

Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungs chirurgie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. T. Pohlemann

**Inhibition des Enzyms 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2
-Ein neuer Ansatz zur Beeinflussung der Frakturheilung
im Mausmodell**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2019

vorgelegt von: Yannik Biskupek
geb. am: 04.03.1990 in St. Wendel

Dekan: Prof. Dr. med. M. D. Menger
1. Gutachter: Prof. Dr. med. J. H. Holstein
2. Gutachter: Prof. Dr. med. S. Landgraeber
Tag der Promotion: 18.05.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Zusammenfassung.....	11
1.1. Zusammenfassung	11
1.2. Summary	13
2. Einleitung.....	16
2.1. Knochen	16
2.1.1. Makroskopische Anatomie.....	16
2.1.2. Histologie.....	16
2.1.3. Physiologie	19
2.2. Frakturheilung.....	19
2.2.1. Primäre Frakturheilung	20
2.2.2. Sekundäre Frakturheilung	20
2.3. Wachstumsfaktoren.....	22
2.3.1. Bone Morphogenetic Protein (BMP).....	22
2.3.2. Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL).....	22
2.3.3. Osteoprotegerin (OPG)	23
2.3.4. Vascular endothelial growth factor (VEGF)	23
2.4. Frakturmodelle.....	23
2.4.1. Großtiermodelle	24
2.4.1.1. Schaf	25
2.4.1.2. Hund	25
2.4.1.3. Ziege	25
2.4.2. Kleintiermodelle	25
2.4.2.1. Kaninchen	26
2.4.2.2. Ratte	26
2.4.2.3. Maus.....	26
2.5. Sexualhormone und Frakturheilung	28
2.5.1. Östrogene	29
2.5.1.1. Synthese	29
2.5.1.2. Rezeptoren.....	29
2.5.1.3. Östrogene und Frakturheilung.....	30
2.5.2. Androgene	30

2.5.2.1. Synthese	30
2.5.2.2. Rezeptor	31
2.5.2.3. Androgene und Frakturheilung	31
2.6. Intrakrinologie	31
2.6.1. 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (17 β -HSD)	32
2.6.2. Inhibition der 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase	33
2.6.3. Inhibitoren	34
2.6.4. AA115	35
2.7. Zielsetzung	36
2.8. Fragestellung	37
3. Material und Methodik	38
3.1. Versuchstiere und Tierhaltung	38
3.2. Frakturmodell	38
3.3. Studiendesign	41
3.4. Medikamentengabe	42
3.5. Probengewinnung	42
3.6. Hochauflösende mikro-computertomographische Analyse	43
3.6.1. Bildakquisition	43
3.6.2. Bildrekonstruktion und ROI-Festlegung	44
3.6.3. Analyse der knochenspezifischen Parameter	44
3.7. Biomechanische Analyse	45
3.8. Histologische Untersuchung	45
3.9. Western Blot Analyse	46
3.9.1. SDS-PAGE	46
3.9.2. Proteintransfer	47
3.9.3. Immunmarkierung	47
3.10. Bestimmung der Organgewichte	48
3.11. Plasmaanalysen	48
3.12. Statistik	48
4. Ergebnisse	49
4.1. Postoperativer klinischer Verlauf	49
4.2. Biomechanik	49

4.3. Histologische Untersuchungsergebnisse nach 14 Tagen	50
4.4. Histologische Untersuchungsergebnisse nach 28 Tagen	52
4.5. µCT-Ergebnisse nach 14 Tagen	54
4.6. µCT-Ergebnisse nach 28 Tagen	54
4.7. Western Blot-Ergebnisse nach 14 Tagen	56
4.8. Western Blot-Ergebnisse nach 28 Tagen	57
4.9. Relative Organgewichte	58
4.10. Plasmaanalysen	59
5. Diskussion	60
5.1. Diskussion der Methoden	60
5.2. Diskussion der Ergebnisse	64
6. Literaturverzeichnis	69
7. Danksagung.....	82
8. Publikationen.....	84
9. Lebenslauf	85

Für Paddi

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius
®	Registered Trade Mark
17β-HSD	17β-Hydroxysteroiddehydrogenase
17β-HSD1-5	17β-Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1-Typ 5
3β-HSD	3β-Hydroxysteroiddehydrogenase
Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
AR	Androgenrezeptor
AZ	Aktenzeichen
BMD	Bone Mineral Density
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMU	Bone Metabolic Unit
BSH	bizyklisch substituierten Hydroxyphenylmethanone
BV	Bone Volume
CaHA	Kalziumhydroxyapatit
CAR	constitutive androstane receptor
cm ³	Kubikzentimeter
CYP	Cytochrom P450
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEA-S	Dehydroepiandrosteron-Sulfat
DHT	5α-Dihydrotestosteron
E1	Östron
E2	Östradiol
E3	Östriol
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay

ERα und ERβ	Östrogenrezeptor α und β
et al.	et alia
F	Kraft
g	Gramm
G	Gauge
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
Gr.	Größe
h17β-HSD	humane 17β-Hydroxysteroiddehydrogenase
HEK293-Zellen	Human Embryonic Kidney Zellen
hERG	human Ether-a-go-go Related Gene
I.E.	Internationale Einheit
IC ₅₀	mittlere Hemmkonzentration
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
L	Strecke
LH	luteinisierendes Hormon
m17β-HSD	murine 17β-Hydroxysteroiddehydrogenase
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
mm ³	Kubikmillimeter
ms	Millisekunden
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
N	Newton

NaCl	Natriumchlorid
NAD/ NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADP/ NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaN ₃	Natriumazid
ng	Nanogramm
OPG	Osteoprotegerin
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
pg	Picogramm
PI	Pixelintensität
PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
PVDF	Polyvenylendiflourid
PXR	pregnane X receptor
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor-κB
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor-κB Ligand
ROI	Region of Interest
S	Biegesteifigkeit
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Standardfehler (engl. Standard Error of the Mean)
SERM	selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator
SF	Selektivitätsfaktor
T	Testosteron
t _{1/2}	Halbwertszeit
Tb.N	Trabekelzahl (engl. trabecular number)
Tb.Sp	Trabekelabstand (engl. trabecular separation)
Tb.Th	Trabekeldicke (engl. trabecular thickness)
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween20
™	Unregistered Trade Mark
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TV	Tissue Volume
UDPGA	Uridine 5'-diphospho-Glucuronosyltransferase

v/v	volume per volume
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VOI	Volume of Interest
vs.	versus
w/w	weight per weight
μ CT	Mikro-Computertomographie
μ M	Mikromolar

1. Zusammenfassung

1.1. Zusammenfassung

Die aktuelle Behandlung steroidhormonabhängiger Erkrankungen besteht vorwiegend aus Behandlungsmaßnahmen, welche die Steroidhormonkonzentration nicht nur im Zielorgan, sondern auch in anderem Gewebe und im Plasma verändern. Eine gezieltere Therapie durch Hemmung von Enzymen des intrazellulären Steroidhormonstoffwechsels stellt daher eine attraktive Alternative mit günstigerem Nebenwirkungsprofil dar. Ein wichtiges Enzym dieses intrakrinologischen Stoffwechsels ist die 17β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2 (17β -HSD2), welche die Konversion von Östradiol (E2) und Testosteron (T) in ihre biologisch weniger aktiven Ketoformen katalysiert. Eine Blockade der 17β -HSD2 im Knochen führt somit zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration von E2 und T. Dadurch kommt es zu einer Hemmung der Knochenresorption und Stimulation der Knochenformation.

Die durchgeführten tierexperimentellen Studien hatten zum Ziel, den Einfluss des 17β -HSD2-Inhibitors AA115 auf die Knochenheilung in der Maus zu untersuchen. Hierfür wurde ein standardisiertes und bereits etabliertes geschlossenes Frakturmodell der Maus herangezogen. Als Versuchstiere dienten männliche C57BL/6-Mäuse (n=50). Nach Frakturierung des rechten Femurs und Stabilisierung mit einer intramedullären Zugschraube wurde der Versuchsgruppe (n=25) täglich in einer Vehikellösung gelöstes AA115 in einer Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht (KG) subkutan appliziert. Die Kontrolltiere (n=25) erhielten ein äquivalentes Volumen Vehikellösung. Zwei, respektive vier Wochen nach Operation und Behandlung mit AA115 oder Vehikellösung wurden die Tiere narkotisiert und getötet. Sowohl das frakturierte, als auch das kontralaterale Femur wurden für biomechanische, radiologische, histologische und proteinbiochemische Analysen explantiert. Für laborchemische Untersuchungen wurde allen Tieren außerdem Blut entnommen.

Die Stabilität des Frakturkallus wurde mittels zerstörungsfreier Drei-Punkt-Biegetestung untersucht. Es wurde die Biegesteifigkeit des frakturierten sowie des kontralateralen Femurs bestimmt. Alle Werte zur Biegesteifigkeit des verheilten Knochens wurden absolut und zusätzlich in Relation zum gesunden Knochen angegeben.

Die radiologische Analyse erfolgte mit Hilfe eines Mikro-Computertomographen. Zur Beurteilung wurden Rekonstruktionen des Frakturkallus angefertigt und das Gesamtvolumen sowie das Knochenvolumen im Gesamtvolumen bestimmt. Darüberhinaus wurden mittlere Anzahl, Breite und Abstand der Knochentrabekel bestimmt. Außerdem erfolgte ein Vergleich der Knochenmineralisation durch Bestimmung der Bone Mineral Density.

Zusammenfassung

Die histologische Beurteilung erfolgte an nach der Masson-Goldner-Trichrome-Methode gefärbten sagittalen, longitudinalen Schnittpräparaten der Knochen. Es wurden die periostale Kallusfläche, sowie die Anteile von Knochen, Knorpel und Bindegewebe innerhalb des periostalen Kallus untersucht.

Zur proteinbiochemischen Untersuchung des Frakturkallus wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Im Speziellen wurde zur Beurteilung der Knochenbildung der osteogene Marker Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) bestimmt. Zur Beurteilung der Knochenresorption wurde die Expression von Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL) und Osteoprotegerin (OPG) bestimmt. Zusätzlich erfolgte ein semiquantitativer Nachweis des osteo- und angiogenen Wachstumsfaktors Vascular endothelial growth factor (VEGF) im Kallus.

Aus den gewonnenen Blutproben wurde die Konzentration von E2 und T im Plasma ermittelt.

Nach statistischer Auswertung der biomechanischen, radiologischen, histologischen, proteinbiochemischen und laborchemischen Analysen zeigten sich folgende Ergebnisse:

1. Zwei Wochen postoperativ hatte die Behandlung mit AA115 keinen Einfluss auf die absolute oder relative Biegesteifigkeit der frakturierten Femora.
Nach vier Wochen zeigten sich jedoch eine signifikant erhöhte absolute und relative Biegesteifigkeit bei den mit AA115 behandelten Tieren.
2. Weder die periostale Kallusfläche, noch die Gewebezusammensetzung des periostalen Kallus unterschieden sich nach zwei Wochen.
Nach vier Wochen fand sich eine um 61% größere periostale Kallusfläche bei den mit AA115 behandelten Tieren. Im Vergleich zu den Kontrolltieren bestand diese periostale Kallusfläche aus signifikant mehr Knochen, während sich die Anteile von Knorpel und Bindegewebe an der Gesamtfläche nicht unterschieden.
3. Das Gesamtkallusvolumen und das Knochenvolumen wiesen in der CT-volumetrischen Bestimmung zwei Wochen postoperativ keine Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe auf.
Vier Wochen postoperativ zeigte sich jedoch ein tendenziell größeres Kallusvolumen bei den mit AA115 behandelten Tieren.
Hinsichtlich ihrer Trabekelstruktur und Knochendichte unterschieden sich die Gruppen weder nach zwei noch nach vier Wochen.
4. Die Behandlung mit AA115 führte nach zwei Wochen zu einer signifikant erhöhten Expression von OPG. Die übrigen wie oben beschrieben bestimmten Proteine wiesen

Zusammenfassung

hinsichtlich ihrer Expression zu diesem Untersuchungszeitpunkt keine Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe auf.

Nach vier Wochen zeigte sich eine signifikant stärkere Expression von VEGF bei den mit AA115 behandelten Tieren.

5. Sowohl zwei als auch vier Wochen postoperativ konnte zwischen den Versuchsgruppen kein Unterschied hinsichtlich der Plasmakonzentration der Hormone E2 und T ermittelt werden.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass im Mausmodell durch die Hemmung der 17 β -HSD2 die mechanische Stabilität nach Knochenbrüchen durch einen größeren Kallus mit neu gebildetem Knochen deutlich gesteigert wird. Die selektive Blockade der 17 β -HSD2 mit AA115 zeigte keinen Einfluss auf die Plasmakonzentration von E2 oder T und birgt daher ein geringes Risiko für systemische Nebenwirkungen.

1.2. Summary

Therapies of steroid hormone-dependent diseases involve predominantly medication that alters steroid hormone concentrations not only in the target organs but also in non-target tissue and in plasma. A more selective therapy which influences intracellular steroidogenic enzymes represents a promising alternative with much less side-effects. 17 β -HSD2 is one important enzyme in this intracrinologic metabolism. It converts estradiol and testosterone into their less active ketones. Blockade of 17 β -HSD2 increases intracellular E2 and T in target tissue as bone, and through stimulation of estrogen and testosterone receptor, thus inhibits bone resorption and stimulates bone formation.

The aim of the present study was to investigate the effect of 17 β -HSD2 inhibition by AA115, a newly designed agent, on fracture healing in mice. Bone healing was studied in a murine closed femur fracture model. For the present study, male C57BL/6 mice ($n=50$) were used. After fracture and stabilisation of the femora with an intramedullary screw, 25 mice were treated daily with 50 mg/kg body weight AA115 administered subcutaneously in a vehicle solution. Another 25 vehicle-treated animals served as controls. After two, respectively four weeks observation period the animals were anaesthetised and sacrificed. The fractured femur and the contralateral femur were resected for further biomechanical, radiological, histological and Western blot analysis. In addition, blood samples were taken for plasma analysis.

The callus stiffness was analysed non-destructively with a three-point bending device. The bending stiffness of the fractured femora as well as the bending stiffness of the contralateral

Zusammenfassung

femora was analysed. Therefore, all values are additionally given in percent of the corresponding unfractured femur.

A high resolution micro-computed tomography (μ CT) imaging system was used for radiological analysis. After 3D-reconstruction of the callus, the following parameters were determined: tissue volume, bone volume within the overall tissue volume, trabecular thickness, trabecular number and trabecular separation. For comparison of bone mineralisation, the bone mineral density was measured.

For histological analysis, sagittal longitudinal sections were stained according to the trichrome method. The periosteal callus area as well as the bone, cartilage and fibrous tissue area within the periosteal callus area were analysed.

To quantify protein expression, Western blot analyses of BMP-2, RANKL, OPG and VEGF expression were performed.

The blood samples were used to analyse the plasma levels of E2 and T.

The biochemical, radiological, histomorphometric, chemical and Western blot analyses revealed the following results:

1. Two weeks after surgery, the treatment with AA115 had no influence on the bending stiffness of the fractured femora.

However, after four weeks, a significantly higher bending stiffness of the fractured femora could be found in the AA115-treated group when compared to controls.

2. Neither the periosteal callus area nor the fractions of osseous, cartilaginous and fibrous tissue showed significant differences between the both groups after two weeks.

After four weeks, the periosteal callus area of the AA115-treated animals was 61% larger than in vehicle-treated controls. The periosteal callus contained significantly more bone than in vehicle-treated animals, while the cartilage and fibrous tissue areas in the perisoteal callus area did not differ significantly.

3. Tissue volume and bone volume, measured by μ CT, showed no difference between both groups after two weeks.

After four weeks, however, the AA115-treated animals tended to have a larger tissue and bone volume than the controls.

Neither after two, nor after four weeks, the analyses of trabecular parameters and bone mineral density showed any significant differences.

Zusammenfassung

4. Treatment with AA115 significantly increased the expression of OPG in callus after two weeks.

After four weeks the expression of VEGF was significantly increased in AA115-treated animals.

5. Treatment with AA115 did not affect plasma levels of E2 and T after two or four weeks.

Furthermore, the weight of the seminal vesicles was not affected.

Taken together, this study demonstrates that in a murine fracture model, inhibition of 17 β -HSD2 leads to a larger callus with more newly formed bone and thereby increases the mechanical stability of a fractured bone. Selective inhibition of 17 β -HSD2 by AA115 did not affect plasma E2 and T concentrations and is therefore unlikely to evoke systemic side-effects.

2. Einleitung

2.1. Knochen

2.1.1. Makroskopische Anatomie

Morphologisch unterscheidet man Ossa longa (lange Knochen, Röhrenknochen), Ossa brevia (kurze Knochen), Ossa plana (platte Knochen) und Ossa irregularia (unregelmäßige Knochen) (SCHIEBLER et al., 1999; SCHÜNKE et al., 2007).

Das in dieser Arbeit untersuchte Femur gehört zu den langen Knochen, die man in verschiedene Abschnitte unterteilen kann. An den meist gelenktragenden Enden weisen sie die Epiphysen auf, der mittlere Schaftbereich wird Diaphyse genannt, die Übergangszonen zwischen beiden Abschnitten bezeichnet man als Metaphysen. Die hier untersuchten Frakturen waren im Bereich der Diaphyse lokalisiert (SCHIEBLER et al., 1999; SCHÜNKE et al., 2007).

Hinsichtlich der makroskopischen Struktur lassen sich zwei Arten von Knochengewebe unterscheiden. Die Substantia compacta ist aus solidem kortikalem Knochen aufgebaut und befindet sich in der Peripherie des Knochens. Die innere Substantia spongiosa besteht aus trabekulärem Knochen (WELSCH et al., 2006).

2.1.2. Histologie

Histologisch besteht Knochen aus Knochenzellen und interzellulärer Knochegrundsubstanz. Diese setzt sich zu 65% aus anorganischen Salzen, im Wesentlichen Calciumphosphate in Form von Calciumhydroxylapatit und zu 35% aus organischem Material wie Kollagen Typ 1, nicht-kollagenen Proteinen und Lipiden zusammen (JUNQUEIRA et al., 2004; WELSCH et al., 2006).

Es können vier verschiedene Typen von Knochenzellen unterschieden werden. Osteoprogenitorzellen sind die Vorläuferzellen der Osteoblasten und differenzieren sich aus mesenchymalen Stammzellen. Sie liegen an innerer und äußerer Knochenoberfläche und differenzieren in erster Linie unter hormonellem Einfluss über Präosteoblasten zu Osteoblasten (JUNQUEIRA et al., 2004; WELSCH et al., 2006).

Osteoblasten stellen die Knochenmatrix bildenden Zellen dar. In ihrem aktiven Zustand besitzen sie eine kubische bis prismatische Form und liegen der Oberfläche von Knochenbälkchen auf. Sie sezernieren das zunächst noch nicht verkalkte Osteoid, welches

Einleitung

im weiteren Verlauf des Knochenaufbaus mit Hilfe der alkalischen Phosphatase mineralisiert wird. Osteoblasten haben weiterhin eine Bedeutung beim Knochenabbau. Als Zielzellen des Parathormons produzieren sie Enzyme zum Abbau des Osteoids. Auf diese Weise ermöglichen sie den Osteoklasten den Zugang zur darunter liegenden mineralisierten Knochenmatrix.

Inaktive Osteoblasten stellen sich dagegen mikroskopisch als abgeflachte Deckzellen mit wenig Organellen dar (bone lining cells).

Osteozyten entstehen aus Osteoblasten, nachdem diese komplett von Osteoid umschlossen wurden (JUNQUEIRA et al., 2004; WELSCH et al., 2006).

Im Gegensatz zu den bisher genannten Knochenzellen entwickeln sich Osteoklasten nicht aus mesenchymalen, sondern aus hämatopoetischen Vorläuferzellen. Als mehrkernige Riesenzellen des Monozyten-Makrophagen-Systems dienen sie dem Abbau mineralisierter Grundsubstanz. Sie liegen in Vertiefungen von abzubauenden Knochenoberflächen, den Howship-Lakunen (JUNQUEIRA et al., 2004; WELSCH et al., 2006).

Nach der Anordnung der Zellen und Grundsubstanz unterscheidet man Lamellen- und Geflechtknochen. Im Geflechtknochen verlaufen Kollagenfaserbündel ungeordnet in groben Bündeln, die Osteozyten liegen diffus verteilt und der Anteil anorganischer Grundsubstanz ist im Vergleich zum Lamellenknochen geringer. Das Wachstum des Geflechtknochens erfolgt entlang von Kapillaren, Lamellenknochen wächst im Gegensatz dazu entlang von Kraftlinien. Im Zuge einer desmalen und enchondralen Ossifikation oder Frakturheilung entsteht zunächst Geflechtknochen, der zu Lamellenknochen umgebaut wird (SCHIEBLER et al., 1999; JUNQUEIRA et al., 2004; WELSCH et al., 2006).

Der Lamellenknochen der Substantia compacta setzt sich aus einzelnen Baueinheiten, den Osteonen oder Havers-Systemen, zusammen. Hierbei handelt es sich um einen längsverlaufenden Kanal, den Zentral- oder Havers-Kanal, um welchen konzentrisch Knochenlamellen geschichtet sind. In diesen so genannten Speziallamellen verlaufen die Kollagenfibrillen in helikaler Anordnung parallel zum Havers-Kanal (WELSCH et al., 2006).

Zwischen den Speziallamellen liegen in linsenförmigen Knochenhöhlen (Lacunae osseae) die Osteozyten. Von diesen Lakunen nehmen radiäre Knochenkanälchen (Canaliculi ossei) ihren Ursprung. Die Kanälchen beinhalten Osteozytenfortsätze und stellen über benachbarte Osteozyten eine Verbindung zum Havers-Kanal und den darin laufenden Blutgefäßen (Havers-Gefäße) dar. Sie besitzen auf diese Weise eine wesentliche Funktion in der Nutrition der Osteozyten, da eine Diffusion von Nährstoffen über die mineralisierte Knochenmatrix nicht möglich ist (JUNQUEIRA et al., 2004; WELSCH et al., 2006).

Die Havers-Kanäle sind über sogenannte Volkmann-Kanäle verbunden. Sie stellen Verzweigungen der Havers-Kanäle dar. Im Zentralkanal sind neben Blutgefäßen auch vegetative Nervenfasern und Bindegewebe zu finden.

Einleitung

Zwischen intakten Osteonen liegen Reste teilweise abgebauter Osteone, welche man als Schaltlamellen bezeichnet (WELSCH et al., 2006).

Zur äußeren Oberfläche unter dem Periost wird die Kompakta von mehreren Lamellen komplett umfasst. Diese werden äußere Generallamellen genannt. Hin zur inneren Oberfläche, angrenzend an die Spongiosa, befinden sich die inneren Generallamellen (JUNQUEIRA et al., 2004; WELSCH et al., 2006).

Die Trabekel der Spongiosa bestehen aus gefäßlosem unregelmäßig angeordnetem Lamellenknochen (WELSCH et al., 2006; SCHÜNKE et al., 2007).

Die Zwischenräume der Spongiosa beherbergen das Knochenmark. Dieses wird während der Embryonalentwicklung als rotes blutbildendes Mark angelegt. Die Hämatopoese findet primär in allen Knochen statt. Ab dem ersten Lebensjahr wird das rote Mark der langen Röhrenknochen jedoch zunehmend von gelbem Fettmark ersetzt, sodass sich die Blutneubildung mehr und mehr auf die kurzen und platten Knochen beschränkt. Diese Entwicklung kann bei chronischer Hypoxie oder Anämie reversibel sein (BOECKER et al., 2012).

Das Knochenmark beinhaltet neben hämatopoetischen Zellen auch Blutgefäße in Form der Knochenmarksinus und Stroma. Im Stroma finden sich Retikulozyten, Lipozyten und Osteoblasten. Die Retikulozyten bilden eine Matrix, die hämatopoetische Wachstumsfaktoren ebenso wie Interleukine binden kann. In biologisch aktiver Form werden sie dann den Zellen präsentiert, die an der Hämatopoese beteiligt sind (BOECKER et al., 2012).

Verglichen mit dem Menschen besitzt die Maus eine primitivere Knochenstruktur mit fehlendem Havers-System. Die Knochenregeneration nach Verletzungen wird hier über sogenannte Resorptionshöhlen vermittelt, welche sich nahe der Fraktur befinden und sich während der Heilung mit Osteoblasten auffüllen. (NUNAMAKER et al., 1998).

Außer im Bereich der mit Knorpel überzogenen Gelenkflächen wird der Knochen von Periost bedeckt. Hinsichtlich der Funktion lassen sich beim Periost zwei Schichten unterscheiden.

Das äußere Stratum fibrosum besteht aus straff angeordneten Kollagenfaserbündeln. Als Sharpey-Fasern strahlen sie in die Kortikalis ein. Sie befestigen somit das Periost zum einen am Knochen, zum anderen stehen sie mit Kollagenfasern einstrahlender Sehnen und Bändern in Verbindung und verteilen hier auftretende Zugkräfte auf eine größere Fläche (SCHIEBLER et al., 1999).

Das innere Stratum osteogenicum oder die Kambiumschicht enthält Osteoprogenitorzellen und trägt somit zur Knochenneubildung bei. Ihre Differenzierung zu Osteoblasten spielt zwar vor allem während des Wachstums eine große Rolle, setzt jedoch auch bei Knochenfrakturheilung nach Abschluss des physiologischen Wachstums wieder verstärkt ein. Weiterhin enthält die Kambiumschicht zahlreiche Gefäße und Kapillaren, die zur Ernährung beitragen und daher mit den Volkmann- und Havers-Gefäßen in Verbindung stehen.

Einleitung

Außerdem kommen hier viele freie Nervenendigungen vor, was die hohe Schmerzempfindlichkeit des Periosts erklärt (SCHIEBLER et al., 1999; JUNQUEIRA et al., 2004).

2.1.3. Physiologie

Wesentliche Aufgaben des Knochens sind als Teil des passiven Bewegungsapparates seine Stütz-, Struktur- und Mobilitätsfunktion. Daneben nimmt er als Speicherorgan aber auch eine zentrale Rolle in der Kalziumhomöostase ein (SCHIEBLER et al., 1999).

Ständig ablaufende Prozesse der Knochenformation und -resorption sind daher essentielle Voraussetzungen zur Ausführung dieser Funktionen. Diese sind in erster Linie durch Größenwachstum, Modeling und Remodeling gekennzeichnet (JUNQUEIRA et al., 2004).

Das Knochenwachstum erfolgt an den Epiphysenfugen. Dort kommt es durch Anlagerung von Knochenmasse an der Diaphysenseite zu einem Längenwachstum und so zu einer Zunahme der Knochenmasse (JUNQUEIRA et al., 2004; WELSCH et al., 2006).

Unter Modeling versteht man die Fähigkeit des Knochens gezielt auf biomechanische Belastung durch Formänderung zu reagieren. Dieser Vorgang findet vor allem in der Wachstumsphase in besonders ausgeprägter Form statt und nimmt mit dem Alter immer weiter ab (JUNQUEIRA et al., 2004; WELSCH et al., 2006).

Als Remodeling bezeichnet man einen Prozess, der zeitlebens abläuft und keine Zunahme der Knochenmasse zur Folge hat. In einem Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und Knochenabbau, welches man als Coupling bezeichnet, werden unter anderem ständig entstehende Mikrofrakturen repariert. Die entsprechende morphologische Struktur wird Bone Metabolic Unit (BMU) genannt (JUNQUEIRA et al., 2004; WELSCH et al., 2006; MARTIN et al., 2009)

2.2. Frakturheilung

Die Frakturheilung ist ein komplexer dynamischer Prozess, welcher mit der Bildung von neuem Knochengewebe einhergeht. Für einen adäquaten Heilungsprozess sind eine ausreichende Ruhigstellung, Knochenkontakt der Frakturfragmente sowie eine suffiziente Vaskularisierung obligate Voraussetzungen. Frakturen können auf zwei Weisen heilen (EINHORN, 1998; SCHÜNKE et al., 2003; EINHORN, 2005).

2.2.1. Primäre Frakturheilung

Die primäre Frakturheilung läuft ohne Ausbildung einer äußereren Kallusmanschette ab. Wesentliche Voraussetzungen für diese Form der Frakturheilung sind zum einen eine hohe mechanische Stabilität und zum anderen eine ausreichende Vaskularisierung. Aus diesem Grund findet die primäre Frakturheilung nur nach anatomischer Reposition der Fragmente und anschließender operativer Stabilisierung durch eine Osteosynthese statt (EINHORN, 1998; SCHÜNKE et al., 2003; WELSCH et al., 2006).

In Abhängigkeit der Weite des Frakturpaltes unterscheidet man zwischen Kontaktheilung, bei der der Abstand der Fragmente weniger als 0,01 mm beträgt und Spaltheilung bei einem Abstand von über 0,01 mm bis maximal 1 mm (MARSELL et al., 2011).

Die Kontaktheilung erfolgt durch longitudinal einwachsende Osteone. Zunächst bohren Osteoklasten sogenannte Resorptionskanäle in die Kortikalis des gegenüberliegenden Fragmentes, welche im weiteren Verlauf von Osteoblasten wieder durch Lamellenknochen aufgefüllt werden. (MARSELL et al., 2011).

Im Rahmen der Spaltheilung erfolgt die Überbrückung des Frakturpaltes zunächst durch Geflechtknochen, welcher sekundär durch lamellären Knochen ersetzt wird (MARSELL et al., 2011; KONRADS et al., 2012).

Es ist nicht bekannt, ob unter den entsprechenden Voraussetzungen eine primäre Frakturheilung auch bei der Maus möglich ist. Alle bisher angewandten Frakturmodelle an der Maus ziehen eine sekundäre Frakturheilung nach sich (HILTUNEN et al., 1993; MANIGRASSO et al., 2004; HOLSTEIN et al., 2007; HOLSTEIN et al., 2009; HISTING et al., 2010).

2.2.2. Sekundäre Frakturheilung

Die Mehrzahl aller Frakturen heilt wegen einer nicht anatomischen Reposition im Sinne einer sekundären Frakturheilung. Diese lässt sich in fünf Phasen unterteilen, die fließend ineinander übergehen und sich teilweise überlappen (MC KIBBIN, 1978; EINHORN, 1998; SCHÜNKE et al., 2003; EINHORN 2005; SIEVERT et al., 2007; MARSELL et al., 2011)

- Frakturphase mit Entstehung eines Frakturhämatoms
- Inflammationsphase
- Granulationsphase

Einleitung

- Phase der Aushärtung des Kallusgewebes
- Modeling und Remodeling

In der Frakturphase kommt es durch Gewalteinwirkung zu einer Verletzung von Periost, Kortikalis, Spongiosa und Markraum. Zusätzlich zu dieser Unterbrechung der Knochenkontinuität werden auch umgebende Weichteile in unterschiedlichem Ausmaß mitgeschädigt, wodurch es zur Ausbildung eines Hämatoms im Frakturbereich kommt (MARSELL et al., 2011).

Die anschließende Entzündungsphase ist durch eine überschießende Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine gekennzeichnet. Insbesondere Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) sowie Interleukin-1 und -6 (IL-1 und IL-6) vermitteln eine Einsprossung neuer Kapillaren. Weiterhin werden pluripotente Stammzellen, neutrophile Granulozyten, sowie Makrophagen und Mastzellen zur Proliferation, Migration und Differenzierung angeregt. (MARSELL et al., 2011).

Auf die Entzündungsphase folgt die Granulationsphase. Das Hämatom mit dem darin enthaltenen Netz aus Fibrin und Kollagen wird zunehmend durch Granulationsgewebe ersetzt. Es enthält neben Lymphozyten und Fibroblasten auch Kollagenfaserbündel und Kapillaren. In unmittelbarer Nachbarschaft zu den Fibroblasten finden sich bereits in diesem Stadium Mineraldepots und aus mesenchymalen Vorläuferzellen differenzieren sich Chondroblasten. Auf diese Weise entsteht durch Ausbildung von Brücken aus Granulationsgewebe zwischen den Frakturfragmenten der sogenannte weiche Kallus (MARSELL et al., 2011).

Die in einiger Entfernung zum Frakturspalt zwischen Knochenoberfläche und Periost gelegenen Osteoprogenitorzellen differenzieren zu Osteoblasten und führen subperiostal zu einer direkten Knochenneubildung, die auch als primäre Kallusreaktion, desmale oder intramembranöse Ossifikation bezeichnet wird (EINHORN, 1998; EINHORN, 2005; MARSELL et al., 2011).

Zeitgleich kommt es zur Einwanderung des sogenannten Blastems aus dem Markraum. So wird der Frakturspalt mit einem medullären Kallus aufgefüllt (MC KIBBIN, 1978; EINHORN, 1998).

Um eine ausreichende Stabilisierung zu erreichen, wird der knorpelige Kallus in der Phase der Kallushärtung zunehmend durch Kalksalzeinlagerung mineralisiert. Das notwenige Kalzium stammt aus Mitochondrien hypertrophierter Chondrozyten (EINHORN, 2005; MARSELL et al., 2011)

Einleitung

Chondroblasten und Osteoblasten beginnen währenddessen bereits mit dem Abbau des kalzifizierten Knorpels. Dieser wird entlang neuer Kapillarsprosse von eingewanderten Osteoblasten im Sinne einer enchondralen Ossifikation durch Geflecktknochen ersetzt (EINHORN, 2005; SIEVERT et al., 2007; MARSELL et al., 2011).

In der Phase des Modelings und Remodelings findet ein Umbau des primitiveren Geflecktknochens zu Lamellenknochen entsprechend der mechanischen Belastung statt. Infolge dessen kommt es zur Wiederherstellung der physiologischen Knochenkontur und des ursprünglichen Markraums (SIEVERT et al., 2003; MARSELL et al., 2011).

2.3. Wachstumsfaktoren

Knochenauf- und -abbau sowie die Knochenregeneration werden durch verschiedene Wachstumsfaktoren reguliert. Im Folgenden werden einige der bedeutsamsten Faktoren kurz beschrieben.

2.3.1. Bone Morphogenetic Protein (BMP)

Die BMPs wurden in ihrer osteoinduktiven Wirkung erstmals von Urist et al. beschrieben und von Wozney et al. als solche identifiziert (URIST et al., 1965; WOZNEY et al., 1988).

Bis dato ist die Existenz von über zwanzig verschiedenen Typen bekannt, die, mit Ausnahme von BMP-1, alle Mitglieder der Transforming Growth Factor- β Superfamilie sind (WOZNEY et al., 1988; EVEN et al., 2012).

Insbesondere BMP-2 und BMP-4 konnte eine wichtige Rolle als Regulatoren der Osteoblastendifferenzierung zugeschrieben werden (YAMAGUCHI et al., 1996; CHEN et al., 1997). Die Gabe von BMP-2 und -7 hat bereits klinische Anwendung in der Behandlung von Knochendefekten gefunden (RONGA et al., 2013).

2.3.2. Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL)

Das Protein RANKL gehört zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) (ANDERSON et al., 1997). Über den Receptor Activator of NF- κ B (RANK), den Rezeptor von RANKL, ist es in vielerlei Hinsicht an der Differenzierung und Funktion von Osteoklasten beteiligt (KEARNS et al., 2008).

RANKL stimuliert die Fusion mononukleärer Osteoklastenvorläuferzellen zu multinukleären Zellen und die Differenzierung zu reifen Osteoklasten (LACEY et al., 1998). Es initiiert die Adhäsion reifer Osteoklasten an Knochenoberflächen, aktiviert diese zur Knochenresorption und senkt ihre Apoptoserate (BURGESS et al., 1999; O'BRIEN et al., 2000; LACEY et al., 2000).

Einleitung

RANKL wird unter anderem von Osteoblasten in löslicher und membrangebundener Form exprimiert und gilt als Marker der Osteoklastenaktivität (NAKASHIMA et al., 2000).

2.3.3. Osteoprotegerin (OPG)

OPG ist Mitglied der Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNFR). Es wird als Homodimer und in geringerer Menge als Monomer von Osteoblasten sezerniert (SIMONET et al., 1997).

Durch Bindung an RANKL verhindert es die Interaktion zwischen RANKL und RANK sowie die hierüber induzierte Osteoklastendifferenzierung (LACEY et al., 1998; YASUDA et al., 1998).

2.3.4. Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Der Bildung neuer Blutgefäße (Neovaskularisierung) wird eine Schlüsselrolle in der enchondralen Ossifikation im Rahmen der sekundären Frakturheilung zugeschrieben (CAPLAN et al., 1990). Als wesentlicher Angiogenesefaktor hierfür konnte das Molekül VEGF identifiziert werden (STREET et al., 2002).

In der frühen Phase der Frakturheilung ist VEGF maßgeblich an der Revaskularisierung des Frakturareals beteiligt (GLOWACKI et al., 1998; STREET et al., 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass VEGF im weiteren Verlauf der Frakturheilung dann zur Einsprössung neuer Gefäße in den avaskulären Knorpel führt, entlang derer im Anschluss neuer Geflechtknochen entsteht (GERBER et al., 1999; CARLEVARO et al., 2000).

VEGF stimuliert darüber hinaus die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Fibro-, Chondro- und Osteoblasten (CARLEVARO et al., 2000; STREET et al., 2002). Tierexperimentell konnte dieser direkte Effekt auf die Knochenformierung und Mineralisierung bestätigt werden, da eine VEGF-Inhibition zu verminderter Größe des knorpeligen Kallus und reduzierter Mineralisation führt (STREET et al., 2002).

2.4. Frakturmodelle

Bis dato konnten über in vitro Studien bereits umfangreiche Erkenntnisse über den Mechanismen der Frakturheilung gewonnen werden. Wegen der komplizierten Interaktionen verschiedener Zell- und Gewebearten sind Tiermodelle für die Forschung auf dem Gebiet der Frakturheilung allerdings noch immer unabdingbar (EINHORN, 1998). So wurden zahlreiche Frakturmodelle sowohl für Groß- als auch für Kleintiere entwickelt. O'Loughlin et al. untersuchten 2008 die Häufigkeit des Einsatzes verschiedener Tierarten in 291 Arbeiten aus renommierten Fachzeitschriften zur Knochenfrakturheilung (O'LOUGHLIN et al., 2008).

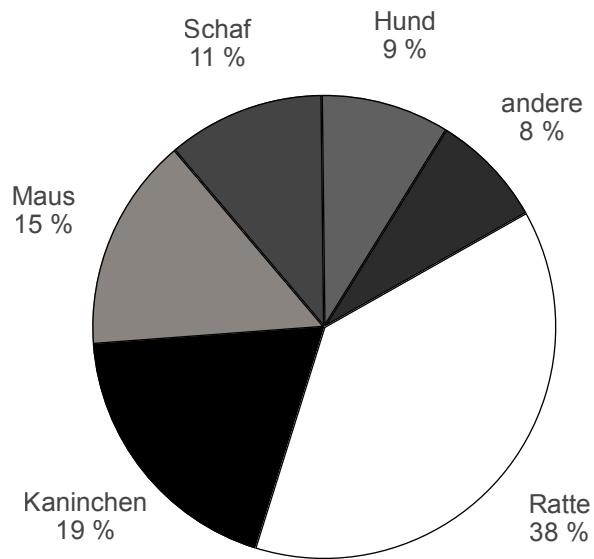


Abb. 1: Häufigkeit des Einsatzes verschiedener Tiermodelle zur Untersuchung der Frakturheilung (Quelle: O'Loughlin et al., 2008).

Prinzipiell gilt es zu beachten, dass Untersuchungen an Tiermodellen bezüglich ihrer Übertragbarkeit auf den Menschen kritisch geprüft werden müssen (NUNAMAKER et al., 1998; O'LOUGHLIN et al., 2008). Von Bedeutung bei der Wahl des geeigneten Modells sind Unterschiede in der makroskopischen und mikroskopischen Anatomie, Unterschiede im Knochenstoffwechsel, welche unterschiedliche Heilungsraten und -geschwindigkeiten bedingen und Unterschiede im Expressionsmuster verschiedener Zytokine im zeitlichen Verlauf (NUNAMAKER et al., 1998; HISTING et al., 2011).

Bei Studien, in denen, wie im hier vorliegenden Fall, Medikamente zum Einsatz kommen, sollte außerdem Augenmerk auf die unterschiedliche Response auf Wirkstoffe gelegt werden. Unterschiedliche Metabolisierungspotentiale der Spezies können differente Effekte bedingen und sollten stets eine Dosisanpassung nach sich ziehen (HERRGESELL et al., 1967; SNOW et al., 1979; JONES et al., 1992).

2.4.1. Großtiermodelle

Ursprünglich wurden fast ausschließlich Großtiermodelle, vor allem Schafe und Hunde, für Untersuchungen der Knochenheilung genutzt, unter anderem, weil bei diesen Tieren die Frakturheilung wie beim Menschen über das Havers-System erfolgt (NUNAMAKER et al., 1998).

Einleitung

Großtiere stellen geeignete Modelle zur Testung von Human-Implantaten dar. Gründe hierfür sind die anatomische Ähnlichkeit zum Menschen, die damit verbundene Übertragbarkeit chirurgischer Prozeduren aus der Klinik ins Labor, sowie eine einfache biomechanische Testung (CHEAL et al., 1991; KIRKER-HEAD et al., 1995).

2.4.1.1. Schaf

Die primäre Frakturheilung ist bei Schafen relativ gut beschrieben. So untersuchte die Association for the Study of Internal Fixation die Frakturversorgung mittels Plattenosteosynthese und Schraubenstabilisierung an diesem Modell (NUNAMAKER et al., 1979). Außerdem erfolgten Studien zur intramedullären Marknagelung und Frakturversorgung mittels Fixateur externe am Schaf (STEEN et al., 1989; SCHEMITSCH et al., 1994 & 1995). Ein Nachteil der Spezies besteht allerdings in den hohen Kosten für Zucht und Haltung, was die Größe entsprechender Versuchsgruppen wesentlich limitiert (NUNAMAKER et al., 1998).

2.4.1.2. Hund

Die Heilung von Knochenbrüchen beim Hund ist vor allem für die Veterinärmedizin von großer Bedeutung, sodass viele Informationen zum biologischen Heilungsprozess am Hundemodell existieren (JOHNSON et al., 1988; NAKAMURA et al., 1998). Die Bedeutung des Hundes in der Frakturforschung variiert weltweit sehr stark in Abhängigkeit der sozialen Akzeptanz von Hunden als Versuchstiere (O'LOUGHLIN et al., 2008).

2.4.1.3. Ziege

Obwohl die Ziege, ebenso wie das Schaf, zur Unterordnung der Wiederkäuer zählt, hat sie sich als Tiermodell zur Untersuchung der Frakturheilung bisher nicht etabliert. Die hohe Inzidenz von Erkrankungen wie der infektiösen Ziegenarthritiden schränken Aussagekraft und Reproduzierbarkeit von Studien an dieser Spezies stark ein (ADAMS et al., 1983; NARAYAN et al., 1988).

2.4.2. Kleintiermodelle

Seit einiger Zeit finden zunehmend Kleintiermodelle Verwendung. Als Versuchstiere dienen vor allem Nagetiere wie Mäuse, Ratten und Kaninchen. Ein wesentlicher Vorteil von Kleintieren ist die kostengünstigere Zucht und Haltung, was die Untersuchung größerer Versuchsgruppen ermöglicht. Auch die Applikation kostenintensiver Substanzen ist bei

Einleitung

Kleintieren aufgrund der geringeren Körpergröße in höheren Dosen möglich (HISTING et al., 2011).

Eine Einschränkung birgt dagegen ihre einfachere Knochenstruktur ohne Havers-System. Dieses ist phylogenetisch erst beim Kaninchen und auch hier nur mit einigen Unterschieden zu größeren Tieren und Mensch zu finden. Bei kleinen Nagetieren erfolgt das Remodeling dagegen über Resorptionshöhlen. Obwohl beide Formen des Remodelings große Ähnlichkeiten besitzen, ist über die eigentliche Relevanz der Unterschiede bei Untersuchungen der Knochenfrakturheilung bisher wenig bekannt. Speziell bei Fragestellungen, die die Funktion des Havers-Systems betreffen, sollten daher andere Tiermodelle herangezogen werden (NUNAMAKER et al., 1998).

2.4.2.1. Kaninchen

Aufgrund der Körpergröße sind Operationstechniken und biophysikalische Untersuchungen bei Kaninchen einfacher anwendbar als im Vergleich zu Klein-Nagern wie Ratte und Maus (ASHHURST et al., 1982; BRIGHTON et al., 1985; STRONG et al., 1992; MILLS et al., 2012). Dementsprechend wurden auch für Kaninchen Stabilisierungsverfahren wie Schraubenosteosynthese, Verriegelungsnagel, Plattenosteosynthese und externen Fixateur entwickelt, deren Anwendung, insbesondere im Vergleich zur Maus, eine weitaus geringere technische Herausforderung darstellt (LETTIN et al., 1965; DANCKWARDT-LILIESTRÖM et al., 1970; ASHHURST et al., 1982; KAPLAN et al., 1985; TERJESEN et al., 1986; HAN et al., 2015).

2.4.2.2. Ratte

Auch die Ratte bietet mit ihrer Körpergröße einfachere Operations- und biomechanische Messbedingungen als die Maus. Ihr Einsatz als Modell zur Knochenfrakturheilung ist bereits seit längerem etabliert. Entsprechende Untersuchungen an der Ratte wurden bisher an Femur, Tibia, Fibula und Schädel durchgeführt (ARO et al., 1985; THALLER et al., 1993; AN et al., 1994; UTVÄG et al., 1994). Während anfänglich bei Kleinnagern aus technischen Gründen auf eine Stabilisierung der Fraktur verzichtet wurde, existieren für die Ratte mittlerweile sowohl instabile Versorgungsmethoden wie die Pin-Osteosynthese, als auch stabile Fixationstechniken wie Verriegelungsnägel, Platten und externe Fixatoren (BONNARENS et al., 1984; HIETANIEMI et al., 1995; KASPAR et al., 2007; SCHOEN et al., 2008; SAVARIDAS et al., 2012).

2.4.2.3. Maus

Während erste Frakturmodelle an der Ratte bereits in den 1940er Jahren etabliert wurden, wurde die Maus erst rund zwanzig Jahre später für vergleichbare Untersuchungen genutzt.

Einleitung

Entsprechend wurden bis vor kurzem die meisten Nagetierstudien zur Frakturheilung an Ratten durchgeführt. Seit einigen Jahren hat die Anzahl von Studien an Mäusen jedoch stark zugenommen (HISTING et al., 2011).

Einen enormen Vorteil bietet neben den bereits erwähnten geringen Kosten die Tatsache, dass das Genom der Maus in Gänze entschlüsselt ist. Die Verfügbarkeit eines großen Spektrums transgener Stämme und spezifischer Antikörper macht die Maus als Versuchstier insbesondere für molekulargenetische Untersuchungen interessant (JACENKO et al., 1995; ROSSANT et al., 1995).

Demgegenüber stellt die diffizile Anatomie dieser Kleinnager eine große Herausforderung dar, da die Frakturierung und Osteosynthese ein hohes Maß an operativem Geschick erfordert (HOLSTEIN et al., 2007). Außerdem schränkt die bereits erwähnte primitivere Knochenstruktur der Maus die Übertragbarkeit gewonnener Erkenntnisse auf den Menschen ein (NUNAMAKER et al., 1998).

Untersuchungen zur Frakturheilung wurden im Mausmodell bisher an Rippe, sowie Tibia und Femur durchgeführt (ITO et al., 1999; YAMAGIWA et al., 1999; OHTA et al., 1999; CHO et al., 2002; HOLSTEIN et al., 2007). Da sich die Rippe aus anatomischen Gründen nur schlecht für biomechanische Testungen eignet, wurden entsprechende Frakturmodelle in erster Linie für Genexpressionsanalysen genutzt (ITO et al., 1999; YAMAGIWA et al., 1999).

Bei Untersuchungen an den langen Röhrenknochen der unteren Extremität unterscheidet man offene und geschlossene Frakturmodelle (HISTING et al., 2011). Offene Modelle nutzen meist einen lateralen longitudinalen Zugang, welcher eine Frakturierung oder Osteotomie unter Sicht erlaubt (CHEUNG et al., 2003). Die geschlossenen Frakturmodelle gehen auf ein von Bonnarens und Einhorn entwickeltes Modell für Ratten zurück (BONNARENS et al., 1984). Hier wird eine transversale Fraktur mit Hilfe einer stumpfen Guillotine erzeugt. Hiltunen et al. übertrugen dieses Verfahren 1993 erstmals auf die Tibia der Maus (HILTUNEN et al., 1993), Manigrasso und O'Connor wendeten es 2004 in Analogie am Femur der Maus an (MANIGRASSO et al., 2004). Das Femur hat gegenüber der Tibia zum einen den Vorteil einer besseren Weichteildeckung, zum anderen den eines einheitlich runden Querschnitts, was die mechanische Testung vereinfacht (CHEUNG et al., 2003, HOLSTEIN et al., 2007; HISTING et al., 2011).

Sowohl Tibia als auch Femur können nach definierten Zeitabständen leicht explantiert werden und stehen so für radiologische, biomechanische, histologische und biochemische ex vivo Untersuchungen zur Verfügung.

Die Frakturversorgung erfolgte bei diesen Modellen ursprünglich mittels eines intramedullären Pins. Ein großer Nachteil des Pins besteht jedoch in einer fehlenden Rotationsstabilität und einem hohen Dislokationsrisiko (HOLSTEIN et al., 2007).

Eine rotationsstabile Frakturversorgung mittels Fixateur externe wurde von Cheung et al. 2003 publiziert (CHEUNG et al., 2003). Ein Nachteil dieser Versorgungsmethode besteht in der Beeinträchtigung des Bewegungsablaufes der Tiere durch Größe, Gewicht und Lage des Implantats. Außerdem ist die Einbringung des Fixateurs mit seinen vier Schanzschrauben

Einleitung

nur durch offene Operationstechniken möglich und daher mit einer höheren Invasivität verbunden (CHEUNG et al., 2003). Durch die Möglichkeit der Einstellung verschiedener Frakturspaltgrößen bietet dieses Modell allerdings Vorteile in der Untersuchung der Pathomechanismen von Pseudarthrosen.

Ein weiteres rotationsstabiles offenes Frakturmodell stellt die sogenannte Pin-Clip-Technik dar. Hierbei wird ein herkömmlicher Pin mit einem offen angebrachten extramedullären Clip kombiniert, um auf diese Weise eine hohe Rotationsstabilität zu erreichen (GARCIA et al., 2008).

Mit der winkelstabilen Platte steht ein drittes offenes Frakturmodell zur Verfügung. Sie eignet sich, ähnlich wie Fixateur externe und Pin-Clip, gut für Untersuchungen der Knochen-defektheilung (HISTING et al., 2010).

2007 entwickelten Holstein et al. erstmals ein geschlossenes Frakturmodell mit rotationsstabilem Osteosyntheseverfahren (HOLSTEIN et al., 2007). Hierbei dient eine beidseitig abgeflachte Injektionskanüle als Verriegelungsmarknagel für das Femur.

Auch Garcia et al. entwickelten einen Verriegelungsnagel für das Mäusefemur. Bei diesem Modell wird der Marknagel über offen eingebrachte Bolzen verriegelt. Ein Gewinde im proximalen Anteil des Implantats sorgt für eine zusätzliche axiale Kompression (GARCIA et al., 2008)

Weiterhin konzipierten Holstein et al. eine intramedulläre Zugschraube (MouseScrew®), welche nach geschlossener Frakturierung über einen Führungsdraht in den Markraum des Femurs eingebracht wird. Ein distaler Konus, der sich in der interkondylären Notch verankert, und ein proximales Gewinde sorgen für eine rotations- und achsstabile Kompression (HOLSTEIN et al., 2009). Diese intramedulläre Zugschraube wurde bei der vorliegenden Arbeit zur Osteosynthese verwendet.

2.5. Sexualhormone und Frakturheilung

Es sind vielfältige Effekte der Sexualhormone auf den Knochen bekannt. Insbesondere der Einfluss auf die Knochenformation, die Entwicklung des Knochens während des Wachstums, die Vorgänge des Remodelings und die Aufrechterhaltung der Knochen-Homöostase wurden bereits in zahlreichen Arbeiten belegt (VANDERSCHUEREN et al., 2004; KAUFMAN et al., 2006; KHOSLA et al., 2012).

In jüngerer Zeit wurde zudem ihre Wirkung auf die Prozesse der Frakturheilung in zahlreichen Studien untersucht. Diese konnten positive Effekte von Östrogenen und Testosteron auf die Frakturheilung nachweisen (MAUS et al., 2008; BEIL et al., 2010).

2.5.1. Östrogene

Östrogene gehören wie alle Sexualhormone zur Gruppe der Steroidhormone und leiten sich somit von Cholesterin ab. Zu den natürlich vorkommenden Östrogenen gehören Östron (E1), Östradiol (E2) und Östriol (E3). Ihnen gemeinsam ist ein aus 18 Kohlenstoffatomen bestehendes Steroid-Grundgerüst sowie ein ungesättigter aromatischer A-Ring. Zum Wirkspektrum zählen einerseits sexualspezifische, zum anderen sexualunspezifische Effekte (LÖFFLER et al., 2007).

2.5.1.1. Synthese

Hauptbildungsort der Östrogene im weiblichen Organismus sind die Theca- und Granulosazellen der Follikel in den Ovarien. Nach Synthese von Androgenen in den Theca-Zellen diffundieren diese zu den Granulosazellen, wo sie zu Östrogenen aromatisiert werden (HILLIER et al., 1994).

Das zuständige Enzym Aromatase wurde weiterhin auch in Muskelzellen, Adipozyten und den Leydig-Zellen des Hodens nachgewiesen (MATSUMINE et al., 1986; BRODIE et al., 1993).

2.5.1.2. Rezeptoren

Die spezifischen genomischen Effekte an den Zielzellen entfalten die Östrogene über zwei verschiedene Subtypen von Östrogenrezeptoren (ER) (GREEN et al., 1986; KUIPER et al., 1996).

Sowohl der ER α als auch der ER β existieren in verschiedenen Isoformen und Splice-Varianten. Die für sie codierenden Gene liegen auf unterschiedlichen Chromosomen. Ihre Ausprägung in verschiedenen Geweben unterscheidet sich stark und weist teilweise Überlappungen auf (ENMARK et al., 1997).

Um das gewebeabhängige Expressionsmuster der beiden Rezeptortypen und damit ihre Funktion insbesondere im Hinblick auf Knochengewebe zu beleuchten, bietet sich eine Betrachtung der Arbeit von Sims et al. an ER-Knockout-Mäusen an. Die Autoren konnten zeigen, dass ein Fehlen des ER α das Remodeling männlicher Tiere beeinflusst, während dieser Effekt bei weiblichen Tieren durch das Vorhandensein einer der beiden Rezeptortypen kompensiert werden kann und nur im Falle eines doppelten Knock-outs von ER α und ER β in Erscheinung tritt. Die Studie lässt somit die Wichtigkeit des ER α für den Knochen erkennen (SIMS et al., 2002).

2.5.1.3. Östrogene und Frakturheilung

Untersuchungen an Mäusen konnten zeigen, dass Östrogene alle Phasen der Frakturheilung stimulieren (BEIL et al., 2010). Vergleichbare Resultate erbrachte eine Behandlung der Tiere mit dem selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulator (SERM) Raloxifen (SPIRO et al., 2013). In beiden Fällen kam es zu einer verstärkten Chondrogenese in der frühen Phase der Frakturheilung sowie einem beschleunigten Kallus-Remodeling in der späten Phase (HEDGE et al., 2016).

Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit Untersuchungen an Zellkulturen. An Chondrozyten verschiedener Knorpelgewebe konnte ein positiver Effekt von Östrogenen auf die Reifung und Funktion von Chondrozyten nachgewiesen werden (BLANCHARD et al., 1991).

In Osteoblastenkulturen führen Östrogene zu einer gesteigerten Proliferation und Kollagen-Synthese (ERNST et al., 1988). Sie verstärken außerdem die Expression von OPG und bedingen auf diese Weise eine indirekte Inhibition von Osteoklasten (ERNST et al., 1988; BORD et al., 2003).

Östrogene besitzen weiterhin direkte, meist Interleukin-6 (IL-6) vermittelte Wirkungen, auf Osteoklasten (JILKA et al., 1992). Sie hemmen die Osteoklastogenese aus hämatopoietischen Vorläuferzellen und die Osteoklastenproliferation (GIRASOLE et al., 1992; FIORELLI et al., 1995; GARCIA PALACIOS et al., 2005). Außerdem führen sie sowohl in Osteoklasten, als auch ihren Vorläuferzellen zu einer gesteigerten Apoptoserate (HUGHES et al., 1996; SHEVDE et al., 1996; KAMEDA et al., 1997).

2.5.2. Androgene

Auch die Androgene gehören zur Gruppe der Steroidhormone. Wichtigster Vertreter der natürlich vorkommenden Androgene ist das Testosteron. Sein von Cholesterin abgeleitetes Grundgerüst besteht aus 19 Kohlenstoffatomen. Testosteron fördert vor allem das Wachstum und die Differenzierung der männlichen Geschlechtsorgane und die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale. Auf den Stoffwechsel hat es eine allgemein anabole Wirkung durch Steigerung der Proteinbiosynthese. Weiterhin ist zwar bekannt, dass Testosteron für die Skelettentwicklung und -homöostase verantwortlich ist, zu seinem Einfluss auf die Frakturheilung existieren dagegen vergleichsweise wenig Studien (KAUFMAN et al., 2006).

2.5.2.1. Synthese

Hauptbildungsort des Testosterons sind die Leydig-Zellen des Hodens. Diese Synthese wird durch das Hypophysen-Hormon Luteinisierendes Hormon (LH) gesteuert. Kleinere Mengen

Einleitung

werden außerdem in der Nebennierenrinde und im Ovar produziert. In einigen Zielgeweben wie beispielsweise der Prostata oder der Samenblase wird Testosteron durch das Enzym 5α-Reduktase in das stärker wirksame 5α-Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt (LÖFFLER et al., 2007)

2.5.2.2. Rezeptor

Der intrazelluläre hoch affine Androgenrezeptor (AR) wurde erstmals 1988 geklont und zunächst in der Prostata und anderen akzessorischen Genitaldrüsen nachgewiesen (CHANG et al., 1988; LUBAHN et al., 1988). Colvard et al. beschrieben erstmals eine Expression des Rezeptors in Osteoblastenkulturen (COLVARD et al., 1989). In weiteren darauf folgenden Studien gelang der Nachweis des AR ebenfalls in Osteozyten, hypertrophen Chondrozyten und Endothelzellen von Blutgefäßen im Knochenmark, was seine Bedeutung für den Knochenstoffwechsel zeigt (ABU et al., 1997; NOBLE et al., 1999). Die Datenlage bezüglich des Vorhandenseins des AR in der Zellreihe der Osteoklasten ist dagegen kontrovers. Während ein Nachweis für die Expression des Rezeptors an entsprechenden Zellen von Hühnern und Mäusen gelang, bleibt ein eindeutiger Beweis für die Expression des AR in menschlichen Osteoklasten bisher aus (MIZUNO et al., 1994; ABU et al., 1997; PEDERSON et al., 1999).

2.5.2.3. Androgene und Frakturheilung

Ebenso wie Östrogene hemmen Androgene die Knochenresorption. Dieser Effekt erfolgt größtenteils über eine Aromatisierung zu Östrogenen und findet somit IL-6 vermittelt statt (BELLIDO et al., 1995; FALAHATI-NINI et al., 2000).

Auf Osteoblasten und Osteozyten wirken Androgene anti-apoptotisch (KOUSTENI et al., 2001). Sie stimulieren außerdem die Proliferation von Osteoblasten. Für diesen Effekt konnten Kasperk et al. einen direkten, AR vermittelten Mechanismus beschreiben, da er auch bei nicht-aromatisierbaren Androgenen nachweisbar ist (KASPERK et al., 1989).

An Knochendefektmodellen wurden diese Eigenschaften von Androgenen *in vivo* untersucht. Sowohl lokal, als auch systemisch applizierte Androgene führen hier zu einer beschleunigten Frakturheilung bei Mäusen und Ratten (TARSOLY et al., 1979; FRANKLE et al., 1990; MAUS et al., 2008).

2.6. Intrakrinologie

In der Endokrinologie werden verschiedene Sekretions- und Wirkungsweisen von Hormonen unterschieden. Der klassische endokrine Weg beschreibt hierbei eine Hormonsekretion ins

Einleitung

Blut und einen Transport des Hormons an die jeweilige Zielzelle, welcher im Falle von lipophilen Hormonen wie den Sexualhormonen an Plasmaproteine gebunden stattfindet.

Wirkt das Hormon an der produzierenden Zelle selbst, spricht man von einem autokrinen Wirkmechanismus. Diffundiert das sezernierte Hormon dagegen zu den unmittelbaren Nachbarzellen und beeinflusst so deren Stoffwechsel, wirkt das Hormon parakrin (LABRIE et al., 1991).

In den letzten Jahren gewann das Gebiet der intrakrinen Hormonregulation zunehmend an Bedeutung. Intrakrinologie beschreibt die Bildung von aktiven Hormonen, speziell von Sexualhormonen, in den jeweiligen Zielzellen selbst. Die hauptsächlich aus der Nebennierenrinde stammenden Vorläufersteroide Dehydroepiandrosteron (DHEA), sein Sulfat (DHEA-S) und Androstendion stellen dabei inaktive Vorstufen dar (LABRIE et al., 1991).

Zur Synthese des Andogens Testosteron, respektive DHT und des Östrogens Estradiol (E2) sind die Zielzellen mit einem entsprechenden Enzymsatz ausgestattet. Zu den wichtigsten in den intrakrinologischen Stoffwechsel involvierten Enzymen gehören (LABRIE et al., 1997):

- 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 β -HSD)
- 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (17 β -HSD)
- 5 α -Reduktase
- Aromatase

2.6.1. 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (17 β -HSD)

Wie in Abbildung 2 dargestellt, spielt 17 β -HSD durch Konversion an Position 17 eine Schlüsselrolle in der Regulation der biologischen Aktivität sowohl von Androgenen, als auch Östrogenen. Ketoformen sind vergleichsweise inaktiv, während die entsprechenden Hydroxyformen die biologisch aktiveren Hormone darstellen. Zurzeit sind zwölf verschiedene Formen des Enzyms im menschlichen Organismus bekannt. Sie unterscheiden sich in ihrer Gewebeverteilung, Redoxaktivität, Substratspezifität und ihren Kofaktoren (LABRIE et al., 1997).

Jedes der 17 β -HSD Enzyme besitzt eine nahezu unidirektionale Aktivität. Während die Typen 1 und 3 Reduktionsreaktionen katalysieren und dafür das Koenzym NADPH benötigen, besitzen die Typen 2 und 4 eine oxidative Aktivität und nutzen NAD als Koenzym (LUU-THE et al., 1995).

17 β -HSD2 wirkt auf Andogene in gleichem Maße wie auf Östrogene. Beim Menschen wird es in Plazenta, Nieren, Prostata, Leber, Dünnd- und Dickdarm exprimiert (LUU-THE et al., 1995). Dong et al. konnten außerdem eine signifikante Aktivität von 17 β -HSD2 in Osteoblastenkulturen nachweisen (DONG et al., 1998). In immunhistochemischen und

Einleitung

enzymatischen Untersuchungen fand sich eine 17β -HSD2-Aktivität auch in Knochenzellen von Mäusen (MILEWICH et al., 1985; ABDELSAMIE et al., 2019).

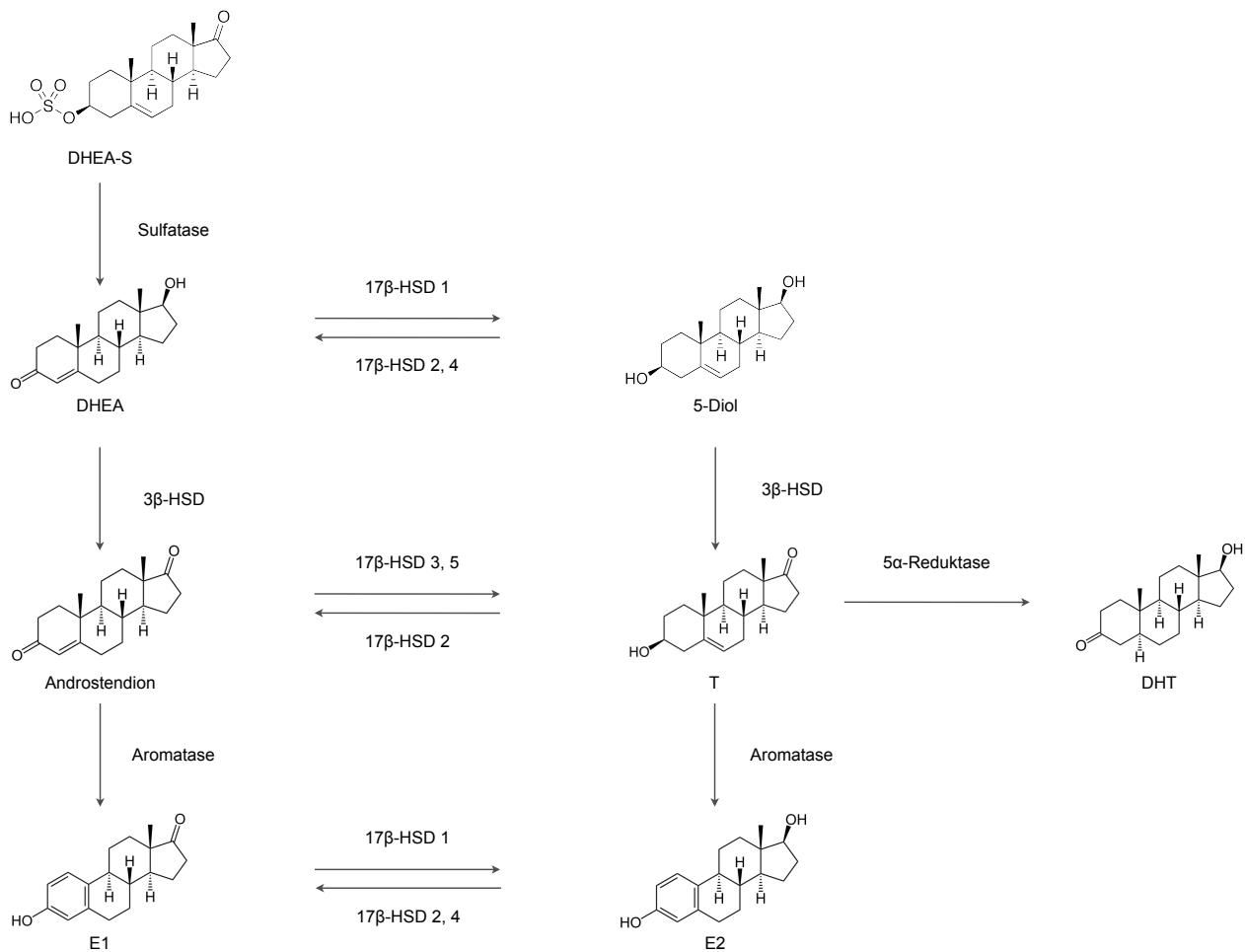


Abb. 2: Intrakrinologischer Stoffwechsel (Quelle: Labrie et al., 1997).

2.6.2. Inhibition der 17β -Hydroxysteroiddehydrogenase

Die Möglichkeit eines therapeutischen Nutzens von spezifischen Enzyminhibitoren für 17β -HSD Typen wurde bereits in mehreren Publikationen postuliert (MARCHAIS-OBERWINKLER et al., 2011).

Inhibitoren der 17β -HSD1 gelten als vielversprechende Kandidaten für neue Therapeutika zur Behandlung östrogenabhängiger Erkrankungen wie dem Mammakarzinom oder der Endometriose. Eine Hemmung des Enzyms soll im entsprechenden erkrankten Gewebe zu einer verminderten Konzentration aktiven Östrogens führen und so den Krankheitsverlauf ohne größere systemische Nebenwirkungen positiv beeinflussen (MIYOSHI et al., 2001; SMUC et al., 2007; JANSSON et al., 2009). Obwohl bereits steroidale als auch nicht-

Einleitung

steroidale Inhibitoren an entsprechenden Mausmodellen getestet wurden, blieben klinische Studien bis dato aus (ABDELSAMIE et al., 2017).

Auch die Inhibition der 17 β -HSD2 stellt einen möglichen neuen Therapieansatz für bestimmte Erkrankungen dar. Aufgrund ihres Vorkommens im Knochen, ihrer Reaktionseigenschaften und Substratspezifität führt eine Enzymhemmung zu erhöhten intrazellulären Konzentrationen von E2 und T. Diesen Wirkmechanismus hofft man sich im Hinblick auf die oben beschriebenen positiven Effekte dieser Hormone auf den Knochenstoffwechsel in der Therapie der Osteoporose oder der Behandlung von Frakturen zu Nutze zu machen (MARCAIS-OBERWINKLER et al., 2013).

Durch die Einflussnahme auf den intrakrinologischen Stoffwechsel führt eine 17 β -HSD2-Hemmung lediglich intrazellulär zu einer erhöhten Konzentration aktiver Sexualhormone in Zielgeweben mit 17 β -HSD2-Aktivität. Im Gegensatz zu systemischen Therapien, wie der Östrogen-Ersatztherapie, der Therapie mit SERM oder Bisphosphonaten, die aktuell in der Osteoporosebehandlung Anwendung finden, ist von der 17 β -HSD2-Hemmung daher ein wesentlich günstigeres Nebenwirkungsprofil zu erwarten (MARCAIS-OBERWINKLER et al., 2013).

2.6.3. Inhibitoren

Um Inhibitoren in Form von Medikamenten therapeutisch nutzen zu können, werden bestimmte Eigenschaften vorausgesetzt und beim Design entsprechend berücksichtigt. Zu ihnen gehören eine hohe Selektivität gegenüber anderen 17 β -HSD-Subtypen, sowie den ER α und β , eine hohe pharmakologische Potenz, eine geringe Toxizität und eine hohe metabolische Stabilität (ABDELSAMIE et al., 2017; ABDELSAMIE et al., 2019)

Für die 17 β -HSD1 sind im Gegensatz zur 17 β -HSD2 verschiedene Röntgenstrukturen bekannt. Diese Tatsache erleichtert die Entdeckung neuer Inhibitoren, wie auch der Gruppe der bipyklisch substituierten Hydroxyphenylmethanone (BSH) wesentlich (OSTER et al., 2010; MARCAIS-OBERWINKLER et al., 2011). Im Rahmen der Arbeiten zu dieser Substanzklasse fanden sich vor allem unter den Sulfonamid substituierten BSH auch einige Inhibitoren, welche eine höhere Selektivität zur 17 β -HSD2 als zu 17 β -HSD1 aufweisen (OSTER et al., 2010; ABDELSAMIE et al., 2017).

Das in Abbildung 3 dargestellte Molekülgerüst diente Abdelsamie et al. als Ausgangspunkt für die Synthese potentieller 17 β HSD2-Inhibitoren für Untersuchungen in in vivo Studien (ABDELSAMIE et al., 2019).

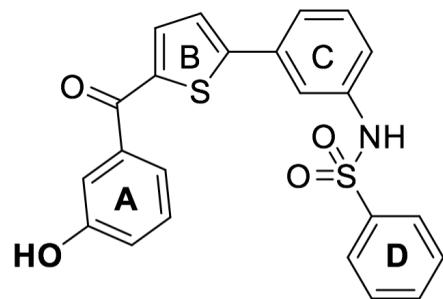


Abb. 3: Molekülgerüst Sulfonamid substituierter bipykatisch substituierter Hydroxyphenylmethanone (Quelle: Abdelsamie et al., 2019).

2.6.4. AA115

Da die Sulfonamid substituierten BSH ursprünglich als Inhibitoren der menschlichen 17 β -HSD1 designed wurden, weisen die meisten Mitglieder dieser Stoffgruppe eine höhere Selektivität zu 17 β -HSD1 als zu 17 β -HSD2 auf. Weiterhin zeigen BSH eine geringe metabolische Stabilität, was bereits ein wesentliches Ausschlusskriterium für eine Testung in *in vivo* Studien darstellt.

Abdelsamie et al. wählten daher ein zweizeitiges Vorgehen beim Design. In einem ersten Schritt zielten sie darauf ab, durch Modifikationen an Ring A die metabolische Stabilität zu optimieren. Vorangehende Untersuchungen konnten die geringe Stabilität auf eine Phase II-Biotransformationsreaktion der phenolischen OH-Gruppe zurückführen, wobei Stoffe, denen die OH-Gruppe fehlt, keine Aktivität besitzen. Durch Einführung von Halogenen als Substituenten an Ring A kann die OH-Gruppe in ihrer Funktionalität vor der Biotransformation geschützt werden. Abdelsamie et al. führen dies auf eine verminderte Nukleophilie des Sauerstoffatoms und sterische Ursachen zurück (ABDELSAMIE et al., 2019).

Nach Optimierung der metabolischen Stabilität zielte ein zweiter Schritt darauf ab, durch Substitution an Ring D die pharmakologische Potenz und Selektivität zur menschlichen und murinen 17 β -HSD2 (h17 β -HSD2 und m17 β -HSD2) zu verbessern. Ziel war eine mittlere Hemmkonzentration (IC_{50}) im nanomolaren Bereich, sowie eine drei- bis fünffach höhere Selektivität zur h17 β -HSD2 im Vergleich zur h17 β -HSD1, um in Geweben mit ähnlicher 17 β -HSD2- und 17 β -HSD1-Aktivität einerseits einen übermäßigen E2-Anstieg, andererseits eine komplette Blockade der physiologisch notwendigen E2-Synthese zu verhindern.

In Voruntersuchungen der am Projekt beteiligten Arbeitsgruppen erwies sich unter den synthetisierten Sulfonamid substituierten BSH die Substanz mit der Bezeichnung AA115 aufgrund ihrer Eigenschaften (Abb. 4) als vielversprechendster Kandidat für Untersuchungen *in vivo* und wurde deshalb einem genaueren Profiling unterzogen (ABDELSAMIE et al., 2019).

Einleitung

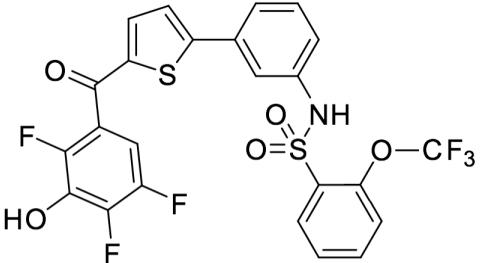
	IC_{50} (nM)	h17 β -HSD2	2
		h17 β -HSD1	6
		m17 β -HSD2	25
		m17 β -HSD1	1764
	SF ^a	Mensch	3
		Maus	72
	$t_{H1/2}$ (min) ^b		60
	Molekülmasse		573
	ER α / ER β -Inhibition (%) ^c		28/ 21

Abb. 4: Strukturformel, chemische und pharmakologische Eigenschaften von AA115. a: Selektivitätsfaktor: $IC_{50}(17\beta\text{-HSD}1)/IC_{50}(17\beta\text{-HSD}2)$, b: Halbwertszeit in S9-Faktion menschlicher Hepatozyten mit Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), Uridine 5'-diphospho-Glucoronosyltransferase (UDPGA) und 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) gemessen, c: gemessen bei einer die E2-Konzentration um den Faktor 1000 übersteigenden AA115-Konzentration (Quelle: Abdesamie et al., 2019).

AA115 führt im MTT-Test an HEK293-Zellen bei über 11000facher mittlerer Hemmkonzentration für h17 β -HSD2 zu keinem verminderten Lebendzellanteil. Im AMES II-Test erwies sich AA115 bis zu einer Konzentration von 100 μM als nicht mutagen. Die mittlere Hemmkonzentration für den Kaliumkanal hERG liegt mit 0,8 μM über der 400fachen mittleren Hemmkonzentration für h17 β -HSD2 (ABDELSAMIE et al., 2019).

Bei einer Konzentration von 3,16 μM führt AA115 zu keiner relevanten Aktivierung der für die Induktion der Leberenzyme CYP 1 bis 3 verantwortlichen Rezeptoren AhR (Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor), CAR (constitutive androstane receptor) oder PXR (pregnane X receptor) (ABDELSAMIE et al., 2019).

In einem letzten Schritt wurde die Pharmakokinetik von AA115 für C57BL/6-Mäuse untersucht. Bei einer subkutanen Injektion von 50 mg/kg Körpergewicht AA115 in einer Vehikellösung aus 0,5% Gelatine und 5% Mannitol in Wasser (w/w) zeigte sich auch nach 24 Stunden eine Plasmakonzentration über der zehnfachen Hemmkonzentration für m17 β -HSD2 (ABDELSAMIE et al., 2019).

2.7. Zielsetzung

Ziel dieser Studie war es, anhand biomechanischer, histomorphometrischer, mikrocomputertomographischer und proteinbiochemischer Analysen, zu untersuchen, inwieweit die Behandlung mit AA115 die Frakturheilung im Mausmodell beeinflusst.

2.8. Fragestellung

Die Nullhypothese lautet:

„Die Frakturheilung wird im Mausmodell durch die Gabe von AA115 nicht beeinflusst.“

3. Material und Methodik

3.1. Versuchstiere und Tierhaltung

Im Rahmen der Studie am Kleintiermodell wurden 50 männliche C57BL/6 Wildtyp-Mäuse mit einem Gewicht zwischen 22 g und 39 g verwendet. Die Tiere wurden im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes gezüchtet und gehalten. Die Tierhaltung erfolgte bei einer Lufttemperatur von 22 °C bis 24 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% und einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus in Einzelkäfigen. Die Versorgung mit Nagetierfutter in Pelletform (Altromin Standarddiät, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) und Wasser erfolgte ad libitum. Die Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde (Dezernat V, Saarpfalz-Kreis, 66424 Homburg) unter dem AZ 46/2013 genehmigt und im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

3.2. Frakturmodell

In der vorliegenden Arbeit kam das Frakturmodell mit Osteosynthese durch eine intramedulläre Zugschraube nach Holstein et al. zur Anwendung (Abb. 5) (HOLSTEIN et al., 2009). Die Operation erfolgte bei allen Tieren in standardisierter Weise unter semisterilen Bedingungen. Zur Analgosedierung wurde eine Narkoselösung bestehend aus 0,5 ml Xylazin 2% (Rompun®, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland), 1 ml Ketamin 100 mg/ml (Ursotamin®, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) und 8,5 ml physiologischer Kochsalzlösung verwendet. Nach intraperitonealer Injektion von 0,01 ml Narkoselösung pro 1 g KG und Rasur des rechten Hinterlaufs erfolgte eine parapatellare Incision zur lateralen Mobilisation der Patellarsehne (Abb. 6 bis 8). Über die so freipräparierte Fossa intercondylaris wurde der Markraum mit einer 0,55 mm durchmessenden Einmalkanüle (Sterican® Einmal-Injektions-Kanüle 24G 1" 0,55x25 mm Gr. 17, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) eröffnet (Abb. 9). Mit einer durch diese Öffnung und den Markkanal geführten Einmalkanüle mit einem Durchmesser von 0,4 mm (Sterican® Einmal-Injektions-Kanüle 27G 1 1/2" 0,40x40 mm Gr. 30/42, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurde anschließend der Trochanter major retrograd zusammen mit der ihn bedeckenden Haut durchbohrt (Abb. 10). Nach Einbringen eines Wolfram-Führungsdrähtes mit einem Durchmesser von 0,2 mm (Abb. 5) durch die Kanüle, wurde diese wieder entfernt (Abb. 11). Mittels einer Frakturmaschine wurde eine geschlossene Fraktur der Femurdiaphyse (A2-A3 nach AO Klassifikation) erzeugt (Abb. 12). Über den liegenden Führungsdräht wurde retrograd eine intramedulläre Schraube (MouseScrew®, RISystem,

Material und Methodik

Davos, Schweiz) implantiert (Abb. 5 und Abb. 13). Nach Reposition der Patella wurde mit nicht resorbierbarem Polypropylen-Faden (5-0 Prolene®, Ethicon, Nordestedt, Deutschland) die Patellarsehne fixiert und der Hautschnitt verschlossen (Abb. 14 und 15). Röntgenkontrollen (MX-20, Faxitron®, Tucson, Arizona, USA) wurden jeweils nach Erzeugen der Fraktur und Implantation der Zugschraube durchgeführt.

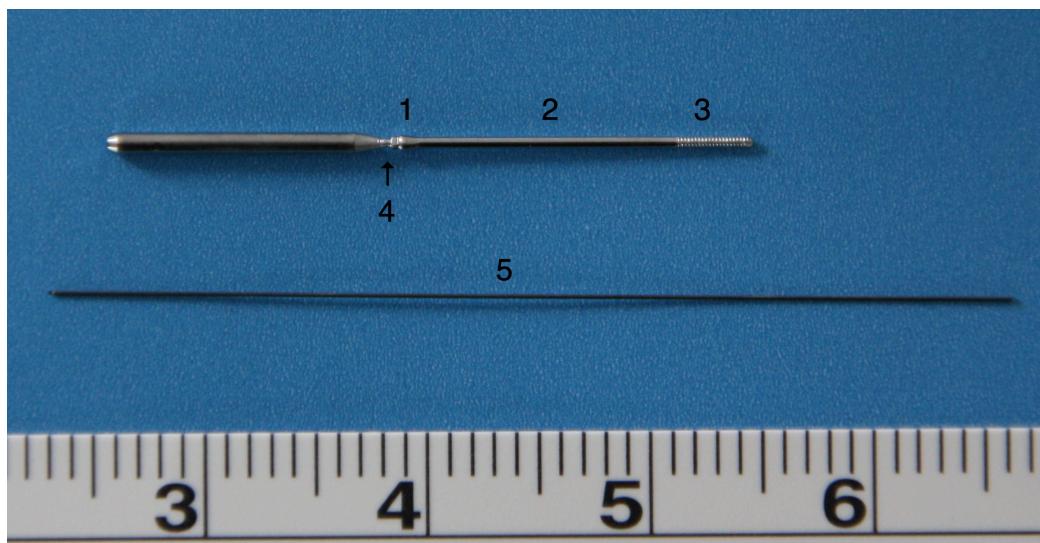


Abb. 5: MouseScrew® bestehend aus Konus (1), Schaft (2) und Gewinde (3) mit Sollbruchstelle (4) zur Halterung im Schraubendreher, Führungsdraht (5).



Abb. 6: Fixierung des Beines nach Rasur.



Abb. 7: Parapatellare Incision und Sicht auf Ligamentum patellae.

Material und Methodik

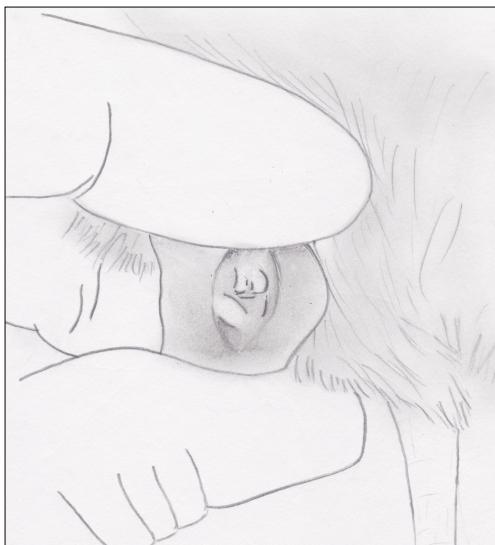


Abb. 8: Lateralisation der Patella und Sicht auf Fossa intercondylaris.

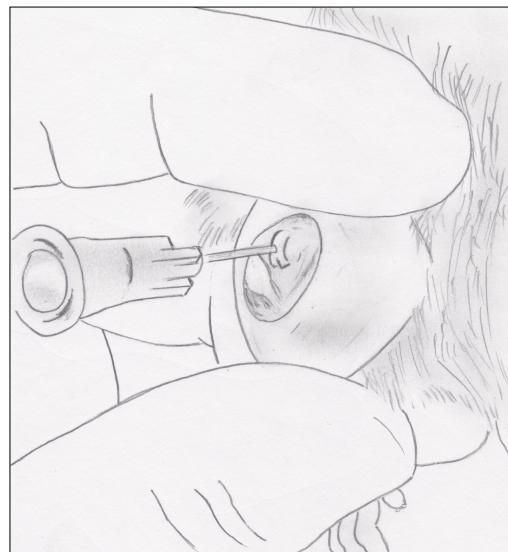


Abb. 9: Eröffneter Markraum und einliegende Kanüle.

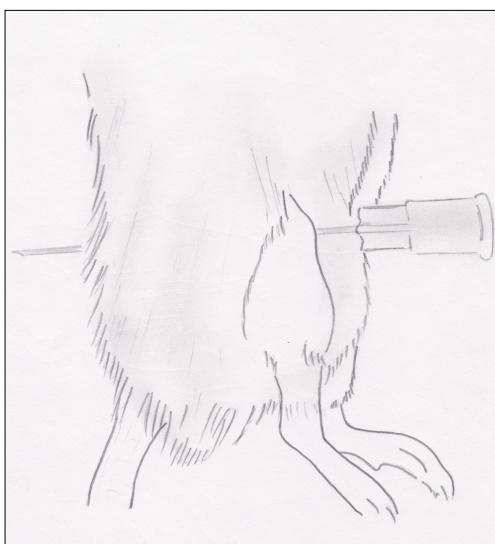


Abb. 10: Retrograd transmedullär eingebrachte Kanüle mit perkutaner Ausleitung.

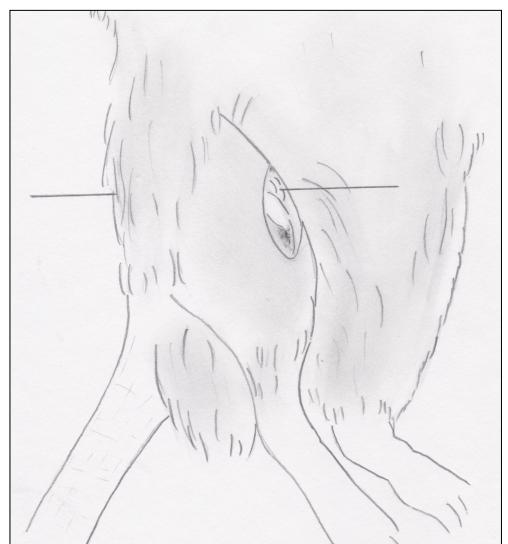


Abb. 11: Einliegender Führungsdräht.

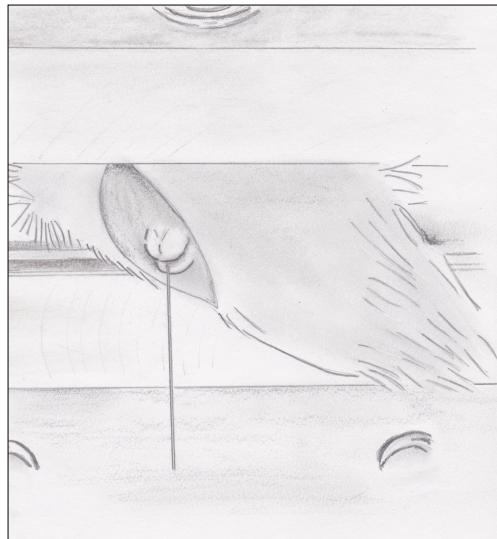


Abb. 12: Positionierung in Frakturapparatur.

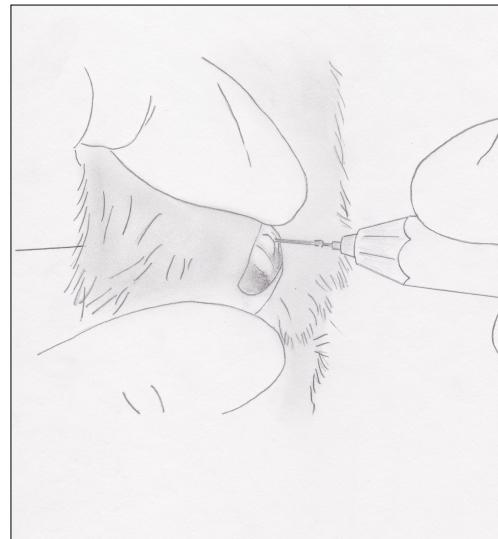


Abb. 13: Einbringung der Zugschraube.



Abb. 14: Refixation der Patella.



Abb. 15: Hautnaht.

(Abbildungen 6 bis 15 modifiziert nach Schmalenbach)

3.3. Studiendesign

Die Tiere wurden entweder einem 14 Tage- oder einem 28 Tage-Experiment zugeordnet. Zur Untersuchung der Biomechanik, Histomorphologie des Kallus und mikro-computertomographischen Evaluation wurden 4 Gruppen à 8 Tiere gebildet, entsprechend einer Versuchs- und einer Kontrollgruppe mit jeweils 14 und 28 Tagen Versuchslaufzeit. Zur biochemischen Proteinanalyse wurden 4 separate Gruppen mit jeweils 4 Tieren für das 14 Tage- und jeweils 5 Tieren für das 28 Tage-Experiment gebildet.

	14 Tage		28 Tage	
	AA115	Kontrolle	AA115	Kontrolle
Biomechanik	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8
Histologie	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8
μ CT	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8
Western Blot	n = 4	n = 4	n = 5	n = 5

Tab. 1: Studiendesign.

3.4. Medikamentengabe

Tiere der Verumgruppen erhielten von Tag 0 (OP-Tag) bis Tag 13 respektive Tag 27 eine tägliche subkutane Injektion von 100 µl des 17 β -HSD2-Inhibitors AA115 unter die Rückenhaut in einer Dosierung von 50 mg/kg Körpergewicht. Zur Verabreichung wurde AA115 mittels Ultraschallbad (Elmasonic S60H®, Elma Schmiedbauer GmbH, Singen, Deutschland) in einer Vehikellösung bestehend aus 0,5% Gelatine und 5% Mannitol in Wasser (w/w) bei 35 °C in Suspension gebracht. Tiere der Kontrollgruppen erhielten eine tägliche subkutane Injektion von 100 µl Vehikellösung.

3.5. Probengewinnung

Die Tötung der Tiere erfolgte zu den beiden oben genannten Zeitpunkten. Hierzu wurden die Tiere nach Röntgendokumentation (Abb. 16) gewogen und narkotisiert. Nach Eröffnung des Abdomens durch eine mediane Laparotomie wurde die Vena cava inferior freipräpariert und aus dieser auf Höhe des Abgangs der Nierenvenen mithilfe einer mit Heparin (Heparin-Natrium 25000 I.E./5 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) vorgespülten Spritze (BD Plastipak™ 1 ml, Becton Dickinson and Company, New Jersey, USA) Blut entnommen. Die Tiere verstarben an dem auf diese Art induzierten Volumenmangel. 300 µl Blut wurden zusammen mit 30 µl Calciumcitrat-Lösung in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 5 min bei 2500 x g zentrifugiert (Hettich Universal 30 RF, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). Das als klarer Überstand abgrenzbare Plasma wurde abpipettiert und bei -80 °C tiefgefroren. Beide Femora wurden nach Exartikulation aus Hüft- und Kniegelenk von Weichgewebe befreit und für biomechanische, histologische und computertomographische Analysen bei -80 °C tiefgefroren. Bei der Probenentnahme für die Western Blot Analyse wurde das Kallusgewebe mittels Einwegskalpell vom originären Knochen getrennt, sofort in Lysepuffer (10 mM Tris, pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA,

Material und Methodik

0,5% Triton-X 100, 0,02% NaN₃, 0,2 mM PMSF, Protease-Inhibitor-Cocktail und Protease-Inhibitor-Cocktail 2, je 1:100, v/v, Sigma–Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gegeben, mit Hilfe von Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden den Kadavern Hoden und Samenbläschen entnommen und die entsprechenden Organgewichte bestimmt.

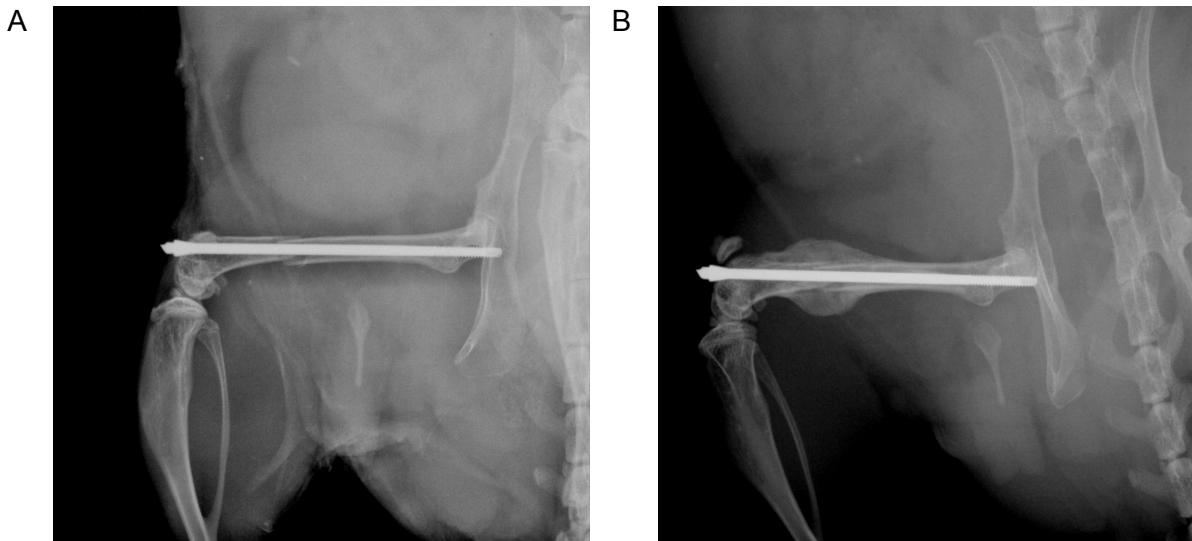


Abb. 16: Röntgendifokumentation der Fraktur und Implantatlage. (A) Intraoperativ. (B) Deutliche Kallusbildung 2 Wochen postoperativ.

3.6. Hochauflösende mikro-computertomographische Analyse

3.6.1. Bildakquisition

Die Femora wurden in Kompressen gewickelt und standardisiert unter fließendem Wasser aufgetaut. Danach wurden die Zugschrauben aus den frakturierten Seiten ohne Beeinträchtigung des Frakturkallus entfernt. Die µCT-Untersuchungen wurden mit dem Computertomographen Skyscan 1172® (Bruker microCT, Kontich, Belgien) durchgeführt. Dabei wurden die Femora in luftgefüllten Eppendorfgefäß en mit Hilfe von Styropor am distalen und Schaumstoff am proximalen Knochenende fixiert und im µCT senkrecht zur auftreffenden Röntgenstrahlung platziert. Die Röntgenspannung betrug 100 kV, die Stromstärke 100 µA. Ein 0,5 mm starker Aluminium-Filter wurde eingesetzt, um Aufhärtungsartefakte zu reduzieren (MEGANCK et al., 2009). Bei einer Voxelgröße von 4 µm und einer Expositionszeit von 1800 ms wurden Transversalschnitte im 360°-Rotationsscan angefertigt. Der zu scannende Bereich wurde anhand von Vorschau-Bildern so ausgewählt, dass der gesamte Kallus beim Scan miteinbezogen wurde.

3.6.2. Bildrekonstruktion und ROI-Festlegung

Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Skyscan NRecon® Software (Bruker microCT, Kontich, Belgien), die Festlegung der Region of Interest (ROI) und Bestimmung der Parameter mit Skyscan CTAnalyzer® (CTAn®, Bruker microCT, Kontich, Belgien). Zu Beginn der ROI-Festlegung wurden zunächst die proximalen und distalen Transversalschnitte aufgesucht, auf denen kein Kallus mehr zu erkennen war. Auf den dazwischenliegenden Schnitten wurde ausschließlich Kallus erfasst, indem zum Teil auf einzelnen Schnitten freihand eine manuelle Markierung um die innere, periostale Grenze und die äußere Kalluskontur gezeichnet wurde. Zu einem anderen Teil interpolierte die CTAn® Software automatisch die ROI zwischen den manuell markierten Schnitten, sowie das entsprechende Volume of Interest (VOI) der 3D-Rekonstruktion.

Jede automatisch entstandene ROI wurde zusätzlich sorgfältig kontrolliert und gegebenenfalls manuell korrigiert.

3.6.3. Analyse der knochenspezifischen Parameter

Zur automatischen Einteilung der Pixel in Knochen und Nicht-Knochen wurde bei der Graustufen-Einstellung ein minimaler Schwellenwert (Threshold) von 68 und ein maximaler Schwellenwert von 255 gewählt (BOSEMARK et al., 2013).

Zu den in der folgenden Analyse erhobenen Parametern gehörten das Knochenvolumen BV [mm³], das Gesamtvolumen des VOI TV [mm³], welches dem Gesamtkallusvolumen entsprach, sowie der Anteil des Knochenvolumens am Gesamtvolumen BV/TV [%].

Zur Analyse der trabekulären Morphologie wurden die durchschnittliche Trabekelzahl pro Längeneinheit Tb.N [1/mm], die mittlere Trabekeldicke Tb.Th [mm] und der mittlere Trabekelabstand Tb.Sp [mm] bestimmt. Zur Bestimmung der Tb.Th und Tb.Sp wurde eine direkte 3D-Evaluation durchgeführt, welche Sphären mit aufsteigenden Durchmessern zur Dickenbestimmung nutzt (HILDEBRAND et al., 1997).

Eine Evaluation des Mineralisierungsgrades erfolgte über die Bestimmung der Bone Mineral Density BMD [g/cm³], einem Parameter, welcher eine Aussage über die mittlere Knochendichte eines definierten Volumens aus gemischtem Knochen- und Weichgewebe erlaubt. Im Vorfeld erfolgte hierzu eine Kalibrierung des Scanners mit zwei 2 mm durchmessenden Zylindern aus Kalziumhydroxylapatit (CaHA) mit bekannten Dichten von 0,25 g/cm³ und 0,75 g/cm³. Über einen so bestimmten Abschwächungskoeffizienten konnte unter standardisierten Scanbedingungen die BMD berechnet werden (BOUXSEIN et al., 2010).

3.7. Biomechanische Analyse

Die mechanische Stabilität der Femora wurde über eine standardisierte und etablierte Dreipunkt-Biegetestung mithilfe einer Materialprüfmaschine (1454, Zwick, Ulm, Deutschland) untersucht (BURSTEIN et al., 1971; HISTING et al., 2011). Hierzu wurden die Knochen am proximalen und distalen Ende auf feste Auflagen mit einem Abstand von 6 mm aufgestützt. Zwischen den Auflagen erfolgte eine Druckbelastung von dorsaler Knochenseite mit einem Stempel, im Falle der rechten Femora auf Höhe der ehemaligen Frakturlinie, im Falle der unfrakturierten Femora auf jeweils entsprechenden Höhen. Die Biegebelastung (Druckkraft) wurde durch Absenken des Stempels kontinuierlich erhöht und zusammen mit der Biegung bis zum Erhalt einer linearen Kurve in einem Kraft-Weg-Diagramm aufgezeichnet. Die Steigung des linearen Kurvenanteils stellte somit die Biegesteifigkeit S [N/mm] des Knochens dar und konnte aus dem Quotienten aus Last (F [N]) und entsprechender Verformung (ΔL [mm]) berechnet werden.

$$S \text{ [N/mm]} = \frac{F \text{ [N]}}{\Delta L \text{ [mm]}}$$

Zur Analyse der Stabilität der Frakturen wurden neben der absoluten Steifigkeit der Femora auch die relative Steifigkeit der frakturierten Femora bestimmt:

$$S_{\text{relativ}} \text{ [%]} = \frac{S_{\text{rechte Seite}} \text{ [N/mm]}}{S_{\text{linke Seite}} \text{ [N/mm]}}$$

3.8. Histologische Untersuchung

Nach computertomographischen und biomechanischen Untersuchungen wurden die rechten Femora zunächst für 24 Stunden in 4%igem Formalin fixiert, anschließend über 4 Wochen in 10%iger EDTA-Lösung dekalzifiziert und in Paraffinblöcke eingebettet. Longitudinalschnitte mit einer Dicke von 5 µm wurden angefertigt und nach der Masson-Goldner-Trichrom-Methode gefärbt. In dieser Färbung erschienen kollagenes Bindegewebe grün, mineralisierter Knochen leuchtend grün, Zytoplasma rot und Zellkerne braunschwarz.

Zur Auswertung wurden lichtmikroskopische Bilder mit 1,25-facher Vergrößerung (Olympus BX 60, Tokyo, Japan) aufgenommen und digitalisiert (Zeiss Axio Cam und Axio Vision 3.1, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Mithilfe einer Analyse-Software (ImageJ Analysis System, NIH, Bethesda MD) konnten die verschiedenen histomorphometrischen Parameter

gemäß den Empfehlungen der American Society of Bone and Mineral Research bestimmt werden (PARFITT et al., 1987):

- Femurdurchmesser [mm]
- Kallusdurchmesser [mm]
- Fläche des periostalen Kallus [mm^2]
- knöcherne Fläche innerhalb des periostalen Kallus [mm^2]
- knorpelige Fläche innerhalb des periostalen Kallus [mm^2]
- bindegewebige Fläche innerhalb des periostalen Kallus [mm^2]

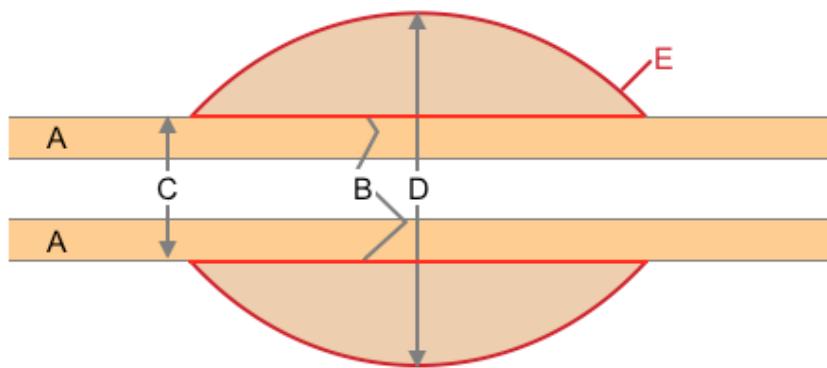


Abb. 17: (A) Kortikalis, (B) Frakturlinie, (C) Femurdurchmesser, (D) Kallusdurchmesser, (E) periostaler Kallus.

3.9. Western Blot Analyse

3.9.1. SDS-PAGE

Für die biochemische Proteinanalyse des Kallusgewebes wurde dieses wie bereits beschrieben bei der Probengewinnung in Lysepuffer gegeben und bei -80 °C kryokonserviert. Zur Analyse wurde die Probe mechanisch homogenisiert, für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 30 Minuten bei 16000 x g zentrifugiert. Eine diskontinuierliche SDS-PAGE diente der Auftrennung des Protein-gemisches. Dabei wanderten die denaturierten, durch das SDS negativ geladenen Proteine in einer von ihrer Molekülgröße abhängigen Geschwindigkeit zur Anode.

3.9.2. Proteintransfer

Um die aufgetrennten Proteine in einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar machen zu können, wurden diese unmittelbar nach Elektrophorese in einer Mini-Trans-Blotkammer (BioRad, München, Deutschland) auf eine Polyvinylendifluorid-Membran (PVDF, BioRad) übertragen. Dieser Transfer erfolgte mittels eines Tank-Blot-Systems. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes in senkrechter Richtung zu Gel und Membran wanderten die Proteine in Richtung der zur Anode ausgerichteten PVDF-Membran.

3.9.3. Immunmarkierung

Zunächst wurden nicht-spezifische Bindungsstellen mit 5%iger Lösung aus Milchpulver (Blotting Grade Blocker non-fat dry milk, BioRad) und TBS-T blockiert. Im Anschluss wurden die Membranen mit folgenden Primärantikörpern für 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert:

Antigen	Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
BMP-2	Kaninchen-Anti-Maus	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
RANKL	Kaninchen-Anti-Maus	1:300	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
OPG	Kaninchen-Anti-Maus	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
VEGF	Kaninchen-Anti-Maus	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
β-Actin	Maus-Anti-Maus	1:5000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Tab. 2: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper.

Die Sekundärantikörper-Inkubation erfolgte daraufhin mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten Ziege-Anti-Maus (1:1500, DAKO, Hamburg, Deutschland) oder Ziege-Anti-Kaninchen IgG Antikörpern (1:1000, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) für 1,5 Stunden. Die Proteinexpression wurde mittels Luminol-enhanced Chemilumineszenz (ECL, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) visualisiert. Die Signale wurden mit einem Chemilumineszenz-Imager (Intas ChemoCam-Imager, ChemoCam-Camera, Chemostar Professional Software, Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) detektiert und mithilfe der LabImage 1D Software (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) analysiert. Die resultierenden Signale wurden auf die jeweiligen β-Actinsignale normalisiert, um unkorrektes Beladen und Blotting der Gele zu korrigieren. Die Proteinexpression wurde in Pixelintensität (PI) angegeben.

3.10. Bestimmung der Organgewichte

Um einen möglichen systemischen Effekt durch die Manipulation im Hormonhaushalt der Versuchstiere nachzuweisen, wurden bei Tötung verschiedene Organgewichte bestimmt. Bei hohen Testosteron-Spiegeln käme es im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus zur Downregulation der Ausschüttung des luteinisiernden Hormons (LH) in der Hypophyse. Bei sinkendem LH-Serumspiegel fiele in der Folge ein wesentlicher Wachstumsreiz auf das Hodengewebe und die Samenbläschen weg, was sich entsprechend in geringeren Organgewichten widerspiegeln würde (RIVERO-MÜLLER et al., 2010).

3.11. Plasmaanalysen

Um den systemischen Effekt der 17 β -HSD2-Inhibition auf die aktiven Hormone E2 und T zu bestimmen, wurden die Steroide aus dem gewonnenen Plasma extrahiert und ihre Konzentration im Plasma mittels ELISA (DRG Instruments GmbH, Marburg, Deutschland) bestimmt (ABDELSAMIE et al., 2019).

3.12. Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler (MW \pm SEM) angegeben. Nach Prüfung auf das Vorliegen einer Normalverteilung der Einzelwerte (Kolmogorov-Smirnov-Test) und der Varianzengleichheit (F-Test) wurden die Gruppen mittels Student's t-Test verglichen. Wenn keine Normalverteilung vorlag, wurde zur statistischen Auswertung ein Wilcoxon-Mann-Whitney-Test durchgeführt. Die Statistik wurde mit Hilfe von GraphPad Prism QuickCalcs (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) erstellt. Als Indikator für statistisch signifikante Unterschiede wurde ein p-Wert von kleiner als 0,05 festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1. Postoperativer klinischer Verlauf

In keiner Versuchs- oder Kontrollgruppe zeigte sich postoperativ eine signifikante Änderung des Körpergewichtes.

Im postoperativen Verlauf erfolgte nach etwa zwei bis drei Tagen eine spontane Aufbelastung der frakturierten Extremität. Sowohl Verhalten als auch Aktivitätsniveau der Tiere waren mit dem präoperativen Zustand vergleichbar. Es zeigten sich keine Beeinträchtigung des Bewegungsablaufs oder äußere Anzeichen von Schmerzen.

Kriterien, die postoperativ zum Ausschluss aus der Studie führten, waren Knochen- oder Weichteilinfektionen, mikroskopisch oder radiologisch erkennbare Implantatdislokationen sowie Frakturen, die nicht den Typen A2 oder A3 gemäß der AO-Klassifikation zugeordnet werden konnten (MEINBERG et al., 2018).

4.2. Biomechanik

Nach zweiwöchiger Frakturheilung zeigte sich bezüglich der Biegesteifigkeit kein signifikanter Unterschied zwischen den mit AA115 behandelten Versuchstieren und den mit Vehikellösung behandelten Kontrolltieren (AA115: $15,3 \pm 3,3$ N/mm vs. Kontrolle: $18,9 \pm 4,5$ N/mm; $p > 0,05$) (Abb. 18A).

Im Gegensatz dazu zeigte sich die Biegesteifigkeit nach vier Wochen in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (AA115: $44,3 \pm 5,5$ N/mm vs. Kontrolle: $31,0 \pm 4,1$ N/mm; $p < 0,05$) (Abb. 18B).

Ergebnisse

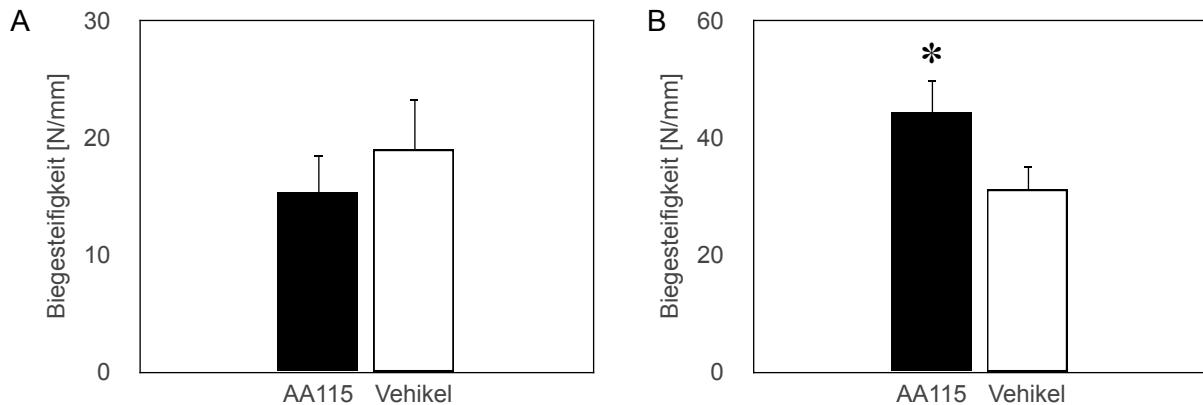


Abb. 18: Absolute Biegesteifigkeit der frakturierten Knochen. (A) 2 Wochen postoperativ. (B) 4 Wochen postoperativ. MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Die relative Biegesteifigkeit der rechten, frakturierten Femora im Verhältnis zum unfrakturierten Femur der Gegenseite wies nach zwei Wochen keinen statistisch signifikanten Unterschied auf (AA115: $22,5 \pm 5,7\%$ vs. Kontrolle: $27,6 \pm 6,6\%$; $p > 0,05$) (Abb. 19A). Nach vierwöchiger Heilung war dagegen auch die relative Biegesteifigkeit in der Versuchsgruppe statistisch signifikant erhöht (AA115: $70,8 \pm 7,3\%$ vs. Kontrolle: $40,9 \pm 5,4\%$; $p < 0,05$) (Abb. 19B).

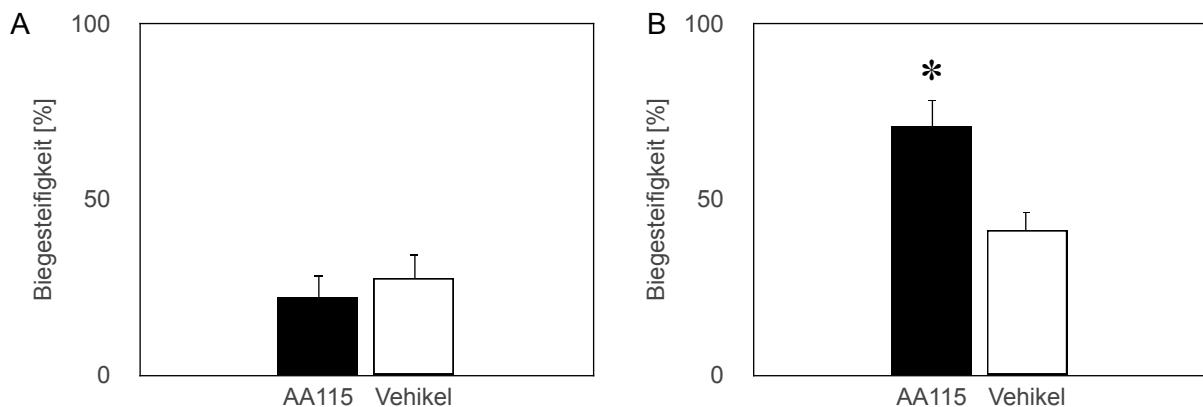


Abb. 19: Relative Biegesteifigkeit der frakturierten Knochen. (A) 2 Wochen postoperativ. (B) 4 Wochen postoperativ. MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.3. Histologische Untersuchungsergebnisse nach 14 Tagen

Die Auswertung der histologischen Schnittbilder ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede des Femur- (AA115: $1,48 \pm 0,04$ mm vs. Kontrolle: $1,54 \pm 0,04$ mm; $p > 0,05$)

Ergebnisse

oder Kallusdurchmessers (AA115: $3,13 \pm 0,19$ mm vs. Kontrolle: $3,41 \pm 0,12$ mm; $p > 0,05$) nach 14 Tagen.

Die Flächen des periostalen Kallus wiesen nach 14 Tagen keinen Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen auf (AA115: $5,09 \pm 0,56$ mm² vs. Kontrolle: $5,16 \pm 0,58$ mm²; $p > 0,05$) (Abb. 20).

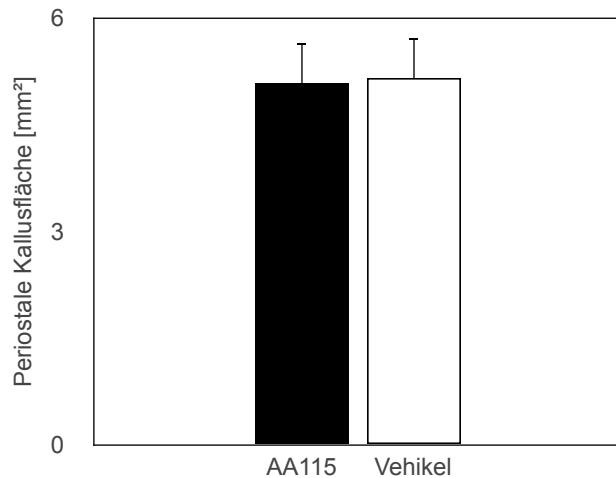


Abb. 20: Periostale Kallusfläche 2 Wochen postoperativ. MW \pm SEM.

Die Untersuchung der Gewebezusammensetzung des periostalen Kallus ergab keine signifikanten Unterschiede nach zweiwöchiger Frakturheilung (AA115: $3,96 \pm 0,44$ mm² Knochen, $1,02 \pm 0,25$ mm² Knorpel, $0,11 \pm 0,08$ mm² Bindegewebe vs. Kontrolle: $4,21 \pm 0,48$ mm² Knochen, $0,91 \pm 0,22$ mm² Knorpel, $0,04 \pm 0,02$ mm² Bindegewebe; $p > 0,05$) (Abb. 21).

Ergebnisse

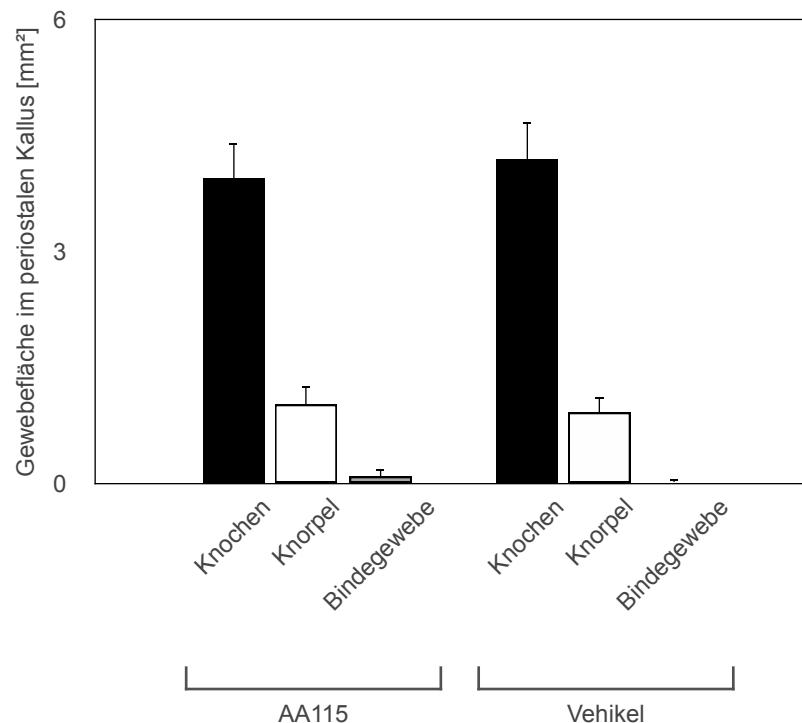


Abb. 21: Periostale Gewebezusammensetzung 2 Wochen postoperativ. MW \pm SEM.

4.4. Histologische Untersuchungsergebnisse nach 28 Tagen

Auch nach vierwöchiger Heilung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede des Femur (AA115: $1,33 \pm 0,12$ mm vs. Kontrolle: $1,41 \pm 0,06$ mm; $p > 0,05$) oder Kallusdurchmessers (AA115: $2,41 \pm 0,25$ mm vs. Kontrolle: $2,46 \pm 0,12$ mm; $p > 0,05$) zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe.

Im Gegensatz dazu war die Fläche des periostalen Kallus in der mit AA115 behandelten Gruppe signifikant größer (AA115: $4,72 \pm 0,65$ mm² vs. Kontrolle: $2,94 \pm 0,30$ mm²; $p < 0,05$) (Abb. 22).

Ergebnisse

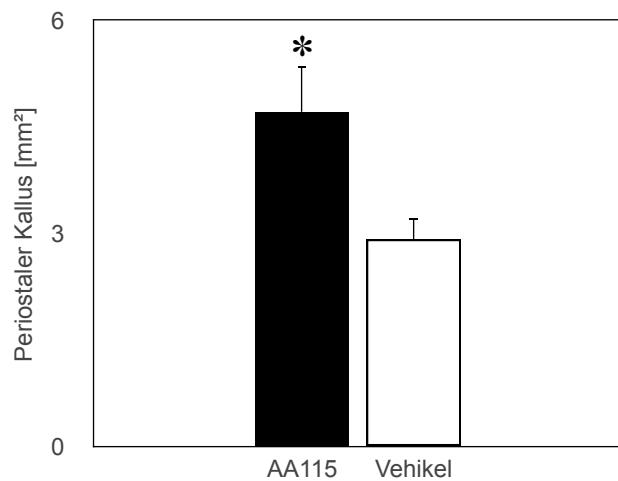


Abb. 22: Periostale Kallusfläche 4 Wochen postoperativ. MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Eine nähere Untersuchung der Gewebezusammensetzung zeigte, dass die periostale Kallusfläche der Versuchsgruppe aus einer signifikant größeren Knochenfläche bestand als die der Kontrollgruppe (AA115: $4,68 \pm 0,65$ mm² Knochen vs. Kontrolle: $2,89 \pm 0,29$ mm² Knochen; $p < 0,05$) (Abb. 23).

Die Flächen von Knorpel und Bindegewebe innerhalb des periostalen Kallus unterschieden sich auch nach 28 Tagen nicht (AA115: $0,04 \pm 0,04$ mm² Knorpel, $0,00 \pm 0,00$ mm² Bindegewebe vs. Kontrolle: $0,05 \pm 0,05$ mm² Knorpel, $0,00 \pm 0,00$ mm² Bindegewebe; $p > 0,05$) (Abb. 23).

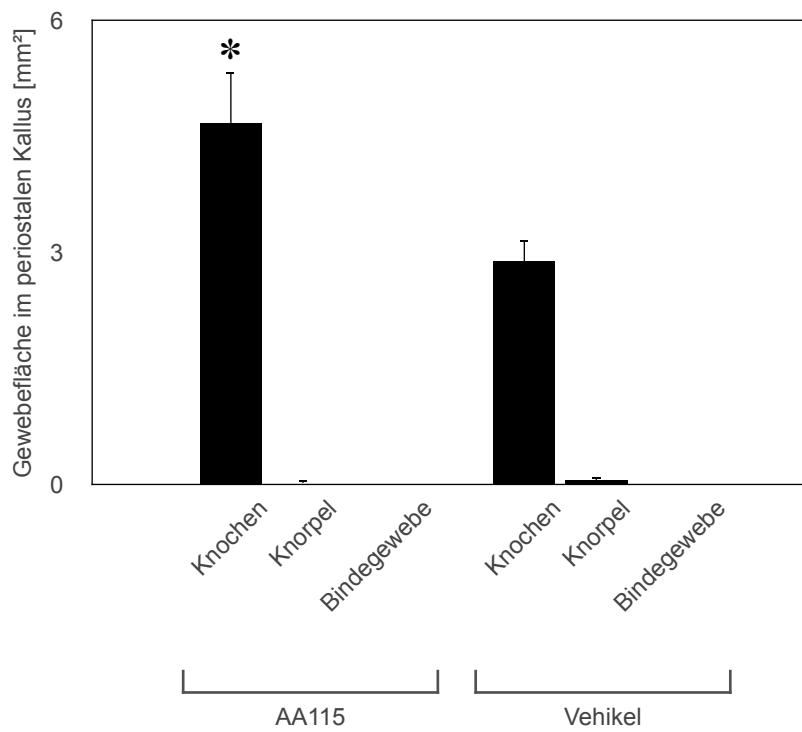


Abb. 23: Periostale Gewebezusammensetzung 4 Wochen postoperativ. MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.5. µCT-Ergebnisse nach 14 Tagen

Ein Vergleich des Gesamtvolumens des Gewebes (Tissue Volume, TV) nach zwei Wochen erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (AA115: $22,04 \pm 2,91 \text{ mm}^3$ vs. Kontrolle: $21,21 \pm 3,06 \text{ mm}^3$; $p > 0,05$) (Abb. 24A). Auch das Volumen von Knochengewebe (Bone Volume, BV) (AA115: $3,61 \pm 0,41 \text{ mm}^3$ vs. Kontrolle: $3,40 \pm 0,32 \text{ mm}^3$; $p > 0,05$) (Abb. 24B) und der Quotient beider Volumina (Bone Volume Ratio, BV/TV) (AA115: $17,48 \pm 1,84\%$ vs. Kontrolle: $19,35 \pm 3,58\%$; $p > 0,05$) unterschieden sich nicht signifikant.

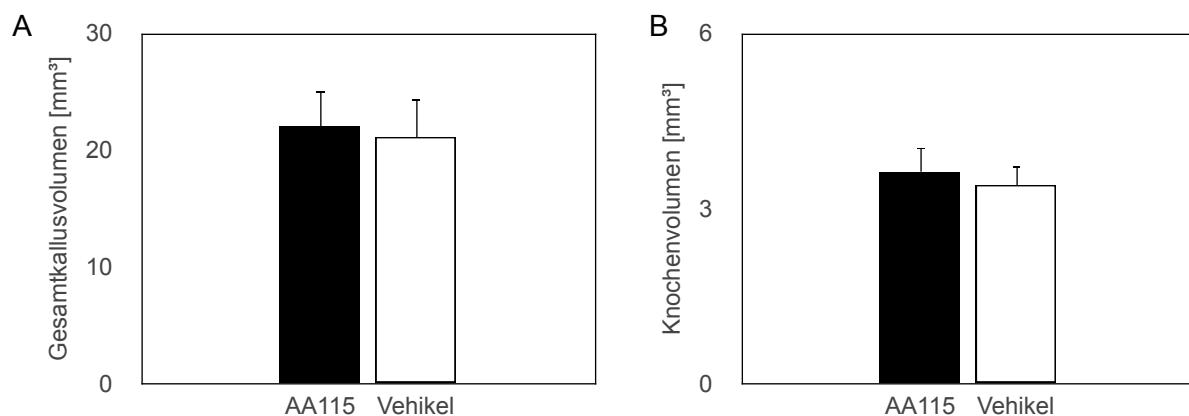


Abb. 24: (A) Gesamtkallusvolumen 2 Wochen postoperativ. (B) Knochenvolumen im Kallus 2 Wochen postoperativ.

Die mittlere Trabekeldicke Tb.Th (AA115: $0,035 \pm 0,002 \text{ mm}$ vs. Kontrolle: $0,033 \pm 0,001 \text{ mm}$; $p > 0,05$), die mittlere Trabekelzahl Tb.N (AA115: $4,404 \pm 0,547 \text{ mm}^{-1}$ vs. Kontrolle: $5,656 \pm 0,831 \text{ mm}^{-1}$; $p > 0,05$) und der mittlere Trabekelabstand Tb.Sp (AA115: $0,165 \pm 0,029 \text{ mm}$ vs. Kontrolle: $0,152 \pm 0,032 \text{ mm}$; $p > 0,05$) wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede auf.

Nach zweiwöchiger Frakturheilung bestand kein Unterschied der BMD zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe (AA115: $0,227 \pm 0,016 \text{ g/cm}^3$ vs. Kontrolle: $0,248 \pm 0,035 \text{ g/cm}^3$; $p > 0,05$).

4.6. µCT-Ergebnisse nach 28 Tagen

Nach vierwöchiger Heilung zeigte sich in der mit AA115 behandelten Gruppe ein größeres TV als in der Kontrollgruppe (AA115: $13,90 \pm 1,70 \text{ mm}^3$ vs. Kontrolle: $10,10 \pm 0,37 \text{ mm}^3$; $p > 0,05$) (Abb. 25A und Abb. 26). Dieser Unterschied war statistisch allerdings nicht signifikant.

Ergebnisse

Ebenso war in der Versuchsgruppe ein tendenziell größeres BV zu verzeichnen (AA115: $3,72 \pm 0,43 \text{ mm}^3$ vs. Kontrolle: $2,95 \pm 0,11 \text{ mm}^3$; $p > 0,05$) (Abb. 25B). Die Bone Volume Ratio zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe unterschied sich nicht (AA115: $27,52 \pm 1,91\%$ vs. Kontrolle: $29,40 \pm 1,36\%$; $p > 0,05$).

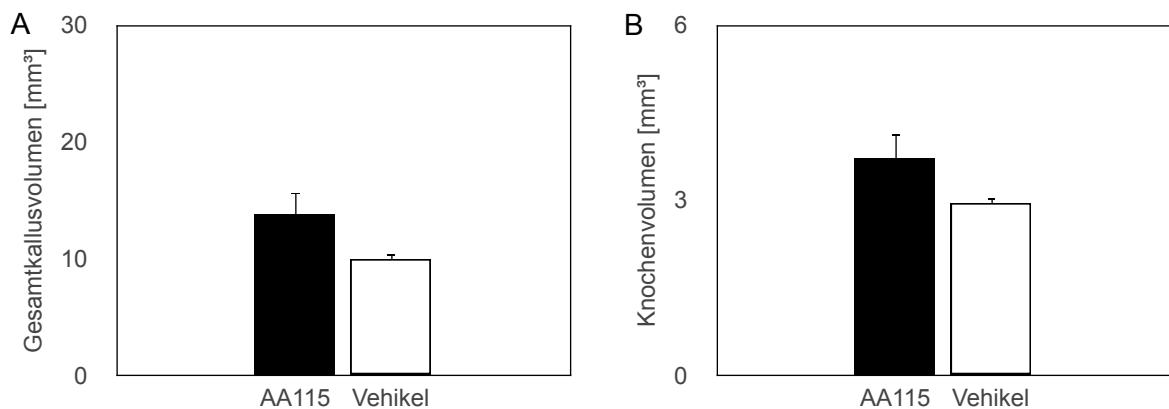


Abb. 25: (A) Gesamtkallusvolumen 4 Wochen postoperativ. (B) Knochenvolumen im Kallus 4 Wochen postoperativ. MW \pm SEM.

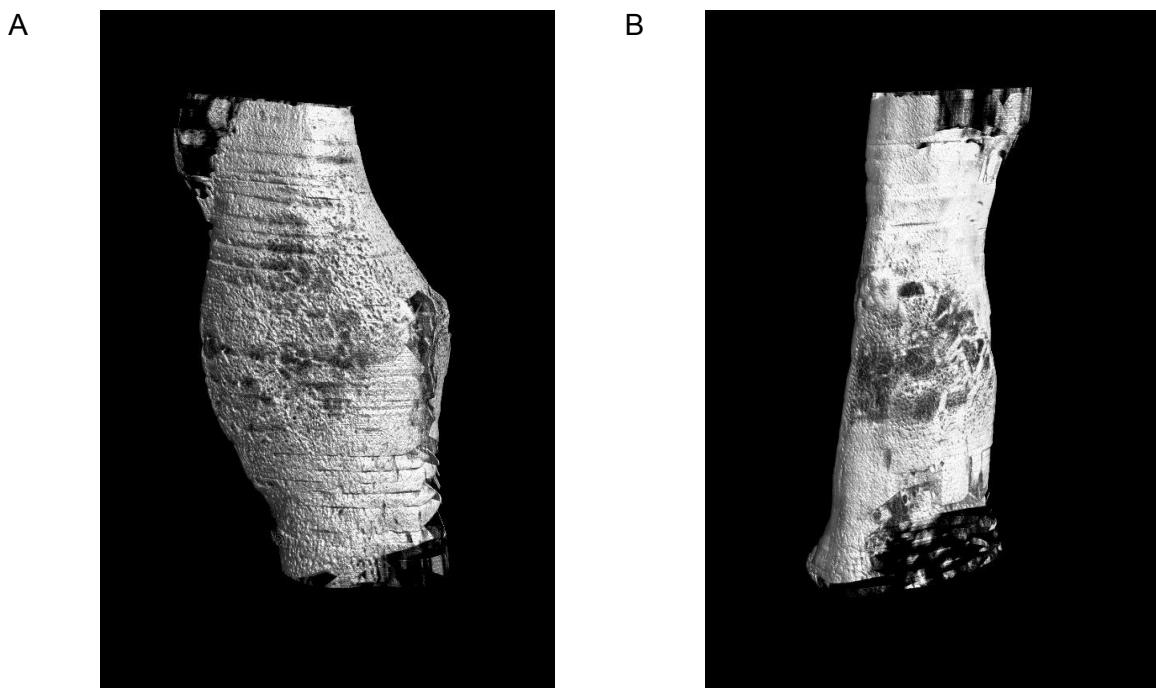


Abb. 26: 3D-Rekonstruktionen der computertomographischen Kallusanalysen 4 Wochen postoperativ. (A) AA115. (B) Vehikel.

Die Untersuchung der Trabekel-Morphologie erbrachte auch nach vier Wochen keine Unterschiede: Tb.Th (AA115: $0,065 \pm 0,004 \text{ mm}$ vs. Kontrolle: $0,071 \pm 0,002 \text{ mm}$; $p > 0,05$),

Ergebnisse

Tb.N (AA115: $4,294 \pm 0,258 \text{ mm}^{-1}$ vs. Kontrolle: $4,135 \pm 0,166 \text{ mm}^{-1}$; $p > 0,05$) und Tb.Sp (AA115: $0,196 \pm 0,009 \text{ mm}$ vs. Kontrolle: $0,197 \pm 0,007 \text{ mm}$; $p > 0,05$) der Gruppen waren vergleichbar.

Ein Unterschied der BMD des Frakturkallus war nicht zu beobachten (AA115: $0,308 \pm 0,019 \text{ g/cm}^3$ vs. Kontrolle: $0,339 \pm 0,016 \text{ g/cm}^3$; $p > 0,05$).

4.7. Western Blot-Ergebnisse nach 14 Tagen

Der Knochenformationsmarker BMP-2 wurde nach 2 Wochen in der mit AA115 behandelten Gruppe stärker exprimiert (AA115: $173,8 \times 10^4 \pm 19,4 \times 10^4 \text{ PI}$ vs. Kontrolle: $112,2 \times 10^4 \pm 26,7 \times 10^4 \text{ PI}$; $p > 0,05$). Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich jedoch nicht (Abb. 27).

Der Knochenresorptionsmarker RANKL zeigte nach zweiwöchiger Behandlung mit AA115 eine vergleichbare Expression zur Kontrollgruppe (AA115: $2,3 \times 10^4 \pm 0,4 \times 10^4 \text{ PI}$ vs. Kontrolle: $2,4 \times 10^4 \pm 0,3 \times 10^4 \text{ PI}$; $p > 0,05$). Der Inhibitor der Osteoklastogenese OPG wurde zum gleichen Untersuchungszeitpunkt hingegen signifikant vermehrt exprimiert (AA115: $37,6 \times 10^4 \pm 6,5 \times 10^4 \text{ PI}$ vs. Kontrolle: $19,7 \times 10^4 \pm 3,2 \times 10^4 \text{ PI}$; $p < 0,05$) (Abb. 27). Somit war der RANKL/OPG-Quotient in der Versuchsgruppe entsprechend niedriger.

Die Expression des Angiogenesemarkers VEGF war in der Versuchsgruppe nach 14 Tagen tendenziell geringer (AA115: $4,2 \times 10^4 \pm 0,1 \times 10^4 \text{ PI}$ vs. Kontrolle: $5,5 \times 10^4 \pm 0,6 \times 10^4 \text{ PI}$; $p > 0,05$) (Abb.27).

Ergebnisse

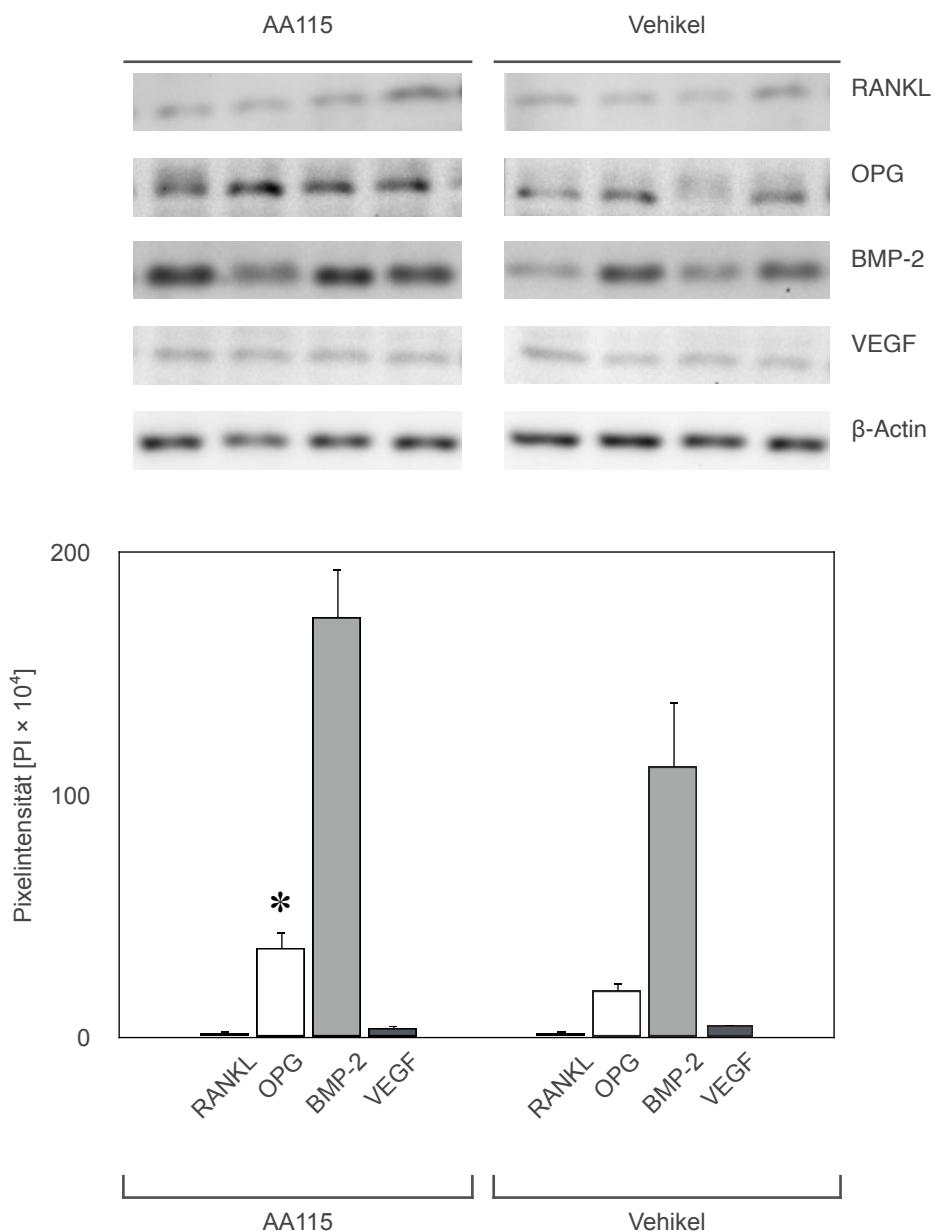


Abb. 27: Western Blot Analyse nach 2 Wochen mit repräsentativem β-Actin. MW ± SEM. *p < 0,05 vs. Kontrolle.

4.8. Western Blot-Ergebnisse nach 28 Tagen

Nach vierwöchiger Behandlung mit AA115 war die Expression von BMP-2 um 52% erhöht (AA115: $35,5 \times 10^4 \pm 6,7 \times 10^4$ PI vs. Kontrolle: $23,3 \times 10^4 \pm 6,1 \times 10^4$ PI; p > 0,05). Ein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich daraus jedoch nicht (Abb. 28).

VEGF zeigte vier Wochen nach Fraktur eine statistisch signifikant erhöhte Expression (AA115: $11,0 \times 10^4 \pm 2,6 \times 10^4$ PI vs. Kontrolle: $4,6 \times 10^4 \pm 0,8 \times 10^4$ PI; p < 0,05). Diese war in der AA115-behandelten Gruppe um 142% größer als in der Kontrollgruppe (Abb. 28).

Ergebnisse

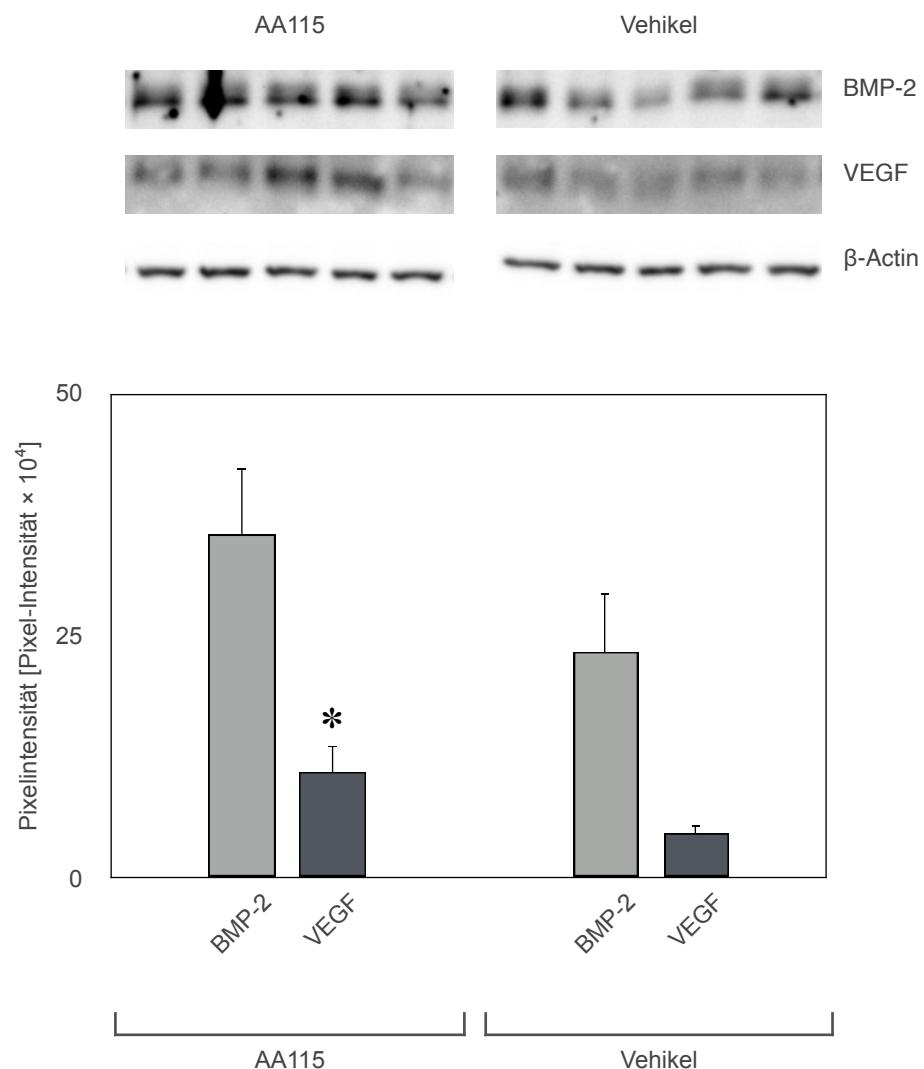


Abb. 28: Western Blot Analyse nach 4 Wochen mit repräsentativem β -Actin. MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.9. Relative Organgewichte

Die bestimmten Organgewichte zeigten relativ zum Körpergewicht des jeweiligen Tieres bei Explantation keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe nach 14 oder 28 Tagen.

	14 Tage		28 Tage	
	AA115	Kontrolle	AA115	Kontrolle
Testikel/ KG [%]	0,69 \pm 0,16	0,65 \pm 0,04	0,66 \pm 0,12	0,64 \pm 0,13
Samenbläschen/ KG [%]	1,05 \pm 0,09	0,98 \pm 0,06	1,33 \pm 0,23	1,19 \pm 0,10

Tab. 3: Organgewichte zum Zeitpunkt der Explantation relativ zum Körpergewicht.

4.10. Plasmaanalysen

Die Bestimmung der Plasmakonzentration der Hormone E2 und T nach 28 Tagen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe.

	AA115	Kontrolle
Testosteron [ng/ml]	0,47 ± 0,30	0,63 ± 0,15
Östrogen [pg/ml]	35,65 ± 5,18	30,65 ± 3,83

Tab. 4: Hormonkonzentrationen im Plasma nach 4 Wochen.

5. Diskussion

5.1. Diskussion der Methoden

Im Rahmen des komplexen biologischen Prozesses, den die Frakturheilung darstellt, sind Wechselwirkungen zahlreicher knochenfremder Gewebearten erforderlich. (STREET et al., 2002). In vitro Studien gelten als wenig aussagekräftig, da hier dieses komplexe Zusammenspiel von Knochen, umgebendem Weichteilgewebe, Gefäß- und Immunsystem nur unzureichend reproduziert werden kann. Zuverlässige in vivo Frakturmodelle sind aus diesem Grund bis heute für Untersuchungen zur Knochenfrakturheilung unumgänglich (FRIEDMANN et al., 1996; EINHORN et al., 1998).

Obwohl Großtiermodelle den Vorteil besitzen, sehr gut mit der Anatomie des Menschen vergleichbar zu sein und Osteosynthesetechniken ohne größere Modifikationen adaptiert werden können, führten wir die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit am Mausmodell durch (NUNAMAKER et al., 1998).

Zwar besitzt die Maus im Gegensatz zu den Großtiermodellen kein Havers-System, sodass die Übertragbarkeit auf den Menschen in diesem Hinblick immer kritisch überprüft werden muss, doch zeigt der Heilungsverlauf über Resorptionshöhlen viele Analogien zum Remodeling über das Havers-System (NUNAMAKER et al., 1998).

Zudem sind Kosten und Aufwand für Anschaffung, Zucht und Haltung im Vergleich zu Großtiermodellen wesentlich günstiger. Dies erlaubt die Untersuchung größerer Versuchsgruppen und somit validere Aussagen in der Ergebnisinterpretation (HISTING et al., 2011).

Auch für die Behandlung mit einem wie in der vorliegenden Arbeit nur begrenzt verfügbaren Wirkstoff bietet die Maus aufgrund ihres geringen Körpergewichts den entscheidenden Vorteil, dass die zu verabreichenden Mengen sehr gering sind.

Bei pharmakologischen Studien gilt es außerdem zu berücksichtigen, dass bei der Untersuchung potentieller neuer Therapeutika für den Menschen in Tiermodellen zum einen das entsprechende Target vorhanden sein muss, zum anderen die pharmakokinetischen Eigenschaften des untersuchten Agens im verwendeten Organismus bekannt sein sollten. Im Vorfeld zum in vivo Experiment erfolgte daher der Nachweis einer m17 β -HSD2 in Osteozyten der Femurkortikalis von C57BL/6 Mäusen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (ABDELSAMIE et al., 2019). Im Zuge aller Phasen des Drug Designs wurden pharmakologische, biochemische und toxikologische Eigenschaften sowohl an h17 β -HSD2 aus menschlichen Plazenta-Homogenisaten als auch an m17 β -HSD2 aus murinen Leberhomogenisaten untersucht (ABDELSAMIE et al., 2019). Außerdem erfolgten bereits im Vorfeld in vivo Untersuchungen zur Pharmakokinetik im murinen Organismus, die bei

Diskussion

subkutaner AA115-Applikation nach 24 Stunden eine für die m17 β -HSD2-Hemmung ausreichend hohe Plasmakonzentration zeigten (ABDELSAMIE et al., 2019). Dennoch gilt es, die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen auch im Hinblick auf die Pharmakokinetik kritisch zu hinterfragen.

Um die Abläufe der Frakturheilung am Mausmodell untersuchen zu können, sind standardisierte Versuchsbedingungen unumgänglich. Für die Maus existieren verschiedene Modelle, die sich hinsichtlich Frakturierung, Frakturlokalisation und Osteosyntheseverfahren unterscheiden (HISTING et al., 2011). In ersten Modellen wurde teilweise ganz auf eine Stabilisierung verzichtet. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass die biomechanischen Eigenschaften einen großen Einfluss auf die Knochenheilung und Kallusbildung haben, erscheinen unfixierte Frakturmodelle jedoch wenig sinnvoll (CLAES et al., 1997).

Die langen Röhrenknochen der Maus, insbesondere Tibia und Femur, eignen sich am besten zur Analyse der Knochenbruchheilung (HILTUNEN et al., 1993; MANIGRASSO et al., 2004). Ein wesentlicher Nachteil in der Verwendung von Frakturmodellen der Tibia besteht darin, dass sie in ihrem Verlauf einen unregelmäßigen, dreieckigen Querschnitt und eine gebogene Achse aufweist, was standardisierte biomechanische Testungen erschwert (HISTING et al., 2011). Bei geschlossener Frakturierung der Tibia kann es zudem zu einer Frakturierung der Fibula kommen, was entweder in zwei getrennten Kallusformationen oder in einem kombinierten Kallusverbund und Synostosenbildung zwischen Tibia und Fibula resultieren kann. Kallusgröße und -beschaffenheit unterliegen somit einer großen Heterogenität (HILTUNEN et al., 1993). Zudem besteht an Tibia und Fibula eine nur sehr geringe Weichteildeckung, was die Gefahr von postoperativen Wundinfekten verglichen mit anderen Frakturmodellen erhöht (HOLSTEIN et al., 2009).

Biomechanische Untersuchungen können am Femur aufgrund seines gleichmäßig runden Querschnitts dagegen standardisiert durchgeführt werden (CHEUNG et al., 2003, HOLSTEIN et al., 2007; HISTING et al., 2011)

Grundsätzlich werden geschlossene und offene Frakturmodelle unterschieden. Bei offenen Frakturmodellen muss über einen lateralen Schnitt zum Knochen zugegangen werden. Die Osteotomie erfolgt unter Sicht. Die anschließende osteosynthetische Versorgung kann durch einen Fixateur, einen Pin-Clip oder eine Platte erfolgen (CHEUNG et al., 2003; GARCIA et al., 2008, HISTING et al., 2010).

Prinzipiell gewährleisten offene Frakturmodelle eine höhere Rotationsstabilität (CHEUNG et al., 2003; HISTING et al., 2010). Nachteil des Fixateurs ist neben seiner externen Lage das hohe Implantatgewicht, welches zu einer Beeinflussung des physiologischen Bewegungsablaufs führen kann. Durch die Perforation der Fixateur-Pins sind Infektionen im Bereich der Durchtrittsstellen durch die Haut möglich. Stabilisierungen mittels Plattenosteosynthese bedingen eine intramembranöse Heilung, die anders als eine enchondrale Heilung ohne die

Diskussion

Ausbildung einer Kallusmanschette und ohne die Bildung von Knorpel abläuft (HISTING et al., 2010). Sie bieten daher eine valide Alternative insbesondere zur Analyse der molekularen Abläufe bei intramembranöser Frakturheilung. In der hier vorgestellten Studie sollten jedoch Untersuchungen am Fraktuskallus durchgeführt werden, weshalb eine Heilung unter Ausbildung von Kallusgewebe erwünscht war.

Ein Nachteil ist, dass offene Operationsverfahren größere Weichteilschäden erzeugen als geschlossene Frakturmodelle, welche die Frakturheilung beeinträchtigen und zu einer verzögerten Frakturheilung führen können (CLAES et al., 2006).

In früheren geschlossenen Frakturmodellen wurde überwiegend die instabile Pin-Osteosynthese verwendet (HILTUNEN et al. 1993; HOLSTEIN et al., 2007). Da die mechanischen Bedingungen am Frakturspalt nachweislich von großer Relevanz für die Frakturheilung sind, sind derartige Studien aufgrund ihrer fehlenden Rotationsstabilität wenig aussagekräftig (CLAES et al., 1997). Weiterhin werden in Pin-Osteosynthesemodellen die Frakturierungen erst bei einliegendem Implantat durchgeführt. Durch Verbiegung des Implantates kann es somit zu zusätzlichen Beeinträchtigungen kommen.

In dieser Arbeit wurde das von Holstein et al. etablierte Modell der Schraubenosteosynthese mittels MouseScrew® verwendet (HOLSTEIN et al., 2009). Das Osteosynthesimplantat stellt eine intramedulläre Zugschraube dar. Durch die Konstruktion mit proximal liegendem Gewinde und distalem Kopf werden eine Kompression der Fraktur und eine rotationsstabile Osteosynthese erreicht. Das Einbringen der Schraube erfolgt retrograd über einen vorgelegten Führungsdräht im Markraum. Ein weiterer Vorteil dieses Modells liegt in seiner guten Reproduzierbarkeit und im wenig invasiven Operationszugang, der zusammen mit Anwendung einer stumpfen Guillotine zur Frakturierung einen geringen Weichteilschaden bedingt (HOLSTEIN et al., 2009).

Die Knochenheilung wird in eine frühe und eine späte Phase unterteilt. Manigrasso und O'Connor analysierten den zeitlichen Ablauf der Frakturheilung an der Maus, welcher wesentlich schneller als beim Menschen verläuft (MANIGRASSO et al., 2004). Hier zeigte sich eine maximale Kallusbildung nach zwei Wochen. Nach fünf Wochen wiesen die meisten Versuchstiere eine vollständige knöcherne Durchbauung der Fraktur auf. Ab diesem Zeitpunkt gilt eine Fraktur aus klinischen Gesichtspunkten als stabil (JUNQUEIRA et al., 2004). Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen der Frakturheilung nach zwei und nach vier Wochen durchgeführt, um zum einen den Einfluss des 17 β -HSD2-Inhibitors AA115 auf die frühe Phase der Frakturheilung zu untersuchen, zum anderen einen Vergleich der Knochenbruchheilung zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe vor endgültigem Abschluss der Kallushärtung durchführen zu können.

Es wurde eine Dosierung von 50 mg/kg KG AA115 verwendet. Die Dosierung wurde in Anlehnung an im Vorfeld von unserer Arbeitsgruppe durchgeführte tierexperimentelle

Diskussion

Pharmakokinetik-Studien gewählt. Diese zeigten bei subkutaner Applikation in genannter Dosierung eine Plasmakonzentration von AA115, welche über 24 Stunden die mittlere Hemmkonzentration für m17 β -HSD2 zu jedem Untersuchungszeitpunkt deutlich überschritt (ABDELSAMIE et al., 2019).

Zur Beurteilung der Stabilität des Kallus existieren verschiedene biomechanische Messmethoden. Zu ihnen gehören die Drei-Punkt-Biegetestung, die Vier-Punkt-Biegetestung sowie die Messung der Rotationsstabilität. Ein Vorteil der Rotationstestung liegt darin begründet, dass die Rotationskomponente, welche beim Menschen eine wesentliche Rolle im Mechanismus der Frakturentstehung spielt, nachgeahmt werden kann. Ein entscheidender Nachteil ist allerdings, dass sich diese Untersuchungsmethode nicht zerstörungsfrei durchführen lässt und somit die doppelte Zahl an Versuchstieren notwendig wäre, um die durchgeföhrten zusätzlichen Analysen realisieren zu können. Die Biegetestungen erlauben dagegen eine zerstörungsfreie Bestimmung der Biegsteifigkeit anhand des Kraft-Weg-Diagramms (BURSTEIN et al., 1971; HISTING et al., 2011). Wesentlicher Vorteil dieser Verfahren ist, dass die Knochen anschließend für histologische Untersuchungen zur Verfügung stehen. Die Vier-Punkt-Biegung bietet im Vergleich zur Drei-Punkt-Biegung zwar zusätzlich den Vorteil, dass sie aus biomechanischer Sicht als günstiger gilt, da die einwirkende Kraft auf eine größere Fläche verteilt wird (BURSTEIN et al., 1971). Da eine Vier-Punkt-Biegetestung aber aufgrund der geringen Größe des Mäusefemurs praktisch nicht realisierbar ist, wurde in der hier vorliegenden Arbeit das Verfahren der Drei-Punkt-Biegetestung verwendet.

Zur weiteren Beurteilung wurden die von der American Society of Bone and Mineral Research empfohlenen Methoden zur histomorphologischen Quantifizierung der Knochenfrakturheilung angewandt (PARFITT et al., 1987). Hierfür wurden sagittale longitudinale Schnitte auf Höhe des maximalen Femurdurchmessers angefertigt, um möglichst standardisierte Aussagen über Kallusdurchmesser, -fläche und -zusammensetzung treffen zu können. In Anbetracht der dreidimensionalen Kallusstruktur sind zweidimensionale histomorphologische Kallusuntersuchungen aber dennoch kritisch zu betrachten.

Aufgrund dessen wurden zur Beurteilung der dreidimensionalen Kallusstruktur zusätzlich radiologische Untersuchungen mittels eines hochauflösenden Mikro-Computertomographen durchgeführt. Um entsprechend valide Aussagen treffen zu können, wurden die von BOUXSEIN et al. und BOSEMARK et al. empfohlenen Standardparameter analysiert (BOUXSEIN et al., 2010; BOSEMARK et al., 2013).

5.2. Diskussion der Ergebnisse

In der hier vorliegenden Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass die Inhibition der 17 β -HSD2 die mechanische Stabilität eines frakturierten Knochens während der Heilung erhöht. Während die tägliche Applikation von AA115 nach zwei Wochen zu keinen biomechanischen Änderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe führte, zeigte sich nach vier Wochen eine nahezu doppelt so große relative Biegesteifigkeit der frakturierten Knochen. Die biomechanischen Untersuchungsergebnisse der lediglich mit Vehikel behandelten Tiere waren zu allen Untersuchungszeitpunkten mit anderen, in der Literatur beschriebenen Werten für C57BL/6-Mäuse vergleichbar (HISTING et al., 2016).

Eine vollständige Wiederherstellung der mechanischen Stabilität war wie zu erwarten nach 28 Tagen nicht zu verzeichnen. Wie bereits von Manigrasso und O'Connor beschrieben, die den zeitlichen Verlauf der Frakturheilung bei der Maus an einem Marknagelmodell untersuchten, findet die komplette knöcherne Konsolidierung ab der dritten bis vierten Woche statt. Ein weiterer Zugewinn an Stabilität in der sich anschließenden Phase des Remodelings ist auf den Umbau des entstandenen Geflechtknochens in lamellären Knochen zurückzuführen (MANIGRASSO et al., 2004).

Die Biegesteifigkeit stellt insbesondere unter klinischen Gesichtspunkten den bedeutendsten der hier untersuchten Parameter im Frakturheilungsprozess dar. Übertragen auf den Menschen entscheidet die biomechanische Stabilität über die Belastbarkeit des Knochens. Eine schnellere Restitution der Knochenstabilität bedingt eine frühere Belastbarkeit, geringere Schmerzen und somit eine verkürzte Phase der Immobilisation. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass diese Faktoren mit einem besseren Outcome bezüglich Mortalität, Morbidität und Lebensqualität einhergehen (OLDMEADOW et al., 2006; PEDERSEN et al., 2008; STARKS et al., 2014).

Betrachtet man in diesem Zusammenhang die Simulationsstudie von Bleiber et al. zu osteoporosebedingten Frakturen des älteren Menschen, wird weiterhin die ökonomische Bedeutung der biomechanischen Untersuchungsergebnisse deutlich (BLEIBER et al., 2013). Bleiber et al. prognostizieren aufgrund der alternden Bevölkerung Deutschlands eine stetige Zunahme osteoporosebedingter Frakturen von rund 115.000 im Jahr 2010 auf rund 273.000 im Jahr 2050. Die daraus kumulierten direkten und indirekten Kosten für das deutsche Gesundheitssystem zwischen 2010 und 2050 werden rund 88,5 Milliarden Euro betragen (BLEIBER et al., 2013). Auch wenn die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen kritisch geprüft werden muss, stellt die hier vorliegende Machbarkeitsstudie dennoch einen vielversprechenden neuen Behandlungsansatz dar, um Mortalität sowie Morbidität von Knochenbrüchen und somit auch die damit verbundenen Kosten für das Gesundheitssystem zu senken.

Die in dieser Arbeit nach 28 Tagen ermittelte erhöhte biomechanische Stabilität lässt sich wie in der histologischen Evaluation bestätigt, auf einen größeren Frakturkallus der AA115

Diskussion

behandelten Tiere zurückführen. Die Histomorphometrie zeigte nach vier Wochen eine um 61% größere periostale Kallusfläche, welche eine signifikant größere Knochenfläche beinhaltete.

Wie für die Frakturheilung der Maus bereits mehrfach beschrieben, ist nach ca. 10 bis 14 Tagen die maximale Kallusgröße erreicht (MANIGRASSO et al., 2004). Zum in Anlehnung an diese Tatsache gewählten frühen Untersuchungszeitpunkt nach 14 Tagen waren in der histologischen Untersuchung keine Unterschiede im Kallus zwischen beiden Gruppen festzustellen.

Die sich anschließende späte Phase der Frakturheilung ist durch Remodelingprozesse gekennzeichnet (EINHORN et al., 1998). Nach Aushärtung des Frakturkallus durch zunehmende Mineralisation kommt es zunächst im Zuge des Ersatzes des Geflechtknochens durch den stabileren lamellären Knochen zu einem Abbau von Bindegewebe und Knorpel und letztlich auch Knochengewebe im Kallus (EINHORN, 1998; MARSELL et al., 2011). In der histologischen Untersuchung waren Knorpel- und Bindegewebefläche der beiden untersuchten Gruppen nach vier Wochen untereinander und mit anderen in der Literatur beschriebenen Werten vergleichbar, was für einen unbeeinträchtigten Ablauf des Remodelings spricht (HISTING et al., 2012; KLEIN et al., 2015). Ein Vergleich des Knochenanteils im Kallus zeigte in der mit AA115 behandelten Gruppe in der späten Phase der Frakturheilung eine signifikant erhöhte periostale Knochenfläche bei ebenfalls signifikant größerer periostaler Kallusfläche. Dies erklärt hinreichend die festgestellte erhöhte Biegesteifigkeit in der mit AA115 behandelten Versuchsgruppe.

Diese Schlussfolgerung steht im Einklang mit den von Beil et al. dargelegten Ergebnissen, dass eine gesteigerte Knochenneubildung im Rahmen der Frakturheilung mit verbesserten biomechanischen Eigenschaften des frakturierten Knochens einhergeht (BEIL et al., 2011).

Hinsichtlich der Einordnung dieser histologischen Untersuchungsergebnisse gilt es bei der Betrachtung anderer Studien zum Frakturheilungsverlauf unter Einflussnahme durch Sexualhormone einige wesentliche Aspekte zu bedenken, die die Vergleichbarkeit stark einschränken.

Zum einen wurden in der hier vorliegenden Arbeit keine Deprivation oder systemische Substitution von Hormonen durchgeführt, wie in vergleichbaren Studien der Fall, sondern Einflüsse auf den intrazellulären Sexualhormonstoffwechsel untersucht (FRANKLE et al., 1990; GESICKI et al., 2003). Bei der Literaturrecherche fällt weiterhin auf, dass Einflüsse männlicher und weiblicher Sexualhormone auf die Frakturheilung bisher nur getrennt voneinander untersucht wurden (GESICKI et al., 2003; MAUS et al., 2008). Als wesentlichen weiteren Punkt gilt es beim Vergleich mit anderen Studien allgemein immer auch zu beachten, welche Frakturmodelle und histologischen Untersuchungsmethoden zur Anwendung kamen.

Eine Studie von Maus et al. zeigte mit der hier vorliegenden Arbeit vergleichbare Ergebnisse. Die Autoren untersuchten den Einfluss von DHT auf die Knochendefektheilung des Femurs

Diskussion

in einem Rattenmodell. Sie konnten zeigen, dass die subkutane Gabe von DHT nach drei Wochen zu einer signifikant größeren Knochenfläche führte (MAUS et al., 2008).

Auch Gesicki und Mitarbeiter konnten in einer 2003 veröffentlichten Studie eine höhere Knochenformation und eine signifikant gesteigerte biomechanische Belastbarkeit in frakturierten Mäusefemora durch Testosteron-Applikation nachweisen (GESICKI et al., 2003). Betrachtet man die Studie von Beil et al. zum Einfluss einer Östrogensubstitution auf die Frakturheilung ovariektomierter Mäuse, so scheinen die Resultate nur zum Teil mit den in der vorliegenden Studie erhobenen Daten im Einklang zu stehen (BEIL et al., 2010). Die Östrogengabe führte auch hier zu einer gesteigerten Formation mineralisierten Knochens in der späten Phase der Frakturheilung, allerdings konnten die Autoren auch einen positiven Effekt auf die Chondrogenese und damit die frühe Phase der Frakturheilung nachweisen, was sich in der vorliegenden Arbeit nicht reproduzieren lies (BEIL et al., 2010).

Zu ähnlichen Ergebnissen wie Beil et al. kamen auch Tahami und Kollegen, die sowohl die Auswirkung einer systemischen, als auch einer lokalen Östrogenapplikation auf die Heilung an Tibiaosteotomien in Kaninchen untersuchten (TAHAMI et al., 2016). Wenngleich die histologischen Unterschiede keine statistische Signifikanz aufwiesen, so konnten sie doch eine deutliche Tendenz zu einer verbesserten Mineralisation vor allem durch eine lokale Östrogengabe nachweisen.

Um weitere mögliche Ursachen der erhöhten Biegesteifigkeit AA115-behandelter Tiere zu evaluieren, wurde die Struktur des neu gebildeten Knochens innerhalb des Fraktuskallus mittels hochauflösender Computertomographie analysiert. Es zeigte sich auch in dieser Untersuchungsmethode ein, wenn auch statistisch nicht signifikant, größeres Gesamt- sowie Knochenvolumen im Kallus der mit AA115 behandelten Tiere. Vor dem Hintergrund, dass TV und BV als dreidimensionale Korrelate zur periostalen Kallus- und Knochenfläche gesehen werden können, fügen sich computertomographische und histologische Untersuchungsergebnisse somit gut zusammen.

Die Untersuchung der Knochenstruktur auf submikroskopischer Ebene zeigte dagegen keine Unterschiede, was sich in einem vergleichbaren trabekulären Aufbau sowie einem ähnlichen Mineralisierungsgrad des neu gebildeten Knochens widerspiegelte.

In Bezugnahme auf die Arbeitshypothese, dass eine 17 β -HSD2-Inhibition sowohl zu einer Testosteron vermittelten Stimulation der Knochenbildung, als auch zu einer Östrogen vermittelten Hemmung der Knochenresorption führt, wurde die Expression von OPG untersucht. OPG gilt als Marker für die Inhibition der Knochenresorption, da es als Decoy-Rezeptor für RANKL agiert, welches wiederum die Knochenresorption stimuliert (LACEY et al., 1998; YASUDA et al., 1998). Es zeigte sich eine 55% und damit signifikant höhere Expression in der Versuchsgruppe nach 14 Tagen.

Die Expressionsrate des Gegenspielers RANKL unterschied sich zum gleichen Zeitpunkt dagegen nicht, sodass der RANKL/OPG-Quotient entsprechend zugunsten des OPG

Diskussion

verschoben war. Eine Induktion des OPG durch Östrogen und die damit verbundene antiresorptive Wirkung wurde bereits beschrieben (BORD et al., 2003).

Während Androgenen ursprünglich eine rein anabole Wirkung auf den Knochen zugeschrieben wurde, konnten jüngere Untersuchungen weiterhin auch eine antiresorptive Wirkung nachweisen (PEDERSEN et al., 1999). Chen et al. konnten 2004 eine über den AR induzierte OPG-Expression durch Androgene in Mäuseosteoblasten nachweisen (CHEN et al., 2004).

Neben den Auswirkungen auf das RANKL/RANK/OPG-System wurde außerdem die Expression des osteogenen Wachstumsfaktors BMP-2 untersucht. Die maximale Expression dieses osteoinduktiven Markers wird physiologischerweise zwischen dem 14. und 20. Tag der Frakturheilung erreicht (BOSTROM et al., 1995). In der vorliegenden Studie konnte allerdings weder nach 14, noch nach 28 Tagen ein signifikanter Unterschied in der Expressionsrate zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Eine mögliche Erklärung findet sich bei Betrachtung einer Studie von Cheng und Kollegen aus dem Jahr 2013. Sie konnten zum einen zeigen, dass über Scaffolds abgegebenes Testosteron die Knochendefektheilung in Mäusefemora ebenso stimuliert wie es BMP-2 tut. Andererseits zeigten ihre Untersuchungen aber auch, dass eine Kombinationstherapie aus Testosteron und BMP-2 der Monotherapie überlegen ist (CHENG et al., 2013). Dies liegt laut Cheng et al. darin begründet, dass die Knochenregeneration von Testosteron und BMP-2 über verschiedene Mechanismen beeinflusst wird, welche bei Kombination der beiden Agenzien synergistisch wirken. Die durch 17 β -HSD2-Inhibition beobachtete verstärkte Knochenbildung könnte also über einen ähnlichen, Testosteron assoziierten und von BMP-2 unabhängigen Signalweg stattfinden.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit die Expression des angiogenen Wachstumsfaktors VEGF untersucht. VEGF stimuliert zum einen die Angiogenese während der frühen Phase der Frakturheilung, zum anderen ist es im späteren Verlauf maßgeblich an der Differenzierung von Zellen beteiligt (CARLEVARO et al., 2000; STREET et al., 2002). Für die Gabe von Östrogen konnten Pufe et al. eine gesteigerte VEGF-Expression durch Osteoblasten in vitro und in vivo nachweisen (PUFE et al., 2007). Eine Steigerung der VEGF-Expression durch die Gabe von AA115 blieb nach 14 Tagen allerdings aus, eine signifikant stärkere Expression von VEGF war nur in der späten Phase der Frakturheilung nachzuweisen. Maloney und Kollegen identifizierten Thrombozyten des Frakturhämatoms als primäre Produzenten von VEGF in der frühen Phase der Frakturheilung (MALONEY et al., 1998). Während Gnatenko et al. zwar eine Expression der Typen 3, 11 und 12 der 17 β -HSD in Thrombozyten nachweisen konnten, bleibt ein Nachweis für die Expression der 17 β -HSD2 und somit dem Target von AA115 in Thrombozyten bis dato aus (GNATENKO et al., 2005). Dies liefert einen plausiblen Erklärungsansatz für die, im Gegensatz zu AA115, unter Östrogen gesteigerte Expressionsrate von VEGF in der frühen Phase der Frakturheilung. Im weiteren Verlauf der

Diskussion

Frakturheilung wird VEGF zunehmend von reifen Osteo- und Chondroblasten gebildet und stimuliert in parakriner Wirkweise die Proliferation und Differenzierung von Fibro-, Chondro- und Osteoblasten (CARLEVARO et al., 2000). In der späten Phase der Frakturheilung scheint AA115 die VEGF-Expression durch Osteoblasten ähnlich der von Östrogenen bewirkten Stimulation zu erhöhen.

Wenngleich es in Anbetracht der hier vorliegenden Ergebnisse auch sehr unwahrscheinlich erscheint, so sollte dennoch kritisch angemerkt werden, dass auch eine noch unbekannte Funktionsweise von AA115 möglich ist. Ein Wirkmechanismus, welcher komplett von 17 β -HSD2 unabhängig ist oder die Inhibition einer bislang unbekannten und Östrogenen und Testosteron unabhängigen Funktion der 17 β -HSD2 können beispielsweise nicht komplett ausgeschlossen werden (ABDELSAMIE et al., 2019).

Wesentliche Ursache für unerwünschte Arzneimittelwirkungen insbesondere bei Hormontherapien sind systemisch auftretende Effekte (CROSNOE et al., 2013; MARCHAIS-OBERWINKLER et al., 2013). Als wichtigen Aspekt dieser Arbeit gilt es daher hervorzuheben, dass die 17 β -HSD2-Inhibition die Serumspiegel von Östrogenen und Testosteron zu keinem Untersuchungszeitpunkt beeinflusste. Dies geht mit der Arbeitshypothese konform, dass AA115 in erster Linie Änderungen der intrazellulären Konzentration dieser Hormone bedingt. Auch das Gewicht der Samenbläschen, welches als hoch sensibel für Änderungen in der Serumkonzentration von Testosteron gilt (RIVERO-MÜLLER et al., 2010), unterschied sich zwischen den mit AA115 und den Vehikel behandelten Tieren nach zwei und vier Wochen nicht. Eine Downregulation des LH sowie des Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) im Sinne eines negativen Feedbacks auf Hypothalamus und Hypophysen-Vorderlappen scheint durch AA115 somit nicht stattzufinden. Dieser Mechanismus gilt beispielsweise bei der Testosteron-Ersatztherapie als Ursache für Unfruchtbarkeit und Störungen der Spermatogenese, welche im Zuge dieser Behandlung häufig als unerwünschte Arzneimittelwirkung auftreten (CROSNOE et al., 2013).

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie erstmalig demonstriert werden, dass die Inhibition der 17 β -HSD2 durch AA115 die mechanische Stabilität frakturierter Knochen von Mäusen erhöht. Diese verbesserte Stabilität ist mit einer größeren periostalen Kallusfläche assoziiert. Im Kallus fand sich nach Behandlung mit AA115 signifikant mehr Knochengewebe. Die vermehrte Knochenbildung ist nach unseren Ergebnissen auf die verstärkte Expression von OPG in der frühen und späten Phase der Frakturheilung sowie eine zusätzlich erhöhte Expression von VEGF in der späten Phase der Frakturheilung zurückzuführen.

Die Untersuchungen erbrachten keinen Hinweis darauf, dass die selektive intrazelluläre Inhibition von 17 β -HSD2 systemische Wirkungen auf die Plasmakonzentration der Steroidhormone hervorruft.

6. Literaturverzeichnis

1. Schiebler TH, Schmidt W (1999) Anatomie. Springer, Berlin.
2. Schünke M, Schulte E, Schumacher U (2007) Prometheus LernAtlas der Anatomie: Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. Thieme, Stuttgart.
3. Welsch U (2006) Lehrbuch Histologie. Urban & Fischer, München, Jena.
4. Junqueira L, Cameiro J (2004) Histologie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
5. Boecker W, Denk H, Heitz PU (2012) Pathologie. Urban & Fischer, München, Jena.
6. Nunamaker DM (1998) Experimental models of fracture repair. Clin Orthop Relat Res 355:56-65.
7. Martin T, Gooi JH, Sims NA (2009) Molecular mechanisms in coupling of bone formation to resorption. Crit Rev Euraryot Gene Expr 19(1):73-88.
8. Einhorn TA (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop Relat Res (355 Suppl):7-21.
9. Einhorn TA (2005) The science of fracture healing. J Orthop Trauma 19 (10 Suppl):4-6.
10. Marsell R, Einhorn TA (2011) The biology of fracture healing. Injury42(6):551-555.
11. Konrads C, Giebel G (2012) Grundlagen der Frakturheilung und Bedeutung für die Osteosynthese. Chirurgische Allgemeine Zeitung 13:468-470.
12. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT (1993) A standardized experimental fracture in the mouse tibia. J Orthop Res 11:305-312.
13. Manigrasso MB, O'Connor JP (2004) Characterization of a closed femur fracture model in mice. J Orthop Trauma 18:687-695.
14. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohleman T (2007) Development of a locking femur nail for mice. J Biomech 40:215-219.
15. Holstein JH, Matthys R, Histing T, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Meier C, Pohleman T, Menger MD (2009) Development of a stable closed femoral fracture model in mice. J Surg Res 153(1):71-75.
16. Histing T, Garcia P, Matthys R, Leidinger M, Holstein JH, Kristen A, Pohleman T, Menger MD (2010) An internal locking plate to study intramembranous bone healing in a mouse femur fracture model. J Orthop Res 28:397-402.
17. McKibbin B (1978) The biology of fracture healing in long bones. J Bone Joint Surg Br 60-B(2):150-162.
18. Siewert JR, Brauer RB (2007) Basiswissen Chirurgie. Springer, Berlin.
19. Urist MR (1965) Bone: formation by autoinduction. Science 150:893-899.

Literaturverzeichnis

20. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242:1528-1534.
21. Even J, Eskander M, Kang J (2012) Bone morphogenetic protein in spine surgery: current and future uses. *J Am Acad Orthop Surg* 20:547-552.
22. Yamaguchi A, Ishizuya T, Kintou N, Wada Y, Katagiri T, Wozney JM, Rosen V, Yoshiki S (1996) Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochem Biophys Res Commun* 220:366-371.
23. Chen D, Harris MA, Rossini G, Dunstan CR, Dallas SL, Feng JQ, Mundy GR, Harris SE (1997) Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 60:283-290.
24. Ronga M, Fagetti A, Canton G, Paiusco E, Surace MF (2013) Clinical applications of growth factors in bone injuries: experience with BMPs. *Injury, Int J Care Injured* 44:1, 34-39.
25. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function . *Nature* 390:175-179
26. Kearns AE, Sundeep K, Kostenuik PJ (2008) Receptor activator of nuclear factor κ B ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocrine Reviews* 29(2):155-192.
27. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165-176.
28. Burgess T, Qian YX, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, Kelley M, Hsu H, Boyle WJ, Dunstan CR, Hu S, Lacey DL (1999) The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 145:527-538.
29. O'Brien EA, Williams J, Marshall MJ (2000) Osteoprotegerin ligand regulates osteoclast adherence to the bone surface in mouse calvaria. *Biochem Biophys Res Comm* 274:281-290.

Literaturverzeichnis

30. Lacey DL, Tan HL, Lu J, Kaufman S, Van G, Qiu W, Rattan A, Scully S, Fletcher F, Juan T, Kelley M, Burgess TL, Boyle WJ, Polverino AJ (2000) Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. *Am J Pathol* 157:435-448.
31. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H (2000) Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- κ B ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Comm* 275:768-775.
32. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan C, Kelly M, Chang MS, Luthy R, Nhuyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliot R, Colombero A, Tan HL, 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.
33. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Go- to M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K (1998) Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 139:1329-1337.
34. Caplan AI (1990) Cartilage begets bone versus endochondral myelopoiesis. *Clin Orthop Relat Res* 261:257-267.
35. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FVJ, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RAD, Filvaroff EH (2002) Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9656-9661.
36. Glowacki J (1998) Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* pp S82-89.
37. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N (1999) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5(6): 623-628.
38. Carlevaro MF, Cermelli S, Cancedda R, Descalzi Cancedda F (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci* 113: 59-69.
39. O'Loughlin PF, Morr S, Bogunovic L, Kim AD, Park B, Lane JM (2008) Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J Bone Joint Surg Am* 90:79-84.

Literaturverzeichnis

40. 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, Pohleman T, Claes L, Menger MD (2011) Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 49:591-599.
41. Herrgesell JD (1967) Aspirin poisoning in the cat. *J Am Vet Med Assoc* 151: 52-455.
42. Snow DH, Bogan JA, Douglas TA, Thompson H (1979) Phenylbutazone toxicity in ponies. *Vet Rec* 105(2):26-30.
43. Jones RD, Baynes RE, Nimitz CT (1992) Nonsteroidal anti-inflammatory drug toxicosis in dogs and cats: 240 cases (1989-1990). *J Am Vet Med Assoc* 201:475-477.
44. Cheal EJ, Mansmann KA, DiGioia AM 3rd, Hayes WC, Perren SM (1991) Role of interfragmentary strain in fracture healing: ovine model of a healing osteotomy. *J Orthop Res* 9:131-142.
45. Kirker-Head CA, Gerhart TN, Schelling SH, Hennig GE, Wang E, Holtrop ME (1995) Long-term healing of bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2. *Clin Orthop Relat Res* 318:222-230.
46. Nunamaker DM, Perren SM (1979) A radiological and histological analysis of fracture healing using prebending of compression plates. *Clin Orthop Relat Res* 138:167-174.
47. Steen H, Fjeld TO (1989) Lengthening osteotomy in the metaphysis and diaphysis. An experimental study in the ovine tibia. *Clin Orthop Relat Res* 247:297-305.
48. Schemitsch EH, Kowalski MJ, Swiontkowski MF & Senft D (1994) Cortical bone blood flow in reamed and unreamed locked intramedullary nailing: a fractured tibia model in sheep. *J Orthop Trauma* 8: 373-382.
49. Schemitsch EH, Kowalski MJ, Swiontkowski MF & Harrington RM (1995) Comparison of the effect of reamed and unreamed locked intramedullary nailing on blood flow in the callus and strength of union following fracture of the sheep tibia. *J Orthop Res* 13: 382-389.
50. Johnson AL, Stein LE (1988) Morphologic comparison of healing patterns in ethylene oxide-sterilized cortical allografts and untreated cortical autografts in the dog. *Am J Vet Res* 49:101-105.
51. Nakamura T, Hara Y, Tagawa M, Tamura M, Yuga T, Fukuda H, Nigi H (1998) Recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates fracture healing by enhancing callus remodeling in experimental dog tibial fracture. *J Bone Miner Res* 13(6):942-929.

Literaturverzeichnis

52. Adams DS, Klevjer-Anderson P, Carlson JL, Mc Guire TC, Gorham JR (1983) Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. Am J Vet Res 44(9):1670-1675.
53. Narayan O, Kennedy-Stoskopf S, Zink MC (1988) Lentivirus-host interactions: Lessons from visna and caprine arthritis-encephalitis viruses. Ann Neurol 23(Suppl):95-100.
54. Ashhurst DE, Hogg J, Perren SM (1982) A method for making reproducible experimental fractures of the rabbit tibia. Injury 14:236-42.
55. Brighton CT, Hozack WJ, Brager MD, Windsor RE, Pollack SR, Vresloovic EJ, Kotwick JE (1985) Fracture healing in the rabbit fibula when subjected to various capacitively coupled electrical fields. J Orthop Res 3:331-4.
56. Strong ML, Wong-Chung J, Babikian G, Brody A (1992) Rotational remodeling of malrotated femoral fractures: a model in the rabbit. J Pediatr Orthop 12:173-176.
57. Mills LA, Sompson AH (2012) In vivo models of bone repair. J Bone Joint Surg Br 94(7):865-874.
58. Lettin AWF (1965) The effects of axial compression on the healing of experimental fractures of the rabbit tibia. Proc R Soc Med 58:882-886.
59. Danckwardt-Lillieström G, Lorenzi GL, Olerud S (1970) Intramedullary nailing after reaming. An investigation on the healing process in osteotomized rabbit tibias. Acta Orthop Scand Suppl 134:1-78.
60. 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. J Orthop Res 3:325-30.
61. Terjesen T, Johnson E (1986) Effects of fixation stiffness on fracture healing. External fixation of tibial osteotomy in the rabbit. Acta Orthop Scand 57:146-148.
62. Han P, Cheng P, Zhang S, Zhao C, Ni J, Zhang Y, Zhong W, Hou P, Zhang X, Zheng Y, Chai Y (2015) In vitro and in vivo studies on the degradation of high-purity Mg (99.99wt.%) screw with femoral intracondylar fractured rabbit model. Biomaterials 64:57-69.
63. Aro H, Eerola E, Aho AJ (1985) Development of nonunions in the rat fibula after removal of periosteal neural mechanoreceptors. Clin Orthop Relat Res 199:292-299.
64. Thaller SR, Hoyt J, Tesluk H, Stevenson TR (1993) Mifacial fracture repair in the adult rat. Ann Plast Surg 31(1):66-71.
65. An Y, Friedman RJ, Parent T, Draughn RA (1994) Production of a Standard Closed Fracture in the Rat Tibia. J Orthop Trauma 8(2):111-115.
66. Utvåg SE, Grundnes O, Reikerås O (1994) Healing of segmental and simple fractures in rats. Acta Orthop Scand 65(5):559-563.

Literaturverzeichnis

67. Bonnarens F, Einhorn TA (1984) Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 2(1):97-101.
68. Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P (1995) An experimental model for non-union in rats. *Injury* 26(10):681-686.
69. Kaspar K, Schell H, Toben D, Matziolis G, Bail HJ (2007) An easily reproducible and biomechanically standardized model to investigate bone healing in rats, using external fixation. *Biomed Tech* 52(6):383-390.
70. Schoen M, Rotter R, Schattner S, Mittlmeier T, Claes L, Vollmar B, Gradi G (2008) Introduction of a New Interlocked Intramedullary Nailing Device for Stabilization of Critically Sized Femoral Defects in the Rat: A Combined Biomechanical and Animal Experimental Study. *J Orthop Res* 26(2):184-189.
71. Savaridas T, Wallace RJ, Muir AY, Salter DM, Simpson AH (2012) The development of a novel model of direct fracture healing in the rat. *Bone Joint Res* 1(11):289-296.
72. Jacenko O, Olsen BR (1995) Transgenic mouse models in studies of skeletal disorders. *J Rheumatol Suppl* 43:39-41.
73. Rossant J, Nagy A (1995) Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat Med* 1:592-594.
74. Ito H, Akiyama H, Shigeno C, Iyama K, Matsuoka H, Nakamura T (1999) Hedgehog signaling molecules in bone marrow cells at the initial stage of fracture repair. *Biochem Biophys Res Commun* 262:443-451.
75. 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.
76. Ohta S, Muramatsu H, Senda T, Zou K, Iwata H, Muramatsu T (1999) Midkine is expressed during repair of bone fracture and promotes chondrogenesis. *J Bone Miner Res* 14:1132-1144.
77. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (2002) Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 17:513-520.
78. Cheung KMC, Kaluarachi K, Andrew G, Lu W, Chan D, Cheah KSE (2003) An externally fixed femoral fracture model for mice. *J Orthop Res* 21:685-690.
79. Garcia P, Holstein JH, Maier S, Schaumlöel H, Al-Marrawi F, Hannig M, Pohlemann T, Menger MD (2008) Development of a reliable non-union model in mice. *J Surg Res* 147:84-91.
80. Garcia P, Holstein JH, Histing T, Burkhardt M, Culemann U, Pizanis A, Wirbel RJ, Pohlemann T, Menger MD (2008) A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: impact of stability on fracture healing. *J Biomech* 41:1689-1696.

Literaturverzeichnis

81. Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C (2004) Androgens and bone. *Endocr Rev* 25(3):389-425.
82. Kaufman JM (2006) Role of sex steroids in the regulation of bone metabolism in the adult skeleton. *Ann Endocrinol* 67(2):119-122.
83. Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG (2012) Estrogen and the skeleton. *Trends Endocrinol Metab* 23(11):576-581.
84. Maus U, Andereya S, Schmidt H, Zombory G, Gravius S, Ohnsorge JAK, C. Niedhart C (2008) Therapy Effects of Testosterone on the Recovery of Bone Defects. *Z Orthop Unfall* 146(1):59-63.
85. Beil FT, Barvencik F, Gebauer M, Seitz S, Rueger JM, Ignatius A, Pogoda P, Schinke T, Amling M (2010) Effects of estrogen on fracture healing in mice. *J Trauma* 69:1259-1265.
86. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (2007) Biochemie und Pathobiochemie. Springer, Berlin.
87. Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD (1994) Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol* 100:51-54.
88. Matsumine H, Hirato K, Yanaihara T, Tamada T, Yoshida M (1986) Aromatization by skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab* 63:717-720.
89. Brodie A, Inkster S (1993) Aromatase in the human testis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44:549-555.
90. Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P (1986) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320:134-139.
91. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5925-5930.
92. Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjold M, Gustafsson JA (1997) Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4258-4265.
93. Sims NA, Dupont S, Krust A, Clement-Lacroix P, Minet D, Resche-Rigon M, Gaillard-Kelly M, Baron R (2002) Deletion of estrogen receptors reveals a regulatory role for estrogen receptors-beta in bone remodeling in females but not in males. *Bone* 30:18-25.
94. Spiro AS, Khadem S, Jeschke A, Marshall RP, Pogoda P, Ignatius A, Amling M, Beil FT (2013) The SERM raloxifene improves diaphyseal fracture healing in mice. *J Bone Miner Metab* 31:629-636.

Literaturverzeichnis

95. Hedge V, Jo JE, Andreopoulou P, Lane JM (2016) Effect of osteoporosis medications on fracture healing. *Osteoporos Int* 27(3):861-871.
96. Blanchard O, Tsagris L, Rappaport R, Duval-Beaupere G, Corvol M (1991) Age-dependent responsiveness of rabbit and human cartilage cells to sex steroids in vitro. *J Steroid Biochem Mol* 40(4-6):711-716.
97. Ernst M, Schmid C, Froesch ER (1988) Enhanced osteoblast proliferation and collagen gene expression by estradiol, *Proc Natl Acad Sci USA* 85(7):2307-2310.
98. Bord S, Ireland DC, Beavan SR, Compston JE (2003) The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone* 32(2):136-141.
99. Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manalogas SC (1992) Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 257(5066):88-91.
100. Girasole G, Jilka RL, Passeri G, Boswell S, Boder G, Williams DC, Manalogas SC (1992) 17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest* 89(3):883-891.
101. Fiorelli G, Gori F, Petilli M, Tanini A, Bevenuti S, Serio M, Bernabei P, Brandi ML (1995) Functional estrogen receptors in a human preosteoclastic cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2672-2676.
102. García Palacios V, Robinson LJ, Borysenko CW, Lehmann T, Kalla SE, Blair HC (2005) Negative regulation of RANKL-induced osteoclastic differentiation in RAW264.7 Cells by estrogen and phytoestrogens. *J Biol Chem* 280(14):13720-13727.
103. Hughes DE, Dai A, Tiffee JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF (1996) Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med* 2(10):1132-1136.
104. Shevde NK, Pike JW (1996) Estrogen modulates the recruitment of myelopoietic cell progenitors in rat through a stromal cell-independent mechanism involving apoptosis. *Blood* 87(7):2683-2692.
105. Kameda T, Mano H, Yuasa T, Mori Y, Miyazawa K, Shiokawa M, Nakamaru Y, Hiroi E, Hiura K, Kameda A, Yang NN, Hakeda Y, Kumegawa M (1997) Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone resorbing osteoclasts. *J Exp Med* 186(4):489-495.
106. Chang CS, Kokontis J, Lia ST (1988) Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(19):7211-7215.

Literaturverzeichnis

107. Lubahn DB, Joseph DR, Sar M, Tan J, Higgs HN, Larson RE, French FS, Wilson EM (1988) The human androgen receptor: complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate. *Mol Endocrinol* 2(12):1265-1275.
108. Colvard DS, Eriksen EF, Keeting PE, Wilson EM, Lubahn DB, French FS, Riggs BL, Spelsberg TC (1989) Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:854-857.
109. Abu EO, Horner A, Kusec V, Triffitt JT, Compston JE (1997) The localization of androgen receptors in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 82(10):3493-3497.
110. Noble B, Routledge J, Stevens H, Hughes I, Jacobson W (1999) Androgen receptors in bone-forming tissue. *Horm Res* 51(1):31-36.
111. Mizuno Y, Hosoi T, Inoue S, Ikegami A, Kaneki M, Akedo Y, Nakamura T, Ouchi Y, Chang C, Orimo H (1994) Immunocytochemical identification of androgen receptor in mouse osteoclast-like multinucleated cells. *Calcif Tissue Int* 54(4):325-326.
112. Pederson L, Kremer M, Judd J, Pascoe D, Spelsberg TC, Riggs BL, Oursler MJ (1999) Androgens regulate bone resorption activity of isolated osteoclasts in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(2):505-510.
113. Bellido T, Jilka RL, Boyce BF, Girasole G, Broxmeyer H, Dalrymple SA, Murray R, Manolagas SC (1995) Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor. *J Clin Invest* 95(6):2886-2895.
114. Falahati-Nini A, Riggs BL, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Eastell R, Khosla S (2000) Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. *J Clin Invest* 106(12):1553-1560.
115. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, Han K, DiGregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Roberson PK, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC (2001) Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen and androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 104:719-730.
116. Kasperk CH, Wergedal JE, Farley JR, Linkhart TA, Turner RT, Baylink DJ (1989) Androgens directly stimulate proliferation of bone cells in vitro. *Endocrinology* 124(3):1576-1578.
117. Tarsoly E, Janossy J, Kosztura L (1979) Effect of testosterone on fracture healing in hypophysectomised rats. *Acta Histochem* 65:25-33.
118. Frankle M, Borrelli J (1990) The effects of testosterone propionate and methenolone enanthate on the healing of humeral osteotomies in the Wistar rat. *J Invest Surg* 3(2):93-113.
119. Labrie F (1991) Introcrinology. *Mol Cell Endocrinol* 78(3):C113-118.

Literaturverzeichnis

120. Labrie F, Luu-The V, Lin SX, Labrie C, Simard J, Breton R, Bélanger A (1997) The key-role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids* 62(1):148-158.
121. Luu-The V, Zhang Y, Poirier D, Labrie F (1995) Characteristics of human types 1, 2 and 3 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities: oxidation/reduction and inhibition. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55(5-6):581-587.
122. Dong Y, Qiu QQ, Debear J, Lathrop WF, Bertolini DR, Tamburini PP (1998) 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human bone cells. *J Bone Miner Res* 13(10):1539-1546.
123. Milewich L, Garcia RL, Gerrity LW (1985) 17 beta-Hydroxysteroid oxidoreductase: a ubiquitous enzyme. Interconversion of estrone and estradiol-17 beta in BALB/c mouse tissues. *Metabolism* 34(10):938-944.
124. Abdelsamie AS, Herath S, Biskupek Y, Börger C, Siebenbürger L, Salah M, Scheuer C, Marchais-Oberwinkler S, Frotscher M, Pohlemann T, Menger MD, Hartmann RW, Laschke MW, van Koppen CJ (2019) Targeted Endocrine Therapy: Design, Synthesis, and Proof-of-Principle of 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Inhibitors in Bone Fracture Healing. *J Med Chem.* [Epub ahead of print]
125. Marchais-Oberwinkler S, Henn C, Möller G, Klein T, Negri M, Oster A, Spadaro A, Werth R, Wetzel M, Xu K, Frotscher M, Hartmann RW, Adamski J (2011) 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenases (17 β -HSDs) as therapeutic targets: protein structures, functions, and recent progress in inhibitor development. *J Steroid Biochem Mol Biol* 125(1-2):66-82.
126. Miyoshi Y, Ando A, Shiba E, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S (2001) Involvement of up-regulation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in maintenance of intratumoral high estradiol levels in postmenopausal breast cancers. *Int J Cancer* 94(5):685-689.
127. Smuc T, Pucelj MR, Sinkovec J, Husen B, Thole H, Lanisnik Rizner T (2007) Expression analysis of the genes involved in estradiol and progesterone action in human ovarian endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 23(2):105-111.
128. Jansson A (2009) 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 144(1-2):64-67.
129. Abdelsamie AS, van Koppen CJ, Bey E, Salah M, Börger C, Siebenbürger L, Laschke MW, Menger MD, Frotscher M (2017) Treatment of estrogen-dependent diseases: Design, synthesis and profiling of a selective 17 β -HSD1 inhibitor with sub-nanomolar IC50 for a proof-of-principle study. *Eur J Med Chem* 127:944-957.

Literaturverzeichnis

130. Marchais-Oberwinkler S, Xu K, Wetzel M, Perspicace E, Negri M, Meyer A, Odermatt A, Möller G, Adamski J, Hartmann RW (2013) Structural optimization of 2,5-thiophene amides as highly potent and selective 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 inhibitors for the treatment of osteoporosis. *J Med Chem* 56(1):167-181.
131. Oster A, Hinsberger S, Werth R, Marchais-Oberwinkler S, Frotscher M, Hartmann RW (2010) Bicyclic substituted hydroxyphenylmethanones as novel inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1) for the treatment of estrogen-dependent diseases. *J Med Chem* 53(22):8176-8186.
132. Schmalenbach JJ (2009) Untersuchung des Einflusses einer Homocysteinämie auf die Frakturheilung an der Maus [Dissertation]. Homburg: Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes.
133. Meganck JA, Kozloff KM, Thornton MM, Broski SM, Goldstein SA (2009) Beam hardening artifacts in micro-computed tomography scanning can be reduced by X-ray beam filtration and the resulting images can be used to accurately measure BMD. *Bone* 45:1104-1116.
134. Bosemark P, Isaksson H, McDonald MM, Little DG, Tägli M (2013) Augmentation of autologous bone graft by a combination of bone morphogenic protein and bisphosphonate increased both callus volume and strength. *Acta Orthop* 84(1):106-111.
135. Hildebrand T, Rüegsegger P. (1997) A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. *J Microsc* 185:67–75.
136. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Gulberg RE, Jepsen KJ, Müller R, (2010) Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 25(7): 1468-86.
137. Burstein AH, Frankel VH (1971) A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech* 4:155-158.
138. Parfitt A, Drezner M, Glorieux F, Kanis J, Recker R. (1987) Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. *J Bone Miner Res* 2:595–610.
139. Rivero-Müller A, Chou YY, Ji I, Lajic S, Hanyaloglu AC, Jonas K, Rahman N, Ji TH, Huhtaniemi I (2010) Rescue of defective G protein-coupled receptors function in vivo by intermolecular cooperation. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(5):2319-2324.
140. Meinberg EG, Agel J, Roberts CS, Karam MD (2018) Fracture and Dislocation Classification Compendium-2018. *J Orthop Trauma* 32(1):1-170.
141. Friedman RJ, An YH, Ming J, Draughn RA & Bauer TW (1996) Influence of biomaterial surface texture on bone ingrowth in the rabbit femur. *J Orthop Res* 14: 455-464

Literaturverzeichnis

142. Claes L, Augat P, Suger G, Wilke HJ (1997) Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. *J Orthop Res* 15(4):577-584.
143. Claes L, Maurer-Klein N, Henke T, Gerngross H, Melnyk M, Augat P (2006) Moderate soft tissue trauma delays new bone formation only in the early phase of fracture healing. *J Orthop Res* 24:1178-1185.
144. Histing T, Andonyan A, Klein M, Scheuer C, Stenger D, Holstein JH (2016) Obesity does not affect the healing of femur fractures in mice. *Injury* 47:1435-1444.
145. Oldmeadow LB, Edwards ER, Kimmel LA, Kipen E, Robertson VJ, Bailey MJ (2006) No rest for the wounded: early ambulation after hip surgery accelerates recovery. *ANZ J Surg* 76(7):607-611.
146. Pedersen SJ, Borgbjerg FM, Schousboe B, Pedersen BD, Jørgensen HL, Duus BR, Lauritzen JB; Hip Fracture Group of Bispebjerg Hospital (2008) A comprehensive hip fracture program reduces complication rates and mortality. *J Am Geriatr Soc* 56(10):1831-1838.
147. Starks I, Wainwright TW, Lewis J, Lloyd J, Middleton RG (2014) Older patients have the most to gain from orthopaedic enhanced recovery programmes. *Age Ageing* 43(5):642-648.
148. Bleibler F, Konnopka A, Benzinger P, Rapp K, König HH (2013) The health burden and costs of incident fractures attributable to osteoporosis from 2010 to 2050 in Germany--a demographic simulation model. *Osteoporos Int* 24:835-847.
149. 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(6):507-514.
150. Klein M, Steiger A, Stenger D, Scheuer C, Holstein JH, Pohlemann T, Menger MD, Histing T (2015) Comparison of healing process in open osteotomy model and open fracture model: Delayed healing of osteotomies after intramedullary screw fixation. *J Orthop Res* 33(7):971-978.
151. Beil FT, Barvencik F, Gebauer M, Beil B, Pogoda P, Rueger JM, Ignatius A, Schinke T, Amling M (2011) Effects of increased bone formation on fracture healing in mice. *J Trauma* 70(4):857-62.
152. Gesicki M, Tibba J, Nguyen CK, Beil FT, Rueger JM, Haberland M, Amling M (2003) Testosterone is a Potent Accelerator of Fracture Healing: Early Structural Reconstruction and Improved Biomechanical Stability. *Osteo trauma care* 11:3-5.
153. Tahami M, Haddad B, Abtahian A, Hashemi A, Aminian A, Konan S (2016) Potential Role of Local Estrogen in Enhancement of Fracture Healing: Preclinical Study in Rabbits. *Arch Bone Jt Surg* 4(4):323-329.

Literaturverzeichnis

154. Chen Q, Kaji H, Kanatani M, Sugimoto T, Chihara K (2004) Testosterone Increases Osteoprotegerin mRNA Expression in Mouse Osteoblast Cells. *Horm Metab Res* 36(10):674-678.
155. Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, Missri AA, Tomin E, Weiland A, Doty SB, Glaser D, Rosen VM (1995) Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* 13:357-367.
156. Cheng BH, Chu TM, Chang C, Kang HY, Huang KE (2013) Testosterone delivered with a scaffold is as effective as bone morphologic protein-2 in promoting the repair of critical-size segmental defect of femoral bone in mice. *PLoS One* 8(8):e70234.
157. Pufe T, Claassen H, Scholz-Ahrens KE, Varoga D, Drescher W, Franke AT, Wruck C, Petersen W, Cellarius C, Schrezenmeir J, Glüer CC (2007) Influence of estradiol on vascular endothelial growth factor expression in bone: a study in Göttingen miniature pigs and human osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 80(3):184-191.
158. Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, Wang J, Tudor RM, Voelkel NF (1998) In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am J Physiol* 275(3):H1054-1061.
159. Gnatenko DV, Cupit LD, Huang EC, Dhundale A, Perrotta PL, Bahou WF (2005) Platelets express steroidogenic 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. Distinct profiles predict the essential thrombocythemic phenotype. *Thromb Haemost* 94(2):412-421.
160. Crosnoe LE, Grober E, Ohl D, Kim ED (2013) Exogenous testosterone: a preventable cause of male infertility. *Transl Androl Urol* 2(2):106-113.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben:

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Jörg Holstein, danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der Möglichkeiten, es zu bearbeiten.

Herrn Dr. med. Steven Herath möchte ich für seine Freundschaft, die anregenden Ideen und die sehr gute Begleitung während der Zeit als mein Betreuer, sowie für einen kleinen Einblick in seine Sicht der Medizin und des Lebens danken. Ohne seine Hilfe und Unterstützung wäre die Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Professor Dr. med. Michael D. Menger und Herrn Professor Dr. med. Matthias Laschke danke ich für die umfassende Hilfe und Beratung bei der Durchführung der Arbeit und für das großzügige Bereitstellen der Infrastruktur ihres Institutes.

Herrn Professor Dr. med. Tim Pohlemanne möchte ich mich für die Idee zum Thema und die stets kompetente Beratung bedanken.

Frau Dr. rer. nat. Claudia Scheuer, Frau Julia Parakenings und Frau Janine Becker möchte ich für die großartige Unterstützung in der Durchführung der proteinbiochemischen und histologischen Analysen danken.

Für seine vielfältige Unterstützung bin besonders Herrn Chris J. van Koppen, PhD dankbar. Er hat mir wertvolle Hilfestellungen gegeben und den Kontakt zu ElexoPharm und PharmBioTec hergestellt.

Dank gilt auch Herrn Jan Buschbaum für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der µCT-Untersuchungen und ihrer Analyse.

Frau Dr. med. vet. Monika Frings danke ich für die Unterstützung während der Tierversuche.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für klinisch-experimentelle Chirurgie für das freundliche Arbeitsklima, die erstklassige Hilfsbereitschaft und Zusammenarbeit bedanken.

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinen engen Freunden dafür, dass sie mir seit Jahren helfen, neben aller Arbeit die vielen kleinen, aber sehr wichtigen Dinge des Lebens nicht aus den Augen zu verlieren. Die Betreffenden wissen, dass sie gemeint sind.

Meinen Eltern danke ich für ihre Liebe und Unterstützung.

8. Publikationen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden wie folgt in einer internationalen Fachzeitschrift veröffentlicht:

Abdelsamie AS, Herath S, Biskupek Y, Börger C, Siebenbürger L, Salah M, Scheuer C, Marchais-Oberwinkler S, Frotscher M, Pohleman T, Menger MD, Hartmann RW, Laschke MW, van Koppen CJ. Targeted Endocrine Therapy: Design, Synthesis, and Proof-of-Principle of 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Inhibitors in Bone Fracture Healing. *J Med Chem.* 2019 Feb 14;62(3):1362-1372. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01493t

9. Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version nicht veröffentlicht.