

Aus der Klinik für Unfallchirurgie, Plastische Chirurgie und Orthopädie
(Prof. Dr. med. W. Lehmann)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Therapiemöglichkeiten zur
metaphysären Frakturheilung am
männlichen, osteoporotischen
Rattenmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Janek Nagel

aus

Bielefeld

Göttingen 2021

Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Brück
Referent/in:	PD Dr. Lukas Weiser
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. Heide Siggelkow
Drittreferent/in:	Prof. Dr. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 23.03.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel
"Therapiemöglichkeiten zur metaphysären Frakturheilung am
männlichen, osteoporotischen Rattenmodell" eigenständig
angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen
und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	8
1.1 Fragestellung	8
1.2 Osteoporose beim Mann.....	9
1.2.1 Definition und Diagnostik der Osteoporose.....	9
1.2.2 Aktuelle Therapieoptionen der Osteoporose beim Mann.....	10
1.2.2.1 Bisphosphonate	11
1.2.2.2 Teriparatid und Preotact	11
1.2.2.3 Denosumab	11
1.3 Grundlagen der Frakturheilung.....	12
1.3.1 Primäre Frakturheilung.....	12
1.3.2 Sekundäre Frakturheilung.....	12
1.3.3 Auswirkungen der Osteoporose auf die Frakturheilung.....	13
1.4 Sexualhormone und Hormonkreislauf des Mannes.....	13
1.4.1 Regelkreis der Androgene	13
1.4.2 Androgene beim alternden Mann	14
1.4.3 Der Androgen-Rezeptor (AR).....	14
1.4.4 Wirkung von Androgenen	15
1.5 Selektive Androgen-Rezeptor Modulatoren (SARMs)	16
1.5.1 Die Entwicklung und Wirkung der SARMs.....	16
1.5.2 Wirkweise und Gewebe-Spezifität der SARMs	17
1.5.2.1 Enzyme	17
1.5.2.2 Ko-Regulatoren	17
1.5.2.3 Intrazelluläre Signalwege	18
1.5.3 Enobosarm	18
1.5.4 Bisherige Forschungsergebnisse und aktueller Stand der Forschung.....	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Versuchsaufbau.....	20
2.2 Versuchstierhaltung.....	22
2.3 Peri- und intraoperatives Management	23
2.3.1 Grundlagen.....	23
2.3.2 Orchiektomie	24
2.3.3 Osteotomie und Osteosynthese	25
2.3.4 Obduktion und Präparation.....	26
2.4 Biomechanischer Test.....	27

2.4.1	Validierung.....	28
2.4.2	Parameter.....	28
2.4.3	Auswertung der Untersuchung	29
2.5	Mikro-CT-Untersuchung	29
2.6	Histologische Untersuchungen	32
2.6.1	Mikroradiographie.....	32
2.6.1.1	Herstellung histologischer Schnitte der Tibia.....	32
2.6.1.2	Digitalisierung der Mikroradiographien.....	33
2.6.1.3	Auswertung der Mikroradiographie	33
2.6.2	Polychrome Sequenzmarkierung	35
2.6.2.1	Digitalisierung der Schnittbilder.....	35
2.6.2.2	Auswertung der polychromen Sequenzmarkierung.....	36
2.7	Statistische Grundlagen der Arbeit.....	37
3	Ergebnisse.....	38
3.1	Gruppengröße, Tiergewichte und Futter-/Wirkstoffaufnahme	38
3.2	Prostatagewichte und Serumuntersuchungen.....	39
3.3	Biomechanischer Test.....	40
3.4	Mikro-CT-Untersuchung	41
3.4.1	Untersuchung des kalzifizierten Kallus.....	41
3.4.2	Untersuchung der Kortikalis	42
3.4.3	Untersuchung der Weichteile	43
3.4.4	Untersuchung der gesamten Knochenstruktur (Kallus und Kortikalis).....	43
3.4.5	<i>Bone volume fraction (BV/TV)</i>	44
3.5	Histologische Untersuchungen	45
3.5.1	Mikroradiographie.....	45
3.5.1.1	Untersuchung des Kallus	45
3.5.1.2	Untersuchung der Kortikalis	47
3.5.2	Polychrome Sequenzmarkierung	48
3.5.2.1	Calceingrün-gefärbter Kallus	48
3.5.2.2	Alizarinkomplexon-gefärbter Kallus	50
3.5.2.3	Tetracyclinhydrochlorid-gefärbter Kallus.....	53
3.5.2.4	Summierter gefärbter Kallus.....	55
4	Diskussion.....	57
4.1	Modell der Knochenheilung.....	57
4.2	Gruppengröße, Tiergewichte und Futter-/Wirkstoffaufnahme	58
4.3	Prostata-Gewichte und Serumuntersuchungen.....	59
4.4	Biomechanischer Test.....	60
4.5	Mikro-CT-Untersuchung	61
4.6	Histologische Untersuchungen	62
4.6.1	Mikroradiographie.....	62
4.6.2	Polychrome Sequenzmarkierung	63
4.7	Schlussfolgerung.....	65

5	Zusammenfassung	66
6	Anhang	68
7	Literaturverzeichnis	75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematisch vereinfachte Darstellung des Regelkreises der Androgene.....	14
Abbildung 2: Strukturformel von Enobosarm	18
Abbildung 3: Strukturformel von Testosteron	18
Abbildung 4: Übersicht über den Versuchsablauf in Form eines Zeitstrahls.....	22
Abbildung 5: Intraoperative Aufnahme des scharfen Absetzens des rechten Hodens eines Versuchstieres.....	25
Abbildung 6: Intraoperative Aufnahme der liegenden 5-Lochplatte.....	26
Abbildung 7: Röntgenabbildung des korrekten Sitzes der 5-Lochplatte am Tibiaknochen post-mortem.....	27
Abbildung 8: Positionierung der Tibia in der Prüfmaschine.....	28
Abbildung 9: Beispielhaftes Kraft-Wege-Diagramm eines Versuchsknochens mit zusätzlichen Beschriftungen.....	29
Abbildung 10: Darstellung des gescannten Knochens und des standardisierten Phantoms.....	31
Abbildung 11: Quader um den Osteotomiespalt zur Bestimmung von Kortikalis, Kallus und Weichteilgewebe.....	31
Abbildung 12: Dichte der fünf Kammern des Phantoms und die dazugehörigen Peaks auf dem Histogramm.....	31
Abbildung 13: Darstellung eines aufgenommenen Röntgenbildes, welches zur histologischen Auswertung genutzt wurde	34
Abbildung 14: Markierte Flächen des Frakturspaltes	34
Abbildung 15: Beispielhafte Vektormarkierung zur Feststellung der Kallus-Dicke.....	34
Abbildung 16: Fluoreszierende Röntgen-Aufnahme mit den Fluorochrom-gefärbten Bereichen.....	36
Abbildung 17: Nahrungsaufnahme in g pro Tag pro Tier über den gesamten Versuchszeitraum.....	39
Abbildung 18: Tiergewichte in g über den gesamten Versuchszeitraum	39
Abbildung 19: Prostatagewichte in g.....	39
Abbildung 20: Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum in U/l.....	39
Abbildung 21: Osteocalcingehalt im Serum in ng/ml.....	40
Abbildung 22: CTX-I-Gehalt im Serum in ng/ml.....	40
Abbildung 23: Maximal angewandte Kraft (F_{max}) auf den Versuchsknochen in N.....	40
Abbildung 24: Steigung (Maß für Elastizität) des linearen Anteils des Kraft-Wege-Diagramms in N/mm.....	40
Abbildung 25: Wert des Überganges der elastischen in die plastische Deformation (<i>yield load</i>) in N.....	41
Abbildung 26: Dichte des kalzifizierten Kallus im Osteotomiespalt in g/cm^3	42
Abbildung 27: Volumen des kalzifizierten Kallus im Osteotomiespalt in mm^3	42
Abbildung 28: Dichte der Kortikalis Osteotomiespalt in g/cm^3	42
Abbildung 29: Volumen der Kortikalis im Osteotomiespalt in mm^3	42
Abbildung 30: Dichte der Weichteile im Osteotomiespalt in g/cm^3	43
Abbildung 31: Volumen der Weichteile im Osteotomiespalt in mm^3	43
Abbildung 32: Dichte der Knochenbestandteile (Kortikalis und kalzifizierter Kallus) im Osteotomiespalt in g/cm^3	44
Abbildung 33: Volumen der Knochenbestandteile (Kortikalis und kalzifizierter Kallus) im Osteotomiespalt in mm^3	44
Abbildung 34: Errechnete <i>bone volume fraction</i> (BV/TV) in %	44
Abbildung 35: Anteil des ventralen Kallus in %.....	45

Abbildung 36: Anteil des dorsalen Kallus in %.....	45
Abbildung 37: Anteil des endostalen Kallus in %.....	46
Abbildung 38: Dicke des ventralen Kallus in mm	46
Abbildung 39: Dicke des dorsalen Kallus in mm.....	46
Abbildung 40: Anteil der ventralen Kortikalis distal vom Osteotomiespalt in %.....	47
Abbildung 41: Anteil der dorsalen Kortikalis distal vom Osteotomiespalt in %.....	47
Abbildung 42: Dicke der ventralen Kortikalis distal vom Osteotomiespalt in mm	47
Abbildung 43: Dicke der dorsalen Kortikalis distal vom Osteotomiespalt in mm.....	47
Abbildung 44: Markierte Fläche des ventralen Kallus mit CG-Färbung in mm ²	48
Abbildung 45: Markierte Fläche des endostalen Kallus mit CG-Färbung in mm ²	48
Abbildung 46: Markierte Fläche des dorsalen Kallus mit CG-Färbung in mm ²	49
Abbildung 47: Markierte Fläche des gesamten Kallus mit CG-Färbung in mm ²	49
Abbildung 48: Markierter Anteil der ventralen Kallusfläche mit CG-Färbung als Anteil der gesamten ventralen Kallusfläche in %.....	49
Abbildung 49: Markierter Anteil der endostalen Kallusfläche mit CG-Färbung als Anteil der gesamten endostalen Kallusfläche in %	49
Abbildung 50: Markierter Anteil der dorsalen Kallusfläche mit CG-Färbung als Anteil der gesamten dorsalen Kallusfläche in %	50
Abbildung 51: Markierte Fläche des ventralen Kallus mit AK-Färbung in mm ²	51
Abbildung 52: Markierte Fläche des endostalen Kallus mit AK-Färbung in mm ²	51
Abbildung 53: Markierte Fläche des dorsalen Kallus mit AK-Färbung in mm ²	51
Abbildung 54: Markierte Fläche des gesamten Kallus mit AK-Färbung in mm ²	51
Abbildung 55: Markierter Anteil der ventralen Kallusfläche mit AK-Färbung als Anteil der gesamten ventralen Kallusfläche in %.....	52
Abbildung 56: Markierter Anteil der endostalen Kallusfläche mit AK-Färbung als Anteil der gesamten endostalen Kallusfläche in %	52
Abbildung 57: Markierter Anteil der dorsalen Kallusfläche mit AK-Färbung als Anteil der gesamten dorsalen Kallusfläche in %	52
Abbildung 58 Markierte Fläche des ventralen Kallus mit TC-Färbung in mm ²	53
Abbildung 59: Markierte Fläche des endostalen Kallus mit TC-Färbung in mm ²	53
Abbildung 60: Markierte Fläche des dorsalen Kallus mit TC-Färbung in mm ²	53
Abbildung 61: Markierte Fläche des gesamten Kallus mit TC-Färbung in mm ²	53
Abbildung 62: Markierter Anteil der ventralen Kallusfläche mit TC-Färbung als Anteil der gesamten ventralen Kallusfläche in %.....	54
Abbildung 63: Markierter Anteil der endostalen Kallusfläche mit TC-Färbung als Anteil der gesamten endostalen Kallusfläche in %	54
Abbildung 64: Markierter Anteil der dorsalen Kallusfläche mit TC-Färbung als Anteil der gesamten dorsalen Kallusfläche in %	54
Abbildung 65: Markierte Fläche des ventralen Kallus mit Fluorochrom-Färbung in mm ²	55
Abbildung 66: Markierte Fläche des endostalen Kallus mit Fluorochrom-Färbung in mm ²	55
Abbildung 67: Markierte Fläche des dorsalen Kallus mit Fluorochrom-Färbung in mm ²	56
Abbildung 68: Markierte Fläche des gesamten Kallus mit Fluorochrom-Färbung in mm ²	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppenzuordnung der Ratten, Gruppen-Bezeichnung sowie die durchgeführten Behandlungen.....	21
Tabelle 2: Veränderung der Gruppengrößen am Versuchsende	23
Tabelle 3: Parameter des Mikro-CT.....	30
Tabelle 4: Einlage der Tibiae zur Vorbereitung der histologischen Schnitte.....	33
Tabelle 5: Erhobene Parameter der Mikroradiographie.....	35
Tabelle 6: Erhobene Parameter der mit Fluorochromen gefärbten Kallusanteile der Osteotomie-region der Tibia.....	37
Tabelle A1: Messwerte der Tiergewichte und täglichen Nahrungsaufnahme.....	68
Tabelle A2: Messwerte von Prostatagewicht und Serumuntersuchungen.....	68
Tabelle A3: Messwerte des biomechanischen Tests	68
Tabelle A4: Messwerte der Mikro-CT-Untersuchung	69
Tabelle A5: Messwerte der Mikroradiographie.....	70
Tabelle A6: Messwerte der polychromen Sequenzmarkierung mit Calceingrün.....	71
Tabelle A7: Messwerte der polychromen Sequenzmarkierung mit Alizarinkomplexon	72
Tabelle A8: Messwerte der polychromen Sequenzmarkierung mit Tetracyclinhydrochlorid	73
Tabelle A9: Messwerte der polychromen Sequenzmarkierung mit allen Fluorochromen.....	74

Abkürzungsverzeichnis

3D	Dreidimensional
AK	Alizarinkomplexon
ANOVA	Varianzanalyse
AR	Androgen-Rezeptor
B	Breite
BMD	<i>Bone mineral density</i>
CG	Calceingrün
CT	Computertomographie
DBD	DNA-bindende Domäne
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Östrogen-Rezeptor
F _{max}	Maximale Steigung
FDA	<i>Food and drug administration</i>
H	Höhe
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
KG	Körpergewicht
LBD	Ligand-bindende Domäne
LH	Lutropin
MMA	Methylmethacrylsäure
Non-ORX	Gruppe ohne Orchiektomie/Kontrollgruppe
NTD	N-terminale Domäne
ORX	Gruppe mit Orchiektomie
RANKL	<i>Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa-B-Ligand</i>
s.c.	subkutan
SARM	Selektiver Androgen-Rezeptor Modulator
SARM_Pr	Gruppe mit Orchiektomie und SARM-Prophylaxe
SARM_Th	Gruppe mit Orchiektomie und SARM-Therapie
SERM	Selektiver Östrogen-Rezeptor Modulator
T	Tiefe
TC	Tetracyclinhydrochlorid
TP	Testosteronpropionat
TP_Pr	Gruppe mit Orchiektomie und Testosteron-Prophylaxe
TP_Th	Gruppe mit Orchiektomie und Testosteron-Therapie
USD	US-Dollar
WHO	<i>World health organization</i>
ZTE	Zentrale tierexperimentelle Einrichtung

1 Einleitung

1.1 Fragestellung

Die Osteoporose als Erkrankung des Skelettsystems ist in ihrer Form schon lange bekannt, eine Erstbeschreibung erfolgte bereits 1885 durch den Pathologen Gustav Adolf Pommer. Der aktuelle demographische Wandel und die Erhöhung der durchschnittlichen Lebenserwartung der europäischen Gesellschaft sorgen für erhöhte Prävalenzen vieler Krankheits-Entitäten. Dies betrifft neben den Krebs- und kardiovaskulären Erkrankungen auch die Osteoporose (Häussler et al. 2007).

Die Osteoporose bei der postmenopausalen Frau ist dabei besonders gut erforscht, es gibt verschiedene medikamentöse Therapie-Ansätze, u. a. selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERMs). Diese lassen sich jedoch aufgrund der hormonell bedingten Nebenwirkungen nur begrenzt beim Mann einsetzen. Nach aktuellen Zahlen ist davon auszugehen, dass jeder fünfte Mann in seinem Leben eine osteoporotische Fraktur erleidet (Khosla 2010). Als Hauptursache wird hier ein altersbedingter Hypogonadismus mit abnehmender Testosteron-Produktion angenommen (Gruenewald und Matsumoto 2003). Bei Männern mit Frakturen nach inadäquaten Traumata zeigt sich bei Schenkelhalsfrakturen in 50%, bei Wirbelkörperfrakturen in 20% der Fälle ein erniedrigter Testosteronspiegel (Kudlacek et al. 2000). Durch Frakturen steigen die Mortalität und Morbidität der betroffenen Patienten, insbesondere aufgrund von Komplikationen durch Immobilität und den damit verbunden psychosozialen Einschränkungen (Mackenzie et al. 2005). Zusätzlich erschwert die vorliegende Osteoporose eine ausreichende operative Versorgung der betroffenen Knochenstrukturen (Brandi 2012). Folglich steigen die sozialmedizinischen Kosten aufgrund der länger notwendigen Versorgung und Unterstützung der Patienten in die Höhe.

Die Substitutionstherapie mit Testosteron hat bekanntermaßen positive und negative Wirkungen. Während belegt ist, dass eine Testosteron-Substitution positive Effekte auf Fettverteilung, Knochendichte und Muskelmasse des Körpers hat, so sind insbesondere die negativen Aspekte wie Hepatotoxizität und erhöhtes Prostatakarzinom-Risiko ein Problem bei der Therapie (Snyder et al. 1999; Gruenewald und Matsumoto 2003; Isidori et al. 2005) Seit einigen Jahren wird intensiv an alternativen Therapiemöglichkeiten geforscht, z. B. an selektiven Androgen-Rezeptor-Modulatoren (SARMs). Während die Therapie mit SERMs bei der Osteoporose der Frau und in der Brustkrebstherapie bereits etabliert ist, so ist der Effekt

von SARMs bis heute nicht ausreichend erforscht. Bisherige Untersuchungen am männlichen Rattenmodell haben zumindest zeigen können, dass SARMs einen Abbau der Knochenstruktur verhindern können (Gao et al. 2005). Enobosarm (Ostarine, MK-2866 oder GTx-024) ist ein nichtsteroidaler SARM, der zur Gruppe der Arylproprionamide gehört und eine Halbwertszeit von 14-21 Stunden hat (Srinath und Dobs 2014). Am weiblichen Tiermodell konnte bereits ein dosisabhängiger positiver Effekt auf die osteoporotischen Knochen und Frakturheilung nachgewiesen werden (Hoffmann et al. 2019; Komrakova et al. 2020). Klinische Studien der Phase II und III zur Untersuchung der Wirkung auf die Muskulatur konnten ebenfalls einen positiven Effekt zeigen (Dalton et al. 2011; Narayanan et al. 2018). Eine verbesserte Frakturheilung in älteren männlichen Patienten würde vermutlich zu einer Reduzierung der nach Fraktur erhöhten Morbidität und Mortalität führen. Eine klinische Zulassung für Enobosarm besteht bisher – trotz positiver Ergebnisse in klinischen Untersuchungen – nicht.

Die folgende Arbeit untersuchte die Wirkung von Enobosarm auf die Knochenheilung und verglich diese mit einer Testosteron-Behandlung. Die orchiektomierte Ratte wurde als Tiermodell für altersbedingte Osteoporose bei Männern angewendet. Als Grundlage des Experiments wurde ein etabliertes Protokoll der Abteilung zur Nachbildung einer metaphysären Fraktur gewählt (Stuermer et al. 2010; Komrakova et al. 2018), da viele osteoporotische Frakturen den metaphysären Knochen betreffen (Cheung et al. 2016). Der trabekuläre Anteil des Knochens (Spongiosa) hat einen erhöhten Stoffwechsel gegenüber dem kortikalen Knochen, so dass dieser vom beeinträchtigten Knochenstoffwechsel im Rahmen einer Osteoporose-Erkrankung stärker betroffen ist (Brandi 2009; Komrakova et al. 2018).

1.2 Osteoporose beim Mann

1.2.1 Definition und Diagnostik der Osteoporose

Während die Definition der Osteoporose analog zum weiblichen Pendant als systemischer Verlust des Knochenmineralgehaltes mit erhöhter Frakturinzidenz (Kudlacek et al. 2000) bezeichnet wird und klaren Diagnosekriterien unterliegt, so gestaltet sich die Diagnosestellung beim Mann deutlich schwieriger.

Nach der operationalen Definition der WHO von 1994 liegt eine Osteoporose vor, wenn der Mineralgehalt der Knochen in der Lendenwirbelsäule oder am proximalen Femur um $\geq 2,5$ Standardabweichungen (T-Score) vom Mittelwert einer 20-29-jährigen Frau abweicht (Kanis 1994). Die 2017 veröffentlichte Leitlinie des Dachverbandes Osteologie ergänzt

hierzu, dass ein erniedrigter T-Score alleine keine Diagnose einer Osteoporose erlaubt. Sekundäre Krankheitsentstehung und der klinische Verlauf sollten ebenfalls Einfluss in die Diagnosestellung erhalten. Weiterhin erhalten in der Leitlinie für Männer adaptierte T-Scores einen Einzug in die Diagnosekriterien der Osteoporose. Vereinfacht lässt sich sagen, dass die bekannten T-Scores der Frauen für Männer zehn Jahre später gelten. Die Empfehlung zur Basis-Diagnostik wird bei Frauen ab dem 70. und für Männer ab dem 80. Lebensjahr empfohlen. Diese beinhaltet neben der körperlichen Untersuchung und der Osteodensometrie auch verschiedene Basis-Labor-Untersuchung zum Ausschluss einer sekundären Osteoporose-Erkrankung. Erweiterte Röntgen-/CT-Bildgebungen sind nur bei klinischem Fraktur-Verdacht empfohlen. Die Ursachen der Osteoporose sind vielseitig. Neben dem hier untersuchten Mangel an Androgenen spielen viele allgemeine Faktoren (Alter, Geschlecht, Rauchen, Alkohol, Vitaminmangel usw.) eine große Rolle. Zusätzlich gibt es eine große Anzahl Erkrankungen, welche mit einer sekundären Abnahme der Knochenstrukturen einhergehen (endokrinologische, rheumatologische und auch neurologische Erkrankungen) (Leitlinie Osteoporose 2017).

1.2.2 Aktuelle Therapieoptionen der Osteoporose beim Mann

Zur Therapie der Osteoporose beim Mann sind bisher nur wenige Medikamente zugelassen. Sexualhormonelle Therapien (insbesondere auch die Testosteronsubstitution) oder Therapien mit selektiven Androgen-Rezeptor-Modulatoren finden in die aktuellen Leitlinien keinen Einzug. Neben der bekannten Basis-Therapie (Vitamin D und Calcium) sollen im Folgenden kurz die bekannten und im klinischen Alltag zugelassenen Therapieoptionen mit Bisphosphonaten, Parathormon-Analoga und Denosumab dargestellt werden. Insgesamt zeigen sich für die Medikamente sehr variable Nebenwirkungsprofile, so dass auch weiterhin an neuen Medikamenten geforscht wird. Aus diesem Grund werden neben der SARM-Forschung auch andere neue Therapieansätze untersucht. Genannt sei hier das Odanacatib als Cathepsin-K-Inhibitor (Pérez-Castrillón et al. 2010), welches bereits Phase-III-Studien durchlaufen hat. Seit Ende des Jahres 2019 ist der monoklonale Antikörper Romosozumab in Europa zugelassen, welcher über Bindung an Sclerostin für einen verminderten Knochenabbau sorgen soll (Cosman et al. 2016). Der Antikörper konnte in der Zulassungsstudie eine Überlegenheit gegenüber der alleinigen Behandlung mit Alendronat zeigen (Saag et al. 2017). Bei der Therapie ist zu beachten, dass die Diagnose der Osteoporose häufig nach abgelaufener Fraktur gestellt wird, die anti-osteoporotischen Medikamente jedoch für eine Behandlung im Rahmen einer aktuellen Fraktur keine Zulassung haben.

1.2.2.1 Bisphosphonate

Die Wirkweise von Bisphosphonaten beruht auf verschiedenen Prinzipien. Einerseits erfolgt die direkte Bindung an Hydroxylapatit und verhindert so den Abbau der Knochenstrukturen. Andererseits wirken die neueren (Amino-)Bisphosphonate durch eine deutlich erhöhte Affinität gegenüber Osteoklasten und bewirken über eine Blockierung des Mevalonat-Signalwegs eine verminderte Osteoklastenaktivität (Rogers et al. 2000).

In den USA konnte gezeigt werden, dass durch die Bisphosphonat-Therapie nach abgelauener (bagatelltraumatischer) Schenkelhalsfraktur eine Reduktion der Mortalität von fast 30% erreicht werden konnte (McClung et al. 2013). Das Nebenwirkungsprofil von Bisphosphonaten ist weitreichend. Neben kurzfristig auftretenden Nebenwirkungen wie Hypokalziämie, gastrointestinalen Beschwerden und Muskelschmerzen besteht zusätzlich die Gefahr einer Nekrose des Kieferknochens, wobei die Häufigkeit hier (bei unzureichender Datenlage) auf 1:10000 bis 1:100000 geschätzt wird (Khosla et al. 2007; Kennel und Drake 2009).

1.2.2.2 Teriparatid und Preotact

Teriparatid (PTH 1-34, Lilly-Pharma, USA) ist ein Fragment des humanen Parathormons und bewirkt eine erhöhte Anzahl von Osteoblasten bei gleichzeitiger Hemmung der Osteoblasten-Apoptose (Ebeling 2008). Hierdurch ergibt sich eine vermehrte Knochenmineralisierung. Eine Kombinations-Therapie mit Bisphosphonaten erwies sich jedoch, im Vergleich zu einer Mono-Therapie, nicht als wirksamer (Riggs 2008). Preotact (PTH 1-84, Nycomed, Schweiz) ist ein Analogon zum körpereigenen Parathormon. Auch hier konnte in Studien ein deutlich positiver Effekt auf Knochenstruktur und Frakturrate belegt werden (Clarke 2008). Zu den häufigsten Nebenwirkungen von Teriparatid, insbesondere zu Beginn der Therapie in den ersten drei bis sechs Monaten, zählen Schwindelgefühl und Muskelkrämpfe der Beine (Minisola et al. 2019). Die häufigsten Nebenwirkungen von Preotact waren Hyperkalziämie, Hyperkalziurie und Übelkeit/Erbrechen (Pleiner-Duxneuner et al. 2009).

1.2.2.3 Denosumab

Denosumab (Amgen, USA) ist ein monoklonaler Antikörper, welcher gegen das RANKL-Protein (**R**eceptor **A**ctivator of **N**uclear Factor-**K**appa-**B**-**L**igand) wirkt. RANKL wird von Osteoblasten sezerniert und bindet an seinen Rezeptor (RANK), welcher sich auf Proosteoklasten befindet. Durch die Bindung beginnt die Wandlung von Progenitorzellen zu ausgereiften Osteoklasten, welche Knochensubstanz abbauen. Durch die Bindung von Denosumab an das RANKL-Protein wird der Signalweg unterbrochen und es kommt zur verminderten Bildung von Osteoklasten (Hanley et al. 2012). Denosumab gilt als gut verträglich,

dennoch besteht neben Rücken- und Muskelschmerzen die Gefahr der Kieferknochen-Nekrose und von opportunistischen Infektionen (urogenital, gastrointestinal), wobei Letzteres nach bisherigen Studien nicht sicher belegt werden konnte (Anastasilakis 2012; Narayanan 2013).

1.3 Grundlagen der Frakturheilung

Je nach Art der Fraktur und durchgeführter operativer Reposition unterscheidet man zwei Arten der Frakturheilung, die primäre Frakturheilung und die sekundäre Frakturheilung.

1.3.1 Primäre Frakturheilung

Die primäre, oder auch direkte, Frakturheilung bezeichnet den Vorgang, dass bei optimaler Adaptation des Frakturspaltens (natürlich oder operativ) und ausreichender Fixation in entsprechender Position auf direktem Wege neuer Lamellenknochen entsteht. Es kommt im Optimalfall zu keiner oder nur wenig Kallusbildung (Lüllmann-Rauch 2009; Sobotta und Welsch 2009).

1.3.2 Sekundäre Frakturheilung

Die sekundäre, oder auch indirekte, Frakturheilung bezeichnet den Vorgang, dass sich neuer Knochen über eine temporäre Bindegewebsnarbe bildet. Es werden mehrere Stadien unterschieden.

Zu Beginn kommt es durch die Verletzung zu einer akuten Entzündungsreaktion und es erfolgt die Immigration von Mediator- und Entzündungszellen mit Ausschüttung von Zytokinen. Aufgrund der Zytokin-Ausschüttung kommt es zur Aktivierung von mesenchymalen Stammzellen sowie Osteoblasten-Aktivierung. Hier scheint insbesondere IL-6 eine tragende Rolle zu spielen (Yang et al. 2007). Im weiteren Verlauf kommt es zum knorpeligen Umbau der Frakturstelle, zur Revaskularisation und daraufhin zur Mineralisation der betroffenen Stelle. Aus weichem Kallus bildet sich harter Kallus und daraus Geflechtknochen (enchondrale Ossifikation). Abschließend erfolgt die Neumodellierung des Geflechtknochens zu Lamellenknochen (Einhorn 2005; Marsell und Einhorn 2011).

Die Phase des Umbaus vom weichen zum harten Kallus ist anfällig für Störungen. Hier spielen ausreichende Ruhe/Schonung des Frakturgebietes, mangelnde Ernährung und Begleiterkrankungen eine große Rolle und sollten beachtet werden (Szczyński 2015).

1.3.3 Auswirkungen der Osteoporose auf die Frakturheilung

Die Osteoporose ist nicht nur die Ursache der erhöhten Inzidenz von Frakturen im höheren Lebensalter, gleichzeitig läuft die Knochenheilung nach einer osteoporotischen Fraktur verzögert und eingeschränkt ab (McCann et al. 2008). Der osteoporotische Knochen reagiert anders auf mechanische Reize, so dass eine Kallus- und Knochenneubildung erst verzögert eintritt. Dieses wird durch eine verspätete Angiogenese des älteren Menschen noch verstärkt (Augat et al. 2005). Zusätzlich kommt es im gebildeten Kallus zu fehlerhaften und minderwertigen Verknüpfungen von Kollagenmolekülen (Namkung-Matthai et al. 2001). Nimmt man diese Faktoren zusammen, so erklärt sich, wieso die Knochenheilung im osteoporotischen Knochen eingeschränkt und verzögert ist, welches direkten Einfluss auf die Genesung, Immobilität und Gefahr einer erneuten Fraktur der betroffenen Personen hat.

1.4 Sexualhormone und Hormonkreislauf des Mannes

1.4.1 Regelkreis der Androgene

Im Hypothalamus wird Gonadoliberin produziert und freigesetzt (Abbildung 1). Die Ausschüttung von Gonadoliberin erfolgt pulsatil mit einem Maximum in den Morgenstunden (Horn 2009; Behrens et al. 2010). Daraufhin kommt es in der Hypophyse zur Ausschüttung von Lutropin (LH). Die Lutropin-Ausschüttung führt in den Leydig-Zellen des Hodens zu einer erhöhten Konversion von Cholesterol zu Testosteron und zur Freisetzung dessen. Darüber hinaus wird ein zusätzlicher, geringer Anteil der Androgene in der Nebennierenrinde synthetisiert.

Freies Testosteron wirkt hemmend (negative Rückkopplung) auf die Hypophyse. Eine weitere negative Rückkopplung erfolgt durch die Sertoli-Zellen des Hodens. Durch Testosteron-Stimulation bilden die Sertoli-Zellen ein Inhibin, welches hemmend auf die LH-Produktion der Hypophyse wirkt.

Zur Verbesserung der Übersicht sind die Androgen-Produktion der Nebennierenrinde und die negative Rückkopplung der Sertoli-Zellen des Hodens in Abbildung 1 nicht dargestellt.

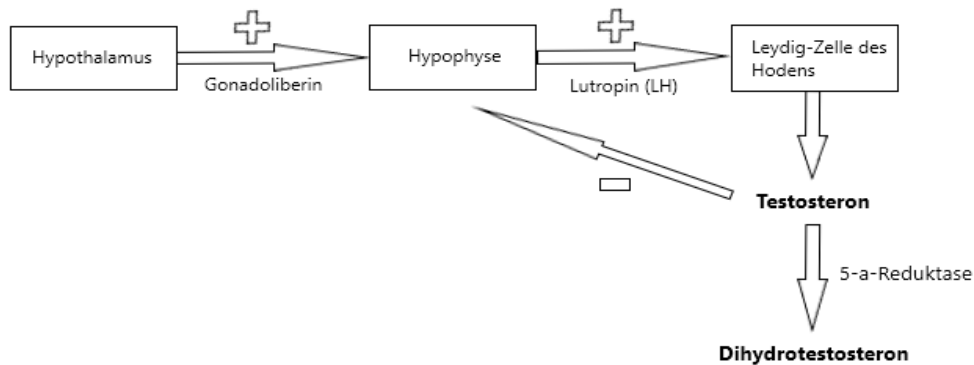


Abbildung 1: Schematisch vereinfachte Darstellung des Regelkreises der Androgene

Freies Testosteron wird in der Prostata, den Samenbläschen und Hautanhangsgebilden durch die 5- α -Reduktase in den aktiveren Metaboliten Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt. Zusätzlich erfolgt die Umwandlung des Testosterons in Östrogen. Über die Wirkungsgrade von Östrogen und Dihydrotestosteron auf den Knochenstoffwechsel gibt es unterschiedliche Meinungen. Während man früher davon ausging, dass allein durch die Umwandlung von Testosteron in Östrogen eine Wirkung auf den Knochen erfolgte, so weiß man nach aktuellem Stand der Forschung, dass beide Hormone eine Wirkung haben (Almeida et al. 2017).

1.4.2 Androgene beim alternden Mann

Im Hinblick auf den alternden Mann sind verschiedene Faktoren bekannt, die zu einer Abnahme der körpereigenen Testosteronspiegel führen (Medikamente, Erkrankungen, physiologische Alterungsprozesse). Durch hypothalamische Läsionen verändern sich die Pulsation und die Amplitude des Lutropins im höheren Alter. Parallel dazu nimmt die Menge der Leydig-Zellen des Hodens aufgrund von Störungen der Mikrozirkulation ab (Mock und Lungmayr 1999). In Studien konnte zudem gezeigt werden, dass insbesondere komorbide Patienten mit Diabetes und/oder metabolischem Syndrom erniedrigte Testosteron-Spiegel aufwiesen (Kelly und Jones 2013).

1.4.3 Der Androgen-Rezeptor (AR)

Der Androgen-Rezeptor gehört zur Klasse der nukleären Rezeptoren. Innerhalb der Zelle befindet sich der Rezeptor im Zytosol. Sobald es jedoch zu einer Bindung durch einen Liganden kommt, findet eine Konformationsänderung statt und der Rezeptor-Ligand-Komplex wandert in den Zellkern und bindet direkt an die DNA, die Transkription in mRNA

sorgt dann für die Produktion von Proteinen (Davey und Grossmann 2016). Im Körper befindet sich der Androgen-Rezeptor hauptsächlich an Gewebezellen der Prostata, der Skelettmuskeln, der Leber, des zentralen Nervensystems und in den Osteoblasten in den Knochen (Vanderschueren und Bouillon 1994). Durch Bindung eines Liganden (Testosteron, Dihydrotestosteron) erfolgt die Aktivierung und Verschiebung in den Zellkern und die Transkription von Genen, je nach betroffenem Gewebe mit unterschiedlicher Wirkung auf die Zelldifferenzierung (Gao et al. 2007).

Der Androgen-Rezeptor besteht aus drei großen Domänen. Die N-terminale Domäne (NTD), die DNA-bindende Domäne (DBD) und die Ligand-bindende Domäne (LBD). Die DBD-Domäne beinhaltet dabei zwei Zinkfinger, welche für die direkte DNA-Bindung zuständig sind (Wang et al. 2005). NTD und LBD bestimmen hierbei die Funktion, die auf Genom-Ebene durchgeführt werden soll (Davey und Grossmann 2016).

Neben dem DNA-abhängigen Weg ist auch eine nichtgenomische Wirkweise des Androgen-Rezeptors bekannt. Die Wirkweise zeichnet sich dadurch aus, dass es innerhalb von Sekunden bis Stunden zu einem Effekt kommt. Der genaue Wirkmechanismus konnte bisher nicht geklärt werden. Bezüglich des therapeutischen Einsatzes von AR-Liganden besteht hier weiterhin Forschungsbedarf, um eine *targeted therapy* entwickeln zu können (Gao et al. 2007; Davey und Grossmann 2016).

Bezüglich des Knochenstoffwechsels konnte bereits gezeigt werden, dass AR-Liganden über den DNA-unabhängigen Weg eine Apoptose von Osteoblasten verhindern können (Kousteni 2001). Zusätzlich konnte auch gezeigt werden, dass DHT die Apoptose von Osteoklasten auslösen kann (Kousteni et al. 2002). Damit wurde bereits bewiesen, dass AR-Liganden direkt in das Gleichgewicht zwischen osteoblastischer und -klastischer Aktivität eingreifen können. Ein direkter Nachweis der Wirkung von Androgen-Rezeptoren zeigte sich insbesondere bei Untersuchungen mit AR-Knockout-Mäusen (Vanderschueren et al. 2014; Wu et al. 2019)

1.4.4 Wirkung von Androgenen

Androgene haben verschiedene Wirkungen auf den menschlichen Körper. Von embryonalen Funktionen, wie der Differenzierung der Geschlechtsorgane und im Wachstumsverlauf der sekundären Geschlechtsmerkmale, Stimmbruch und Seborrhoe bis zur Spermatogenese und Erythropoese sind wir abhängig vom Testosteron. Weiterhin bestimmen die Hormone unser psychosexuelles Geschlechtsverhalten und können zu aggressiven Verhaltensauffälligkeiten

führen (Behrens et al. 2010). Effekte von Testosteron auf das muskuloskeletale System, insbesondere auf das Gleichgewicht zwischen osteoblastischer und osteoklastischer Aktivität des Menschen sind bekannt. In Studien konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Magermasse (*lean-body-mass*), die Muskelgröße und die Kraft des Körpers unter Testosteronmangel abnimmt (Finkelstein et al. 2013).

Bezüglich einer möglichen anti-osteoporotischen Therapie könnten die anabolen Effekte der Androgene hilfreich sein. Aufgrund der systemischen Wirkweise und bekannten Nebenwirkungen wie Lebertoxizität, Atherosklerose und Verhaltensauffälligkeiten bis hin zu psychiatrischen Störungen sowie Störungen der Sexualorgane bis hin zu Gynäkomastie, Azoospermie und Infertilität scheint die alleinige Testosteron-Therapie trotz belegtem Benefit für die Knochen-Mineralisierung nicht Mittel der Wahl (Maravelias et al. 2005; Tyagi et al. 2017). Zusätzlich sind kardio-vaskuläre Risiken bei älteren multimorbiden Patienten bei einer Therapie zu berücksichtigen (Grech et al. 2014). Die Entstehung von Prostatakarzinomen unter einer Testosteron-Substitution gilt als eine der gefürchtetsten Nebenwirkungen. Sichere Belege für einen Zusammenhang gibt es diesbezüglich bei fehlenden Studien mit entsprechender Aussagekraft bisher nicht (Corona et al. 2013).

1.5 Selektive Androgen-Rezeptor Modulatoren (SARMs)

1.5.1 Die Entwicklung und Wirkung der SARMs

Nichtsteroidale Androgen-Rezeptorliganden wurden bereits 1998 erstmalig beschrieben. Man erhoffte sich einen schnellen und guten therapeutischen Nutzen bezüglich männlicher Infertilitäts- und Hormonersatztherapie (Dalton et al. 1998). In den folgenden Jahren wurde intensiv geforscht. Viele Firmen entwickelten ihre eigenen SARMs (Furuya et al. 2013). Je nach chemischer Zusammensetzung der SARMs zeigten sich verschiedene Bindungsaffinitäten zum Androgen-Rezeptor (Yin 2003).

In mehreren Studien an Tiermodellen konnten verschiedene Wirkweisen der SARMs belegt werden. Hierzu gehörten ein gesteigertes Muskelwachstum und verminderter Knochenabbau (Gao et al. 2005) sowie die Möglichkeit der Verkleinerung der Prostata beim Benignen Prostata-Syndrom (Gao et al. 2004). Zusätzlich zeigten sich die SARMs in der Lage, den Androgen-Rezeptor in Muskel und Knochen zu aktivieren, während Prostata und Samenbläschen hiervon (so gut wie) unbeeinträchtigt blieben (Narayanan et al. 2018).

1.5.2 Wirkweise und Gewebe-Spezifität der SARMs

Die SARMs wirken am Androgen-Rezeptor. Der genaue molekulare Signalweg, welcher dafür sorgt, dass gewünschte Effekte (Knochen-/Muskelaufbau) auftreten und unerwünschte Effekte ausbleiben (Prostata-Hypertrophie, Virilisation), ist bis heute nicht ausreichend untersucht.

Die Gewebeselektivität von SARMs konnte mithilfe des sogenannten Hershberger-Assays belegt werden. Auf dem Assay basierend konnte gezeigt werden, dass das Gewicht des *M. levator ani* von orchietomierten und SARM-behandelten Ratten auf das Normalgewicht von *sham*-operierten Tieren anstieg, während bei Prostata und Samenbläschen keine signifikante Vergrößerung dokumentiert werden konnte (Gao et al. 2005).

Aktuell geht man davon aus, dass bei der Selektivität mindestens drei verschiedene molekulare Mechanismen eingreifen, welche teilweise auch bei den SERMs bekannt sind (Narayanan et al. 2018).

1.5.2.1 Enzyme

Bezüglich des Testosterons ist bekannt, dass in spezifischen Geweben (Prostata, Haut) die Umwandlung in Dihydrotestosteron durch die 5- α -Reduktase erfolgt, während dies z. B. in Knochen und Muskeln nicht geschieht (Gao und Dalton 2007; Narayanan et al. 2018). Man vermutet, dass es bei SARMs durch ähnliche gewebespezifische Enzyme ebenfalls zu einer Aktivierung/Deaktivierung kommt, welche die Selektivität des Wirkstoffes bedingt. Enobosarm und die meisten anderen bisher entwickelten SARMs sind jedoch nichtsteroidal, so dass eine Wirkung der bekannten Enzyme (z. B. 5- α -Reduktase) auf die Gewebe-Selektivität unwahrscheinlich erscheint.

1.5.2.2 Ko-Regulatoren

In Untersuchungen konnten bisher mehr als 200 Proteine identifiziert werden, die mit dem Androgen-Rezeptor interagieren (Heinlein und Chang 2002). Je nach Ko-Regulator kann damit eine erhöhte oder erniedrigte Aktivität des Androgen-Rezeptors ausgelöst werden (Chang und McDonnell 2002). Im Hinblick auf die SARMs geht man davon aus, dass sich in der Prostata Komplexe mit hemmenden Ko-Regulatoren bilden, welche die maximale Aktivierung des Androgen-Rezeptors verhindern, während aktivierende Ko-Regulatoren in Muskel und Knochen dies zulassen (Narayanan et al. 2018).

1.5.2.3 Intrazelluläre Signalwege

Intrazelluläre Signalwege sind abhängig von der Menge an Kinasen, Phosphatasen und der vorliegenden Menge an Wachstumsfaktoren. In Untersuchungen konnte belegt werden, dass SARMs und Dihydrotestosteron unterschiedliche Signalwege innerhalb der Zelle aktivieren und folglich unterschiedliche genomische und nichtgenomische Effekte erzielen (Narayanan et al. 2008).

1.5.3 Enobosarm

Das im Rahmen dieses tierexperimentellen Versuchs benutzte SARM Enobosarm (Ostarine, MK-2866, GTx-024) wurde von der amerikanischen Firma GCx incorporated entwickelt und es wird auch weiterhin intensiv an möglicher klinischer Nutzung geforscht (Christiansen et al. 2020). Anders als Testosteron beinhaltet Enobosarm (Abbildung 2) in seiner chemischen Struktur keine Steroid-Ringe (Abbildung 3). Eine enzymatische Umwandlung in Dihydrotestosteron findet dadurch nicht statt und ungewollte Nebenwirkungen wie Prostata-Wachstum und Virilisierung (bei der Frau) bleiben aus (Garber 2016). Enobosarm hat eine Halbwertszeit von 14-21 Stunden (Srinath und Dobs 2014). *In vivo* wird Enobosarm über das CYP3A4-System der Leber metabolisiert (Srinath und Dobs 2014). Anhand der aktuellen Datenlage besteht zusätzlich eine Interaktion mit CYP2C9, welches beim klinischen Einsatz beachtet werden sollte (Coss et al. 2016; Henkies 2020).

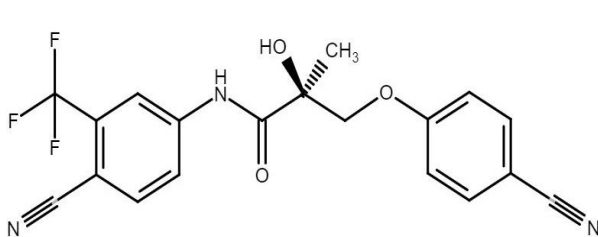


Abbildung 2: Strukturformel von Enobosarm (erstellt mit Marvin JS)

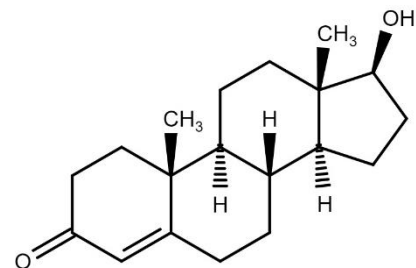


Abbildung 3: Strukturformel von Testosteron (erstellt mit Marvin JS)

1.5.4 Bisherige Forschungsergebnisse und aktueller Stand der Forschung

In verschiedenen tierexperimentellen Versuchen konnten bereits grundlegende Wirkungen von SARMs nachgewiesen werden. Für das strukturähnliche Andarine (S-4), welches in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, konnte eine schnelle und gute orale Bioverfügbarkeit auch bei niedrigen Dosierungen nachgewiesen werden (Kearbey et al. 2004). Zusätzlich konnten positive Effekte auf Muskelkraft und Knochenstabilität nachgewiesen werden (Gao et al. 2004; Gao et al. 2005). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde auch an anderen Substanzen intensiver geforscht, unter anderem an S-22 (Enobosarm).

Enobosarm wird bereits seit einigen Jahren in klinischen Studien untersucht. Hierzu gehören mehrere Phase-II-Studien zu Brustkrebs (ER-positiv und Triple-negativ) sowie Stressinkontinenz. Eine doppelblinde Phase-III-Studie zu Kachexie und Muskelschwund in Lungenkrebspatienten wurde bereits durchgeführt (Garber 2016). Eine Phase-II-Studie zu Patienten mit Sarkopenie konnte erfolgreich und mit vielversprechenden Ergebnissen abgeschlossen werden. So zeigten sich eine Erhöhung von 3 % der *Lean-Body-Mass* und eine Steigerung der Kraft beim Treppensteigen um 15 %. Insgesamt wurden wenig Nebenwirkungen/Komplikationen dokumentiert, jedoch zeigte sich eine Erniedrigung des HDL im Organismus. (Dalton et al. 2011). Diesbezüglich und vor der weiteren Forschung in Phase-III-Studien verlangte die Food and Drug Administration (FDA) weitere Studien bezüglich des kardio-vaskulären Risikoprofils von Enobosarm. Bei geschätzten Kosten von 500 Millionen USD verzichtete die GCx incorporated auf die weitere Studiendurchführung (Garber 2016). Aktuell gibt es neben den Enobosarm-Studien in verschiedenen Phasen auch weitere Phase-I und -II-Studien mit anderen selektiven Androgen-Rezeptor Modulatoren zu Osteoporose und Sarkopenie (Christiansen et al. 2020). Bis zum heutigen Tag hat jedoch kein anderes SARM die Phase III erreicht.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Die Versuchsplanung erfolgte mit männlichen, achtmonatigen Sprague Dawley Ratten. Der tierexperimentelle Teil des Versuchs wurde für 18 Wochen geplant. Zum Versuchsbeginn wurden die Tiere randomisiert in sechs Gruppen zu je 15 Tieren eingeteilt. Startpunkt des Experiments war die Durchführung einer Orchiektomie bei den 75 Tieren der Gruppen 2-6, um einen osteoporotischen Zustand zu erlangen. Gruppe 1 wurde nicht orchiektomiert. Zwölf Wochen nach der Orchiektomie fanden die Osteotomie und Osteosynthese der metaphysären Tibiae statt. Sechs Wochen nach Osteotomie und Osteosynthese wurden die Tiere obduziert und für die weiteren Untersuchungen präpariert. Je nach Gruppenzuordnung erhielten die Tiere entsprechende Wirkstoffe zur Prophylaxe und/oder Therapie der Osteoporose und zur Untersuchung bezüglich deren Wirkungen auf die Frakturheilung.

Die Substanz Enobosarm (SARM) der Firma Biochempartner wurde über einen Distributor (Hölzel Diagnostika, Köln, Deutschland) bezogen. Das Testosteronpropionat wurde von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika) bezogen. Die tägliche Zieldosis pro Tier betrug bei Enobosarm 0,4 mg/kg Körpergewicht (KG) und beim Testosteronpropionat 50 mg/kg KG.

Die Gruppe 1 (Non-ORX) erhielt weder eine Orchiektomie noch Wirkstoffe und diente somit als gesunde Kontrollgruppe. Die Gruppe 2 (ORX) erhielt eine Orchiektomie, jedoch keine Wirkstoffe und diente als osteoporotische Kontrollgruppe. Die Gruppe 3 (SARM_Th) erhielt eine Orchiektomie sowie eine 6-wöchige SARM-Behandlung nach Osteosynthese. Die Gruppe 4 (SARM_Pr) erhielt eine Orchiektomie und unmittelbar danach eine 18-wöchige SARM-Prophylaxe über den gesamten Versuchszeitraum. Die Gruppe 5 (TP_Th) erhielt eine Orchiektomie sowie eine 6-wöchige Testosteronpropionat-Behandlung nach Osteosynthese. Die Gruppe 6 (TP_Pr) erhielt eine Orchiektomie und eine 18-wöchige Testosteronpropionat-Prophylaxe (Tabelle 1, Abbildung 4). Um in den histologischen Untersuchungen mögliche Änderungen der Kinetik der Frakturheilung beurteilen zu können wurden den Tieren postoperativ am 23. Tag 10 mg/kg KG Calceingrün (Waldeck GmbH, Münster, Deutschland), am 33. Tag 30 mg/kg KG Alizarinkomplexon (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und am 43. Tag 25 mg/kg KG Tetracyclinhydrochlorid (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) subkutan verabreicht. Die Angabe der Tage bezieht sich auf den Zeitpunkt nach Durchführung der Osteotomie und -synthese.

Nach Ablauf der 18 Versuchswochen wurden die Tiere unter CO₂-Narkose enthauptet, obduziert und die Tibiae für die anstehenden Untersuchungen präpariert.

Die Genehmigung für die tierexperimentellen Untersuchungen sind unter dem Aktenzeichen 33.9-42502-04-14/1396 einzusehen.

Tabelle 1: Gruppenzuordnung der Ratten, Gruppen-Bezeichnung sowie die durchgeführten Behandlungen

Gruppennummer	Gruppenbezeichnung	Durchgeführte Behandlung
1	Non-ORX	Keine Orchiektomie Keine Wirkstoffe
2	ORX	Orchiektomie Keine Wirkstoffe
3	SARM_Th	Orchiektomie SARM-Therapie, 6 Wochen ab Osteosynthese
4	SARM_Pr	Orchiektomie SARM-Prophylaxe, 18 Wochen ab Orchiektomie
5	TP_Th	Orchiektomie Testosteronpropionat-Therapie, 6 Wochen ab Osteosynthese
6	TP_Pr	Orchiektomie Testosteronpropionat-Prophylaxe, 18 Wochen ab Orchiektomie

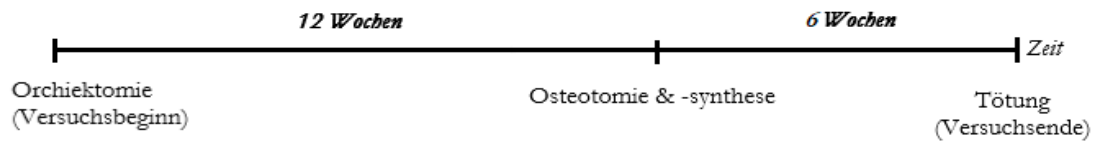


Abbildung 4: Übersicht über den Versuchsablauf in Form eines Zeitstrahls.

2.2 Versuchstierhaltung

Die 90 männlichen Versuchstiere (Ratten, Sprague Dawley, männlich, 8 Monate alt; Janvier Labs, St. Berthevin Cedex, Frankreich) wurden in 30 Käfigen zu je 3 Ratten in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen gehalten. Die Tiere erhielten pro Woche 1500 g sojafreies Futter (ssniff SM R/M, 10 mm-Pellets; ssniff Spezialitäten GmbH, Soest, Deutschland), welches nach 7 Tagen wieder auf 1500 g aufgefüllt und die Restmenge gewogen wurde. Je nach Versuchsgruppe wurden dem Futter 8,566 mg Enobosarm/kg Futter oder 1 g Testosteronpropionat/kg Futter zugemischt. Entmineralisiertes Wasser stand den Tieren während der gesamten Versuchsdauer frei zur Verfügung. In der ZTE wurde durchgehend für eine Säuberung der Käfige, angepasste Umgebungsbedingungen von 20 °C Raumtemperatur bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 % sowie für einen simulierten 12 Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus gesorgt.

Bereits vor der ersten Operation musste ein Versuchstier aufgrund des Verdachtes auf ein tumoröses Geschehen am Rücken getötet werden. Während der Durchführung der Orchiektomie starben 10 Tiere, sieben davon intraoperativ und drei im postoperativen Verlauf. Im Verlauf der Osteosynthese starben insgesamt 13 Tiere an intraoperativen Komplikationen. Nach Abschluss der Osteosynthese starben weitere 15 Tiere an einem akuten Darmverschluss. Dieses geschah unter standardisiertem und in Rücksprache mit den Tierärzten verabreichtem analgetischen Protokoll. Eine genaue Ursache ließ sich nicht sicher finden, möglicherweise bestand ein Zusammenhang mit den verabreichten Opiaten. Aufgrund der Vielzahl von intra- und postoperativen Todesfällen hat sich die initial gewählte Gruppengröße verkleinert. Die detaillierten Änderungen der Gruppengrößen können in Tabelle 2 eingesehen werden.

Tabelle 2: Veränderung der Gruppengrößen am Versuchsende

Gruppe	Ursprüngliche Anzahl der Tiere	Abschließende Anzahl der Tiere
ORX	15	12
Non-ORX	15	8
SARM_Th	15	7
SARM_Pr	15	9
TP_Th	15	5
TP_Pr	15	9

2.3 Peri- und intraoperatives Management

2.3.1 Grundlagen

Die operativen Eingriffe der Versuchstiere wurden unter Narkoseeinleitung mittels Isofluran (Forene® 250ml, AbbVie Deutschland GmbH+Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) per Inhalationen durchgeführt. Alle Tiere wurden mittels eines Mikrochips (UNO Micro ID 12 mm ISO Transponder, UNO BV, Zevenaar, Niederlande) markiert, der mit Hilfe eines Detektors (Mini Max II, Datamars SA, Bedano, Schweiz) die genaue Identifizierung der Tiere ermöglichte. Zum Schutz der Augen vor dem Austrocknen während der Narkose wurde Dexpanthenol (1 g/50 ml, Bausch & Lomb, Berlin, Deutschland) verwendet. Zur besseren Dokumentation des postoperativen Gewichtsverlustes wurde das aktuelle Gewicht der Tiere ermittelt. Zusätzlich erfolgte bei der Orchiektomie die intraperitoneale Verabreichung von 2,5 mg/kg KG Midazolam (15 mg/3 ml, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland), 80 mg/kg KG Ketamin (10 g/100 ml, MEDISTAR Arzneimittelvertrieb GmbH, Ascheberg, Deutschland) und 4 mg/kg KG Xylazin (20 mg/ml Xylarium, Riemser Arzneimittel AG, Greifswald, Deutschland). Am zweiten und dritten Operationstag wurden die Dosierungen auf 3 mg/kg KG Midazolam, 80 mg/kg KG Ketamin und 2 mg/kg KG Xylazin geändert. Aufgrund von acht vermutlich narkoseassoziierten Todesfällen wurde die Narkose auf eine Isofluran-Inhalation umgestellt. Hierunter kam es zu keinen weiteren Todesfällen.

Postoperativ erfolgte die Aufwachphase der Tiere auf einer 34 °C warmen Wärmeplatte. Einem Flüssigkeitsverlust wurde mit der subkutanen Applikation von 2 ml Natrium-Chlorid 0,9 % s.c. (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) vorgebeugt.

Zur Gewährleistung einer ausreichenden Analgesie wurde den Tieren nach der Orchiektomie am Operationstag und an den beiden folgenden Tage 5 mg/kg KG Carprofen (Rimadyl®, Zoetis Schweiz GmbH, Zürich, Schweiz) subkutan appliziert.

Peri- und postoperativ zur Osteotomie und –synthese erfolgte zusätzlich eine analgetische Therapie nach dem folgenden Protokoll: Bereits drei Tage vor der Operation wurde den Tieren Metamizol (500 mg/ml Novaminsulfon, Zentiva, Frankfurt a.M., Deutschland) mit einer Dosierung von 4 ml/1 l Trinkwasser angeboten. Dies wurde bis zum sechsten postoperativen Tag fortgeführt.

Zur ausreichenden intraoperativen Anästhesie erfolgte die intraperitoneale Gabe von 75 mg/kg KG Ketamin und 5 mg/kg KG Midazolam. Aufgrund von erneuten Todesfällen in den Versuchsgruppen wurden die Dosierungen von Ketamin und Midazolam ab dem dritten operativen Tag halbiert. Einmalig mit einem Zeitabstand von 4-6 Stunden nach Abschluss der Osteotomie-Operation erfolgte die Verabreichung von Buprenorphin 0,1 mg/kg KG s.c. (0,3 mg/ml Temgesic®, RB Pharmaceuticals Limited, Berkshire, England). Am ersten und zweiten postoperativen Tag erfolgte dreimal täglich die subkutane Applikation von Buprenorphin 0,1 mg/kg KG. Zusätzlich wurde den Tieren Futter in Form von Brei mit Metamizolwasser-Gemisch angeboten. Das Intervall der Buprenorphin-Analgesie wurde am dritten postoperativen Tag auf zweimal täglich reduziert. Ab dem vierten postoperativen Tag wurde die Dosis des Buprenorphins halbiert und ab dem sechsten postoperativen Tag sollte Buprenorphin nur noch bei Bedarf verabreicht werden. Da es ab diesem Zeitpunkt zu den vielen Tiertodesfällen kam, wurde auf jegliche weitere Analgesie verzichtet.

2.3.2 Orchiektomie

Nach der Rasur und Desinfektion (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) des Operationsgebietes erfolgte die Öffnung des Skrotalsackes auf einer Länge von ca. 8-10 mm. Der Hoden wurde freigelegt und umgebendes Fett- und Bindegewebe vorsichtig entfernt. Die versorgenden Leitungsbahnen wurden mittels Ligatur (Vicryl™ 4-0, Ethicon, Dülmen, Deutschland) abgebunden und distal davon scharf abgesetzt (Abbildung 5). Zur Reduktion von Blutungsrisiken erfolgte die Kauterisation der kleineren umgebenden Gefäße (C300 Cautery Handle, Merlin Medical, Lemgo, Deutschland). Es erfolgte der Verschluss des Peri-

toneums mithilfe von zwei bis drei Einzelknopfnähten (Vicryl™ 4-0, Ethicon). Die Bauchhaut darüber wurde mit 4.0 Prolene-Fäden (Ethicon, Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Das Operationsgebiet wurde anschließend erneut desinfiziert und es erfolgte das analoge Verfahren auf der kontralateralen Seite.



Abbildung 5: Intraoperative Aufnahme des scharfen Absetzens des rechten Hodens eines Versuchstieres.

2.3.3 Osteotomie und Osteosynthese

Zwölf Wochen nach der Orchiektomie erfolgte eine beidseitige Osteotomie sowie Osteosynthese bei den verbliebenen 79 Tieren. Dafür wurde die ventrale Seite des Unterschenkels mit einem sagittalen Schnitt eröffnet und die oberen Zweidrittel der Tibia behutsam freipräpariert. Die etwa 7 mm unterhalb des Tibiaplateaus liegende Osteotomielinie wurde markiert und eine 5-Loch-Leibinger-T-Platte (57-05140 XSTitanfixationsplatte, T-Form 90°, Stryker Trauma, Selzach, Schweiz) aufgelegt. Vier Löcher wurden in den Knochen gebohrt; zwei proximal sowie zwei distal der markierten Osteotomielinie. Nach dem Anlegen der Bohrkannäle erfolgte die eigentliche Osteotomie mithilfe einer weichteilschonenden Ultraschall-Säge (OT 7 Piezosurgery®, Mectron Medical Technology, Carasco, Italien). Analog zur Dicke des Sägeblatts von 0,5 mm ergab sich ein standardisierter Osteotomiespalt für jede Ratte. Anschließend erfolgte die vierfache Verschraubung der Platte im Knochen (Abbildung 6) (Sturmer et al. 2010). Das geschonte Muskelgewebe wurde auf der ventralen Seite des Knochens mit 4.0 Vicryl-Fäden (Ethicon, Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland) zusammengenäht; der Hautverschluss erfolgte per chirurgischer Klammerung (Michel *wound brackets* 7 x 1,75 mm, Gebrüder Martin GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland). Die Operation der kontralateralen Seite erfolgte analog. Nach abschließender Desinfektion (B. Braun

Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurden die Ratten zum Aufwachen auf eine Wärmeplatte gelegt.



Abbildung 6: Intraoperative Aufnahme der liegenden 5-Lochplatte. Auf dem Bild ist der gesetzte Frakturspalt gut zu erkennen.

2.3.4 Obduktion und Präparation

Weitere sechs Wochen nach der Osteotomie wurden die verbliebenen 50 Tiere getötet. Hierfür wurden die Tiere mit Kohlenstoffdioxid betäubt und daraufhin mithilfe einer Guillotine dekapitiert und im Anschluss obduziert. Die Tibia wurde dafür beidseitig behutsam von Femur und Fußknochen getrennt und mit dem Skalpell von Muskeln und Sehnen befreit. Die 5-Loch-Leibinger-Platte wurde zusammen mit den Schrauben entfernt. Es wurde darauf geachtet, dass die Fibula unbeschädigt bleibt. Die gesäuberten Tibiaknochen wurden anschließend mit ein wenig Salzlösung befeuchtet und bis zum Beginn der anschließenden Untersuchungen bei -20 °C gelagert. Beispielhaft sei eine Tibia mit korrektem Sitz der Platte gezeigt (Abbildung 7).

Serumanalysen von alkalischer Phosphatase (ALP), Magnesium, Kalzium und Phosphat wurden in der Abteilung für klinische Chemie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt. Der Prozess erfolgte automatisiert und nach Anweisungen des Herstellers (Architect c16000 Analyzer, Abbott, Wiesbaden, Deutschland). Osteocalcin (OC) und CTX-I wurden durch vorgefertigte Essays untersucht. (Immunodiagnostic Systems GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland).

Für weitere Untersuchungen, welche nicht im Rahmen dieser Dissertation betrachtet werden, wurden den Tieren zusätzlich Femur, Wirbelsäule, bestimmte Muskeln und Organe entnommen.

Der Verfasser dieser Arbeit hat sich am Tierversuch sowie den durchgeführten Operationen beteiligt und die folgenden Untersuchungen am Knochen (Biomechanische Testung, Mikro-CT, Histologische Untersuchungen) eigenständig durchgeführt, ausgewertet und die Ergebnisse statistisch untersucht.

2.4 Biomechanischer Test

Der biomechanische Test der beidseitig entnommenen Tibiaknochen erfolgte mit einer Werkstoffprüfmaschine (Typ 145660Z020/TND Zwick/Roell, Ulm, Deutschland) mithilfe der beiliegenden Software (testXpert®, Zwick/Roell, Ulm, Deutschland). Vor der Untersuchung wurde die Fibula vorsichtig von der Tibia getrennt und verworfen. Die Tibiae wurden mithilfe des Testgeräts auf drei Parameter untersucht und die Ergebnisse in Form eines Kraft-Weg-Diagramms dargestellt. Ausgewertet wurden dabei die maximale Kraft (F_{\max}), die Steigung als Maß für die Elastizität und der *Yield load*. Es war darauf zu achten, dass der Knochen dabei nur gebogen, aber nicht gebrochen wurde. Für die Messung wurden die Knochen auf eine speziell hergestellte Platte gelegt, sodass das dorsale Tibiaplateau unten auflag. Um den Knochen gegen seitliches Verrutschen zu schützen, wurde er mit vier Zylindern fixiert (Abbildung 8). Die Kraft wirkte durch einen Rollenstempel, der ca. 1mm oberhalb des Osteotomiespalt an der ventralen Tibiaseite angesetzt wurde. Nach initialer Krafteinwirkung von 1 Newton wurde der feste und korrekte Sitz der Tibia erneut überprüft. Daraufhin startete die eigentliche Messung, in welcher sich der Stempel mit einer fest einstellbaren Geschwindigkeit (5mm/min) senkte und alle 0,1 mm die angewandte Kraft gemessen und aufgezeichnet wurde (Stuermer et al. 2005; Stuermer et al. 2010; Weidemann 2013).



Abbildung 7: Röntgenabbildung des korrekten Sitzes der 5-Lochplatte am Tibiaknochen post-mortem.

2.4.1 Validierung

Die biomechanische Testung sollte möglichst messgenau ablaufen. Diesbezüglich erfolgten vorher das Erlernen und die Validierung der Messmethode mit Tibiaknochen, die nicht von unseren Versuchstieren stammten (Abbildung 8). Hierzu wurden insgesamt 20 Tibiae von 10 Tieren untersucht und die Ergebnisse der linken Seite mit der rechten Seite verglichen. Lagen die Abweichungen der durchgeführten Testmessungen zwischen den einzelnen Messwerten nicht über 10 %, konnte mit dem eigentlichen Versuch begonnen werden.

2.4.2 Parameter

Die Maximalkraft (F_{\max}) ist der Punkt des Graphen, nach dem es zum ersten Mal zu einer negativen Steigung und damit zu einem Abfall der Kurve kommt. F_{\max} ist definiert als der Punkt, an dem der Knochen vom Biegen zum Brechen übergehen würde.

Die Steigung der Kurve ist ein Maß für die Elastizität des Knochens. Sie errechnet sich, indem man im linearen Verlauf der Kurve die Differenz zweier Punkte errechnet.

Der *Yield load* beschreibt den Übergang der elastischen in die plastische Transformation und beschreibt einen Punkt auf der Kurve kurz bevor F_{\max} erreicht ist. Zur Bestimmung wird die Standardabweichung für den linearen Teil der Kurve bestimmt. Als *Yield load* wurde der Punkt des Graphen festgesetzt, bei dem der Abfall der Steigung die doppelte Standardabweichung erreicht (Stuermer et al. 2005).



Abbildung 8: Positionierung der Tibia in der Prüfmaschine. Die vier Zylinder halten den Knochen in Position, während der Stempel von oben die gewählte Kraft ausübt. Es handelt sich um eine nichtostotomierte Tibia aus der Validierung

2.4.3 Auswertung der Untersuchung

Die Auswertung der Untersuchung erfolgte im Hinblick auf die oben genannten Parameter anhand von erstellten Kraft-Weg-Diagrammen (Abbildung 9). Initial kommt es zu einer elastischen Deformation des Knochens, welcher sich in einer linearen Funktion widerspiegelt. Ab einem gewissen Punkt wird in der Knochenstruktur der *yield load* erreicht. Hier befindet sich der Übergangspunkt von der elastischen zur plastischen Deformation (Stuermer et al. 2014). Ab diesem Punkt befindet sich das Diagramm noch in der Steigung, verlässt jedoch den linearen Bereich. Am letzten Punkt mit positiver Steigung ist F_{\max} erreicht. Es kommt nun zur Deformierung der Knochenstruktur und zu einer negativen Steigung. Die Voreinstellung des Messprogramms sorgte an dieser Stelle (Abfall der Kurve um 2 Newton) für einen Abbruch der Messung, um eine erneute komplette Fraktur der Tibia zu vermeiden (Stuermer et al. 2005).

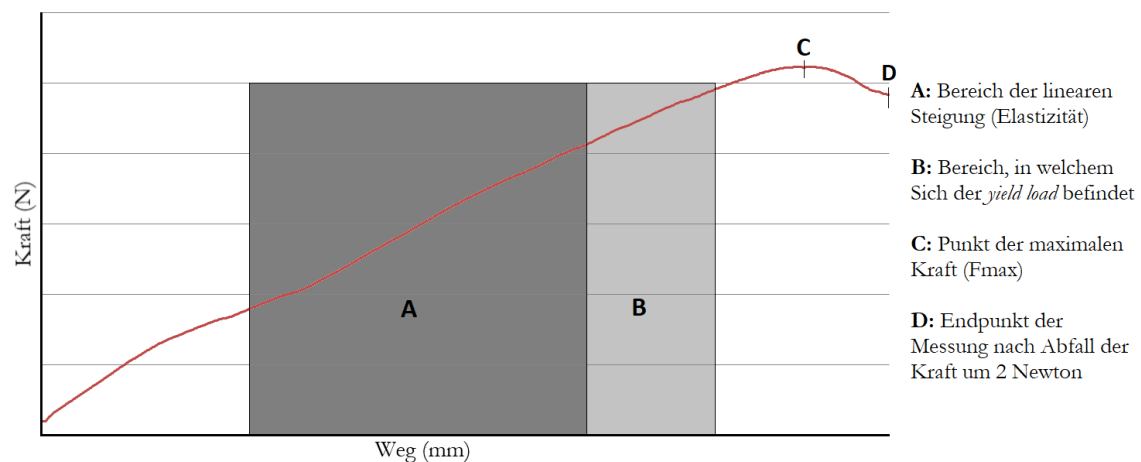


Abbildung 9: Beispielhaftes Kraft-Wege-Diagramm eines Versuchsknochens mit zusätzlichen Beschriftungen

2.5 Mikro-CT-Untersuchung

Zur weiteren Untersuchung der Knochen wurden von diesen mittels Kleintier-Mikro-CT (QuantumFX μ CT, CaliperLifeScience, Hopkinton, Massachusetts, USA) Schnittbilder angefertigt. Gleichzeitig erfolgte die Abbildung eines Dichte-Phantoms, das aus fünf Säulen mit verschiedenen und bekannten Dichten bestand. Das Bild jedes Knochens wurde mit identischen Parametern angefertigt (Tabelle 3) (Zimmermann 2018). Mithilfe der erstellten 3D-Rekonstruktionen und der abgebildeten Phantome erfolgte die weitere Auswertung mithilfe des Programms 3DOsteoAnalyzer (Schmisch et al. 2009; Hoffmann et al. 2019).

Tabelle 3: Parameter des Mikro-CT

Parameter
Röhrensorgung: 70 kVp
Stromstärke der Röhre: 200 μ A
Zeit des Scans: 2 Minuten
Field of views (FOV): 20 mm ²
Anzahl der Projektionen (360°-Scan): 3600
Scanmode: Vollrotation
Effektive "Voxel"-Größe: 40x40x40 μ m ³
Detektor-Framerate: 30 Hz
Bildmatrix: 512x512
Datenpräsentation: 16 bit

Im ersten Durchlauf der Software erfolgte die Analyse des Phantoms. Die Dichte der fünf Kammern des Phantoms waren bekannt (0,2 g/cm³, 0,4 g/cm³, 0,6 g/cm³, 0,8 g/cm³, 1 g/cm³). Mithilfe eines Grauwert-Histogramms ließ sich jede der 5 Dichtestufen einem konkreten Grauwert zuordnen (Abbildung 10, 12). Die Validität dieser Grauwerte ließen sich mithilfe einer Ausgleichsgrade feststellen. Dies ermöglichte im Verlauf die indirekte Bestimmung der Knochendichte. Die Zuordnung der Grauwerte wurde für jede einzelne Tibia wiederholt.

Im zweiten Durchlauf der Software wurde anhand der vorher erarbeiteten Grauwerte die Tibia untersucht. Hierbei wurde jedoch nur der relevante Teil um den Osteotomiespalt in einem Quader von 4,5 mm x 9 mm x 9 mm (HxBxT) betrachtet (Abbildung 11).

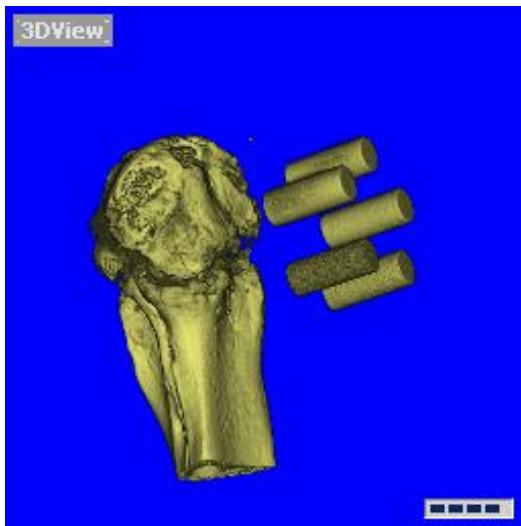


Abbildung 10: Darstellung des gescannten Knochens und des standardisierten Phantoms.

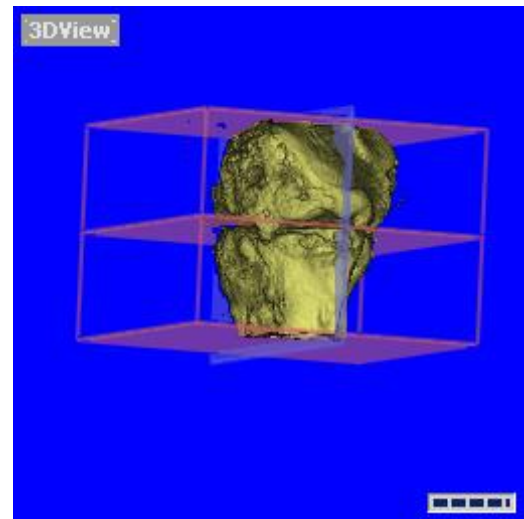


Abbildung 11: Quader um den Osteotomiespalt zur Bestimmung von Kortikalis, Kallus und Weichteilgewebe.

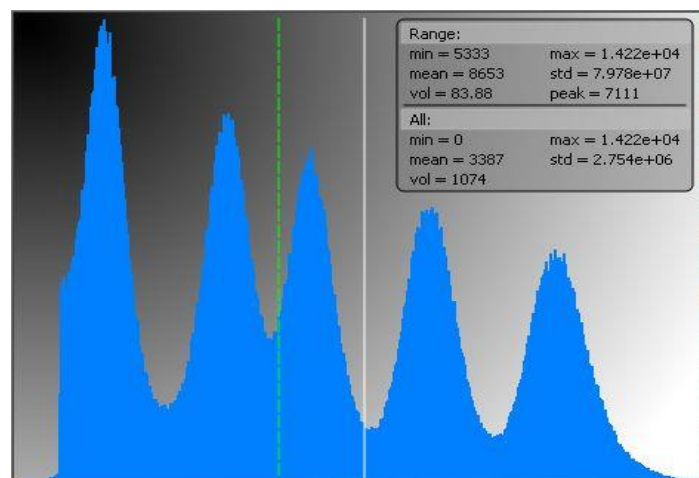


Abbildung 12: Dichte der fünf Kammern des Phantoms und die dazugehörigen Peaks auf dem Histogramm. Die X-Achse zeigt die Dichte, die Y-Achse den dazugehörigen Grauwert.

Innerhalb des ausgeschnittenen Quaders wurde nun erneut ein Grauwert-Histogramm erstellt. Auf der X-Achse stellte sich die Röntgenabschwächung und damit zunehmende Mineralisierung des Knochens dar. Auf der Y-Achse stellte sich die Anzahl der dort zu findenden Bildpunkte dar. Das Ergebnis zeigte ein nun nur noch viergipfliges Histogramm. Der erste Gipfel zeigte die initiale Röntgenabschwächung durch die Luft und wurde aus der Messung genommen. Die verbleibenden drei Spitzen des Histogramms zeigten nun von links nach rechts die Anzahl der Bildpunkte mit einer bestimmten Graustufe, ließen damit also

Rückschluss auf das Volumen und die Dichte der Knochenstruktur zu. Nach manueller Zuweisung der Peaks zu einer Gewebeart (Kallus, Kortikalis, Weichteile) auf der X-Achse wurden die berechneten Werte für drei Non-Orx und drei Orx Tiere gemittelt und diese Mittelwerte wurden für alle Versuchsknochen festgelegt.

Weiterhin wurden die Volumina und Dichte-Werte von Kortikalis, des kalzifizierten Kallus und Weichteil-Gewebe hinsichtlich eines signifikanten Unterschiedes untersucht. Es erfolgte eine Messung der Gesamtknochendichte und des -volumens (BV) (Kortikalis- und kalzifizierter Kallus zusammengefasst) und eine Messung des Gesamtvolumens (TV) des Knochens (Weichteil-, kalzifizierter Kallus- und Kortikalisvolumen zusammengefasst). BV/TV wurde mit Hilfe von Excel (Microsoft Office 2016) berechnet.

Bezüglich des detaillierten Ablaufs sei auch auf das etablierte Protokoll der Arbeitsgruppe verwiesen (Weidemann 2013; Komrakova et al. 2015; Komrakova et al. 2020).

2.6 Histologische Untersuchungen

2.6.1 Mikroradiographie

Die genaue Bemessung der Knochenbestandteile wurde mittels Mikroradiographie nach bereits im Labor etabliertem Protokoll durchgeführt (Weidemann 2013; Komrakova et al. 2015; Komrakova et al. 2020). Dies ermöglicht insbesondere die Unterscheidung von Kortikalis und Kallus der frakturierten Regionen der Tibiaknochen. Anhand von Röntgenbildern lassen sich die Anteile der beiden o. g. in Prozent, sowie die durchschnittliche Größe bzw. Dicke in Millimetern berechnen.

2.6.1.1 Herstellung histologischer Schnitte der Tibia

Zur Herstellung der histologischen Schnitte musste den Tibiae jeglicher Fett- und Wasseranteil entzogen werden. Es erfolgte das Einlegen in steigende Alkoholkonzentrationen (Tabelle 4) und im späteren Verlauf in Methylmethacrylsäure (MMA, Merck KGaA, Darmstadt Deutschland). Danach erfolgte die dreiwöchige Aushärtungsphase in einem Gemisch aus 1000 ml MMA, 200ml Dibutylphtalat (Merck KGaA, Darmstadt Deutschland) und 29 g Benzylperoxid (Merck KGaA, Darmstadt Deutschland). Nach Ablauf der drei Wochen wurden die ausgehärteten Knochen mit einer Innenlochsäge (Leica SP 1600 Sägemikroton, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) sagittal in 150 µm dicke Schichten geschnitten. Drei benachbarte Schnitte aus der Knochenmitte wurden zur weiteren Untersuchung ausgewählt (Komrakova et al. 2010)

Tabelle 4: Einlage der Tibiae zur Vorbereitung der histologischen Schnitte

Material	Dauer der Einlage
70 % Ethanol	4 Tage
80 % Ethanol	3 Tage
96 % Ethanol	8 Tage
96 % Ethanol + MMA	3 Tage
MMA	3 Tage

2.6.1.2 Digitalisierung der Mikroradiographien

Um weitere Untersuchungen durchführen zu können, war es notwendig, alle erstellten Schnitte zu digitalisieren. Hierfür erfolgte vorerst die Ablichtung der Schnitte in einem Röntgengerät (Modell-Nr. 43855A, Faxitron X-Ray system, Hewlett-Packard, San Diego, USA). Die Aufnahmen wurden mit einer Röhrenspannung von 10 kV, einer Belichtungszeit von 3 Minuten und einer Stromstärke von 0,3 mA angefertigt (Weidemann 2013; Stuermer et al. 2014; Komrakova et al. 2015; Komrakova et al. 2020).

Daraufhin erfolgte die Untersuchung der Mikroradiographien mithilfe eines Stereomakroskops (Leica MZ 7-5, Bensheim, Deutschland) und die Aufnahme mittels einer Kamera (Leica DC 300F, Bensheim, Deutschland). Es wurde dabei auf eine konstante Betriebstemperatur von 3000 K geachtet und in einem abgedunkelten Raum gearbeitet. Die Mikroradiographien wurden nachfolgend mikroskopisch inspiziert und untersucht (Abbildung 13). Mikroradiographien mit einem zu geringen oder zu hohen Kortikalis-Anteil wurden aus der Untersuchung ausgeschlossen. Die digitalisierten Bilder wurden mithilfe der Software MetaMorph (MetaMorph® Microscopy Automation & Image Analysis Software, Molecular Devices LLC, Sunnyvale, Kalifornien, USA) ausgewertet.

2.6.1.3 Auswertung der Mikroradiographie

Mithilfe des Programms MetaMorph erfolgten nun mehrere Arbeitsschritte. Im ersten Arbeitsschritt wurde zur Erkennung von Kortikalis- und Kallusbestandteilen eine Graudetektion durchgeführt. Nachdem mit einer Hilfslinie durch den Osteotomiespalt ein genormter Messrahmen von 5 mm Höhe über das Bild gelegt wurde, führte das Programm die Graudetektion automatisch durch und markierte jegliche als Knochen erkannten Strukturen. Eine Nachjustierung durch den Anwender war möglich.

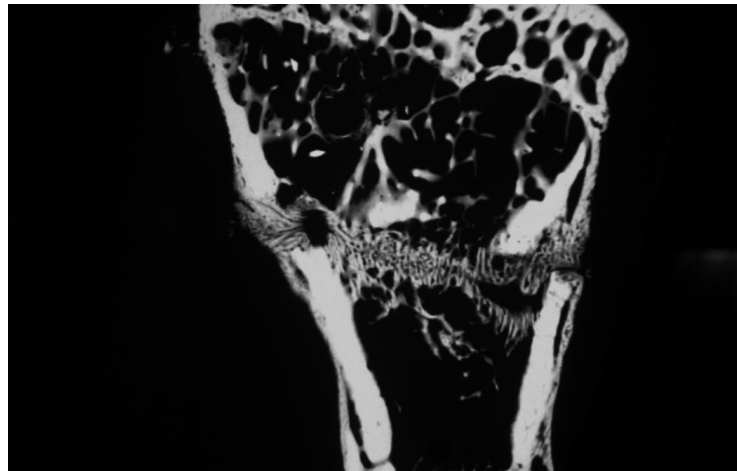


Abbildung 13: Darstellung eines aufgenommenen Röntgenbildes, welches zur histologischen Auswertung genutzt wurde

Im zweiten Arbeitsschritt ging es um die Markierung der einzelnen Knochenbestandteile. Unterschieden wurde dabei in Kortikalis- und Kallusbestandteile sowie die dazugehörige topographische Zuordnung (Tabelle 5). Flächenhafte Anteile (in Prozent angegeben) wurden dabei mithilfe eines Grafik-Pads umrandet (Abbildung 14). Die Angabe in Prozent gibt den Anteil des kalzifizierten Knochenareals von der gesamten Knochenfläche wieder (Komrakova et al. 2020). Die Dicke (in Millimeter angegeben) wurde mittels einzuzeichnender Vektoren berechnet (Abbildung 15). Zur Minimierung der Fehleranfälligkeit erfolgte der Ablauf in von der Software vorgegebener Reihenfolge (Stuermer et al. 2009; Weidemann 2013).

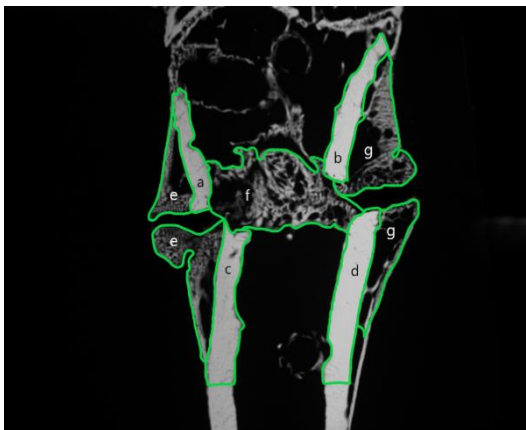


Abbildung 14: Markierte Flächen des Frakturspaltes; a: ventrale, proximale Kortikalis, b: dorsale, proximale Kortikalis, c: ventrale, distale Kortikalis, d: dorsale, distale Kortikalis, e: ventraler Kallus, f: endostaler Kallus, g: dorsaler Kallus

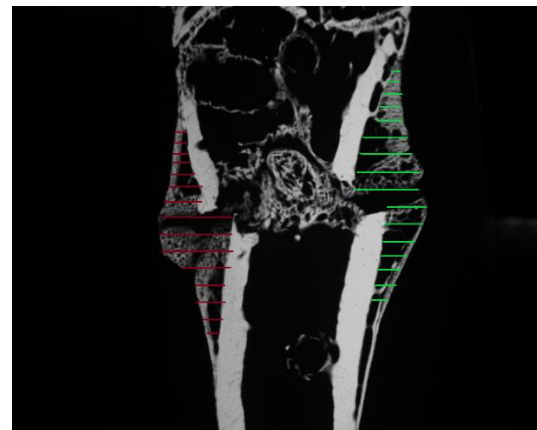


Abbildung 15: Beispielhafte Vektormarkierung zur Feststellung der Kallus-Dicke; Rot= ventral, Grün=dorsal

Tabelle 5: Erhobene Parameter der Mikroradiographie

Parameter und Einheit:	Input (Buchstaben analog zu Abb. 14):
Kallusanteil endostal (%)	Umrandeter Bereich des endostalen Kallus (f)
Kallusanteil dorsal (%)	Umrandeter Bereich des dorsalen Kallus (g)
Kallusanteil ventral (%)	Umrandeter Bereich des ventralen Kallus (e)
Kortikalisanteil dorsal und distal (%)	Umrandeter Bereich der dorsalen Kortikalis; nur distal der Osteotomielinie (d)
Kortikalisanteil ventral und distal (%)	Umrandeter Bereich der ventralen Kortikalis; nur distal der Osteotomielinie (c)
Kallusdicke dorsal (mm)	Arimethrisches Mittel der Vektoren über dem dorsalen Kallus
Kallusdicke ventral (mm)	Arimethrisches Mittel der Vektoren über dem ventralen Kallus
Kortikalisdicke dorsal und distal (mm)	Arimethrisches Mittel der fünf Vektoren über der dorsalen Kortikalis; nur distal der Osteotomielinie
Kortikalisdicke ventral und distal (mm)	Arimethrisches Mittel der fünf Vektoren über der ventralen Kortikalis; nur distal der Osteotomielinie
Knochendurchmesser proximal (mm)	Arimethrisches Mittel der Vektoren über dem gesamten proximalen Knochen
Knochendurchmesser distal (mm)	Arimethrisches Mittel der Vektoren über dem gesamten distalen Knochen

Da es sich um eine sehr anwenderabhängige Untersuchung handelt, erfolgte eine Validierung mit zufällig ausgewählten Knochenschnitten des Versuches, in welcher die Ergebnisse keine Abweichung $>10\%$ vom Mittelwert haben durften. Alle Bilder wurden vom selben Benutzer untersucht und in randomisierter Reihenfolge betrachtet.

2.6.2 Polychrome Sequenzmarkierung

Die polychrome Sequenzmarkierung dient der farblichen Darstellung der zeitlichen Abfolge der Frakturheilung. Die verschiedenen Fluorochrome haben gemeinsam, dass sie *in vivo* an Kalzium-Ionen binden und sich dementsprechend in Bereichen mit Aktivität im Knochenstoffwechsel anreichern. Durch zeitlich versetzte *in vivo* Applikation von drei Fluorochromen lässt sich so der dynamische Prozess der Frakturheilung sichtbar machen und messen.

2.6.2.1 Digitalisierung der Schnittbilder

Mithilfe eines Leica Auflicht-Fluoreszenz-Stereomakroskops (Leica MZ 7-5; mit FluoCombi III, Bensheim, Deutschland) und einer Quecksilber-Höchstdruck-Lampe (100 W) wurden

analog zum Vorgehen bei der Mikroradiographie (Vgl. 2.4.3.1 und 2.4.3.2) die Schnitte in digitaler Form auf dem Computer gespeichert. Durch Blaulicht und einen Anregungsfilter (450-490 nm) wurden die vorab applizierten Fluorochrome angeregt. Die Belichtungszeit wurde je nach Schichtdicke zwischen acht und zwölf Sekunden eingestellt. Mit diesen Einstellungen zeigten sich folgende Fluoreszenzen im digitalisierten Bild (Abbildung 16): Calceingrün (CG) → Grün, Alizarinkomplexon (AK) → Rot, Tetracyclinhydrochlorid (TC) → gelb (Komrakova et al. 2010).

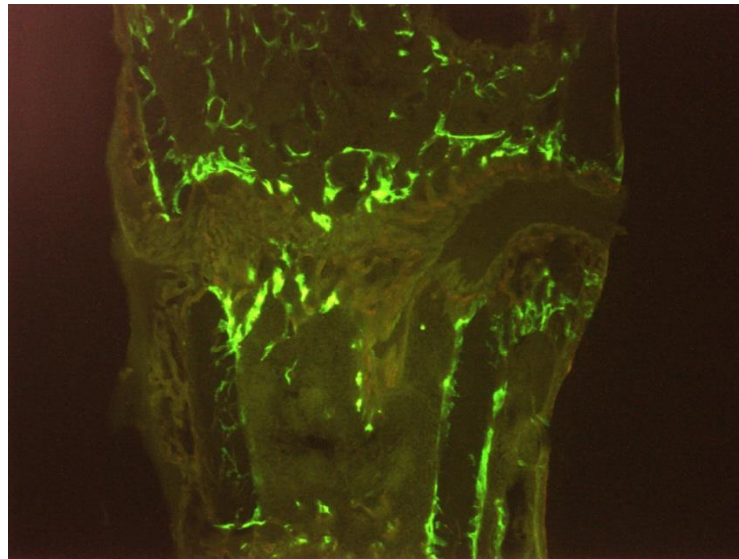


Abbildung 16: Fluoreszierende Röntgen-Aufnahme mit den Fluorochrom-gefärbten Bereichen.
Grün = Calceingrün, Rot = Alizarinkomplexon, Gelb = Tetracyclinhydrochlorid

2.6.2.2 Auswertung der polychromen Sequenzmarkierung

Zur Ermittlung der Anteile und Flächen der gefärbten Bereiche des Frakturspaltes und damit der zeitlichen Einordnung erfolgte analog zur Mikroradiographie die Untersuchung mithilfe der MetaMorph®-Software. Ähnlich der Mikroradiographie erfolgte zuerst die Definition der verschiedenen Areale mithilfe eines Grafikpads. Analog zur Mikroradiographie erfolgte dies mithilfe eines vom Programm bereit gestellten Messrahmens. Hierfür wurde als erstes die gesamte Knochenmasse definiert und daraufhin die Kortikalis umzeichnet und herausgerechnet. Die überbleibende Knochenstruktur nahe des Frakturspaltes wurde somit durch Ausschluss als Kallus definiert. Abschließend wurden dann die gefärbten Areale einzeln mit dem Grafikpad umrandet und die Flächen durch das Programm automatisch in eine Datenbank integriert. Mit den erhobenen Daten konnte die weitere statistische Auswertung fortgeführt werden (Komrakova et al. 2011; Weidemann 2013; Komrakova et al. 2015; Komrakova et al. 2020). Hierbei wurden zum einen die absoluten Flächenwerte in mm^2 und zum anderen der prozentuale Anteil der Markierung als Anteil des Gesamten berechnet, z. B. der

Anteil des dorsalen Kallus mit CG-Färbung als Anteil des gesamten dorsalen Kallus in % (Tabelle 6).

Tabelle 6: Erhobene Parameter der mit Fluorochromen gefärbten Kallusanteile der Osteotomie-region der Tibia

Parameter und Einheit	Unterteilung
Kallusfläche in mm ²	Ventral/endostal/dorsal/gesamt
Fläche (CG) in mm ²	Ventral/endostal/dorsal/gesamt
Fläche (AK) in mm ²	Ventral/endostal/dorsal/gesamt
Fläche (TC) in mm ²	Ventral/endostal/dorsal/gesamt
Anteil (CG) in %	Ventral/endostal/dorsal
Anteil (AK) in %	Ventral/endostal/dorsal
Anteil (TC) in %	Ventral/endostal/dorsal

2.7 Statistische Grundlagen der Arbeit

Die statistischen Untersuchungen der Arbeit wurden mithilfe der GraphPad Prism Software (Version 5, März 2007, GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt. Hierbei erfolgte im ersten Schritt eine Berechnung des Mittelwerts und des Standardfehlers in den sechs Versuchsgruppen. Im zweiten Schritt und zur Detektion von Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen wurden der „one-way ANOVA“ und der „Turkey-Kramer post-hoc“ Test angewandt. Das Signifikanzniveau wurde bei einem p-Wert $\alpha \leq 0,05$ festgelegt.

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen werden als Mittelwerte (*mean*) mit Standardfehler (*SEM*) präsentiert, Signifikanzen sind mittels Sternchen und Buchstaben gekennzeichnet. Das Sternchen gibt hierbei das bestehende Signifikanzniveau an, der Buchstabe beschreibt, zu welcher anderen Gruppe/zu welchen anderen Gruppen der signifikante Unterschied besteht. Zusätzlich werden die Daten der Untersuchungen im Anhang in tabellarischer Form dargestellt. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: Ein Sternchen bedeutet $p < 0,05$, zwei Sternchen bedeutet $p < 0,01$, drei Sternchen bedeutet $p < 0,001$. Statistische Signifikanzen wurden mittels Buchstaben wie folgt gekennzeichnet: a bedeutet eine Signifikanz zu Non-ORX, b bedeutet eine Signifikanz zu ORX, c bedeutet eine Signifikanz zu SARM_Th, d bedeutet eine Signifikanz zu SARM_Pr, e bedeutet eine Signifikanz zu TP_Th und f bedeutet eine Signifikanz zu TP_Pr.

3 Ergebnisse

3.1 Gruppengröße, Tiergewichte und Futter-/Wirkstoffaufnahme

Nahrungsaufnahme und Gewichte der Ratten wurden über den gesamten Versuchszeitraum wöchentlich erfasst und dokumentiert. In Woche 14 erfolgte aufgrund der postoperativen Nebenwirkungen der analgetischen Medikation keine Messung der Nahrungsaufnahme. Bereits während der Orchiektomie verstarben 10 Tiere. Weitere 13 Tiere verstarben im Rahmen der Osteotomie. Im postoperativen Verlauf verstarben weitere 15 Tiere unter dem Verdacht auf einen Darmverschluss unter analgetischer Therapie mit Opi-aten. Nach Abzug aller verstorbenen Tiere verkleinerten sich leider die Gruppen. Die kleinste Gruppe (TP-Th) hatte zum Ende des Versuches nur noch 5 Tiere.

In der Menge der Nahrungsaufnahme der Tiere zeigte sich gemittelt über den gesamten Versuchszeitraum kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 17).

Anhand der ermittelten täglichen durchschnittlichen Nahrungsaufnahme lässt sich auch die tägliche Wirkstoffaufnahme berechnen. Hier ergaben sich eine Enobosarm-Aufnahme von $0,35 \pm 0,06 \text{ mg/kg KG}$, für Testosteronpropionat von $41 \pm 8 \text{ mg/kg KG}$.

Hinsichtlich des Körpergewichts zeigten sich nach Berechnung der Mittelwerte über den gesamten Versuchszeitraum Signifikanzen zwischen allen orchiektomierten und nichtorchiektomierten Tieren (Abbildung 18). Alle Gruppen hatten gegenüber der Kontrollgruppe (Non-ORX) ein signifikant reduziertes Körpergewicht. Zwischen diesen fünf Gruppen zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf den Gewichtsverlust.

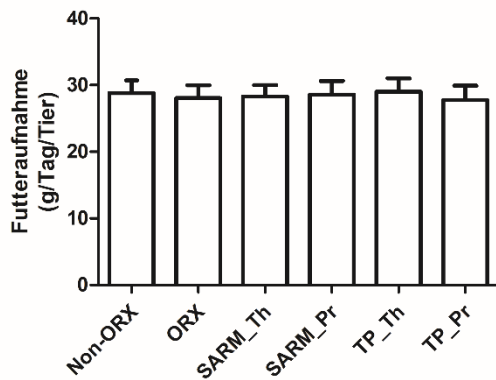


Abbildung 17: Nahrungsaufnahme in g pro Tag pro Tier über den gesamten Versuchszeitraum (*mean* + *SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

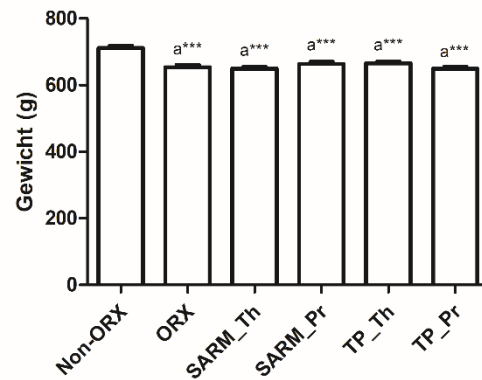


Abbildung 18: Tiergewichte in g über den gesamten Versuchszeitraum (*mean* + *SEM*); a = signifikant zu Non-ORX; *** = $p < 0,001$

3.2 Prostatagewichte und Serumuntersuchungen

Die Untersuchung des Serums und der Prostatagewichte ergab, dass alle orchiectomierten Tiere ein signifikant erniedrigtes Prostatagewicht gegenüber der Non-ORX-Kontrollgruppe hatten. Innerhalb der orchiectomierten Tiere zeigte sich das Gewicht in der SARM_Pr-Gruppe signifikant erhöht gegenüber ORX und den mit Testosteron behandelten Tieren (Abbildung 19). In der Auswertung der alkalischen Phosphatase zeigten sich keine relevanten Unterschiede (Abbildung 20).

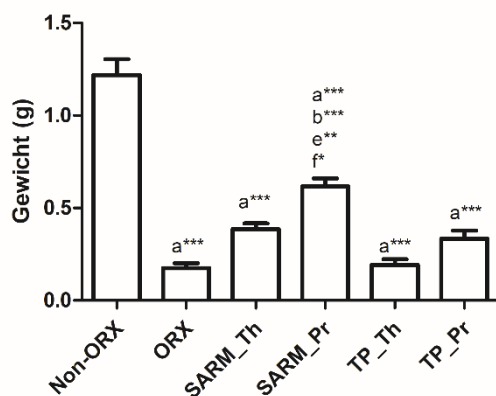


Abbildung 19: Prostatagewichte in g (*mean* + *SEM*); a = signifikant zu Non-ORX; b = signifikant zu ORX; e = signifikant zu TP_Th; f = signifikant zu TP_Pr; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ *** = $p < 0,001$

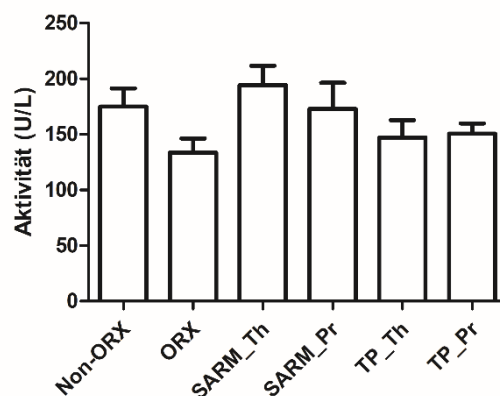


Abbildung 20: Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum in U/l (*mean* + *SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

Osteocalcin als Marker des Knochenumsatzes war in den Enobosarm-behandelten Gruppen signifikant erniedrigt gegenüber ORX und TP_Th (Abbildung 21). CTX-I als Abbauprodukt von Kollagen zeigte keine signifikanten Unterschiede in den Versuchsgruppen (Abbildung 22).

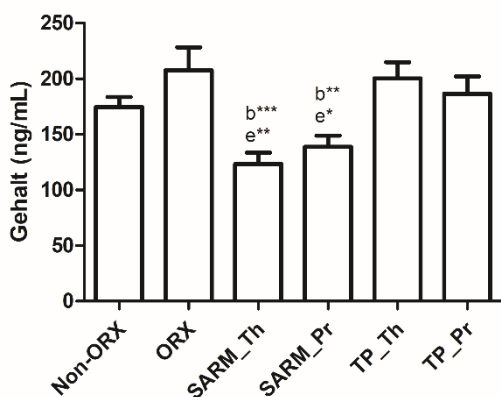


Abbildung 21: Osteocalcingehalt im Serum in ng/ml (*mean* + *SEM*); b = signifikant zu ORX; e = signifikant zu TP_Th; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ *** = $p < 0,001$

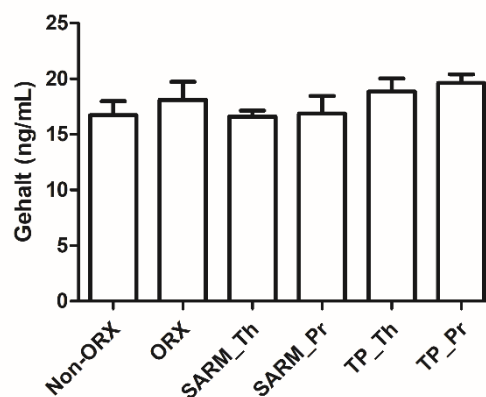


Abbildung 22: CTX-I-Gehalt im Serum in ng/ml (*mean* + *SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

3.3 Biomechanischer Test

In der Biomechanischen Testung zeigten sich für keine der drei untersuchten Parameter (F_{\max} , Steigung, *yield load*) signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abbildungen 23-25).

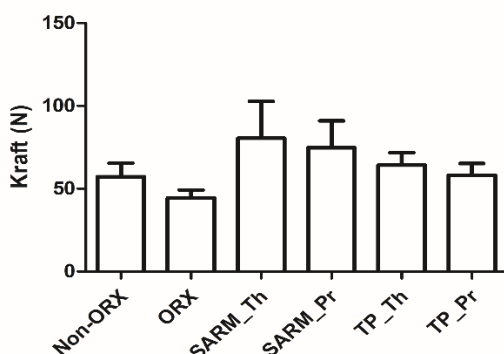


Abbildung 23: Maximal angewandte Kraft (F_{\max}) auf den Versuchsknochen in N (*mean* + *SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

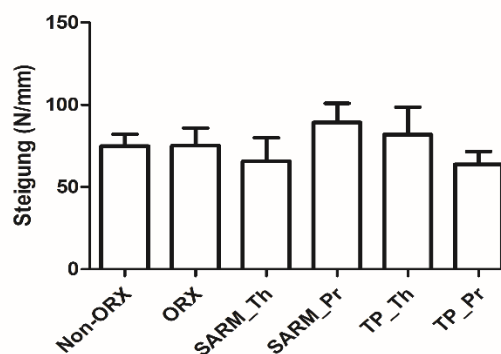


Abbildung 24: Steigung (Maß für Elastizität) des linearen Anteils des Kraft-Wege-Diagramms in N/mm (*mean* + *SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

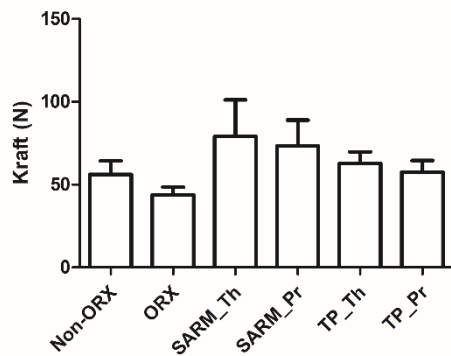


Abbildung 25: Wert des Überganges der elastischen in die plastische Deformation (*yield load*) in N (*mean + SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

3.4 Mikro-CT-Untersuchung

3.4.1 Untersuchung des kalzifizierten Kallus

In der Untersuchung der Dichte des kalzifizierten Kallus fiel auf, dass die ORX-Gruppe signifikant weniger Dichte des Kallus aufwies als die Non-ORX-Kontrollgruppe. Eine erhöhte Kallusdichte ließ sich zudem in SARM_Pr gegenüber ORX dokumentieren (Abbildung 26). Beim Betrachten des Volumens zeigte sich, dass sowohl TP_Th als auch TP_Pr ein signifikant größeres Kallus-Volumen als Non-ORX hatten, während sich dies für beide SARM-Gruppen nicht nachweisen ließ (Abbildung 27).

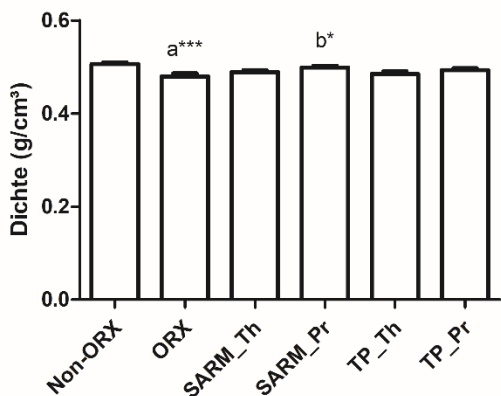


Abbildung 26: Dichte des kalzifizierten Kallus im Osteotomiespalt in g/cm³ (*mean* + *SEM*); a = signifikant zu Non-ORX; b = signifikant zu ORX, * = p < 0,05; *** = p < 0,001

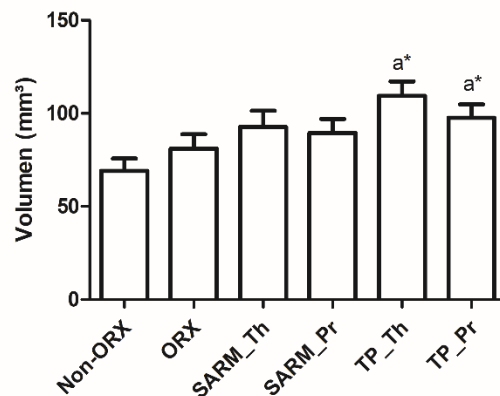


Abbildung 27: Volumen des kalzifizierten Kallus im Osteotomiespalt in mm³ (*mean* + *SEM*); a = signifikant zu Non-ORX; * = p < 0,05

3.4.2 Untersuchung der Kortikalis

Die Untersuchung der Kortikalis zeigte eine signifikant geringere Dichte in SARM_Pr gegenüber Non-ORX (Abbildung 28), während sich ansonsten keine Signifikanzen dokumentieren ließen. Hinsichtlich des gemittelten Volumens ergaben sich ebenfalls keine Signifikanzen (Abbildung 29).

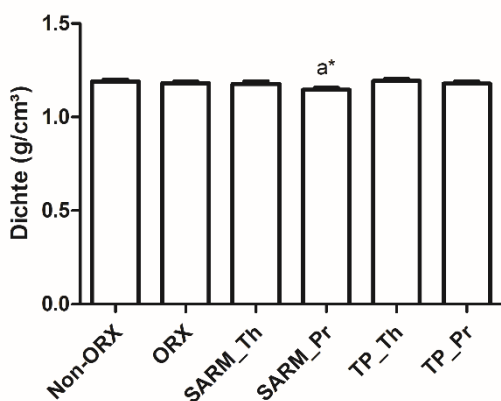


Abbildung 28: Dichte der Kortikalis Osteotomiespalt in g/cm³ (*mean* + *SEM*); a = signifikant zu Non-ORX; * = p < 0,05

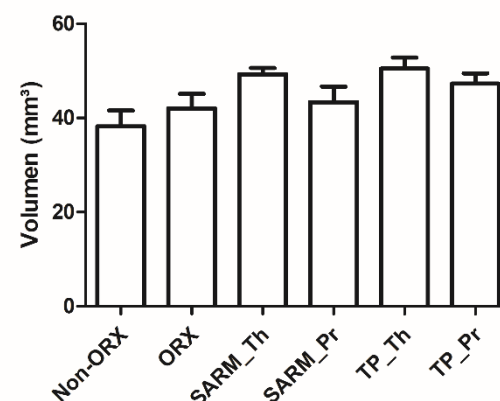


Abbildung 29: Volumen der Kortikalis im Osteotomiespalt in mm³ (*mean* + *SEM*); Keine signifikanten Unterschiede (p > 0,05)

3.4.3 Untersuchung der Weichteile

In der Untersuchung des Weichteilgewebes zeigten sich keinerlei relevante Signifikanzen (Abbildungen 30, 31).

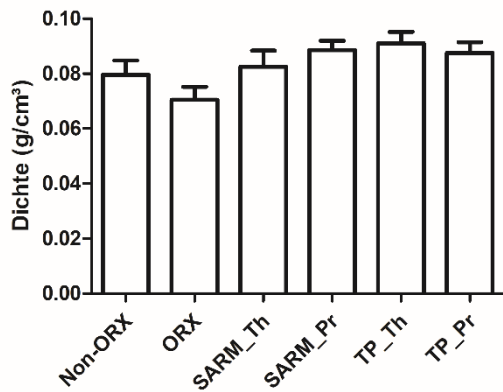


Abbildung 30: Dichte der Weichteile im Osteotomiespalt in g/cm³ (*mean* + *SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

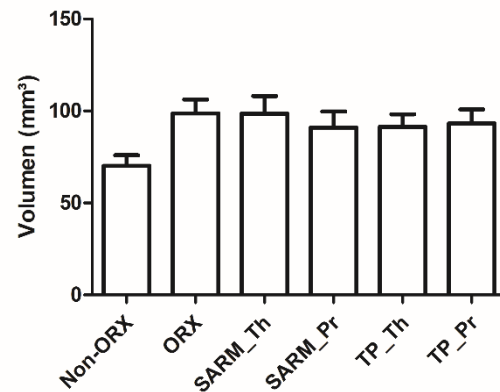


Abbildung 31: Volumen der Weichteile im Osteotomiespalt in mm³ (*mean* + *SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

3.4.4 Untersuchung der gesamten Knochenstruktur (Kallus und Kortikalis)

Hinsichtlich der ermittelten Dichte-Werte der gesamten Knochenstrukturen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 32). Betrachtet man die Volumina des kalzifizierten Kallus und der Kortikalis zusammen, so waren die Werte der mit Testosteronpropionat behandelten Gruppen signifikant erhöht gegenüber der Non-ORX-Kontrollgruppe (Abbildung 33).

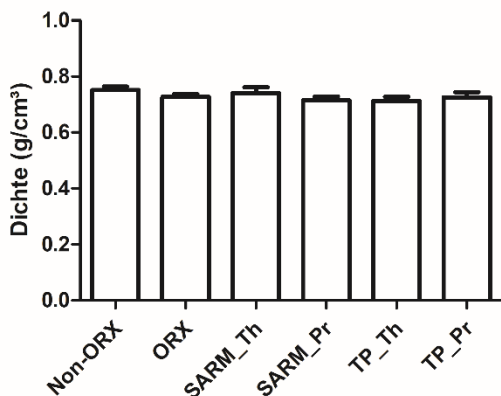


Abbildung 32: Dichte der Knochenbestandteile (Kortikalis und kalzifizierter Kallus) im Osteotomiespalt in g/cm³ (*mean* + *SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

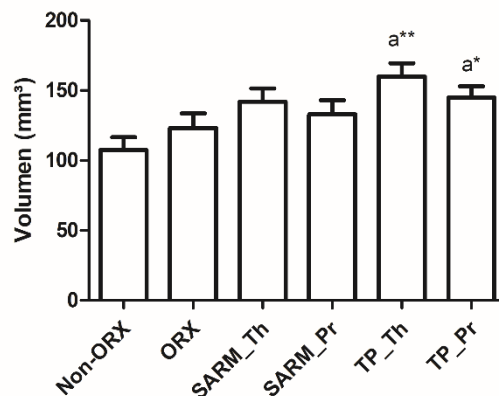


Abbildung 33: Volumen der Knochenbestandteile (Kortikalis und kalzifizierter Kallus) im Osteotomiespalt in mm³ (*mean* + *SEM*); a = signifikant zu Non-ORX, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

3.4.5 Bone volume fraction (BV/TV)

Aus den errechneten und dokumentierten Rohdaten lässt sich die *bone volume fraction* (BV/TV) berechnen. Unter diesem Wert versteht man den Anteil an mineralisiertem Knochen am Gesamtvolumen des Knochens und er errechnet sich anhand des summierten Volumens der Kortikalis und des kalzifizierten Kallus und des Gesamtvolumens. Signifikante Unterschiede zeigten sich in dieser Untersuchung nicht (Abbildung 34).

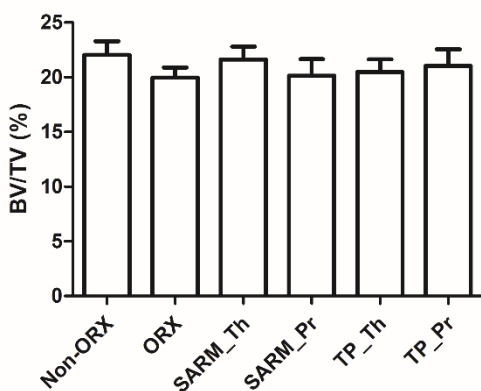


Abbildung 34: Errechnete *bone volume fraction* (BV/TV) in % (*mean* + *SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).

3.5 Histologische Untersuchungen

3.5.1 Mikroradiographie

3.5.1.1 Untersuchung des Kallus

In den histologischen Untersuchungen des Kallusanteils zeigten sich im ventralen und dorsalen Bereich lediglich ein signifikant erniedrigter Kallusanteil dorsal des Bruchspaltes von SARM_Th gegenüber Non-ORX (Abbildungen 35, 36). Betrachtete man jedoch den endostalen Kallusanteil, so sah man eine signifikante Verringerung des endostalen Kallus-Anteils der Gruppen SARM_Th, SARM_Pr, TP_Th und TP-Pr gegenüber Non-ORX (Abbildung 37). Hinsichtlich der Dicke des gebildeten Kallus ließen sich weder ventral noch dorsal signifikante Unterschiede nachweisen (Abbildungen 38, 39).

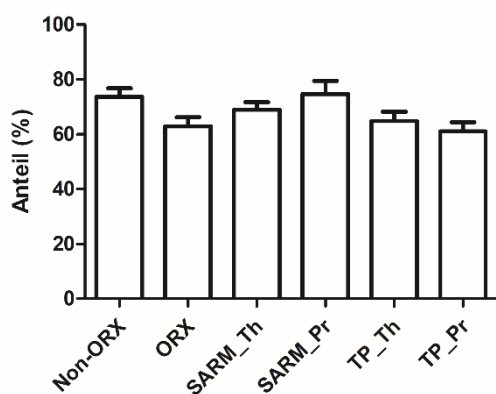


Abbildung 35: Anteil des ventralen Kallus in % (*mean* + *SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

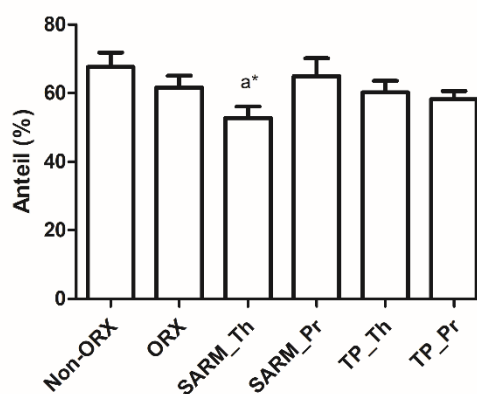


Abbildung 36: Anteil des dorsalen Kallus in % (*mean* + *SEM*); a = signifikant zu Non-ORX; * = $p < 0,05$

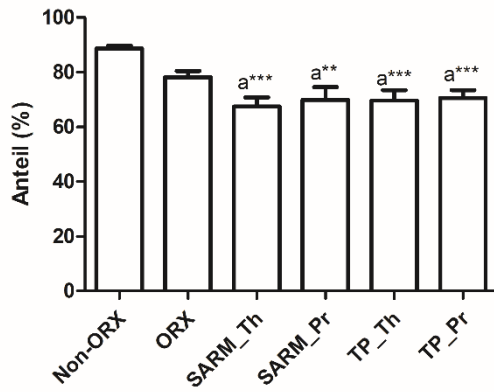


Abbildung 37: Anteil des endostalen Kallus in % (*mean* + *SEM*); a = signifikant zu Non-ORX; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

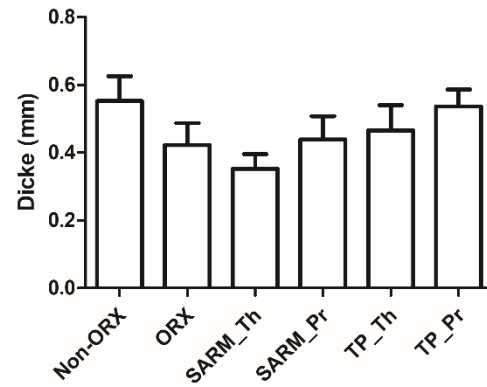


Abbildung 38: Dicke des ventralen Kallus in mm (*mean* + *SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

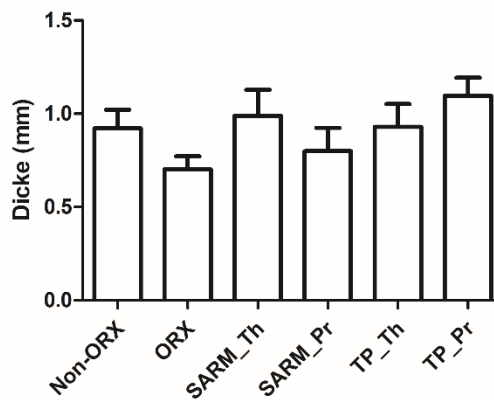


Abbildung 39: Dicke des dorsalen Kallus in mm (*mean* + *SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

3.5.1.2 Untersuchung der Kortikalis

Bezüglich des Kortikalis-Anteils zeigten sich im ventralen und dorsalen Bereich des Bruchspaltes keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildungen 40, 41). Betrachtete man die Kortikalisdicke, so zeigten sich im ventralen Bereich des Bruchspaltes keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 42). Dorsal war eine signifikante Erhöhung der mit Testosteronpropionat behandelten Ratten gegenüber der ORX-Gruppe festzustellen (Abbildung 43).

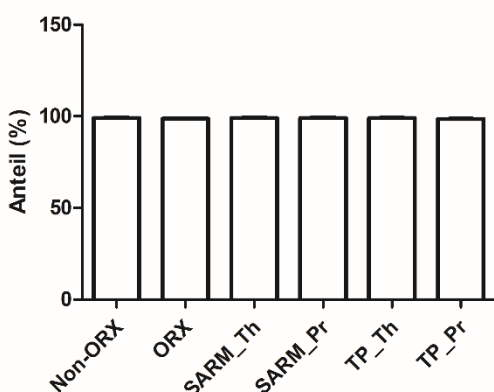


Abbildung 40: Anteil der ventralen Kortikalis distal vom Osteotomiespalt in % (*mean + SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

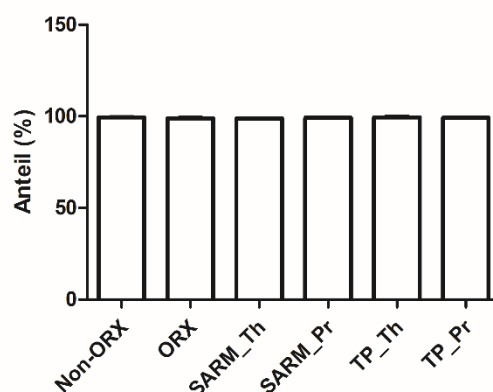


Abbildung 41: Anteil der dorsalen Kortikalis distal vom Osteotomiespalt in % (*mean + SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

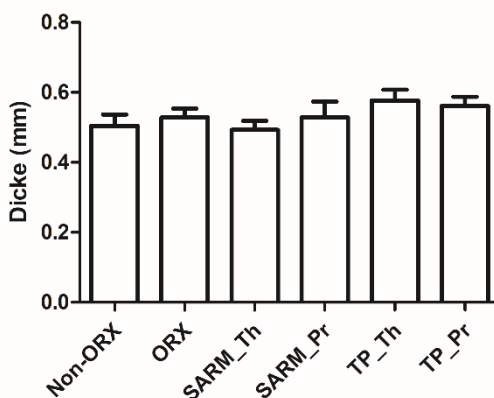


Abbildung 42: Dicke der ventralen Kortikalis distal vom Osteotomiespalt in mm (*mean + SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

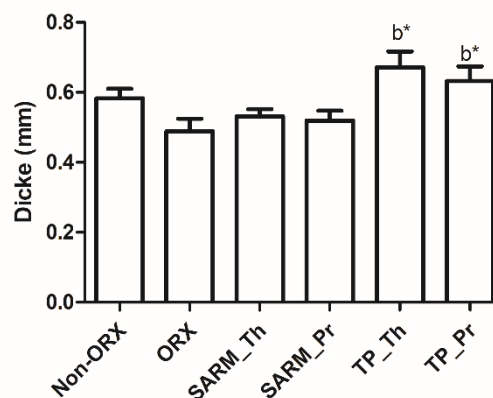


Abbildung 43: Dicke der dorsalen Kortikalis distal vom Osteotomiespalt in mm (*mean + SEM*); b = signifikant zu ORX; * = $p < 0,05$

3.5.2 Polychrome Sequenzmarkierung

3.5.2.1 Calceingrün-gefärbter Kallus

Durch die Fluorochrome wurde der bis zum Zeitpunkt der Injektion gebildete Kallus angefärbt. Der Calceingrün-gefärbte Kallus wurde zwischen Tag 0 und 23 nach der Osteotomie gebildet.

Bei der CG-markierten Fläche zeigte sich eine signifikante Erniedrigung im ventralen Bereich von ORX gegenüber Non-ORX. Zusätzlich konnte eine signifikant größere Kallusfläche von SARM_Pr im Vergleich zu ORX und auch zu SARM_Th nachgewiesen werden (Abbildung 44). Im endostalen Bereich ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 45). Der dorsale Bereich wies eine signifikant größere CG-markierte Fläche von TP_Pr verglichen mit ORX und SARM_Th auf (Abbildung 46). Summiert auf den gesamten Bereich ergaben sich damit folgende Ergebnisse: ORX zeigte sich signifikant erniedrigt, wenn man es mit der Non-ORX-Kontrollgruppe verglich. SARM_Pr und TP_Pr zeigten jeweils signifikant erhöhte Flächen von CG im Vergleich zu ORX und SARM_Th (Abbildung 47).

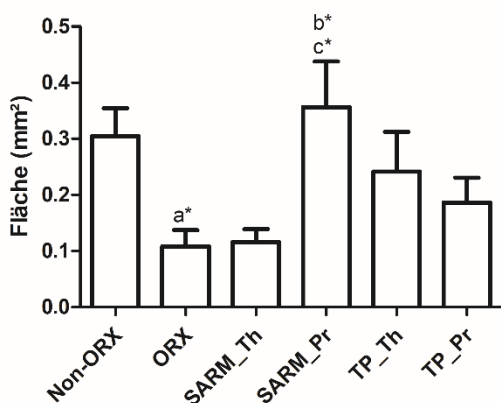


Abbildung 44: Markierte Fläche des ventralen Kallus mit CG-Färbung in mm² (*mean* + *SEM*); a = signifikant zu Non-ORX; b = signifikant zu ORX; c = signifikant zu SARM_Th; * = $p < 0,05$

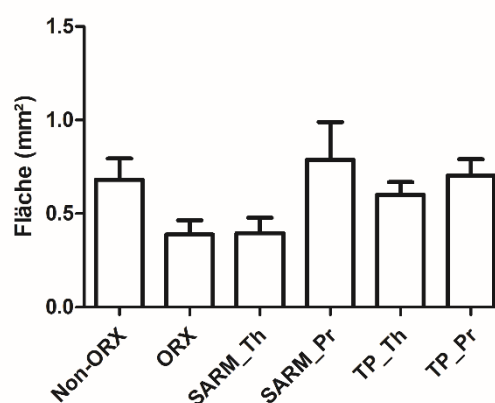


Abbildung 45: Markierte Fläche des endostalen Kallus mit CG-Färbung in mm² (*mean* + *SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

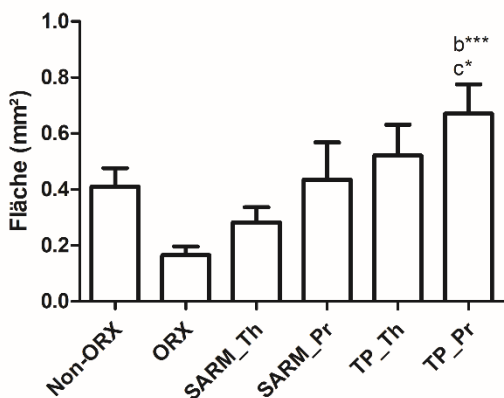


Abbildung 46: Markierte Fläche des dorsalen Kallus mit CG-Färbung in mm² (*mean* + *SEM*); b = signifikant zu ORX; c = signifikant zu SARM_Th; * = p < 0,05

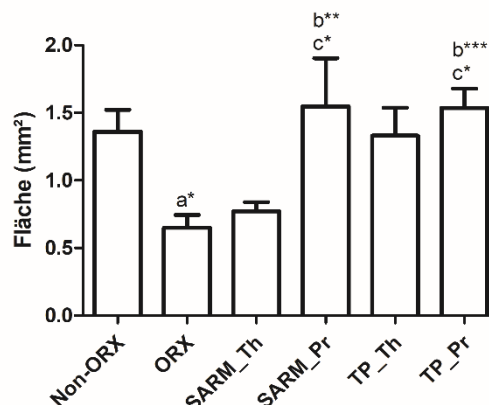


Abbildung 47: Markierte Fläche des gesamten Kallus mit CG-Färbung in mm² (*mean* + *SEM*); a = signifikant zu Non-ORX; b = signifikant zu ORX; c = signifikant zu SARM_Th; * = p < 0,05; ** = p < 0,01 *** = p < 0,001

Bezüglich des ventralen CG-markierten Anteils an der gesamten ventralen Kallusfläche zeigte sich eine signifikante Erhöhung von SARM_Pr gegenüber ORX. Dorsal zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Anteils von SARM_Pr und TP_Pr gegenüber ORX (Abbildungen 48, 50). Endostal ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen (Abbildung 49).

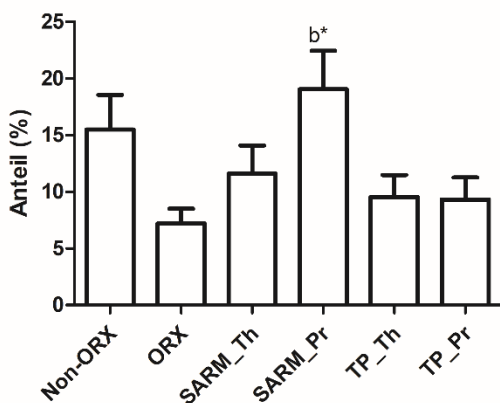


Abbildung 48: Markierter Anteil der ventralen Kallusfläche mit CG-Färbung als Anteil der gesamten ventralen Kallusfläche in % (*mean* + *SEM*); b = signifikant zu ORX; * = p < 0,05

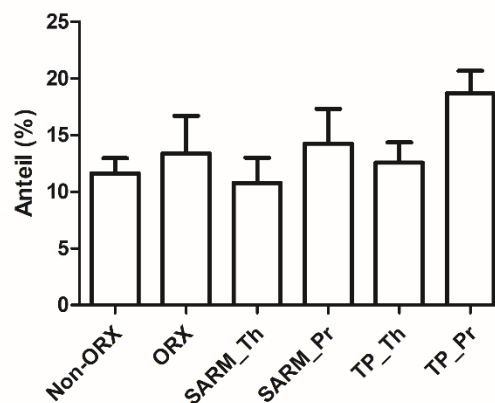


Abbildung 49: Markierter Anteil der endostalen Kallusfläche mit CG-Färbung als Anteil der gesamten endostalen Kallusfläche in % (*mean* + *SEM*); Keine signifikanten Unterschiede (p > 0,05)

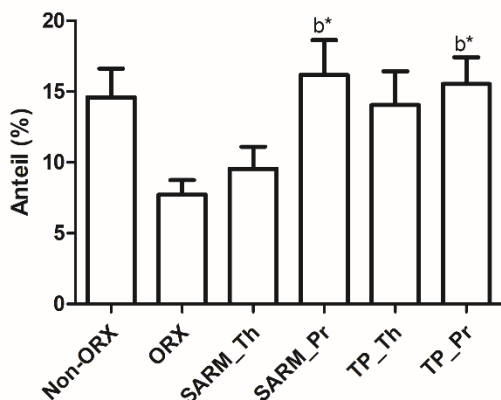


Abbildung 50: Markierter Anteil der dorsalen Kallusfläche mit CG-Färbung als Anteil der gesamten dorsalen Kallusfläche in % (*mean* + *SEM*); b = signifikant zu ORX; * = $p < 0,05$

3.5.2.2 Alizarinkomplexon-gefärbter Kallus

Der Alizarinkomplexon-gefärbte Kallus wurde zwischen Tag 24 und 33 nach der Osteosynthese gebildet. Nach Markierung der AK-gefärbten Fläche im ventralen Anteil zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied (Abbildung 51). Betrachtete man den AK-gefärbten Teil des Kallus, so konnte endostal eine signifikant größere AK-gefärbte Fläche bei TP_Th verglichen mit ORX, SARM_Th und TP_Pr nachgewiesen werden. Gleichzeitig zeigte sich eine signifikante reduzierte Kallusfläche von TP_Pr gegenüber Non-ORX (Abbildung 52).

In der dorsalen Flächenmarkierung zeigte sich eine signifikante Erhöhung von TP_Pr gegenüber allen Gruppen außer TP_Th (Abbildung 53). Betrachtete man die Gesamtfläche, zeigte sich eine signifikante Abnahme von ORX und SARM_Th gegenüber Non-ORX. Gleichzeitig war die Kallusbildung von TP_Th signifikant gegenüber ORX, SARM_Th und TP_Pr erhöht, nicht jedoch gegenüber Non-ORX (Abbildung 54).

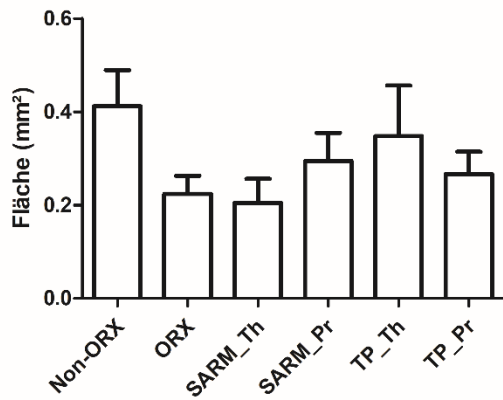


Abbildung 51: Markierte Fläche des ventralen Kallus mit AK-Färbung in mm² (*mean + SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

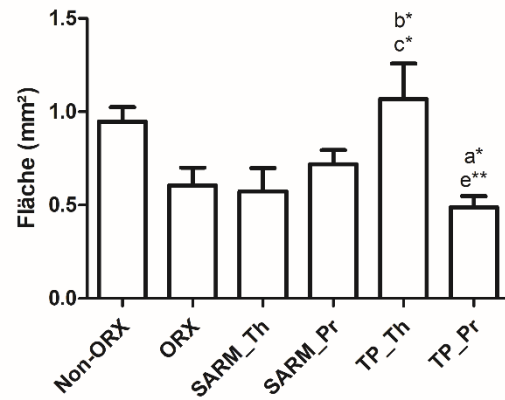


Abbildung 52: Markierte Fläche des endostalen Kallus mit AK-Färbung in mm² (*mean + SEM*); a = signifikant zu Non-ORX; b = signifikant zu ORX; c = signifikant zu SARM_Th; e = signifikant zu TP_Th; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

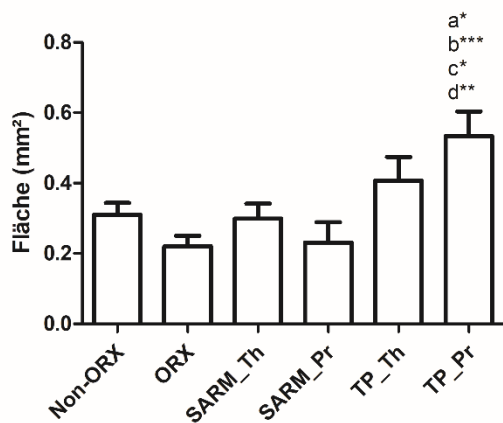


Abbildung 53: Markierte Fläche des dorsalen Kallus mit AK-Färbung in mm² (*mean + SEM*); a = signifikant zu Non-ORX; b = signifikant zu ORX; c = signifikant zu SARM_Th; d = signifikant zu SARM_Pr; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

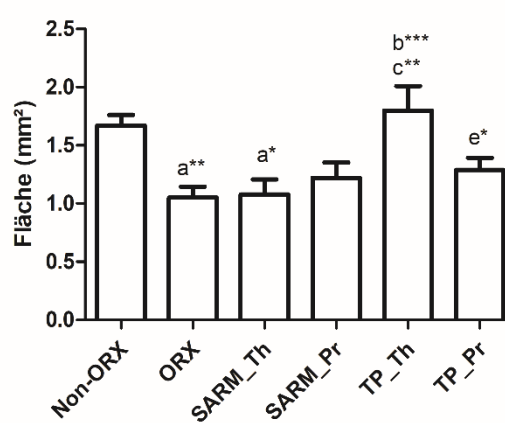


Abbildung 54: Markierte Fläche des gesamten Kallus mit AK-Färbung in mm² (*mean + SEM*); a = signifikant zu Non-ORX; b = signifikant zu ORX; c = signifikant zu SARM_Th; e = signifikant zu TP_Th; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

In den ventralen und dorsalen Anteilsberechnungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildungen 55, 57). Der Anteil des AK-gefärbten Kallus im Bruchspalt war bei TP_Th gegenüber SARM_Th signifikant erhöht. Die Testosteron-Prophylaxe-Gruppe hingegen zeigte sich signifikant erniedrigt gegenüber TP_Th und Non-ORX (Abbildung 56).

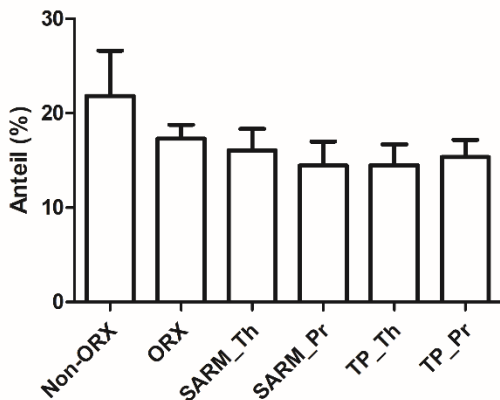


Abbildung 55: Markierter Anteil der ventralen Kallusfläche mit AK-Färbung als Anteil der gesamten ventralen Kallusfläche in % (*mean* + *SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

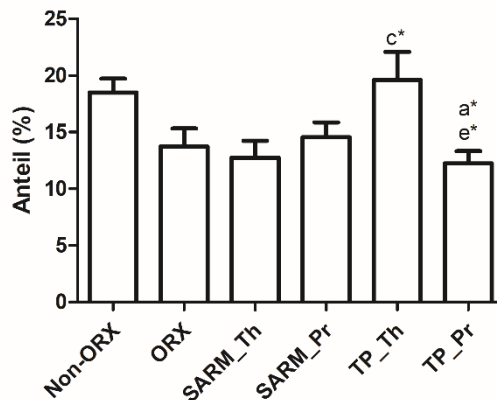


Abbildung 56: Markierter Anteil der endostalen Kallusfläche mit AK-Färbung als Anteil der gesamten endostalen Kallusfläche in % (*mean* + *SEM*); a = signifikant zu Non-ORX; c = signifikant zu SARM_Th; e = signifikant zu TP_Th; * = $p < 0,05$

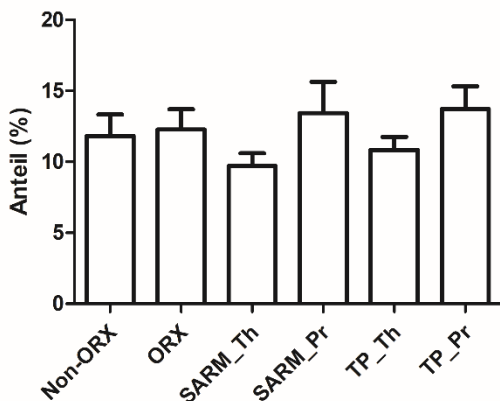


Abbildung 57: Markierter Anteil der dorsalen Kallusfläche mit AK-Färbung als Anteil der gesamten dorsalen Kallusfläche in % (*mean* + *SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

3.5.2.3 Tetracyclhydrochlorid-gefärbter Kallus

Die Tetracyclhydrochlorid-gefärbten Kallusanteile wurde zwischen Tag 33 und Tag 43 nach der Osteosynthese gebildet.

In der Untersuchung der TC-gefärbten Fläche war ausschließlich im ventralen Kallus eine signifikante Erhöhung von TP_Th gegenüber SARM_Th nachweisbar (Abbildung 58). Die Auswertung der dorsalen und endostalen Flächen sowie die Gesamtfläche konnten keine signifikanten Unterschiede darstellen (Abbildungen 59-61).

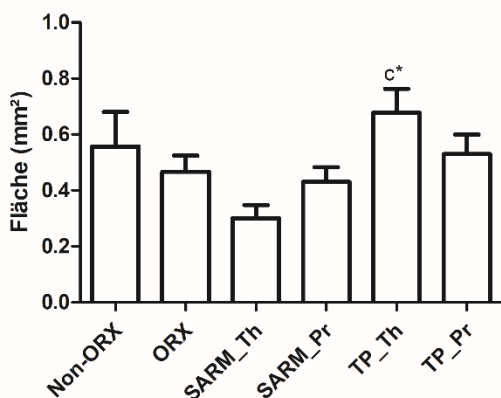


Abbildung 58 Markierte Fläche des ventralen Kallus mit TC-Färbung in mm² (*mean + SEM*); c = signifikant zu SARM_Th; * = p < 0,05

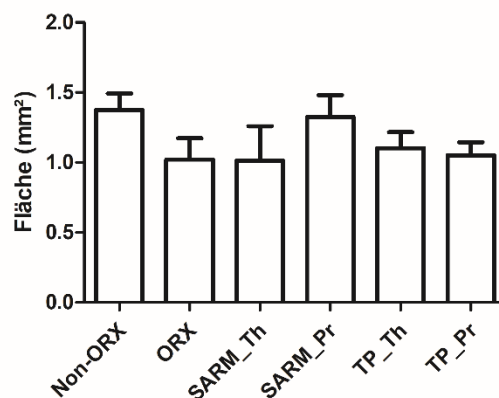


Abbildung 59: Markierte Fläche des endostalen Kallus mit TC-Färbung in mm² (*mean + SEM*); Keine signifikanten Unterschiede (p > 0,05)

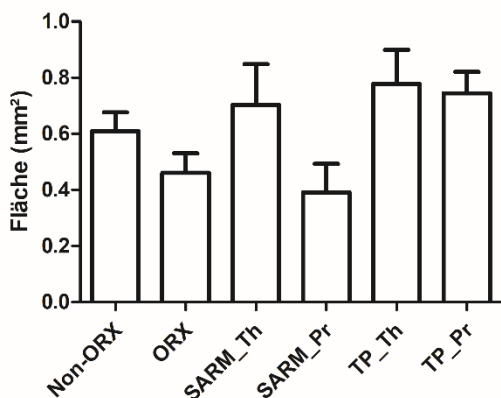


Abbildung 60: Markierte Fläche des dorsalen Kallus mit TC-Färbung in mm² (*mean + SEM*); Keine signifikanten Unterschiede (p > 0,05)

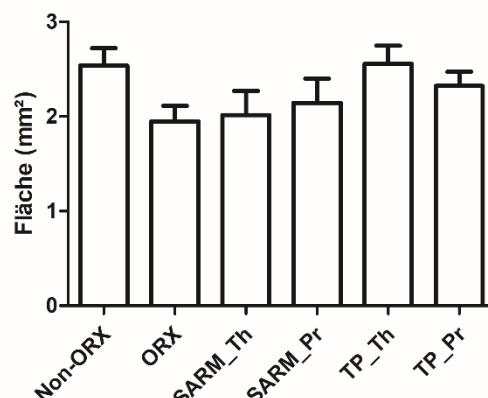


Abbildung 61: Markierte Fläche des gesamten Kallus mit TC-Färbung in mm² (*mean + SEM*); Keine signifikanten Unterschiede (p > 0,05)

Betrachtete man den Anteil der TC-gefärbten Flächen, so war ORX signifikant erhöht gegenüber Non-ORX (Abbildung 62). Endostal und dorsal ließen sich keine weiteren signifikanten Unterschiede feststellen. Zwischen den anderen Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede (Abbildungen 63, 64).

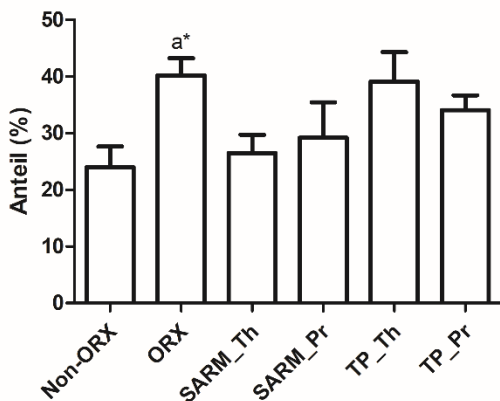


Abbildung 62: Markierter Anteil der ventralen Kallusfläche mit TC-Färbung als Anteil der gesamten ventralen Kallusfläche in % (*mean* + *SEM*); a = signifikant zu Non-ORX; * = $p < 0,05$

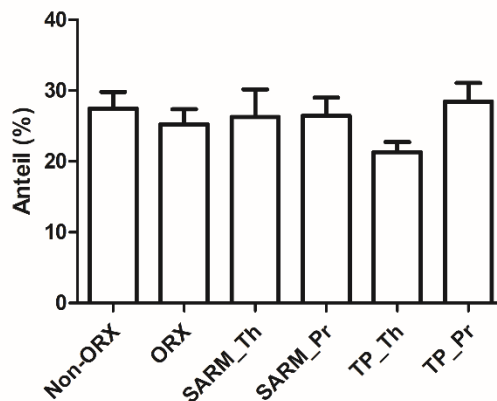


Abbildung 63: Markierter Anteil der endostalen Kallusfläche mit TC-Färbung als Anteil der gesamten endostalen Kallusfläche in % (*mean* + *SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

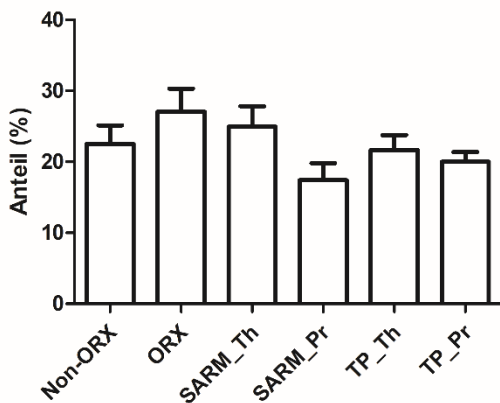


Abbildung 64: Markierter Anteil der dorsalen Kallusfläche mit TC-Färbung als Anteil der gesamten dorsalen Kallusfläche in % (*mean* + *SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

3.5.2.4 Summierter gefärbter Kallus

Die gesamte gefärbte Fläche der Fluorochrome wurde abschließend aufsummiert und erneut zwischen den Gruppen verglichen.

Betrachtete man die Kallusfläche zeigte, sich im ventralen Bereich eine signifikante Abnahme von ORX und SARM_Th im Vergleich zu Non-ORX (Abbildung 65). Die Auswertung der endostalen Kallusfläche ergab keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 66). Bei der dorsalen Kallusfläche waren signifikante Erhöhungen von TP_Th und TP_Pr gegenüber ORX nachweisbar (Abbildung 67). Addierte man die gesamten gefärbten Bereiche aller Fluorochrome zusammen und verglich sie, so zeigte sich ORX signifikant erniedrigt im Vergleich zu Non-ORX und TP_Th. (Abbildung 68).

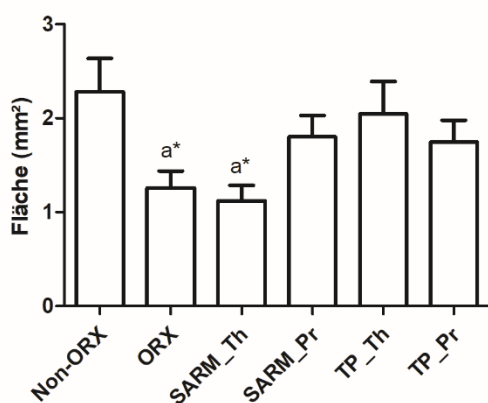


Abbildung 65: Markierte Fläche des ventralen Kallus mit Fluorochrom-Färbung in mm² (*mean* + *SEM*); a = signifikant zu Non-ORX; * = $p < 0,05$

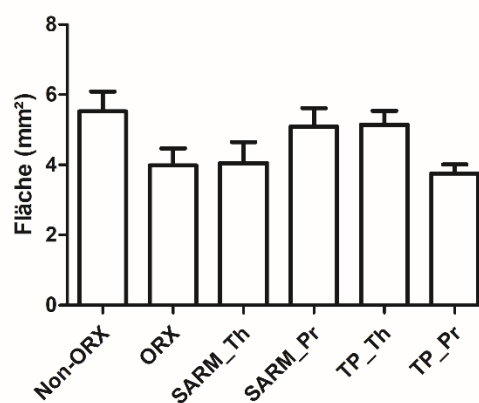


Abbildung 66: Markierte Fläche des endostalen Kallus mit Fluorochrom-Färbung in mm² (*mean* + *SEM*); Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

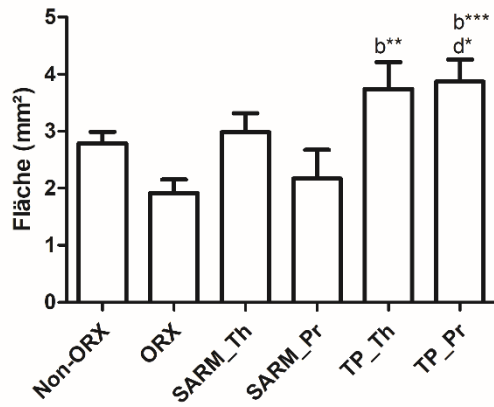


Abbildung 67: Markierte Fläche des dorsalen Kallus mit Fluorochrom-Färbung in mm² (*mean* + *SEM*); b = signifikant zu ORX; d = signifikant zu SARM_Pr; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

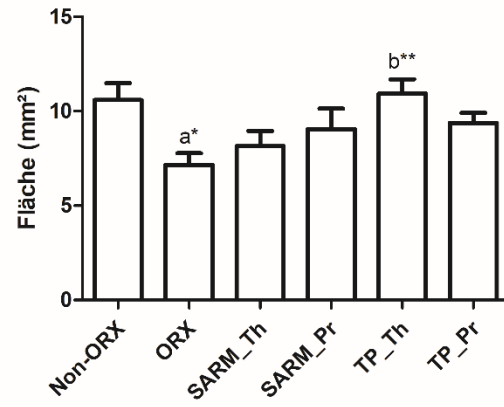


Abbildung 68: Markierte Fläche des gesamten Kallus mit Fluorochrom-Färbung in mm² (*mean* + *SEM*); a = signifikant zu Non-ORX; b = signifikant zu ORX; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

4 Diskussion

Das Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit war es einen Effekt von Enobosarm auf die metaphysäre Frakturheilung zu untersuchen und mit einer Behandlung mit Testosteron zu vergleichen. Frakturen gehören zu den häufigsten Begleiterscheinungen von manifesten Osteoporose-Erkrankungen und führen aufgrund der Komplikationen zu deutlich erhöhten Morbiditäten und Mortalitäten des Patientenkollektivs (Häussler et al. 2007). In diesem Fall sollte geschaut werden, wie sich eine medikamentöse Behandlung einer osteoporotisch bedingten Fraktur auf die Regenerationszeit des Knochens auswirkt. Somit wäre es möglich, Komplikationen vorzubeugen und die Mortalität zu senken. Insbesondere mit der Verschiebung der demographischen Verteilung und der Erhöhung der durchschnittlichen Lebenserwartung wird mit einer Verdopplung der osteoporotischen (Hüft-)Frakturen bis 2040 gerechnet (Häussler et al. 2007). Was andere SARMS und insbesondere Enobosarm angeht, so konnte der positive Effekt auf Kallusbildung und Knochenheilung sowie auf die Struktur der osteoporotischen Knochen im weiblichen Tiermodell bereits belegt werden (Kearbey et al. 2009; Hoffmann et al. 2019; Komrakova et al. 2020). Hinsichtlich des bei osteoporotischen Themen häufig nicht beachteten männlichen Organismus sollte in dieser Arbeit untersucht werden, wie Enobosarm die Knochenheilung im männlichen Tiermodell beeinflusst. Gleichzeitig sollte durch die Gabe von Testosteronpropionat ein direkter Vergleich mit bzw. eine Überlegenheit gegenüber der reinen hormonellen Therapie gezeigt werden.

4.1 Modell der Knochenheilung

In der Arbeit wurde das etablierte Protokoll der Abteilung zur Nachbildung einer metaphysären Fraktur genutzt, in diesem Fall am Modell des durch die Orchiektomie bedingten osteoporotischen Knochens (Stuermer et al. 2010; Komrakova et al. 2018). Metaphysäre Frakturen bei osteoporotischer Knochenstruktur des älteren Mannes spielen im klinischen Alltag eine große Rolle, da sie einen Großteil der Frakturen ausmachen. Insbesondere entstehen osteoporotische Frakturen überwiegend an den metaphysären Knochenabschnitten (distaler Radius, proximaler Femur) (Cheung et al. 2016). Dementsprechend wurde der iatrogen gesetzte Osteotomiespalt in den metaphysären Bereich der Tibia gesetzt. Die metaphysäre Frakturheilung verläuft direkt/primär, so dass es formal zu keiner erheblichen Kallusbildung kommen sollte (Ghiasi et al. 2017). Aufgrund der lediglich ventralen Stabilisierung und der fehlenden Ruhigstellung der Tiere kam es während des Versuches jedoch zu Kallusbildung, vermutlich verursacht durch die vorhandenen Mikrobewegungen am Osteotomiespalt (Komrakova et al. 2009).

4.2 Gruppengröße, Tiergewichte und Futter-/Wirkstoffaufnahme

In dieser Studie veränderte sich die initiale Gruppengröße von 15 Tieren auf fünf bis zwölf pro Gruppe im Verlauf des Experiments. Die vielen perioperativen Tierverluste stehen vermutlich im Zusammenhang mit der angewandten multimodalen Schmerztherapie. Normalerweise sollten kurzzeitig angewandte Therapien mit NSAID, Buprenorphin oder Metamizol keine nennenswerten Nebenwirkungen zeigen (Kohn et al. 2007). Es besteht jedoch ein direkter Zusammenhang von postoperativem Ileus bei gleichzeitiger Therapie mit Opiaten (Behm und Stollman 2003). Vermutlich waren die Todesfälle auch durch das fortgeschrittene Alter der Ratten bedingt. Nach Auftreten der ersten postoperativen tödlichen Verläufe wurde bei allen Tieren die Schmerztherapie angepasst. Am Versuchsende gab es ausreichend Tiere pro Gruppe, um die notwendigen Untersuchungen durchzuführen und anschließende statistische Analysen zu ermöglichen.

Bei der Futteraufnahme zeigten sich die Tiere unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit und damit einhergehender Behandlung gleichwertig über den gesamten Versuchszeitraum. Beim weiblichen Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Tiere nach einer Ovariectomie vor allem aufgrund der Körperfettzunahme deutlich an Gewicht zunahmen, während eine Behandlung mit Enobosarm keinen darüberhinausgehenden Effekt auf das Gewicht hatte (Hoffmann et al. 2019; Komrakova et al. 2020). Am weiblichen Tiermodell zeigte sich in anderen Studien ein temporärer Abfall der Futteraufnahme nach Osteotomie (Komrakova et al. 2009; Komrakova et al. 2020). Auch in dieser Untersuchung am männlichen Tiermodell konnte dies beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung wären die postoperativen Schmerzen, die geringere körperliche Belastung und die analgetische Medikation (Komrakova et al. 2011). Im Rahmen dieser experimentellen Doktorarbeit zeigten die männlichen Tiere signifikant reduzierte Körpergewichte gegenüber der Non-ORX-Kontrollgruppe, analog zu Voruntersuchungen (Ojeda et al. 1997). Bekanntermaßen führt Testosteronmangel zu herabgesetzter Knochendichte und Muskelabbau und damit zur Gewichtsreduktion (Isidori et al. 2005). Es zeigte sich jedoch, dass die mit Testosteron behandelten Gruppen gegenüber der Non-ORX-Kontrollgruppe ebenfalls signifikant weniger Gewicht aufwiesen, obwohl die fehlenden Hormone substituiert wurden. Auch eine Behandlung bzw. Therapie mit SARMS konnte das reduzierte Körpergewicht nicht wieder normalisieren. In einer klinischen Phase-II-Studie mit Enobosarm konnte eine dosisabhängige Zunahme der *lean body mass* bei Abnahme der Fettmasse nachgewiesen werden. Eine signifikante Änderung des gesamten Körpergewichts ergab sich dadurch nicht (Dalton et al. 2011). Anders als in der klinischen Studie von Dalton et al. 2011 ist in diesem Experiment zu beachten, dass die Durchführung der

Operationen (Orchiektomie, Osteotomie) Einfluss auf die Nahrungsaufnahme und das Gewicht der Tiere hat. Ein direkter Vergleich ist hier mit Einschränkungen zu betrachten.

Hinsichtlich der Wirkung des Testosterons auf das Körpergewicht konnte in früheren Studien belegt werden, dass eine Testosteron-Substitutionstherapie zu einer Zunahme des Gewichts des alternden Mannes führt, wobei hier eine starke Abhängigkeit von dem gewählten Testosteron-Präparat und der Art und Dauer der Anwendung besteht (Neto et al. 2015). Möglicherweise besteht hier also ein Zusammenhang mit der metabolischen Funktion der Leber und der eingeschränkten Bioverfügbarkeit der oralen Gabe von Testosteronpropionat (Gooren und Bunck 2004).

Anhand der täglichen Nahrungsaufnahme konnte eine Enobosarm-Aufnahme von etwa $0,35 \pm 0,06$ mg/kg KG berechnet werden, für Testosteronpropionat von 41 ± 8 mg/kg KG. Die geplante Zieldosis wurde somit annähernd erreicht. Hierbei ist zu beachten, dass die Wirkstoffaufnahme allein aus der aufgenommenen Nahrungsmenge berechnet wurde, während weitere Faktoren (Bioverfügbarkeit, metabolische Funktion der Leber) nicht beachtet wurden.

4.3 Prostata-Gewichte und Serumuntersuchungen

Die Prostata-Gewichte aller orchiektomierten Gruppen zeigten sich signifikant erniedrigt zur Non-ORX-Gruppe, so dass hier von einem direkten Zusammenhang mit dem Testosteron-Mangel auszugehen war. Innerhalb der behandelten Versuchsgruppen zeigten die über 18 Wochen mit Enobosarm behandelten Tiere (SARM_Pr) einen signifikanten Anstieg des Prostata-Gewichts im Vergleich mit den anderen orchiektomierten Gruppen, wobei diese weiterhin signifikant erniedrigt gegenüber der Non-ORX-Kontrollgruppe war. Studien unter Testosteron-Substitution konnten bisher einen deutlichen Anstieg des Prostata-Gewichts im Rahmen einer Hypertrophie aufzeigen (Li et al. 2018). Dies lässt sich in unserer Studie nicht sicher reproduzieren, wobei hier möglicherweise ein Zusammenhang mit der reduzierten oralen Bioverfügbarkeit von Testosteron in unserem Versuchsaufbau besteht, da Li et al. 2018 sich für eine subkutane Applikation entschieden hatten. Bekanntermaßen haben auch SARMS einen steigernden Effekt auf das Prostata-Gewicht, jedoch in geringerem Maße als Testosteron-Behandlungen (Srinath und Dobs 2014; Narayanan et al. 2018). Die eingeschränkte Wirkung auf die Prostata wird im Zusammenhang mit der geringen Affinität zur 5α -Reduktase gesehen (Gao et al. 2004).

Das Osteocalcin im Serum war bei den mit Enobosarm behandelten Tieren signifikant erniedrigt. Ähnliches zeigten auch andere Arbeitsgruppen z. B. für SARMS S4/Andarine (Gao

et al. 2005). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Enobosarm die Zelldifferenzierung zu Osteoblasten fördert und zu Osteoklasten hemmt, so dass man hier von antiresorptiven Eigenschaften spricht (Kawano et al. 2003; Gao et al. 2005). Erniedrigte Osteocalcin-Werte könnten ein Hinweis auf die antiresorptiven Eigenschaften von Enobosarm sein. Im Rahmen einer Osteoporose-Erkrankung mit hoher Krankheitsaktivität (*high-turnover osteoporosis*) wäre dies ein wünschenswerter Effekt. Gleichzeitig sind antiresorptive Medikamente nach akuten Frakturen nicht indiziert (Cao et al. 2002), so dass die Behandlung akuter Frakturen mit Enobosarm nicht empfehlenswert erscheint.

Die Werte für die alkalische Phosphatase und CTX-I zeigten keine Auffälligkeiten, so dass hier nicht von einer Beeinflussung durch die von uns gewählten Wirkstoffe zum Zeitpunkt der Messungen auszugehen ist.

4.4 Biomechanischer Test

Die Stabilität des Bruchspaltes wurde mithilfe des 3-Punkt-Biegetests untersucht (Stuermer et al. 2005; Komrakova et al. 2015). In der Auswertung der biomechanischen Testung zeigten sich zwischen allen untersuchten Gruppen keinerlei signifikante Unterschiede. Analog zu Vorstudien am weiblichen Tiermodell konnten in dieser Untersuchung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen dokumentiert werden (Komrakova et al. 2020). Hier spielen sicherlich die geringe Gruppengröße und der hohe Standardfehler der Untersuchung eine große Rolle. Ein positiver Effekt einer Testosteron-Therapie auf die biomechanischen Eigenschaften des Kallus lässt sich anders als in anderen Untersuchungen (jedoch an intaktem Tibia-Modell) nicht nachweisen (Stuermer et al. 2005). Insgesamt zeigen sich also keine positiven Auswirkungen der Therapien auf die biomechanischen Eigenschaften der Fraktur-Stelle. Gleichzeitig ergeben sich auch keine Hinweise auf eine negative Beeinflussung der Knochenstabilität durch die verabreichten Substanzen. Es ist dabei zu beachten, dass einige Knochen nicht untersucht werden konnten, da es zum Zeitpunkt der Untersuchung noch nicht zu einer abgeschlossenen Knochenheilung bzw. ausreichend stabilisierenden Kallusbildung gekommen war. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass sich Osteoporose negativ auf die biomechanischen Eigenschaften des gebildeten Kallus auswirkt (Namkung-Matthai et al. 2001; McCann et al. 2008). In der Forschung werden weiterhin verschiedene Möglichkeiten zur Untersuchung von biomechanischen Eigenschaften verwendet. Der hier gewählte 3-Punkt-Biegetest hat den Vorteil, dass die Knochen in dem Prozess intakt bleiben und für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen. Der Biegetest lässt sich zudem bei den kleinen Rattenknochen leichter durchführen (Steiner et al. 2015), es kommt jedoch häufig zu

hohen Standardabweichungen/-fehlern und die Ergebnisse sind sehr abhängig von der Ausrichtung oder Asymmetrie des gebildeten Kallus (Ekeland et al. 1981; Augat et al. 2003; Steiner et al. 2015). Hohe Standardabweichungen/-fehler ließen sich vermutlich vermeiden, wenn eine andere Form der biomechanischen Testung auf den Frakturspalt gewählt würde, wie z. B. eine Rotation oder ein Komprimieren der Knochens (Steiner et al. 2015), wobei es hier häufig zu einer Zerstörung des Knochens kommt. Aufgrund des von uns geplanten Versuchsaufbaus wurden die Knochen gebogen und nicht gebrochen, so dass sie in weiteren Untersuchungen ausgewertet werden konnten.

4.5 Mikro-CT-Untersuchung

Das Ziel der Mikro-CT-Untersuchung war es, die Knochenstrukturen im und um den Osteotomiespalt zu quantifizieren, um einen möglichen Einfluss der SARMs oder der Testosteron-Therapie auf die Kallusbildung bzw. Frakturheilung darzustellen.

In Voruntersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass SARMs einen anabolen Effekt auf den kortikalen Knochenanteil von orchiektomierten/ovarektomierten Ratten haben (Hanada et al. 2003; Gao et al. 2005; Kearbey et al. 2007). In dieser Untersuchung konnte eine signifikante Beeinflussung der Kortikalis-Dichte durch SARM-Th am Osteotomiespalt nicht reproduziert werden, ebenso konnte kein Einfluss auf die Kortikalis-Fläche nachgewiesen werden. In SARM_Pr zeigte sich eine Reduktion der Kortikalisdichte. Es ist jedoch zu beachten, dass aufgrund des gewählten Knochenausschnitts nur ein geringer Teil der Kortikalis untersucht wurde und dass Untersuchungen der Kortikalis an intakten Knochen besser zu untersuchen sind. Hinsichtlich der errechneten *bone volume density* zeigten sich ebenfalls keine positiven oder negativen Effekte von Testosteron oder Enobosarm.

Hinsichtlich der Kallusdichte zeigte ORX eine Reduktion im Vergleich zur gesunden Non-ORX-Kontrollgruppe. Vergleichbare Beeinträchtigungen der Knochenheilung in ORX-Ratten konnten bereits in Voruntersuchungen gezeigt werden (Komrakova et al. 2011).

In unserer Studie erhöhte SARM_Pr die Kallusdichte gegenüber ORX, so dass hier von einer direkten Wirksamkeit des Enobosarms auf die Frakturheilung auszugehen ist, zumindest in der prophylaktischen Dosierung. Ursächlich hierfür könnte die direkte Wirkung auf den AR sein (Narayanan et al. 2018). Beide mit Testosteron behandelten Gruppen zeigten ein signifikant erhöhtes Kallusvolumen sowie Knochenvolumen (Kortikalis und kalzifizierter Kallus) gegenüber Non-ORX. Dementsprechend ist hier von einem ebenfalls positiven Effekt des Testosterons auf die Frakturheilung auszugehen, so wie auch andere experimentelle Studien diesen bereits belegen konnten (Gesicki et al. 2003; Cheng et al. 2013). Testosteron wird im

Körper teilweise aromatisiert und wirkt nicht nur über den AR, sondern zusätzlich über den Östrogen-Rezeptor auf die Knochen (Kasperk et al. 1997; Mohamad et al. 2016).

In den erhobenen Daten der Weichteile (Kollagen, Fett usw.) lassen sich keine signifikanten Unterschiede in den Gruppen erheben, so dass hier keine Wirkung der untersuchten Substanzen anzunehmen ist.

Zusammengefasst lässt sich also feststellen, dass ein anaboler Effekt von Enobosarm als Prophylaxe auf die Kallus-Dichte besteht, sowie ein positiver Effekt von Testosteron (Therapie und Prophylaxe) auf das Kallusvolumen.

4.6 Histologische Untersuchungen

4.6.1 Mikroradiographie

Die mikroradiographische Untersuchung soll dazu beitragen, die Kallus- und Kortikalis-Veränderungen am Osteotomiespalt genauer beurteilen zu können. In der Auswertung des Kallusanteils und der Kallusdicke lassen sich verschiedene Aspekte der Frakturheilung aufzeigen. Der Anteil des endostalen Kallus zeigte sich in allen medikamentös behandelten Gruppen signifikant erniedrigt im Vergleich zu Non-ORX, so dass sich der tendenziell erniedrigte Kallusanteil in der ORX Gruppe durch die Behandlungen nicht verbesserte. Insgesamt zeigte sich jedoch in diesem Versuch in der mikroradiographischen Untersuchung keine signifikante Reduktion des Kallusanteils bzw. der Kallusdicke. In anderen Untersuchungen konnte sowohl eine signifikant erniedrigte Kallusdicke als auch ein positiver Effekt von SARMs nachgewiesen werden (am weiblichen Tiermodell) (Komrakova et al. 2020). Die periostale Kallusdicke zeigte unter den verschiedenen Behandlungen dieses Experimentes keine signifikante Veränderung. Anders als in Versuchen am weiblichen Tiermodell zeigte sich in dieser Studie für die Enobosarm-Behandlung nach abgelaufener Fraktur (SARM_Th) jedoch eine Verminderung des dorsalen Kallusanteils. Bei der Behandlung von osteoporotischen weiblichen Ratten mit Enobosarm konnte in unserer Arbeitsgruppe in vorherigen Versuchen eine Verbesserung der Kallus-Struktur nachgewiesen werden (Komrakova et al. 2020). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass es sich dort um weibliche junge Tiere handelte, während in diesem Experiment alte männliche Tiere untersucht wurden. Generell ist die Wirkung von selektiven Androgen-Rezeptormodulatoren im Geschlechtervergleich noch nicht ausreichend untersucht, da in den meisten Arbeiten nur ein Geschlecht oder beide Geschlechter zusammengefasst untersucht werden (Dalton et al. 2011; Dobs et al. 2013). Unterschiede in der Wir-

kung von SARMs aufs weibliche und männliche Geschlecht konnten zumindest schon teilweise dargestellt werden, z. B. in der verstärkten Wirkung von Enobosarm auf die Muskeln im weiblichen Organismus (Neil et al. 2018).

In anderen Studien konnte bereits ein positiver Effekt von SARMs auf die Kortikalisdicke von ovariectomierten Ratten gezeigt werden (Komrakova et al. 2020). Dies lässt sich für das männliche Rattenmodell in diesem Versuch nicht nachweisen. Nach einer Testosteron-Behandlung zeigte sich eine Erhöhung der Kortikalisdicke in TP_Th und TP_Pr, so dass hier ein positiver Effekt von Testosteron auf die Knochenstabilität anzunehmen ist, wie bereits in anderen Studien belegt wurde (Arisaka et al. 1995; Isidori et al. 2005).

Insgesamt war zu beachten, dass mit der Methode der Mikroradiographie der Kallusanteil zweidimensional berechnet wird, während dieser im Mikro-CT in dreidimensionaler Form (Dichte und Volumen) berechnet wird. Allerdings ergänzen sich die beiden Methoden so, dass die Knochenheilung vielseitig untersucht werden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich anhand der Daten der Mikroradiographie ein positiver Effekt für beide Testosteron-Behandlungen, jedoch ein negativer Effekt von einer Enobosarm-Therapie (SARM_Th) auf die Frakturheilung zeigt.

4.6.2 Polychrome Sequenzmarkierung

Die polychrome Sequenzmarkierung hat das Ziel, die Kinetik der Frakturheilung durch die Applikation von Fluorochromen in bestimmten Zeitintervallen sichtbar zu machen, so dass eine Aussage darüber möglich ist, zu welchem Zeitpunkt sich Kallus in welchem Maße bildet.

Betrachtet man die drei verschiedenen Färbungen, so zeigt sich für den Zeitraum von Tag 0 bis 23 nach der Osteotomie und der Färbung mit Calceingrün eine Kallusfläche von ca. 0,6 und 1,5 mm² und damit ca. 10-20 % der gesamten markierten Kallus-Fläche. Für die Färbung mit Alizarinkomplexon zeigt sich eine Fläche zwischen 1 und 1,8 mm², was einem Anteil von 15-25 % entspricht (zwischen Tag 24 und Tag 33. Ein erhöhter Anteil zwischen 25-40 % bzw. 2-2,5 mm² zeigt sich für die Zeit bis zum 43. Tag in der Tetracyclinhydrochlorid-Färbung. Damit scheint der überwiegende Anteil des kalzifizierten Kallus erst zwischen Tag 34 und 43 zu entstehen. Dies entspricht dem Reparaturstadium der Frakturheilung, welche sich grob in drei verschiedene Phasen einteilen lässt. Darauf folgt das Stadium des *remodelings*, in welchem der Geflechtknochen in lamellären Knochen umgebaut wird (Komrakova et al. 2009).

Nach Auswertung der Ergebnisse konnte eine signifikante Reduktion der gesamten Fluorochrom-gefärbten Fläche in der ORX-Gruppe gegenüber der Non-ORX-Gruppe nachgewiesen werden. In anderen Untersuchungen am orchiektomierten Rattenmodell konnte nachgewiesen werden, dass insbesondere die frühe Knochenheilung im osteoporotischen Knochenmodell eingeschränkt ist und die Heilung erst verzögert eintritt (Namkung-Matthai et al. 2001; Komrakova et al. 2010; Brandi 2012).

Auch in unserem Versuch wurde die frühe Kallusbildung (Tag 0 bis 23) am meisten beeinflusst. Hier zeigten SARM_Pr und TP_Pr signifikante Erhöhungen der gesamten Kallusfläche, wobei dies bei TP_Pr überwiegend den dorsalen Kallus betraf und bei SARM_Pr den ventralen. Vergleichbare Ergebnisse mit einer signifikanten Erhöhung der frühen Kallusbildung konnten in unserer Arbeitsgruppe bereits nachgewiesen werden, diese jedoch am weiblichen Tiermodell mit einer Enobosarm-Aufnahme von 4 mg/kg KG (Komrakova et al. 2020). Insbesondere in der Frühphase nach der Fraktur scheinen also die von uns verabreichten Wirkstoffe in den Gruppen SARM_Pr und TP_Pr einen Effekt zur Abschwächung der osteoporotischen Einflüsse auf den Knochen zu erzielen.

Im Zeitraum zwischen Tag 23 und 32 führte die Behandlung der TP_Th-Gruppe zu vermehrter Kallusbildung, wobei hier ebenfalls die Kallusbildung auf der dorsalen Bruchspaltseite überwog. Auch die gebildete Kallusfläche in ORX war signifikant erniedrigt gegenüber der Kontrollgruppe Non-ORX, so dass auch in diesem Zeitraum die Kallusbildung durch die Osteoporose weiterhin deutlich beeinträchtigt war.

Zwischen Tag 33 und 43 ließen sich kaum noch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen nachweisen, insbesondere auch nicht von ORX gegenüber Non-ORX, so dass hier trotz fehlendem Testosteron bzw. Testosteronersatzes eine ähnliche Kallusbildung stattfand. Dies unterstützt erneut die Aussage, dass die Osteoporose insbesondere die frühe Frakturheilung beeinflusst (Brandi 2012)

Über den gesamten Untersuchungszeitraum betrachtet zeigt sich damit, dass eine Testosteron-Therapie oder -Prophylaxe sowie eine SARM-Prophylaxe einen deutlichen Vorteil für die frühe Frakturheilung zeigen. Eine reine post-operative SARM-Therapie scheint keinen ausreichenden Effekt auf die frühe Kallusbildung des Bruchspaltes zu haben. Zieht man die Ergebnisse der Mikroradiographie hinzu, so lässt sich hier sogar ein negativer Effekt nachweisen. In Voruntersuchungen der Abteilung zeigte sich im weiblichen Tiermodell bereits, dass eine SARM-Therapie nach durchgeführter Osteosynthese im ovariektomierten Rattenmodell erst ab einer höheren Dosierung einen Vorteil erbringt (Komrakova et al. 2020). In diesem Versuch wurde nachgewiesen, dass bei frühzeitiger prophylaktischer Gabe des

SARMs eine vermehrte frühe Kallusbildung erfolgte. Damit zeigt sich nun auch ein positiver Effekt des Enobosarms auf die Frakturheilung im männlichen Tiermodell, wenngleich es einer präventiv begonnenen Prophylaxe-Therapie bedarf, um ähnliche Ergebnisse wie in der Non-ORX-Kontrollgruppe und den Testosteron-behandelten Gruppen zu erreichen.

4.7 Schlussfolgerung

Eine Behandlung mit Testosteron als Prophylaxe oder Therapie und der Einsatz von SARMs in prophylaktischer Form scheinen einen positiven Effekt auf die Frakturheilung zu haben. Insbesondere für Testosteron ließen sich positive Effekte auf Kortikalisdicke und Kallusbildung finden. Durch eine kontinuierliche Prophylaxe mit Enobosarm zeigten sich jedoch ebenfalls positive Effekte wie eine vergrößerte Kallusfläche, insbesondere in den ersten Wochen nach der Frakturheilung, sowie eine erhöhte Kallus-Dichte. Zu beachten ist bei SARM_Pr jedoch, dass sich hier ein signifikant erhöhtes Prostata-Gewicht gegenüber den anderen orchietomierten Gruppen messen ließ. Für eine reine postoperative Therapie mit Enobosarm (SARM_Th) zeigten sich eine verringerte Kallusbildung und -dichte, insbesondere in den ersten Wochen nach der Fraktur, so dass hier von einem negativen Effekt auf die Frakturheilung auszugehen ist. Die strukturellen Änderungen im Knochen konnten im biomechanischen Test aufgrund von hohen Standardabweichungen nicht mit ausreichender Signifikanz nachgewiesen werden.

Überträgt man diese Ergebnisse auf das klinische Problem der osteoporotischen Frakturen beim Mann, so scheint eine Enobosarm-Prophylaxe eine Möglichkeit zu sein, die BMD dauerhaft zu erhöhen und damit gegebenenfalls prophylaktisch Frakturen vorzubeugen, wobei die Erhöhung des Prostatagewichtes bedacht werden muss. Gleiches gilt für eine Testosteron-Substitutionstherapie, zumindest unter Berücksichtigung der potenziellen Nebenwirkungen. Im Hinblick auf die bestehende Wahrscheinlichkeit zwischen 10 % und 25 % eines jeden Mannes, im Leben eine osteoporotische Fraktur zu erleiden, so ergäbe sich hieraus eine deutliche klinische Signifikanz (Burge et al. 2007; Adler 2014). Eine Therapie mit Enobosarm erst nach abgelaufener Fraktur ist unter der Berücksichtigung der hier dargestellten Ergebnisse nicht empfehlenswert.

5 Zusammenfassung

Osteoporose und osteoporotisch bedingte Frakturen nehmen einen großen Stellenwert in den Erkrankungen des älteren Menschen ein. Bei der Frau ist die Osteoporose als Erkrankung lange bekannt, gut untersucht und es gibt verschiedene Therapiemöglichkeiten. Beim Mann ist diese Erkrankung lange unbeachtet geblieben, so dass selbst die Diagnosestellung lange nicht nach festgelegten Kriterien erfolgte. In diesem tierexperimentellen Versuch sollten demnach Therapiemöglichkeiten zur metaphysären Frakturheilung am männlichen, osteoporotischen Tiermodell untersucht werden.

Für den Versuch wurden 90 8-Monate alte männliche Ratten in sechs Gruppen ($n = 15$) aufgeteilt und erhielten verschiedene Behandlungsregime. Gruppe 1 (Non-ORX) wurde nicht orchiektomiert und blieb unbehandelt. Gruppe 2 (ORX) wurde orchiektomiert und blieb ebenfalls unbehandelt. Gruppen 3 (SARM_Th) und 4 (SARM_Pr) wurden orchiektomiert und erhielten eine Behandlung mit Enobosarm. Gruppen 5 (TP_Th) und 6 (TP_Pr) wurden ebenfalls orchiektomiert und erhielten eine Behandlung mit Testosteron. Die Behandlungen mit Enobosarm (Biochempartner©, Distributor Hölzel Diagnostika, Köln, Deutschland) bzw. Testosteronpropionat (Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika) wurden als Therapie (Th) der Osteoporose (12 Wochen nach der Orchiektomie über 6 Wochen) oder als Prophylaxe (Pr) der Osteoporose (unmittelbar nach ORX über 18 Wochen) angewendet. TP und SARM wurden dem sojafreien Futter beigemischt und den Tieren verabreicht. Die tägliche Dosis pro Tier betrug bei Enobosarm $0,35 \pm 0,06$ mg/kg KG, bei Testosteronpropionat 41 ± 8 mg/kg KG. Allen Tieren stand entmineralisiertes Wasser und sojafreies Futter frei zur Verfügung. Zwölf Wochen nach der Orchiektomie erfolgte eine beidseitige metaphysäre Osteotomie der Tibiae in allen Tieren. Mithilfe einer Ultraschallsäge wurde ein 0,5 mm dicker transversaler Bruchspalt gesetzt und mittels 5-Loch-Leibinger-T-Platte und 4 Schrauben fixiert. Für die polychrome Sequenzmarkierung des neugebildeten Kallus erhielten die Tiere subkutane Injektionen mit Calceingrün (10 mg/kg), Alizarinkomplexon (30 mg/kg) und Tetracyclhydrochlorid (10 mg/kg) am 23., 33. und 43. Tag nach der Osteosynthese.

Aufgrund von peri- und post-operativen Todesfällen verkleinerten sich im Laufe des Experiments die Gruppengrößen (Non-ORX: 12 Tiere, ORX: 8 Tiere, SARM_Th: 7 Tiere, SARM_Pr: 9 Tiere, TP_Th: 5 Tiere, TP_Pr: 9 Tiere). Nach der Obduktion der Versuchstiere wurden die Tibiae gesammelt und mikroradiographisch, biomechanisch und histomorphologisch untersucht. Weiterhin erfolgte die Bestimmung von Prostatagewichten und verschiedenen Serumparametern wie der alkalischen Phosphatase (AP), des *cross linked C-telopeptide of*

Type-I Collagen (CTX-I) und des Osteocalcins. Futteraufnahme und Körpergewicht wurden wöchentlich dokumentiert und ebenfalls statistisch untersucht. In der Untersuchung mittels Mikro-CT konnten positive Effekte auf die Knochenheilung für TP_Th, TP_Pr sowie für SARM_Pr nachgewiesen werden. Während für SARM_Pr hier insbesondere eine Erhöhung der Kallusdichte nachzuweisen war, so zeigten TP_Th und TP_Pr vermehrtes Kallusvolumen. In den histologischen Untersuchungen konnte ein positiver Effekt von Enobosarm und Testosteron als prophylaktische Behandlung auf die frühe Kallusbildung aufgezeigt werden. Zusätzlich war die Kallus-Dichte erniedrigt und die Überbrückung des Osteotomiespaltes für SARM_Th verzögert, so dass hier ein negativer Effekt auf die Frakturheilung anzunehmen war. Biomechanische Eigenschaften der Tibiae an der Osteotomieseite unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen.

In der Untersuchung der Prostata-Gewichte zeigte sich diesbezüglich ein signifikant erhöhtes Gewicht für SARM_Pr gegenüber ORX, während dies in anderen Studien zu SARMs bisher nicht berichtet wurde. Eine Wirkung von Testosteron auf das Prostatagewicht konnte nicht nachgewiesen werden. Während sich für die Nahrungsaufnahme keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten, so waren die Körpergewichte aller orchiectomierten Gruppen signifikant reduziert gegenüber Non-ORX. Für die AP und CTX-I im Serum konnten keine relevanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen aufgezeigt werden, das Osteocalcin war in den SARM-behandelten Gruppen signifikant verringert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Testosteron-Behandlung bei osteoporotischen Frakturen sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch eine grundsätzliche Therapieoption darstellt, hier sind jedoch das ausgeprägte Nebenwirkungs- und Risikoprofil einer dauerhaften Testosteron-Substitution zu beachten. Enobosarm als prophylaktische Behandlung (SARM-Pr) scheint hier eine potentielle Alternative für die Osteoporosetherapie und Frakturheilung des älteren Mannes zu sein, wobei die potentiellen Wirkungen auf die Prostata beachtet und weitergehend erforscht werden sollten. Aufgrund der negativen Effekte einer Therapie mit Enobosarm (SARM_Th) auf die Knochenheilung ist eine solche Behandlung basierend auf den hier erhobenen Ergebnissen nicht zu empfehlen.

Abschließend lässt sich formulieren, dass selektive Androgen-Rezeptormodulatoren weiterhin eine potentielle Therapieoption zur Behandlung/Prävention von osteoporotischen Frakturen bei männlichen Individuen sind und hier sicher weiterer Forschungsbedarf und weiteres Forschungsinteresse besteht.

6 Anhang

Tabelle A1: Messwerte der Tiergewichte und täglichen Nahrungsaufnahme (*mean+SEM*); a= signifikant zu Non-ORX; ***= $p < 0,001$

Parameter	Non-ORX	ORX	SARM_Th	SARM_Pr	TP_Th	TP_Pr
Tiergewichte über den gesamten Versuchszeitraum in g	712,000 ±6,446	653,700 ±7,310 a***	649,500 ±5,606 a***	663,800 ±6,651 a***	665,500 ±5,647 a***	649,100 ±6,079 a***
Nahrungsaufnahme in g/Tag	28,82 ±1,906	28,03 ±1,954	28,30 ±1,736	28,59 ±2,028	29,01 ±1,996	27,75 ±2,160

Tabelle A2: Messwerte von Prostatagewicht und Serumuntersuchungen (*mean+SEM*); a= signifikant zu Non-ORX; b= signifikant zu ORX; e= signifikant zu TP_Th; f= signifikant zu TP_Pr; *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$ ***= $p < 0,001$

Parameter	Non-ORX	ORX	SARM_Th	SARM_Pr	TP_Th	TP_Pr
Prostatagewicht in g	1,219 ±0,085	0,1763 ±0,025 a***	0,286 ±0,032 a***	0,617 ±0,043 a***, b***, e**, f*	0,192 ±0,031 a***	0,334 ±0,044 a***
Alkalische Phosphatase im Serum in U/l	174,900 ±16,500	133,700 ±12,670	194,200 ±17,660	172,900 ±23,560	147,200 ±15,590	150,600 ±9,293
Osteocalcin im Serum in ng/ml	174,500 ±9,052	207,600 ±20,530	123,400 ±10,130 b***, e**	138,900 ±9,992 b**, e*	200,400 ±14,540	186,600 ±15,540
CTX-I-Gehalt im Serum in ng/ml	16,730 ±1,254	18,100 ±1,606	16,600 ±0,538	16,870 ±1,578	18,850 ±1,172	19,620 ±0,786

Tabelle A3: Messwerte des biomechanischen Tests (*mean+SEM*). Keine signifikanten Unterschiede.

Parameter	Non-ORX	ORX	SARM_Th	SARM_Pr	TP_Th	TP_Pr
Maximalkraft (Fmax) in N	57,170 ±8,119	44,380 ±4,847	80,390 ±22,290	74,720 ±16,250	64,230 ±7,506	58,170 ±7,014
Steigung in N/mm	74,910 ±7,292	75,180 ±10,800	65,630 ±14,260	89,360 ±11,520	81,990 ±16,590	63,820 ±7,750
Yield load in N	56,200 ±8,096	43,820 ±4,784	79,090 ±22,100	73,270 ±15,730	62,710 ±7,122	57,490 ±7,031

Tabelle A4: Messwerte der Mikro-CT-Untersuchung (*mean+SEM*); a= signifikant zu Non-ORX; b= signifikant zu ORX; *= p<0,05; **= p<0,01 ***= p<0,001

Parameter	Non-ORX	ORX	SARM_Th	SARM_Pr	TP_Th	TP_Pr
Dichte des kalzifizierten Kallus im Osteotomiespalt in g/cm ³	0,506 ±0,004	0,480 ±0,006 a***	0,490 ±0,005	0,4987 ±0,004 b*	0,4846 ±0,006	0,4934 ±0,004
Volumen des kalzifizierten Kallus im Osteotomiespalt in mm ³	69,240 ±6,579	81,110 ±7,727	92,650 ±8,744	89,510 ±7,603	109,400 ±7,843 a*	97,710 ±7,132 a*
Dichte der Kortikalis im Osteotomiespalt in g/cm ³	1,190 ±0,010	1,181 ±0,008	1,177 ±0,013	1,146 ±0,010 a*	1,193 ±0,010	1,178 ±0,012
Volumen der Kortikalis im Osteotomiespalt in mm ³	38,230 ±3,325	42,020 ±3,103	49,270 ±1,347	43,380 ±3,290	50,480 ±2,343	47,260 ±2,224
Dichte der Weichteile im Osteotomiespalt in g/cm ³	0,080 ±0,005	0,070 ±0,005	0,083 ±0,006	0,089 ±0,003	0,091 ±0,004	0,088 ±0,004
Volumen der Weichteile im Osteotomiespalt in mm ³	70,170 ±5,800	98,630 ±7,600	98,510 ±9,526	90,890 ±8,819	91,360 ±6,821	93,23 ±7,563
Dichte der Knochenbestandteile (Kortikalis und kalzifizierter Kallus) im Osteotomiespalt in g/cm ³	0,752 ±0,012	0,727 ±0,010	0,741 ±0,020	0,715 ±0,014	0,712 ±0,015	0,726 ±0,018
Volumen der Knochenbestandteile (Kortikalis und kalzifizierter Kallus) im Osteotomiespalt in mm ³	107,400 ±9,200	123,200 ±10,400	141,900 ±9,568	133,000 ±9,973	159,800 ±9,534 a**	145,000 ±7,928 a*
Errechnete <i>bone volume fraction</i> (BV/TV) in %	22,020 ±1,255	19,960 ±0,914	21,620 ±1,188	20,140 ±1,526	20,470 ±1,172	21,040 ±1,510

Tabelle A5: Messwerte der Mikroradiographie (*mean*+*SEM*); a= signifikant zu Non-ORX; b= signifikant zu ORX; *= p<0,05; **= p<0,01 ***= p<0,001

Parameter	Non-ORX	ORX	SARM_Th	SARM_Pr	TP_Th	TP_Pr
Anteil des ventralen Kallus in %	73,710 ±3,093	63,000 ±3,229	68,96 ±2,713	74,730 ±4,722	64,900 ±3,317	61,010 ±3,393
Anteil des dorsalen Kallus in %	67,630 ±4,233	61,620 ±3,498	52,740 ±3,358 a*	64,980 ±5,184	60,210 ±3,329	58,230 ±2,420
Anteil des endostalen Kallus in %	88,730 ±0,951	78,110 ±2,365	67,420 ±3,369 a***	69,900 ±4,602 a**	69,600 ±3,888 a***	70,510 ±2,913 a***
Dicke des ventralen Kallus in mm	0,553 ±0,073	0,422 ±0,064	0,352 ±0,044	0,440 ±0,068	0,466 ±0,075	0,536 ±0,050
Dicke des dorsalen Kallus in mm	0,922 ±0,100	0,702 ±0,071	0,988 ±0,140	0,799 ±0,125	0,929 ±0,122	1,096 ±0,097
Anteil der ventralen Kortikalis distal vom Osteotomiespalt in %	99,070 ±0,262	98,730 ±0,261	99,060 ±0,258	99,050 ±0,364	99,030 ±0,277	98,570 ±0,263
Anteil der dorsalen Kortikalis distal vom Osteotomiespalt in %	99,410 ±0,121	98,980 ±0,230	98,790 ±0,187	99,230 ±0,142	99,460 ±0,215	99,180 ±0,196
Dicke der ventralen Kortikalis distal vom Osteotomiespalt in mm	0,505 ±0,033	0,528 ±0,025	0,493 ±0,026	0,528 ±0,045	0,577 ±0,031	0,561 ±0,026
Dicke der dorsalen Kortikalis distal vom Osteotomiespalt in mm	0,583 ±0,272	0,489 ±0,036	0,532 ±0,021	0,520 ±0,028	0,671 ±0,045 b*	0,632 ±0,042 b*

Tabelle A6: Messwerte der polychromen Sequenzmarkierung mit Calceingrün (*mean+SEM*); a= signifikant zu Non-ORX; b= signifikant zu ORX; c= signifikant zu SARM_Th; *= p<0,05; **= p<0,01 ***= p<0,001

Parameter	Non-ORX	ORX	SARM_Th	SARM_Pr	TP_Th	TP_Pr
Markierte Fläche des ventralen Kallus mit CG-Färbung in mm ²	0,305 ±0,049	0,109 ±0,029 a*	0,116 ±0,023	0,356 ±0,081 b*, c*	0,241 ±0,071	0,186 ±0,044
Markierte Fläche des endostalen Kallus mit CG-Färbung in mm ²	0,682 ±0,113	0,388 ±0,077	0,396 ±0,082	0,787 ±0,203	0,601 ±0,067	0,703 ±0,089
Markierte Fläche des dorsalen Kallus mit CG-Färbung in mm ²	0,411 ±0,065	0,165 ±0,031	0,283 ±0,054	0,434 ±0,134	0,521 ±0,110	0,670 ±0,105 b***, c*
Markierte Fläche des gesamten Kallus mit CG-Färbung in mm ²	1,361 ±0,162	0,648 ±0,096 a*	0,772 ±0,068	1,548 ±0,357 b**, c*	1,331 ±0,206	1,536 ±0,143 b***, c*
Markierter Anteil der ventralen Kallusfläche mit CG-Färbung in %	15,500 ±3,057	7,207 ±1,302	11,610 ±2,489	19,040 ±3,399 b*	9,525 ±1,968	9,330 ±1,933
Markierter Anteil der endostalen Kallusfläche mit CG-Färbung in %	11,630 ±1,346	13,380 ±3,321	10,780 ±2,230	14,270 ±3,049	12,560 ±1,792	18,680 ±2,000
Markierter Anteil der dorsalen Kallusfläche mit CG-Färbung in %	14,610 ±2,009	7,722 ±1,038	9,560 ±1,540	16,170 ±2,477 b*	14,060 ±2,388	15,54 ±1,880 b*

Tabelle A7: Messwerte der polychromen Sequenzmarkierung mit Alizarinkomplexon (*mean*+*SEM*); a= signifikant zu Non-ORX; b= signifikant zu ORX; c= signifikant zu SARM_Th; d= signifikant zu SARM_Pr; e= signifikant zu TP_Th; *= p<0,05; **= p<0,01 ***= p<0,001

Parameter	Non-ORX	ORX	SARM_Th	SARM_Pr	TP_Th	TP_Pr
Markierte Fläche des ventralen Kallus mit AK-Färbung in mm ²	0,4117 ±0,078	0,2244 ±0,038	0,205 ±0,051	0,294 ±0,060	0,348 ±0,109	0,267 ±0,048
Markierte Fläche des endostalen Kallus mit AK-Färbung in mm ²	0,949 ±0,076	0,606 ±0,095	0,574 ±0,124	0,719 ±0,075	1,069 ±0,190 b*, c*	0,489 ±0,060 a*, e**
Markierte Fläche des dorsalen Kallus mit AK-Färbung in mm ²	0,310 ±0,033	0,221 ±0,030	0,299 ±0,043	0,231 ±0,058	0,407 ±0,068	0,534 ±0,070 a*, b*** c*, d**
Markierte Fläche des gesamten Kallus mit AK-Färbung in mm ²	1,670 ±0,090	1,051 ±0,094 a**	1,078 ±0,130 a*	1,220 ±0,133	1,800 ±0,210 b***, c**	1,289 ±0,104 e*
Markierter Anteil der ventralen Kallusfläche mit AK-Färbung in %	21,830 ±4,803	17,300 ±1,482	16,060 ±2,264	14,470 ±2,555	14,500 ±2,220	15,360 ±1,818
Markierter Anteil der endostalen Kallusfläche mit AK-Färbung in %	18,490 ±1,237	13,720 ±1,601	12,730 ±1,510	14,560 ±1,302	19,600 ±2,494 c*	12,250 ±1,072 a*, e*
Markierter Anteil der dorsalen Kallusfläche mit AK-Färbung in %	11,830 ±1,519	12,280 ±1,427	9,707 ±0,894	13,450 ±2,203	10,840 ±0,919	13,730 ±1,605

Tabelle A8: Messwerte der polychromen Sequenzmarkierung mit Tetracyclinhydrochlorid (*mean*+*SEM*); a= signifikant zu Non-ORX; c= signifikant zu SARM_Th; *= $p < 0,05$

Parameter	Non-ORX	ORX	SARM_Th	SARM_Pr	TP_Th	TP_Pr
Markierte Fläche des ventralen Kallus mit TC-Färbung in mm ²	0,557 ±0,124	0,467 ±0,057	0,300 ±0,045	0,430 ±0,052	0,677 ±0,085 c*	0,529 ±0,071
Markierte Fläche des endostalen Kallus mit TC -Färbung in mm ²	1,373 ±0,119	1,020 ±0,152	1,012 ±0,247	1,324 ±0,157	1,102 ±0,113	1,050 ±0,094
Markierte Fläche des dorsalen Kallus mit TC -Färbung in mm ²	0,608 ±0,068	0,462 ±0,069	0,703 ±0,145	0,391 ±0,101	0,777 ±0,122	0,744 ±0,076
Markierte Fläche des gesamten Kallus mit TC -Färbung in mm ²	2,539 ±0,185	1,949 ±0,164	2,016 ±0,256	2,146 ±0,255	2,557 ±0,193	2,324 ±0,151
Markierter Anteil der ventralen Kallusfläche mit TC -Färbung in %	23,980 ±3,644	40,230 ±3,007 a*	26,480 ±3,264	29,170 ±6,271	39,100 ±5,205	34,050 ±2,633
Markierter Anteil der endostalen Kallusfläche mit TC -Färbung in %	27,470 ±2,331	25,260 ±2,110	26,270 ±3,930	26,450 ±2,569	21,330 ±1,421	28,460 ±2,611
Markierter Anteil der dorsalen Kallusfläche mit TC -Färbung in %	22,530 ±2,608	27,040 ±3,266	24,960 ±2,880	17,430 ±2,378	21,670 ±2,129	20,030 ±1,357

Tabelle A9: Messwerte der polychromen Sequenzmarkierung mit allen Fluorochromen (*mean*+*SEM*); a= signifikant zu Non-ORX; b= signifikant zu ORX; d= signifikant zu SARM_Pr; *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$ ***= $p < 0,001$

Parameter	Non-ORX	ORX	SARM_Th	SARM_Pr	TP_Th	TP_Pr
Markierte Fläche des ventralen Kallus mit Fluorochrom-Färbung in mm ²	2,285 ±0,354	1,259 ±0,181 a*	1,121 ±0,162 a*	1,803 ±0,229	2,050 ±0,345	1,750 ±0,231
Markierte Fläche des endostalen Kallus mit Fluorochrom-Färbung in mm ²	5,526 ±0,565	3,985 ±2,212	4,052 ±0,599	5,082 ±0,535	5,141 ±0,395	3,759 ±0,252
Markierte Fläche des dorsalen Kallus mit Fluorochrom-Färbung in mm ²	2,787 ±0,202	1,914 ±0,237	2,981 ±0,335	2,167 ±0,507	3,739 ±0,473 b**	3,868 ±0,390 b***, d*
Markierte Fläche des gesamten Kallus mit Fluorochrom-Färbung in mm ²	10,600 ±0,895	7,157 ±0,622 a*	8,154 ±0,798	9,052 ±1,096	10,93 ±0,763 b**	9,376 ±0,541

7 Literaturverzeichnis

- Adler RA (2014): Osteoporosis in men: a review. *Bone Res* 2, 14001
- Almeida M, Laurent MR, Dubois V, Claessens F, O'Brien CA, Bouillon R, Vanderschueren D, Manolagas SC (2017): Estrogens and androgens in skeletal physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 97, 135–187
- Anastasilakis A (2012): Long-term treatment of osteoporosis: safety and efficacy appraisal of denosumab. *Ther Clin Risk Manag* 8, 295–306
- Arisaka O, Arisaka M, Nakayama Y, Fujiwara S, Yabuta K (1995): Effect of testosterone on bone density and bone metabolism in adolescent male hypogonadism. *Metabolism* 44, 419–423
- Augat P, Burger J, Schorlemmer S, Henke T, Peraus M, Claes L (2003): Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model. *J Orthop Res* 21, 1011–1017
- Augat P, Simon U, Liedert A, Claes L (2005): Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. *Osteoporos Int* 16, 36–43
- Behm B, Stollman N (2003): Postoperative ileus: Etiologies and interventions. *Clin Gastroenterol Hepatol* 1, 71–80
- Behrens JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, Hoth M, Kurtz A, Leipziger J, Müller F et al.: *Duale Reihe Physiologie*. 1. Auflage; 2010, 413–421
- Brandi ML (2009): Microarchitecture, the key to bone quality. *Rheumatology* 48, 3–8
- Brandi ML (2012): Drugs for bone healing. *Expert Opin Investig Drugs* 21, 1169–1176
- Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Wong JB, King A, Tosteson A (2007): Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005–2025. *J Bone Miner Res* 22, 465–475
- Cao Y, Mori S, Mashiba T, Westmore MS, Ma L, Sato M, Akiyama T, Shi L, Komatsubara S, Miyamoto K et al. (2002): Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 17, 2237–2246
- Chang CY, McDonnell DP (2002): Evaluation of ligand-dependent changes in AR structure using peptide probes. *Molecular Endocrinology* 16, 647–660

- Cheng BH, Chu TMG, 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**, e70234
- Cheung WH, Miclau T, Chow SKH, Yang FF, Alt V (2016): Fracture healing in osteoporotic bone. *Injury* **47**, 21–26
- Christiansen AR, Lipschultz LI, Hotaling JM, Pastuszak AW (2020): Selective androgen receptor modulators: the future of androgen therapy? *Transl Androl Urol* **9**, 135–148
- Clarke BL (2008): Effect of recombinant human parathyroid hormone (1-84) on vertebral fracture and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis: a randomized trial. *Yearb Endocrinol* **2008**, 221–223
- Corona G, Vignozzi L, Sforza A, Maggi M (2013): Risks and benefits of late onset hypogonadism treatment: an expert opinion. *World J Mens Health* **31**, 103
- Cosman F, Crittenden DB, Adachi JD, Binkley N, Czerwinski E, Ferrari S, Hofbauer LC, Lau E, Lewiecki EM, Miyauchi A, et al. (2016): Romosozumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* **375**, 1532–1543
- Coss CC, Jones A, Dalton JT (2016): Pharmacokinetic drug interactions of the selective androgen receptor modulator GTx-024(Enobosarm) with itraconazole, rifampin, probenecid, celecoxib and rosuvastatin. *Invest New Drugs* **34**, 458–467
- Dalton JT, Mukherjee A, Zhu Z, Kirkovsky L, Miller DD (1998): Discovery of nonsteroidal androgens. *Biochem Biophys Res Commun* **244**, 1–4
- Dalton JT, Barnette KG, Bohl CE, Hancock ML, Rodriguez D, Dodson ST, Morton RA, Steiner MS (2011): The selective androgen receptor modulator GTx-024 (enobosarm) improves lean body mass and physical function in healthy elderly men and postmenopausal women: results of a double-blind, placebo-controlled phase II trial. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **2**, 153–161
- Davey RA, Grossmann M (2016): Androgen receptor structure, function and biology: From bench to bedside. *Clin Biochem Rev* **37**, 3-15
- Dobs AS, Boccia RV, Croot CC, Gabrail NY, Dalton JT, Hancock ML, Johnston MA, Steiner MS (2013): Effects of enobosarm on muscle wasting and physical function in patients with cancer: a double-blind, randomised controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol* **14**, 335–345
- DVO-Leitlinie 2017 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen und bei Männern. Dachverband Osteologie e.V., o. O. 2009 (URL: https://dv-osteologie.org/uploads/Leitlinie%202017/Finale%20Version%20Leitlinie%20Osteoporose%202017_end.pdf)

-
- Ebeling P (2008): Osteoporosis in men: its pathophysiology and the role of teriparatide in its treatment. *Clin Interv Aging* 3, 635–645
- Einhorn TA (2005): The science of fracture healing: *J Orthop Trauma* 19, 4–6
- Ekeland A, Engesaeter LB, Langeland N (1981): Mechanical properties of fractured and intact rat femora evaluated by bending, torsional and tensile tests. *Acta Orthop Scand* 52, 605–613
- Finkelstein JS, Lee H, Burnett-Bowie S-AM, Pallais JC, Yu EW, Borges LF, Jones BF, Barry CV, Wulczyn KE, Thomas BJ et. al (2013): Gonadal steroids and body composition, strength, and sexual function in men. *N Engl J Med* 369, 1011–1022
- Furuya K, Yamamoto N, Ohyabu Y, Morikyu T, Ishige H, Albers M, Endo Y (2013): Mechanism of the tissue-specific action of the selective androgen receptor modulator S-101479. *Biol Pharm Bull* 36, 442–451
- Gao W, Kearbey JD, Nair VA, Chung K, Parlow AF, Miller DD, Dalton JT (2004): Comparison of the pharmacological effects of a novel selective androgen receptor modulator, the 5 α -reductase inhibitor finasteride, and the antiandrogen hydroxyflutamide in intact rats: new approach for benign prostate hyperplasia. *Endocrinology* 145, 5420–5428
- Gao W, Reiser PJ, Coss CC, Phelps MA, Kearbey JD, Miller DD, Dalton JT (2005): Selective androgen receptor modulator treatment improves muscle strength and body composition and prevents bone loss in orchidectomized rats. *Endocrinology* 146, 4887–4897
- Gao W, Bohl CE, Dalton JT (2007): Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem Rev* 105, 3352–3370
- Gao W, Dalton JT (2007): Ockham's razor and selective androgen receptor modulators (SARMs): are we overlooking the role of 5 α -reductase? *Mol Interv* 8, 10–13
- Garber K (2016): No longer going to waste. *Nat Biotechnol* 34, 458–461
- 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
- Ghiasi MS, Chen J, Vaziri A, Rodriguez EK, Nazarian A (2017): Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. *Bone Rep* 6, 87–100
- Gooren LJG, Bunck MCM (2004): Androgen Replacement Therapy. *Drugs* 64, 1861–1891
- Grech A, Breck J, Heidelbaugh J (2014): Adverse effects of testosterone replacement therapy: an update on the evidence and controversy. *Ther Adv Drug Saf* 5, 190–200

-
- Gruenewald DA, Matsumoto AM (2003): Testosterone supplementation therapy for older men: potential benefits and risks. *J Am Geriatr Soc* 51, 101–115
- Hanada K, Furuya K, Yamamoto N, Nejishima H, Ichikawa K, Nakamura T, Miyakawa M, Amano S, Sumita Y, Oguro N (2003): Bone anabolic effects of S-40503, a novel nonsteroidal selective androgen receptor modulator (SARM), in rat models of osteoporosis. *Biol Pharm Bull* 26, 1563–1569
- Hanley DA, Adachi JD, Bell A, Brown V (2012): Denosumab: mechanism of action and clinical outcomes. *Int J Clin Pract* 66, 1139–1146
- Häussler B, Gothe H, Göl D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D (2007): Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany—the BoneEVA study. *Osteoporos Int* 18, 77–84
- Heinlein CA, Chang C (2002): Androgen Receptor (AR) Coregulators: An overview. *Endocrine Reviews* 23, 175–200
- Henkies D: Der Einfluss des selektiven Androgenrezeptor-Modulators Enobosarm auf die Skelettmuskulatur im Modellorganismus der osteoporotischen Ratte. Med. Diss. Göttingen 2020
- Hoffmann DB, Komrakova M, Pflug S, von Oertzen M, Saul D, Weiser L, Walde TA, Wassmann M, Schilling AF, Lehmann W, Schmisch S (2019): Evaluation of ostarine as a selective androgen receptor modulator in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 37, 243–255
- Horn F: *Biochemie des Menschen*. 4. Auflage; Thieme 2009, 398–400
- Isidori AM, Giannetta E, Greco EA, Gianfrilli D, Bonifacio V, Isidori A, Lenzi A, Fabbri A (2005): Effects of testosterone on body composition, bone metabolism and serum lipid profile in middle-aged men: a meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 63, 280–293
- Kanis JA (1994): World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Technical report series. Geneva, WHO
- Kasperk C, Helmboldt A, Börcsök I, Heuthe S, Cloos O, Niethard F, Ziegler R (1997): Skeletal site-dependent expression of the androgen receptor in human osteoblastic cell populations. *Calcif Tissue Int* 61, 464–473
- Kawano H, Sato T, Yamada T, Matsumoto T, Sekine K, Watanabe T, Nakamura T, Fukuda T, Yoshimura K, Yoshizawa T, et al. (2003): Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc Natl Acad Sci* 100, 9416–9421

- Kearbey JD, Wu D, Gao W, Miller DD, Dalton JT (2004): Pharmacokinetics of *S*-3-(4-acetylamino-phenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-N-(4-nitro-3-trifluoromethyl-phenyl)-propionamide in rats, a non-steroidal selective androgen receptor modulator. *Xenobiotica* 34, 273–280
- Kearbey JD, Gao W, Narayanan R, Fisher SJ, Wu D, Miller DD, Dalton JT (2007): Selective androgen receptor modulator (SARM) treatment prevents bone loss and reduces body fat in ovariectomized rats. *Pharm Res* 24, 328–335
- Kearbey JD, Gao W, Fisher SJ, Wu D, Miller DD, Dalton JT (2009): Effects of selective androgen receptor modulator (SARM) treatment in osteopenic female rats. *Pharm Res* 26, 2471–2477
- Kelly DM, Jones TH (2013): Testosterone: a metabolic hormone in health and disease. *J Endocrinol* 217, 25–45
- Kennel KA, Drake MT (2009): Adverse effects of bisphosphonates: Implications for osteoporosis management. *Mayo Clin Proc* 84, 632–638
- Khosla S (2010): Update in male osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 3–10
- Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, Gagel RF, Gilsanz V, Guise T, Koka S, et al. (2007): Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the american society for bone and mineral research. *J Bone Miner Res* 22, 1479–1491
- Kohn DF, Martin TE, Foley PL, Morris TH, Swindle MM, Vogler GA, Wixson SK (2007): Guidelines for the assessment and management of pain in rodents and rabbits. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 46, 97–108
- Komrakova M, Werner C, Wicke M, Nguyen BT, Sehmisch S, Tezval M, Stuermer KM, Stuermer EK (2009): Effect of daidzein, 4-methylbenzylidene camphor or estrogen on gastrocnemius muscle of osteoporotic rats undergoing tibia healing period. *J Endocrinol* 201, 253–262
- Komrakova M, Stuermer EK, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmisch S, Tezval M, Daub F, Martens T, Witzhausen P, et al. (2010): Effect of human parathyroid hormone hPTH (1–34) applied at different regimes on fracture healing and muscle in ovariectomized and healthy rats. *Bone* 47, 480–492
- Komrakova M, Krischek C, Wicke M, Sehmisch S, Tezval M, Rohrberg M, Brandsch T, Stuermer KM, Stuermer EK (2011): Influence of intermittent administration of parathyroid hormone on muscle tissue and bone healing in orchietomized rats or controls. *J Endocrinol* 209, 9–19
- Komrakova M, Weidemann A, Dullin C, Ebert J, Tezval M, Stuermer KM, Sehmisch S (2015): The impact of strontium ranelate on metaphyseal bone healing in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 97, 391–401

-
- Komrakova M, Fiebig J, Hoffmann DB, Kriscsek C, Lehmann W, Stuermer KM, Sehmisch S (2018): The advantages of bilateral osteotomy over unilateral osteotomy for osteoporotic bone healing. *Calcif Tissue Int* 103, 80–94
- Komrakova M, Furtwängler J, Hoffmann DB, Lehmann W, Schilling AF, Sehmisch S (2020): The selective androgen receptor modulator ostarine improves bone healing in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 106, 147-157
- Kousteni S (2001): Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors dissociation from transcriptional activity. *Cell* 104, 719–730
- Kousteni S, Chen J-R, Bellido T, Han L, Ali AA, O'Brien CA, Plotkin L, Fu Q, Mancino AT, Wen Y (2002): Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids. *Science* 298, 843-846
- Kudlacek S, Freudenthaler O, Resch H, Willvonseder R Die Osteoporose beim Mann. *J. Miner Stoffwechs* 7, 21-25
- Leitlinie Osteoporose s. DVO-Leitlinie 2017
- Li J, Tian Y, Guo S, Gu H, Yuan Q, Xie X (2018): Testosterone-induced benign prostatic hyperplasia rat and dog as facile models to assess drugs targeting lower urinary tract symptoms. *PLOS ONE* 13, e0191469
- Lüllmann-Rauch R: Taschenlehrbuch Histologie. 3. Auflage; Thieme-Verlag 2009, 155-165
- Mackenzie EJ, Bosse MJ, Pollak AN, Webb LX, Swiontkowski MF, Kellam JF, Smith DG, Sanders RW, Jones AL, Starr AJ, et al. (2005): Long-term persistence of disability following severe lower-limb trauma: Results of a seven year follow-up. *J Bone Jt Surg-Am Vol* 87, 1801–1809
- Maravelias C, Dona A, Stefanidou M, Spiliopoulou C (2005): Adverse effects of anabolic steroids in athletes. *Toxicol Lett* 158, 167–175
- Marsell R, Einhorn TA (2011): The biology of fracture healing. *Injury* 42, 551–555
- McCann RM, Colleary G, Geddis C, Clarke SA, Jordan GR, Dickson GR, Marsh D (2008): Effect of osteoporosis on bone mineral density and fracture repair in a rat femoral fracture model. *J Orthop Res* 26, 384–393
- McClung M, Harris ST, Miller PD, Bauer DC, Davison KS, Dian L, Hanley DA, Kendler DL, Yuen CK, Lewiecki EM (2013): Bisphosphonate therapy for osteoporosis: benefits, risks, and drug holiday. *Am J Med* 126, 13–20
- Minisola S, Cipriani C, Grotta GD, Colangelo L, Occhiuto M, Biondi P, Sonato C, Vigna E, Cilli M, Pepe J (2019): Update on the safety and efficacy of teriparatide in the treatment of osteoporosis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 11, 1-12

- Mock K, Lunglmayr G Androgene und Östrogene beim alternden Mann. *J Urol Urogynäkol* 6, 5-9
- Mohamad NV, Soelaiman I-N, Chin K-Y (2016): A concise review of testosterone and bone health. *Clin Interv Aging* 11, 1317–1324
- Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Lin JH, Maastricht S, Swain M, Mason RS, Murrell GAC, Diwan AD, Diamond T (2001): Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone Vol* 28, 80-86
- Narayanan P (2013): Denosumab: A comprehensive review. *South Asian J Cancer* 2, 272-277
- Narayanan R, Coss CC, Yepuru M, Kearbey JD, Miller DD, Dalton JT (2008): Steroidal androgens and nonsteroidal, tissue-selective androgen receptor modulator, S-22, regulate androgen receptor function through distinct genomic and nongenomic signaling pathways. *Mol Endocrinol* 22, 2448–2465
- Narayanan R, Coss CC, Dalton JT (2018): Development of selective androgen receptor modulators (SARMs). *Mol Cell Endocrinol* 465, 134–142
- Neil D, Clark RV, Magee M, Billiard J, Chan A, Xue Z, Russell A (2018): GSK2881078, a SARM, produces dose-dependent increases in lean mass in healthy older men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 103, 3215–3224
- Neto WK, Gama EF, Rocha LY, Ramos CC, Taets W, Scapini KB, Ferreira JB, Rodrigues B, Caperuto É (2015): Effects of testosterone on lean mass gain in elderly men: systematic review with meta-analysis of controlled and randomized studies. *AGE* 37, 5
- Ojeda MS, Gomez N, Giménez MS (1997): Androgen regulation of lung lipids in the male rat. *Lipids* 32, 57–62
- Pérez-Castrillón JL, Pinacho F, De Luis D, Lopez-Menendez M, Dueñas Laita A (2010): Odanacatib, a new drug for the treatment of osteoporosis: review of the results in postmenopausal women. *J Osteoporos* 2010, 1–5
- Pleiner-Duxneuner J, Zwettler E, Paschalis E, Roschger P, Nell-Duxneuner V, Klaushofer K (2009): Treatment of osteoporosis with parathyroid hormone and teriparatide. *Calcif Tissue Int* 85, 463–463
- Riggs (2008): Teriparatide in the management of osteoporosis. *Clin Interv Aging* 2, 499–507
- Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, Frith JC (2000): Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 88, 2961-2978

- Saag KG, Petersen J, Brandi ML, Karaplis AC, Lorentzon M, Thomas T, Maddox J, Fan M, Meisner PD, Grauer A (2017): Romosozumab or alendronate for fracture prevention in women with osteoporosis. *N Engl J Med* 377, 1417–1427
- Schmisch S, Dullin C, Zaroban A, Tezval M, Rack T, Schmelz U, Seidlova-Wuttke D, Dunkelberg H, Wuttke W, Marten K, et al. (2009): The use of flat panel volumetric computed tomography (fpVCT) in osteoporosis research. *Acad Radiol* 16, 394–400
- Snyder PJ, Peachey H, Hannoush P, Berlin JA, Loh L, Lenrow DA, Holmes JH, Dlewati A, Santanna J, Rosen CJ et. al (1999): Effect of testosterone treatment on body composition and muscle strength in men over 65 years of age. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 2647-2653
- Sobotta J, Welsch U: Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie; 2. Auflage, 4. Nachdruck; Elsevier, Urban & Fischer, München 2009, 124-125
- Srinath R, Dobs A (2014): Enobosarm (GTx-024, S-22): a potential treatment for cachexia. *Future Oncol* 10, 187–194
- Steiner M, Volkheimer D, Meyers N, Wehner T, Wilke H-J, Claes L, Ignatius A (2015): Comparison between different methods for biomechanical assessment of ex vivo fracture callus stiffness in small animal bone healing studies. *PLOS ONE* 10, e0119603
- Stuermer EK, Seidlová-Wuttke D, Schmisch S, Rack T, Wille J, Frosch KH, Wuttke W, Stuermer KM (2005): Standardized bending and breaking test for the normal and osteoporotic metaphyseal tibias of the rat: effect of estradiol, testosterone, and raloxifene. *J Bone Miner Res* 21, 89–96
- Stuermer EK, Schmisch S, Tezval M, Tezval H, Rack T, Boekhoff J, Wuttke W, Herrmann TRW, Seidlova-Wuttke D, Stuermer KM (2009): Effect of testosterone, raloxifene and estrogen replacement on the microstructure and biomechanics of metaphyseal osteoporotic bones in orchietomized male rats. *World J Urol* 27, 547–555
- Stuermer EK, Schmisch S, Rack T, Wenda E, Seidlova-Wuttke D, Tezval M, Wuttke W, Frosch KH, Stuermer KM (2010): Estrogen and raloxifene improve metaphyseal fracture healing in the early phase of osteoporosis. A new fracture-healing model at the tibia in rat. *Langenbecks Arch Surg* 395, 163–172
- Stuermer EK, Komrakova M, Schmisch S, Tezval M, Dullin C, Schaefer N, Hallecker J, Stuermer KM (2014): Whole body vibration during fracture healing intensifies the effects of estradiol and raloxifene in estrogen-deficient rats. *Bone* 64, 187–194
- Szczyński G (2015): Fracture healing and its disturbances. A literature review. *Ortop Traumatol Rehabil* 17, 437–454
- Tyagi V, Scordo M, Yoon RS, Liporace FA, Greene LW (2017): Revisiting the role of testosterone: are we missing something? *Rev Urol* 19, 16-24

-
- Vanderschueren D, Bouillon R (1995): Androgens and bone. *Calcif Tissue Int* 56, 341-346
- Vanderschueren D, Laurent MR, Claessens F, Gielen E, Lagerquist MK, Vandenput L, Börjesson AE, Ohlsson C (2014): Sex steroid actions in male bone. *Endocr Rev* 35, 906–960
- Wang L, Hsu C-L, Chang C (2005): Androgen receptor corepressors: An overview. *The Prostate* 63, 117–130
- Weidemann A: Der Einfluss von Strontiumranelat auf die metaphysäre Frakturheilung osteopener Ratten. Med. Diss. Göttingen 2020
- Wu J, Henning P, Sjögren K, Koskela A, Tuukkanen J, Movérare-Skrtic S, Ohlsson C (2019): The androgen receptor is required for maintenance of bone mass in adult male mice. *Mol Cell Endocrinol* 479, 159–169
- Yang X, Ricciardi BF, Hernandez-Soria A, Shi Y, Pleshko Camacho N, Bostrom MPG (2007): Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone* 41, 928–936
- Yin D (2003): Key structural features of nonsteroidal ligands for binding and activation of the androgen receptor. *Mol Pharmacol* 63, 211–223
- Zimmermann M: Einfluss der selektiven Inhibition proinflammatorischer Lipooxygenase auf den osteoporotischen Knochen im Ovariectomiemodell der Ratte. Med. Diss. Göttingen 2018

Danksagung

Für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Doktorarbeit möchte ich meiner Betreuerin Dr. Marina Komrakova und den technischen Assistentinnen Ramona Castro-Machguth und Annette Witt herzlich danken. Sie hatten immer ein offenes Ohr hatten und standen mir bei jeglichen Problemen stets zur Seite. Zusätzlich danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Stephan Sehmisch und Prof. Dr. med. Wolfgang Lehmann für das Ermöglichen der Durchführung und Fertigstellung der Dissertation.

Abschließend danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, SE 1966/4-1, KO 4646/3-1) für die Projektförderung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.