

Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie,  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Emmanouil Liodakis, MBA, FEBOT

---

**Einfluss von Metamizol auf die Frakturheilung im murinen  
Ischämiemodell**

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

---

vorgelegt von: Christian Daniel Schönbeck  
geb. am: 26.03.1988 in Rockenhausen

**Tag der Promotion:** 07.05.2026

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

**Berichterstatter:** Prof. Dr. med. Marcel Orth, MHBA

Univ.-Prof. Dr. med. Stefan Landgraeber

# Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis .....	6
2	Zusammenfassung/Abstract .....	8
2.1	Zusammenfassung .....	8
2.2	Abstract.....	9
3	Einleitung .....	10
3.1	Knochen.....	10
3.1.1	Morphologie .....	10
3.1.2	Histologie .....	11
3.1.3	Funktion .....	13
3.2	Frakturheilung .....	13
3.2.1	Inflamationsphase.....	13
3.2.2	Reparationsphase.....	14
3.2.2.1	Weicher (bindegewebiger) Kallus.....	14
3.2.2.2	Harter (knöcherner) Kallus .....	14
3.2.3	Remodeling.....	15
3.2.3.1	Vaskularisierung .....	15
3.3	Wachstumsfaktoren .....	16
3.3.1	Cluster of differentiation 31.....	16
3.3.2	Cysteine-rich protein 61.....	17
3.3.3	Osteoprotegerin .....	17
3.3.4	Proliferating Cell Nuclear Antigen.....	17
3.3.5	Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand.....	17
3.3.6	Runt-related transcription factor 2 .....	18
3.4	Frakturmodelle .....	18
3.4.1	Primaten .....	19
3.4.2	Pferd .....	19
3.4.3	Schaf.....	19
3.4.4	Ziege.....	19
3.4.5	Hund .....	20
3.4.6	Katze.....	20
3.4.7	Kaninchen.....	20
3.4.8	Ratte .....	21
3.4.9	Maus .....	21
3.5	Metamizol-Natrium.....	22

3.5.1	Grundlagen in Einführung und Anwendung.....	22
3.5.2	Pharmakokinetik.....	23
3.5.2.1	Absorption.....	23
3.5.2.2	Distribution.....	23
3.5.2.3	Metabolismus.....	23
3.5.2.4	Elimination.....	24
3.5.2.5	Pharmakogenetik.....	24
3.5.3	Pharmakodynamik.....	24
3.5.3.1	Wirkung.....	24
3.5.4	Gegenanzeigen und Nebenwirkungen.....	25
3.5.4.1	Gegenanzeigen.....	25
3.5.4.2	Nebenwirkungen.....	25
3.6	Ischämie.....	26
3.7	Zielsetzung.....	27
3.8	Fragestellung.....	27
4	Material und Methoden.....	28
4.1	Methoden.....	28
4.1.1	Studiendesign.....	28
4.1.2	Tiermodell.....	29
4.1.3	Operationsverfahren.....	29
4.1.4	Medikation.....	35
4.1.5	Tötung der Versuchstiere.....	35
4.1.6	Präparation der Knochen.....	35
4.2	Auswertung der Zielkriterien.....	36
4.2.1	High-Performance-Liquid-Chromatographie.....	36
4.2.1.1	High-Performance-Liquid-Chromatographie-Ultra-Violett Analyse.....	36
4.2.1.2	Extraktion.....	37
4.2.1.3	Daten zur Validation der Ergebnisse.....	37
4.2.2	Biomechanik.....	37
4.2.3	Radiologie.....	38
4.2.3.1	Röntgen.....	38
4.2.3.2	$\mu$ CT.....	39
4.2.4	Histomorphometrie.....	40
4.2.5	Proteinbiochemische Marker.....	42
4.2.5.1	Western-Blot.....	42
4.3	Statistik.....	44
5	Ergebnisse.....	45

5.1	Serum-Level.....	45
5.2	Biomechanik .....	46
5.3	Röntgen .....	47
5.4	$\mu$ CT .....	48
5.5	Histologie .....	50
5.6	Western-Blot .....	51
6	Diskussion.....	55
6.1	Diskussion der Methoden .....	55
6.2	Diskussion der Ergebnisse .....	61
7	Literaturverzeichnis .....	65
8	Danksagung.....	76
9	Publikationen.....	78
9.1	Vorträge .....	78
9.2	Fachjournal .....	78
10	Abbildungsverzeichnis .....	79
11	Tabellenverzeichnis .....	81
12	Lebenslauf.....	82

# 1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
#	Nummer
%	Prozent
®	Registered Trademark/ Registrierte Handelsmarke
4-AA	4-Amino-Antipyrine/ 4-Amino-Antipyrin
4-AAA	4-Acetyl-Amino-Antipyrine/ 4-Acetyl-Amino-Antipyrin
4-FAA	4-Formyl-Amino-Antipyrine/ 4-Formyl-Amino-Antipyrin
4-MAA	4-Methyl-Amino-Antipyrine/ 4-Methyl-Amino-Antipyrin
BMP	bone morphogenic proteins
BV	Bone Volume / knöchernes Gesamtvolumen
ca.	circa
CAr	Callus Area / Periostale Kallusfläche gesamt
CD31	Cluster of Differentiation 31
CgAr	Cartilagenious Area / Knorpelige Fläche innerhalb des periostalen Kallus
COX	Cyclooxygenase
CT	Computertomographie
CYP	Cytochrom P450 Isoform
Cyr61	Cysteine-rich proteine 61
DKOU	Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie
et al.	et alia / und andere
EZM	Extrazellulärmatrix
FTAr	Fibrinous Tissue Area / Bindegewebige Fläche innerhalb des periostalen Kallus
Fx	absolute Biegesteifigkeit
Fx/C	relative Biegesteifigkeit
g	Gramm
G	Erdbeschleunigung in m/s <sup>2</sup>
HLPC	High-Performance-Liquid-Chromatographie
HRP	Horseradish peroxidase
KF	Korrekturfaktor
kg	Kilogramm
KG	Kommanditgesellschaft
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
M.	Musculus
µA	Mikroampere
Metamizol	Metamizol-Natrium
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm

ml	.....	Milliliter
μl	.....	Mikroliter
mm	.....	Millimeter
mm <sup>2</sup>	.....	Quadratmillimeter
mm <sup>3</sup>	.....	Kubikmillimeter
μM	.....	Mikromol
ms	.....	Millisekunden
MW	.....	Mittelwert
n	.....	Anzahl
N	.....	Newton
NSAID	.....	Non-steroidal antiinflammatory drug/ Nichtsteroidale Antirheumatika
OPG	.....	Osteoprotegerin
pAVK	.....	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCNA	.....	Proliferating Cell Nuclear Antigen
RANK	.....	receptor activator of NF-κB
RANKL	.....	receptor activator of NF-κB ligand
RGBS	.....	Röntgen-Goldberg-Score
RUNX2	.....	runt-related transcription factor 2
s.c.	.....	subcutan
SEM	.....	standard error of the mean / Standardfehler der Stichprobenverteilung
TbN	.....	Trabecular Number / Trabekelanzahl
TbSp	.....	Trabecular Separation / Trabekelabstand
TbTh	.....	Trabecular Thickness / Trabekeldicke
TOTAr	.....	Total Area / Knöcherner Fläche innerhalb des periostalen Kallus
TIP	.....	Target-Intensitätspixel
TP	.....	β-Actin-korrigiertes Targetprotein
TV	.....	Tissue Volume / Gesamtvolumen des Kallus
U/min	.....	Umdrehungen pro Minute
v/v	.....	Volumenprozent
vs.	.....	versus
WHO	.....	World Health Organisation
z.B.	.....	zum Beispiel

## 2 Zusammenfassung/Abstract

### 2.1 Zusammenfassung

Metamizol-Natrium (Metamizol) ist im Rahmen der klinischen Frakturbehandlung ein häufig eingesetztes Analgetikum. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Metamizol keinen nachteiligen Einfluss auf die Frakturheilung unter physiologischen Bedingungen hat. Unter ischämischen Bedingungen ist der Effekt von Metamizol auf die Frakturheilung jedoch bis dato nicht geklärt. Des Weiteren ist unklar, in welcher Dosierung Metamizol im murinen Modell verabreicht werden muss, um Serumlevel der aktiven Metabolite 4-Amino-Antipyrin und 4-Methyl-Amino-Antipyrin analog zum menschlichen Organismus zu erreichen. Ziel dieser Studie war es daher, die Plasmaspiegel der aktiven Metabolite in der Maus zu quantifizieren und den Einfluss von Metamizol auf die Frakturheilung in einem murinen Ischämiemodell zu untersuchen.

Für die Studie wurden 44 CD-1<sup>®</sup> Mäuse untersucht. Mittels doppelter Ligatur der Arteria profunda femoris erfolgte die Induktion einer milden Ischämie im Bereich der rechten unteren Extremität. Anschließend wurde das Femur frakturiert und durch eine intramedulläre Zugschraube stabilisiert. Den Tieren der Versuchs-Gruppe wurden täglich 50 mg/kg Körpergewicht Metamizol *per os* appliziert (n=23, Metamizol-Gruppe), die Kontroll-Gruppe erhielt täglich die äquivalente Menge 0,9 % Natriumchlorid-Lösung *per os* (n=21, Kontroll-Gruppe). Am Ende der Studzeit erfolgte die Bestimmung der Serumkonzentration von 4-Amino-Antipyrin und 4-Methyl-Amino-Antipyrin 30, 60 und 90 Minuten nach Verabreichung. Die Knochenheilung wurde durch biomechanische, radiologische, histomorphometrische und Western-Blot Untersuchungen 2 und 5 Wochen nach Operation analysiert.

Die Plasmaspiegel des aktiven Metaboliten 4-Methyl-Amino-Antipyrin waren allzeit erhöht, während die Konzentration von 4-Amino-Antipyrin 90 Minuten nach Applikation eine deutliche Spitze erreichte. Biomechanisch, radiologisch und histomorphometrisch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen, obwohl sowohl die Metamizol-Gruppe als auch die Kontroll-Gruppe jeweils eine verzögerte Frakturheilung zeigten. Die Western-Blot Analysen des Kallus-Gewebes zeigten signifikant erhöhte Werte von cysteine-rich angiogenic inducer 61, runt-related transcription factor 2 sowie receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die Gabe von Metamizol die Frakturheilung unter ischämischen Bedingungen nicht beeinträchtigt. Daher scheint die Behandlung mit Metamizol zur Analgesie bei Patienten mit Frakturen und Co-Morbiditäten, welche eine Gewebischämie begünstigen, sinnvoll und gerechtfertigt zu sein.

## 2.2 Abstract

Metamizole sodium (metamizole) is a commonly used analgesic in clinical fracture treatment. Previous studies have shown that metamizole has no negative effect on fracture healing under physiological conditions. Under ischemic conditions, however, the effect of metamizole on fracture healing has not been clarified yet. In addition, it is unclear at what dosage metamizole must be administered in the murine model to achieve serum levels of the active metabolites 4-amino-antipyrine and 4-methyl-amino-antipyrine analogous to plasma-levels in humans. The aim of this study was therefore to first quantify the plasma levels of the active metabolites in the mouse and then to investigate the influence of metamizole on fracture healing in a murine ischemia model.

For the study, 44 CD-1<sup>®</sup> mice were used. Double ligation of the deep femoral artery was performed to induce ischemic conditions in the right lower extremity. Subsequently, the femur was fractured and stabilized by an intramedullary lag screw. Animals of the test-group were administered 50 mg/kg body weight of metamizole *per os* daily (n=23, metamizole group), the control-group received the equivalent amount of 0.9% sodium chloride solution *per os* daily (n=21, control group). At the End of the period, the serum concentrations of 4-amino-antipyrine and 4-methyl-amino-antipyrine were determined 30, 60 and 90 minutes after administration. Bone healing was analyzed by biomechanical, radiological, histomorphometrical and Western blot analysis at 2 and 5 weeks post-surgery.

The plasma level of the active metabolite 4-methyl-amino-antipyrine was high at all time points, whereas 4-amino-antipyrine peaked at 90 minutes after administration. Biomechanical, radiological and histomorphometrical analyses revealed no significant differences between both groups, while metamizole-treated and control mice showed a delayed fracture healing. The Western-Blot analyses of callus tissue showed significantly increased levels of cysteine-rich angiogenic inducer 61, runt-related transcription factor 2 and receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand.

Summarized, these findings point to the fact that the application of metamizole does not affect fracture healing under ischemic conditions. Therefore, treatment with metamizole for analgesia in fracture patients suffering from co-morbidities resulting in tissue ischemia appears to be reasonable and justified.

## 3 Einleitung

### 3.1 Knochen

#### 3.1.1 Morphologie

Eine systematische Unterteilung der Knochen nach Form und Aufbau erleichtert die Zuordnung nach makroskopischen Eigenschaften [5,6]. So können zum Beispiel (z.B.) unterschieden werden [3,5,6]:

- a) Ossa plana (flache bzw. platte Knochen): z.B. Os parietale, Scapula
- b) Ossa irregularia (Unregelmäßige Knochen): z.B. Vertebra
- c) Ossa brevia (kurze Knochen): z.B. Ossa carpi, ossa tarsi
- d) Ossa pneumatica (lufthaltige Knochen): z.B. Processus mastoideus, Cavum tympani
- e) Ossa sesamoidea (Sesambeine): z.B. Patella
- f) Ossa longa (lange Knochen bzw. Röhrenknochen)
  - a. Lange Röhrenknochen: z.B. Humerus, Femur
  - b. Kurze Röhrenknochen: z.B. Ossa metacarpi, Ossa metatarsi

Bei den Röhrenknochen erfolgt eine Unterscheidung verschiedener Abschnitte des Knochens, welche in der Beurteilung von Frakturen ebenfalls eine Rolle spielen (siehe z.B. AO-Klassifikation). Von der im Röhrenknochen mittig gelegenen Diaphyse differenziert man in zentripetaler Ausbreitung zu den jeweiligen Enden noch die Metaphyse und die Epiphyse. Letztere mündet in die Knorpelflächen. Zwischen Metaphyse und Epiphyse befindet sich im Wachstumsstadium noch die Epiphysenfuge, welche im adulten Knochen als schmale Verdichtung erkennbar ist. Von ihr aus findet über die Metaphyse das Längenwachstum des Knochens statt [3,5,6].

Entgegen der Klassifizierung nach der Form können Knochen auch nach dem Aufbau klassifiziert werden [5,6]. Hierzu unterscheidet man zwischen

- a) Geflechtknochen: auch Faserknochen oder primärer Knochen genannt. Letztere Bezeichnung vermittelt eine weitere Deutungsmöglichkeit der Struktur nach dem Ablauf der Knochenbildung im Rahmen des physiologischen Wachstums. Im adulten Organismus findet man Geflechtknochen unter physiologischen Verhältnissen noch im Bereich der Schädelnähte, in der Pars petrosa des Os temporale sowie im Bereich der Alveolarfortsätze von Mandibula und Maxilla. Ursprung des primären Knochens ist die embryonale Entwicklung, in der er sich aus einem Geflecht kollagener Fibrillen strukturiert. Im ersten Lebensjahr des Menschen bilden sich in den Faserknochen primäre Osteone aus, welche im Zuge zunehmender Belastung durch die weitere Entwicklung zu Lamellenknochen ausdifferenzieren. Geflechtknochen erfüllt zudem

eine Funktion als Zwischenstufe bei der Frakturheilung, ebenso ist er in Umbauprozessen knöcherner Strukturen zu finden, wie sie sich in der zuvor beschriebenen Entwicklung darstellen. Eine regelmäßige Anordnung der Gefäße, wie sie in den Lamellenknochen zu finden ist, fehlt. In seiner Eigenschaft der Biegesteifigkeit hat der Geflechtknochen gegenüber dem Lamellenknochen ein geringeres Potenzial [3,5,6].

- b) Lamellenknochen: auch sekundärer Knochen. Er entsteht aus den primären Knochen und ersetzt in einer normgerechten Entwicklung etwa ab dem zweiten Lebensjahr den Geflechtknochen. Die gemeinsame Struktur aller sekundärer Knochen entspricht folgendem Aufbau: Dem außen aufliegenden Periost schließt sich nach innen folgend zunächst die Substantia corticalis an, welche auch Kompakta genannt wird. Ihre Dicke kann bis zu 10 mm betragen. Hierauf folgt die Substantia spongiosa, deren charakteristisches Merkmal die namensgebende schwammartige Struktur ist. In ihr und im Knochenzentrum findet sich dann das Knochenmark, welches noch die Knochenhöhlen abgrenzt [3,5,6].

Ungeachtet der Bauform ist allen Knochen eine äußere Ummantelung durch Periost gemein [6]. Diese besteht aus drei Schichten: Dem Knochen liegt die innere Schicht, das Stratum osteogenicum, an (auch: Kambiumschicht). Nach außen ist das Stratum fibrosum ausgebildet. Ihm liegt die Adventitia auf, eine gefäßreiche Schicht. Die von ihr ausgehenden Gefäße ziehen über die Volkmann-Kanäle in den Knochen hinein [3,6,75].

Die inneren Knochenoberflächen, wie zum Beispiel Havers-Kanäle, Spongiosa-Trabekel und Innenflächen der Kompakta, werden durch das Endost bedeckt. Es grenzt somit den Markraum ab [3,6]. Nach Frakturen geht die Frakturheilung von Periost und Endost aus [5,31,36].

### **3.1.2 Histologie**

Knochengewebe verdankt seine Stabilität einer Kombination aus organischen und anorganischen Strukturbestandteilen [3,5,6]. Verschiedene Zelltypen sind für einen kontinuierlichen Umbau der Strukturen, in Abhängigkeit von Funktion und Belastung des Knochens, verantwortlich. Osteoblasten sind die Knochen-bildenden Zellen. Ihnen gegenüber stehen die Osteoklasten, welche einen kontinuierlichen Abbau knöcherner Substanz bewirken. Osteoklasten sind hierbei ca. 10-mal so aktiv wie Osteoblasten [1]. Ein entsprechendes Gleichgewicht ist notwendig, um eine leistungsfähige Knochenstruktur zu erhalten. Bei Osteozyten handelt es sich um ausdifferenzierte Osteoblasten, deren Aufgabe in der Organisation der Anpassungsvorgänge auf Belastung besteht [3]. Diese Zellarten wiederum sind in der Extrazellulärmatrix des Knochens eingebettet. Zu den organischen Bestandteilen

der Extrazellulärmatrix (EZM) gehören Proteoglykane, Glykoproteine und Kollagen-Fasern vom Typ I. An anorganischer Strukturkomponente findet sich das Hydroxylapatit. Dieses besteht aus Hydroxid-, Phosphat- und Calciumionen sowie Fluorid, Karbonat und Magnesium [6]. Die angepasste Organisation des Knochens aus eben jenen Knochenbestandteilen mündet in unterschiedlich stark ausgeprägten Lamellenarten des Lamellenknochens:

Die Kompakta wird durch die Generallamellen begrenzt, welche eine äußere und eine innere Zirkumferenz ausbilden. Während die äußere Zirkumferenz immer aus mehreren Generallamellen besteht, welche stets mehr Lagen haben als die innere Lage, bilden die Generallamellen der inneren Schicht nicht zwingend mehrere Schichten aus. Sie können zudem in Spongiosabälkchen übergehen. Zwischen den Generallamellen finden sich die Osteone, auch Havers-Systeme genannt. Ihr Aufbau erfolgt aus der grundlegenden Organisation des menschlichen Knochens, wonach sich zunächst ein sog. Havers-Gefäß mit begleitenden Nervenfasern ausbildet, um welches sich dann im Prozess der Knochenbildung Speziallamellen anordnen. Das Gefäß mit den Nervenfasern bildet die füllende Struktur des Havers-Kanals, welcher das Zentrum des Havers-Systems darstellt. Um diesen Kanal folgt die Anordnung der Speziallamellen in konzentrischer Form, in denen Kollagenfasern (Typ-1-Kollagen) in zueinander gegensätzlicher Laufrichtung angeordnet sind. Vereinzelt kommt es zu Übertritten der Fasern in benachbarte Speziallamellen. Die zelluläre Struktur des Knochens wird von Osteozyten gebildet. Diese finden sich zwischen den Speziallamellen, bilden an langen Ausläufern Gap-junctions aus und erreichen über Fortsätze die Blutgefäße des entsprechenden Osteons. Die Ernährung der Knochengrundsubstanz wird zudem durch perizelluläre Spalten gewährleistet, welche eine Diffusion gelöster (Nähr-)Stoffe und Abbauprodukte ermöglichen. Jedes Osteon wird als Einheit durch eine Linea cementalis nach außen hin abgegrenzt. Zur Gewährung der Blutversorgung existieren in Ergänzung zu den longitudinal verlaufenden Havers-Gefäßen sogenannte Volkmann-Gefäße. Diese treffen diametral auf die Havers-Gefäße. Ihren Ursprung finden sie in der Adventitia und dringen über die Volkmann-Kanäle (Canales perforantes) in den Knochen ein. Die Adventitia bedeckt zusammen mit Stratum fibrosum und Stratum osteogenicum als Periost die Knochenoberfläche nahezu vollständig [3,75]. Dieses enthält neben zahlreichen Gefäßen eine starke Innervation, wodurch Verletzungen am Periost auch zu Schmerzwahrnehmung führen [5]. Die mittlere Schicht, das Stratum fibrosum, wird aus einer Kombination straffen Bindegewebes und elastischer Fasern gebildet. Während die elastischen Fasern zur Ausbildung von Sehnenansätzen einen wesentlichen Beitrag leisten, führen Kollagenfasern zur Fixierung des Periosts. Dies geschieht, in dem sie als sogenannte Sharpey-Fasern in den Knochen einstrahlen und so eine stabile Verankerung bilden [3,75]. Das Stratum osteogenicum lässt eine Unterscheidung dreier Zelltypen zu, deren Funktion im Knochenbau liegt: Osteoprogenitorzellen, mesenchymale Stammzellen und Präosteoblasten. Von dieser

Schicht geht das Dickenwachstum des Knochens aus. Ebenso erfolgt von hier die Einwanderung von Zellen im Rahmen der Frakturheilung [3,75,107].

Ähnlich dem Stratum osteogenicum können auch dem Endost drei Zellarten zugewiesen werden, die bei Frakturheilung und Remodeling aktiv sind: ruhende Osteoblasten, Osteoklasten sowie mesenchymale Stammzellen. Nur ca. 10 % der Zellen sind aktiv, der Rest liegt als ruhende Reserve vor [58,129]. Ihre Aufgabe besteht im Remodeling von Knochen und Kallusgewebe [3,75,107]. Ein bis zwei Lagen von Zellen und eine dünne Schicht nicht-mineralisierter Kollagenfibrillen bilden gemeinsam das Endost [3,75].

Die Spongiosabälkchen werden umgeben und stabilisiert von ihnen aufliegenden dünnen, avaskulären Lamellen, deren Anordnung parallel zur Trabekeloberfläche liegt [3,5,6].

### **3.1.3 Funktion**

Der Knochen dient als Stützgewebe, zusätzlich schützt er die Organe, z.B. im Thorax. Ebenso hat er eine Funktion als Hauptkalziumspeicher des menschlichen Körpers [12]. Im Knochengewebe sind 99% des Kalziums gespeichert [6]. Ab dem 4. Monat, also bereits im Fetus, übernimmt das rote Knochenmark die Blutbildung. Sofern kein unphysiologischer Prozess eine Ausweitung der Blutbildung erfordert, verbleibt diese Aufgabe im Knochenmark ein Leben lang [6].

## **3.2 Frakturheilung**

Bricht ein Knochen, können die darauffolgenden Heilungsvorgänge bis zur Wiederherstellung der Funktion in Phasen unterteilt werden. Die Anzahl der Phasen unterscheidet sich jedoch in Abhängigkeit von Beschreiber und Beobachtungsart [36,97,100,107]. Das Vier-Phasen-Modell der Frakturheilung hat seinen Ursprung in der histologischen Beobachtung des Heilungsprozesses [34]. Claes *et alia* (*et al.*) fasst den Prozess in drei Phasen zusammen, wobei eine Unterteilung der Kallusstruktur unterlassen wird [20]. Der physiologische Ablauf zeigt wesentlich weichere Übergänge auf, als es ein Erklärungsmodell in seiner Struktur erfasst. Dennoch eignet sich ein Modell aus didaktischen Gründen, um die im Verlauf überwiegenden Vorgänge einzuordnen. Hierbei können die Phasen wie folgt zusammengefasst werden.

### **3.2.1 Inflammationsphase**

Diese erste Phase der Frakturheilung ist unter anderem gekennzeichnet durch Hämatombildung im Frakturspalt. Die Fraktur umgebendes Gewebe begrenzt dabei die Ausbreitung der Einblutung. Es folgt die Migration von Zellen der unspezifischen Immunabwehr in das Hämatom. Diese beschleunigen durch die Ausschüttung

unterschiedlicher Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren die Gerinnung des Hämatoms. Im zunächst fibrinösen Thrombus erfolgt die Beseitigung von Zellfragmenten, Stoffwechselprodukte können durch neu gebildete Kapillaren abtransportiert werden und die Durchblutung des Kallusgewebes ermöglicht die flächige Umwandlung des fibrinösen Thrombus in weiches Granulationsgewebe [107].

### **3.2.2 Reparationsphase**

Der Inflammationsphase folgt die Reparationsphase. In dieser kommt es zu einer Umstrukturierung des weichen Granulationsgewebes. Abhängig von der Distanz der Frakturrenden zueinander wird in primäre und sekundäre Frakturheilung unterschieden. Bei der primären Frakturheilung kommt es dank direkt aufeinanderliegenden Frakturrenden in Verbindung mit absoluter Rigidität zu einer unvermittelten Durchbauung des Frakturspalts mit Havers-Kanälen [80]. Hierbei handelt es sich jedoch um eine sehr spezielle Situation, welche in der Regel nur durch eine absolut steife Osteosynthese erreicht wird [21,106]. Kommt es hingegen zu einer Fixierung mit geringer Distanz oder Mikrobewegungen (in Abhängigkeit von Belastungsmechanismen und -kräften), erfolgt die Ausbildung eines entsprechenden funktionellen Kallus [10,22,42,67].

#### **3.2.2.1 Weicher (bindegewebiger) Kallus**

Es kommt zu einer bindegewebigen Durchbauung des Frakturspalts mit Faserknorpel, ausgehend vom Markzentrum der Frakturrenden [21]. Primäre Zelltypen in diesem Stadium sind Chondrozyten und Fibroblasten. Ergänzend zu den Umbauprozessen im Kallus kommt es zusätzlich zur Ausbildung einer knorpeligen Ummantelung [36]. In Abhängigkeit von vorherrschenden Wachstumsfaktoren und biomechanischer Belastung des Frakturspalts bzw. des sich ausbildenden Kallus ist das Verhältnis der vorherrschenden Zellart sehr variabel. Im weiteren Verlauf einer physiologischen Frakturheilung kommt es zur Umwandlung von bindegewebigen Anteilen und Granulationsgewebe zu Faserknorpel. In Bereichen mit insuffizienter Knorpelbildung wird von Fibroblasten weiterhin Bindegewebe ausgebildet. Zentral im Kallus gelegener Faserknorpel bildet schlussendlich ein sich zentripetal ausbreitendes Verbindungselement zwischen den Frakturteilen, welches der Fraktur Festigkeit gibt [8].

#### **3.2.2.2 Harter (knöcherner) Kallus**

Es beginnt der knöcherner Ersatz der knorpeligen Substanz des Kallus im subperiostalen Areal des Kallus. Zunächst erfolgt eine verstärkte Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoprogenitorzellen. Diese werden wiederum zur Differenzierung in Osteoblasten

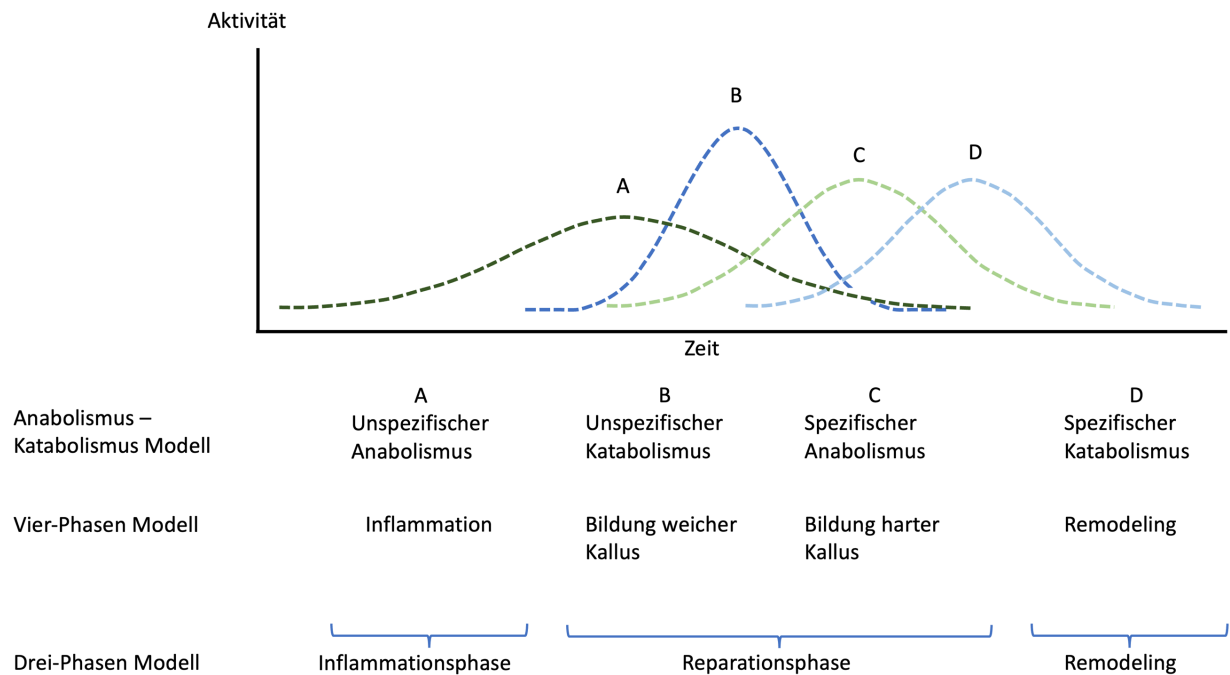
angeregt. Es entstehen Wachstumszonen ähnlich der Struktur der Epiphysenfugen, mit primärer und sekundärer Spongiosa [97]. Es entsteht zunächst ein ungerichtetes Knochenwachstum mit dem Ergebnis eines irregulären Kallus aus Geflechtknochen [31,97,107].

### **3.2.3 Remodeling**

Erst im weiteren Heilungsverlauf schließt sich das gezielte Remodeling mit Ausbildung einer Kortikalis, belastungsoptimierten Lamellen und Spongiosa an. Diese strukturierte Anpassung entspricht dem Konzept der sekundären Frakturheilung [36]. Hierbei kommt es durch ein komplexes Zusammenspiel von Osteoklasten und Osteoblasten zu gezieltem Abbau des Geflechtknochens. Durch Neovaskularisierung entstehen neue Havers-Gefäße, welche als zentrale Einheit des lamellären Knochenbaus die Grundstruktur für die Neuausbildung der originären Knochenstruktur im Bereich der ursprünglichen Frakturzone bilden [1,12,30,80,107].

#### **3.2.3.1 Vaskularisierung**

Um eine regelhafte Durchbauung des Frakturspalts zu gewährleisten und die Reorganisation des Knochens im Rahmen des Remodelings sicherzustellen, ist auch das Gewebe im Frakturspalt auf eine entsprechende Gefäßversorgung angewiesen [80]. Erst eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff führt zur Umwandlung von Knorpelsubstanz in knöchernes Material. Kommt die Gefäßversorgung dem Remodeling zeitlich und räumlich nicht nach, kann die knorpelige Struktur erhalten bleiben, bis das Versorgungsdefizit aufgeholt ist. Die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration am Ort des Umbaus ist eine der Regulationsmöglichkeiten, die im Rahmen der Frakturheilung stattfinden [16,80,81].



**Abbildung 1:** Stadien der Frakturheilung in Anlehnung an Schindeler *et al.* [107]

### 3.3 Wachstumsfaktoren

Das Konzept der Frakturheilung auf molekularer Ebene ist komplex. Sowohl die Kommunikation der Zellen untereinander als auch die gegenseitige Einflussnahme verschiedener Biomarker aufeinander bleiben Gegenstand aktueller Forschung. Stete Weiterentwicklung laborchemischer Methoden wie auch neue Forschungsansätze lassen regelmäßig weitere Erkenntnisse erwarten. Die hier gezeigten und untersuchten Parameter stellen einen Bruchteil der bekannten Wachstumsfaktoren dar. Die Auswahl erfolgte aufgrund ihres simultanen Einflusses sowohl auf Knochen- als auch auf Gefäßheilung und -neubildung.

#### 3.3.1 Cluster of differentiation 31

Cluster of differentiation (CD31) ist ein transmembranöses Glykoprotein aus der Immunglobulin-Familie [96]. Es wird vor allem von Endothelzellen ausgebildet und dient dem Zell-Zell-Kontakt zur Ausbildung eines dichten Endothels [2]. Es hat eine wichtige Funktion in der Entwicklung eines normalen funktionsfähigen Gefäßsystems und der Angiogenese, zudem fördert es durch Erfassung von Scherkräften im Gefäßsystem die Anpassung der Gefäße an verstärkte Belastung [23]. CD31<sup>+</sup>-Zellen haben einen proangiogenen Effekt und erhöhen die Durchblutung ischämischer Areale [68].

### **3.3.2 Cysteine-rich protein 61**

Cysteine-rich proteine 61 (Cyr61) fördert die Maturation von Osteoblasten-Vorläuferzellen [115]. Daraus resultiert eine gesteigerten Zell-Proliferation und osteoblastischen Differenzierung. Ebenso erhöht die Expression von Cyr61 die Migration von Osteoblasten. In Summe führt es so zu einer Stimulation der Ausbildung knöchernen Gewebes. Dem Namen entsprechend konnte Cyr61 außerdem eine angiogene Wirkung nachgewiesen werden [44,54,69,110,115].

### **3.3.3 Osteoprotegerin**

Osteoprotegerin (OPG) schützt Knochen vor exzessivem Abbau durch die Antagonisierung von receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand und der daraus resultierenden Verhinderung einer Bindung an receptor activator of NF- $\kappa$ B [12]. Hierdurch bremst OPG die Maturation von Osteoklasten. Das Verhältnis von receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand zu OPG in Knochen ist eine Hauptdeterminante in Bezug auf Knochenmasse/-dichte und -stärke. Zudem konnte bei OPG-Knockout-Mäusen eine verringerte Dichte des Knorpelgeflechts nachgewiesen werden, was als Hinweis auf einen pathologisch gesteigerten Umsatz der Remodeling-Aktivität zu werten ist [12,83,112].

### **3.3.4 Proliferating Cell Nuclear Antigen**

Das Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) ist eine Untereinheit der DNA-Polymerase. Sie umgibt den DNA-Doppelstrang ringförmig, verankert die Polymerase auf der DNA und fördert so die komplexe Interaktion der DNA-Polymerase an der Replikationsgabel [77]. Daraus resultiert eine Funktion als Marker für Zellproliferation. Zudem konnte gezeigt werden, dass PCNA die Differenzierung von Osteoklasten reguliert und eine bedeutende Rolle in der Funktionalität des Aktinsaumes der Osteoklasten innehat [77,116].

### **3.3.5 Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand**

Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) fungiert als Ligand zu receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK) im Sinne der Regulation der Osteoklasten-Formation, -Aktivierung und -Überleben im normalen Knochen-Modeling und Remodeling [12]. So ist es Bestandteil der Homöostase des Knochenaufbaus. In Vorgängen, welche durch erhöhten Knochenumbau charakterisiert sind, lässt sich ebenfalls eine erhöhte Aktivität von RANKL nachweisen. So trifft dies unter anderem auf die Rheumatoide Arthritis zu, in deren aktiven Phasen RANKL von Synovialzellen und aktivierten T-Zellen in den befallenen Gelenken ausgeschüttet wird [12].

### 3.3.6 Runt-related transcription factor 2

Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), ehemals CBFA1 „core binding factor  $\alpha 1$ “ genannt [29,58]. Es handelt sich hierbei um einen Osteoblasten-Differenzierungsfaktor. Dieser bindet und aktiviert das Osteocalcin-Promotor-Genom und weitere osteogene Differenzierungs- und Knochen-formende Gene. RUNX2 ist der Hauptschalter für Osteogenese durch Aktivierung Knochen-phänotypisierender Gene in pluripotenten Zellen [58]. Er führt eine beginnend prämatüre Zelle zurück in die Osteoblasten-Linie und inhibiert adipogene Phänotypen [58]. Zusätzlich zur Promotion der Knochenreife vermittelt RUNX2 ebenso den Zellzyklus-Exit in proliferierenden Osteoprogenitorzellen. Es wird ausgebildet in proliferierenden immaturren Osteoblasten, einige Wachstumsfaktoren beeinflussen zudem die Ausschüttung von RUNX2, hierzu gehören unter anderem TGF- $\beta$ , indian hedgehog und Mitglieder der BMP-Familie [29,47,58]. Der regulierende Einfluss konnte außerdem im Prozess der endochondralen Ossifikation gezeigt werden: unter Abwesenheit von RUNX2 blieb die Gefäßinfiltration in Knorpelmulden aus, so dass es zu einer verminderten Ausbildung von Knochen kam [12]. RUNX2 ist für die Gefäßinvasion in Knorpelmulden im Rahmen der endochondralen Ossifikation notwendig [12]

## 3.4 Frakturmodelle

Um die Vorgänge der Knochenheilung weiter zu erforschen, braucht es verschiedene Untersuchungsmodalitäten. Die Interaktion der beteiligten Systeme und auch deren Abhängigkeit voneinander lassen sich aktuell noch am besten *in vivo* erforschen. Trotz der immer weiter fortschreitenden Entwicklung zur Simulation von Tiermodellen und dem Versuch, möglichst auf Tierversuche zugunsten von z. B. *in-vitro*-Modellen zu verzichten, wurden laut Bundesinstitut für Risikobewertung für das Jahr 2020 1,9 Millionen Wirbeltiere in Versuchen gemeldet. Dies entspricht einem Rückgang von 14 Prozent im Vergleich zum Vorjahr. Wenn auch nicht jeder Tierversuch der medizinischen Forschung dient, belegt sie mit knapp 81 % den ersten Platz in der Beanspruchung von Tieren für die Weiterentwicklung von Wissen und Können. 1,4 % der Gesamtpopulation von Versuchstieren in Deutschland wird hierbei in der Erforschung des muskuloskelettalen Systems verwendet [133]. Bei der Ausübung von Versuchen am Tier werden unterschiedliche Faktoren gewertet, deren Zusammenschau schlussendlich die Wahl für die Versuchstierspezies begründen. Die unterschiedliche Anatomie verschiedener Spezies im Vergleich zum Menschen, Variationen in Ablauf und Struktur von Heilungsprozessen und Unterschiede in Stoffwechselprozessen müssen bei der Übertragung von Ergebnissen aus Tierexperimenten auf den Menschen immer kritisch betrachtet werden.

### **3.4.1 Primaten**

Im Sinne der Artenverwandtschaft lässt sich die Übertragung von Forschungsergebnissen, allen voran von Menschenaffen, auf humane Ansprüche am ehesten realisieren. Die phylogenetische Nähe zum Menschen ist jedoch zugleich ein großes Hindernis. Die hieraus entstehenden Einschränkungen, ergänzend zu Haltungsbedingungen, Zucht und Verfügbarkeit, machen eine Nutzung von Primaten in der Erforschung von Frakturheilungen als Versuchstiergruppe ungeeignet [89].

### **3.4.2 Pferd**

Pferde sind in Haltung und Anschaffung recht teuer. Hinzu kommt die Beanspruchung von verwendeten Materialien, da Pferde eine Frakturstelle direkt hoher Belastung aussetzen und ihr Gewicht einen zusätzlichen Faktor darstellt. Dies führt häufig zu einer insuffizienten Frakturheilung, durch die sich eine Nutzung des Pferdes für Frakturmodelle nicht rechtfertigen lässt [88,89].

### **3.4.3 Schaf**

Im Sinne der Übertragbarkeit von Ergebnissen auf den Menschen zählt das Schaf zu den am ehesten nutzbaren Tieren. So gilt die Schafstibia im Hinblick auf Größe und Form als recht vergleichbar mit menschlichen Röhrenknochen. So können, für die Nutzung am Menschen entwickelte, Instrumente und handelsübliche Implantate am Schaf in der Regel ohne nötige Anpassungen genutzt werden. Biomechanisch ergibt sich zudem die Besonderheit, dass die Schafstibia wie die menschliche Tibia in der Tragachse des Beines liegt. Testungen auf Einflüsse von Belastungen sind somit ebenso nah am humanen Knochen wie auch die Ermittlung biomechanischer Belastbarkeit. Sie zeigen zudem in der Regel eine homogene Reaktion auf Schädigung der zu untersuchenden Strukturen, sodass größere Abweichungen in einer Gruppe nicht auf interindividuelle Unterschiede zurückzuführen sind [89,128]. Limitierend wirkt sich hingegen der Anspruch an Haltungsbedingungen und die Schreckhaftigkeit der Tiere aus. Letzteres macht das Verhalten der Schafe schwer einschätzbar und kann zu Einschränkungen der Beurteilbarkeit von Belastungen auf Frakturen führen [89].

### **3.4.4 Ziege**

Als Vorteil von Ziegen kann die Verwendbarkeit von für den menschlichen Gebrauch vorgesehenen Fixateuren und intramedullären Nägeln betrachtet werden. Diese benötigen, wenn überhaupt, nur eine geringfügige Anpassung und sind somit im Frakturmodell an der

Ziege gut zu erforschen [26]. Als nachteilig sind vor allem orthopädische Erkrankungen wie die caprine Arthritis-Enzephalitis zu nennen, welche die Auswertung und Übertragbarkeit von Studienergebnissen beeinträchtigen können [89].

### **3.4.5 Hund**

Die breite Variation in den Hunderassen ermöglicht es, einerseits viele Forschungsmodelle zu etablieren, jedoch macht dies eine Vergleichbarkeit teilweise schwierig und stellt zusätzliche Hindernisse in der Übertragung von Ergebnissen auf den Menschen oder andere Tiergattungen dar. So beschreiben Wissing *et al.* [128] die Problematik der Übertragbarkeit von Ergebnissen der Frakturheilung der Tibia von verschiedenen Hunderassen (hier: Beagle und Bastardschäferhund) zueinander. Vorteil am genannten Schäferhund benennt er in der strukturellen Nähe der Hundetibia zum menschlichen Knochenaufbau. Als nachteilig wird die Infektneigung und stark schwankende Zeitkorridore in den Heilungsabläufen angegeben [128]. Bei Einsatz von nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAID) wurde zudem bei Hunden eine verstärkte Neigung zu gastrointestinalen Ulzera beobachtet, was mit einer schnelleren Absorptionsrate der Medikamente im Magen-Darm-Trakt und längeren Halbwertszeiten begründet wird [89]. Ein weiterer Nachteil besteht in ihrer Fähigkeit, Sicherungssysteme (Verbände, Gips, externe Fixierung) zu lösen. Ihre Begabung, auch auf drei Extremitäten recht effizient zu laufen, mindert die Möglichkeit für Untersuchungen zur Belastbarkeit einer Versorgung, stellt jedoch auch einen Vorteil dar, sofern die Schonung gewünscht ist [89].

### **3.4.6 Katze**

Katzen werden in der veterinärmedizinischen Forschung genutzt, um verschiedenen Frakturmodelle zu entwickeln und die Heilung von Frakturen zu erforschen [48,99,120]. Vor allem in der Entwicklung von Homografts ist die Frakturforschung zur Behandlung von Femurfrakturen der Katze ein standardisiertes Verfahren [48,99]. Ein großer Vorteil liegt in ihrem Verhalten, da sie verletzte Extremitäten sehr effizient schonen. Nachteilig ist die eingeschränkte Funktion des Glucuronyl-Transferase-Pathway's, was bei der Katze im Zuge der Erforschung von Medikamentenwirkungen einen Nachteil darstellt [89].

### **3.4.7 Kaninchen**

Unter anderem das Vorhandensein von Havers-Systemen macht die Untersuchung von Frakturmodellen an Kaninchen bei gerade noch moderaten Kosten interessant [89]. Unterschiedliche Modelle mit Versorgungsmöglichkeiten der erzeugten Frakturen mittels Fixateur externe, intramedullärer Versorgung, Platten und Schrauben existieren für Kaninchen

[27,64,89]. Aufgrund der schnellen Heilungsvorgänge sind Kaninchen für die Beurteilung der Festigkeit von Implantaten jedoch nicht geeignet [128].

### **3.4.8 Ratte**

Vielfältige Methoden zur Untersuchung der Frakturheilung an der Ratte sind bekannt. Modelle zur Beurteilung der Vorgänge existieren unter anderem für Schädelknochen, Radius, Ulna, Femur, Tibia, Fibula und metatarsale Knochen [49,89,118,123]. Ebenso existieren Methoden zur geschlossenen Frakturerzeugung wie im Mausmodell [9,108]. Bezüglich der anatomischen Gegebenheiten ist darauf hinzuweisen, dass bei der Ratte (wie bei der Maus) keine Havers-Systeme im Knochen vorhanden sind [79,89]. Ähnlich wie Mäuse sind auch Ratten als Versuchstiere in größeren Kohorten noch recht kostengünstig zu halten und einfach zu versorgen [89]. Bei radiologischen Kontrollen von Rattenknochen im Wachstum sei darauf hingewiesen, dass mangels Epiphysenfuge der Abschluss der Wachstumsphase in Ratten nicht auf diese Art erfolgen kann [89].

### **3.4.9 Maus**

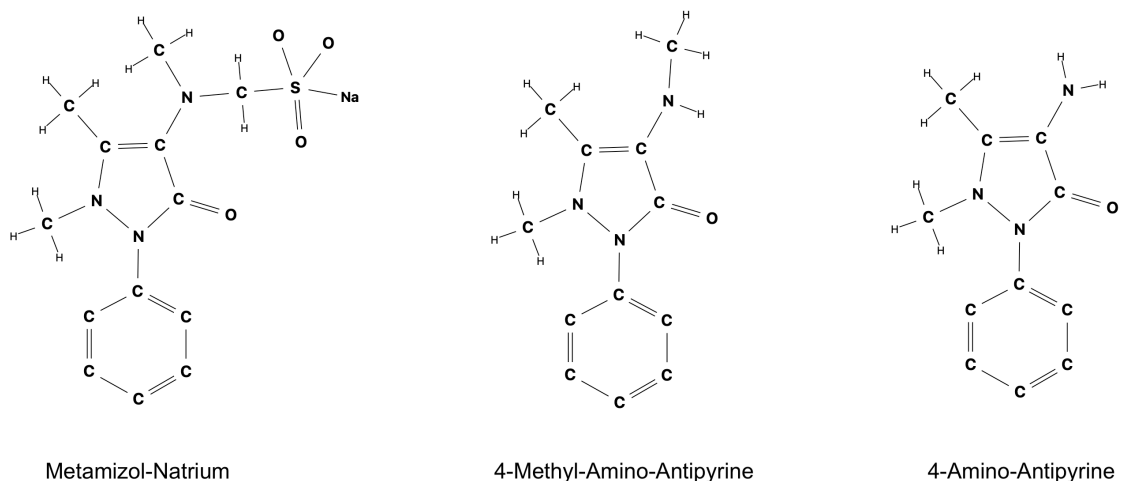
Die Nutzung von Mäusen als Versuchstiere hat zum Vorteil, dass die Haltungskosten gering sind und auch große Gruppen relativ wenig Platz benötigen. Zudem ist das Genom der Maus weitestgehend entschlüsselt und es bestehen vielfältige Methoden zur Erzeugung spezifischer genetischer Variationen [104]. Die Erzeugung transgener Mausstämme ermöglicht die dezidierte Erforschung von Einflüssen genetischer Mutationen auf die zu untersuchende Entität. Auch im Bereich der Frakturheilung bestehen daher unterschiedliche Ansätze, welche in Abhängigkeit der gesuchten Zielparameter angewandt werden können. Etabliert zur Untersuchung der Genexpression während der Frakturheilung ist das Modell der Rippenfraktur der Maus [86,130]. Nachteilig an Rippen ist die fehlende Möglichkeit zur reproduzierbaren Testung biomechanischer Parameter wie Torsions- und Biegesteifigkeit. So entwickelten Hiltunen *et al.* ein Modell zur Tibiafraktur der Maus als weitere Möglichkeit, um die Genexpression und/oder die Stadien bei der Frakturheilung zu untersuchen [11,50]. Durch die Verwendung einer intramedullären Drahtung der Tibia konnte diese stabilisiert werden. Aufgrund der Form der Tibia und der geringen Weichteildeckung mit hohem Risiko für Wundheilungsstörungen und Infektionen schien das Femur als Frakturmodell besser geeignet zu sein [18,59]. Daher entwickelten Manigrasso *et al.* in Anlehnung an Bonnarens und Einhorn ein Modell zur geschlossenen Fraktur am Femur der Maus, mit dem Ziel im Mausmodell auch biomechanische Testungen zu ermöglichen [9,78]. Der hierbei genutzte intramedulläre Pin erreichte jedoch keine Rotationssteifigkeit. Die Versorgung der Fraktur mit einem Fixateur externe brachte bei geübten Operateuren eine gute Fixierung der Fraktur, war jedoch mit

einem großen Weichteilschaden verbunden. In Folge schloss sich die Entwicklung weiterer Frakturmodelle an, mit dem Ziel, die intramedulläre Fixierung von Femurfrakturen zu verbessern. So entwickelten Holstein *et al.* zunächst ein Modell mit Femurnägeln und anschließend eines unter Verwendung einer Femurschraube [59,60]. Dies ermöglichte nun die rotationsstabile Versorgung einer Fraktur am Mausmodell. Hieraus resultierend waren jetzt auch weitere Erforschungen der Frakturheilung möglich, ohne dass diese vom Weichteilschaden einer offenen Versorgung begleitet wurde. Ebenso hat diese Methode zum Vorteil, dass die Belastung der Tiere nicht so hoch ist wie bei einer instabilen Fraktur. Allen Versuchen an der Maus ist, ebenso wie an der Ratte, zum Nachteil, dass diese Tiergattung keine Havers-Systeme ausbildet. Dies schränkt die Beurteilbarkeit und Übertragungsfähigkeit von Ergebnissen auf größere Säugetiere und Menschen zusätzlich ein [79,89].

### 3.5 Metamizol-Natrium

#### 3.5.1 Grundlagen in Einführung und Anwendung

Metamizol-Natrium (Metamizol) ist derzeit das in Deutschland verfügbare stärkste nicht-Opioid-Analgetikum [65]. Es zählt zu den am häufigsten genutzten Schmerzmitteln in Stufe 1 des WHO-Stufenschemas [102]. Metamizol kann intramuskulär, intravenös, oral als Tabletten und Tropfen sowie rektal als Zäpfchen angewandt werden. Obgleich es seit 1922 auf dem deutschen Markt zur Behandlung von Schmerzen zur Verfügung steht, ist sein Wirkungsmechanismus weiterhin nicht abschließend geklärt [32,51]. Zur Anwendung kommt es sowohl als verschreibungspflichtiges Medikament (z. B. Deutschland) als auch als frei verkäufliches Präparat (z. B.: Russland, Israel und Brasilien) zur Therapie akuter und chronischer Schmerzen [90,102,127,132].



**Abbildung 2:** Strukturformel Metamizol-Natrium und der aktiven Metabolite 4-Methyl-Amino-Antipyrin und 4-Amino-Antipyrin [51]

N-Methyl-N-(2,3-dimethyl-5-oxo-1-phenyl-3-pyrazolin-4-yl)-aminomethansulfonsäure hat eine molare Masse von 311.36 g/mol. Die Summenformel lautet  $C_{13}H_{16}N_3NaO_4S$ .

Seine mittlere Halbwertszeit beträgt 2,5 Stunden [103].

### **3.5.2 Pharmakokinetik**

#### **3.5.2.1 Absorption**

Die Ausgangssubstanz Metamizol ist ein Prodrug und lediglich bei parenteraler Gabe nachweisbar. Bei i.v.-Applikation kann die inaktive Substanz nur für ca. 14 Minuten im Serum nachgewiesen werden [62,92,125]. Bei enteraler Gabe wurde ausschließlich die aktive Substanz und ihre teilweise inaktiven Metabolite im Blut gefunden. Es wird davon ausgegangen, dass die Ursprungssubstanz in mindestens 7 Zwischenprodukte zerfällt [125]. Bei oraler Gabe erfährt Metamizol im Magensaft eine Hydrolyse in 4-Methyl-Amino-Antipyrine (4-MAA). In dieser Form findet die Absorption im Gastrointestinaltrakt statt [62].

#### **3.5.2.2 Distribution**

Nach oraler Gabe von Filmtabletten wurde die Bioverfügbarkeit von 4-MAA im Magen-Darm-Trakt mit ca. 85 % Maximum der enteral verfügbaren Menge von 4-MAA ermittelt [73]. Der Peak der systemischen Konzentration wurde im Schnitt nach 1,2 Stunden bis 2,0 Stunden *post applicationem* ermittelt. Das Verteilungsvolumen liegt bei 1,15 l/kg fettfreier Körpermasse. Die vier Metabolite werden zu weniger als 60 % an Plasmaproteinen gebunden [73].

#### **3.5.2.3 Metabolismus**

Die durchschnittliche Eliminationshalbwertszeit für 4-MAA beträgt 2,6 Stunden bis 3,5 Stunden. Es wird mittels Oxidation in 4-Formyl-Amino-Antipyrin (4-FAA) sowie durch eine Isoform der Cytochrom P450 – Familie (CYP), das CYP3A4, in 4-Amino-Antipyrine (4-AA) weiter verstoffwechselt [28]. Bei 4-FAA handelt es sich um ein Endprodukt der Verstoffwechslung. 4-AA hingegen erfährt anschließend eine Acetylierung zu 4-Acetyl-Amino-Antipyrine 4-AAA. Dieser Vorgang wird durch die polymorphe N-Acetyltransferase katalysiert und findet im Schnitt nach einer Halbwertszeit von 3,8 Stunden bis 5,5 Stunden statt. Die zeitliche Differenz entsteht durch die individuelle Veranlagung des Patienten, wie schnell die Acetylierung in seinem Organismus stattfindet [73].

### 3.5.2.4 Elimination

Ein Nachweis renaler Ausscheidung gelang nach aktuellem Stand für die vier zuvor beschriebenen Metabolite 4-MAA, 4-FAA, 4-AA, 4-AAA. Die Menge der nachgewiesenen Ausscheidungssubstanzen entsprach in etwa 60 % der aufgenommenen Stoffmenge. Die Clearance von 4-MAA nahm unter wiederholter Einnahme um bis zu 22 % ab, ebenso konnte eine Degression der Clearance in Abhängigkeit der Leberfunktion und des Alters des Organismus nachgewiesen werden (bis zu 33 %) [73].

### 3.5.2.5 Pharmakogenetik

Wie schon im Kapitel 3.5.2.3 „Metabolismus“ beschrieben, ist die Geschwindigkeit der Acetylierung von 4-AA zu 4-AAA abhängig von der individuellen Effizienz des jeweiligen Konsumenten, mit der die N-Acetyltransferase arbeitet. Es muss an dieser Stelle beachtet werden, dass 4-AA eine aktive Form darstellt, jedoch nicht den einzigen aktiven Metaboliten von Metamizol [73]. Zusätzlich hat Metamizol die Eigenschaft, diverse Stoffwechsellenzyme zu beeinflussen [7]. So konnte nachgewiesen werden, dass Metamizol diverse CYP-Enzyme induziert und CYP1A2 hemmt. Hierbei sei darauf hingewiesen, dass CYP3A4, welches ebenfalls eine Induktion erfährt, zugleich bei der Biotransformation von 4-MAA zu 4-AA aktiv ist [7].

## 3.5.3 Pharmakodynamik

### 3.5.3.1 Wirkung

Metamizol hat neben der analgetischen Wirkkomponente auch antipyretische und spasmolytische Eigenschaften. Die Wirkungsweise ist bis heute nicht endgültig geklärt, nachgewiesen werden konnten jedoch unter anderem folgend genannte Einflüsse:

- Angriff am Endocannabinoid-System: Rogosch *et al.* konnten 2012 in einer Untersuchung zeigen, dass Metamizol einen Einfluss auf das Endocannabinoid-System hat und hierüber sowohl für die schmerzstillende als auch die spasmolytische Wirkung einen Erklärungsansatz liefert [62,103].
- Angriff an Opioid'ergen Rezeptoren: Ein Einfluss von Metamizol auf endogene Opioid-Rezeptoren konnte in Studien ebenfalls nachgewiesen werden [122,124].
- Hemmung der Cyclooxygenasen: Bei den Untersuchungen zur Hemmung der Cyclooxygenasen (COX) konnte gezeigt werden, dass sowohl die COX-1 als auch die COX-2 eine Hemmung durch Metamizol erfahren [15,51,98]. Die höchste Potenz in der Hemmung der Cyclooxygenasen wurde in Studien für die COX-3 gezeigt [17], in

anderen Untersuchungen konnte dies jedoch nicht verifiziert werden [51,103]. Ungeachtet der Präferenz für einzelne Cyclooxygenasen bietet das Ansprechen der COX-3 einen Erklärungsansatz für die Wirksamkeit von Metamizol. Die COX-3 findet sich nach mRNA-Analysen an humanen Gewebeproben in hoher Konzentration vor allem im zentralen Nervensystem (zerebraler Kortex) und am Herzen. Somit würde dies einen zentralen Effekt auf die Nozizeption als Erklärungsansatz liefern.

### 3.5.4 Gegenanzeigen und Nebenwirkungen

Als Beispiel für Gegenanzeigen zur Anwendung und der Nebenwirkungen werden hier gekürzt Angaben aus der Fachinformation für „Novaminsulfon-ratiopharm® 500 mg Tabletten – ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland“, mit Stand der Informationen vom Januar 2017, sowie aus dem Eintrag der „Gelben Liste“ zu „Metamizol“ mit Stand vom 03.02.2019 angegeben [92,101]:

#### 3.5.4.1 Gegenanzeigen

- Überempfindlichkeit gegen den Wirkstoff oder andere Pyrazolone bzw. Pyrazolidine
- Patienten mit bekanntem Analgetika-Asthma-Syndrom oder Analgetika-Intoleranz
- Störungen der Knochenmarkfunktion
- Genetisch bedingter Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel
- Akute intermittierende hepatische Porphyrie
- Letztes Drittel der Schwangerschaft
- Stillzeit
- Kinder unter 4 Jahren oder Körpergewicht unter 16kg

#### 3.5.4.2 Nebenwirkungen

Häufigkeit	Art der Nebenwirkungen
<b>Gelegentlich</b>	Hypotensive Reaktionen bis hin zu schwerem Blutdruckabfall Fixes Arzneimittelexanthem Rotfärbung des Urins (harmlos)
<b>Selten</b>	Leukopenie Anaphylaktische/ anaphylaktoide Reaktion Ausschlag (makulopapulöses Exanthem)
<b>Sehr selten</b>	Agranulozytose, einschließlich Todesfälle Thrombozytopenie Analgetika-induziertes Asthma-Syndrom

	Stevens-Johnson-Syndrom oder toxische epidermale Nekrolyse Akute Verschlechterung der Nierenfunktion bis hin zu akutem Nierenversagen Akute interstitielle Nephritis
<b>Unbekannte Häufigkeit</b>	Aplastische Anämie Anaphylaktischer Schock Panzytopenie, einschließlich Todesfälle Kounis-Syndrom Gastrointestinale Blutungen

**Tabelle 1:** Auflistung Nebenwirkungen Metamizol [92,101]

### 3.6 Ischämie

Zur Induktion einer Ischämie am Mausmodell stehen verschiedene Operationstechniken zur Verfügung, welche in Abhängigkeit von der Schwere der zu induzierenden Ischämie ausgewählt werden können [4]. Ziel dieser Methoden war es vor allem, die Therapiemöglichkeiten der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) zu untersuchen. Die hierbei gemessenen Veränderungen wurden in der Regel in Bezug auf Angiogenese, Neovaskularisierung und Kollateralenbildung betrachtet [4,95,117].

Menger, Stutz *et al.* beschäftigen sich zum ersten Mal mit den Auswirkungen von Ischämien verschiedener Schweregrade auf die Frakturheilung im Mausmodell [82]. Orientierend an den Arbeiten von Parikh *et al.* und Tang *et al.* fand ein Vergleich zweier Ischämie-Modelle statt, in dem eine „schwere“ und eine „leichte“ Ischämie am Hinterlauf der Maus hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Frakturheilung des Femurs untersucht wurden [95,117].

Parikh *et al.* hatten in ihrer Arbeit ein Modell zur standardisierten Erzeugung einer Gangrän am Hinterlauf der Maus etabliert. Hierzu wurde eine Ligatur der A. femoralis nach Abgang der A. iliaca interna vorgenommen. Als Ergebnis konnte eine reproduzierbare Gangrän des distalen Hinterlaufes erzeugt werden [95].

Tang *et al.* forcierten die Entstehung von Nekrosen und Wundheilungsstörungen an der unteren Extremität, indem sie die A. femoralis direkt distal des Leistenbandes mittels Fadenligatur verschlossen. Eine weitere Ligatur proximal der poplitealen Gabelung ermöglichte anschließend die Resektion der Arterie zwischen den beiden Ligaturen. Auch diese Methode ermöglichte eine reproduzierbare Ischämie [117].

Die dieser Studie voran genannte Untersuchung von Menger, Stutz *et al.* kam zu dem Ergebnis, dass eine „milde“ Ischämie durch Fadenligatur der A. profunda femoris im Hinblick auf die Untersuchungen zur Auswirkung auf die Frakturheilung am Femur am sinnvollsten ist [82].

Die A. profunda femoris stellt die dominante Versorgung der medialen Oberschenkelmuskulatur, des Femurs, von Biceps femoris und Hüftgelenk [70]. Zudem beeinflusst sie nicht die drei Haupt-Kollateralen für die Versorgung des Hinterlaufes [70,82].

### **3.7 Zielsetzung**

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von Metamizol auf die Frakturheilung im murinen Ischämiemodell zu untersuchen.

### **3.8 Fragestellung**

Die untersuchte Nullhypothese lautet:

**„Metamizol hat keinen Einfluss auf die Frakturheilung in der Maus unter ischämischen Bedingungen.“**

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Methoden

#### 4.1.1 Studiendesign

Es handelt sich um den Tierversuch Nummer 35/2020, welcher vom

Landesamt für Verbraucherschutz  
Abteilung Lebensmittel- und Veterinärwesen  
- Zentralstelle -  
Konrad-Zuse-Straße 11  
66115 Saarbrücken

behördlich genehmigt wurde. Die Durchführung erfolgte nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes am

Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie  
der Universität des Saarlandes  
Gebäude 65  
66421 Homburg.

In Summe wurden 44 CD-1<sup>®</sup> Mäuse (Elternstamm: CD-1<sup>®</sup> IGS Mouse, Nomenklatur: Crl: CD1 (ICR) Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) untersucht. Nach Aufteilung in 2 Gruppen erhielten die Tiere täglich 50 mg/kg Körpergewicht Metamizol *per os* (n=23, Metamizol-Gruppe: Verum). Der Kontroll-Gruppe wurde die äquivalente Menge Natriumchlorid *per os* (n=21, Kontroll-Gruppe) appliziert.

Um den Einfluss von Metamizol auf die Frakturheilung im Heilungsverlauf besser einschätzen zu können, wurde der Progress zu zwei Zeitpunkten erfasst. Jeweils 2 und 5 Wochen postoperativ erfolgten biomechanische, histomorphometrische, radiologische und  $\mu$ CT-Untersuchungen (Tabelle 2). Aus dem Kallusgewebe der 2-Wochen-Gruppen erfolgten zusätzlich proteinbiochemische Untersuchungen auf Wachstumsfaktoren. Zum Ende der 5-wöchigen Standzeit schloss sich in der Verum-Gruppe eine laborchemische Bestimmung der Serumkonzentration von 4-AA und 4-MAA an. Die Auswahl der Untersuchungszeitpunkte ergab sich aus dem Zeitpunkt des größten zu erwartenden Kallusdurchmessers (2 Wochen), sowie der anzunehmenden knöchernen Konsolidierung des murinen Frakturspalts (5 Wochen) [78].

Die Aufteilung der Gruppen stellte sich zusammenfassend wie folgt dar:

Versuchsgruppe	Kontrolle		Metamizol	
	2 Wochen	5 Wochen	2 Wochen	5 Wochen
Röntgen/ $\mu$ CT				
Biomechanik	n=8	n=8	n=10	n=8
Histologie				
Proteinbiochemie	n=5	-	n=5	-

**Tabelle 2:** Gruppeneinteilung Versuchstiere

#### 4.1.2 Tiermodell

Die Durchführung der Studie erfolgte an erwachsenen Tieren eines CD-1<sup>®</sup>-Stammes beider Geschlechter im Alter von 3-6 Monaten. Die Unterbringung und Versorgung der Tiere erfolgte am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar. Die Haltungsbedingungen umfassten klimatisierte Räumlichkeiten (relative Luftfeuchte: 60 % bei einer Lufttemperatur von 22 °C bis 24 °C) mit einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus. Futter (1320 Haltdiät für Ratten und Mäuse, Altromin Spezialfutter GmbH&Co. KG, Lage, Deutschland) in Pelletform und Wasser in Nippelflaschen waren ad libidum verfügbar. Am Operationstag und bei Bedarf wurde o.g. Futter auch eingeweicht zur Verfügung gestellt, um die Nahrungsaufnahme zu erleichtern. Sofern möglich erfolgte die Haltung der Tiere in Gruppen mit Geschwistertieren gleichen Geschlechts. Bei Bedarf konnte eine Einzelhaltung erfolgen. Die Haltung erfolgte in Kleintierkäfigen mit Nistmaterial.

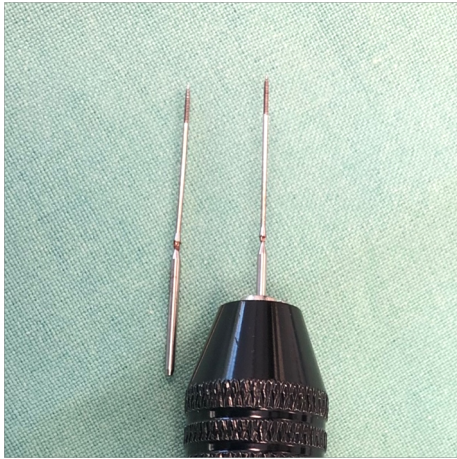
Vom ersten Tag präoperativ bis zum Tag des Ausbaus der Femora mit vorangegangener Tötung der Tiere erfolgte täglich eine strukturierte Beobachtung nach § 9 Abs. 5 TierSchG zur Ermittlung der Belastung der Tiere mit ggf. Anpassung der Schmerzmedikation oder Abbruch gemäß der im Tierschutzantrag festgelegten Abbruchkriterien.

#### 4.1.3 Operationsverfahren

Zunächst wurden die Tiere mit Ketamin (Ursostamin<sup>®</sup> 100 mg – Serumwerke Bernburg, Bernburg, Deutschland) mit 75 mg/kg Körpergewicht und Xylazin (Rompun<sup>®</sup> 2 % Xylazinhydrochlorid als Xylazin, Elanco-GmbH, Cuxhaven, Deutschland) in der Dosierung 15 mg/kg Körpergewicht *intrapitoneal* narkotisiert. Es schloss sich die Rasur der rechten unteren Extremität sowie der zur erwartenden Durchtrittsstelle des Führungsdrahtes an. Das rasierte Bein wurde zudem anschließend mit Enthaarungscreme (asid-med<sup>®</sup> – ASID BONZ GmbH, Herrenberg, Deutschland) enthaart (Abbildung 4). Am OP-Platz lagen die Tiere auf dafür vorgesehenen Wärmematten, um starkes Abkühlen des Organismus zu verhindern. Zum

Schutz der Hornhaut vor Austrocknung und Irritation wurde diese mit Dexpanthenol-Salbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe – Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) benetzt. Nach ausführlicher Hautdesinfektion mit alkoholischer Sprühdesinfektion (Octeniderm® – Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland) wurde das Bein mit Daumen und Zeigefinger der linken Hand fixiert. Es erfolgte an der medialen Laufseite, kranial der Patella, eine Inzision von 6 mm Länge parallel in Verlaufsrichtung der durch die Haut scheinenden A. und V. femoralis mit einer Skalpellklinge (Carbon Steel Skalpellklingen #15 – Braun Aesculap AG&Co KG, Tuttlingen, Deutschland). Nach vorsichtigem Lösen der Haut vom darunterliegenden Gewebe konnte entlang des Gefäß-Nervenbündels, bestehend aus A., V. und N. femoralis, die Abzweigung der A. profunda femoris aufgesucht und mittels stumpfer Sonde und Splitterpinzette freigelegt werden. Abgangsnah wurde nun die A. profunda femoris mittels doppelter Fadenligatur verschlossen, um eine milde Ischämie der rechten unteren Extremität zu induzieren [82]. Als Faden wurde ein Seidenfaden (Seide schwarz 6/0 USP, Seidenfaser nicht resorbierbar, geflochten, Resorba®, Nürnberg, Deutschland) genutzt (Abbildung 6). Es erfolgte dann die Mobilisation des Hautschnitts über das Kniegelenk (Abbildung 7). Daran anschließend wurde die Kniegelenkkapsel mittels Inzision medial der Patella eröffnet und die Femurkondylen durch Lateralisation der Quadrizepssehne mit Patella unter Zuhilfenahme eines Wattetupfers bei gestrecktem Lauf freigelegt. Durch Beugung des jetzt offenen Kniegelenks wurde die Fossa intercondylaris vollständig zugänglich (Abbildung 8). Bei weiterhin zwischen Daumen und Zeigefinger fixiertem Unterschenkel konnte mit dem Mittelfinger der linken Hand eine Basis gebildet werden, welche für den folgenden Schritt als Gegenlager notwendig war. Um den Markraum zu erreichen wurde die knöcherne Deckung der Fossa intercondylaris mittels einer 24 Gauge Spritzkanüle (BD Microlance 3™ - 24 Gauge 1" – Nr. 17, Ø 0,55x25 mm – BD Drogheda, Irland) unter oszillierender Bewegung zwischen Daumen und Zeigefinger der rechten Hand eröffnet und mit der Kanüle der Markraum des Femurs retrograd penetriert (Abbildung 9). Nach Wechsel auf eine 27 Gauge Dental-Anästhesiekanüle (Sterican® Einmalkanüle für die Dental-Anästhesie – O./U.-Kiefer, Leitungsanästhesie – Größe 30/42 – Gauge 27x1 1/2 / Ø 0,40x40 mm, Braun, Melsungen, Deutschland) mit ebenfalls retrograder Durchführung des zuvor eröffneten Markraumes schloss sich die Durchbohrung des Trochanter major und Durchstechung der Haut in Verlängerung des Stichkanals an. Im nächsten Schritt wurde nach Entfernung der Dentalkanüle ein Wolfram-Führungsdraht (GuideTube 0,30/0,20 mm – RISystem AG, Davos, Schweiz) durch den Markraum und die Hautinzision geführt (Abbildung 10, Abbildung 11). Die radiologische Lagekontrolle wurde vor Frakturierung des Femurs vorgenommen (Abbildung 12). Anschließend erfolgte eine geschlossene Frakturierung des Femurs mit einer stumpfen Guillotine im mittleren Femurdrittel (Abbildung 13). Ziel war eine Fraktur gemäß AO-Systematik A2 bis A3 [85]. Nach darauffolgender Röntgenkontrolle zur Sicherung der Fraktur

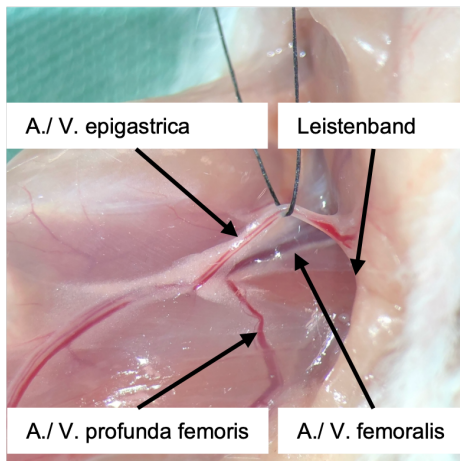
(Abbildung 14) erfolgte die Stabilisierung mittels einer intramedullären Zugschraube aus medizinischem Stahl (MouseScrew™ – RISystem AG, Davos, Schweiz; Länge: 17,2 mm, Durchmesser 0,5 mm) (Abbildung 3). Hierzu wurde die Spitze der Zugschraube in den hohlen Führungsdraht eingesetzt (Abbildung 15) und mit schraubender Bewegung durch den Markraum über die Frakturstelle hinweg bis zum proximalen Ende des Trochanter major geführt. Dort fasste das Gewinde im Bereich der zuvor erzeugten Knochenpunktion. Unter Zug durch das Festschrauben der MouseScrew™ kam es zu einer Kompression der Frakturrenden (Abbildung 16). Bei ausreichendem Zug kam es in der Folge zum Abdrehen der im Bohrfutter fixierten Schraubenaufnahme, sodass hierbei auch eine definierte Krafteinwirkung auf den Frakturspalt erzeugt wurde [60]. Nach Röntgenkontrolle (Abbildung 17) von Lage und Fixierung der Schraube wurde zum Abschluss die Kniegelenkkapsel durch Reposition der Patella mit Fixierung via Einzelknopfnähten (Abbildung 18) sowie eine Hautnaht mit Einzelknopffäden (Abbildung 19), jeweils mittels 5–0 Prolene®-Faden (Ethicon Inc., Somerville, USA), durchgeführt. Bis zum Wiedererlangen des Bewusstseins wurden die Tiere vor einer Infrarot-Rotlichtlampe in ihren Kleintierkäfigen abgelegt und beobachtet.



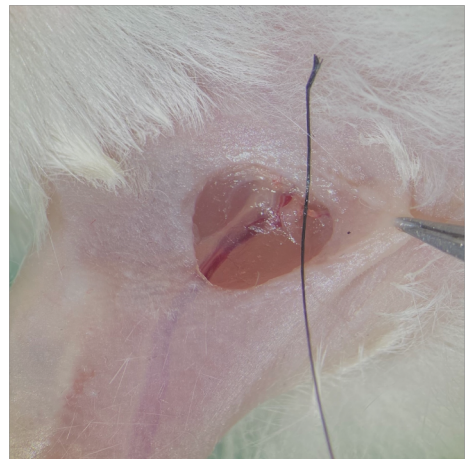
**Abbildung 3:** intramedulläre Zugschraube in Bohrfutter



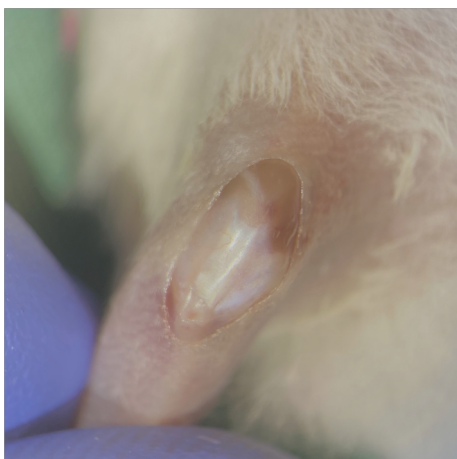
**Abbildung 4:** Hinterlauf nach Vorbereitung



**Abbildung 5:** Darstellung Gefäßversorgung untere Extremität der Maus



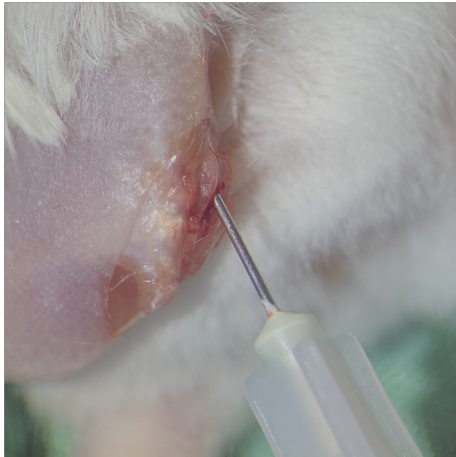
**Abbildung 6:** Freigelegte A. profunda femoris mit unterlegtem Ligaturfaden



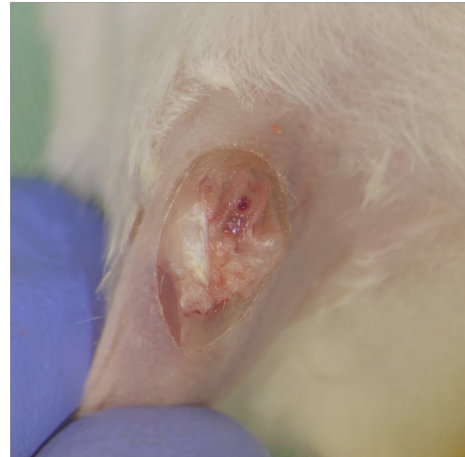
**Abbildung 7:** Darstellung der Patellarsehne vor Eröffnung der Kniegelenkscapsel



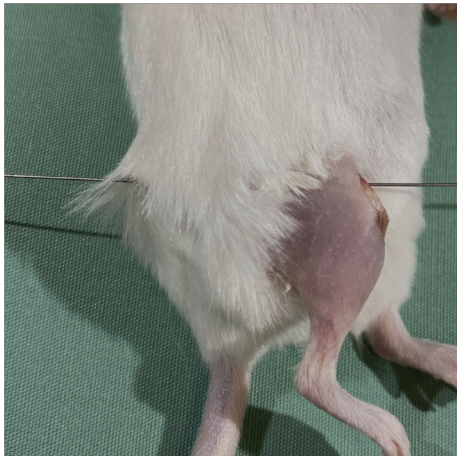
**Abbildung 8:** Blick auf die Femurkondylen nach Lateralisation der Patella



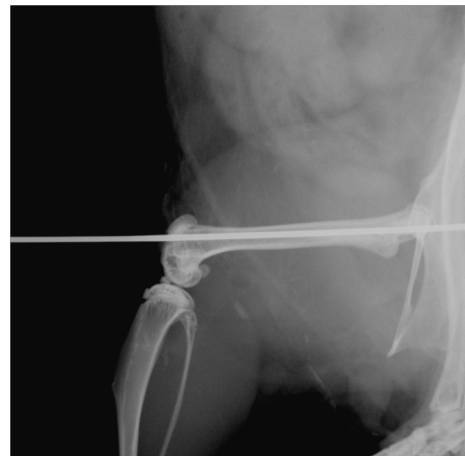
**Abbildung 9:** Eröffnung des Markraumes



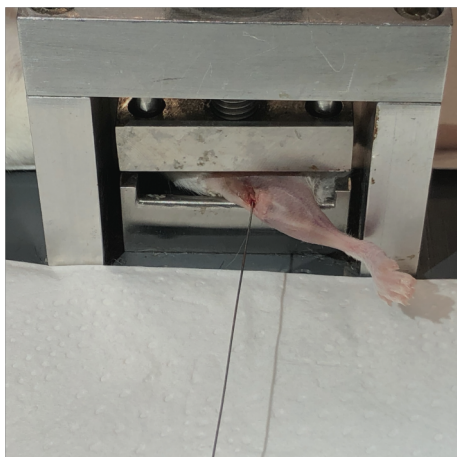
**Abbildung 10:** Zustand nach Eröffnung des Markraumes



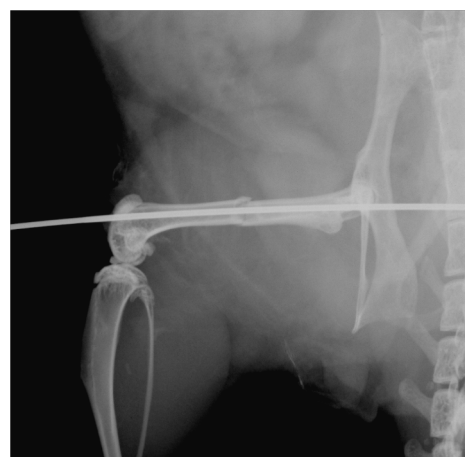
**Abbildung 11:** Eingelegter Wolframdraht



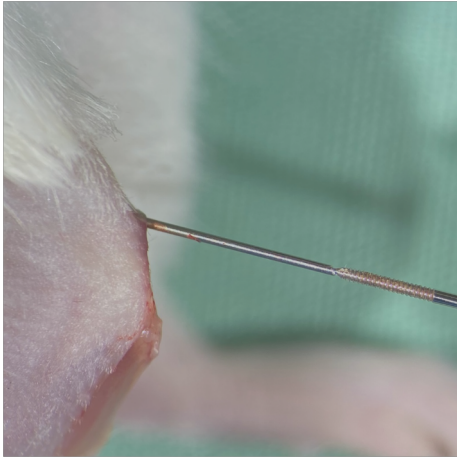
**Abbildung 12:** Radiologische Lagekontrolle



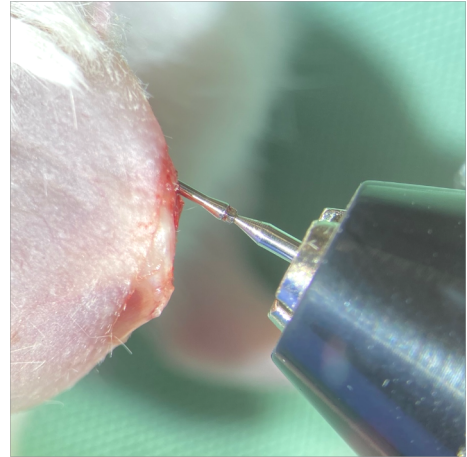
**Abbildung 13:** Anwendung der stumpfen Guillotine



**Abbildung 14:** Radiologische Darstellung nach Frakturherzeugung



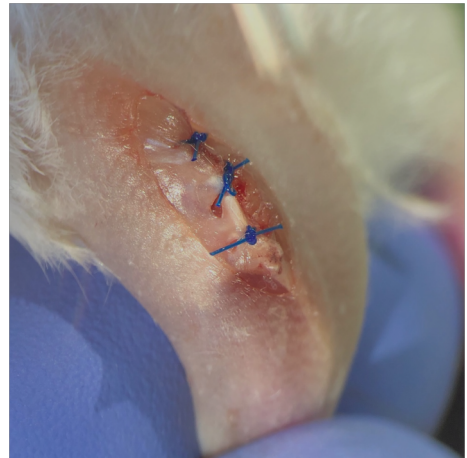
**Abbildung 15:** Zuführung der intramedullären Zugschraube über Führungsdraht



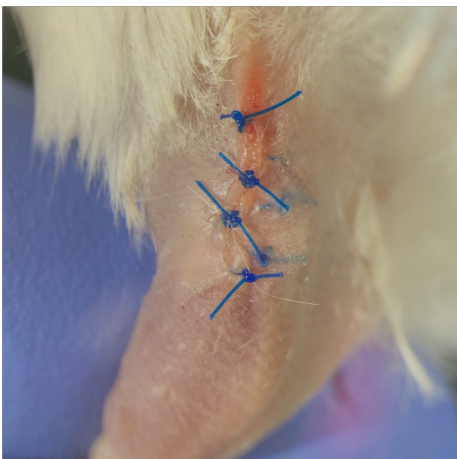
**Abbildung 16:** Bohrfutteraufnahme mit Sollbruchstelle am distalen Konus kurz vor vollständiger Applikation der Schraube



**Abbildung 17:** Radiologische Abschlusskontrolle



**Abbildung 18:** Kapselnaht Kniegelenk



**Abbildung 19:** Hautnaht

#### **4.1.4 Medikation**

Am Vortag der OP wurde das Trinkwasser durch mit Tramal (Tramal Tropfen 100 mg/ml Lösung zum Einnehmen – Grünenthal GmbH, Stolberg, Deutschland) 1 mg/ml angereichertem Trinkwasser ersetzt. Dieses erfolgte regelhaft bis Tag 3 post-OP, konnte jedoch bei Bedarf nach Einschätzung entsprechend den täglichen Kontrolluntersuchungen fortgeführt werden. Ab dem Vor-OP-Tag erhielten die Versuchstiere der Verum-Gruppe die körpergewichtsadaptierte Menge Metamizol. Die Kontroll-Gruppe erhielt äquivalent die reine Trägerlösung NaCl 0,9 % (isotone Kochsalzlösung 0,9 % – Braun, Melsungen, Deutschland) appliziert. Am OP-Tag selbst wurde zusätzlich Rimadyl® (Rimadyl 50 mg/ml Carprofen, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) in der Dosis 5 mg/kg Körpergewicht subkutan in die Nackenfalte appliziert, nachdem die Tiere zuvor mit Ketamin und Xylazin *intraperitoneal* narkotisiert worden waren.

Postoperativ erhielten die Mäuse zusätzlich 1% des Körpergewichts in ml NaCl 0,9% Lösung zum Volumenerhalt s.c..

#### **4.1.5 Tötung der Versuchstiere**

Für den Ausbau der Femora erfolgte die Tötung der Versuchstiere. Hierzu wurden diese einer Überdosis Narkosemittel ausgesetzt, um anschließend in Narkose ein Überstrecken des Nackens mit Dislokation der Wirbelsäule vorzunehmen.

#### **4.1.6 Präparation der Knochen**

Am Ende der Standzeit erfolgte der Ausbau beider Femora am zuvor gestreckten Versuchstier. Hierzu wurden die Hinterläufe mit zwei Schnitten T-förmig eröffnet: ein Schnitt distal parallel zum Leistenband, ein weiterer im Verlauf des Femurs, mit Verbindung beider Schnitte auf Höhe des Hüftgelenks. Es folgte die stumpfe Freilegung des Knochens durch entsprechende Präparation des M. quadrizeps femoris. Die Muskelansätze am Knochen wurden vorsichtig mit einer Skalpellklinge möglichst nah der knöchernen Ansatzstelle abgetrennt. Ebenso wurden die Gelenkkapseln an Hüft- und Kniegelenk vorsichtig eröffnet, mit anschließender Herauslösung aus der Gelenkpfanne der Hüfte. Am nun freien Knochen wurden verbliebene Gewebereste mittels Splitterpinzette abgelöst, bis keine fassbaren Weichteilelemente mehr vorhanden waren.

Für die Probengewinnung der biochemischen Analyse mittels Western-Blot wurde der weiche Kallus ebenfalls mit einer Splitterpinzette abgetragen.

Nach Abschluss der Reinigung des Knochens erfolgte die Explantation der Schraube mittels einer dafür vom Hersteller angefertigten Ausbauhilfe.

Während des gesamten Prozesses wurde der Knochen regelmäßig mit Kochsalzlösung NaCl 0,9 % befeuchtet und bis zum abgeschlossenen Ausbau der Gegenseite in einer mit Kochsalzlösung getränkten Kompresse eingeschlagen.

Nach Durchführung der biomechanischen und radiologischen Vergleichskontrollen der beiden Femora eines jeden individuellen Versuchstieres erfolgte die Lagerung des frakturierten Knochens in einem Einzelgefäß, bis zur Deckung des Knochens gefüllt mit Formalin (Formalin 4 %, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Jene Knochen, die nicht zu weiteren Untersuchungen genutzt wurden, konnten hiernach einer entsprechend spezialisierten Entsorgung zugeführt werden.

## **4.2 Auswertung der Zielkriterien**

### **4.2.1 High-Performance-Liquid-Chromatographie**

Da bisher keine Studien zur Erfassung der Serumwerte der Metamizol-Metabolite bestand, wurden deren Level in einer laborchemischen Analyse ermittelt.

Um untersuchen zu können, ob Metamizol in der Maus vergleichbare Konzentrationen zum Menschen erreicht, wurde eine Analyse der Serumlevel mittels High-Performance-Liquid-Chromatographie (HPLC) durchgeführt. Als Referenz wurden die Werte aus der Studie von Hinz *et al.* herangezogen [51]. Orientierend an den in dieser Studie durchgeführten Zeitintervalle erfolgte die Entnahme der Blutproben an der Maus nach 30, 60 und 90 Minuten nach der oralen Gabe von Metamizol mittels Schlundsonde.

#### **4.2.1.1 High-Performance-Liquid-Chromatographie-Ultra-Violett Analyse**

Die Analysemethodik erfolgte gemäß der zuvor von Domínguez-Ramírez *et al.* sowie von Giorgi *et al.* etablierten Methode zur Bestimmung der Serumlevel-Konzentrationen von Metamizol am „Departement of Veterinary Sciences“ der Universität von Pisa, San Piero a Grado, Pisa, Italien durch Herrn Prof. Mario Giorgi sowie Frau Dr. Irene Sartini des „Departement of Veterinary Medicine“ der Universität von Sassari, Sassari, Italien [28,39,40]. Bei der Anwendung der zitierten Methodik kam es abweichend in der vorliegenden Arbeit zur Nutzung folgender Geräte:

Das HPLC-System war ein LC Jasco mit einer HPLC-Pumpe PU-980, einem in-line-Entgaser DG-2080-53, einem Diodenarray-Detektor MD-1510, sowie einem Autosampler AS-2055 und einem Peltierelement CO-4062, alles von Jasco (Jasco Corporation Via Luigi Cadorna 1 - 23894 Cremella (LC), Italien).

#### 4.2.1.2 Extraktion

Die Probenextraktion erfolgte in einer 15 ml Polypropylen-Probenflasche. Zu 0,5 ml Plasma wurden 100 µl Internal Standard Solution (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) gegeben und für 30 Sekunden durch Vortexen vermischt. Anschließend wurde 0,1 ml Natronlauge 1 N (Natronlauge for 1000 ml. c (NaOH) = 1 mol/l (1 N) Titrisol<sup>®</sup>, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben und ebenso vermischt. 4 ml Ethylacetat:Methylenchlorid (beides Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) (3:7, v/v) wurden hinzugegeben. Es folgte erneutes Vortexen für 30 Sekunden, dann Schwenken (60 Oszillationen/Minute, 10 Minuten) und anschließend wurde die Mischung für 10 Minuten bei 10 °C bei 10,956 G in einer Zentrifuge mit 5 cm Rotor-Radius zentrifugiert. Von der organischen Schicht wurden 3 ml abgenommen und in eine neuen 15 ml Flasche gegeben. In dieser wurde sie bei 40 °C unter Stickstoff-Bedampfung getrocknet und anschließend mit 100 µl der mobilen Phase erneut aufgelöst. 50 µl dieser Lösung wurden anschließend zur Analyse der HPLC zugeführt.

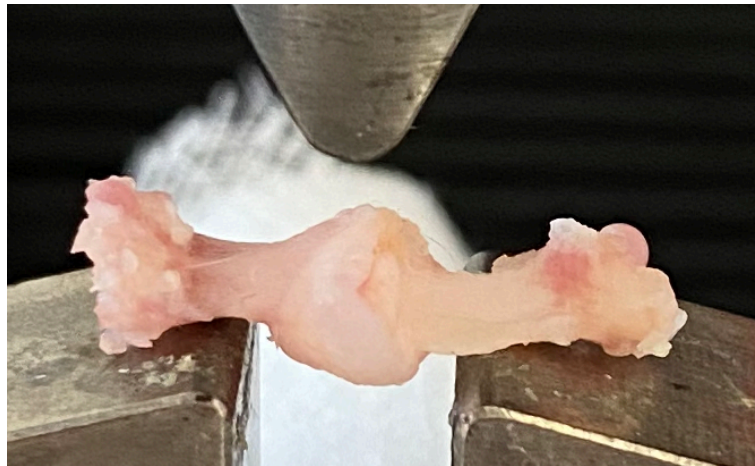
#### 4.2.1.3 Daten zur Validation der Ergebnisse

Sowohl für 4-MAA und 4-AA lag die Nachweisgrenze bei 0,03 µg/ml und die Bestimmungsgrenze bei 0,05 µg/ml. Die Konzentrationen zur Kurvenkalibrierung wurden für beide bei 0,05 – 0,1 – 0,25 – 0,5 – 1 – 5 und 10 µg/ml festgelegt. Der Bereich der optimalen Linearität (Regressionslinien) wurde für 4-MAA in der Breite von  $y = 0,1749x - 0,0547$  ( $r^2 = 0,9989$ ) und bei 4-AA im Bereich von  $y = 0,3291x - 0,0293$  ( $r^2 = 0,9995$ ) festgelegt. Die Wiederfindungsrate bewegte sich für 4-MAA in einem Bereich von 90,1 – 95,2 % und für 4-AA von 93,9 – 97,1 %. Der Variationskoeffizient der Intraday und Interday-Präzision lag unter 8,1 % und 6,8 % beziehungsweise unter 9,9 % und 9,4 % für 4-AA und 4-MAA.

#### 4.2.2 Biomechanik

Nach Entfernung der stabilisierenden Femurschraube und der vollständigen Präparation der Knochen zur Reduktion von Einflüssen durch Weichteilresiduen erfolgte die Messung der Biegesteifigkeit. Hierzu wurden zum Vergleich beide Femora einer Maus einzeln in eine 3-Punkt-Biegetestung (Mini-Zwick Z 2.5 – Zwick GmbH, Ulm, Deutschland) zerstörungsfrei einer Belastungsprobe unterzogen. Ziel war die Feststellung der Belastbarkeit des Kallus in absoluten Werten als absolute Biegesteifigkeit  $F_x$  sowie relativ in Prozent, im Verhältnis zu einem nicht frakturierten Femur, als relative Biegesteifigkeit  $F_x/C$ . Zur Vergleichbarkeit aller Proben erfolgte die Auflage des Knochens jeweils mit der ventralen Seite nach unten, Ausrichtung des Hüftkopfes nach rechts, mittig der Auflagestempel bei einem Abstand der Stempel von 6 mm zueinander (Abbildung 20). Es erfolgte die Messung mit einer

Geschwindigkeit von 1 mm/min. Die Auswertung der Ergebnisse geschah jeweils am linearen Abschnitt im Kraft-Wege-Diagramm.



**Abbildung 20:** gereinigtes Femur in der Dreipunktbiegung

## 4.2.3 Radiologie

### 4.2.3.1 Röntgen

Zur Beurteilung der knöchernen Durchbauung des Kallus erfolgte eine Einteilung anhand von Röntgenbildern, welche direkt nach Ausbau der Femora vorgenommen wurden. Die Erstellung der Aufnahmen erfolgte in anterior-posteriorem Strahlengang (Spannung 26 kV, Belichtungszeit 10 Sekunden) (MX-20 – Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, IL, USA; Faxitron Sr 1.4.1 – Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, IL, USA). Als Maßgabe zur Beurteilung wurde der Röntgen-Goldberg-Score (RGBS) genutzt, welcher eine Einteilung der Frakturheilung anhand der knöchernen Durchbauung des Frakturspaltens vornimmt [41].



**Abbildung 21:** Röntgenkontrolle nach 5 Wochen

Punktwert	Interpretation
0	Keine Ossifikation
1	Partielle Ossifikation
2	Komplette Ossifikation

**Tabelle 3:** Goldberg-Score



**Abbildung 22:** Röntgenbild zur Bewertung nach Goldberg-Score

#### 4.2.3.2 $\mu$ CT

Ziel der mikrocomputertomographischen Diagnostik war die Auswertung des strukturellen Aufbaus des Kallus 2 und 5 Wochen postoperativ. Hierzu erfolgte die Aufnahme der Knochen in 9  $\mu$ m Schichtdicke (Skyscan High-Resolution *in vivo* X-Ray microtomograph, Bruker CT SkyScan Serie 1176, RJL Micro&Analytic GmbH, Karlsdorf-Neuthard, Deutschland) bei einer Röntgenspannung von 50 kV Stromstärke 200  $\mu$ A, Intervalle 0,4  $e$ Grad, Expositionszeit 2400 Millisekunden, Aluminiumfilter 0,5 mm. Die Speicherung der Aufnahmen erfolgte in dreidimensionalen Arrays, welche es ermöglichten, das Kallus-Areal zu konturieren. Aus dieser „Region of interest“ wurde dann mittels einer Software (CTAnalyser, Bruker, Billerica, MA, USA) anhand definierter Schwellenwerte zur Differenzierung zwischen Weich- und Knochengewebe die knöcherne Durchbauung ausgewertet. Dies ermöglichte die Ermittlung folgende Kenngrößen:

- Anteil Knochenvolumen am gesamten Kallusvolumen (BV/TV) in [%] errechnet aus

- „Bone Volume“ BV (knöchernes Gesamtvolumen) [mm<sup>3</sup>]
- „Tissue Volume“ TV (Gesamtvolumen des Kallus) [mm<sup>3</sup>]
- „Trabecular Number“ TbN (Trabekelanzahl) [1/mm]
- „Trabecular separation“ TbSp (Trabekelabstand) [mm]
- „Trabecular thickness“ TbTh (Trabekeldicke) [mm]

#### 4.2.4 Histomorphometrie

Im Anschluss an biomechanische Messung, Röntgen und  $\mu$ CT erfolgte die histologische Präparation der Knochen, um die Kalluszusammensetzung untersuchen zu können. Zudem war so auch eine histomorphometrische Erfassung der Kallusfläche und deren Zusammensetzung möglich.

Zur Fixierung wurden die Knochen daher zunächst 24 Stunden in einer 4 %igen Formalin-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingelegt. Danach wurden die Knochen entkalkt. Hierzu wurde eine 10 %ige EDTA-Lösung verwendet, in welcher die Präparate 14 Tage bei 4 °C lagerten. Anschließend konnten sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert werden (jeweils 1 Stunde bei 70 %, 80 %, 90 % und insgesamt 4 Stunden bei 100 %). Mit Xylol wurden die Knochen für weitere 3 Stunden vorbehandelt, um sie für Paraffin gangbar zu machen, in welches sie anschließend eingebettet wurden.

Am so vorbehandelten Knochen konnten dann die Schnitte vorgenommen werden. Hierzu wurde der Bereich mit dem größten Kallusdurchmesser gewählt, von dem dann 5  $\mu$ m dicke Schnitte in sagittal-longitudinaler Schnitfführung angefertigt wurden.

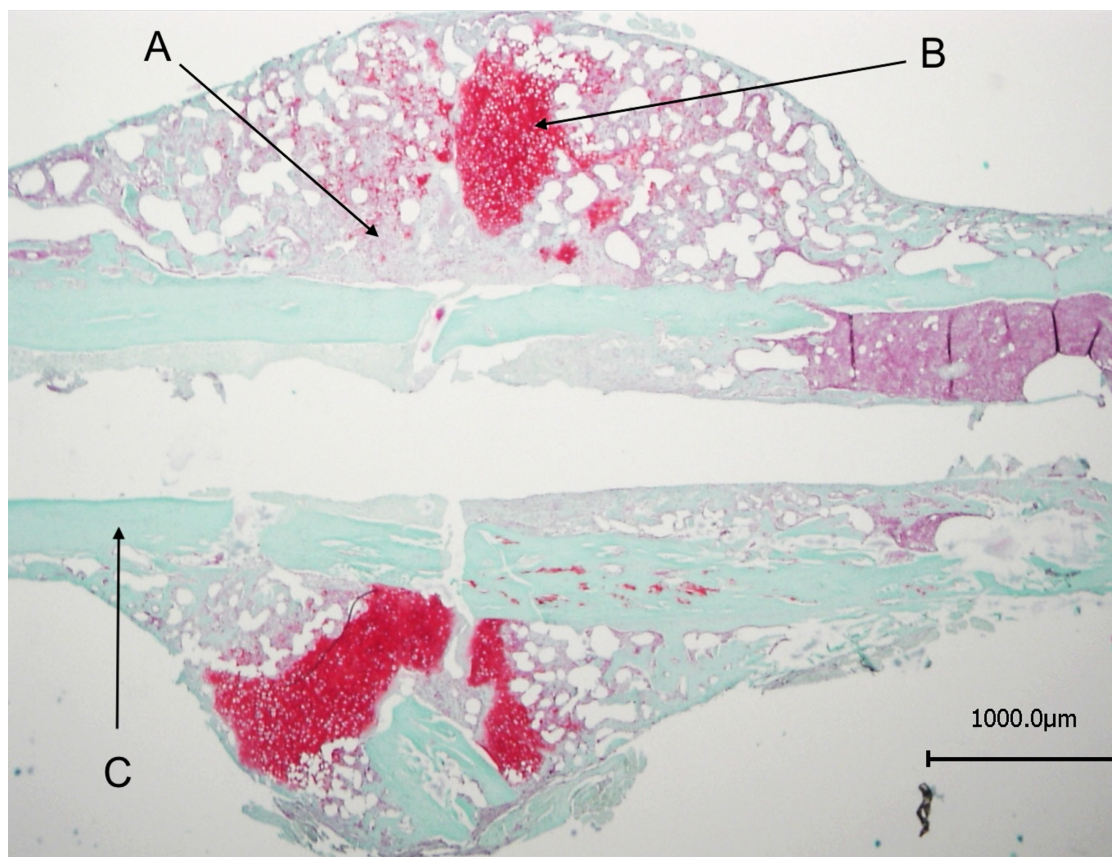
Es folgte die Färbung nach Safranin-O-Methode. Der Ablauf des Färbungsschemas stellt sich wie folgt dar:

1. 1 Minute Eisenhämatoxylin nach Weigert
2. Spülung mit Aqua destillata
3. Differenzierung mittels HCl-Alkohol
4. 5 Minuten bläuen in Leitungswasser
5. Spülung mit Aqua destillata
6. 4 Minuten 0,02 % „Fast green“
7. Abspülen mit 1 % Essigsäure
8. 5 Minuten 0,1% „Safranin-O“
9. Entwässerung mit Alkohol (ab 90% Alkohol)
10. Schwenkung in Xylol
11. Eindeckung in xylolhaltiges Eindeckmittel

Bei korrekter Anwendung stellt sich die Färbung der Gewebe wie folgt dar:

Gewebe	Färbung
Bindegewebe	Farblos/bleichrosa
Kerne	Schwarz
Knochen	Grün
Knorpel	rot

**Tabelle 4:** Farbschema bei Safranin-O-Färbung



**Abbildung 23:** Beispiel einer Safranin-O-Färbung am Femur im sagittalen Längsschnitt.  
Beschriftung: A) Bindegewebe B) Knorpel C) Knochen

Mit einem Keyence BioZero BZ8100 Fluoreszenzmikroskop (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) erfolgte die Aufnahme der histologischen Schnitte in 12,5facher Vergrößerung. Die Digitalisierung erfolgte mittels Zeiss Axio Vision 3.1 sowie Zeiss Axio Cam – Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Im Anschluss wurden die Bilder mittels eines Bildbearbeitungsprogramms (ImageJ Analysis System, U.S. National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) anhand der durch die Färbung unterscheidbaren Gewebearten ausgewertet.

Hierbei wurden folgende Parameter ermittelt:

- Knöcherner Fläche innerhalb des periostalen Kallus (TOTAr) [mm<sup>2</sup>]
- Periostale Kallusfläche gesamt (CAr) [mm<sup>2</sup>]

In Anlehnung an Gerstenfeld *et al.* wurde zudem die anteilige Knochenfläche am Kallus ( $\frac{TOTAr}{CAr}$  [%]) als Zielwert festgelegt [38].

#### 4.2.5 Proteinbiochemische Marker

Es erfolgte eine Analyse der Expression verschiedener Wachstumsfaktoren mittels Western-Blot. Die untersuchten Faktoren wurden im Kapitel 4.4 „Wachstumsfaktoren“ erläutert, eine kurze Auflistung findet sich im folgenden Abschnitt.

##### 4.2.5.1 Western-Blot

Um eine Auswirkung von Metamizol auf die Expression von Wachstumsfaktoren während des Knochenheilungsprozesses zu ermitteln, erfolgte 2 Wochen postoperativ die Analyse der Konzentrationen im Kallusgewebe mittels Western-Blot. Zum Abschluss der Heilungsphase nach 5 Wochen wurde keine derartige Analyse vorgenommen. Zur Analyse wurden folgende Faktoren bestimmt:

Faktor	Funktion
CD31	Angiogenesefaktor
Cyr61	Osteoblastenmaturation, Angiogenese
OPG	Bindung von RANKL, Schutz des Knochens vor Abbau
PCNA	DNA-Polymerase, Osteoklasten-Differenzierungsfaktor
RANKL	Osteoklasten-Aktivierungsfaktor
RUNX2	Osteoblasten-Differenzierungsfaktor

**Tabelle 5:** Faktoren der Western-Blot Analyse und ihre Funktion

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Lowry genutzt. Um die Analyse zu ermöglichen, wurden den Versuchstieren nach 14 Tagen Standzeit die frakturierten Femora, nach vorherigem Überstrecken in Narkose, ausgebaut. Zur Gewinnung der Proben wurde das weiche Kallusgewebe am ausgebauten Femur vorsichtig abgetragen und direkt in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung in Eppendorf-Gefäßen bei -80 °C gelagert. Die Proben wurden in einem Lysepuffer (Mengenangaben für 10 ml: 100 µl Tris(hydroxymethyl)aminomethan 1M pH 7,5, 20 µl NaCl 5M, 4 µl Ethylendiamintetraessigsäure 250 mM, 500 µl Triton™-X-100 10 %, 50 µl NaN<sub>3</sub>, mit destilliertem Wasser auf 10 ml aufgefüllt) (ca. 500 µl pro 100 mg Probengewebe) mit

Phenylmethylsulfonylfluorid 100 mM im Verhältnis 1:500 zum Endvolumen sowie Protease-Phosphatase-Inhibitor-Cocktail Cell-Signaling 5872 im Verhältnis 1:100 zum Endvolumen) für 20 Sekunden auf Eis homogenisiert (Micra Mini Batch Homogenisator, Micra GmbH, Heitersheim, Deutschland). Es folgte die Inkubation auf Eis für 30 Minuten und anschließend wurden die Proben bei 16.000 U/Minute für weitere 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Proteinlysate wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C auf Eis gelagert. Ein Teil davon wurde anschließend mit dem Probenpuffer nach Lämmli denaturiert und für die Beladung genutzt. Zur Trennung der Proteinproben wurden diese auf Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel intermittierend aufgetragen (5 µg Protein je Bahn), anschließend erfolgte die Übertragung auf Polyvinylidendifluorid-Membranen. Es folgte die Blockade der unspezifischen Bindungsseite mit Milchpulver. Nun konnten die Proben mit folgenden Primär-Antikörpern inkubiert werden:

- **CD31:** Hasen-IgG Antikörper (Cell signaling 77699, 1:1000, Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt am Main, Deutschland)
- **Cyr61:** Schaf IgG Antikörper (R&D AF4055, 1 µg/ml, R&D Systems, Minneapolis, USA)
- **OPG:** Ratten-IgG Antikörper (OPG MAB4591 Monoclonal Antibody, 1 µg/µl, R&D Systems, Minneapolis, USA)
- **PCNA:** HRP Mäuse IgG Antikörper (HRP-conjugated PCNA Monoclonal antibody Proteintech HRP-60097, 1000 µg/ml, Proteintech Germany GmbH, Planegg-Martinsried, Deutschland)
- **RANKL:** Hasen-IgG Antikörper (Anti-sRANKL antibody ab62516, 0,25-0,5 µg/ml, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich)
- **RUNX2:** Hasen-IgG Antikörper (Anti-RUNX2 antibody [EPR22858-106] - CHIP Grade, 1/1000, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich)

Nach Inkubation mittels Primär-Antikörpern erfolgte die Auftragung der jeweiligen Sekundär-Antikörper:

- **goat- $\alpha$ -rabbit IgG HRP** (HAF008, 1:500, R&D Systems, Minneapolis, USA)
- **goat- $\alpha$ -mouse IgG HRP** (P0447, 1:1500, Dako Agilent Technologies, California, USA)
- **rabbit- $\alpha$ -sheep IgG HRP** (P0163, 1:1000, Dako Agilent Technologies, California, USA)
- **goat- $\alpha$ -rat IgG HRP** (HAF005, 1:500, R&D Systems, Minneapolis, USA)

Um die erfolgreiche Beladung zu kontrollieren, wurde  $\beta$ -Aktin (Sc-47778  $\beta$ -Aktin HRP, 1:1000) für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg,

Deutschland) genutzt. Zum Abschluss erfolgte die Detektion der markierten Wachstumsfaktoren mittels Chemilumineszenz. Pro Membran wurden hierzu je 250  $\mu$ l ECL Detection Reagenz 1 und 2 (Clarity™ Western ECL Substrate #170-5060, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gemischt. Nach 1-minütiger Inkubation wurden die Proben im ChemoCam Imager (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) entwickelt.

### **4.3 Statistik**

Alle Daten werden als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Für parametrische Daten (Shapiro-Wilk-Test) wurde nach Bestimmung der Varianzgleichheit (Brown-Forsythe-Test) der Vergleich zwischen zwei Gruppen mit dem Student's t-Test durchgeführt. Die Analysen von drei Gruppen wurde durch einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, einschließlich der Korrektur des  $\alpha$ -Fehlers durch die Bonferroni-Korrektur, um Mehrfachvergleiche zu kompensieren. Bei nicht-parametrischen Daten wurde der Vergleich zwischen zwei Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, während die Analysen von drei Gruppen durch eine einfaktorielle ANOVA auf Rängen durchgeführt wurden, gefolgt von einem Dunn-Test für alle paarweisen Vergleiche. Die statistischen Auswertungen wurden mit der Software SigmaPlot 13.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) durchgeführt. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als Hinweis auf signifikante Unterschiede angesehen.

## 5 Ergebnisse

Die Versuche wurden durchgeführt an CD-1<sup>®</sup> Mäusen unterschiedlichen Wurfdatums im durchschnittlichen Alter von 130,36 Tagen  $\pm$  3,75 Tagen mit einem Gewicht von 41,41 g  $\pm$  6,12 g. Untersuchungen zu den Auswirkungen der Metamizol-Gabe erfolgten nach zwei (Biomechanik, Röntgen,  $\mu$ CT, Histologie, Western-Blot) sowie fünf (Biomechanik, Röntgen,  $\mu$ CT, Histologie, Serum-Level) Wochen post-operativ.

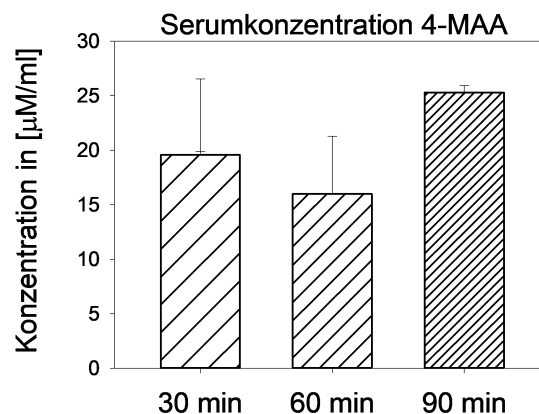
### 5.1 Serum-Level

In den Serumproben der untersuchten Mäuse (n = 4 bis 7 je Zeitabschnitt) konnten folgende Serumlevel der aktiven Metamizol-Metabolite 4-MAA und 4-AA festgestellt werden:

Zeit nach Gabe	4-MAA in $\mu$ M/ml	4-AA $\mu$ M/ml
30 Minuten	23,21 $\pm$ 7,46	4,13 $\pm$ 5,05
60 Minuten	17,65 $\pm$ 9,56	1,90 $\pm$ 1,94
90 Minuten	24,11 $\pm$ 3,69	9,59 $\pm$ 1,93

**Tabelle 6:** Serumlevel der Metabolite 4-MAA und 4-AA

Die Serumwerte zeigen im Vergleich der Werte nach 60 Minuten im Verhältnis zu den Werten nach 90 Minuten einen signifikanten Anstieg der Konzentration des aktiven Metaboliten 4-AA.



**Abbildung 24:** Serumkonzentration 4-MAA in  $\mu$ M/ml]. MW  $\pm$  SEM.

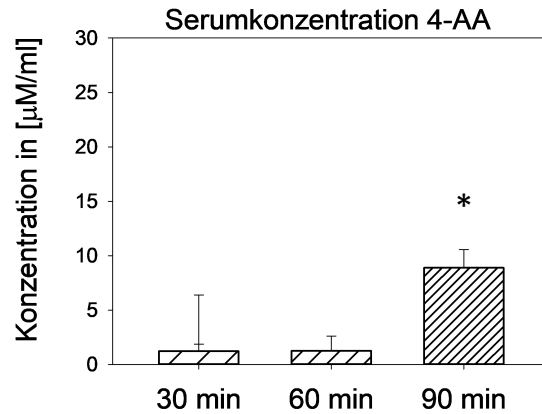


Abbildung 25: Serumkonzentration 4-AA in [µM/ml]. MW ± SEM. \*p<0,05 vs. 60 min

## 5.2 Biomechanik

Die biomechanische Testung der frakturierten (Fx) und unfrakturierten (C) Knochen durch Ermittlung der Biegesteifigkeit ergab keine signifikante Unterschiede in der Biegesteifigkeit zwischen beiden Untersuchungsgruppen zum jeweiligen Beobachtungszeitpunkt (2 Wochen und 5 Wochen), jedoch einen signifikanten Anstieg der Biegesteifigkeit innerhalb der Untersuchungsgruppen nach 5 Wochen im Vergleich zu Biegesteifigkeit nach 2 Wochen (Abbildung 26 bis Abbildung 28).

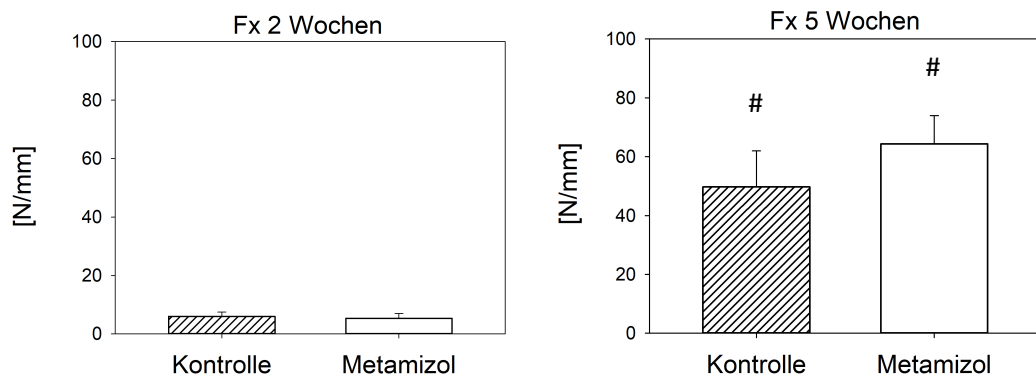
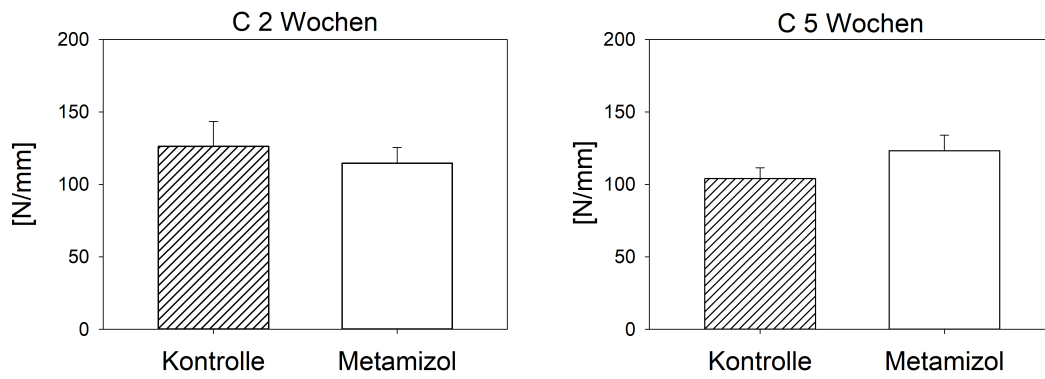
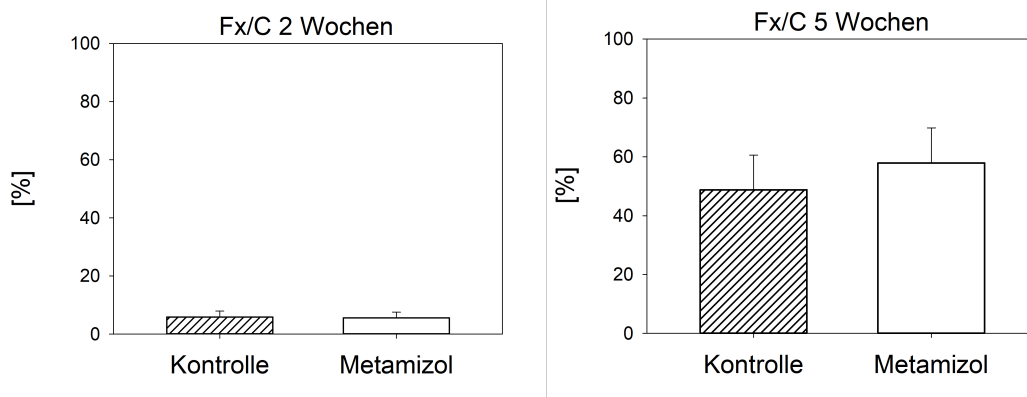


Abbildung 26: Frakturierte Knochen (Fx) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ. MW ± SEM #p<0,05 vs. Fx 2 Wochen



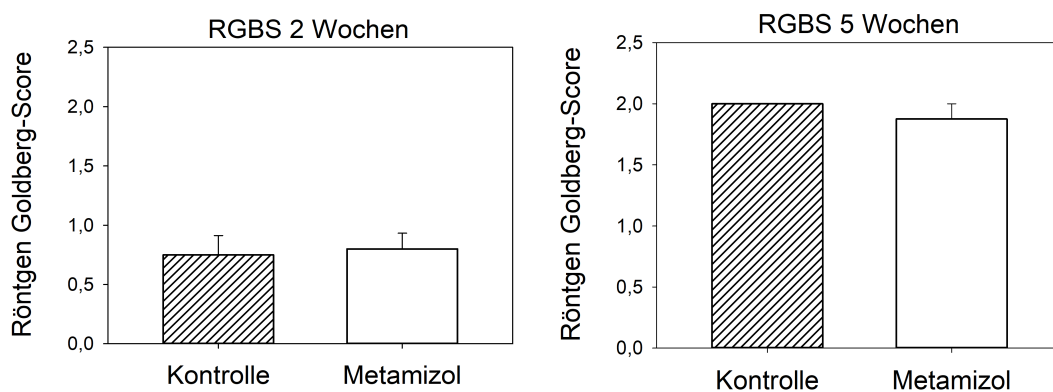
**Abbildung 27:** Unfrakturierte Knochen (C) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ.



**Abbildung 28:** Verhältnis der Biegesteifigkeit frakturierter zu unfrakturierten Knochen (Fx/C) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ.

### 5.3 Röntgen

Die röntgenologische Überprüfung der Knochenheilung mittels Röntgen-Goldberg-Score ergab keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nach 2 und 5 Wochen (Abbildung 29).

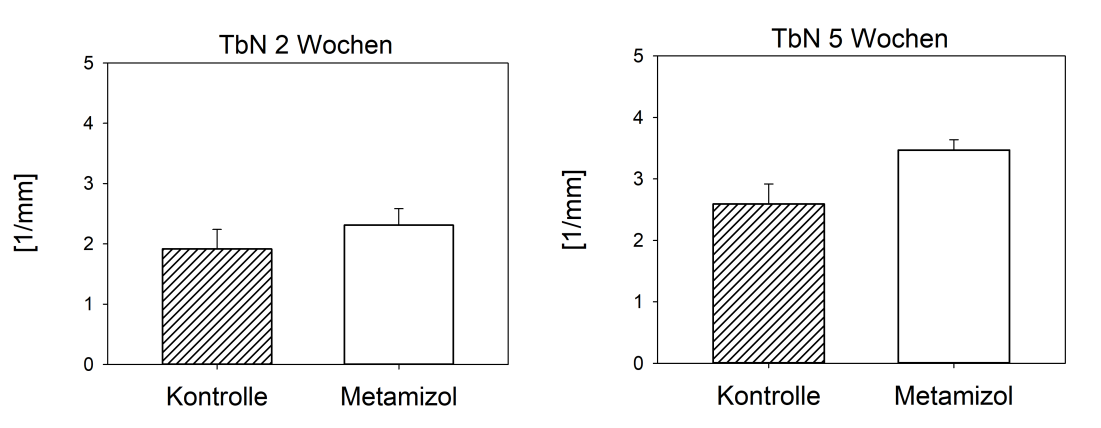


**Abbildung 29:** Röntgen-Goldberg-Score (RGBS) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ. MW  $\pm$  SEM

## 5.4 $\mu$ CT

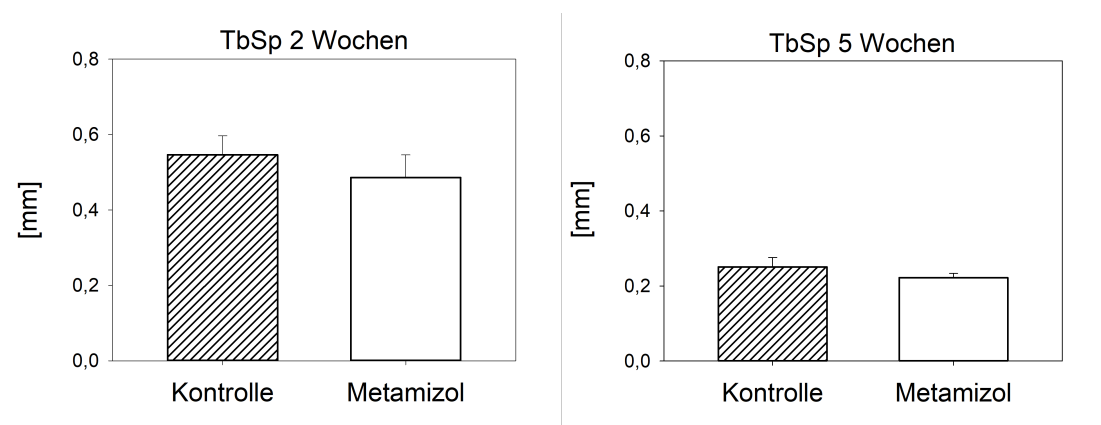
Die detaillierte radiologische Analyse der Knochenheilung mittels  $\mu$ CT ergab für die einzelnen Parameter folgende Ergebnisse:

Die Trabekelanzahl zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und der Metamizol-Gruppe nach 2 und 5 Wochen (Abbildung 30).



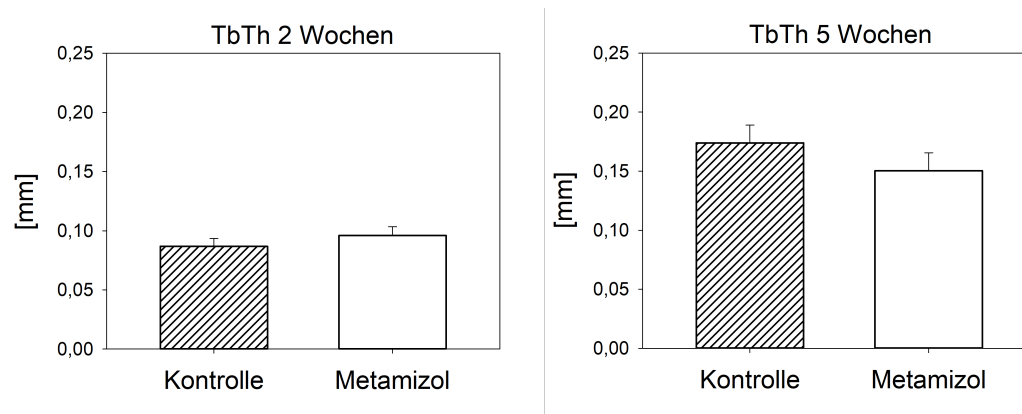
**Abbildung 30:** Trabekelanzahl (TbN) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ. MW  $\pm$  SEM

Der Trabekelabstand zeigte in der  $\mu$ CT ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und der Metamizol-Gruppe nach 2 und 5 Wochen (Abbildung 31).



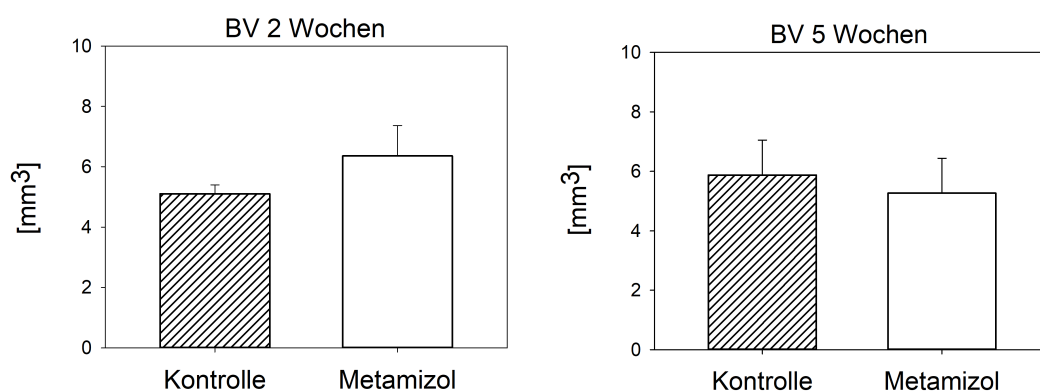
**Abbildung 31:** Trabekelabstand (TbSp) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ. MW  $\pm$  SEM

Auch die Trabekeldicke zeigte zwischen der Kontroll- und Metamizol-Gruppe nach 2 und 5 Wochen keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 32).

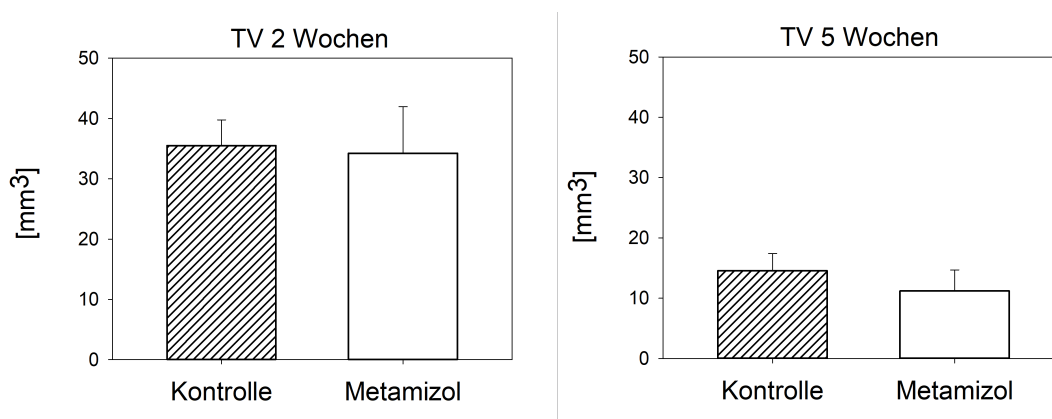


**Abbildung 32:** Trabekeldicke (TbTh) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ. MW  $\pm$  SEM

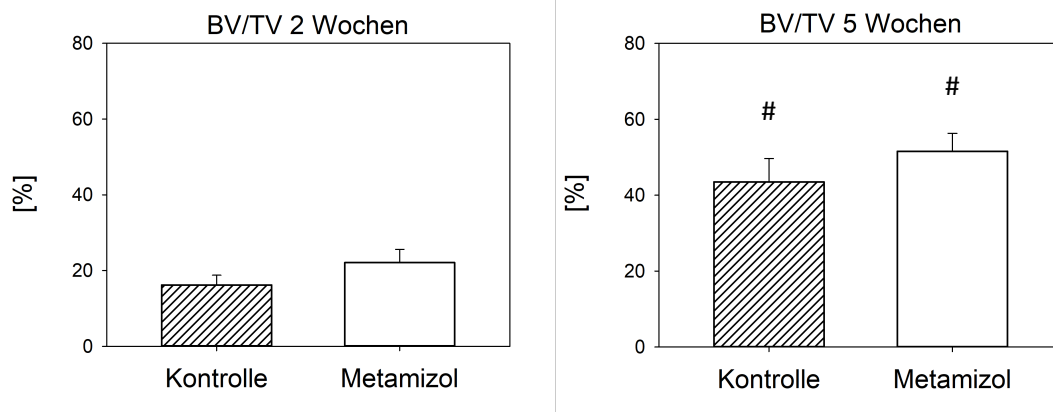
Die Parameter zu BV und TV bzw. die Analyse deren Verhältnis zueinander zeigte zwischen der Kontroll- und der Metamizol-Gruppe zum jeweiligen Zeitpunkt (2 Wochen und 5 Wochen) keinen signifikanten Unterschied. Bei Betrachtung des Verhältnisses von BV zu TV innerhalb einer Gruppe zeigte sich eine signifikante Veränderung zugunsten des Knochen volumens BV nach 5 Wochen (Abbildung 33 bis Abbildung 35).



**Abbildung 33:** Knochen volumen (BV) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ. MW  $\pm$  SEM



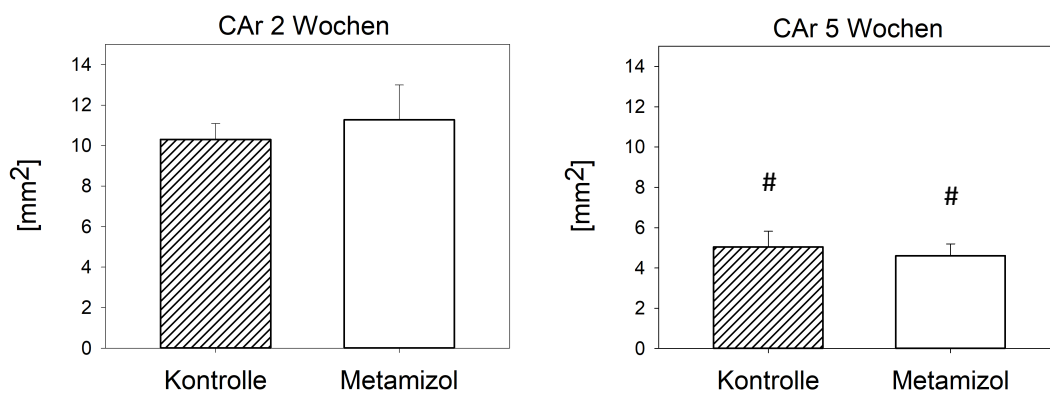
**Abbildung 34:** Kallusvolumen (TV) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ. MW  $\pm$  SEM



**Abbildung 35:** Anteil Knochenvolumen am Kallusvolumen (BV/TV) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ. MW  $\pm$  SEM # $p < 0,05$  vs. BV/TV 2 Wochen

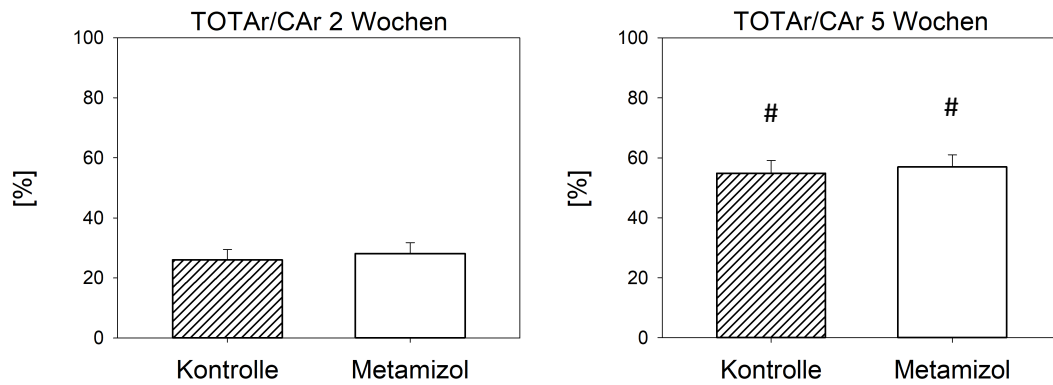
## 5.5 Histologie

Die histologische Analyse der Kallusfläche zeigte nach 2 und nach 5 Wochen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungsgruppen zum jeweiligen Zeitpunkt, jedoch innerhalb der Untersuchungsgruppen eine signifikante Reduktion der Kallusfläche nach 5 Wochen (Abbildung 36).



**Abbildung 36:** Kallusfläche (CAr) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ. MW  $\pm$  SEM # $p < 0,05$  vs. CAr 2 Wochen

Auch die Analyse der Kalluszusammensetzung ergab für das Verhältnis von Knochen- zur Gesamtkallusfläche keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Metamizol-Gruppe zu den beiden Untersuchungszeitpunkten, jedoch einen signifikanten Zuwachs des knöchernen Kallusanteils innerhalb der Untersuchungsgruppen nach 5 Wochen im Vergleich zu 2 Wochen (Abbildung 37)

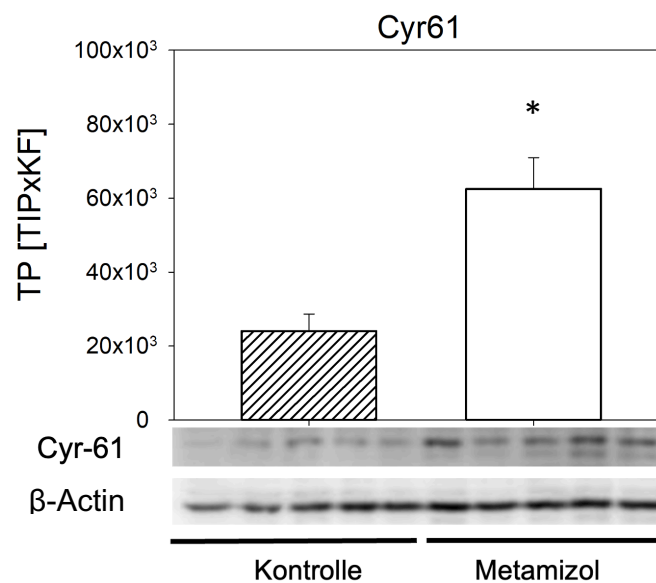


**Abbildung 37:** Verhältnis von Knochen- zur Gesamtkallusfläche (TOTAr/CaR) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ. MW  $\pm$  SEM #p<0,05 vs. TOTAr/CaR 2 Wochen

## 5.6 Western-Blot

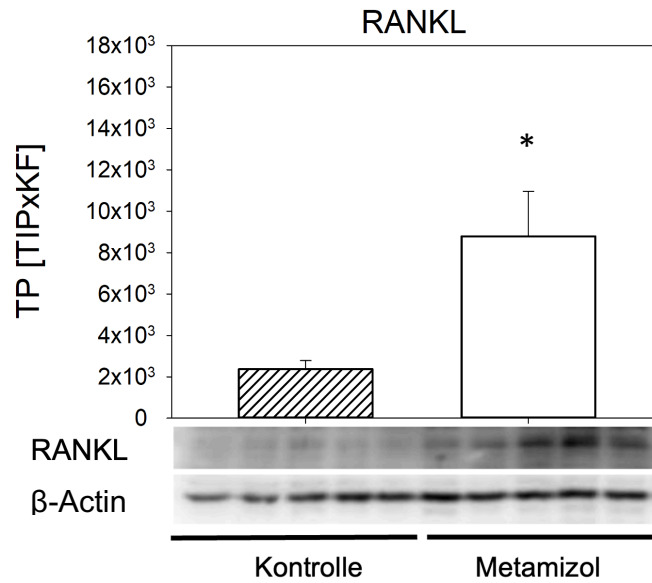
Die Western-Blot Analyse für die verschiedenen Proteine im Kallusgewebe 2 Wochen postoperativ zeigte folgende Unterschiede in den beiden Untersuchungsgruppen:

Bei der Untersuchung des Differenzierungsfaktors Cyr61 konnte in der Metamizol-Gruppe eine signifikant verstärkte Expression im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nachgewiesen werden (Abbildung 38).



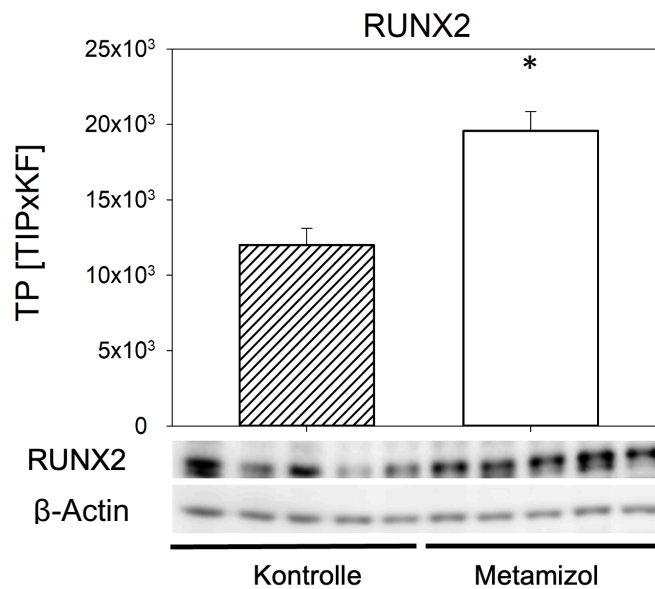
**Abbildung 38:** Cyr61 Expression. MW  $\pm$  SEM. \*p<0,05 vs. Kontrolle

Bei der Metamizol-Gruppe kam es zu einer signifikant verstärkten Ausbildung von RANKL im Kallusgewebe (Abbildung 39).



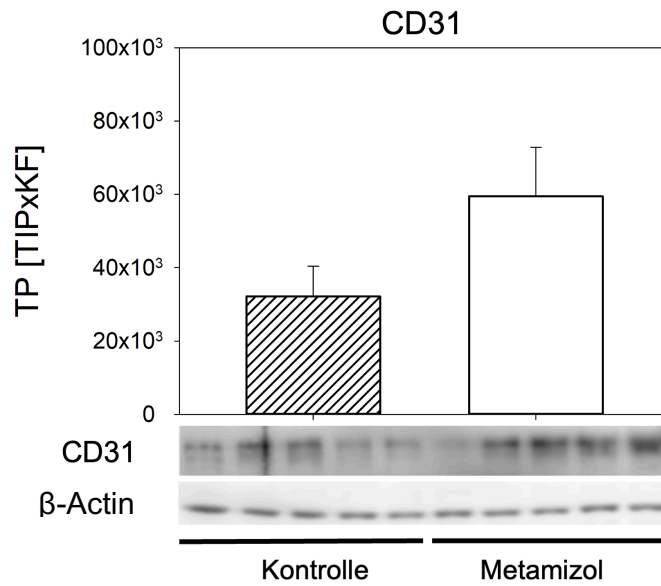
**Abbildung 39:** RANKL Expression. MW ± SEM. \*p<0,05 vs. Kontrolle

Der Osteoblasten-Differenzierungsfaktor RUNX2 wurde unter Gabe von Metamizol in signifikant erhöhter Konzentration, im Vergleich zur Kontroll-Gruppe, im Kallusgewebe gefunden (Abbildung 40).



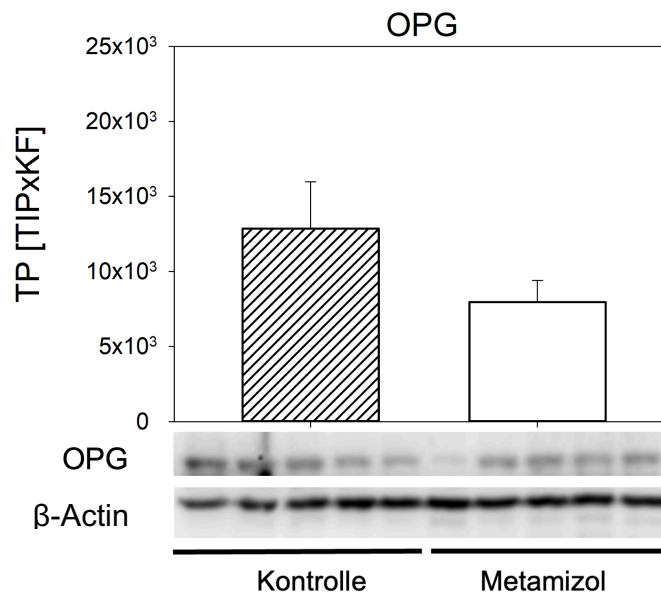
**Abbildung 40:** RUNX2 Expression. MW ± SEM. \*p<0,05 vs. Kontrolle

Die Expression von CD31 als angiogener Marker war in der Metamizol-Gruppe tendenziell erhöht, jedoch zeigte sich auch hier keine Signifikanz zwischen den Gruppen (Abbildung 41).



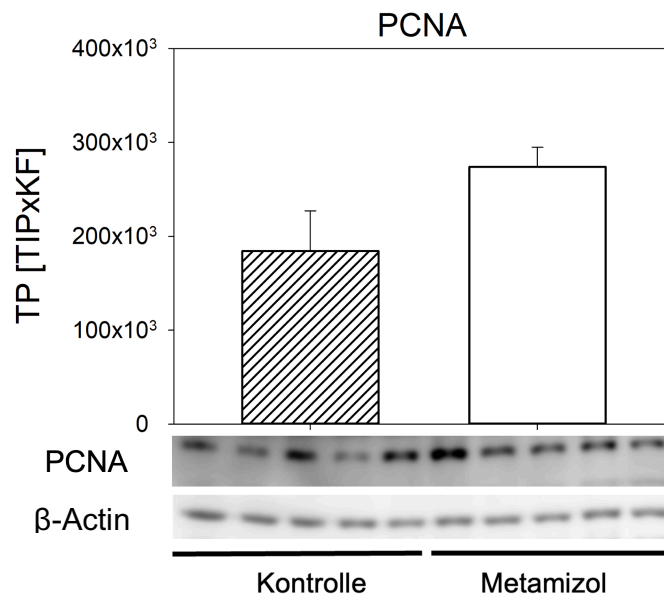
**Abbildung 41:** CD31 Expression. MW ± SEM

Die Untersuchung der Ausbildung von OPG konnte keine signifikanten Unterschiede in den beiden Gruppen nachweisen (Abbildung 42).



**Abbildung 42:** OPG Expression. MW ± SEM

Die Ausprägung der Polymerasenuntereinheit PCNA zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und der Metamizol-Gruppe (Abbildung 43).



**Abbildung 43:** PCNA Expression. MW ± SEM.

## 6 Diskussion

### 6.1 Diskussion der Methoden

Um Einflüsse auf die Frakturheilung abzubilden, sind *in-vitro*-Untersuchungen aufgrund der vielfältigen und komplexen Zusammenhänge im Rahmen des osteogenen Reparaturprozesses von reduzierter Aussagekraft, da sie in ihrer Vielschichtigkeit schlecht reproduzierbar sind und die Übertragbarkeit auf den lebenden Organismus Grenzen hat [24,34,61,89,91]. Aus genannten Gründen wurde diese Studie an einem Tiermodell durchgeführt.

Untersuchungen an verschiedenen Tiergattungen haben unterschiedliche Vorteile in Abhängigkeit der Fragestellung [61,89,91].

Die Durchführung eines Tierversuches an der Maus bietet vielerlei Vorzüge. So verursachen Mäuse beispielsweise im Verhältnis zu anderen Tiergattungen relativ niedrige Haltungskosten und sind einfach und schnell in Vielzahl zu züchten [61]. Ebenso findet die Frakturheilung bei der Maus in einem wesentlich kürzeren Zeitraum statt, als dies bei größeren Tieren der Fall ist [78,91,128]. Dies reduziert die Dauer der Belastungsphase für das Versuchstier und wirkt sich positiv auf die Auslastung der zur Verfügung stehenden institutionellen Ressourcen aus.

Da die Vergleichbarkeit von Studienergebnissen aufgrund metabolischer Einflüsse durch Medikamente im Rahmen des genetischen Polymorphismus eines jeden Individuums eingeschränkt wird, kann dieser Einfluss durch Verwendung genetisch definierter Stämme reduziert werden [119]. Daher eignen sich Mausmodelle besonders, um die Einflussnahme auf molekulare Mechanismen der Frakturheilung zu untersuchen [13,61].

Aus den genannten Gründen haben wir uns für die Durchführung der Studie an Tieren eines CD1<sup>®</sup>-Stammes entschieden.

Die Frakturheilung ist ein präzise orchestrierter Prozess, bei dem Angiogenese und Osteogenese eine zentrale Rolle spielen [25]. Die Bedeutung von Metamizol hinsichtlich Gefäßausbildung und Frakturheilung wird in der Beurteilung insoweit eingeschränkt, als dass die Maus kein Havers-System ausbildet [79]. Die Osteoneogenese bei Maus und Ratte findet über die Ausbildung von Resorptionshöhlen statt, welche sich nahe der Oberfläche der Fraktur ausbilden [89]. Diese werden dann im Rahmen der Heilung ausgefüllt. Auch wenn dieses Modell sich anatomisch von menschlichen Knochen abhebt, entspricht die Systematik funktionell der Frakturheilung unter Ausbildung des Havers-Systems, wie es etwa auch in größeren Versuchstierspezies zu finden ist [89]. Einschränkungen in der Beurteilung der Ergebnisse in Bezug auf den Menschen ergeben sich aus den Unterschieden. So lässt die

Methodik zum einen nicht zu, Veränderungen am Havers-System zu beurteilen, zum anderen geht die Bedeutung des Havers-Systems für die Frakturheilung beim Menschen nicht aus Untersuchungen am Maus- oder Rattenmodell hervor. Der Einfluss dieses Unterschiedes auf die Übertragbarkeit von Ergebnissen am Mausmodell auf den Menschen ist indes nicht vollständig geklärt, so dass die Vorteile eines Mausmodells bei der Fragestellung überwiegen [79,89].

Da es sich bei Mäusen um soziale Tiere handelt, welche in größeren Gruppen leben, war eine Haltung in eben dieser Form angestrebt [14]. Es erfolgte eine Aufteilung in Gruppen von Geschwistertieren gleichen Geschlechts und Wurfdatums. Bei einzelnen Gruppen kam es im Verlauf der Studie zu Konflikten mit Verletzungen aus Rang- und Revierkämpfen. Körperliche Auseinandersetzungen bei Revierkämpfen verursachen mechanischen Stress auf die Frakturstelle, was Auswirkungen auf die Frakturheilung hat [22,131]. Ergänzend wurde in einer Studie gezeigt, dass bei männlichen Mäusen Stress, ausgelöst durch Konfrontation mit dominanten Männchen, einen negativen Einfluss auf die Frakturheilung hat [45]. Aufgrund dieser Einflüsse wurde die Versuchstiere täglich auf Verletzungen aus Revierkämpfen hin untersucht, ebenso wurde auf das Verhalten in den Gruppen bei den täglichen Kontrollen geachtet. So konnte gewährleistet werden, dass bei Auffälligkeiten eine umgehende Trennung aus der Gruppe erfolgte, um die Individuen negativen Stressoren zu entziehen und somit die Belastung des Tieres zu reduzieren.

Vorteilhaft in diesem Zusammenhang ist, dass bei Mäusen durch die Gabe von Metamizol ein anxiolytischer und antidepressiver Effekt beobachtet werden konnte [121]. Wie stark diese Wirkung im Kontext der beschriebenen Umstände ist, kann aus den genannten Arbeiten und den hier durchgeführten Untersuchungen nicht abgeleitet werden.

Um den Einfluss von Stressoren auf die Frakturheilung nicht unnötig zu erhöhen, führten wir weitere Anpassungen durch. So erfolgte die Gabe der von uns errechneten Tagesdosis Metamizol einmal am Tag via Schlundsonde. Hierdurch konnte gewährleistet werden, dass jedes Tier die individuelle, körperrgewichtsadaptierte Dosis erhält. Hintergrund für die einmalige Gabe war die Reduktion der mechanischen Belastung der Schleimhäute der Tiere durch die Applikation via Schlundsonde und Minderung der Belastung durch den Stress, welchen mehrfaches Handling am Tag verursacht.

Nahrung und Trinkwasser stand den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung, um einen Einfluss von Fastenperioden auf die Frakturheilung auszuschließen. Eine Studie zur Auswirkung von 16-stündigen Fastenperioden bei der Maus auf 17 Wochen alte Tiere zeigte eine höhere Belastbarkeit der Knochen an, ähnlich nach Krafttraining [105]. Ab welchem Zeitraum ein

Benefit von Fasten auf Knochenstabilität der Maus auftritt, ließ sich aus dieser Studie nicht ableiten. Die Kohorte war vom Alter mit der hier genutzten Gruppe vergleichbar (17 Wochen im Vergleich zu 12 bis 26 Wochen) [105]. Einer falsch-positiven Beeinflussung der Ergebnisse durch Fastenperioden wurde somit vorgebeugt. Zudem würde eine Fastenperiode eine zusätzliche Belastung für die Versuchstiere darstellen.

Bei der Auswahl eines Frakturmodells stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, welche in Bezug auf Fragestellung und zur Verfügung stehende Ressourcen unterschiedliche Vor- und Nachteile bieten [61,89,91]. Die Verwendung eines geschlossenen Frakturmodells am Femur bietet hierbei unter Betrachtung unserer Zielsetzung einige Vorteile. Zur Ermittlung des Einflusses von Metamizol auf die Frakturheilung unter ischämischen Bedingungen war es zunächst notwendig, ein Modell zu wählen, welches sich bereits mit dem Einfluss der Ischämie auf die Frakturheilung in der Maus auseinandergesetzt hat. Hierzu lag das Modell von Menger *et al.* vor [82]. Das hierbei genutzte Frakturmodell unter Verwendung einer intramedullären Zugschraube am Femur wurde von Holstein *et al.* entwickelt und fand bereits Verwendung in vielfältigen Studien [52,54–57,60,82,93]. Durch die innenliegende Schraube entsteht eine rotations- als auch axial-stabile Fixierung bei zugleich geringerem Weichteilschaden, als dies bei einem offenen Frakturmodell gegeben wäre [60]. Die Größe des Weichteilschadens hat hierbei direkten Einfluss auf die Frakturheilung, wie in verschiedenen Studien als auch bei Versuchen zur Etablierung des geschlossenen Frakturmodells an der Fraktur von Tibia und Femur der Ratte gezeigt werden konnte [9,80,81,107,108]. Zudem hat der entstehende Weichteilschaden bei offenen Modellen in Abhängigkeit der hierbei potentiell verletzten Gefäße störenden Einfluss auf die Gefäßversorgung des Femur [61]. Schmidmaier *et al.* untersuchten beim geschlossenen Frakturmodell die Druckwerte in den Kompartimenten des Femurs. Pathologisch erhöhte Druckwerte konnte in diesen Untersuchungen keine ermittelt werden, sodass eine ausreichende Durchblutung des geschädigten Knochens und des umliegenden Gewebes zu jeder Zeit anzunehmen ist. 24 Stunden nach Frakturzeugung am Femur der Ratte waren laut Bonnarens *et al.* keine erkennbaren Weichteilschäden in histologischen Untersuchungen zu dokumentieren [9]. Entsprechende Einschätzungen der Ergebnisse in Analogie zu den Untersuchungen an der Maus sind anzunehmen. Ein Vergleich zwischen offenem und geschlossenem Frakturmodell im murinen Modell steht indes noch aus. Durch Verwendung der stumpfen Guillotine nach Schmidmaier *et al.* und des dadurch anzunehmenden geringeren Weichteilschadens, im Vergleich zu offenen Frakturmodellen, ist der Einfluss durch das Weichteiltrauma auf die Frakturheilung auf dem aktuell möglichen niedrigsten Niveau gehalten. Zudem muss bedacht werden, dass eine Fraktur am zuvor gesunden Knochen in der Regel ebenfalls durch traumatische Einflüsse von außen entsteht. Eine Trennung von knöchernem Schaden und Weichteilschaden ist daher nicht zwingend

anzustreben. Die durch den Weichteilschaden negativ beeinflusste Versorgung des Wundgebietes ist zudem eine notwendige Triebfeder der Frakturheilung: durch die entstehende Ischämie wird eine Inflammationsreaktion ausgelöst, welche die Frakturheilung unterstützt [72]. Ischämie ist zugleich einer der Hauptrisikofaktoren für Komplikationen bei der Frakturheilung [46]. Frühere Studien konnten zeigen, dass Frakturen unter ischämischen Bedingungen oft zu einer Pseudarthrosenbildung führen [74]. Das hier verwendete Tiermodell ist durch eine milde Ischämie gekennzeichnet und hat gezeigt, dass es eine verzögerte Frakturheilung induziert, ohne die Knochenregeneration zu verhindern [82].

Um den Einfluss durch Metamizol unter jenen Bedingungen zu untersuchen, die einer Medikamentendosis im humanmedizinisch therapeutischen Bereich entspricht, wurde die Dosis wie folgt angepasst:

In der deutschen Bevölkerung liegt das Durchschnittsgewicht der Gesamtbevölkerung in der Alterskohorte zwischen 40 und 70 Jahren in einem Bereich von 78,6-79,3 kg [134]. Bei Patienten gelten 4000 mg Metamizol als maximale Tagesdosis für Erwachsene und Jugendliche ab 15 Jahren [114]. Diese Tagesdosis stellt eine gängige Verschreibung für die schmerzlindernde Behandlung nach Knochenverletzungen dar und entspricht ca. 50 mg/kg Körpergewicht bei einem durchschnittlichen Erwachsenen von 80 kg Körpergewicht. Darüber hinaus wurde diese Dosierung bereits bei Mäusen angewendet (Soncini *et al.*, 2012). Dementsprechend wurde diese Dosierung auch in der vorliegenden Studie für die Behandlung von Mäusen gewählt [113]. Bei den durchgeführten Versuchen wurde die maximale Tagesdosis aus genannten Gründen als Einzeldosis gegeben. In Anlehnung an Hinz *et al.* wurde den Mäusen Metamizol in Tablettenform verabreicht [51]. Dazu wurden die Tabletten in einem Mörser fein zerstoßen, mit NaCl 0,9 % als Trägerlösung vermischt und als Emulsion appliziert. Zur Sicherstellung einer gleichmäßigen Verteilung der gewählten Dosis wurde die Trägerlösung vor jeder Applikation ausführlich geschwenkt und auf etwaige Sedimentation sowie Konglomerate hin untersucht. Berücksichtigt man die Einnahmezyklen im Vergleich zu den Versuchen zur Konzentration von Metamizol-Stoffwechselmetaboliten am Menschen, wie sie von Hinz *et al.* durchgeführt wurden, stellt sich das Problem der Nüchtern-Einnahme dar [51]. Die Probanden der Humanstudie hatten vor der oralen Einnahme von Metamizol über Nacht keine Nahrung zu sich genommen, zudem kann bei einer Applikation am Menschen mit 8 Stunden Abstand zwischen zwei Gaben ein gleichmäßiger Spiegel angenommen werden, als dies bei einmaliger Gabe der maximalen Tagesdosis der Fall ist. Hinsichtlich der Beanspruchung der Versuchstiere durch mehrmalige Gaben am Tag wurde zugunsten der reduzierten Belastung dieses Konzept nicht übernommen, wie bereits weiter oben beschrieben. Zudem konnten wir anhand der in den Blutuntersuchungen ermittelten Werte der Metamizol-Stoffwechselprodukte den gewählten Ansatz als zielführend betrachten.

Zur Sicherstellung einer adäquaten Schmerztherapie erhielten die Versuchstiere am OP-Tag sowie folgend Carprofen und Tramadol. Bei Carprofen handelt es sich um ein NSAID mit bekannter Hemmung der Cyclooxygenasen. Studien konnten sowohl *in-vitro* als auch *in vivo* negative Einflüsse auf Osteoblasten und Frakturheilung unter Gabe von NSAID nachweisen [37,76]. Da die Applikation in Verum- und Placebo-Gruppe erfolgt ist, darf davon ausgegangen werden, dass es zu keiner Verschiebung zugunsten einer Versuchsgruppe gekommen ist. Bei Tramadol, einem Arzneistoff welcher den Opioiden zuzuordnen ist, konnte kein signifikanter Einfluss auf die Frakturheilung nachgewiesen werden [63].

Zur Ermittlung der knöchernen Konsolidierung sowie der Stabilität des Kallus erfolgte der Ausbau der Femora 5 Wochen nach Operation. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da in vorangegangenen Studien die knöcherne Durchbauung der Fraktur nach durchschnittlich 28 Tagen gegeben war, während zwischen 4 und 6 Wochen nach Frakturierung des Femur keine statistisch signifikanten Unterschiede in den biomechanischen Testungen in Bereichen Spitzendrehmoment und Biegesteifigkeit vorlagen [78]. So wären zu einem früheren Zeitpunkt relevante Verzögerungen in der Frakturheilung möglicherweise nicht aufgefallen, zugleich wäre zu einem späteren Zeitpunkt ein fortgeschrittenes Remodeling des Kallus zu erwarten gewesen, was die histologische und röntgenologische Beurteilung beeinflusst hätte [41,78].

Bei der Verwendung von Metamizol wird die Hemmung der Cyclooxygenasen in dieser Untersuchung als grundlegende Ursache für einen möglicherweise nachteiligen Einfluss auf die Frakturheilung angenommen [37,51,98,111]. Hierbei gilt jedoch zu bedenken, dass die Wirkungsmechanismen von Metamizol weiterhin als nicht-abschließend geklärt gelten [121]. Da zudem nicht klar war, ob und in welchem Umfang Mäuse Metamizol verstoffwechseln können, ergänzten wir die Untersuchungen um eine gaschromatographische Analyse von Blutproben einiger Versuchstiere. Aufgrund der zu entnehmenden Menge an Blut für die beschriebene Analyseverfahren musste die Blutentnahme im Zusammenhang mit der Tötung der Tiere zum Ausbau der Femora erfolgen. Metamizol ist ein Prodrug, das nach intravenöser Verabreichung nur etwa 15 Minuten lang im Blut nachweisbar ist [62]. Diese Ausgangssubstanz ist vor ihrer Umwandlung in die beiden aktiven Metaboliten 4-MAA und 4-AA nicht klinisch wirksam [32]. Daher wurden in der vorliegenden Studie die Serumkonzentrationen von 4-MAA und 4-AA untersucht. Während 4-MAA ein früher Metabolit von Metamizol und ein Ergebnis der Magenpassage ist, entwickelt sich 4-AA aus 4-MAA in einem späteren Metabolisierungsschritt nach der Resorption [62]. Die Proben zur Erfassung der Serumwerte von Metamizol wurden entsprechend in Anlehnung an Untersuchungen der

Metabolisierung von Metamizol im Menschen 30, 60 und 90 Minuten nach oraler Gabe entnommen [43,62].

Den komplexen Belastungsverlauf auf eine Extremität, wie er bei etwa beim Gang stattfindet, kann derzeit kein Modell zur Ermittlung der Belastbarkeit nach Frakturheilung ausreichend nachbilden. Die Verwendung des Femur hat den Vorteil, dass er durch seine zylindrische Form für die Ermittlung der Biegesteifigkeit des Knochens via Drei-Punkt-Biegemodell besser geeignet ist, als etwa die Tibia, deren dreieckiger Querschnitt und die gebogene Form hier nachteilig sind [60,61]. Die Drei-Punkt-Biegung hat zum Nachteil, dass der Lastpunkt am Kallus ansetzt (siehe auch Abbildung 20), für eine Vier-Punkt-Biegung, welche den Kallus nicht kompromittiert, sind die Femora der Maus jedoch zu kurz [78]. Es wurde daher ein zerstörungsfreies Modell der Drei-Punkt-Biegung gewählt, welches die Stabilität des Kallus abbildet [53]. Vorteil dieser Methode ist die weitere Verwendbarkeit der Femora für anschließende histologische Untersuchungen. Um Einflüsse auf die Belastbarkeit des Kallus zu reduzieren, welche durch Einflüsse wie Austrocknung oder beginnenden Zellzerfall entstehen, wurde die Messung unmittelbar nach dem Ausbau und der Reinigung des jeweiligen Femurs durchgeführt. Hierbei wurden die Knochen in Anlehnung an Claes *et al.* kontinuierlich mit physiologischer Kochsalzlösung benetzt [19].

Für die Beurteilung der Rekonvaleszenz der Frakturen wurden röntgenologische und computertomographische Modelle genutzt. Die Quantifizierung der osteogenen Konsolidierung im zweidimensionalen Modell via Röntgen erfolgte anhand des Goldberg-Score [41]. Mit ihm kann das Maß der knöchernen Durchbauung eines Frakturspalts bewertet werden. Da sich dieses Verfahren etabliert hat, jedoch nicht den gesamten Kallus in seiner dreidimensionalen Struktur abbildet, wurde das Verfahren um Messungen im Rahmen einer  $\mu$ CT ergänzt. Die hier erhobenen Parameter erlauben einen detaillierteren Blick auf die Zusammensetzung des Kallus, als es die reine Beurteilung der Ossifikation im zweidimensionalen Röntgenbild möglich macht [84].

Trotz der fortgeschrittenen Details, die in einem  $\mu$ CT dargestellt werden können, werden hierbei lediglich strahlendichte Gewebeanteile eines Kallus abgebildet. Die Zusammensetzung aus unterschiedlichen Gewebearten kann hiermit nicht beurteilt werden, weshalb abschließend eine histologische Untersuchung am sagittal-longitudinalen Schnitt des hierbei zerstörten Femurs notwendig ist. Diese Methodik gilt weiterhin als Goldstandard, da sie es ermöglicht, Gewebearten zu unterscheiden und deren Anteil am Gesamtvolumen eines Kallus zu ermitteln [38]. Hierzu wurden die Proben anhand des oben beschriebenen Färbeprotokolls bearbeitet und darauffolgend digitalisiert. Die anschließende computergestützte Analyse der

Schnitte in Fläche und Gewebsart ermöglichte eine strukturierte, reproduzierbare Beurteilung der Zusammensetzung eines jeden untersuchten Kallus.

Die proteinbiochemischen Analysen des Kallus erfolgten 14 Tage postoperativ, da zu diesem Zeitpunkt das größte Kallusvolumen vorhanden ist [78]. Dieses Stadium des Heilungsprozesses ermöglichte es, eine ausreichende Menge an Kallusgewebe zu erfassen, welche für eine Western-Blot-Analyse vonnöten ist. Hierzu wurden die Femora manuell von umgebendem Gewebe befreit und anschließend die noch unverknöcherten Anteile des Kallus händisch mittels Splitterpinzette abgetragen. Die Proben wurden einzeln in Eppendorf-Gefäßen gesammelt und für den direkten Transport mit anschließender Weiterbearbeitung auf Eis gekühlt gelagert.

## **6.2 Diskussion der Ergebnisse**

In der vorliegenden Studie wurden zum ersten Mal die Auswirkungen von Metamizol auf die Knochenheilung unter ischämischen Bedingungen in einem etablierten Mausmodell der verzögerten Frakturheilung analysiert. Zu diesem Zweck wurde Metamizol in einer Dosierung verabreicht, die eine klinische Behandlung nachahmen sollte. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass durch die tägliche Einnahme von Metamizol eine signifikant vermehrte Expression der Wachstumsfaktoren RUNX2, Cyr61 sowie von RANKL entsteht. Diese Veränderungen im Knochenstoffwechsel bleiben jedoch ohne nachweisbaren Einfluss auf das funktionelle Ergebnis.

Metamizol wird in der Schmerztherapie eingesetzt und findet häufig Anwendung im klinischen Alltag [102]. In Stufe 1 des WHO-Behandlungsschemas für Schmerzen stellt Metamizol nach aktuellem Stand das potenteste Medikament dar, bevor es in Stufe 2 und höher zur Inanspruchnahme von Opioiden und Opioidderivaten kommt [65]. Die Auswahl von Metamizol für diese Studie erfolgte aufgrund der häufigen Nutzung in der klinischen Schmerztherapie zur Behandlung von Frakturen. Der breite Einsatz im klinischen Alltag rechtfertigt den Studienansatz. Sollte sich ein Einfluss auf die Frakturheilung erweisen, wäre dies ein möglicher Aspekt in der schmerzmedizinischen Versorgung von Patienten mit knöchernen Verletzungen und Ischämie-begünstigenden Co-Morbiditäten, welcher künftig strenger zu beachten wäre.

Aus den Ergebnissen der Serum-Analysen kann geschlossen werden, dass es möglich ist, im Mausmodell Serumkonzentrationen der stoffwechselaktiven Metabolite 4-AA und 4-MAA zu erreichen, welche denen des Menschen entsprechen [62,125]. So konnte 30 Minuten nach der Anwendung eine hohe Konzentration von 4-MAA festgestellt, die über den Zeitraum der nachfolgenden Messungen bis 90 Minuten konstant blieb. Dies steht im Einklang mit früheren

Studien, die eine maximale Konzentration von 4-MAA 1,2-2,0 Stunden nach oraler Verabreichung zeigten [62]. Dass die Konzentration von 4-MAA nach Applikation so schnell ansteigt, lässt sich über die größere Resorptionsfläche erklären, welche durch das Zerstoßen der Tabletten vor der Gabe via Schlundsonde entsteht. Im Gegensatz dazu war die Konzentration von 4-AA zu frühen Zeitpunkten niedrig und 90 Minuten nach der Anwendung signifikant erhöht, was den Metabolisierungsschritt von 4-MAA zu einem späteren Zeitpunkt widerspiegeln könnte. Diese weitere Metabolisierung von 4-MAA zu 4-AA geschieht nach durchschnittlich 2,6 bis 3,25 Stunden [62]. Die nach 30 und 60 Minuten gemessenen 4-AA Konzentrationen müssen dementsprechend Residuen der Dosis vom Vortag sein. Somit wird gezeigt, dass auch bei einmaliger Gabe einer für die Verwendung am Menschen orientierten Dosis eine nachweisbare Konzentration von aktiven Metaboliten von Metamizol vorhanden ist. Die Streubreite der Ergebnisse lässt sich durch die kleine Versuchsgruppe in Verbindung mit Beobachtungen von Goromaru *et al.* erklären, welche bedeutende interindividuelle Unterschiede in der Acetylierung von 4-AA in fortfolgende Metabolite nachweisen konnten [43]. Diese Ergebnisse zeigen somit eine Aufnahme und Metabolisierung von Metamizol, wie sie auch in der klinischen Anwendung zu erwarten wäre.

Die Überprüfung der Biegesteifigkeit 2 und 5 Wochen nach Operation zeigt, dass sich unter ischämischen Bedingungen eine funktionelle Konsolidierung des Knochens ausbildet, welche die Biegesteifigkeit nach 5 Wochen im Vergleich zu 2 Wochen signifikant erhöht (siehe Abbildung 26 bis Abbildung 28), jedoch erreicht die Frakturheilung auch nach 5 Wochen aufgrund der ischämischen Bedingungen nicht die Belastbarkeit einer physiologischen Genese, so wie es auch von Menger *et al.* beschrieben wurde [82].

Hintergrund für die Induktion ischämischer Bedingungen ist eine Anlehnung der Heilungsbedingungen an Zustände, wie sie bei Patienten mit Gefäßverletzungen, Weichteilschäden bis hin zu einem Kompartmentsyndrom oder stenosierenden Gefäßerkrankungen auftreten. Die Prävalenz stenosierender Erkrankungen steigt bei zunehmendem Lebensalter. So sind bis zu 20 % der über 70-jährigen Patienten von einer pAVK betroffen [87]. Die Ursachen hierfür sind vielfältig. Dyslipidämien, Übergewicht, Bluthochdruck und Diabetes und andere Krankheiten sind Faktoren, die in Verbindung mit der weiter steigenden Lebenserwartung der Weltbevölkerung ein gehäuftes Antreffen von Patienten mit pAVK in den Nebendiagnosen wahrscheinlich werden lässt [87]. Zudem sind diese Co-Morbiditäten selbst mit einem verminderten Blutfluss und somit negativen Einfluss auf die Frakturheilung verbunden [46]. Aufgrund dieser Entwicklungen scheint es notwendig, auch die Auswirkungen von Medikamenten auf Mechanismen zu untersuchen, welche durch dieses Erkrankungsspektrum beeinflusst werden.

Bei Betrachtung der biochemischen Analyse mittels Western-Blot zeigte sich, dass die regelmäßige Einnahme von Metamizol über die Dauer der Frakturheilung zumindest bis zum 14. Tag postoperativ Einfluss auf die Expression verschiedener Schlüsselenzyme der Frakturheilung hat.

Die Expression von RANKL war im Kallusgewebe der Metamizol-Tiere signifikant erhöht. Erhöhte RANKL-Werte signalisieren einen erhöhten Knochenumbau durch Beeinflussung des RANK-RANKL-OPG-Systems sowie einer verstärkten Osteoklasten-Aktivität [12].

Einer erhöhten Osteoklasten-Aktivität steht in der vorliegenden Arbeit der Nachweis von verstärkt exprimiertem Cyr61 und RUNX2 gegenüber. Die erhöhte Expression von Cyr61 führt zu vermehrter Osteoblastendifferenzierung und -proliferation, wodurch das Remodeling des Knochens unterstützt wird und die Frakturheilung positiv beeinflusst wird.

Die im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant erhöhten Werte von RUNX2 lassen ebenfalls annehmen, dass ein verstärktes Remodeling des Kallus stattfindet, da RUNX2 als Differenzierungsfaktor für Osteoblasten funktioniert [58].

Zusätzlich konnten vorangegangene Studien nachweisen, dass die Einsprossung von Gefäßen in Abwesenheit von RUNX2 negativ beeinflusst wird [12,29]. Dies hat dann auch ein Ausbleiben der Ossifikation zur Folge [29,66,71]. Eine Überexpression hingegen kann die Produktion osteoblastentypischer Gene, z.B. Osteokalzin, antreiben und somit zu einer verstärkten Knochenbildung führen [58]. Interessant ist, dass Metamizol *in vitro* die Apoptose in osteoblastenähnlichen Zellen erhöht und COX-1, COX-2 und COX-3 hemmt, von denen COX-2 für die Knochenheilung essentiell ist [37,76,111]. Unter physiologischen Bedingungen übte Metamizol jedoch keinen nachteiligen Einfluss auf die Knochenheilung bei nicht stabilisierten Tibiafrakturen von Ratten aus [35].

Intragruppenvergleiche zwischen 2 und 5 Wochen nach der Operation zeigen eine erfolgreiche knöcherne Überbrückung der Frakturstelle. Dies zeigte sich in beiden Gruppen durch die erhöhte biomechanische Biegesteifigkeit, das erhöhte Verhältnis von BV/TV in der  $\mu$ CT-Analyse und Anzeichen eines histomorphometrischen Umbaus. Die verminderte biomechanische Stabilität der verletzten Femora von ca. 50-60 % im Vergleich zu gesunden Femora 5 Wochen nach der Operation deutet jedoch darauf hin, dass der Prozess der Knochenheilung zu diesem späten Zeitpunkt nach der Operation noch nicht abgeschlossen ist. Somit konnte der Prozess der verzögerten Knochenheilung ohne Pseudarthrosenbildung unter Verwendung dieses Tiermodells in der vorliegenden Studie bestätigt werden.

In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnten wir auch keine negativen Auswirkungen von Metamizol auf die Knochenheilung unter ischämischen Bedingungen feststellen, wie

unsere biomechanischen, radiologischen und histomorphometrischen Ergebnisse zeigen. Unter den schwierigen Bedingungen unseres Modells veränderte Metamizol jedoch das Proteinexpressionsmuster im Kallusgewebe 2 Wochen nach der Operation im Vergleich zu den Kontrollen leicht. Tatsächlich konnten wir eine signifikant höhere Expression von Cyr61, RUNX2 und RANKL in der Metamizol-Gruppe nachweisen. Dies deutet auf einen Trend zu einer höheren angiogenen Aktivität und einem beschleunigten Knochenumbau unter Metamizol-Behandlung hin [33,94,126]. Metamizol könnte daher den Knochenumsatz erhöht haben, ohne die Knochenheilung zu beschleunigen oder zu verhindern.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie, dass die Anwendung von Metamizol die Frakturheilung unter schwierigen ischämischen Bedingungen funktionell nicht beeinflusst. Daher kann die Behandlung mit diesem Analgetikum auch bei Frakturpatienten empfohlen werden, die an Komorbiditäten leiden, die mit einer Gewebeischämie einhergehen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Al-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (2008) Molecular Mechanisms Controlling Bone Formation during Fracture Healing and Distraction Osteogenesis. *J Dent Res* 87:107–118
2. Albelda SM, Oliver PD, Romer LH, Buck CA (1990) EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 110:1227–1237
3. Albrecht M, Aumüller G, Bock R, Eppler E, Hofmann A, Mannowetz N (2017) Taschenbuch Histologie. 2. Auflage. Elsevier, Urban & Fischer, München
4. Aref Z, de Vries MR, Quax PHA (2019) Variations in Surgical Procedures for Inducing Hind Limb Ischemia in Mice and the Impact of These Variations on Neovascularization Assessment. *International Journal of Molecular Sciences* 20:14
5. Arnold WH, Bechmann IJ, Böckers A, Bräuer L, Dehghani F, Deller T (2019) Anatomie: das Lehrbuch: Sobotta. 2. Auflage. Elsevier, München
6. Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D (2017) Anatomie. 4., aktualisierte Auflage. Thieme, Stuttgart
7. Bachmann F, Duthaler U, Meyer Zu Schwabedissen HE, Puchkov M, Huwyler J, Haschke M, Krähenbühl S (2021) Metamizole is a Moderate Cytochrome P450 Inducer Via the Constitutive Androstane Receptor and a Weak Inhibitor of CYP1A2. *Clin Pharmacol Ther* 109:1505–1516
8. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (1999) Growth Factor Regulation of Fracture Repair. *Journal of Bone and Mineral Research* 14:1805–1815
9. Bonnarens F, Einhorn TA (1984) Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 2:97–101
10. Bottlang M, Lesser M, Koerber J, Doornink J, von Rechenberg B, Augat P, Fitzpatrick DC, Madey SM, Marsh JL (2010) Far cortical locking can improve healing of fractures stabilized with locking plates. *J Bone Joint Surg Am* 92:1652–1660
11. Bourque WT, Gross M, Hall BK (1992) A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Lab Anim Sci* 42:369–374
12. Boyce BF, Xing L (2008) Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473:139–146
13. Bult CJ, Blake JA, Smith CL, Kadin JA, Richardson JE (2019) Mouse Genome Database (MGD) 2019. *Nucleic Acids Res* 47:801–806
14. Busch M, Chourbaji S, Dammann P (2022) Zur Einzelhaltung von Mäusen zu Versuchszwecken. URL: [https://www.gv-solas.de/wp-content/uploads/2021/03/Einzelhaltung-von-Maeusen-zu-Versuchszwecken\\_2021-1.pdf](https://www.gv-solas.de/wp-content/uploads/2021/03/Einzelhaltung-von-Maeusen-zu-Versuchszwecken_2021-1.pdf)

15. Campos C, de Gregorio R, García-Nieto R, Gago F, Ortiz P, Alemany S (1999) Regulation of cyclooxygenase activity by metamizol. *European Journal of Pharmacology* 378:339–347
16. Carano RAD, Filvaroff EH (2003) Angiogenesis and bone repair. *Drug Discovery Today* 8:980–989
17. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KLT, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13926–13931
18. Cheung KMC, Kaluarachi K, Andrew G, Lu W, Chan D, Cheah KSE (2003) An externally fixed femoral fracture model for mice. *Journal of Orthopaedic Research* 21:685–690
19. Claes L, Blakytyn R, Göckelmann M, Schoen M, Ignatius A, Willie B (2009) Early dynamization by reduced fixation stiffness does not improve fracture healing in a rat femoral osteotomy model. *Journal of Orthopaedic Research* 27:22–27
20. Claes L, Recknagel S, Ignatius A (2012) Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol* 8:133–143
21. Claes L (2017) Mechanobiologie der Frakturheilung Teil 1. *Unfallchirurg* 120:14–22
22. Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D, Seidl W, Margevicius KJ, Augat P (1998) Effects of Mechanical Factors on the Fracture Healing Process. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 355:132–147
23. Collins C, Guilluy C, Welch C, O'Brien ET, Hahn K, Superfine R, Burrige K, Tzima E (2012) Localized tensional forces on PECAM-1 elicit a global mechanotransduction response via the integrin-RhoA pathway. *Curr Biol* 22:2087–2094
24. Cramer EEA, Ito K, Hofmann S (2021) Ex vivo Bone Models and Their Potential in Preclinical Evaluation. *Curr Osteoporos Rep* 19:75–87
25. Cui Q, Dighe AS, Irvine Jr JN (2013) Combined Angiogenic and Osteogenic Factor Delivery for Bone Regenerative Engineering. *CPD* 19:3374–3383
26. Curtis MJ, Brown PR, Dick JD, Jinnah RH (1995) Contaminated fractures of the tibia: A comparison of treatment modalities in an animal model. *Journal of Orthopaedic Research* 13:286–295
27. Danckwardt-Lillieström G, Lorenzi GL, Olerud S (1970) Intramedullary Nailing after Reaming: An Investigation on the Healing Process in Osteotomized Rabbit Tibias. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 41:1–78
28. Domínguez-Ramírez AM, Calzadilla PC, Cortés-Arroyo AR, Hurtado y de la Peña M, López JRM, Gómez-Hernández M, López-Muñoz FJ (2012) High-performance liquid chromatographic assay for metamizol metabolites in rat plasma: Application to

- pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 71:173–178
29. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997) *Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. Cell* 89:747–754
  30. Einhorn TA (1998) *The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing. Clinical Orthopaedics and Related Research®* 355:7–21
  31. Einhorn TA, Gerstenfeld LC (2015) *Fracture healing: mechanisms and interventions. Nat Rev Rheumatol* 11:45–54
  32. Fendrich Z (2000) *Metamizol--nové účinné analgetikum s dlouhou historií. Přehled farmakologie a praktického využití [Metamizol--a new effective analgesic with a long history. Overview of its pharmacology and clinical use]. Cas Lek Cesk* 139:440–444
  33. 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 (SICOT)* 36:2387–2393
  34. Friedman RJ, An YH, Ming J, Draughn RA, Bauer TW (1996) *Influence of biomaterial surface texture on bone ingrowth in the rabbit femur. Journal Orthopaedic Research* 14:455–464
  35. Gali JC, Caetano EB, Paes RH, Quevedo FC, Sansanovicz D, Ventin FC (2014) *Dipyrone has no effects on bone healing of tibial fractures in rats. Acta Ortop Bras* 22:210–213
  36. 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
  37. Gerstenfeld LC, Thiede M, Seibert K, Mielke C, Phippard D, Svagr B, Cullinane D, Einhorn TA (2003) *Differential inhibition of fracture healing by non-selective and cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. Journal of Orthopaedic Research* 21:670–675
  38. 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
  39. Giorgi M, De Vito V, Lee HK, Laus F, Kowalski C, Faillace V, Burmanczuk A, Vullo C (2015) *Pharmacokinetic investigations of the marker active metabolite-4-methylamino-antipyrin after intravenous and intramuscular injection of metamizole in healthy sheep. Small Ruminant Research* 132:143–146
  40. Giorgi M, Łebkowska-Wieruszewska B, Lisowski A, Owen H, Poapolathep A, Kim TW, De Vito V (2018) *Pharmacokinetic profiles of the active metamizole metabolites after four*

- different routes of administration in healthy dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 41:428–436
41. Goldberg VM, Powell A, Shaffer JW, Zika J, Bos GD, Heiple KG (1985) Bone grafting: Role of histocompatibility in transplantation. *Journal of Orthopaedic Research* 3:389–404
  42. Goodship A, Kenwright J (1985) The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures. *The Journal of Bone and Joint Surgery British volume* 67-B:650–655
  43. Goromaru T, Matsuyama K, Noda A, Iguchi S (1978) The Measurement of Plasma Concentration of Aminopyrine and Its Metabolites in Man. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 26:33–37
  44. 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
  45. Haffner-Luntzer M, Foertsch S, Fischer V, Prystaz K, Tschaffon M, Mödinger Y, Bahney CS, Marcucio RS, Miclau T, Ignatius A, Reber SO (2019) Chronic psychosocial stress compromises the immune response and endochondral ossification during bone fracture healing via  $\beta$ -AR signaling | PNAS. URL: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1819218116>
  46. Haffner-Luntzer M, Hankenson KD, Ignatius A, Pfeifer R, Khader BA, Hildebrand F, Van Griensven M, Pape H, Lehmicke M (2019) Review of Animal Models of Comorbidities in Fracture-Healing Research. *Journal Orthopaedic Research* 37:2491–2498
  47. Hassan MQ, Tare RS, Lee SH, Mandeville M, Morasso MI, Javed A, Wijnen AJ van, Stein JL, Stein GS, Lian JB (2006) BMP2 Commitment to the Osteogenic Lineage Involves Activation of Runx2 by DLX3 and a Homeodomain Transcriptional Network \*. *Journal of Biological Chemistry* 281:40515–40526
  48. Henry WB, Schachar NS, Wadsworth PL, Castronovo FP, Mankin HJ (1985) Feline model for the study of frozen osteoarticular hemijoint transplantation: qualitative and quantitative assessment of bone healing. *Am J Vet Res* 46:1714–1720
  49. Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P (1995) An experimental model for non-union in rats. *Injury* 26:681–686
  50. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT (1993) A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *Journal of Orthopaedic Research* 11:305–312
  51. Hinz B, Cheremina O, Bachmakov J, Renner B, Zolk O, Fromm MF, Brune K (2007) Dipyronne elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. *The FASEB Journal* 21:2343–2351

52. Histing T, Marciniak K, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger MD (2011) Sildenafil accelerates fracture healing in mice. *Journal of Orthopaedic Research* 29:867–873
53. 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
54. Histing T, Stenger D, Scheuer C, Metzger W, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2012) Pantoprazole, a Proton Pump Inhibitor, Delays Fracture Healing in Mice. *Calcif Tissue Int* 90:507–514
55. Histing T, Stenger D, Kuntz S, Scheuer C, Tami A, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2012) Increased Osteoblast and Osteoclast Activity in Female Senescence-Accelerated, Osteoporotic SAMP6 Mice During Fracture Healing. *Journal of Surgical Research* 175:271–277
56. Histing T, Anton C, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger MD (2012) Melatonin Impairs Fracture Healing by Suppressing RANKL-Mediated Bone Remodeling. *Journal of Surgical Research* 173:83–90
57. Histing T, Andonyan A, Klein M, Scheuer C, Stenger D, Holstein JH, Veith NT, Pohlemann T, Menger MD (2016) Obesity does not affect the healing of femur fractures in mice. *Injury* 47:1435–1444
58. Hofmann A, Mattyasovszky SG, Brüning C, Ritz U, Mehling I, Meurer A, Rommens PM (2009) Osteoblasten. *Orthopäde* 38:1009
59. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T (2007) Development of a locking femur nail for mice. *Journal of Biomechanics* 40:215–219
60. Holstein JH, Matthys R, Histing T, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Meier C, Pohlemann T, Menger MD (2009) Development of a stable closed femoral fracture model in mice. *J Surg Res* 153:71–75
61. 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
62. Jasiacka A, Maślanka T, Jaroszewski JJ (2014) Pharmacological characteristics of metamizole. *Pol J Vet Sci* 17:207–214
63. Jirkof P, Durst M, Klopffleisch R, Palme R, Thöne-Reineke C, Buttgereit F, Schmidt-Bleek K, Lang A (2019) Administration of Tramadol or Buprenorphine via the drinking water for post-operative analgesia in a mouse-osteotomy model. *Sci Rep* 9:10749

64. Kaplan SJ, Hayes WC, Mudan P, Lelli JL, White AA (1985) Monitoring the healing of a tibial osteotomy in the rabbit treated with external fixation. *Journal of Orthopaedic Research* 3:325–330
65. Karow T, Lang-Roth R (2019) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis: 2020.* 28. Auflage. Thomas Karow, Köln
66. Karsenty G (2000) Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 11:343–346
67. Kenwright J, Goodship AE (1989) Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures. *Clin Orthop Relat Res* 241:36–47
68. Kim S-W, Kim H, Cho H-J, Lee J-U, Levit R, Yoon Y (2010) Human Peripheral Blood-Derived CD31+Cells Have Robust Angiogenic and Vasculogenic Properties and Are Effective for Treating Ischemic Vascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology* 56:593–607
69. Kireeva ML, Lam SC-T, Lau LF (1998) Adhesion of Human Umbilical Vein Endothelial Cells to the Immediate-Early Gene Product Cyr61 Is Mediated through Integrin  $\alpha\beta 3^*$ . *Journal of Biological Chemistry* 273:3090–3096
70. Kochi T, Imai Y, Takeda A, Watanabe Y, Mori S, Tachi M, Kodama T (2013) Characterization of the Arterial Anatomy of the Murine Hindlimb: Functional Role in the Design and Understanding of Ischemia Models. *PLOS ONE* 8:e84047
71. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao Y-H, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T (1997) Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturation Arrest of Osteoblasts. *Cell* 89:755–764
72. Lambert SM (2018) Ischaemia, healing and outcomes in proximal humeral fractures. *EFORT Open Rev* 3:304–315
73. Levy M, Zylber-Katz E, Rosenkranz B (1995) Clinical pharmacokinetics of dipyron and its metabolites. *Clin Pharmacokinet* 28:216–234
74. Lu C, Miclau T, Hu D, Marcucio RS (2007) Ischemia leads to delayed union during fracture healing: A mouse model. *Journal Orthopaedic Research* 25:51–61
75. Lüllmann-Rauch R, Asan E (2015) *Taschenbuch Histologie.* 5. vollst. überarb. Auflage. Thieme, Stuttgart
76. Luna-Bertos PhD E De, Ramos-Torrecilas PhD J, Manzano-Moreno FJ, Garcia-Martinez PhD O, Ruiz PhD C (2015) Effects on Growth of Human Osteoblast-Like Cells of Three Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Biological Research for Nursing* 2015 17(1):62–67

77. Maga G, Hübscher U (2003) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of Cell Science* 116:3051–3060
78. Manigrasso MB, O'Connor JP (2004) Characterization of a Closed Femur Fracture Model in Mice. *Journal of Orthopaedic Trauma* 18:687–695
79. Maynard RD, Ackert-Bicknell CL (2019) Mouse Models and Online Resources for Functional Analysis of Osteoporosis Genome-Wide Association Studies. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10:1–15
80. McKibbin B (1978) The biology of fracture healing in long bones. *The Journal of Bone and Joint Surgery British volume* 60-B:150–162
81. Melnyk M, Henke T, Claes L, Augat P (2008) Revascularisation during fracture healing with soft tissue injury. *Arch Orthop Trauma Surg* 128:1159–1165
82. Menger MM, Stutz J, Ehnert S, Nussler AK, Rollmann MF, Herath SC, Braun BJ, Pohlemann T, Menger MD, Histing T (2022) Development of an ischemic fracture healing model in mice. *Acta Orthopaedica* 93:466–471
83. Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, Van G, Kaufman S, Kostenuik PJ, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS (2000) Osteoprotegerin Reverses Osteoporosis by Inhibiting Endosteal Osteoclasts and Prevents Vascular Calcification by Blocking a Process Resembling Osteoclastogenesis. *Journal of Experimental Medicine* 192:463–474
84. Morgan EF, Mason ZD, Chien KB, Pfeiffer AJ, Barnes GL, Einhorn TA, Gerstenfeld LC (2009) Micro-computed tomography assessment of fracture healing: Relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone* 44:335–344
85. Müller-Mai C (2015) *Frakturen auf einen Blick: Klassifikation und Behandlungsoptionen; mit Farbleitsystem*. Springer, Berlin Heidelberg
86. Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y, Oikawa S, Ono K, Takaoka K (1994) Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *Journal of Bone and Mineral Research* 9:651–659
87. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FGR (2007) Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Journal of Vascular Surgery* 45:5–67
88. Nunamaker DM, Richardson DW, Butterweck DM, Provost MT, Sigafos RD (1986) A New External Skeletal Fixation Device\* That Allows Immediate Full Weightbearing Application in the Horse. *Veterinary Surgery* 15:345–355
89. Nunamaker DM (1998) Experimental Models of Fracture Repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 355:56–65

90. Ohnesorge H, Bein B, Hanss R, Francksen H, Mayer L, Scholz J, Tonner PH (2009) Paracetamol versus metamizol in the treatment of postoperative pain after breast surgery: a randomized, controlled trial. *European Journal of Anaesthesiology | EJA* 26:648–653
91. O’Loughlin PF, Morr S, Bogunovic L, Kim AD, Park B, Lane JM (2008) Selection and Development of Preclinical Models in Fracture-Healing Research. *Journal of Bone and Joint Surgery* 90:79–84
92. Online GL Metamizol - Anwendung, Wirkung, Nebenwirkungen | Gelbe Liste. URL: [https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Metamizol\\_297](https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Metamizol_297)
93. 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
94. Orth M, Shenar AK, Scheuer C, Braun BJ, Herath SC, Holstein JH, Histing T, Yu X, Murphy WL, Pohlemann T, Laschke MW, Menger MD (2019) VEGF-loaded mineral-coated microparticles improve bone repair and are associated with increased expression of epo and RUNX-2 in murine non-unions. *Journal Orthopaedic Research* 37:821–831
95. Parikh PP, Castilla D, Lassance-Soares RM, Shao H, Regueiro M, Li Y, Vazquez-Padron R, Webster KA, Liu Z-J, Velazquez OC (2018) A Reliable Mouse Model of Hind limb Gangrene. *Ann Vasc Surg* 48:222–232
96. Park S, Sorenson CM, Sheibani N (2015) PECAM-1 Isoforms, eNOS, and Endoglin Axis in Regulation of Angiogenesis. *Clin Sci (Lond)* 129:217–234
97. Phillips AM (2005) Overview of the fracture healing cascade. *Injury* 36:5–7
98. Pierre SC, Schmidt R, Brenneis C, Michaelis M, Geisslinger G, Scholich K (2007) Inhibition of Cyclooxygenases by Dipyron. *British Journal of Pharmacology* 151:494–503
99. Puech B, Cameli M, Chancrin JL, Pierre C, Dufour M, Elizagaray A (1990) Biointegration of massive bone allografts: imaging and histological studies in cat. *Biomaterials* 11:75–78
100. Puzas EJ, Houck J, Bukata SV (2006) Accelerated Fracture Healing. *JAAOS - Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 14:145–151
101. Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland Novaminsulfon-Ratiopharm 500mg Tabletten Fachinformation.
102. Reist L, Erlenwein J, Meissner W, Stammschulte T, Stüber F, Stamer UM (2018) Dipyron is the preferred nonopioid analgesic for the treatment of acute and chronic pain. A survey of clinical practice in German-speaking countries. *Eur J Pain* 22:1103–1112

103. Rogosch T, Sinning C, Podlewski A, Watzler B, Schlosburg J, Lichtman AH, Cascio MG, Bisogno T, Di Marzo V, Nüsing R, Imming P (2012) Novel bioactive metabolites of dipyron (metamizol). *Bioorg Med Chem* 20:101–107
104. Rossant J, Nagy A (1995) Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat Med* 1:592–594
105. Samvelyan HJ, Mathers JC, Skerry TM (2021) Feeding intervention potentiates the effect of mechanical loading to induce new bone formation in mice. *The FASEB Journal* 35:e21792
106. Schenk RK (1978) [Histology of primary bone healing in light of new concepts of bone reconstruction (author's transl)]. *Unfallheilkunde* 81:219–227
107. 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
108. Schmidmaier G, Wildemann B, Melis B, Krummrey G, Einhorn TA, Haas NP, Raschke M (2004) Development and Characterization of a Standard Closed Tibial Fracture Model in the Rat. *Eur J Trauma* 30:35–42
109. Schönbeck C, Stutz J, Siep C, Metzger JW, Giorgi M, Sartini I, Pohlemann T, Fritz T, Menger M, Orth M (2022) Einfluss von Metamizol auf die Frakturheilung im murinen Ischämie-Modell. *Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU)*. URL: <https://www.egms.de/static/en/meetings/dkou2022/22dkou426.shtml>
110. 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
111. Simon AM, Manigrasso MB, O'Connor JP (2002) Cyclo-Oxygenase 2 Function Is Essential for Bone Fracture Healing. *Journal of Bone and Mineral Research* 17:963–976
112. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang M-S, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan H-L, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell* 89:309–319
113. Soncini R, De Souza DF, Neves AP, Braga DS, Andrade CAF, Giusti-Paiva A (2012) Dipyron attenuates acute sickness response to lipopolysaccharide in mice. *Neuroscience Letters* 516:114–118
114. Stromer W, Palladini M (2022) Metamizole: A comprehensive approach to its benefit-risk profile. *Evid Self Med* 2:1–4
115. Su J-L, Chiou J, Tang C-H, Zhao M, Tsai C-H, Chen P-S, Chang Y-W, Chien M-H, Peng C-Y, Hsiao M, Kuo M-L, Yen M-L (2010) CYR61 Regulates BMP-2-dependent

- Osteoblast Differentiation through the  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  Integrin/Integrin-linked Kinase/ERK Pathway\*. *Journal of Biological Chemistry* 285:31325–31336
116. Tang D, Liu X, Chen K, Li Z, Dai Y, Xu J, Zhang H-T, Gao X, Liu L (2020) Cytoplasmic PCNA is located in the actin belt and involved in osteoclast differentiation. *Aging* 12:13297–13317
  117. Tang G, Charo DN, Wang R, Charo IF, Messina L (2004) CCR2<sup>-/-</sup> knockout mice revascularize normally in response to severe hindlimb ischemia. *Journal of Vascular Surgery* 40:786–795
  118. Thaller SR, Hoyt J, Tesluk H, Stevenson TR (1993) Midfacial fracture repair in the adult rat. *Ann Plast Surg* 31:66–71
  119. Tomaszewski P, Kubiak-Tomaszewska G, Pachecka J Cytochrome P450 polymorphism - molecular, metabolic, and pharmacogenetic aspects. III. Influence of CYP genetic polymorphism on population differentiation of drug metabolism phenotype. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 65:319–329
  120. Toombs JP, Wallace LJ, Bjorling DE, Rowland GN (1985) Evaluation of Key's hypothesis in the feline tibia: an experimental model for augmented bone healing studies. *Am J Vet Res* 46:513–518
  121. Topuz RD, Cetinkaya MZ, Erumit D, Duvan Aydemir K, Gunduz O, Karadag CH, Ulugol A (2021) The role of endocannabinoid system and TRPV1 receptors in the antidepressant and anxiolytic effects of dipyrone in chronic unpredictable mild stress in mice. *European Journal of Pharmacology* 908:174315
  122. Tortorici V, Vanegas H (2000) Opioid tolerance induced by metamizol (dipyrone) microinjections into the periaqueductal grey of rats. *European Journal of Neuroscience* 12:4074–4080
  123. Utvåg SE, Grundnes O, Reikerås O (1994) Healing of segmental and simple fractures in rats. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 65:559–563
  124. Vazquez E, Hernandez N, Escobar W, Vanegas H (2005) Antinociception induced by intravenous dipyrone (metamizol) upon dorsal horn neurons: Involvement of endogenous opioids at the periaqueductal gray matter, the nucleus raphe magnus, and the spinal cord in rats. *Brain Research* 1048:211–217
  125. Vlahov V, Badian M, Verho M, Bacracheva N (1990) Pharmacokinetics of metamizol metabolites in healthy subjects after a single oral dose of metamizol sodium. *Eur J Clin Pharmacol* 38:61–65
  126. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM (2006) RANKL–RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends in Molecular Medicine* 12:17–25
  127. White PF (2005) The Changing Role of Non-Opioid Analgesic Techniques in the Management of Postoperative Pain. *Anesthesia & Analgesia* 101:5–22

128. Wissing H, Stürmer K, Breidenstein G (1990) Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspecies für experimentelle Untersuchungen am Knochen. Springer, Berlin Heidelberg
129. 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
130. Yamagiwa H, Tokunaga K, Hayami T, Hatano H, Uchida M, Endo N, Takahashi HE (1999) Expression of metalloproteinase-13 (collagenase-3) is induced during fracture healing in mice. Bone 25:197–203
131. Yu X, Guo Y, Kang Q, Luo C (2013) Effects and mechanisms of mechanical stress on secondary fracture healing. Frontiers in Bioscience-Landmark 18:1344–1348
132. Zukowski M, Kotfis K (2009) [Safety of metamizole and paracetamol for acute pain treatment]. Anestezjol Intens Ter 41:170–175
133. Zahlen zu den im Jahr 2020 verwendeten Versuchstieren. [http://www.bf3r.de/de/verwendung\\_von\\_versuchstieren\\_im\\_jahr\\_2020-288932.html](http://www.bf3r.de/de/verwendung_von_versuchstieren_im_jahr_2020-288932.html) 47
134. Körpermaße nach Altersgruppen und Geschlecht. URL: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Gesundheitszustand-Relevantes-Verhalten/Tabellen/liste-koerpermasse.html>

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Entstehung und dem Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben:

Zunächst danke ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Marcel Orth, für die Überlassung des Themas, seine Ratschläge und Hilfe bei der Ausarbeitung der Thematik sowie der Interpretation und Veröffentlichung der Daten.

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Fr. Dr. Janine Stutz. Sie bot mir allumfassende und herausragende Betreuung während dieser Zeit. Sie stand mir allzeit mit Rat und Tat zur Seite, war wirklich jederzeit erreichbar und immer konstruktiv in Kritik und Förderung.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Lukas Keller für die gegenseitige, großartige und freundschaftliche Unterstützung während dieser Zeit.

Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Wolfgang Metzger danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und die große Unterstützung bei der Erzeugung und Interpretation der Daten im Rahmen der Blutuntersuchungen zum Stoffwechsel von Metamizol in der Maus, sowie seiner Unterstützung bei der Kommunikation mit Hr. Prof. Giorgi und Fr. Dr. Sartini.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Prof. Mario Giorgi des „Departement of Veterinary Sciences“ der Universität von Pisa, San Piero a Grado, Pisa, Italien, sowie bei Frau Dr. Irene Sartini des „Departement of Veterinary Medicine“ der Universität von Sassari, Sassari, Italien, bedanken. Dank ihrer Expertise wurde es erst möglich, die Konzentration der Serumwerte von Metamizol in der Maus zu ermitteln.

Frau Dr. med. vet. Monika Frings und Frau Dr. med. vet. Christina Körbel danke ich für die große Hilfe beim Erlernen und Verbessern des Umgangs mit den Mäusen und der Unterstützung bei Fragen.

Herrn Professor Dr. med. Michael D. Menger und Herrn Professor Dr. med. Matthias W. Laschke danke ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten, technischen Hilfsmittel, Medikamente und diagnostischen Geräte.

Herrn Professor Dr. med. Tim Pohlemann und Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Emmanouil Liodakis danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Durchführung

der Studie und für die Förderung zur Teilnahme am DKOU-Kongress in Berlin im Oktober 2022.

Frau Dr. rer. nat. Claudia Scheuer und Frau Caroline Bickelmann gilt ebenso wie Frau Janine Becker mein aufrichtiger Dank für die Unterstützung in der Erstellung der proteinbiochemischen und histologischen Analysen.

Ebenso gilt mein Dank dem ganzen Team der Tierpflege und allen beteiligten Mitarbeitern des Instituts der experimentellen Chirurgie für die großartige und aufmerksame Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima, dass sie geschaffen haben.

Des Weiteren danke ich meinen Freunden, die mich in dieser Zeit unterstützt haben. Der rege Austausch, ihre Ideen und Zuspruch waren mir eine große Hilfe.

**Zu guter Letzt möchte ich von ganzem Herzen meinen Eltern danken! Sie haben mir als Vorbilder und Unterstützer diesen Werdegang ermöglicht, mich gefördert und standen mir stets mit Rat und Tat zu Seite.**

## 9 Publikationen

### 9.1 Vorträge

Die Ergebnisse wurden am 27.10.2022 als ePoster unter dem Titel „Einfluss von Metamizol auf die Frakturheilung im murinen Ischämiemodell“ auf dem Deutschen Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU) in Berlin präsentiert [109].

Eine Präsentation der Ergebnisse in Form eines Onlinevortrages unter dem Titel „Einfluss von Metamizol im murinen Ischämiemodell“ fand am 20.04.2023 im Rahmen des DCK.digital (Deutscher Chirurgie Kongress) in der Session „Chirurgische Forschung: Knorpel- und Knochenregeneration“ statt.

### 9.2 Fachjournal

Es erfolgte eine Veröffentlichung der Daten als Originalarbeit:

Schönbeck C, Stutz J, Schreiber ST, Keller L, Siep C, Metzger W, Giorgi M, Sartini I, Fritz T, Pohlemann T, Menger MD, Liidakis E, Laschke MW, Orth M (2025) Metamizole does not affect fracture healing in a murine ischemia model. *Frontiers in Physiology* 16 DOI: 10.3389/fphys.2025.1630268

## 10 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Stadien der Frakturheilung in Anlehnung an Schindeler <i>et al.</i> [107] .....	16
<b>Abbildung 2:</b> Strukturformel Metamizol-Natrium und der aktiven Metabolite 4-Methyl-Amino-Antipyrin und 4-Amino-Antipyrin [51].....	22
<b>Abbildung 3:</b> intramedulläre Zugschraube in Bohrfutter .....	32
<b>Abbildung 4:</b> Hinterlauf nach Vorbereitung.....	32
<b>Abbildung 5:</b> Darstellung Gefäßversorgung untere Extremität der Maus .....	32
<b>Abbildung 6:</b> Freigelegte A. profunda femoris mit unterlegtem Ligaturfaden .....	32
<b>Abbildung 7:</b> Darstellung der Patellarsehne vor Eröffnung der Kniegelenkscapsel .....	32
<b>Abbildung 8:</b> Blick auf die Femurkondylen nach Lateralisation der Patella .....	32
<b>Abbildung 9:</b> Eröffnung des Markraumes .....	33
<b>Abbildung 10:</b> Zustand nach Eröffnung des Markraumes .....	33
<b>Abbildung 11:</b> Eingelegter Wolframdraht.....	33
<b>Abbildung 12:</b> Radiologische Lagekontrolle .....	33
<b>Abbildung 13:</b> Anwendung der stumpfen Guillotine.....	33
<b>Abbildung 14:</b> Radiologische Darstellung nach Frakturerzeugung.....	33
<b>Abbildung 15:</b> Zuführung der intramedullären Zugschraube über Führungsdraht .....	34
<b>Abbildung 16:</b> Bohrfutteraufnahme mit Sollbruchstelle am distalen Konus kurz vor vollständiger Applikation der Schraube .....	34
<b>Abbildung 17:</b> Radiologische Abschlusskontrolle .....	34
<b>Abbildung 18:</b> Kapselnaht Kniegelenk.....	34
<b>Abbildung 19:</b> Hautnaht.....	34
<b>Abbildung 20:</b> gereinigtes Femur in der Dreipunktbiegung .....	38
<b>Abbildung 21:</b> Röntgenkontrolle nach 5 Wochen .....	38
<b>Abbildung 22:</b> Röntgenbild zur Bewertung nach Goldberg-Score .....	39
<b>Abbildung 23:</b> Beispiel einer Safranin-O-Färbung am Femur im sagittalen Längsschnitt. Beschriftung: A) Bindegewebe B) Knorpel C) Knochen.....	41
<b>Abbildung 24:</b> Serumkonzentration 4-MAA in [ $\mu$ M/ml]. MW $\pm$ SEM. ....	45
<b>Abbildung 25:</b> Serumkonzentration 4-AA in [ $\mu$ M/ml]. MW $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs. 60 min.....	46
<b>Abbildung 26:</b> Frakturierte Knochen (Fx) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ. MW $\pm$ SEM # $p < 0,05$ vs. Fx 2 Wochen .....	46
<b>Abbildung 27:</b> Unfrakturierte Knochen (C) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ.....	47
<b>Abbildung 28:</b> Verhältnis der Biegesteifigkeit frakturierter zu unfrakturierten Knochen (Fx/C) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ. ....	47
<b>Abbildung 29:</b> Röntgen-Goldberg-Score (RGS) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ. MW $\pm$ SEM.....	47
<b>Abbildung 30:</b> Trabekelanzahl (TbN) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ. MW $\pm$ SEM..	48

<b>Abbildung 31:</b> Trabekelabstand (TbSp) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ. MW ± SEM .....	48
<b>Abbildung 32:</b> Trabekeldicke (TbTh) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ. MW ± SEM ..	49
<b>Abbildung 33:</b> Knochenvolumen (BV) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ. MW ± SEM	49
<b>Abbildung 34:</b> Kallusvolumen (TV) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ. MW ± SEM .....	49
<b>Abbildung 35:</b> Anteil Knochenvolumen am Kallusvolumen (BV/TV) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ. MW ± SEM #p<0,05 vs. BV/TV 2 Wochen .....	50
<b>Abbildung 36:</b> Kallusfläche (CAr) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ. MW ± SEM #p<0,05 vs. CAr 2 Wochen .....	50
<b>Abbildung 37:</b> Verhältnis von Knochen- zur Gesamtkallusfläche (TOTAr/CAr) 2 Wochen und 5 Wochen postoperativ. MW ± SEM #p<0,05 vs. TOTAr/CAr 2 Wochen .....	51
<b>Abbildung 38:</b> Cyr61 Expression. MW ± SEM. *p<0,05 vs. Kontrolle .....	51
<b>Abbildung 39:</b> RANKL Expression. MW ± SEM. *p<0,05 vs. Kontrolle .....	52
<b>Abbildung 40:</b> RUNX2 Expression. MW ± SEM. *p<0,05 vs. Kontrolle .....	52
<b>Abbildung 41:</b> CD31 Expression. MW ± SEM .....	53
<b>Abbildung 42:</b> OPG Expression. MW ± SEM.....	53
<b>Abbildung 43:</b> PCNA Expression. MW ± SEM.....	54

## 11 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Auflistung Nebenwirkungen Metamizol [92,101].....	26
<b>Tabelle 2:</b> Gruppeneinteilung Versuchstiere.....	29
<b>Tabelle 3:</b> Goldberg-Score.....	39
<b>Tabelle 4:</b> Farbschema bei Safranin-O-Färbung .....	41
<b>Tabelle 5:</b> Faktoren der Western-Blot Analyse und ihre Funktion .....	42
<b>Tabelle 6:</b> Serumlevel der Metabolite 4-MAA und 4-AA .....	45

## **12 Lebenslauf**

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

