruments). Dabei wurden die Banden im Vergleich zum Komigrationsstandard identifiziert. Die ermittelten Daten wurden entsprechend der integrierten Intensität der jeweiligen  $\beta$ -Actin-Bande auf eine einheitliche  $\beta$ -Actin-Konzentration korrekturgerechnet.

*Tab. 6: Verwendete Primär-Antikörper, Typ IgG. Verdünnung in TBS-T-Puffer mit 5 % Magermilchpulver. Inkubation bei Raumtemperatur. Zusätzlich Inkubation über Nacht bei 4 °C mit Ausnahme von anti- $\beta$ -Actin-Immunglobulin.*

Antigen	Wirtspezies	Verdünnung	Inkubationszeit	Hersteller
BMP-2, BMP-4	Kaninchen	1:25	2 Stunden	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
CYR61	Ziege	1:100	3,5 Stunden	Santa Cruz Biotechnology
OPG	Kaninchen	1:50	3,5 Stunden	Bioss Antibodies, Woburn, USA
PCNA	Maus	1:1000	2 Stunden	DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
RANKL	Kaninchen	1:25	3,5 Stunden	Abcam, Cambridge, UK
VEGF	Kaninchen	1:100	2 Stunden	Santa Cruz Biotechnology
$\beta$ -Actin	Maus	1:5000	3,5 Stunden	Sigma-Aldrich Chemie

Tab. 7: *Verwendete Sekundär-Antikörper, konjugiert mit Meerrettichperoxidase. Verdünnung in TBS-T-Puffer mit 5 % Magermilchpulver. Inkubation bei Raumtemperatur.*

Antigen	Wirtspezies	Verdünnung	Inkubationszeit	Hersteller
Kaninchen-IgG	Ziege	1:1000	1,5 Stunden	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Maus-IgG	Ziege	1:1000	1,5 Stunden	DakoCytomation
Ziegen-IgG	Kaninchen	1:1000	1,5 Stunden	DakoCytomation

### 3.5 Statistik

Alle statistischen Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. Die ermittelten Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung und per F-Test auf Varianzgleichheit getestet. Lag beides vor, so wurden die Gruppen anhand Student's t-Test verglichen. Lag keine Normalverteilung vor oder waren die Varianzen inhomogen, so erfolgte der Gruppenvergleich per Mann-Whitney-U-Test. Ordinalskalierte Daten wurden ebenfalls mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert. Die verwendeten Tests waren zweiseitig. Die statistische Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme des Programms SigmaPlot 13 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland). Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Postoperativer Verlauf

Unmittelbar postoperativ zeigte sich ein Entlastungshinken im Bewegungsablauf sowie eine verringerte Aktivität. Die Symptomatik änderte sich innerhalb der ersten 2-3 postoperativen Tage kontinuierlich zu einem physiologischen Bewegungs- und Verhaltensmuster. Dies wurde bei der Mehrzahl der Versuchstiere beibehalten. Während des postoperativen Verlaufs ist es zu Gewichtsänderungen gekommen (Tab. 8). Diese unterschieden sich jedoch nicht signifikant zwischen Pantoprazolgruppe und Kontrollgruppe.

Abweichend vom beschriebenen postoperativen Verlauf wurde das Experiment bei mehreren Versuchstieren wegen einer Dislokation des Implantats (Pantoprazolgruppe: n = 3; Kontrollgruppe: n = 1) oder wegen einer starken postoperativen Gewichtsabnahme (> 20% relative Gewichtsänderung; Pantoprazolgruppe: n = 1) abgebrochen. Zudem verstarb ein Versuchstier am 7. postoperativen Tag (Kontrollgruppe). Die betroffenen Versuchstiere wurden von der Studie ausgeschlossen.

Tab. 8: Gewichtsänderung (in %) 2 und 5 Wochen postoperativ im Vergleich zum präoperativen Gewicht. Mittelwert  $\pm$  SEM.

	Pantoprazol	Kontrolle
2 Wochen	-6,7 $\pm$ 1,1	-5,6 $\pm$ 1,7
5 Wochen	-3,4 $\pm$ 2,1	-7,0 $\pm$ 1,4

### 4.2 Radiologie

Die Überbrückung des Frakturspalts wurde mittels Goldberg-Score beurteilt. Dieser war in der Pantoprazolgruppe nach 2 und 5 Wochen tendenziell niedriger (Abb. 18). Die Unterschiede waren allerdings nicht signifikant ( $p = 0,11$ ;  $p = 0,2$ ).

Das computertomographisch bestimmte Kallusvolumen unterschied sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikant zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 20 A und B). Der Knochenanteil war nach 2 Wochen vergleichbar (Abb. 20 C). Nach 5 Wochen war der Knochenanteil in der Pantoprazolgruppe tendenziell vermindert (Abb. 20 D), der Unterschied war allerdings nicht signifikant ( $p = 0,1$ ).

Die computertomographische Analyse der trabekulären Struktur ergab eine vergleichbare Trabekeldicke nach 2 Wochen (Abb. 21 A). Nach 5 Wochen war die Trabekeldicke in der Pantoprazolgruppe signifikant vermindert (Abb. 21 B). Die Trabekelanzahl und der Trabekelabstand unterschieden sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikant zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 21 C-F).

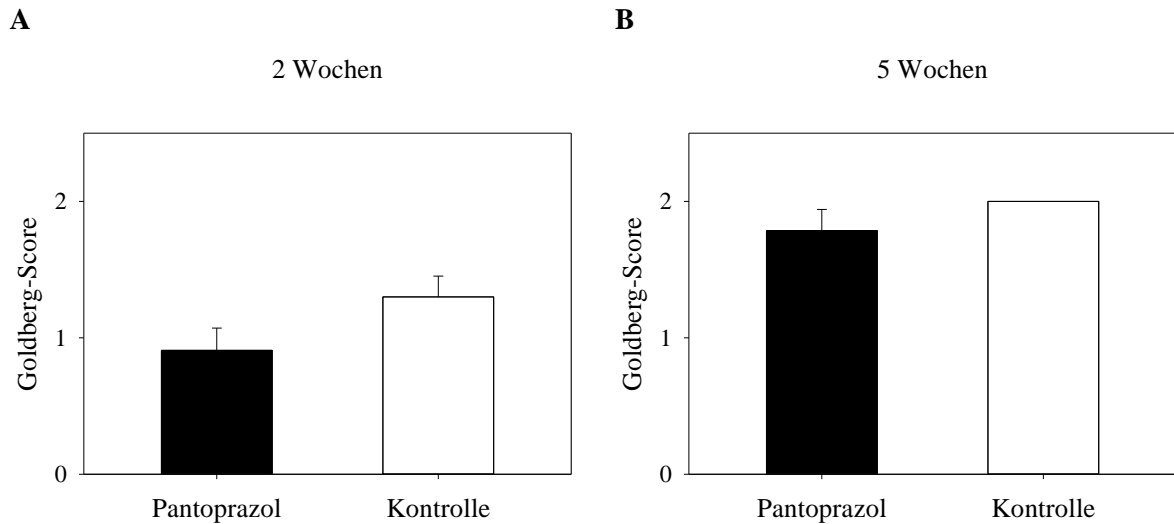


Abb. 18: Goldberg-Score 2 Wochen (A) und 5 Wochen (B) postoperativ. Keine knöcherne Überbrückung (0), partielle knöcherne Überbrückung (1) und knöcherne Überbrückung (2) des Frakturspalts. Pantoprazolgruppe (schwarze Balken) und Kontrollgruppe (weiße Balken). Mittelwert  $\pm$  SEM.

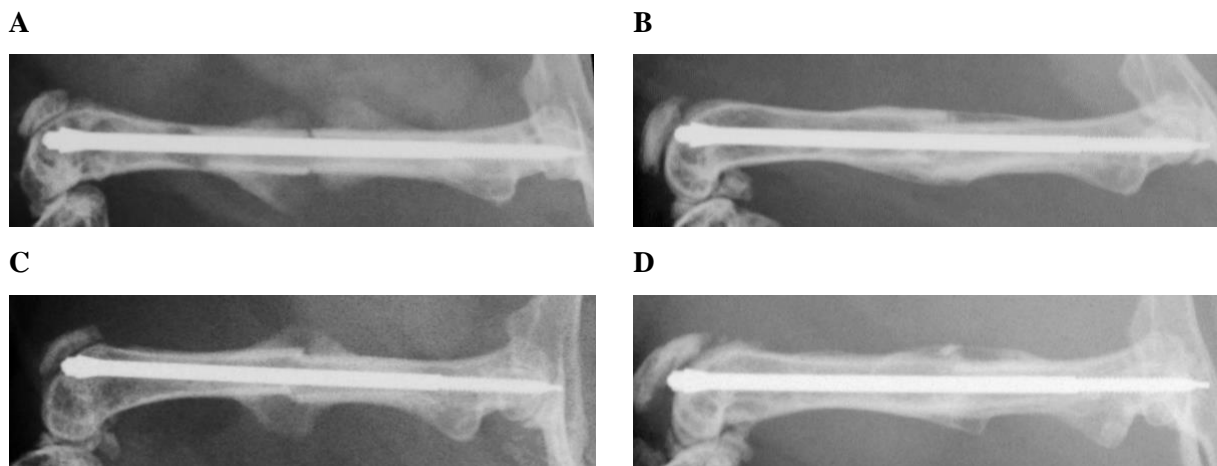


Abb. 19: Laterale Röntgenaufnahmen der frakturierten Femora. Pantoprazolgruppe 2 Wochen (A) und 5 Wochen (B) postoperativ. Kontrollgruppe 2 Wochen (C) und 5 Wochen (D) postoperativ.

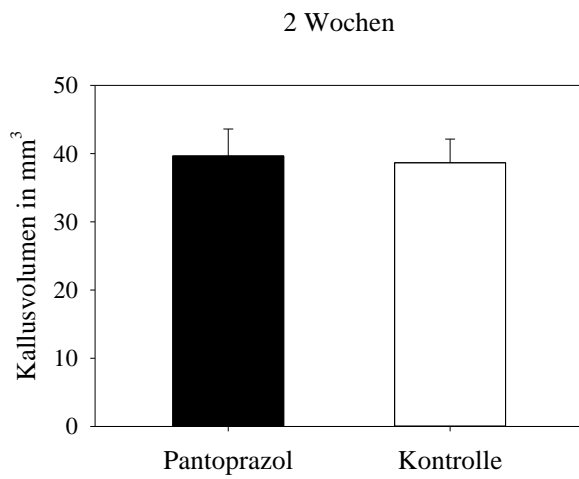
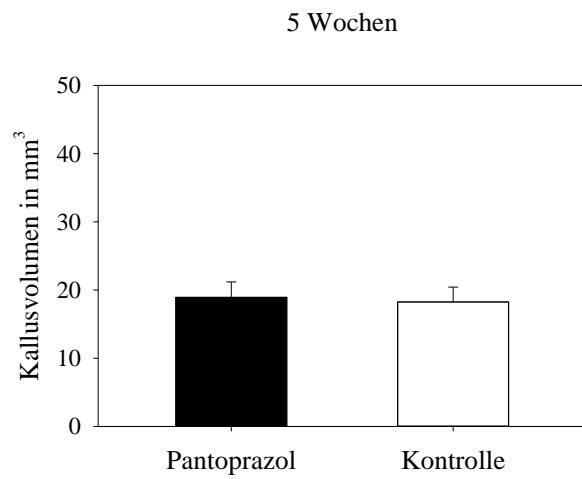
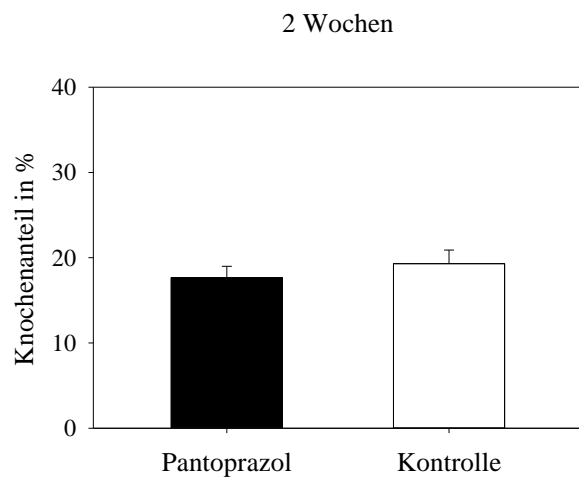
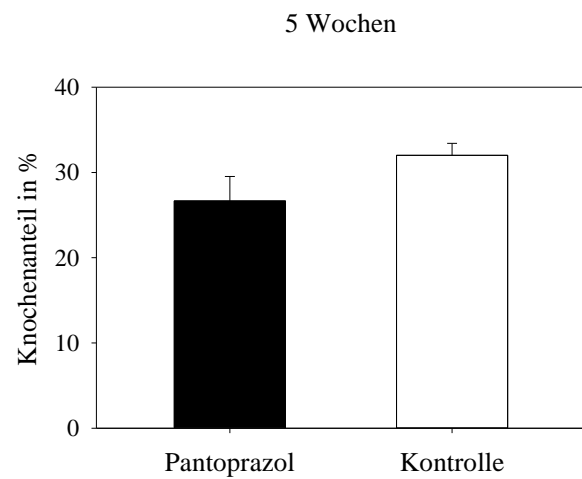
**A****B****C****D**

Abb. 20: Kallusvolumen 2 Wochen (A) und 5 Wochen (B) postoperativ. Knochenanteil 2 Wochen (C) und 5 Wochen (D) postoperativ. Pantoprazolgruppe (schwarze Balken) und Kontrollgruppe (weiße Balken). Mittelwert  $\pm$  SEM.

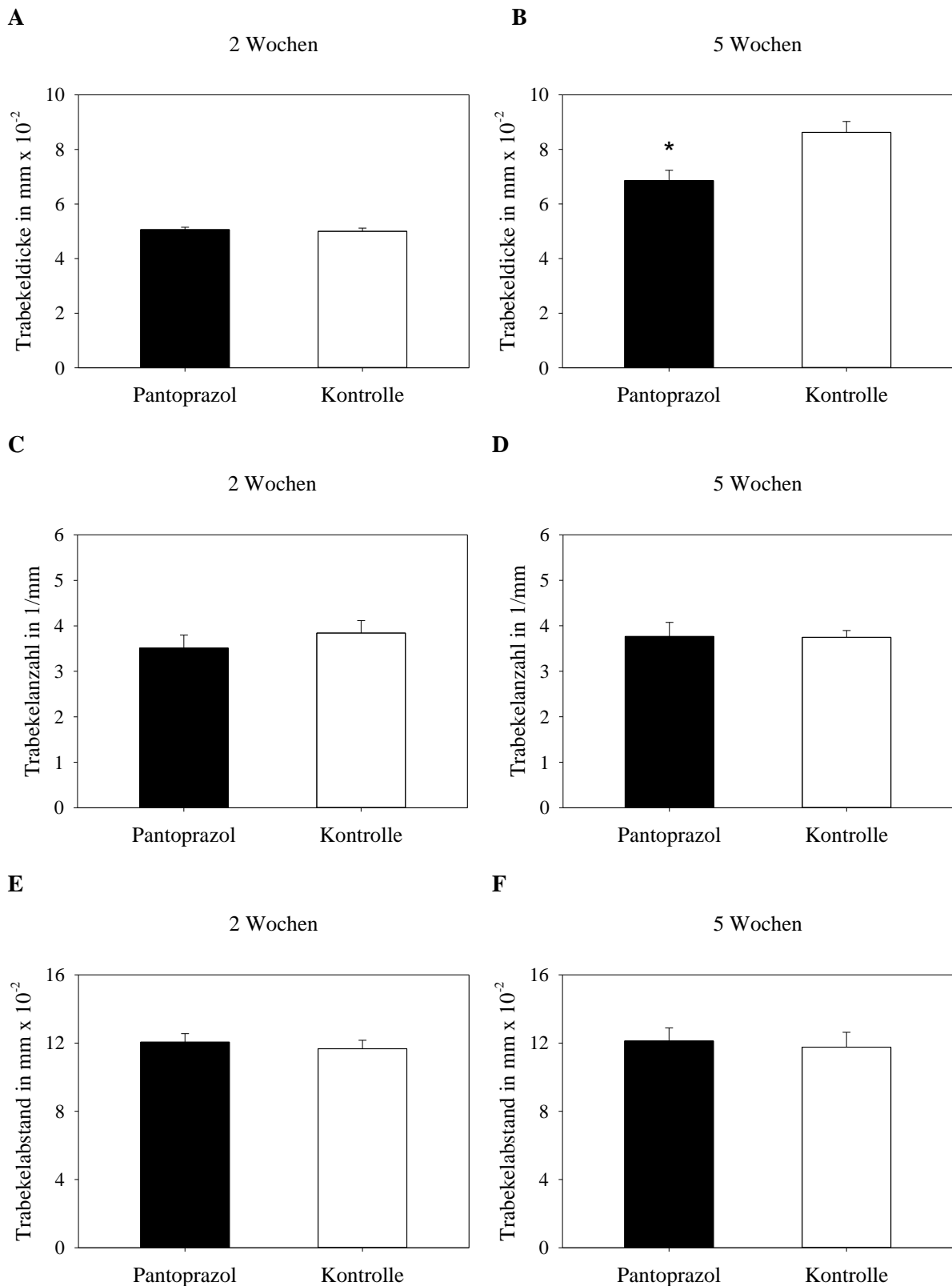


Abb. 21: Trabekuläre Struktur des Frakturkallus. Trabekeldicke 2 Wochen (A) und 5 Wochen (B) postoperativ. Trabekelanzahl 2 Wochen (C) und 5 Wochen (D) postoperativ. Trabekelabstand 2 Wochen (E) und 5 Wochen (F) postoperativ. Pantoprazolgruppe (schwarze Balken) und Kontrollgruppe (weiße Balken). Mittelwert  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  versus Kontrollgruppe.

### 4.3 Biomechanik

Die biomechanische Analyse ergab eine signifikant verminderte Biegesteifigkeit in der Pantoprazolgruppe nach 2 und 5 Wochen (Abb. 22 A und B). Auch die relative Biegesteifigkeit im Vergleich zum unfrakturierten kontralateralen Femur war nach 2 und 5 Wochen signifikant vermindert (Abb. 22 C und D). Die Biegesteifigkeit der unfrakturierten Femora war nicht signifikant unterschiedlich (Tab. 9).

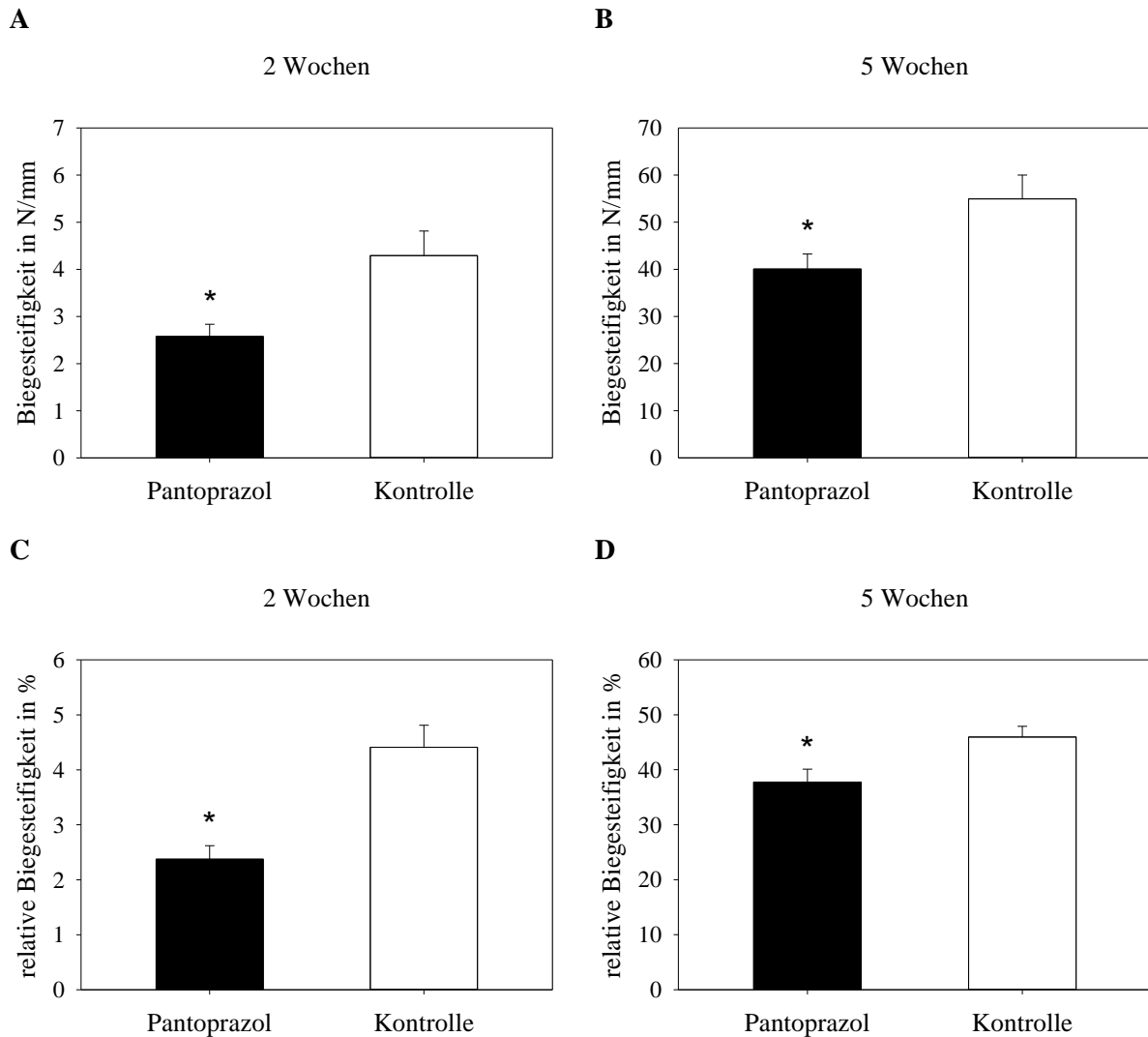


Abb. 22: Biegesteifigkeit 2 Wochen (A) und 5 Wochen (B) postoperativ. Relative Biegesteifigkeit 2 Wochen (C) und 5 Wochen (D) postoperativ. Pantoprazolgruppe (schwarze Balken) und Kontrollgruppe (weiße Balken). Mittelwert  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  versus Kontrollgruppe. Die Skalierung differiert zwischen den Untersuchungszeitpunkten.

Tab. 9: Biegesteifigkeit in N/mm der unfrakturierten Femora. Mittelwert  $\pm$  SEM.

	Pantoprazol	Kontrolle
2 Wochen	108,9 $\pm$ 2,7	95,9 $\pm$ 7,2
5 Wochen	106,2 $\pm$ 7,2	118,6 $\pm$ 7,4

#### 4.4 Histologie

Bei der histomorphometrischen Analyse des Frakturkallus zeigte sich 2 Wochen postoperativ eine signifikant geringere periostale Kallusfläche im Verhältnis zum Femurdurchmesser in der Pantoprazolgruppe (Abb. 23 A). Nach 5 Wochen zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 23 B). Der Knochenanteil an der periostalen Kallusfläche war in der Pantoprazolgruppe nach 2 und 5 Wochen signifikant vermindert (Abb. 24 A und B). Der Bindegewebeanteil war nach 2 und 5 Wochen hingegen signifikant erhöht (Abb. 24 C und D). Der Knorpelanteil unterschied sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 24 E und F).

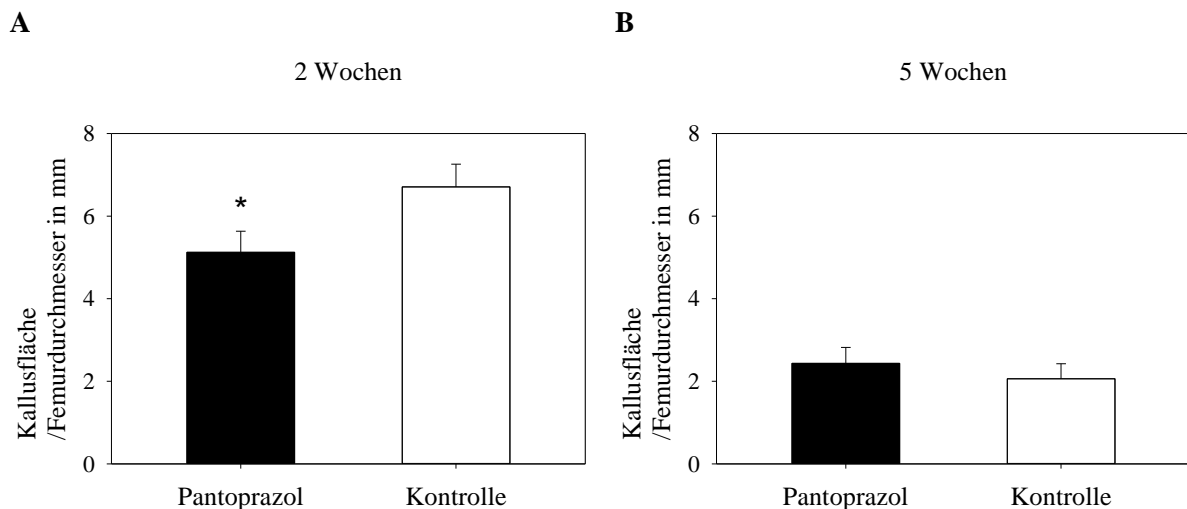


Abb. 23: Kallusfläche in Relation zum Femurdurchmesser 2 Wochen (A) und 5 Wochen (B) postoperativ. Pantoprazolgruppe (schwarze Balken) und Kontrollgruppe (weiße Balken). Mittelwert  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  versus Kontrollgruppe.

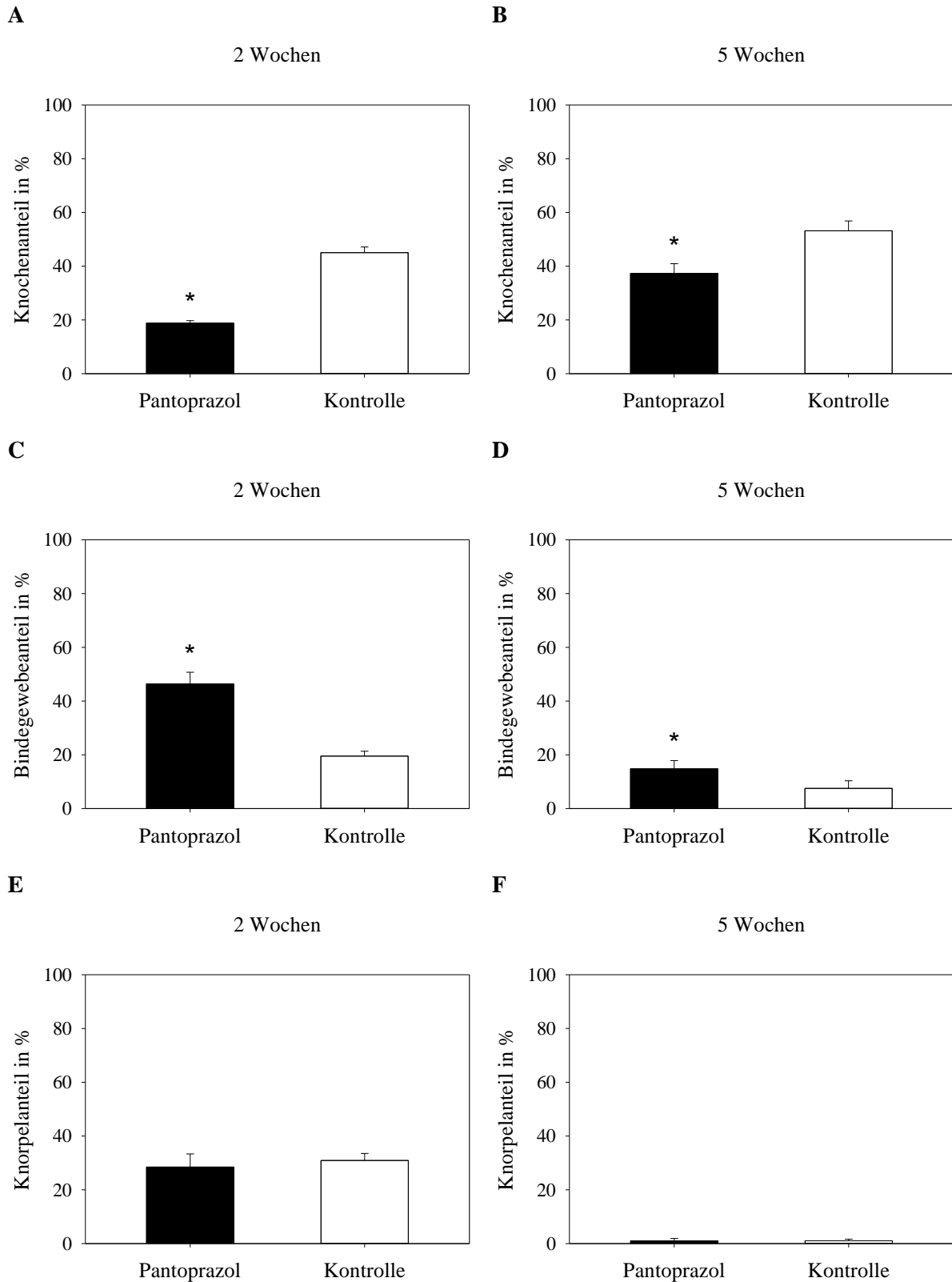


Abb. 24: Gewebezusammensetzung des Frakturkallus. Knochenanteil 2 Wochen (A) und 5 Wochen (B) postoperativ. Bindegewebeanteil 2 Wochen (C) und 5 Wochen (D) postoperativ. Knorpelanteil 2 Wochen (E) und 5 Wochen (F) postoperativ. Jeweils Anteil der periostalen Kallusfläche. Pantoprazolgruppe (schwarze Balken) und Kontrollgruppe (weiße Balken). Mittelwert  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  versus Kontrollgruppe.

Die histologische Untersuchung der Osteoklasten im Frakturkallus ergab eine signifikant erhöhte Anzahl an Osteoklasten in der Pantoprazolgruppe nach 2 Wochen (Abb. 25 A). Von diesen Osteoklasten befand sich im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell ein höherer Anteil im Knorpelgewebe und ein geringerer Anteil im Knochengewebe (Abb. 25 C). Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant ( $p = 0,11$ ). Nach 5 Wochen war die Anzahl der Osteoklasten in der Pantoprazolgruppe hingegen signifikant vermindert (Abb. 25 B). Die verbliebenen Osteoklasten befanden sich ausschließlich im Knochengewebe. In der Kontrollgruppe konnten vereinzelt auch Osteoklasten im Knorpelgewebe beobachtet werden (Abb. 25 D), die Unterschiede waren allerdings nicht signifikant ( $p = 0,13$ ).

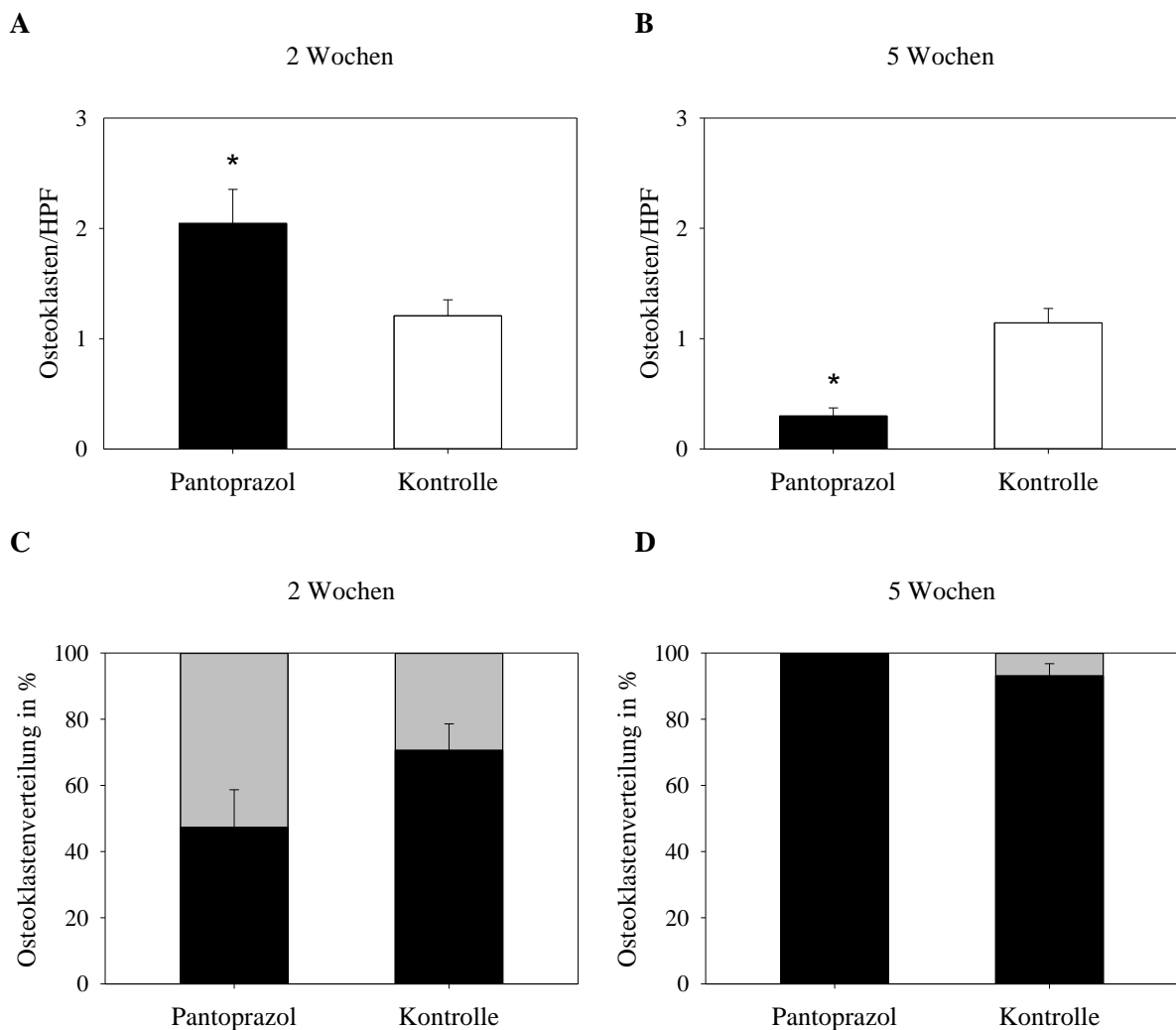


Abb. 25: Osteoklastenzahl pro high power field 2 Wochen (A) und 5 Wochen (B) postoperativ. Pantoprazolgruppe (schwarze Balken) und Kontrollgruppe (weiße Balken). Anteil der Osteoklasten im Knochengewebe (schwarz) und Knorpelgewebe (grau) 2 Wochen (C) und 5 Wochen (D) postoperativ. Mittelwert  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  versus Kontrollgruppe.



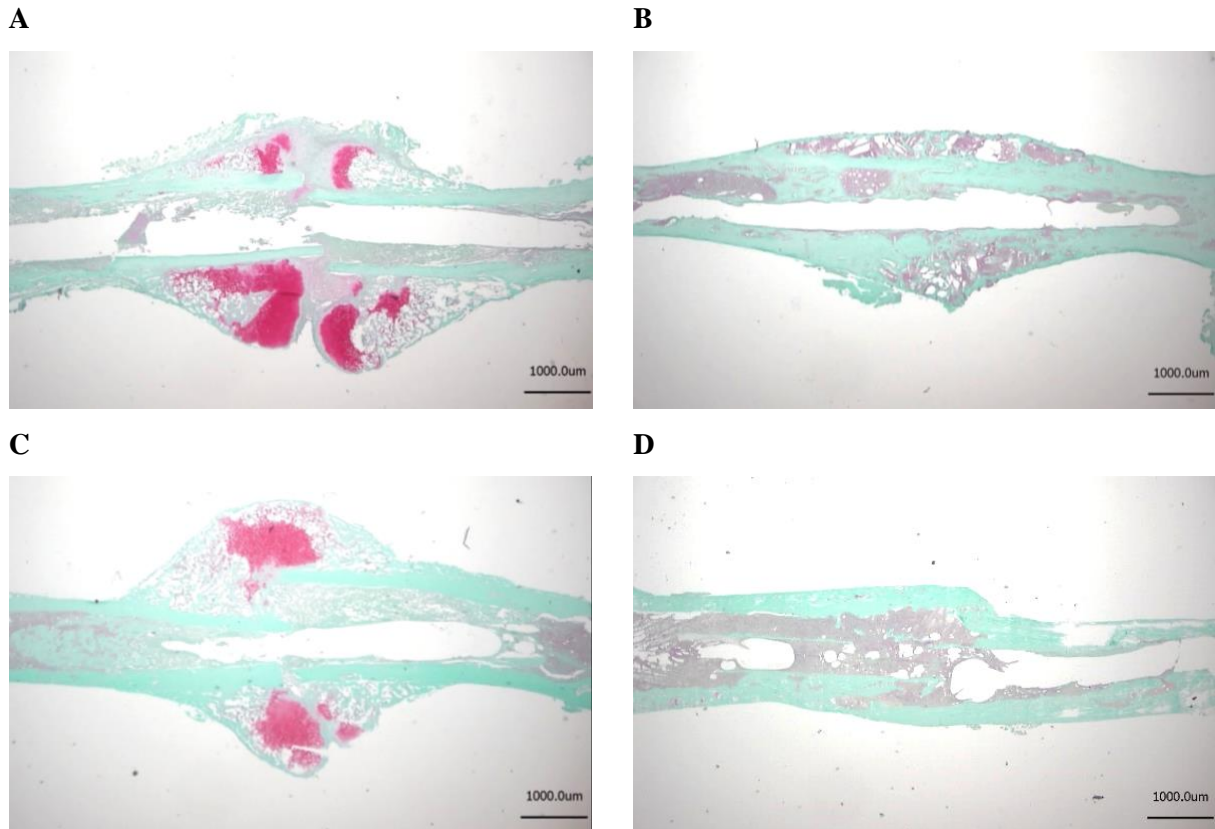


Abb. 26: Histologische Präparate (Safranin O-Färbung). Pantoprazolgruppe 2 Wochen (A) und 5 Wochen (B) postoperativ. Kontrollgruppe 2 Wochen (C) und 5 Wochen (D) postoperativ.

## 4.5 Proteinanalyse

Die Proteinanalyse erfolgte 2 Wochen postoperativ. Zur Beurteilung der Kallusformation wurde die Expression von PCNA und der osteogenen Marker BMP-2 und BMP-4 bestimmt. Es zeigte sich eine signifikant verminderte Expression von BMP-4 in der Pantoprazolgruppe (Abb. 27 B). Die Expression von BMP-2 (Abb. 27 A;  $p = 0,46$ ) und PCNA (Abb. 27 C) unterschied sich nicht signifikant zwischen den Versuchsgruppen.

Zur Beurteilung der Vaskularisierung des Frakturkallus wurde die Expression von VEGF und CYR61 bestimmt. Die Expression von VEGF war in der Pantoprazolgruppe tendenziell erhöht (Abb. 28 A), der Unterschied war allerdings nicht signifikant ( $p = 0,095$ ). Die Expression von CYR61 war nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 28 B;  $p = 0,69$ ).

Zudem wurde jeweils das Verhältnis von BMP-2 und BMP-4 zu VEGF und CYR61 bestimmt. Das Verhältnis von BMP-4 zu VEGF war in der Pantoprazolgruppe signifikant vermindert (Abb. 28 E). Das Verhältnis von BMP-4 zu CYR61 war in der Pantoprazolgruppe tendenziell vermindert, der Unterschied war allerdings nicht signifikant (Abb. 28 F;  $p = 0,095$ ). Auch das Verhältnis von BMP-2 zu VEGF und

von BMP-2 zu CYR61 war in der Pantoprazolgruppe tendenziell vermindert (Abb. 28 C und D), die Unterschiede waren jedoch ebenfalls nicht signifikant ( $p = 0,162$ ;  $p = 0,31$ ).

Zur Beurteilung der Kallusresorption wurde die Expression von RANKL und OPG bestimmt. Die Expression von RANKL war in der Pantoprazolgruppe tendenziell vermehrt, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 29 A;  $p = 0,056$ ). Die Expression von OPG war in der Pantoprazolgruppe tendenziell vermindert, der Unterschied war allerdings ebenfalls nicht signifikant (Abb. 29 B;  $p = 0,21$ ). Das Verhältnis von RANKL zu OPG war in der Pantoprazolgruppe hingegen signifikant erhöht (Abb. 29 C).

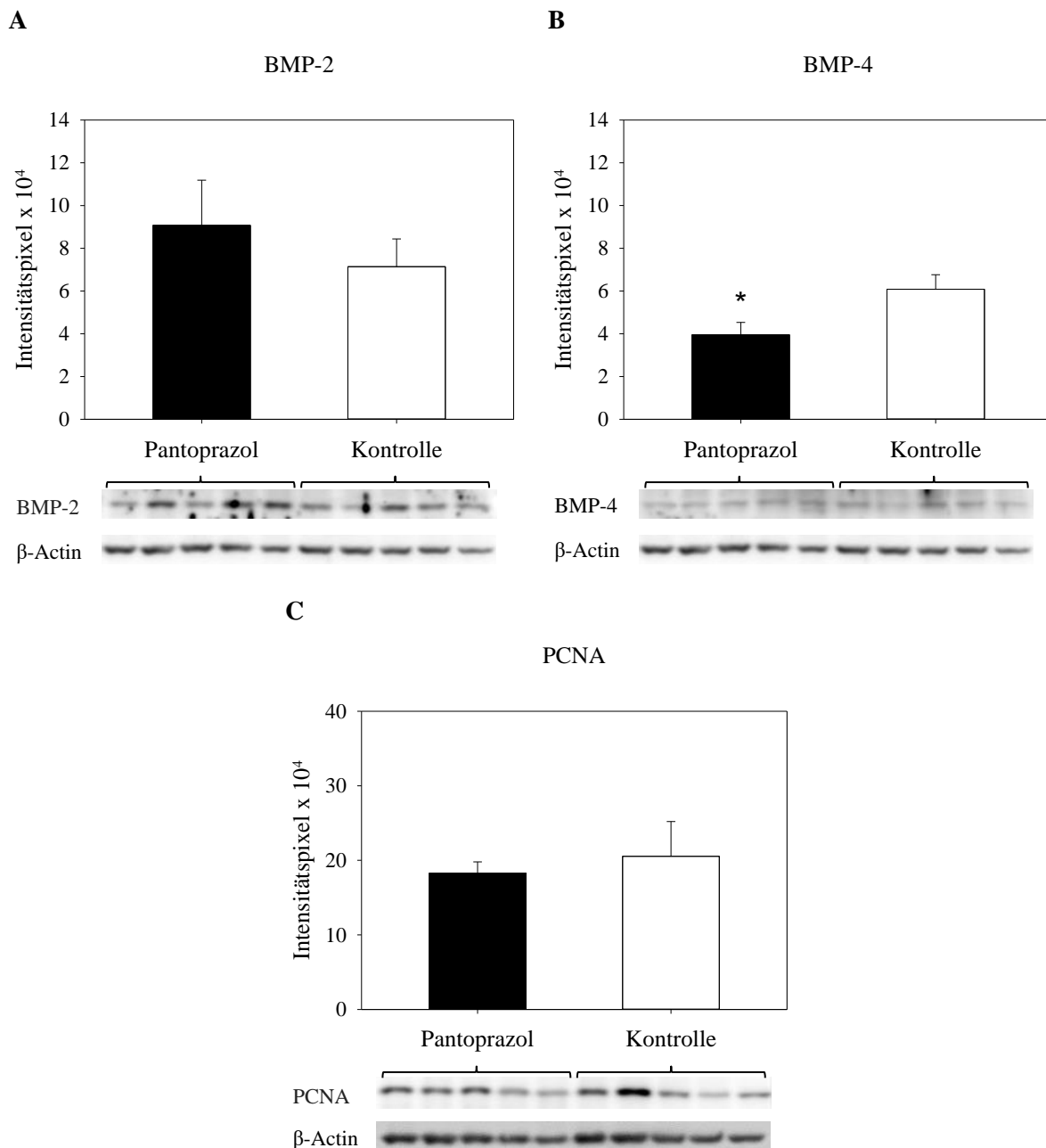


Abb. 27: Proteinexpression von BMP-2 (A), BMP-4 (B) und PCNA (C). Jeweils mit zugehörigen Westernblots. Pantoprazolgruppe (schwarze Balken) und Kontrollgruppe (weiße Balken). Mittelwert  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  versus Kontrollgruppe.

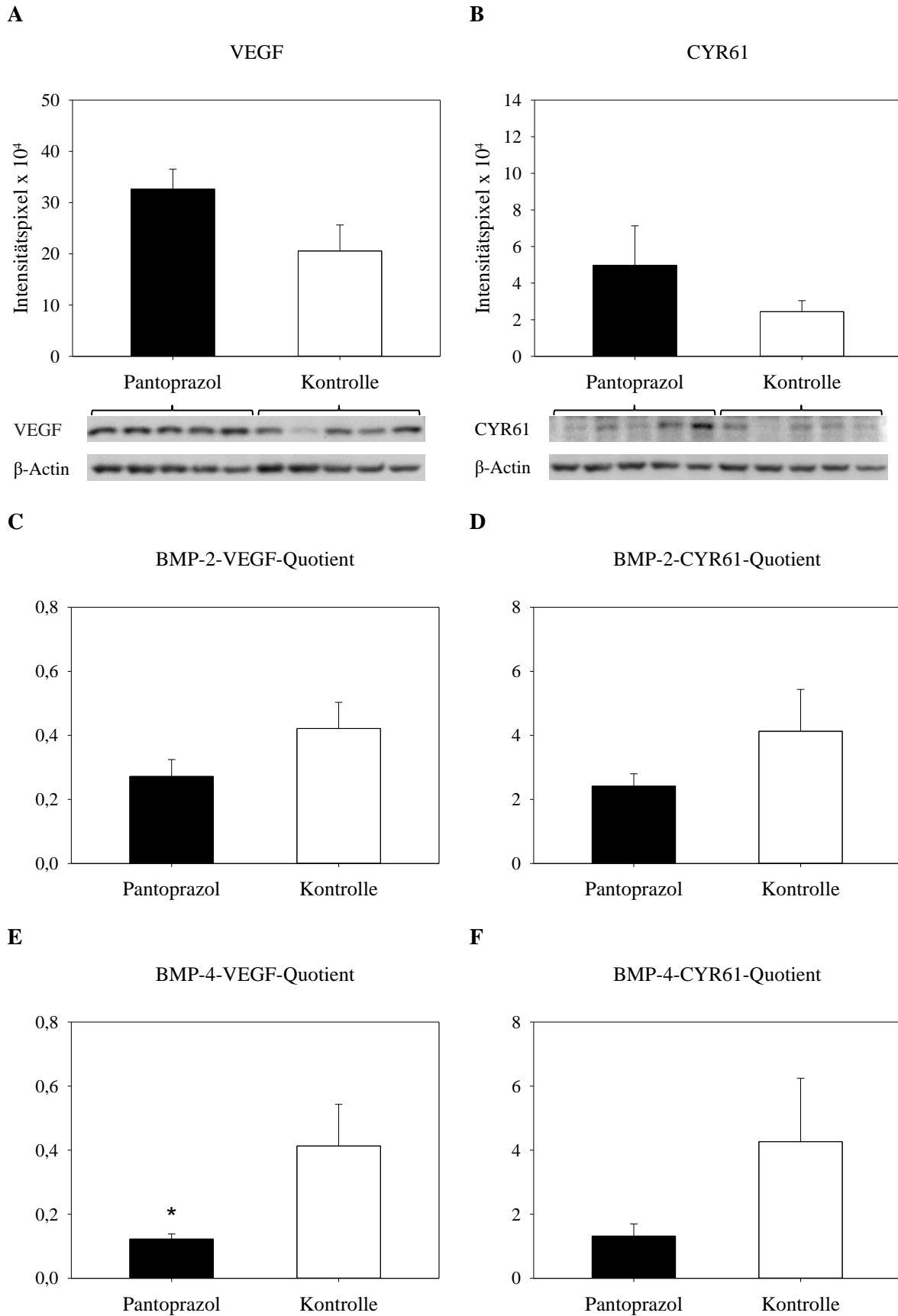


Abb. 28: Proteinexpression von VEGF (A) und CYR61 (B). Jeweils mit zugehörigen Westernblots. Verhältnis der Expression von BMP-2 zu VEGF (C) und CYR61 (D). Verhältnis der Expression von BMP-4 zu VEGF (E) und CYR61 (F). Pantoprazolgruppe (schwarze Balken) und Kontrollgruppe (weiße Balken). Mittelwert  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  versus Kontrollgruppe.

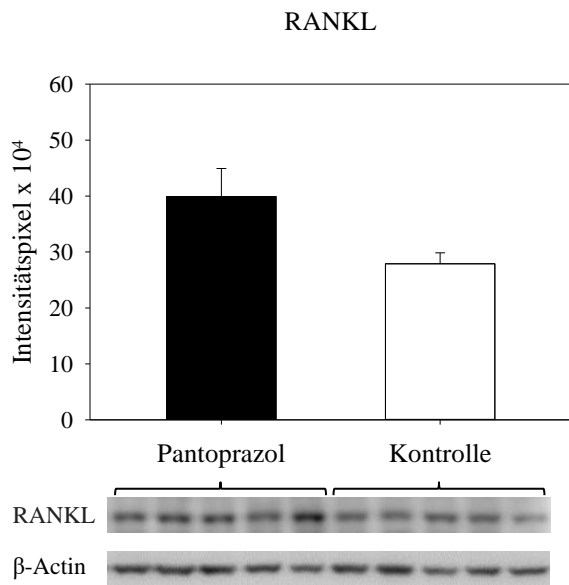
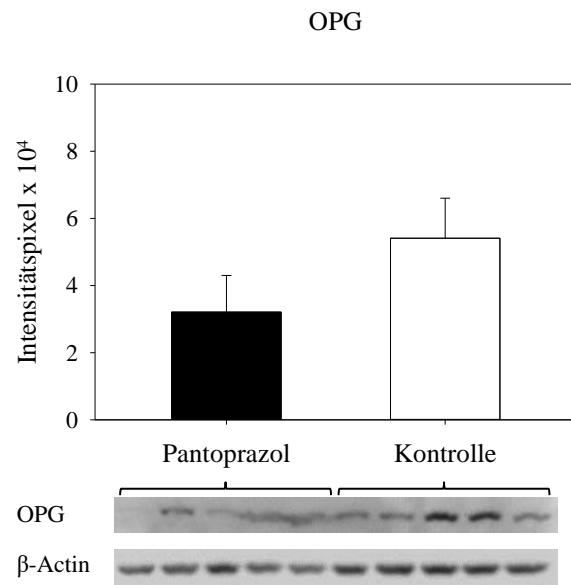
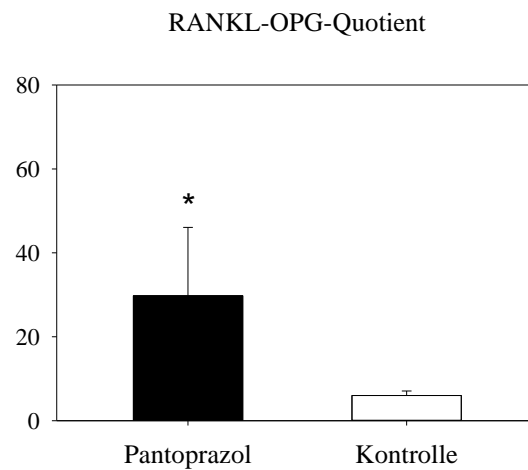
**A****B****C**

Abb. 29: Proteinexpression von RANKL (A) und OPG (B). Jeweils mit zugehörigen Westernblots. Verhältnis der Expression von RANKL zu OPG (C). Pantoprazolgruppe (schwarze Balken) und Kontrollgruppe (weiße Balken). Mittelwert  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  versus Kontrollgruppe.

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion der Methoden

Zur Untersuchung der Frakturheilung wurde ein von Histing et al. (2018) beschriebenes geschlossenes Frakturmodell der Maus verwendet. Die hierbei verwendete intramedulläre Zugschraube ermöglicht eine Stabilisierung der Fraktur durch interfragmentäre Kompression (Histing et al., 2018). Durch die Stabilisierung und Kompression des Frakturspalts kann die Frakturheilung im Vergleich zu nicht-stabilisierten Frakturen beschleunigt werden und ist somit besser mit der humanen Frakturversorgung vergleichbar (Histing et al., 2016b). Allerdings wird keine absolute Stabilität erreicht, weswegen es zur indirekten Frakturheilung kommt (Histing et al., 2018). Geschlossene Frakturmodelle haben insgesamt eine geringe Invasivität (Gunderson et al., 2020; Histing et al., 2011). Durch das Einbringen des Implantats kommt es jedoch zu einer Gewebeschädigung in der Cavitas medullaris (Histing et al., 2011). Hierdurch könnte die Frakturheilung beeinträchtigt werden. Allerdings werden auch bei der humanen Frakturversorgung intramedulläre Implantate verwendet (Niethard et al., 2017). Bei dem verwendeten Frakturmodell wurden Frakturen des Knochenschafts untersucht. Im Alter werden jedoch überwiegend metaphysäre Frakturen beobachtet, deren Frakturheilung Unterschiede aufweist (Haffner-Luntzer et al., 2020). Dies ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen.

Die menschliche und murine Frakturheilung unterscheiden sich. Mäuse und Ratten haben eine weniger komplexe Knochenstruktur ohne Havers-Kanäle (Nunamaker, 1998) sowie einen geringeren Spongiosa-Anteil (Gomes, Fernandes, 2011). Die Kallusformation findet größtenteils periostal statt (O'Loughlin et al., 2008). Beim *Remodelling* kommt es nicht zur Ausbildung von Resorptionskanälen, sondern von Resorptionshöhlen (Gomes, Fernandes, 2011; Nunamaker, 1998). Diese Form des *Remodelling* ist jedoch ähnlich zum menschlichen *Remodelling* (Nunamaker, 1998). Zudem verläuft die Frakturheilung bei Mäusen etwa um den Faktor 6-8 schneller als bei Menschen (Peric et al., 2015).

Da die Frakturheilung im Alter untersucht werden sollte, wurden 16 Monate alte Mäuse verwendet. Bei vorherigen Studien wurden hierfür häufig 18 Monate alte Mäuse verwendet (Histing et al., 2016a; Lu et al., 2008; Lu et al., 2005; Orth et al., 2019). Flurkey et al. (2007) empfehlen, bei Altersstudien 18 bis 24 Monate alte Mäuse zu verwenden. Vorher sei der Alterungsprozess noch nicht ausreichend vorangeschritten. Allerdings beziehen sich die Autoren hierbei auf eine Zuchtlinie (C57BL/6J), bei der die Hälfte der Mäuse nach etwa 28 Monaten verstirbt (Flurkey et al., 2007). In der vorliegenden Studie wurden CD-1-Mäuse verwendet. Homburger et al. (1975) beobachteten bei einer Kontrollgruppe von CD-1-Mäusen, dass bereits nach etwa 17 Monaten die Hälfte der Mäuse verstorben waren. Maita et al. (1988) stellten eine Mortalität von 30 % nach 19 Monaten und 65 % nach 25 Monaten fest. Navarro et al. (2004) berichten von einer medianen Lebensdauer von 16 bis 20 Monaten. Somit verläuft der

Alterungsprozess bei CD-1-Mäusen anscheinend schneller. Bei der Obduktion stellten Homburger et al. (1975) ab einem Alter von 18 Monaten zudem vermehrt Neoplasien fest. Mit dem Alter zunehmende Komorbiditäten wie Tumorerkrankungen stellen jedoch einen Störfaktor bei Altersstudien dar (Flurkey et al., 2007; Vanhooren, Libert, 2013). Sie sind zwar auch durch Alterungsprozesse bedingt, allerdings ist nicht jedes Versuchstier von denselben Erkrankungen betroffen (Flurkey et al., 2007). Daher wird oftmals empfohlen, keine sehr alten Versuchstiere zu verwenden (Flurkey et al., 2007; Vanhooren, Libert, 2013) oder diese zumindest eingehend zu obduzieren (Flurkey et al., 2007). Bei Studien mit älteren oder jüngeren Mäusen als in der vorliegenden Studie könnten jedoch durchaus abweichende Beobachtungen gemacht werden. So schlossen Lu et al. (2005) aus Beobachtungen der Frakturheilung bei Mäusen unterschiedlichen Alters auf eine kontinuierliche Abnahme des Heilungsvermögens während der gesamten Lebensdauer.

Zwischen dem Alterungsprozess bei Menschen und Mäusen bestehen Unterschiede (Demetrius, 2006; Vanhooren, Libert, 2013). Manche dieser Unterschiede könnten die kürzere Lebensdauer von Mäusen erklären (Demetrius, 2006). Allerdings haben Mäuse vergleichsweise lange Telomere und eine hohe Telomerase-Aktivität (Vanhooren, Libert, 2013). Beim Menschen wird die Verkürzung von Telomeren als eine Hauptursache des Alterns angesehen, während bei Mäusen keine kritische Telomer-Verkürzung im Alter beobachtet wird (McHugh, Gil, 2017). Trotz dieser Unterschiede ist der Phänotyp alter Mäuse sehr ähnlich zum Phänotyp alter Menschen (Ackert-Bicknell et al., 2015).

Die Applikation von Pantoprazol erfolgte intraperitoneal. Dies ist eine häufig verwendete Applikationsart bei Mäusen (Donovan, Brown, 2005). Eine orale Gabe war nicht möglich, da keine magensaftresistenten Arzneiformen in den erforderlichen niedrigen Dosen verfügbar waren. Auf eine intravenöse Gabe wurde verzichtet, da dies eine kompliziertere Methode ist und nur geringe Volumina appliziert werden können (Donovan, Brown, 2005). Intraperitoneal applizierte Substanzen werden hauptsächlich über Gefäße resorbiert, welche in die Vena portae hepatis drainieren, sodass sie einem *First-Pass*-Effekt unterliegen (Lukas et al., 1971). Somit kann die orale Pharmakokinetik von Pantoprazol teilweise nachgestellt werden. Intraperitoneale Injektionen führen allerdings zu einer vermehrten Freisetzung von Glucocorticoiden (Baek et al., 2015; Drude et al., 2011). Die Gabe von Glucocorticoiden führt wiederum zu einer beeinträchtigten Knochenheilung (Liu et al., 2018; Waters et al., 2000). Deswegen erhielt die Kontrollgruppe intraperitoneale Injektionen einer äquivalenten Menge des Vehikels. Auch die verwendete Dosis unterschied sich im Vergleich zu den beim Menschen üblicherweise verwendeten Dosen. Nach der von Nair und Jacob (2016) vorgeschlagenen Berechnungsmethode entspricht die verwendete Dosis einer humanen Äquivalenzdosis von etwa 8 mg/kg KG. Beim Menschen werden meist 20-40 mg als Tagesdosis eingesetzt (Mutschler et al., 2013). Dennoch wurde bei mehreren vorherigen Studien eine ähnlich hohe Dosierung gewählt, sodass die Ergebnisse besser miteinander verglichen werden können (Histing et al., 2012; Joo et al., 2013; Sonn et al., 2019; Vegger et al., 2017).

Die Untersuchung der frakturierten Femora erfolgte 2 und 5 Wochen postoperativ, um sowohl die Kallusformation als auch das *Remodelling* beurteilen zu können. Auf Grundlage des zeitlichen Verlaufs der Frakturheilung bei Mäusen empfehlen Histing et al. (2011) die Untersuchungen 1-2 Wochen sowie 3-5 Wochen postoperativ durchzuführen. Manigrasso und O'Connor (2004) untersuchten diesen zeitlichen Verlauf bei 3 Monate alten Mäusen in einem geschlossenen Marknagel-Frakturmodell. Hierbei wurde nach 10-14 Tagen der maximale Kallus-Durchmesser beobachtet. Somit überwogen bis zu diesem Zeitpunkt die anabolen Effekte der Kallusformation. Das Remodelling konnte anhand der Überbrückung des Frakturspaltes beobachtet werden, welche nach 2 Wochen knorpelig, nach 3-4 Wochen knöchern und nach 6 Wochen lamellär war (Manigrasso, O'Connor, 2004). Bei alten Mäusen ist die Frakturheilung jedoch verzögert (Lopas et al., 2014; Lu et al., 2005). Daher könnten spätere Untersuchungszeitpunkte sinnvoller sein. Allerdings wählten Histing et al. (2012) dieselben Zeitpunkte bei der Untersuchung des Einflusses von Pantoprazol auf die Frakturheilung bei jungen Mäusen, sodass die Ergebnisse besser miteinander verglichen werden können.

Die biomechanische Untersuchung erfolgte mittels zerstörungsfreier 3-Punkt-Biegung. Dadurch konnten die Proben auch für weitere Analysen verwendet werden, wodurch die benötigte Anzahl an Versuchstieren reduziert werden konnte. Bei Biegetests werden Druck- und Zugspannungen innerhalb des Knochens erzeugt (Turner, Burr, 1993). Sie erlauben allerdings keine vollständige biomechanische Charakterisierung. Insbesondere die Widerstandsfähigkeit gegenüber Torsionskräften wird nicht getestet (Turner, Burr, 1993). Steiner et al. (2015) merkten zudem an, dass die Messung bei einem stark asymmetrischen Kallus fehlerhaft sein kann. Im Vergleich zu anderen Methoden im Kleintiermodell kommen Biegetests der physiologischen Belastung auf einen frakturierten Knochen allerdings am nächsten (Steiner et al., 2015).

Bei der radiologischen Untersuchung wurde eine in-vitro-Computertomographie durchgeführt. Diese Methode wurde bereits bei einigen Studien zur Untersuchung der Frakturheilung eingesetzt (Lopas et al., 2014; O'Neill et al., 2012; Orth et al., 2019). Die Bilderstellung und -auswertung orientierte sich in der vorliegenden Studie an den Empfehlungen von Bouxsein et al. (2010) zur morphometrischen Analyse trabekulären Knochens. Computertomographische Aufnahmen ermöglichen die Untersuchung der Zusammensetzung und Struktur eines Frakturkallus als dreidimensionales Objekt (O'Neill et al., 2012). Allerdings werden hauptsächlich mineralisierte Bestandteile abgebildet, da die Aufnahmen in Weichstrahltechnik angefertigt wurden. Dadurch kann das Knochengewebe besser abgegrenzt werden (Bouxsein et al., 2010). Bei der Bildauswertung konnten die Grenzen des Kallus durch dessen Knochenmanschette identifiziert werden. Allerdings war in der vorliegenden Studie bei keinem der nach 2 Wochen untersuchten Knochen bereits die komplette Zirkumferenz des Kallus von dieser Manschette umschlossen. Deswegen war es auf Höhe des Frakturspaltes nicht möglich, die Grenzen des Kallus vollständig zu erkennen. Sie wurden stattdessen durch Interpolation bestimmt. Somit könnte das Kallusvolumen über- oder unterschätzt worden sein. Aus Fehleinschätzungen des Kallusvolumens

würden auch fehlerhafte Knochenanteile resultieren. Fehlerhafte Messungen der trabekulären Struktur wären nicht zu erwarten. Die Analyse der knöchernen Strukturen ist allerdings maßgeblich vom Segmentierungsverfahren abhängig (Bouxsein et al., 2010). Hierbei wurde ein Grauwertebereich festgelegt, der als Knochengewebe definiert wurde. Dies erfolgt üblicherweise durch optischen Vergleich und stellt eine häufige Fehlerquelle dar (Bouxsein et al., 2010).

Die histologische Untersuchung ist ein Goldstandard bei tierexperimentellen Frakturheilungsstudien. Zur Anfertigung und Auswertung der Präparate wurden gängige Methoden verwendet (Gerstenfeld et al., 2005). Solche Untersuchungen ermöglichen die Analyse aller Gewebearten innerhalb des Frakturkallus unabhängig von deren Mineralisierungsgrad. Allerdings wurde nur eine Ebene eines dreidimensionalen Objekts untersucht, welches nicht vollständig homogen aufgebaut ist. So beobachteten Gerstenfeld et al. (2003) separate halbmondförmige Chondrifikations- und Ossifikationszentren, deren Ausmaß sich in verschiedenen Ebenen unterschied. Folglich kann sich die ermittelte Gewebezusammensetzung eines Schnittes von der Zusammensetzung des gesamten Kallus unterscheiden.

Die Proteinanalyse wurde nur nach 2 Wochen durchgeführt. Es konnte jedoch für einige der verwendeten Biomarker gezeigt werden, dass sie während der Frakturheilung nicht konstant exprimiert werden. Ihre Expression hat teils mehrere Maxima und Minima. Somit ist die Aussagekraft von Ergebnissen eines einzelnen Untersuchungszeitpunktes limitiert. Ferner konnte nur die globale Expression im Frakturkallus bestimmt werden. Die Expression der verwendeten Biomarker erfolgt allerdings nicht durch jede beteiligte Zelle im selben Ausmaß. Ihre Wirkung ist zudem teils von lokalen Gradienten oder weiteren lokalwirkenden Molekülen abhängig, deren Expression entweder nicht bestimmt wurde oder deren räumliche Verteilung unbekannt ist (siehe Kapitel 2.2.4.).

Die Stichprobengrößen waren vergleichbar zu den Stichprobengrößen ähnlicher tierexperimenteller Studien (Aasarød et al., 2016; Al Subaie et al., 2016; Fischer et al., 2017; Yukata et al., 2018). Insbesondere die Stichprobengröße für die Proteinanalyse war jedoch relativ klein, da primär überprüft werden sollte, ob überhaupt ein Einfluss auf die Frakturheilung besteht und gleichzeitig die Anzahl an Versuchstieren begrenzt war. Besonders bei relativ kleinen Effektstärken haben statistische Tests für kleine Stichprobengrößen allerdings eine geringe Teststärke ( $1-\beta$ ) (Mascha, Vetter, 2018). Die daraus resultierende höhere Wahrscheinlichkeit für  $\beta$ -Fehler sollte beachtet werden.



## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass die Frakturheilung bei alten Mäusen durch Gabe von Pantoprazol beeinträchtigt wird. Dies manifestierte sich in minderwertigen biomechanischen Eigenschaften, einer veränderten trabekulären Struktur und einem reduzierten Knochenanteil. Letzteres spricht für eine gestörte direkte und/oder enchondrale Knochenformation. Da der Knorpelanteil in Folge dessen nicht erhöht war, sondern der Bindegewebeanteil, ist möglicherweise auch die Knorpelformation gestört gewesen. So wird Bindegewebe im Frakturkallus dort gebildet, wo die Knorpelformation unzulänglich ist (Schindeler et al., 2008). Die computertomographischen Analysen konnten den histologisch verminderten Knochenanteil allerdings nicht verifizieren. Die Differenzen könnten Resultat der diskutierten Limitationen beider Methoden sein.

Die Ergebnisse dieser Studie sind konsistent zu den Ergebnissen von Histing et al. (2012), welche zeigen konnten, dass die Frakturheilung bei jungen Mäusen durch Gabe von Pantoprazol beeinträchtigt wird. Das Frakturmodell und die Untersuchungsmethoden waren weitestgehend vergleichbar. Es zeigte sich ebenfalls eine reduzierte Biegesteifigkeit. Die Unterschiede waren allerdings nur nach 5 Wochen signifikant. Abweichend von den Beobachtungen bei alten Mäusen zeigten sich nach 2 Wochen keine Veränderungen der Gewebzusammensetzung. Nach 5 Wochen war der Knochenanteil ebenfalls vermindert, während der Bindegewebeanteil und Knorpelanteil erhöht waren. Computertomographische Analysen wurden nicht durchgeführt. Die Effektstärke wurde allerdings nicht bestimmt. Ferner könnten die Differenzen vom Operateur oder Untersucher abhängig sein. Anscheinend hat der Einfluss von Pantoprazol im Alter jedoch eine größere Relevanz. So konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass die Frakturheilung im Alter bereits beeinträchtigt ist (Lopas et al., 2014; Lu et al., 2005; Meyer et al., 2001). Die biomechanischen Eigenschaften der frakturierten Femora junger Ratten sind bereits nach 4 Wochen wieder vergleichbar zu den biomechanischen Eigenschaften unfrakturiertes Femora, während dies bei alten Ratten auch nach 24 Wochen noch nicht der Fall ist (Meyer et al., 2001). Pantoprazol verstärkt somit eine bereits bestehende Beeinträchtigung der Frakturheilung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sind ebenfalls konsistent zu den Ergebnissen von Al Subaie et al. (2016). Diese untersuchten den Einfluss von Omeprazol auf die Knochenheilung nach corticalen Knochendefekten der Tibiae junger Ratten (Ø 2,5 mm). Nach 2 Wochen enthielten die Defekte der mit Omeprazol behandelten Ratten weniger neugebildeten Knochen und wiesen eine veränderte trabekuläre Struktur auf. Interessanterweise zeigten sich diese Veränderungen bereits bei einer wesentlich geringeren Dosis (5 mg/kg KG täglich) als in der vorliegenden Studie. Dies entspricht einer humanen Äquivalenzdosis von 0,8 mg/kg KG (Nair, Jacob, 2016) und ist somit nur geringfügig höher als die beim Menschen eingesetzten Dosis.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Sonn et al. (2019) führte hingegen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Hierbei wurde der Einfluss von Pantoprazol (200 mg/kg KG täglich) auf die Knochenheilung nach einer Spondylodese mittels posterolateraler lumbaler Fusion bei weiblichen Ratten untersucht. Die Knochenformation wurde mit BMP-2 stimuliert. Über das Alter der Versuchstiere wurden keine Angaben gemacht. 8 Wochen postoperativ zeigte sich eine vergleichbare Torsionssteifigkeit der fusionierten Wirbel. Die gemessene Torsionsfestigkeit war etwa 20 % niedriger, allerdings waren die Unterschiede nicht signifikant. Das computertomographisch bestimmte neugebildete Knochenvolumen war etwa 30 % geringer, wobei die Unterschiede ebenfalls nicht signifikant waren. Zudem war die palpatorisch bestimmte Fusionsrate vergleichbar. Da jedoch das Ausmaß der Überbrückung signifikant erniedrigt war, folgerten die Autoren, dass PPI die Knochenheilung bei spinalen Fusionen möglicherweise beeinträchtigen. Sonn et al. (2019) merkten jedoch an, dass die beobachtete Knochenheilung überwiegend dem Muster der direkten Frakturheilung folgte. In der vorliegenden Studie wurde die indirekte Frakturheilung untersucht.

Bei der indirekten Frakturheilung kommt es zur Formation eines Frakturkallus (Loi et al., 2016). Die Differenzierung der hierfür benötigten Chondrozyten und Osteoblasten aus MSCs wird unter anderem durch BMPs stimuliert (Bahney et al., 2019). In der Pantoprazolgruppe war die BMP-4-Expression signifikant vermindert. Dies könnte für eine Hemmung der enchondralen Knochenformation sprechen. Bei jungen Mäusen zeigte sich ebenfalls eine verminderte BMP-4-Expression, wobei zusätzlich die BMP-2-Expression vermindert war (Histing et al., 2012). Auch in-vitro zeigt sich eine PPI-induzierte verminderte BMP-2-Expression durch Zellen der osteoblastischen Zelllinie (Costa-Rodrigues et al., 2013). Bei alten Mäusen war die BMP-2-Expression hingegen nicht signifikant unterschiedlich. Diese Differenzen könnten durch eine bereits verminderte BMP-2-Expression im Alter bedingt sein (Meyer et al., 2003).

PPI haben anscheinend auch einen direkten Einfluss auf Osteoblasten. Die bisherigen Studien sind allerdings widersprüchlich. Costa-Rodrigues et al. (2013) untersuchten den Einfluss von drei verschiedenen PPI auf humane MSCs, welche zur osteoblastischen Differenzierung angeregt wurden, über einen Zeitraum von 21 Tagen. Hierbei zeigte sich eine dosisabhängig erhöhte Apoptoserate, eine verminderte Expression der alkalischen Phosphatase und von Typ-I-Kollagen sowie eine daraus resultierende verminderte Produktion mineralisierter Matrix. Die Unterschiede waren ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  signifikant. Teilweise konnten die Veränderungen bereits nach 7 Tagen beobachtet werden. Nach 3-tägiger Inkubation mit Omeprazol (0,29-11,6  $\mu\text{M}$ ) konnten Hyun et al. (2010) hingegen keine Veränderung der Zellviabilität von murinen Osteoblasten-ähnlichen Zellen feststellen. Vielmehr zeigte sich eine vermehrte Genexpression von Osteocalcin, was die Autoren als Stimulation der Osteoblastenaktivität interpretierten. Prause et al. (2014) stellte sogar eine erhöhte Zellviabilität und Aktivität der alkalischen Phosphatase bei humanen Osteoblasten fest, welche für 7 Tage mit Pantoprazol (2,5-25  $\mu\text{M}$ ) inkubiert wurden.

Die enchondrale Knochenformation geht mit dem Einwachsen von Gefäßen einher (Schindeler et al., 2008). Diese Vaskularisierung ist von entscheidender Bedeutung für das Voranschreiten der Frakturheilung (Bahney et al., 2015). Sie wird unter anderem durch VEGF induziert (Marsell, Einhorn, 2011). In der Pantoprazolgruppe war die Expression von VEGF erhöht. Der Unterschied war allerdings nicht signifikant. Sollte dieser Unterschied dennoch nicht durch Zufall entstanden sein, könnte dies für hypoxische Bedingungen im Frakturkallus sprechen. So ist Hypoxie beziehungsweise der *hypoxia-inducible factor* ein maßgeblicher Induktor der VEGF-Expression (Apte et al., 2019; Clarkin, Gerstenfeld, 2013). Somit könnte die Perfusion oder Diffusion innerhalb des Frakturkallus bei Behandlung mit Pantoprazol vermindert oder der Sauerstoffverbrauch erhöht sein. Dies wäre insbesondere im Alter von Bedeutung, da die Perfusion des Knochens (Prisby et al., 2007) und die Vaskularisierung des Frakturkallus (Lu et al., 2008) im Alter bereits gestört ist. Eine verminderte Perfusion führt wiederum zu einer verzögerten Frakturheilung (Lu et al., 2007).

Ähnlich zu den Beobachtungen der vorliegenden Studie stellten Weiss et al. (2009) und Sarahrudi et al. (2009) bei Patienten mit verzögerter Frakturheilung und Pseudarthrosen im Vergleich zu Patienten mit normaler Frakturheilung erhöhte VEGF-Serumkonzentration fest. Die Unterschiede waren allerdings nicht signifikant. Garcia et al. (2012) untersuchten im Mausmodell die Angiogenese bei Pseudarthrosen im Vergleich zur normalen Frakturheilung. Bei Pseudarthrosen zeigte sich eine signifikant erhöhte VEGF-Expression. Die Autoren vermuteten, dass dies durch hypoxische Bedingungen induziert wurde. Gleichzeitig war die Gefäßdichte insgesamt nicht signifikant unterschiedlich und an Tag 7-14 sogar tendenziell vermehrt (Garcia et al., 2012). Manche Autoren folgerten auf Grundlage dieser Berichte, dass die Frakturheilung auch durch eine initiale Hypervaskularisierung beeinträchtigt werden könnte (Ding et al., 2018; Reahl et al., 2020). Sollte diese Annahme zutreffen, könnte eine potentiell vermehrte Expression von VEGF auch selbst an der Pathogenese der beeinträchtigten Frakturheilung bei Gabe von Pantoprazol beteiligt gewesen sein.

In der Pantoprazolgruppe war das Verhältnis von BMP-4 zu VEGF signifikant vermindert. Garcia et al. (2012) stellten bei Pseudarthrosen neben einer erhöhten VEGF-Expression auch eine verminderte Expression von BMP-2 und BMP-4 fest. Die Autoren vermuteten, dass dies nicht nur Folge der gestörten Frakturheilung sein könnte, sondern ein gestörtes Verhältnis von angiogenen zu osteogenen Biomarkern auch ursächlich für die Bildung von Pseudarthrosen sein könnte. Peng et al. (2002, 2005) untersuchten den Einfluss dieser Verhältnisse auf die Knochenheilung nach cranialen Knochendefekten im Mausmodell. Hierzu wurden in den Knochendefekten *muscle-derived stem cells* platziert, die durch DNA-Transfektion zur vermehrten Expression von VEGF, BMP-2 oder BMP-4 angeregt wurden. Die Anzahl BMP-2- respektive BMP-4-produzierender Zellen war konstant. Mit steigendem Anteil VEGF-produzierender Zellen wurde eine verminderte Knochenformation beobachtet (Peng et al., 2005; Peng et al., 2002). Bei der BMP-4-induzierten Knochenformation führte eine stark erhöhte Verhältnis von VEGF zu BMP-4 (5:1) sogar zu einer geringeren Knochenformation als die alleinige Stimulation mit

BMP-4 (Peng et al., 2002). Peng et al. (2002) vermuteten, dass diese Beobachtungen durch eine vermehrte Differenzierung von MSCs zu Endothelzellen bedingt sein könnten. In Folge dessen sei möglicherweise die Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten aus MSCs gehemmt. Nach meiner Kenntnis konnte ein solcher Mechanismus bislang nicht nachgewiesen werden. Gleichwohl lassen die Ergebnisse von Peng et al. (2002) vermuten, dass ein vermindertes Verhältnis von BMP-4 zu VEGF an der Pathogenese der beeinträchtigten Frakturheilung beteiligt gewesen sein könnte. Ein potentieller Mechanismus hierfür könnte auch eine Störung der Vaskularisierung sein. So wird die räumliche Organisation der Endothelzellen während der Angiogenese unter anderem durch das Zusammenspiel des BMP- und VEGF-Signalwegs reguliert, deren Wirkung durch den Notch-Signalweg gekoppelt ist (Mack, Iruela-Arispe, 2018). Eine Störung dieses Zusammenspiels könnte zu einer inadäquaten Vaskularisierung geführt haben. Allerdings wurde in der vorliegenden Studie weder die Vaskularisierung noch die Expression anderer involvierter BMPs bestimmt.

Für das Remodelling des Frakturkallus werden Osteoklasten benötigt (Bahney et al., 2019). Die Genese und Aktivität von Osteoklasten wird maßgeblich durch RANKL stimuliert (Rupp et al., 2019). In der Pantoprazolgruppe war das Verhältnis von RANKL zu dessen Antagonisten OPG erhöht. Konsistent dazu war die Anzahl der Osteoklasten zum selben Zeitpunkt um den Faktor 1,7 erhöht. Eine vermehrte Osteoklastenpopulation könnte zu einer übermäßigen Resorption des Kallusgewebes geführt haben und somit zu einem verminderten Knochenanteil beigetragen haben. Ein ähnlicher Mechanismus wurde von Mehta et al. (2010) postuliert. Diese stellten eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten bei der unbeeinflussten Frakturheilung alter Ratten fest. Gleichzeitig zeigte sich eine verminderte Knochendichte und eine veränderte trabekuläre Struktur. Die Autoren führten diese morphologischen Veränderungen auf eine gesteigerte Resorption zurück und vermuteten, dass die gesteigerte Osteoklastenaktivität eine Ursache der beeinträchtigten Frakturheilung im Alter sein könnte. Sollte diese Vermutung zutreffen, könnte Pantoprazol die Frakturheilung im Alter durch eine Verstärkung dieses Mechanismus beeinträchtigen.

Allerdings wird auch von einer Osteoklastenhemmung durch PPI berichtet. So stellten mehrere Studien eine verminderte Resorptionsfähigkeit in-vitro (Costa-Rodrigues et al., 2013; Prause et al., 2015; Tuukkanen, Väänänen, 1986; Zaidi, 1990) und auch in-vivo bei lokaler Applikation fest (Sheraly et al., 2009). Tuukkanen und Väänänen (1986) vermuteten, dass dies an einer Inhibition der osteoklastischen Säuresekretion liegen könnte. Mattsson et al. (1991) konnten eine solche Inhibition der osteoklastischen H<sup>+</sup>-ATPase durch Omeprazol nachweisen. Die Autoren merkten allerdings an, dass hierfür wesentlich höhere Konzentrationen ( $\geq 100 \mu\text{M}$ ) als für die Inhibition der gastralen H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ( $\geq 3 \mu\text{M}$ ) notwendig sind. Die klinische Relevanz dieses Mechanismus wird daher von manchen Autoren angezweifelt (Vaezi et al., 2017). Zumindest in der vorliegenden Studie könnte dieser Mechanismus aufgrund der hohen Dosis jedoch einen Einfluss gehabt haben.

PPI haben aber anscheinend auch bei geringeren Konzentrationen bereits einen Einfluss auf Osteoklasten. Costa-Rodrigues et al. (2013) untersuchten den Einfluss von drei verschiedenen PPI auf humane Monozyten, welche zur osteoklastischen Differenzierung angeregt wurden, über einen Zeitraum von 21 Tagen. Hierbei zeigte sich eine dosisabhängig erhöhte Apoptoserate, verminderte Expression von Cathepsin K, verminderte TRAP-Aktivität und eine daraus resultierende verminderte Resorption eingebrachter Calcium-Phosphat-Platten. Die Unterschiede waren ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  signifikant. Teilweise konnten die Veränderungen bereits nach 7 Tagen beobachtet werden. Konsistent hierzu stellten Prause et al. (2015) eine verminderte Zellviabilität von humanen Osteoklasten fest, welche für 7 Tage mit Pantoprazol (25  $\mu\text{M}$ ) inkubiert wurden. Nach 3-tägiger Inkubation mit Omeprazol (0,29-11,6  $\mu\text{M}$ ) konnten Hyun et al. (2010) hingegen noch keine Veränderungen der Zellviabilität von murinen Osteoklasten-ähnlichen Zellen feststellen. Allerdings zeigte sich bereits bei einer Dosis von 0,29  $\mu\text{M}$  eine Abnahme der Genexpression des Calcitoninrezeptors sowie von *c-fos* und *nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1* (NFATc1). Letztere sind Teil des RANK-Signalwegs (Park et al., 2017). Darüber hinaus konnten Costa-Rodrigues et al. (2013) auch eine verminderte Genexpression von *MYC* feststellen. Dieses ist ebenfalls Bestandteil des RANK-Signalwegs und wird unterdessen neben *NFATc1* als weiteres zentrales Signalmolekül bei der Regulation der Genese und Aktivität von Osteoklasten angesehen (Lorenzo, 2017). Durch Inhibition von *MYC* (Battaglino et al., 2002) oder *NFATc1* (Park et al., 2017) kann die Osteoklastogenese inhibiert werden.

Diese Veränderungen könnten erklären, weswegen die Osteoklastenpopulation nach 5 Wochen vermindert war. Auch Al Subaie et al. (2016) stellten eine PPI-induzierte Reduktion der Osteoklastenpopulation bei der Heilung corticaler Knochendefekte fest und führten dies ebenfalls auf eine Hemmung der Osteoklastogenese zurück. Es bleibt jedoch unklar, weswegen sich erst nach 5 Wochen eine verminderte Osteoklastenpopulation zeigte, während Al Subaie et al. (2016) dies bereits nach 2 Wochen beobachten konnten. Unabhängig von der Ursache einer verminderten Osteoklastenpopulation, könnte es hierdurch zu einer Störung des *Remodelling* gekommen sein.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie stellten Histing et al. (2012) bei jungen Mäusen eine verminderte RANKL- und eine vermehrte OPG-Expression fest. Dennoch war die Anzahl an Osteoklasten zu diesem Zeitpunkt sogar tendenziell erhöht (Faktor 1,7; nicht signifikant). Daher wurde möglicherweise kein konstanter Effekt von Pantoprazol auf die Expression dieser Proteine festgestellt. Vielmehr könnte die veränderte Expression Ausdruck einer verlangsamten Frakturheilung sein. So konnten Kon et al. (2001) zeigen, dass es bei der unbeeinflussten Marknagel-stabilisierten Frakturheilung der Maus innerhalb der ersten 2 Wochen mindestens dreimal zu einer Inversion des Verhältnisses von RANKL zu OPG kommt. Die Autoren assoziierten die fluktuierende Expression mit der Formation und dem voranschreitenden *Remodelling* des weichen Kallus. Gegen diese Hypothese spricht, dass PPI das Verhältnis der osteoblastischen Expression von RANKL zu OPG in-vitro reduzieren (Hyun et al., 2010). Allerdings konnten Joo et al. (2013) zeigen, dass die tägliche Gabe von

30 mg/kg KG Omeprazol für 8 Wochen bei einer calciumarmen Ernährung zu einem erhöhten Verhältnis von RANKL zu OPG im Knochenmark junger ovariectomierter Ratten führt, während dies bei alleiniger Gabe von Omeprazol oder einer calciumarmen Ernährung nicht beobachtet werden konnte. Die Differenzen zwischen in-vitro und in-vivo Daten legen die Vermutung nahe, dass auch systemische Wirkungen von Pantoprazol die Frakturheilung beeinflusst haben könnten. Auch hinsichtlich des Einflusses von PPI auf den normalen Knochenstoffwechsel wurden vergleichbare Hypothesen aufgestellt (Aasarød et al., 2016; Vaezi et al., 2017).

So könnte die Frakturheilung durch die Auswirkungen gastraler Hypoazidität beeinflusst worden sein. Schinke et al. (2009) untersuchten den Einfluss gastraler Hypoazidität auf den Knochenstoffwechsel durch Genausschaltung von *Cckbr*. Dieses codiert den CCK-B/Gastrinrezeptor, welcher in den Belegzellen und Enterochromaffin-ähnlichen Zellen des Magens exprimiert wird (Langhans et al., 1997). Bei 2 Wochen alten Mäusen stellten Schinke et al. (2009) eine Hypocalcämie, um mehr als das 2-Fache erhöhte PTH-Serumkonzentrationen und eine vermehrte Osteoklastenpopulation fest. Im Alter von etwa einem Jahr zeigte sich zudem ein osteoporotischer Phänotyp. Auch die Genausschaltung von *Atp5b*, welches die  $\beta$ -Untereinheit der gastralen  $H^+/K^+$ -ATPase codiert, führte bei Mäusen zu einem vergleichbaren Anstieg der PTH-Serumkonzentration und einem osteoporotischen Phänotyp im Alter von 6 Monaten und 20 Monaten (Fossmark et al., 2012). Schinke et al. (2009) konnten wiederum zeigen, dass die beobachteten Veränderungen bei *Cckbr*-defizienten Mäusen durch lebenslange Supplementierung von Calcium und Vitamin D in Abhängigkeit von der Darreichungsform und Dosis reduziert oder verhindert werden können. Die Autoren schlugen daher vor, dass gastrale Hypoazidität die enterale Resorption von Calcium beeinträchtigt und dadurch zu einem sekundären Hyperparathyreoidismus und Osteoporose führt. Ähnlich zu diesen Beobachtungen führte die tägliche Einnahme von 20 mg Omeprazol über eine Dauer von einer Woche bei postmenopausalen Frauen zu einer 60-prozentigen Reduktion der mittleren Resorption von radioaktiv markiertem Calciumcarbonat unter nüchternen Bedingungen (O'Connell et al., 2005). Freedberg et al. (2017) merkten jedoch an, dass die Resorption von Calcium aus Milchprodukten und wasserlöslichen Calciumsalzen unbeeinflusst von gastraler Hypoazidität ist. Auch eine verminderte Resorption von Calciumcarbonat kann durch gleichzeitige Einnahme saurer Nahrungsmittel verhindert werden (Freedberg et al., 2017). Dennoch stellten Bahtiri et al. (2017) eine Reduktion der Calcium- und eine Zunahme der PTH-Serumkonzentration nach einjähriger Einnahme verschiedener PPI fest (n = 209). Auch Mizunashi et al. (1993) konnten eine Zunahme der PTH-Serumkonzentration nach 8-wöchiger Einnahme von 20 mg Omeprazol täglich nachweisen (n = 32). Hansen et al. (2019) konnten hingegen keine Veränderungen der Calcium- oder PTH-Serumkonzentration nach 6-monatiger Einnahme von 60 mg Dexlansoprazol oder 40 mg Esomeprazol täglich feststellen (n = 93). Auch Sharara et al. (2013) konnten keine signifikanten Veränderungen der PTH-Serumkonzentration oder des ionisierten Calcium nach 3-monatiger Einnahme verschiedener PPI nachweisen (n = 58). Zumindest in der vorliegenden Studie könnte es allerdings zu einer verminderten Calciumresorption und einer konsekutiven Stimulation der

PTH-Sekretion gekommen sein, da ein vergleichbares Standarddiätfutter verwendet wurde wie in der Studie von Schinke et al. (2009). Dieser Mechanismus könnte zudem im Alter von größerer Bedeutung sein, da die enterale Calciumresorption bei alten Ratten vermindert ist (Horst et al., 1978; Wood et al., 1998).

Ob es tatsächlich zu erhöhten PTH-Plasmakonzentrationen oder sogar einer Dekompensation der Calciumhomöostase gekommen ist, wurde nicht untersucht. Sollte es hierzu gekommen sein, könnte dies zu den beobachteten Veränderungen beigetragen haben. So stimuliert PTH die Expression von RANKL in Osteozyten (Wein, 2018) und Osteoblasten (Silva et al., 2011). Dies könnte erklären, warum es zu einer Erhöhung des Verhältnisses von RANKL zu OPG gekommen ist. Ferner führte auch Hyperparathyreoidismus in zahlreichen Studien zu einer vermehrten Osteoklastenpopulation (Fischer et al., 2017; Haffner-Luntzer et al., 2016; Liu et al., 2016; Yukata et al., 2018). Liu et al. (2016) konnten zudem zeigen, dass die Knochenheilung bei Ratten mit sekundärem Hyperparathyreoidismus in Folge einer bilateralen 5/6-Nephrektomie beeinträchtigt ist. Hierbei enthielten craniale Knochendefekte ( $\varnothing$  5 mm) nach 4 und 8 Wochen etwa 50 % weniger neugebildeten Knochen. Corticale Knochendefekte der Femora ( $\varnothing$  1,4 mm) separater Ratten enthielten nach 2 und 4 Wochen etwa 20 % weniger neugebildeten Knochen, der eine verminderte Knochendichte aufwies. Die Calcium-Serumkonzentration war unbeeinflusst. Fischer et al. (2018) untersuchten die Frakturheilung bei ovariectomierten Mäusen mit sekundärem Hyperparathyreoidismus in Folge einer 8-wöchigen Ernährung ohne Calcium und Vitamin D. Die Calcium-Serumkonzentration selbst war hiervon unbeeinflusst. Die Fraktur wurde mittels Fixateur externe stabilisiert. Nach 23 Tagen zeigte sich ein verminderter Knochenanteil, der zudem eine geringere Knochendichte aufwies. Die Biegesteifigkeit war jedoch vergleichbar. Fischer et al. (2017) folgerten, dass die Frakturheilung geringfügig beeinträchtigt wurde. Sie führten dies neben einer Aktivierung von Osteoklasten durch PTH vor allem auf eine verminderte Verfügbarkeit von Calcium für die Mineralisierung des Kallus zurück. Beide Mechanismen könnten auch die Frakturheilung bei Gabe von Pantoprazol beeinträchtigt haben.

Eine Studie von Yukata et al. (2018) führte hingegen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Hierbei wurde der Einfluss einer kontinuierlichen Gabe des PTH-Fragments Teriparatid (40  $\mu$ g/kg KG täglich) auf die Marknagel-stabilisierte Frakturheilung bei Mäusen untersucht. Hierbei zeigte sich ein geringerer Anteil knöchern konsolidierter Frakturen nach 2 und 3 Wochen sowie ein geringeres Knochenvolumen nach einer Woche. Nach 3 und 5 Wochen war das Knochenvolumen jedoch erhöht und auch die Biegefestigkeit war nach 3 Wochen erhöht. Allerdings wurde bei diesem Modell ein primärer Hyperparathyreoidismus simuliert, welcher mit einer Hypercalcämie einhergeht (Yukata et al., 2018). Die Supplementierung von Calcium während der Frakturheilung führt im Mausmodell wiederum zu einer erhöhten Knochendichte und Biegesteifigkeit (Haffner-Luntzer et al., 2016). Die Vergleichbarkeit ist daher eingeschränkt. Dennoch könnte die Studie von Yukata et al. (2018) Einblick in die Mechanismen geben, welche bei Gabe von Pantoprazol zu einer Beeinträchtigung der Frakturheilung

geführt haben könnten. So folgerten die Autoren, dass Teriparatid die Frakturheilung durch eine Störung der enchondralen Knochenformation verzögert, da die Knorpelfläche vergrößert und die Expression von *Col2a1* als Marker unreifer Chondrozyten erhöht war, während die Expression von *Col10a1* als Marker hypertropher Chondrozyten tendenziell – jedoch nicht signifikant – vermindert war. Die Autoren vermuteten, dass Teriparatid die Reifung von Chondrozyten ähnlich zu *PTH-related peptide* während der Osteogenese inhibiert.

Gegen eine maßgebliche Beeinträchtigung der Frakturheilung durch PPI-induzierte gastrale Hypoazidität spricht jedoch, dass die mittels Fixateur externe stabilisierte Frakturheilung bei jungen *Cckbr*-defizienten Mäusen nicht beeinträchtigt ist (Haffner-Luntzer et al., 2016). Allerdings kann bei einer globalen Genausschaltung von *Cckbr* nicht der Einfluss einer Hypergastrinämie überprüft werden (Aasarød et al., 2016). Aasarød et al. (2016) konnten wiederum zeigen, dass die einjährige Gabe eines CCK-B/Gastrinrezeptor-Antagonisten die Entwicklung des osteoporotischen Phänotyps von *Atp5b*-defizienten Mäusen teilweise verhindern kann. Die Autoren vermuteten daher, dass auch eine Hypergastrinämie einen katabolen Effekt auf den Knochenstoffwechsel haben könnte. Daher erscheint auch eine Beeinflussung der Frakturheilung in Folge einer Hypergastrinämie möglich.

Helgadóttir et al. (2019) konnten zeigen, dass die Gastrin-Serumkonzentration bereits nach einmaliger Gabe von 40 mg Esomeprazol ansteigt. Nach 5-tägiger Gabe dieser Dosis zeigte sich ein Anstieg der medianen Gastrin-Serumkonzentration um den Faktor 1,5 im Vergleich zum basalen Niveau (Helgadóttir et al., 2019). Das Ausmaß dieser Wirkung wurde vermutlich durch die Einnahme einer Mahlzeit nach 2 Stunden verstärkt. Allerdings stellten Pregun et al. (2011) auch einen Anstieg der nüchternen Gastrin-Serumkonzentration nach 10- und 28-tägiger Gabe üblicher Tagesdosen verschiedener PPI fest. Hierbei zeigte sich nach 28 Tagen eine um den Faktor 1,9 erhöhte Gastrin-Serumkonzentration im Vergleich zum basalen Niveau vor Initiierung der Therapie. Dementsprechend hat die Gabe von Pantoprazol vermutlich auch in der vorliegenden Studie zu einer Hypergastrinämie geführt.

Es wurde vorgeschlagen, dass eine PPI-induzierte Hypergastrinämie zu einer Stimulation der PTH-Sekretion führen könnte (Hyun et al., 2010; Vaezi et al., 2017). Ein solcher Mechanismus könnte die potentielle Stimulation der PTH-Sekretion weiter verstärkt haben. Bisher konnte gezeigt werden, dass eine 14-wöchige endogene Hypergastrinämie bei Ratten zu einer Hyperplasie der Nebenschilddrüsen führt (Grimelius et al., 1977). Bei Hühnern führt eine 3-wöchige exogen erzeugte Hypergastrinämie und auch die 5-wöchige Gabe von Omeprazol (138 mg/kg KG täglich) zu einer Hyperplasie und Hypertrophie der Nebenschilddrüsen sowie zu einer vermehrten Expression von prä-pro-PTH (Gagnemo-Persson et al., 1997). Zudem konnten Parthemore et al. (1978) zeigen, dass die PTH-Sekretion durch Gabe des CCK-B/Gastrinrezeptor-Agonisten Pentagastrin stimuliert werden kann. Coetzee et al. (1980) konnten hingegen keine solche Stimulation durch Pentagastrin feststellen. Ob Gastrin selbst die PTH-Sekretion stimuliert, wurde nach meiner Kenntnis bisher nicht untersucht. Auch



der zugrundeliegende Mechanismus ist unklar, da es bisher keine Beweise für die Expression von Gastrinrezeptoren in der Nebenschilddrüse gibt (Aasarød et al., 2016) und sich die Calcium-Serumkonzentration bei den genannten Studien nicht unterschied.

Es bleibt unklar, ob es tatsächlich zu hormonellen Veränderungen durch Gabe von Pantoprazol gekommen ist. Eine Stimulation der PTH-Sekretion erscheint prinzipiell plausibel. Die Effektstärke einer solchen Stimulation ist allerdings fraglich. Auch weil erst am Tag der Fraktur mit der Gabe von Pantoprazol begonnen wurde. Somit könnte das Ausmaß hormoneller Veränderungen insbesondere zu Beginn des Experiments sehr gering gewesen sein. Auch die Veränderungen der Osteoklastenpopulation im Verlauf des Untersuchungszeitraums lassen eine zeitlich inkonstante Wirkung von Pantoprazol auf den Frakturheilungsprozess vermuten. Diese Überlegungen werfen die Frage auf, ob die Frakturheilung bei bereits länger bestehender Applikation von PPI im selben Maße beeinträchtigt wird.

### 5.3 Schlussfolgerungen

Es konnte gezeigt werden, dass Pantoprazol die Frakturheilung bei alten Mäusen beeinträchtigt. Es zeigte sich sowohl eine Störung der Knochenformation als auch der Knochenresorption. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind weiterhin nicht abschließend geklärt. Da die Frakturheilung im Alter bereits beeinträchtigt ist und insbesondere ältere Patienten PPI einnehmen, könnte der Einfluss von PPI im Alter eine größere klinische Relevanz haben. Bei der Interpretation dieser Studie sollte allerdings beachtet werden, dass die Auswirkungen von PPI auf die menschliche Frakturheilung aufgrund der Limitationen des Tiermodells andersartig oder von geringer klinischer Relevanz sein könnten. Daher sollte eine indizierte PPI-Therapie nicht auf Grundlage dieser Studie abgesetzt werden. Auch wenn die Frakturheilung beim Menschen beeinträchtigt sein sollte, so könnten dennoch die Vorteile einer Therapiefortführung oder bei Patienten mit hohem Stressulkusrisiko sogar die Vorteile einer Therapieinitiierung überwiegen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Aasarød KM, Ramezanzadehkoldeh M, Shabestari M, Mosti MP, Stunes AK, Reseland JE, Beisvag V, Eriksen EF, Sandvik AK, Erben RG, Schüler C, Boyce M, Skallerud BH, Syversen U, Fossmark R (2016) Skeletal effects of a gastrin receptor antagonist in H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase beta subunit KO mice. *Journal of Endocrinology* 230:251-262
2. Ackert-Bicknell CL, Anderson LC, Sheehan S, Hill WG, Chang B, Churchill GA, Chesler EJ, Korstanje R, Peters LL (2015) Aging Research Using Mouse Models. *Current Protocols in Mouse Biology* 5:95-133
3. Al Subaie A, Emami E, Tamimi I, Laurenti M, Eimar H, Abdallah M-N, Tamimi F (2016) Systemic administration of omeprazole interferes with bone healing and implant osseointegration: an in vivo study on rat tibiae. *Journal of Clinical Periodontology* 43:193-203
4. Ambrose AF, Cruz L, Paul G (2015) Falls and Fractures: A systematic approach to screening and prevention. *Maturitas* 82:85-93
5. Apte RS, Chen DS, Ferrara N (2019) VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell* 176:1248-1264
6. Athanasopoulos AN, Schneider D, Keiper T, Alt V, Pendurthi UR, Liegibel UM, Sommer U, Nawroth PP, Kasperk C, Chavakis T (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* 282:26746-26753
7. Baek JM, Kwak SC, Kim J-Y, Ahn S-J, Jun HY, Yoon K-H, Lee MS, Oh J (2015) Evaluation of a novel technique for intraperitoneal injections in mice. *Lab Animal* 44:440-444
8. Bahney CS, Hu DP, Miclau T, Marcucio RS (2015) The Multifaceted Role of the Vasculature in Endochondral Fracture Repair. *Frontiers in Endocrinology* 6:4
9. Bahney CS, Zondervan RL, Allison P, Theologis A, Ashley JW, Ahn J, Miclau T, Marcucio RS, Hankenson KD (2019) Cellular biology of fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research* 37:35-50
10. Bahtiri E, Islami H, Hoxha R, Gashi A, Thaci K, Karakulak C, Thaci S, Qorraj Bytyqi H (2017) Proton pump inhibitor use for 12 months is not associated with changes in serum magnesium levels: a prospective open label comparative study. *Turk J Gastroenterol* 28:104-109
11. Battaglino R, Kim D, Fu J, Vaage B, Fu XY, Stashenko P (2002) c-myc is required for osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res* 17:763-773
12. Bavishi C, DuPont HL (2011) Systematic review: the use of proton pump inhibitors and increased susceptibility to enteric infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 34:1269-1281
13. Blanco R, Gerhardt H (2013) VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:a006569
14. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R (2010) Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research* 25:1468-1486
15. Buettmann EG, McKenzie JA, Migotsky N, Sykes DAW, Hu P, Yoneda S, Silva MJ (2019) VEGFA From Early Osteoblast Lineage Cells (Osterix+) Is Required in Mice for Fracture Healing. *Journal of Bone and Mineral Research* 34:1690-1706
16. Cheung KS, Leung WK (2019) Long-term use of proton-pump inhibitors and risk of gastric cancer: a review of the current evidence. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 12:1756284819834511
17. Chintala H, Krupska I, Yan L, Lau L, Grant M, Chaqour B (2015) The matricellular protein CCN1 controls retinal angiogenesis by targeting VEGF, Src homology 2 domain phosphatase-1 and Notch signaling. *Development* 142:2364
18. Cho T-J, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (2002) Differential Temporal Expression of Members of the Transforming Growth Factor  $\beta$  Superfamily During Murine Fracture Healing. *Journal of Bone and Mineral Research* 17:513-520
19. Choe KN, Moldovan G-L (2017) Forging Ahead through Darkness: PCNA, Still the Principal Conductor at the Replication Fork. *Molecular Cell* 65:380-392

20. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G (2016) Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiological Reviews* 96:365-408
21. Clark D, Nakamura M, Miclau T, Marcucio R (2017) Effects of Aging on Fracture Healing. *Current Osteoporosis Reports* 15:601-608
22. Clarkin CE, Gerstenfeld LC (2013) VEGF and bone cell signalling: an essential vessel for communication? *Cell Biochemistry and Function* 31:1-11
23. Coetzee J, Klaff LJ, Epstein S (1980) Measurement of human serum parathyroid hormone in disorders of calcium metabolism and during administration of certain gut hormones. *S Afr Med J* 57:165-170
24. Corley DA, Kubo A, Zhao W, Quesenberry C (2010) Proton Pump Inhibitors and Histamine-2 Receptor Antagonists Are Associated With Hip Fractures Among At-Risk Patients. *Gastroenterology* 139:93-101
25. Costa-Rodrigues J, Reis S, Teixeira S, Lopes S, Fernandes MH (2013) Dose-dependent inhibitory effects of proton pump inhibitors on human osteoclastic and osteoblastic cell activity. *The FEBS Journal* 280:5052-5064
26. Crockett JC, Schütze N, Tosh D, Jatzke S, Duthie A, Jakob F, Rogers MJ (2007) The Matricellular Protein CYR61 Inhibits Osteoclastogenesis by a Mechanism Independent of  $\alpha\beta 3$  and  $\alpha\beta 5$ . *Endocrinology* 148:5761-5768
27. Demetrius L (2006) Aging in Mouse and Human Systems. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1067:66-82
28. Deutzmann R, Bruckner P (2014). Knorpel- und Knochengewebe. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L (eds) *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 952-960
29. Deutzmann R (2016). Hormone. In: Rassow J, Hauser K, Deutzmann R, Netzker R (eds) *Duale Reihe Biochemie*. 4. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 582-648
30. Ding Z-c, Lin Y-k, Gan Y-k, Tang T-t (2018) Molecular pathogenesis of fracture nonunion. *Journal of Orthopaedic Translation* 14:45-56
31. Donovan J, Brown P (2005) Parenteral Injections. *Current Protocols in Neuroscience* 33:A.4F.1-A.4F.9
32. Drude S, Geißler A, Olfe J, Starke A, Domanska G, Schuett C, Kiank-Nussbaum C (2011) Side effects of control treatment can conceal experimental data when studying stress responses to injection and psychological stress in mice. *Lab Animal* 40:119-128
33. Eckstein F, Paulsen F, Tillmann BN (2010). Organe des Bewegungsapparates. In: Zilles K, Tillman BN (eds) *Anatomie*. Springer, Heidelberg, pp 75-307
34. Ensrud KE (2013) Epidemiology of Fracture Risk With Advancing Age. *The Journals of Gerontology: Series A* 68:1236-1242
35. Fischer V, Haffner-Luntzer M, Prystaz K, vom Scheidt A, Busse B, Schinke T, Amling M, Ignatius A (2017) Calcium and vitamin-D deficiency marginally impairs fracture healing but aggravates posttraumatic bone loss in osteoporotic mice. *Scientific Reports* 7:7223
36. Fischer V, Haffner-Luntzer M, Amling M, Ignatius A (2018) Calcium and vitamin D in bone fracture healing and post-traumatic bone turnover. *Eur Cell Mater* 35:365-385
37. Flurkey K, M. Curren J, Harrison DE (2007). Chapter 20 - Mouse Models in Aging Research. In: Fox JG, Davisson MT, Quimby FW, Barthold SW, Newcomer CE, Smith AL (eds) *The Mouse in Biomedical Research (Second Edition)*. Academic Press, Burlington, pp 637-672
38. Fossmark R, Stunes AK, Petzold C, Waldum HL, Rubert M, Lian A-M, Reseland JE, Syversen U (2012) Decreased bone mineral density and reduced bone quality in H+/K+ATPase beta-subunit deficient mice. *Journal of Cellular Biochemistry* 113:141-147
39. Foulke BA, Kendal AR, Murray DW, Pandit H (2016) Fracture healing in the elderly: A review. *Maturitas* 92:49-55
40. Freedberg DE, Kim LS, Yang Y-X (2017) The Risks and Benefits of Long-term Use of Proton Pump Inhibitors: Expert Review and Best Practice Advice From the American Gastroenterological Association. *Gastroenterology* 152:706-715
41. Frey SP, Doht S, Eden L, Dannigkeit S, Schuetze N, Meffert RH, Jansen H (2012) Cysteine-rich matricellular protein improves callus regenerate in a rabbit trauma model. *International Orthopaedics* 36:2387-2393

42. Gagnemo-Persson R, Samuelsson A, Håkanson R, Persson P (1997) Chicken Parathyroid Hormone Gene Expression in Response to Gastrin, Omeprazole, Ergocalciferol, and Restricted Food Intake. *Calcified Tissue International* 61:210-215
43. García de Vinuesa A, Abdelilah-Seyfried S, Knaus P, Zwijsen A, Bailly S (2016) BMP signaling in vascular biology and dysfunction. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 27:65-79
44. Garcia P, Pieruschka A, Klein M, Tami A, Histing T, Holstein JH, Scheuer C, Pohlemann T, Menger MD (2012) Temporal and Spatial Vascularization Patterns of Unions and Nonunions: Role of Vascular Endothelial Growth Factor and Bone Morphogenetic Proteins. *JBJS* 94:49-58
45. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA (2003) Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of Cellular Biochemistry* 88:873-884
46. Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA (2005) Application of Histomorphometric Methods to the Study of Bone Repair. *Journal of Bone and Mineral Research* 20:1715-1722
47. Gerstenfeld LC, Sacks DJ, Pelis M, Mason ZD, Graves DT, Barrero M, Ominsky MS, Kostenuik PJ, Morgan EF, Einhorn TA (2009) Comparison of Effects of the Bisphosphonate Alendronate Versus the RANKL Inhibitor Denosumab on Murine Fracture Healing. *Journal of Bone and Mineral Research* 24:196-208
48. Goldberg VM, Powell A, Shaffer JW, Zika J, Bos GD, Heiple KG (1985) Bone grafting: role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res* 3:389-404
49. Gomes PS, Fernandes MH (2011) Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Laboratory Animals* 45:14-24
50. Graefe KH (2016). *Gastrointestinales System*. In: Graefe KH, Lutz W, Bönisch H (eds) *Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie*. 2., vollständig überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 544-567
51. Grimelius L, Johansson H, Lundqvist G, Olazabal A, Polak JH, Pearse AGE (1977) The Parathyroid Glands in Experimentally Induced Hypergastrinemia in the Rat. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 12:739-744
52. Gruber R, Koch H, Doll BA, Tegtmeier F, Einhorn TA, Hollinger JO (2006) Fracture healing in the elderly patient. *Experimental Gerontology* 41:1080-1093
53. Gunderson ZJ, Campbell ZR, McKinley TO, Natoli RM, Kacena MA (2020) A comprehensive review of mouse diaphyseal femur fracture models. *Injury* 51:1439-1447
54. Haastrup PF, Thompson W, Søndergaard J, Jarbøl DE (2018) Side Effects of Long-Term Proton Pump Inhibitor Use: A Review. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 123:114-121
55. Hadjiargyrou M, Ahrens W, Rubin CT (2000) Temporal Expression of the Chondrogenic and Angiogenic Growth Factor CYR61 During Fracture Repair. *Journal of Bone and Mineral Research* 15:1014-1023
56. Haffner-Luntzer M, Heilmann A, Heidler V, Liedert A, Schinke T, Amling M, Yorgan TA, vom Scheidt A, Ignatius A (2016) Hypochlorhydria-induced calcium malabsorption does not affect fracture healing but increases post-traumatic bone loss in the intact skeleton. *Journal of Orthopaedic Research* 34:1914-1921
57. Haffner-Luntzer M, Weber B, Lam C, Fischer V, Lackner I, Ignatius A, Kalbitz M, Marcucio RS, Miclau T (2020) A novel mouse model to study fracture healing of the proximal femur. *Journal of Orthopaedic Research* 1-8 (online ahead of print; doi: 10.1002/jor.24677)
58. Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, Marsh JL, Tilp S, Schnettler R, Simpson H, Alt V (2014) Delayed union and nonunions: Epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury* 45:S3-S7
59. Hálfðánarson ÓÖ, Pottegård A, Björnsson ES, Lund SH, Ogmundsdóttir MH, Steingrímsson E, Ogmundsdóttir HM, Zoega H (2018) Proton-pump inhibitors among adults: a nationwide drug-utilization study. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 11:1756284818777943
60. Hansen KE, Nieves JW, Nudurupati S, Metz DC, Perez MC (2019) Dexlansoprazole and Esomeprazole Do Not Affect Bone Homeostasis in Healthy Postmenopausal Women. *Gastroenterology* 156:926-934
61. Hartree EF (1972) Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry* 48:422-427

62. Harwood PJ, Newman JB, Michael ALR (2010) (ii) An update on fracture healing and non-union. *Orthopaedics and Trauma* 24:9-23
63. Helgadóttir H, Björnsson ES (2019) Problems Associated with Deprescribing of Proton Pump Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences* 20:5469
64. Helgadóttir H, Lund SH, Björnsson ES, Gizurarson SS, Waldum H (2019) Serum Concentration and Pharmacokinetics of Single and Repeated Oral Doses of Esomeprazole and Gastrin Elevation in Healthy Males and Females. *Gastroenterology* 156:S-308
65. Helgadóttir H, Lund SH, Gizurarson S, Metz DC, Björnsson ES (2020) Predictors of Gastrin Elevation Following Proton Pump Inhibitor Therapy. *Journal of Clinical Gastroenterology* 54:227-234
66. Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke MW, Wehner T, Bindl R, Recknagel S, Stuermer EK, Vollmar B, Wildemann B, Lienau J, Willie B, Peters A, Ignatius A, Pohlemann T, Claes L, Menger MD (2011) Small animal bone healing models: Standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 49:591-599
67. Histing T, Stenger D, Scheuer C, Metzger W, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2012) Pantoprazole, a Proton Pump Inhibitor, Delays Fracture Healing in Mice. *Calcified Tissue International* 90:507-514
68. Histing T, Heerschop K, Klein M, Scheuer C, Stenger D, Herath SC, Pohlemann T, Menger MD (2016a) Effect of Stabilization on the Healing Process of Femur Fractures in Aged Mice. *Journal of Investigative Surgery* 29:202-208
69. Histing T, Heerschop K, Klein M, Scheuer C, Stenger D, Holstein JH, Pohlemann T, Menger MD (2016b) Characterization of the healing process in non-stabilized and stabilized femur fractures in mice. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 136:203-211
70. Histing T, Bremer P, Rollmann MF, Herath S, Klein M, Pohlemann T, Menger MD, Fritz T (2018) A Minimally Invasive Model to Analyze Endochondral Fracture Healing in Mice Under Standardized Biomechanical Conditions. *J Vis Exp*:e57255
71. Holstein JH, Klein M, Garcia P, Histing T, Culemann U, Pizanis A, Laschke MW, Scheuer C, Meier C, Schorr H, Pohlemann T, Menger MD (2008) Rapamycin affects early fracture healing in mice. *British Journal of Pharmacology* 154:1055-1062
72. Holstein JH, Garcia P, Histing T, Kristen A, Scheuer C, Menger MD, Pohlemann T (2009) Advances in the Establishment of Defined Mouse Models for the Study of Fracture Healing and Bone Regeneration. *Journal of Orthopaedic Trauma* 23:S31-S38
73. Holzer P (2017). *Pharmakotherapie gastrointestinaler Erkrankungen*. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (eds) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 12. Auflage. Elsevier, München, pp 489-517
74. Homburger F, Russfield AB, Weisburger JH, Lim S, Chak SP, Weisburger EK (1975) Aging Changes in CD-1 HaM/ICR Mice Reared Under Standard Laboratory Conditions. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 55:37-45
75. Horst RL, Deluca HF, Jorgensen NA (1978) The effect of age on calcium absorption and accumulation of 1,25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in intestinal mucosa of rats. *Metabolic Bone Disease and Related Research* 1:29-33
76. Hu DP, Ferro F, Yang F, Taylor AJ, Chang W, Miclau T, Marcucio RS, Bahney CS (2017) Cartilage to bone transformation during fracture healing is coordinated by the invading vasculature and induction of the core pluripotency genes. *Development* 144:221-234
77. Huntley R, Jensen E, Gopalakrishnan R, Mansky KC (2019) Bone morphogenetic proteins: Their role in regulating osteoclast differentiation. *Bone Reports* 10:100207
78. Hyun JJ, Chun HJ, Keum B, Seo YS, Kim YS, Jeon YT, Lee HS, Um SH, Kim CD, Ryu HS, Kim SG, Jung WW (2010) Effect of omeprazole on the expression of transcription factors in osteoclasts and osteoblasts. *Int J Mol Med* 26:877-883
79. Ikebuchi Y, Aoki S, Honma M, Hayashi M, Sugamori Y, Khan M, Kariya Y, Kato G, Tabata Y, Penninger JM, Udagawa N, Aoki K, Suzuki H (2018) Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling. *Nature* 561:195-200
80. Jagodzinski M, Krettek C (2007) Effect of mechanical stability on fracture healing - an update. *Injury* 38:S3-S10
81. Joo MK, Park JJ, Lee BJ, Kim JH, Yeon JE, Kim JS, Byun KS, Bak YT (2013) The effect of a proton pump inhibitor on bone metabolism in ovariectomized rats. *Mol Med Rep* 7:1267-1272

82. Khalili H, Huang ES, Jacobson BC, Camargo CA, Feskanich D, Chan AT (2012) Use of proton pump inhibitors and risk of hip fracture in relation to dietary and lifestyle factors: a prospective cohort study. *BMJ* 344:e372
83. Khosla S, Monroe DG (2018) Regulation of Bone Metabolism by Sex Steroids. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 8:a031211
84. Kim B-J, Koh J-M (2019) Coupling factors involved in preserving bone balance. *Cellular and Molecular Life Sciences* 76:1243-1253
85. Kim K-H, Won JH, Cheng N, Lau LF (2018) The matricellular protein CCN1 in tissue injury repair. *Journal of Cell Communication and Signaling* 12:273-279
86. Knecht B, Lohmüller J, Telschow C (2019). Ergänzende statistische Übersicht. In: Schwabe U, Paffrath D, Ludwig W-D, Klauber J (eds) *Arzneiverordnungs-Report 2019*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 1037-1102
87. Komatsu DE, Hadjiargyrou M (2004) Activation of the transcription factor HIF-1 and its target genes, VEGF, HO-1, iNOS, during fracture repair. *Bone* 34:680-688
88. Kon T, Cho T-J, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (2001) Expression of Osteoprotegerin, Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (Osteoprotegerin Ligand) and Related Proinflammatory Cytokines During Fracture Healing. *Journal of Bone and Mineral Research* 16:1004-1014
89. Langhans N, Rindi G, Chiu M, Rehfeld JF, Ardman B, Beinborn M, Kopin AS (1997) Abnormal gastric histology and decreased acid production in cholecystokinin-B/gastrin receptor-deficient mice. *Gastroenterology* 112:280-286
90. Lienau J, Schell H, Epari DR, Schütze N, Jakob F, Duda GN, Bail HJ (2006) CYR61 (CCN1) Protein Expression during Fracture Healing in an Ovine Tibial Model and Its Relation to the Mechanical Fixation Stability. *Journal of Orthopaedic Research* 24:254-262
91. Liu W, Kang N, Seriwatanachai D, Dong Y, Zhou L, Lin Y, Ye L, Liang X, Yuan Q (2016) Chronic Kidney Disease Impairs Bone Defect Healing in Rats. *Scientific Reports* 6:23041
92. Liu YZ, Akhter MP, Gao X, Wang XY, Wang XB, Zhao G, Wei X, Wu HJ, Chen H, Wang D, Cui L (2018) Glucocorticoid-induced delayed fracture healing and impaired bone biomechanical properties in mice. *Clinical Interventions in Aging* 13:1465-1474
93. Lohse AW, Mössner J (2019). Magen-Darm-Mittel und Lebertherapeutika. In: Schwabe U, Paffrath D, Ludwig W-D, Klauber J (eds) *Arzneiverordnungs-Report 2019*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 761-788
94. Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin T-h, Yao Z, Goodman SB (2016) Inflammation, fracture and bone repair. *Bone* 86:119-130
95. Lopas LA, Belkin NS, Mutyaba PL, Gray CF, Hankenson KD, Ahn J (2014) Fractures in Geriatric Mice Show Decreased Callus Expansion and Bone Volume. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 472:3523–3532
96. Lorenzo J (2017) The many ways of osteoclast activation. *The Journal of Clinical Investigation* 127:2530-2532
97. Lowery JW, Rosen V (2018) Bone Morphogenetic Protein–Based Therapeutic Approaches. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10:a022327
98. Lu C, Miclau T, Hu D, Hansen E, Tsui K, Puttlitz C, Marcucio RS (2005) Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *Journal of Orthopaedic Research* 23:1300-1307
99. Lu C, Miclau T, Hu D, Marcucio RS (2007) Ischemia leads to delayed union during fracture healing: A mouse model. *Journal of Orthopaedic Research* 25:51-61
100. Lu C, Hansen E, Sapozhnikova A, Hu D, Miclau T, Marcucio RS (2008) Effect of age on vascularization during fracture repair. *Journal of Orthopaedic Research* 26:1384-1389
101. Lukač N, Katavić V, Novak S, Šučur A, Filipović M, Kalajzić I, Grčević D, Kovačić N (2020) What do we know about bone morphogenetic proteins and osteochondroprogenitors in inflammatory conditions? *Bone* 137:115403
102. Lukas G, Brindle SD, Greengard P (1971) The route of absorption of intraperitoneally administered compounds. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 178:562-564
103. Lüllmann H, Mohr K, Wehling M, Hein L (2016) *Pharmakologie und Toxikologie*, 18., vollständig überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

104. Lüllmann-Rauch R, Asan E (2019) Taschenlehrbuch Histologie, 6., vollständig überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
105. Lundell L, Vieth M, Gibson F, Nagy P, Kahrilas PJ (2015) Systematic review: the effects of long-term proton pump inhibitor use on serum gastrin levels and gastric histology. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 42:649-663
106. Mack JJ, Iruela-Arispe ML (2018) NOTCH regulation of the endothelial cell phenotype. *Current Opinion in Hematology* 25:212-218
107. Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, Carmeliet G, Kronenberg HM (2010) Osteoblast Precursors, but Not Mature Osteoblasts, Move into Developing and Fractured Bones along with Invading Blood Vessels. *Developmental Cell* 19:329-344
108. Maita K, Hirano M, Harada T, Mitsumori K, Yoshida A, Takahashi K, Nakashima N, Kitazawa T, Enomoto A, Inui K, Shirasu Y (1988) Mortality, Major Cause of Moribundity, and Spontaneous Tumors in CD-1 Mice. *Toxicologic Pathology* 16:340-349
109. Manigrasso MB, O'Connor JP (2004) Characterization of a Closed Femur Fracture Model in Mice. *Journal of Orthopaedic Trauma* 18:687-695
110. Marsell R, Einhorn TA (2009) The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. *Injury* 40:S4-S7
111. Marsell R, Einhorn TA (2011) The biology of fracture healing. *Injury* 42:551-555
112. Mascha EJ, Vetter TR (2018) Significance, Errors, Power, and Sample Size: The Blocking and Tackling of Statistics. *Anesthesia & Analgesia* 126:691-698
113. Mattsson JP, Vaananen K, Wallmark B, Lorentzon P (1991) Omeprazole and bafilomycin, two proton pump inhibitors: differentiation of their effects on gastric, kidney and bone H(+)-translocating ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1065:261-268
114. McColl KEL, Gillen D (2009) Evidence That Proton-Pump Inhibitor Therapy Induces the Symptoms it Is Used to Treat. *Gastroenterology* 137:20-22
115. McHugh D, Gil J (2017) Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *Journal of Cell Biology* 217:65-77
116. Mehta M, Strube P, Peters A, Perka C, Hutmacher D, Fratzl P, Duda GN (2010) Influences of age and mechanical stability on volume, microstructure, and mineralization of the fracture callus during bone healing: Is osteoclast activity the key to age-related impaired healing? *Bone* 47:219-228
117. Meyer RA, Jr., Meyer MH, Tenholder M, Wondracek S, Wasserman R, Garges P (2003) Gene Expression in Older Rats with Delayed Union of Femoral Fractures. *JBJS* 85:1243-1254
118. Meyer RAJ, Tsahakis PJ, Martin DF, Banks DM, Harrow ME, Kiebzak GM (2001) Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *Journal of Orthopaedic Research* 19:428-435
119. Mills LA, Aitken SA, Simpson AHRW (2017) The risk of non-union per fracture: current myths and revised figures from a population of over 4 million adults. *Acta Orthopaedica* 88:434-439
120. Mizunashi K, Furukawa Y, Katano K, Abe K (1993) Effect of omeprazole, an inhibitor of H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, on bone resorption in humans. *Calcified Tissue International* 53:21-25
121. Mouillessieux KP, Wiley DS, Saunders LM, Wylie LA, Kushner EJ, Chong DC, Citrin KM, Barber AT, Park Y, Kim J-D, Samsa LA, Kim J, Liu J, Jin S-W, Bautch VL (2016) Notch regulates BMP responsiveness and lateral branching in vessel networks via SMAD6. *Nature Communications* 7:13247
122. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Menzel S, Ruth P (2013) Mutschler Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie, 10., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
123. Nair AB, Jacob S (2016) A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy* 7:27-31
124. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Penninger JM, Takayanagi H (2011) Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nature Medicine* 17:1231-1234
125. Naot D, Musson DS, Cornish J (2018) The Activity of Peptides of the Calcitonin Family in Bone. *Physiological Reviews* 99:781-805

126. Navarro A, Gomez C, López-Cepero JM, Boveris A (2004) Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 286:R505-R511
127. Nehra AK, Alexander JA, Loftus CG, Nehra V (2018) Proton Pump Inhibitors: Review of Emerging Concerns. *Mayo Clinic Proceedings* 93:240-246
128. Niethard FU, Pfeil J, Biberthaler P (2017) *Duale Reihe Orthopädie und Unfallchirurgie*, 8., unveränderte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
129. Nunamaker DM (1998) Experimental Models of Fracture Repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 355:56-65
130. O'Loughlin PF, Morr S, Bogunovic L, Kim AD, Park B, Lane JM (2008) Selection and Development of Preclinical Models in Fracture-Healing Research. *JBJS* 90:S79-S84
131. O'Neill KR, Stutz CM, Mignemi NA, Burns MC, Murry MR, Nyman JS, Schoenecker JG (2012) Micro-computed tomography assessment of the progression of fracture healing in mice. *Bone* 50:1357-1367
132. O'Connell MB, Madden DM, Murray AM, Heaney RP, Kerzner LJ (2005) Effects of proton pump inhibitors on calcium carbonate absorption in women: A randomized crossover trial. *The American Journal of Medicine* 118:778-781
133. Ode A, Duda GN, Geissler S, Pauly S, Ode J-E, Perka C, Strube P (2014) Interaction of Age and Mechanical Stability on Bone Defect Healing: An Early Transcriptional Analysis of Fracture Hematoma in Rat. *PLOS ONE* 9:e106462
134. Offermanns S (2016). *Pharmaka mit Wirkung auf die Magenfunktion*. In: Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S (eds) *Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 529-542
135. Orth M, Baudach J, Scheuer C, Osche D, Veith NT, Braun BJ, Rollmann MF, Herath SC, Pohlemann T, Menger MD, Histing T (2019) Erythropoietin does not improve fracture healing in aged mice. *Experimental Gerontology* 122:1-9
136. Ota N, Takaishi H, Kosaki N, Takito J, Yoda M, Tohmonda T, Kimura T, Okada Y, Yasuda H, Kawaguchi H, Matsumoto M, Chiba K, Ikegami H, Toyama Y (2009) Accelerated Cartilage Resorption by Chondroclasts during Bone Fracture Healing in Osteoprotegerin-Deficient Mice. *Endocrinology* 150:4823-4834
137. Park JH, Lee NK, Lee SY (2017) Current Understanding of RANK Signaling in Osteoclast Differentiation and Maturation. *Mol Cells* 40:706-713
138. Parthemore JG, Roos BA, Parker DC, Kripke DF, Avioli LV, Deftos LJ (1978) Assessment of Acute and Chronic Changes in Parathyroid Hormone Secretion by a Radioimmunoassay with Predominant Specificity for the Carboxy-Terminal Region of the Molecule. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 47:284-289
139. Peng H, Wright V, Usas A, Gearhart B, Shen H-C, Cummins J, Huard J (2002) Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *The Journal of Clinical Investigation* 110:751-759
140. Peng H, Usas A, Olshanski A, Ho AM, Gearhart B, Cooper GM, Huard J (2005) VEGF Improves, Whereas sFlt1 Inhibits, BMP2-Induced Bone Formation and Bone Healing Through Modulation of Angiogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research* 20:2017-2027
141. Peric M, Dumic-Cule I, Grcevic D, Matijasic M, Verbanac D, Paul R, Grgurevic L, Trkulja V, Bagi CM, Vukicevic S (2015) The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies. *Bone* 70:73-86
142. Pottegård A, Broe A, Hallas J, de Muckadell OBS, Lassen AT, Lødrup AB (2016) Use of proton-pump inhibitors among adults: a Danish nationwide drug utilization study. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 9:671-678
143. Pountos I, Georgouli T, Pneumaticos S, Giannoudis PV (2013) Fracture non-union: Can biomarkers predict outcome? *Injury* 44:1725-1732
144. Prause M, Seeliger C, Unger M, van Griensven M, Haug AT (2014) Pantoprazole Increases Cell Viability and Function of Primary Human Osteoblasts in vitro. *Injury* 45:1156-1164
145. Prause M, Seeliger C, Unger M, Rosado Balmayor E, van Griensven M, Haug AT (2015) Pantoprazole Decreases Cell Viability and Function of Human Osteoclasts in Vitro. *Mediators of Inflammation* 2015:413097



146. Pregun I, Herszényi L, Juhász M, Miheller P, Hritz I, Patócs A, Rácz K, Tulassay Z (2011) Effect of Proton-Pump Inhibitor Therapy on Serum Chromogranin A Level. *Digestion* 84:22-28
147. Prisby RD, Ramsey MW, Behnke BJ, Dominguez Ii JM, Donato AJ, Allen MR, Delp MD (2007) Aging Reduces Skeletal Blood Flow, Endothelium-Dependent Vasodilation, and NO Bioavailability in Rats. *Journal of Bone and Mineral Research* 22:1280-1288
148. Pufe T (2017). Binde- und Stützgewebe. In: Wennemuth G (ed) *Taschenbuch Histologie*. 2. Auflage. Elsevier, München, pp 58-91
149. Raschke MJ, Haas NP (2012). Unfallchirurgie. In: Siewert JR, Stein HJ (eds) *Chirurgie: mit integriertem Fallquiz*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 865-999
150. Reahl GB, Gerstenfeld L, Kain M (2020) Epidemiology, Clinical Assessments, and Current Treatments of Nonunions. *Current Osteoporosis Reports* 18:157-168
151. Robling AG, Bonewald LF (2020) The Osteocyte: New Insights. *Annual Review of Physiology* 82:485-506
152. Rupp M, Merboth F, Daghma DE, Biehl C, El Khassawna T, Heiss C (2019) Osteocytes. *Z Orthop Unfall* 157:154-163
153. Salazar VS, Gamer LW, Rosen V (2016) BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nature Reviews Endocrinology* 12:203-221
154. Sarahrudi K, Thomas A, Braunsteiner T, Wolf H, Vécsei V, Aharinejad S (2009) VEGF serum concentrations in patients with long bone fractures: A comparison between impaired and normal fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research* 27:1293-1297
155. Sartawi Z, Schipani E, Ryan KB, Waeber C (2017) Sphingosine 1-phosphate (S1P) signalling: Role in bone biology and potential therapeutic target for bone repair. *Pharmacological Research* 125:232-245
156. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG (2008) Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19:459-466
157. Schinke T, Schilling AF, Baranowsky A, Seitz S, Marshall RP, Linn T, Blaeker M, Huebner AK, Schulz A, Simon R, Gebauer M, Priemel M, Kornak U, Perkovic S, Barvencik F, Beil FT, Fattore AD, Frattini A, Streichert T, Pueschel K, Villa A, Debatin K-M, Rueger JM, Teti A, Zustin J, Sauter G, Amling M (2009) Impaired gastric acidification negatively affects calcium homeostasis and bone mass. *Nature Medicine* 15:674-681
158. Schmidt W (2017). Bewegungssystem – Grundlagen. In: Aumüller G, Aust G, Conrad A, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D, Salvetter J, *et al.* (eds) *Duale Reihe Anatomie*. 4., aktualisierte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 221-242
159. Schütze N, Kunzi-Rapp K, Wagemanns R, Nöth U, Jatzke S, Jakob F (2005) Expression, purification, and functional testing of recombinant CYR61/CCN1. *Protein Expression and Purification* 42:219-225
160. Schwab A, Oberleithner H (2019). Salz- und Wasserhaushalt. In: Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S (eds) *Physiologie*. 9., vollständig überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 443-475
161. Sharara AI, El-Halabi MM, Ghaith OA, Habib RH, Mansour NM, Malli A, El Hajj-Fuleihan G (2013) Proton pump inhibitors have no measurable effect on calcium and bone metabolism in healthy young males: A prospective matched controlled study. *Metabolism - Clinical and Experimental* 62:518-526
162. Sheraly AR, Lickorish D, Sarraf F, Davies JE (2009) Use of gastrointestinal proton pump inhibitors to regulate osteoclast-mediated resorption of calcium phosphate cements in vivo. *Curr Drug Deliv* 6:192-198
163. Si W, Kang Q, Luu HH, Park JK, Luo Q, Song W-X, Jiang W, Luo X, Li X, Yin H, Montag AG, Haydon RC, He T-C (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* 26:2955
164. Silva BC, Costa AG, Cusano NE, Kousteni S, Bilezikian JP (2011) Catabolic and anabolic actions of parathyroid hormone on the skeleton. *Journal of Endocrinological Investigation* 34:801-810

165. Sonn KA, Wallace SJ, Yuan FNF, Schneider AD, Hsu EL, Havey RM, Patwardhan AG, Callaci JJ (2019) The Effect of Proton Pump Inhibitors on Bone Formation in a Rat Spinal Arthrodesis Model. *Spine* 44:E815–E822
166. Spanel-Borowski K, Mayerhofer A (2017). Zytologie und Histologie – Grundlagen. In: Aumüller G, Aust G, Conrad A, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D, Salvetter J, *et al.* (eds) *Duale Reihe Anatomie*. 4., aktualisierte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 49-101
167. Steiner M, Volkheimer D, Meyers N, Wehner T, Wilke H-J, Claes L, Ignatius A (2015) Comparison between Different Methods for Biomechanical Assessment of Ex Vivo Fracture Callus Stiffness in Small Animal Bone Healing Studies. *PLOS ONE* 10:e0119603
168. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RAD, Filvaroff EH (2002) Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:9656
169. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, Einhorn T, Tabin CJ, Rosen V (2006) BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nature Genetics* 38:1424-1429
170. Turner CH, Burr DB (1993) Basic biomechanical measurements of bone: A tutorial. *Bone* 14:595-608
171. Tuukkanen J, Väänänen HK (1986) Omeprazole, a specific inhibitor of H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, inhibits bone resorption in vitro. *Calcified Tissue International* 38:123-125
172. Vaezi MF, Yang Y-X, Howden CW (2017) Complications of Proton Pump Inhibitor Therapy. *Gastroenterology* 153:35-48
173. Vanhooren V, Libert C (2013) The mouse as a model organism in aging research: Usefulness, pitfalls and possibilities. *Ageing Research Reviews* 12:8-21
174. Vegger JB, Brüel A, Thomsen JS (2017) Pantoprazole, a proton pump inhibitor, does not prevent botulinum toxin induced disuse osteopenia in mice. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 17:162-175
175. Wang S-C (2014) PCNA: a silent housekeeper or a potential therapeutic target? *Trends in Pharmacological Sciences* 35:178-186
176. Waters RV, Gamradt SC, Asnis P, Vickery BH, Avnur Z, Hill E, Bostrom M (2000) Systemic corticosteroids inhibit bone healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 71:316-321
177. Wein MN (2018) Parathyroid Hormone Signaling in Osteocytes. *JBMR Plus* 2:22-30
178. Wein MN, Kronenberg HM (2018) Regulation of Bone Remodeling by Parathyroid Hormone. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 8:a031237
179. Weiss S, Zimmermann G, Pufe T, Varoga D, Henle P (2009) The systemic angiogenic response during bone healing. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 129:989-997
180. Welsch U, Kummer W (2018a). Bindegewebe. In: Welsch U, Kummer W (eds) *Histologie - Das Lehrbuch*. 5. Auflage. Elsevier, München, pp 115-151
181. Welsch U, Kummer W (2018b). Blutzellen. In: Welsch U, Kummer W (eds) *Histologie - Das Lehrbuch*. 5. Auflage. Elsevier, München, pp 219-243
182. Wong M, Kireeva ML, Kolesnikova TV, Lau LF (1997) Cyr61, Product of a Growth Factor-Inducible Immediate-Early Gene, Regulates Chondrogenesis in Mouse Limb Bud Mesenchymal Cells. *Developmental Biology* 192:492-508
183. Wood RJ, Fleet JC, Cashman K, Bruns ME, Deluca HF (1998) Intestinal Calcium Absorption in the Aged Rat: Evidence of Intestinal Resistance to 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D. *Endocrinology* 139:3843-3848
184. Xiong J, Piemontese M, Onal M, Campbell J, Goellner JJ, Dusevich V, Bonewald L, Manolagas SC, O'Brien CA (2015) Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone. *PLOS ONE* 10:e0138189
185. Yukata K, Kanchiku T, Egawa H, Nakamura M, Nishida N, Hashimoto T, Ogasa H, Taguchi T, Yasui N (2018) Continuous infusion of PTH1–34 delayed fracture healing in mice. *Scientific Reports* 8:13175
186. Zaidi M (1990) Modularity of osteoclast behaviour and “mode-specific” inhibition of osteoclast function. *Bioscience Reports* 10:547-556

187. Zhang Y, Sheu T-j, Hoak D, Shen J, Hilton MJ, Zuscik MJ, Jonason JH, O'Keefe RJ (2016) CCN1 Regulates Chondrocyte Maturation and Cartilage Development. *Journal of Bone and Mineral Research* 31:549-559
188. Zhao G, Huang B-L, Rigueur D, Wang W, Bhoot C, Charles KR, Baek J, Mohan S, Jiang J, Lyons KM (2018) CYR61/CCN1 Regulates Sclerostin Levels and Bone Maintenance. *Journal of Bone and Mineral Research* 33:1076-1089
189. Zhou B, Huang Y, Li H, Sun W, Liu J (2016) Proton-pump inhibitors and risk of fractures: an update meta-analysis. *Osteoporosis International* 27:339-347
190. Zhou X, von der Mark K, Henry S, Norton W, Adams H, de Crombrughe B (2014) Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice. *PLoS Genetics* 10:e1004820-e1004820
191. Zioupos P, Kirchner HOK, Peterlik H (2020) Ageing bone fractures: The case of a ductile to brittle transition that shifts with age. *Bone* 131:115176
192. Zura R, Xiong Z, Einhorn T, Watson JT, Ostrum RF, Prayson MJ, Della Rocca GJ, Mehta S, McKinley T, Wang Z, Steen RG (2016) Epidemiology of Fracture Nonunion in 18 Human Bones. *JAMA Surgery* 151:e162775-e162775

## 7 Publikationen

### 7.1 Publikationen

1. Menger MM\*, **Bremer P\***, Scheuer C, Rollmann MF, Braun BJ, Herath S, Orth M, Später T, Pohlemann T, Menger MD, Histing T (2020). Pantoprazole impairs fracture healing in aged mice. Zur Veröffentlichung eingereicht bei Scientific Reports.
2. Histing T, **Bremer P**, Rollmann MF, Herath S, Klein M, Pohlemann T, Menger MD, Fritz T (2018). A minimally invasive model to analyze endochondral fracture healing in mice under standardized biomechanical conditions. Journal of Visualized Experiments e57255.

\*geteilte Erstautorenschaft

### 7.2 Kongressbeiträge

1. **Bremer P**, Stenger D, Osche D, Rollmann MF, Pohlemann T, Menger MD, Histing T. Pantoprazol beeinträchtigt die Frakturheilung bei alten Mäusen. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, Berlin, 2018.
2. Osche D, Stenger D, Stutz J, **Bremer P**, Rollmann MF, Pohlemann T, Menger MD, Histing T. Der Einfluss von EPO auf die Frakturheilung im murinen Ischämiemodell. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, Berlin, 2018.
3. Stutz J, Stenger D, Osche D, **Bremer P**, Rollmann MF, Pohlemann T, Menger MD, Histing T. Der Einfluss von Cilostazol auf die Frakturheilung unter Ischämiebedingungen. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, Berlin, 2018.

## **8 Dank**

Meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Tina Histing gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, die hervorragende Betreuung in allen Phasen des Dissertationsvorhabens sowie die darüber hinausgehende Förderung und Unterstützung.

Prof. Dr. med. Michael Menger danke ich für seine konstruktiven Anregungen sowie die Überlassung der Räumlichkeiten und Gerätschaften des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie.

Dr. rer. med. Claudia Scheuer, Julia Parakenings und Janine Becker danke ich für die proteinanalytische und histologische Probenaufbereitung.

Dr. med. vet. Monika Frings und Dr. med. vet. Christina Körbel danke ich für ihre Beratung bei der Durchführung der Tierversuche.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Doktoranden am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie für die kollegiale Zusammenarbeit und das stets angenehme Arbeitsklima bedanken.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie, die mir diesen Lebensweg ermöglicht hat, von ganzem Herzen für ihre unermüdliche, liebevolle Unterstützung danken.

## **9 Lebenslauf**

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