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

# Der Einfluss des selektiven Androgenrezeptor-Modulators Ostarine auf die metaphysäre Frakturheilung in der osteoporotischen Ratte

# INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

# Judith Märit Katharina Furtwängler

aus

Saarbrücken

Göttingen 2021

Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Brück
Referent/in	i.V. PD Dr. Daniel Hoffmann
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. Dr. Stephan Haehling von Lanzenauer
Drittreferent/in:	Prof. Dr. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 15. Februar 2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Der Einfluss des selektiven Androgenrezeptor-Modulators Ostarine auf die metaphysäre Frakturheilung in der osteoporotischen Ratte" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den		
	(Unterschrift)	

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Komrakova M, **Furtwängler J**, Hoffmann DB, Lehmann W, Schilling AF, Sehmisch S (2019): The selective androgen receptor modulator ostarine improves bone healing in ovariectomized rats. Calcif Tissue Int <u>106</u>, 147-157

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis Tabellenverzeichnis Abkürzungsverzeichnis		III IV V
<u>1 Ei</u>	inleitung	1
1.1 Ei	nleitung	1
1.2 Os	steoporose	3
1.2.1	Definition	3
1.2.2	Ätiologie	4
1.2.3	Epidemiologie der Osteoporose und der osteoporotischen Frakturen	5
1.2.4	Klinik	5
1.2.5	Diagnostik	6
1.2.6	Therapie	7
1.2.6.1	Allgemeine Maßnahmen	7
1.2.6.2	2 Medikamentöse Therapie	8
1.3 Fr	aktur und Frakturheilung	12
1.3.1	Direkte Frakturheilung	12
1.3.2	Indirekte Frakturheilung	13
1.3.3	Die osteoporotische Frakturheilung	13
1.4 Se	lektive Androgenrezeptor-Modulatoren	13
1.4.1	Wirkung von Androgenen auf den Knochen	13
1.4.2	Der Androgenrezeptor (AR)	14
1.4.3	Nicht-steroidale Androgenrezeptor-Modulatoren	16
1.4.4	Enobosarm/Ostarine	18
1.5 H	ypothese und Fragestellung	19
<u>2</u> <u>M</u>	aterial und Methoden	20
2.1 M	aterial	20
2.2 M	ethoden	23
2.2.1	Versuchsablauf	23
2.2.2	Versuchstiere und Versuchstierhaltung	24
2.2.3	Ovarektomie	25
2.2.4	Osteotomie und Osteosynthese	26
2.2.5	Behandlung und Ostarine-Verabreichung	28
2.2.6	Obduktion und Präparation	29
2.2.7	Serumanalyse	29
2.2.8	Biomechanische Untersuchung	30
2.2.8.1	Durchführung der Untersuchung	30
2.2.8.2	2 Biomechanische Untersuchung	31
2.2.9	Messparameter	32
2.2.9.1	Elastizität	32

2.2.9.2 Streckgrenze (yield load)	32
2.2.9.3 Maximalkraft (F <sub>max</sub> )	32
2.2.10 Mikro-Computertomographie	32
2.2.10.1 Scan der Tibiae	32
2.2.10.2 Auswertung der Mikro-CT-Scans	33
2.2.10.3 Messparameter der Micro-CT-Untersuchung	37
2.2.11 Histologische Untersuchung	38
2.2.11.1 Mikroradiographie	38
2.2.11.2 Polychrome Sequenzmarkierung	43
2.2.12 Statistik	48
<u>3</u> Ergebnisse	49
3.1 Körpergewicht	49
3.2 Futter- und Wirkstoffaufnahme	50
3.3 Uterusgewicht	52
3.4 Alkalische Phosphatase im Serum	53
3.5 Biomechanische Untersuchung	54
3.6 Mikro-CT	55
3.7 Mikroradiographie und polychrome Sequenzmarkierung	56
4 Diskussion	61
4.1 Metaphysäres Frakturmodell und Osteoporosemodell	61
4.2 Diskussion der Ergebnisse	62
4.2.1 Körpergewicht und Uterusgewicht	62
4.2.2 Alkalische Phosphatase	64
4.2.3 Biomechanische Testung	64
4.2.4 Mikro-CT	65
4.2.5 Histologische Untersuchung	66
4.2.5.1 Mikroradiographie	66
4.2.5.2 Polychrome Sequenzmarkierung	67
4.3 Schlussfolgerung	68
5 Zusammenfassung	69
6 Literaturverzeichnis	71

Abbildungsverzeichnis	
Abbildung 1: Beispielhafte Vertreter der vier strukturellen Gruppen der SARMs	17
Abbildung 2: Enobosarm	18
Abbildung 3: Rasur der Hinterläufe zur Operations-vorbereitung	27
Abbildung 4: Osteotomiespalt	27
Abbildung 6: Vernähte und reponierte Beugemuskulatur	28
Abbildung 5: 5-Loch-Leibinger-Platte mit vier Schrauben	28
Abbildung 7: Desinfizierte und geklammerte Operationswunde	28
Abbildung 9: Aufsetzen der Nut an der ventralen Tibiakante	31
Abbildung 8: Korrekte Positionierung der Tibia auf der Trägerplatte	31
Abbildung 10: Grauwerthistogramm des Kalibrierungsphantoms	35
Abbildung 11: Position des Meßrahmens	35
Abbildung 12: Meßrahmen nach Entfernen der restlichen Tibiaanteile	35
Abbildung 13: Grauwerthistogramm nach Ausblenden der Luft	36
Abbildung 14: 2D-Betrachtung des im Grauwerthistogramm grün eingefärbten, eingegrenzten Bereic	h der
Kortikalis	37
Abbildung 15: Flächendetektion einer Mikroradiographie	41
Abbildung 16: Beispielhafte Darstellung der Vektorenmarkierung der dorso-distalen Kortikalis einer	
Mikroradiographie	42
Abbildung 17: Beispielhafte Darstellung der Vektorenmarkierung zur Berechnung der Kallusdicke	43
Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf der Frakturheilung und Applikationszeitpunkte der Fluorochrome z	zur
polychromen Sequenzmarkierung	44
Abbildung 19: Beispielhafte CG-Markierung	46
Abbildung 20: Beispielhafte AK-Markierung	46
Abbildung 21: Beispielhafte TC-Markierung	46
Abbildung 22: Futteraufnahme im zeitlichen Verlauf	51
Abbildung 23: Das Uterusgewicht am Versuchsende	52
Abbildung 24: Aktivität der alkalischen Phophatase im Serum	53
Abbildung 25: Repräsentative Bilder der Gruppe NON-OVX	57
Abbildung 26: Repräsentative Bilder der Gruppe OVX	57
Abbildung 27: Repräsentative Bilder der Gruppe OS 0,04	58
Abbildung 28: Repräsentative Bilder der Gruppe OS 0,4	58
Abbildung 29: Repräsentative Bilder der Gruppe OS 4	58

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tiere und Tierhaltung	20
Tabelle 2: Operationsmaterialien	20
Tabelle 3: Medikamente	21
Tabelle 4: Chemikalien	21
Tabelle 5: Geräte und Verbrauchsmaterialien	22
Tabelle 6: Software und Programme	23
Tabelle 7: Behandlung der verschiedenen Versuchsgruppen	24
Tabelle 8: Parameter des Scan-Protokolls für die Anfertigung von 3D-CT-Scans	33
Tabelle 9: Messparameter und deren Berechnungsgrundlage in der Micro-CT Untersuchung	37
Tabelle 10: Zeitpunkte der Applikation und Dosierung der Fluochrome	44
Tabelle 11: Messparameter der polychromen Sequenzmarkierung	47
Tabelle 12: Kennzeichnung der signifikanten Unterschiede	49
Tabelle 13: Körpergewichte der Versuchstiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Versuchs	50
Tabelle 14: Tägliche Wirkstoffaufnahme in mg/kg KG in den Ostarine-behandelten Gruppen	51
Tabelle 15: Tägliche Wirkstoffaufnahme in mg/Tag/Ratte in den Ostarine-behandelten Gruppen	52
Tabelle 16: Uterusgewicht am Versuchsende	53
Tabelle 17: AP-Spiegel im Serum	54
Tabelle 18: Biomechanische Parameter	54
Tabelle 19: Qualitative Analyse der Versuchstibiae vor der biomechanischen Testung	55
Tabelle 20: MikroCT- Parameter	56
Tabelle 21: Ergebnisse der Mikroradiographie	59
Tabelle 22: Ergebnisse der polychromen Sequenzmarkierung	60

# Abkürzungsverzeichnis

AF-1	activation factor one
AK	Alizarinkomplexon
ANOVA	Varianzanalyse
AP	alkalische Phosphatase
AR	Androgenrezeptor
BMD	Knochendichte oder bone mineral density
BV/TV	Knochenvolumen aus dem Gesamtvolumen
CG	Calcein-Grün
СТ	Computertomographie
DBD	DNA-bindende Domäne
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DVO	Dachverband Osteologie
DXA	Dual X-Ray-Absorptiometrie
HRT	Hormonersatztherapie
ICSD	International Society for Clinical Densitometry
IGF	Insulin-like Growth Factor
IgG	Immun-Globulin G
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
LBD	Liganden-bindende Domäne
MMA	Methylmethacrylsäure
Ν	Newton
NLS	nuclear localization sign
NON-OVX	nicht ovarektomiert
NTD	N-Terminale Domäne
OS	Ostarine (Enobosarm, MK-2866, GTx-024)
OVX	ovarektomiert
РТН	Parathormon
RANK	Receptor Activator of NF- KB
RANKL	Receptor Activator of NF- κB Ligand
s.c.	subcutan
SARMs	selektive Androgenrezeptor-Modulatoren
SERMs	selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren
Tab.	Tabelle
ТС	Tetrahydrochlorid
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
U	Units/Einheiten
US	United States
WHO	World Health Organization
XO	Xylenolorange- Natriumsalz
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung

#### 1 Einleitung

#### 1.1 Einleitung

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, welche sich durch eine Abnahme der Knochensubstanz und eine verschlechterte Mikrostruktur des Knochens auszeichnet (Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis 1993; DVO 2017). In Folge der abnehmenden Knochenqualität manifestiert sich die Osteoporose durch Knochenbrüche auf Grund von inadäquaten Traumata. Ist es erst zu einer Fraktur gekommen, so wird die Frakturheilung durch die osteoporotischen Veränderungen am Knochen zusätzlich erschwert. In einer durch Mobilität geprägten Gesellschaft führt dies zu einer nachhaltigen Beeinträchtigung der Lebensqualität der Patienten und ist zudem ein kostenintensives Unterfangen. Laut der BoneEVA-Studie von 2007 lagen die Kosten von Osteoporose-assoziierten Frakturen in Deutschland bei 5,8 Milliarden Euro (Häussler et al. 2007).

Betroffen sind vor allem postmenopausale Frauen. Durch die plötzliche Abnahme des Östrogen-Spiegels kommt es in dem postmenopausalen Knochen zu Umbauprozessen, welche in einer verminderten Knochendichte, -masse und -qualität und einer erhöhten Fragilität des Skeletts resultieren (Bartl 2014). Es wird vermutet, dass jede zweite Frau, die an postmenopausaler Osteoporose leidet, einmal in ihrem Leben eine Fraktur erleiden wird (Chrischilles 1991; Sambrook und Cooper 2006). Das zunehmende Alter der Gesellschaft, Alkohol- und Nikotinabusus, chronische Krankheiten und Einnahme von Medikamenten, welche eine Osteoporose, und somit im Verlauf auch sehr wahrscheinlich eine Fraktur, begünstigen, sind weitere Risikofaktoren, welche zusätzlich zu Östrogen-Mangel bei postmenopausalen Frauen nicht außer Acht gelassen werden dürfen (Kanis et al. 2019).

Eine Basisdiagnostik zur Einschätzung einer eventuell bestehenden Osteoporose wird generell bei Frauen und Männern ab dem 70. Lebensjahr empfohlen, da ab diesem Alter von einem erhöhten Frakturrisiko ausgegangen werden kann (Kanis et al. 2005). Zu einem früheren Zeitpunkt wird die Durchführung der Basisdiagnostik, welche eine ausführliche Anamnese, eine Knochendichtemessung und ein Basislabor umfasst, empfohlen, wenn niedrigtraumatische Frakturen aufgetreten sein sollten, eine familiäre Prädisposition besteht oder aber eine Osteoporose-fördernde Grunderkrankung diagnostiziert wurde (DVO 2017). Wird im Rahmen der Osteoporose-Diagnostik ein über 30% erhöhtes 10-Jahres Frakturrisiko für eine vertebrale oder Schenkelhalsfraktur evaluiert, oder handelt es sich um eine manifeste Osteoporose mit bereits erlittener Fraktur, so wird vom Dachverband Osteologie e.V. eine medikamentöse Therapie empfohlen (DVO 2017).

Diese medikamentöse Therapie umfasst im Rahmen der sogenannten Basistherapie die Calcium- und Vitamin D-Supplementierung. Weiterführend kann zur Osteoporosetherapie bei postmenopausalen Frauen auf Bisphosphonate, den monoklonalen Antikörper Denosumab, Östrogen oder Östrogen-Progestin-Präparate im Rahmen einer Hormonersatz-Therapie (HRT) oder selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) zurückgegriffen werden. Der Fokus der Osteoporosetherapie richtet sich natürlich in erster Linie auf die Prävention von Frakturen. Kommt es aber zu einer Fraktur, welche häufig die Erstdiagnose der Osteoporose ergibt, ist bis heute keine medikamentöse Therapie zur Unterstützung der Frakturheilung von Osteoporose-assoziierten Frakturen bei postmenopausalen Frauen zugelassen (DVO 2017; Kanis et al. 2019). Durch eine beschleunigte bzw. normalisierte Frakturheilung kann eine schnellere Mobilität erreicht werden, wodurch sich Hospitalisierungszeit, Kosten und Mortalität der osteoporotischen Frakturen senken ließe (Raaben et al. 2018).

Angesichts des zunehmenden Alters der Gesellschaft ist mit einem rapiden Anstieg an Osteoporose-assoziierten Frakturen zu rechnen. So führt bei Männern ein sinkender Testosteronspiegel zu einem erhöhten Risiko für Osteoporose und Osteoporoseassoziierten Frakturen (Araujo et al. 2007). Testosteron hat auch bei Frauen einen osteoprotektiven Effekt, da es unter anderem die Knochendichte verbessern und die Muskelmasse erhöhen kann (Lee et al. 2008). Bei postmenopausalen Frauen wirkt sich also nicht nur der Abfall der Östrogenspiegel auf das Osteoporose- und damit Frakturrisikobegünstigend aus, sondern auch der abfallende Androgenspiegel (Cauley et al. 2017). Hier bietet sich ein neuer Ansatzpunkt in der Therapie der Osteoporose und vor allem der Osteoporose-assoziierten Frakturen, welcher einen Nutzen für Frauen darstellen könnte. In letzter Zeit sind die nicht-steroidalen selektiven Androgenrezeptor-Modulatoren (SARMs) in den Focus der Osteoporose-Forschung gerückt, da diese Medikamente nicht die Nebenwirkungen von Steroiden wie Testosteron, wie z. B. Virilisierung, Lebertoxizität oder kardiovaskuläre Ereignisse (Davis und Wahlin-Jacobsen 2015), zeigen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine systemische Applikation verschiedener SARMs in ovarektomierten Ratten eine Abnahme der Knochensubstanz verhindern oder eine stattgefundene Abnahme gar wiederherstellen konnte (Gao et al. 2005; Kearbey et al. 2007;

Jones et al. 2013). Zu den experimentell und klinisch am besten erforschten SARMs gehört Ostarine (Enobosarm, MK-2866 oder GTx-024), welchem in experimentellen Studien bereits ein osteoanaboler Effekt auf den osteoporotischen Knochen nachgewiesen werden konnte (Jones et al. 2013; Narayanan et al. 2018). In klinischen Studien wurde der Focus bezüglich einer Ostarine-Therapie bislang auf Sarkopenie verschiedener Ursachen gelegt. So konnte in klinischen Studien bei gesunden Patienten unter Ostarine-Therapie eine Erhöhung der fettfreien Masse, des Muskelvolumens, sowie der Beinmuskelkraft nachgewiesen werden. Auch bei Patienten mit Tumorkachexie konnten eine erhöhte fettfreie Masse nach Applikation von Ostarine nachgewiesen werden (Dalton et al. 2011; Jones et al. 2013; Narayanan et al. 2018). Auch im Rahmen dieser Studie konnte ein anaboler Effekt auf die quergestreifte Muskulatur nachgewiesen werden (Henkies 2020). Ein indirekter, den osteoporotischen Knochen stärkender Effekt von Ostarine über die gesteigerte Muskelkraft ist neben der direkten Wirkung auf den osteoporotischen Knochen anzunehmen. Die direkte Wirkung von Ostarine auf den osteoporotischen Knochen wurde als Teil dieser Studie an intakten Wirbelkörpern und Femora untersucht und kürzlich veröffentlicht. Auch hier konnten osteoanabole Effekte nachgewiesen werden (Hoffmann et al. 2019). Die Wirkung von SARMs auf die Frakturheilung bei Osteoporose-assoziierten Frakturen ist bislang unbekannt.

#### 1.2 Osteoporose

#### 1.2.1 Definition

Die Osteoporose wird von dem Dachverband Osteologie e.V. definiert als eine systemische Skeletterkrankung, welche sich in einer verschlechterten Mikroarchitektur und einer niedrigen Knochenmasse niederschlägt. Durch die sukzessive Abnahme der Knochenqualität entsteht eine Frakturneigung, weshalb es bereits bei Bagatelltraumata zu Knochenbrüchen kommen kann, wodurch sich die Osteoporose schließlich manifestiert (DVO 2017).

Die noch heute angewandte Definition der WHO von 1994 besagt, dass von einer Osteoporose gesprochen werden kann, wenn die Knochendichte des Oberschenkelhalses oder der Lendenwirbelkörper bei einer Knochendichtemessung  $\leq$  -2,5 Standardabweichungen von dem Mittelwert abweicht, welcher bei gesunden 20-29 jährigen Erwachsen zu finden ist (Kanis 1994; Kanis et al. 2008; Kanis et al. 2013; Kanis et al. 2019). Diese Standardabweichungen werden als T-Score bezeichnet. Nach den Richtwerten der WHO gilt ein T-Score  $\geq$ -1 als Normalwert, ein T-Score zwischen -1 und -2,5 als Osteopenie und ab einem T-Score von  $\leq$  -2,5 wird von einer Osteoporose gesprochen (Kanis et al. 2019). Der Dachverband Osteologie e.V. empfiehlt die Diagnosestellung nicht ausschließlich in Abhängigkeit der T-Scores, sondern auch unter Einbeziehung einer ausführlichen Anamnese mit passender Klinik zu stellen (DVO 2017). Sind bei einem Patienten jedoch sowohl ein T-Score von  $\leq$ -2,5 als auch Frakturen vorzufinden, so wird von einer manifesten Osteoporose gesprochen (DVO 2017).

#### 1.2.2 Ätiologie

Man unterscheidet zunächst zwischen einer primären und einer sekundären Osteoporose. Bei ca. 90% der Krankheitsfälle handelt es sich um primäre Osteoporosen. Dazu gehören postmenopausale, die idiopathische sowie die senile Osteoporose. die Die postmenopausale Osteoporose wird durch die Abnahme der weiblichen Sexualhormone hervorgerufen. Der regulierende Effekt des Östrogens auf die Remodelierung des Knochens entfällt (Bartl 2014; Nuti et al. 2019). Es entsteht ein Ungleichgewicht zwischen Knochenauf- und abbau zugunsten des Abbaus. Die postmenopausale Osteoporose, auch Typ I-Osteoporose genannt, ist die häufigste Form dieser Krankheit. Einen weiteren Vertreter der primären Osteoporose stellt die senile Osteoporose dar. Diese tritt bei Männern und Frauen über 70 Jahren gleichermaßen auf (Bartl 2014). Laut Riggs und Melton (1986) liegen der senilen Osteoporose zum einen die durch den Alterungsprozess bedingte Abnahme der Osteoblasten-Funktion zugrunde, welche der Osteoklastenaktivität nicht nachkommen kann. Zum anderen kommt es mit dem Alter zu einer Abnahme der Nierenfunktion und dadurch zu einer Abnahme von aktivem Vitamin D. Die Regression des Vitamin D führt zu einer verminderten intestinalen und renalen Calciumresorption. Dies wiederrum bedingt einen sekundären Hyperparathyreoidismus. Parathormon mobilisiert Calcium aus dem Knochen und trägt dadurch zum weiteren Knochenabbau bei. (Riggs und Melton 1986; Bartl 2014)

Die Ausbildung einer sekundären Osteoporose kann vielfältige Ursachen haben. So können metabolische oder endokrine Faktoren und auch chronische und maligne Erkrankungen das Entstehen einer Osteoporose fördern (Bartl 2014). Eine wichtige Rolle spielen auch Lifestyle-Faktoren, wie Ernährung, Alkohol- und Nikotinabusus (Schapira 1990; Office of the Surgeon General (US) 2004; Kanis et al. 2005; Bartl 2014; Kanis et al. 2019). Den größten Anteil an den sekundären Osteoporosen hat jedoch die medikamenteninduzierte Osteoporose durch Glucocorticoide. Diese vermindern die Differenzierung von knochnebildenden Osteoblasten, fördern die frühzeitige Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten und führen zu einer gesteigerten Osteoklasten-Aktivität (Weinstein et al. 1998; Orcel 2005; Villa et al. 2013; Compston 2018).

#### 1.2.3 Epidemiologie der Osteoporose und der osteoporotischen Frakturen

Die Osteoporose ist eine weltweit verbreitete und häufig auftretende Skeletterkrankung. Allein in Deutschland beläuft sich die Prävalenz bei den über 50-Jährigen insgesamt auf 14 %, wobei die Geschlechter-bezogene Prävalenz bei Frauen 24 % und bei Männern 6 % zeigte (Gosch et al. 2019). Die Inzidenz bei den über 50-jährigen betrug 2,1 % pro Jahr. Das bedeutet, dass in Deutschland im Jahr 2009 hochgerechnet 6,3 Millionen Menschen an Osteoporose erkrankt waren (Hadji et al. 2013). Europaweit geht man von 22 Millionen Frauen und 5,6 Millionen Männern mit Osteoporose aus (Hernlund et al. 2013; Kanis et al. 2019). Von den weltweit aufgetretenen 8,9 Millionen osteoporotischen Frakturen ereigneten sich allein ein Drittel in Europa (Johnell und Kanis 2006; Hernlund et al. 2013). Die häufigsten Osteoporose-assoziierten Frakturen sind die der Hüfte, bzw. des proximalen Femurs, der Wirbelkörper, des distalen Unterarmes und des proximalen Humerus (Kanis et al. 1994; Kanis et al. 2019). Die gravierendste osteoporotische Fraktur ist hierbei die Fraktur des proximalen Femurs, da sie mit einer hohen Mortalität einhergeht und auch die meisten Kosten verursacht. 10-20 % der Frauen, die eine Fraktur des proximalen Femurs erlitten haben, sterben innerhalb des ersten Jahres nach Frakturereignis. Bei Männern ist hier die Mortalität sogar noch höher (Cummings und Melton 2002; Abrahamsen et al. 2009). Die Wahrscheinlichkeit von Frauen bzw. Männern über 50 Jahren eine Fraktur des proximalen Femurs zu erleiden liegt bei 17 % bzw. 6 % (Melton 2000). Es wird angenommen, dass als Folge des demographischen Wandels die Zahl der Osteoporose-assoziierten Frakturen von 3,5 Millionen im Jahr 2010 auf 4,5 Millionen im Jahr 2025 ansteigen wird, was einer Zunahme von 28% entspricht (Kanis et al. 2019). Die Kosten der Osteoporosetherapie, welche die konservative und operative Frakturversorgung sowie die medikamentöse Therapie der Osteoporose beinhalten, beliefen sich in der EU im Jahr 2010 bereits auf 37 Milliarden Euro (Hernlund et al. 2013; Kanis et al. 2019).

#### 1.2.4 Klinik

Da es sich bei der Osteoporose nicht um ein plötzlich auftretendes Krankheitsbild handelt, sondern um eine stumm voranschreitende Knochenerkrankung, wird die Klinik der Osteoporose maßgeblich durch die als Erstsymptom auftretenden Frakturen bestimmt. Die

6

häufigsten Frakturen, die im Rahmen einer Osteoporose diagnostiziert werden, sind die proximale Femur- oder auch Hüftfraktur, die Lendenwirbelfraktur, die proximale Humerusfraktur und die distale Radiusfraktur Typ Colles (Kanis et al. 1994; Kanis et al. 2019). Ihr Auftreten ist meist durch leichte bis moderate Traumata bedingt, die bei einem Knochengesunden keine Frakturen hervorrufen würden. Meist handelt es sich bei diesen Traumata um Stürze aus Standhöhe oder aus dem Sitzen (Amin et al. 2014). Besonders die Wirbelkörper- und Frakturen des proximalen Femurs gehen mit einem hohen Maß an Mortalität einher (Ettinger et al. 1992; Ross 1996; Abrahamsen et al. 2009; Kanis et al. 2019). Die Frakturereignisse können zu einer massiv verminderten Lebensqualität und einem hohen Verlust an Selbstständigkeit führen (Black und Rosen 2016). Durch die osteoporotischen Veränderungen an den Wirbelkörpern und den daraus resultierenden Frakturen kann es im Verlauf zu einer Körpergrößenabnahme, Bewegungseinschränkungen und zu teils diffusen Rückenschmerzen kommen (Ettinger et al. 1992; Nevitt et al. 1998; Hernlund et al. 2013). Zu zentralen Wirbelkörperfrakturen kommt es bereits bei minimalen Traumata, welche bei alltäglichen Bewegungsmustern wie Gehen, Stehen, Sitzen oder Liegen passieren (Amin et al. 2014). Oft bleiben die Wirbelkörperfrakturen symptomlos, so dass nur jede dritte Fraktur klinisch erfasst wird (Nevitt et al. 1998; Fink et al. 2005; Lems et al. 2021). Das Risiko bei einer bereits stattgefundenen Wirbelkörperfraktur eine weitere Fraktur, sowohl an den Wirbelkörpern als auch an anderen Lokalisationen, zu erleiden, steigt jedoch exponentiell (Ross et al. 1991; Klotzbuecher et al. 2000; Hernlund et al. 2013). Der durch Osteoporose bedingte Lebenszeit- und -qualitätsverlust übersteigt jenen von rheumatoider Arthritits, Asthma, hypertensiver Herzerkrankung und allen Krebserkrankungen mit Ausnahme von Lungenkrebs (Johnell und Kanis 2006; Kanis et al. 2008; Kanis et al. 2019).

#### 1.2.5 Diagnostik

Die angewandte Diagnostik zur Ermittlung einer Osteoporose und des damit verbundenen Frakturrisikos richtet sich nach dem individuellen Risikoprofil des Patienten. Die Basisdiagnostik sollte daher mit einer ausführlichen Anamnese beginnen, welche eine Familienanamnese, besonders hinsichtlich aufgetretener Frakturereignisse bei den Eltern, eine Schmerzanamnese, eine Krankheits- und eine Medikamentenanamnese beinhalten sollte (Kanis 1994; Kanis et al. 2019). Auch explizite Fragen nach Alkohol- und Nikotinkonsum und dem Ernährungsverhalten sollten erfolgen, um die Risikoabschätzung einer Osteoporose zu komplettieren (Kanis 1994; Kanis et al. 2019). Sollte sich bei der körperlichen Untersuchung eine eingeschränkte Koordination oder verminderte Muskelkraft zeigen, kann man sich verschiedener Tests zur Sturzprädiktion bedienen, wie dem "Timed up & go"- und dem "Chair rising"-Test (Ganz et al. 2007; Schoene et al. 2013). Des Weiteren sollte die Körpergröße regelmäßig gemessen werden und auf das so genannte "Tannenbaumphänomen" geachtet werden, das die Bildung von Hautfalten am seitlichen Rumpf durch Körpergrößenminderung bezeichnet (Bartl 2011).

Zur Diagnosestellung der Osteoporose nach den WHO-Kriterien und zur Abschätzung des Frakturrisikos ist die Messung der Knochendichte (BMD) unabdinglich. Die Leitliniengruppe des Dachverbandes Osteologie e.V. (DVO 2017) empfiehlt als Standardverfahren zur Knochendichtemessung die "Dual-X-ray-Absorptiometrie" (DXA) des proximalen Femurs und der Lendenwirbelsäule, wobei hier die Lendenwirbelsäule von L1-L4 dargestellt werden sollte und mind. 2 Wirbelkörper beurteilbar sein müssen (ISCD 2019). Der Computer berechnet anhand des unterschiedlich abgeschwächten Strahlendurchgangs die Mineralisation des Knochens, die dann auf die BMD und schließlich in den T-Score umgerechnet wird. Weicht der T-Score um < - 2,5 SD von dem Mittelwert der BMD in gesunden 20-29-jährigen Individuen ab, so wird, die Diagnose der Osteoporose gestellt, unter Berücksichtigung des individuellen klinischen Kontext (Kanis et al. 1994; Kanis et al. 2019).

Auf ein konventionelles Röntgen der Wirbelsäule sollte bei Frauen ab 70 Jahren, bei Männern ab 80 Jahren, bei akuten Schmerzereignissen, bei chronischen, noch nicht abgeklärten Rückenschmerzen, bei bereits stattgefundener Wirbelfraktur und bei zunehmendem Körpergrößenverlust zurückgegriffen werden (Kaptoge et al. 2004; Roux et al. 2007; Kanis et al. 2019).

Ein Basislabor sollte zum Ziel haben, Differentialdiagnosen und andere Osteopathien, wie zum Beispiel primären Hyperparathyreoidismus oder Osteomalazie, weitestgehend auszuschließen und etwaige Kontraindikationen für die medikamentöse Therapie zu erkennen (Pfeilschifter 2009; Bartl 2014).

#### 1.2.6 Therapie

#### 1.2.6.1 Allgemeine Maßnahmen

In der Therapie der Osteoporose gilt es, die Knochenstabilität zu verbessern und Frakturereignisse zu vermeiden. Somit stehen am Anfang der Frakturprophylaxe zunächst die Eruierung und Eliminierung möglicher Risikofaktoren. So sollte auf ein adäquates Gewicht geachtet werden, da sowohl Über- als auch Untergewicht Frakturrisiken bergen (Tanaka et al. 2013). Bei Calcium- und Vitamin D-Mangel senkt eine kombinierte Supplementierung die Inzidenz von Frakturen bei älteren Menschen (Boonen et al. 2007). Durch regelmäßige körperliche Aktivität sollte Muskelkraft und Koordination gefördert werden. Durch die so verbesserte Balance wird eine Sturz- und somit auch Frakturprophylaxe erreicht (Sherrington et al. 2008). Eine Immobilisation stellt ein starkes Frakturrisiko dar und sollte vermieden werden (Cooper et al. 1990; Kanis et al. 2019). Auch eine Nikotinkarenz und Vermeidung von Alkoholexzessen hat einen positiven Effekt auf die Frakturprophylaxe (Schapira 1990; Kanis J. A. et al. 2005; Fini et al. 2012; Hernlund et al. 2013; Kanis et al. 2019). Sturz- und Osteoporose-fördernde Medikamente sind nach Möglichkeit abzusetzen und durch eine gleichwertige Therapie zu ersetzen, welche keinen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel nehmen oder eine erhöhte Sturzneigung hervorrufen. Ist dies nicht möglich, sollte das Medikament in der geringstmöglichen Dosis verabreicht werden. Zu diesen Medikamenten zählen Antiepileptika, Sedativa und Orthostase-auslösende Medikament, Glitazone und vor allem Glucocorticoide, welche der häufigste Grund einer sekundären Osteoporose sind (Orcel 2005; Hernlund et al. 2013; DVO 2017; Kanis et al. 2019).

#### 1.2.6.2 Medikamentöse Therapie

Die medikamentöse Therapie der Osteoporose hat zum Ziel, die Knochenqualität zu verbessern und somit auch die Frakturgefahr zu senken. Wenn die Indikation für die medikamentöse Behandlung gestellt wurde, kann mit dem Patienten die für ihn passende medikamentöse Therapie ausgewählt werden, wobei der Patient aktiv an der Entscheidung beteiligt werden sollte (Donovan 1995). Dies soll die Adhärenz der Patienten verbessern, die laut Compston und Seeman bei 50 % der Osteoporose-Patienten nicht vorhanden ist (Compston und Seeman 2006; Kanis et al. 2019). Da die Adhärenz einen sehr wichtigen Faktor in der optimalen Frakturprävention darstellt (Ross et al. 2011), sollte diese nicht vernachlässigt werden.

#### Hormonersatztherapie (HRT)

Bei der postmenopausalen Osteoporose liegt es nahe, sich die Eigenschaft des Östrogens zu Nutze zu machen, also des Hormons, durch dessen abruptes Absinken mit Beginn der Menopause ein erhöhter Knochenum- und -abbau initiiert wurde (Bartl 2014). So ist die HRT – besonders in der frühen Menopause – ein gern eingesetztes Mittel, da es neben einer Linderung der menopausalen Symptome auch positive Effekte auf andere Organe hat. Man hat sowohl einen nachweislich verminderten Knochensubstanzverlust an Schenkelhals und Radius feststellen können (Reginster et al. 2000) als auch ein vermindertes Frakturrisiko, welches an Schenkelhals und Wirbelkörpern um 34% gesenkt wurde. Das Risiko anderer osteoporotischer Frakturen wurde um 23% gesenkt (Rossouw et al. 2002). Allerdings geht die HRT auch mit gewissen Risiken einher. Da bei nichthysterektomierten Frauen das Risiko der Entwicklung eines Endometriumkarzinoms bei alleiniger Östrogensubstitution steigt, müssen hier kombinierte Östrogen-Progestin-Präparate als HRT eingesetzt werden, wobei das Progestin keinen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel hat (Pfeilschifter 2001). Im Tiermodell ließ sich bei Gabe von Östrogenen während der Frakturheilung zwar keine Behinderung des Frakturheilungsprozesses feststellen, jedoch aber eine milde Unterdrückung der Remodelierung des Kallus (Cao et al. 2002). Nicht zu unterschätzen sind auch Nebenwirkungen wie ein erhöhtes Risiko an invasivem Brustkrebs zu erkranken (Chlebowski et al. 2009) und das vermehrte Auftreten thrombembolischer Ereignisse (Eisenberger und Westhoff 2014). Daher wird die HRT von dem Dachverband Osteologie e.V. nur bei Kontraindikation oder Überempfindlichkeiten gegenüber anderer Osteoporosetherapeutika empfohlen (DVO 2017).

#### Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs)

Auch die meisten der selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren zeigen einerseits durch ihre Östrogen-agonistische Wirkung am Knochen, andererseits durch Östrogenantagonistische Effekte auf Uterus und Brust (Shelly et al. 2008) ein gutes Wirkprofil in der Therapie der postmenopausalen Osteoporose. Durch ihre antiresorptive Wirkung auf den Knochen, indem sie hemmend auf die Osteoklasten wirken, wird im Verlauf der Behandlung die Knochendichte an Lendenwirbelsäule und proximalem Schenkelhals erhöht und somit das Frakturrisiko signifikant gesenkt (Heaney und Draper 1997; Delmas et al. 2002; Johnell et al. 2004). Zusätzlich zu den positiven Effekten auf Knochen- und Fettstoffwechsel bei postmenopausalen Frauen, ist auch eine signifikante Reduktion von invasivem Brustkrebs bei Risikopatientinnen festgestellt worden (Cauley et al. 2001). Auch hier zeigte sich im Tiermodell, vergleichbar mit der HRT, keine Behinderung der Frakturheilung per se, sondern nur die milde Suppression der Kallusremodelierung (Cao et al. 2002). Generell sind klinische Daten bezüglich der Wirkung von Östrogenen und SERMs auf die Frakturheilung selten (Hegde et al. 2016). Die relevanten Nebenwirkungen der SERMs erstrecken sich von Hitzewallung über Wadenkrämpfe, welche besonders am Anfang der Therapie auftreten, bis hin zu einem signifikant erhöhten Risiko für thrombembolische Ereignisse (Davies et al. 1999; Ettinger et al. 1999; Epstein 2006).

#### Denosumab

Auf der Osteoklasten-Oberfläche wird RANK präsentiert, ein Rezeptor, welcher die osteoklastische Knochenresorption maßgeblich beeinflussen kann. Denosumab ist ein humaner, monoklonaler IgG2-Antikörper mit einer hohen Affinität zu RANKL, dem Rezeptor-Aktivator von RANK. Denosumab bindet also an RANKL und behindert so eine Bindung an RANK, welcher in der Folge nicht aktiviert wird. Somit wirkt Denosumab durch die ausbleibende antiresorptiv, da es Aktivierung von RANK die Osteoklastenformation und -aktivität inhibiert und es zu frühzeitiger Apoptose der Osteoklasten kommt (Zaheer et al. 2015). Durch diesen Wirkmechanismus lässt sich der Knochenumsatz reduzieren, die Knochendichte verbessern und das Frakturrisiko von sowohl vertebralen als auch non-vertebralen Frakturen senken (Cummings et al. 2009). Da Denosumab zweimal jährlich subcutan appliziert wird, ist die Adhärenz und Patientenzufriedenheit im Vergleich zu täglich verabreichten Medikamenten sehr gut (Freemantle et al. 2012). Indikation zur Denosumab-Behandlung in Deutschland sind bei Frauen postmenopausale Osteoporose mit hohem Frakturrisiko und bei Männern Knochenschwund unter Hormon-Ablation bei Prostatakarzinom und erhöhtem Frakturrisiko. Bei Gabe zur Unterstützung der Frakturheilung konnte eine schnellere Schmerzlinderung erreicht werden und bei anhaltender Therapie mit Denosumab auch eine gesteigerte Knochendichte im Vergleich zur Gabe von Alendronat gezeigt werden (Tetsunaga et al. 2017).

#### **Bisphosphonate**

Die Bisphosphonate sind sehr effektive Inhibitoren der Knochenresorption (Flanagan und Chambers 1991; Kanis et al. 2019), welche nicht nur in der Therapie der postmenopausalen Osteoporose ihren Einsatz finden, sondern auch in der Osteoporose des Mannes, der Glucocorticoid-induzierten Osteoporose (Saag et al. 1998; Weinstein 2012) und bei Osteolysen durch Knochenmetastasen (Mundy 2002). Die Bisphosphonate entfalten ihre antiresorptive Wirkung einerseits durch die Bindung an Hydroxylapatit – dem Mineral, aus welchem Knochen und Zähne hauptsächlich bestehen – und verhindern dessen Auflösung (Jung et al. 1973; Drake und Cremers 2010; Cremers et al. 2019). Andererseits hemmen sie den Knochenabbau, indem sie in den Osteoklasten eine enzymatische Kaskade hemmen, welche für die Zellteilung und -differenzierung der Osteoklasten fundamental ist, und somit die Apoptose der Osteoklasten induzieren (Leu et al. 2006; Roelofs et al. 2006; Drake und Cremers 2010; Cremers et al. 2019). Unter Bisphosphonat-Therapie wird die Knochendichte gesteigert und das Auftreten von Frakturen an Wirbelsäule, Hüfte und anderen skeletalen Bereichen signifikant reduziert (Black et al. 1996; Black et al. 2000; Kanis et al. 2019). Bezüglich der Frakturheilung wird der Gebrauch von Bisphosphonaten in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Gabe von Bisphosphonaten während der Frakturheilung inhibiert die Kallusremodelierung (Jørgensen und Schwarz 2011). Bei In vivo-Versuchen konnte aber auch eine beschleunigte Wiedereinstellung der mechanischen Stabilität im Frakturbereich nachgewiesen werden (Greiner et al. 2008). Die Nebenwirkungen der Bisphosphonate treten vor allem bei der oralen Applikation auf und äußern sich dann in Beschwerden des oberen Gastrointestinaltraktes, wie Durchfall oder Reizungen und Entzündungen des Ösophagus und des Magens (Tosteson et al. 2003; Kanis et al. 2008; Kanis et al. 2019). Auch Nebenwirkungen am Auge und an der Haut, wie u.a. Uveitis und Pruritus, sind beobachtet worden (Abrahamsen 2010). Die gefürchtetste Nebenwirkung der Bisphosphonattherapie stellt die Osteonekrose des Kiefers dar (Khosla et al. 2007; DVO 2017; Kanis et al. 2019).

#### Parathormon (PTH 1-34) / Teriparatid

Teriparatid ist ein rekombinantes, aminoterminales Fragment des humanen Parathormons (PTH 1-34) (Cosman 2008) und kann sowohl bei Männern als auch bei Frauen, die ein hohes Frakturrisiko aufweisen, therapeutisch eingesetzt werden. Parathormon wird bei sinkenden Serum-Calciumspiegeln kontinuierlich aus der Nebenschilddrüse ausgeschüttet und bedingt, durch verstärkte Calcium-Rückresorption in Niere und Darm sowie durch Calcium-Abbau aus den Knochen, den Anstieg des Calcium-Spiegels im Blut. Allerdings wird durch intermittierende Gabe bei der medikamentösen Verabreichung des Parathormons die Osteoblasten-Apoptose vermindert, dadurch die Osteoblastenzahl erhöht und die Knochenneuformation begünstigt, wodurch Knochenmasse und Knochenfestigkeit gesteigert werden (Bartl 2011; Kanis et al. 2019). Teriparatid wirkt also osteoanabol. Es steigert die Knochendichte sowohl in der Wirbelsäule als auch am Schenkelhals signifikant (Finkelstein et al. 2003). Das Frakturrisiko, sowohl vertebral als auch non-vertebral, konnte mit Teriparatid bei Männern und Frauen deutlich gesenkt werden (Neer et al. 2001; Finkelstein et al. 2009; Kanis et al. 2019). In einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, das mit Teriparatid die Zeit der Frakturheilung dosisabhängig etwas verkürzt werden konnte (Aspenberg et al. 2010), eine Zulassung zur medikamentösen Unterstützung der Frakturheilung gibt es allerdings noch nicht. Als

Nebenwirkung von Teriparatid wurden neben Allgemeinsymptomen, wie Kopfschmerzen und Übelkeit, auch Verwirrtheit und Wadenkrämpfe festgestellt, die allerdings meist nur kurz nach Injektion auftraten (Neer et al. 2001). Neben einem Anstieg der Harnsäure im Serum, wurden auch häufig Hypercalciämien und Hypercalciurien festgestellt. Daher ist die Anwendung von Teriparatid bei Patienten mit einer Neigung zu Nierensteinen kontraindiziert (Neer et al. 2001; Miller 2008; Kanis et al. 2019). In Tierversuchen zur Kanzerogenität von Teriparatid wurden gehäuft Osteosarkome gefunden (Vahle et al. 2002; Kanis et al. 2019). Bei Menschen konnte die Ursachen-Wirkungsbeziehung noch nicht eindeutig nachgewiesen werden (Betancourt et al. 2003). Daher wurde die maximale Anwendungsdauer von Teriparatid auf maximal 24 Monate begrenzt (DVO 2017).

#### 1.3 Fraktur und Frakturheilung

Das Wort Fraktur leitet sich von dem lateinischen Wort frangere ab, was "brechen" bedeutet. Mit einer Fraktur wird in der Medizin eine vollständige oder unvollständige Kontinuitätsunterbrechung des Knochens beschrieben. Bei gesunden Knochen muss normalerweise eine große Kraft aufgebracht werden, um diesen zu brechen. Je nach Mechanismus unterscheidet man hier die direkte von der indirekten Fraktur. Bei der direkten Fraktur findet man die Diskontinuität des Knochens direkt an der Stelle der Krafteinwirkung, bei der indirekten kommt es zu Biegung oder Stauchung des Knochens, sodass die Fraktur an einem anderen Ort als der Stelle der Krafteinwirkung auftritt. Auch mechanische Zeitraum durch Überlastung kann über einen längeren eine Ermüdungsfraktur auftreten, welche die Folge der summierten Mikrotraumen aus diesem Zeitintervall darstellt. Besteht nun eine Knochenerkrankung wie die Osteoporose, die durch eine Knochendichteabnahme gekennzeichnet ist, kommt es zu atraumatischen oder pathologischen Frakturen, also Frakturen ohne erkennbaren Grund oder adäquates Trauma. (Bartl 2014; Niethard et al. 2014)

#### 1.3.1 Direkte Frakturheilung

Die direkte oder auch primäre Frakturheilung stellt sich ein, wenn der Frakturspalt klein ist (nicht größer als 0,5 mm), oder die Frakturenden sich sogar berühren und stabil zueinanderstehen. Zur Ausheilung der Fraktur kommt es, indem Osteoprogenitorzellen sich um die in dem schmalen Frakturspalt eingesprossenen Blutgefäße setzen und Osteonen bilden. Bei der direkten Frakturheilung kommt es zu keiner Kallusbildung (Bartl 2011).

#### 1.3.2 Indirekte Frakturheilung

Ist der Frakturspalt größer, kommt es zu der indirekten (sekundären) Frakturheilung. Diese ist durch einen mehrphasigen Verlauf gekennzeichnet. In Phase eins (Entzündungsphase) bildet sich durch den Blutaustritt aus den Knochenenden ein Frakturhämatom. In Phase zwei (Regenrationsphase) wandern Fibroblasten und kapillarreiches Mesenchym in das Frakturhämatom ein. Es kommt zur Bildung eines bindegewebigen Kallus zwischen den Frakturenden, dem sogenannten Brückenkallus. Die Fibroblasten wandeln sich in Phase drei (Mineralisationphase) in Osteoblasten um, die den Kallus verkalken und so Faserknochen bilden. In Phase vier (Remodellierungsphase) wird der Faserknochen unter wieder zunehmender mechanischer Belastung zu stabilem, lamellärem Knochen umgebaut (Bartl 2011).

#### 1.3.3 Die osteoporotische Frakturheilung

In dem osteoporotischen Skelett kommt es durch progressiv katabolische Veränderungen am Knochen zu einer erhöhten Frakturneigung (Manolagas 2000). Ist es erst zu einer Fraktur gekommen, stellt sich die Frakturheilung verspätet ein. Ein fortgeschrittenes Alter führt zu einer Verlangsamung von einer Vielzahl von Prozessen, die für die Frakturheilung essentiell sind, wie Angiogenese im Knorpelgewebe und neuem Knochengewebe, verminderte Ossifikation, verspätete Zelldifferenzierung und stark beeinträchtigte Knochengeweberemodellierung (Lu et al. 2005; Cheung et al. 2016). Die Frakturheilung am meisten zu beeinträchtigen scheint die verminderte Zelldifferenzierung, die eng mit der Gefäßinvasion zusammenhängt (Lu et al. 2005). In osteoporotisch verändertem Knochen ist der Heilungsprozeß zusätzlich erschwert, da all diese Faktoren durch die Erkrankung verstärkt werden (Meyer et al. 2001). Eine medikamentöse Unterstützung der durch die Osteoporose beeinträchtigten Knochenheilung ist bis dato nicht offiziell zugelassen.

#### 1.4 Selektive Androgenrezeptor-Modulatoren

#### 1.4.1 Wirkung von Androgenen auf den Knochen

Unter Androgenen fasst man die virilisierenden Sexualhormone zusammen. Sie sind, wie Östrogen, Steroidhormone und unterliegen beim Gesunden einem strengen Regelkreis, in welchem via negativer Rückkopplung die Konzentration der Hormone im Gleichgewicht gehalten wird. In der embryonalen Entwicklung des Mannes vermitteln und fördern sie die Ausbildung von Nebenhoden, der Vasa deferentia und der Samenblasen, das Wachstum von Penis und Prostata, sowie die Ausbildung von Urethra und Skrotum (Silbernagel und Lang 2009). Gebildet in Hoden, Ovarien und Nebenniere beeinflussen die Androgene die Knochenhomoöstase während des ganzen Lebens, besonders in der Pubertät und bei Erwachsenen (Clarke und Khosla 2009). Das prominenteste und häufigste Androgen ist Testosteron. Durch das Enzym 5a-Reduktase kann Testosteron zu dem weitaus potenteren 5a-Dihydrotestosteron (DHT) reduziert werden. Sowohl Testosteron als auch DHT können nun an den ubiquitär im Körper vorkommenden Androgenrezeptor (AR) binden und diesen aktivieren. Durch einen Enzymkomplex, eine Aromatase, kann aus Testosteron auch Östradiol metabolisiert werden, sodass auch eine Östrogen-Wirkung über Bindung des jeweiligen Östrogenrezeptors auf den Knochen ausgeübt werden kann. Sicher haben Östrogene einen größeren Einfluss auf den Erhalt der Knochengesundheit, doch sind die günstigen Effekte der Androgene auf Knochen nicht zu vernachlässigen. Androgene haben eine antiosteoporotische und anabole Wirkung (Elbers et al. 1999; Almeida et al. 2017). Bei älteren Männern mit Osteoporose beugen sie einem Knochenmasseverlust vor, sind maßgeblich an der Entwicklung des Skelettes in jungen Erwachsenen beteiligt und unterstützen den Erhalt des trabekulären Knochens während des Alterns (Vanderschueren al. 2004). Besonders DHT stimuliert periostales Wachstum, hemmt die et Osteoklastengenese und fördert die Osteoklasten-Apoptose (Chen et al. 2001; Kousteni et al. 2002). Die Osteoblasten- und Osteozyten-Apoptose wird durch Androgene vermindert (Clarke und Khosla 2009) und die Osteoblastendifferenzierung stimuliert (Kasperk et al. 1990; Kim und Koo 2020). Des Weiteren regulieren Androgene auch die lokale Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Cytokinen und nehmen somit indirekt Einfluss auf Vorgänge im Knochen. So kommt es unter Androgen-Einfluss zu einer Hochregulation von Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) und Insulin-like Growth Factor (IGF), welche die Ossifikation stimulieren (Kasperk et al. 1990; Kasperk CH et al. 1997; Vanderschueren et al. 2014), sowie zu einer Herabregulation von Interleukin-6 (IL-6), welches die Osteoklastengenese fördert (Bellido et al. 1995; Vanderschueren et al. 2014).

#### 1.4.2 Der Androgenrezeptor (AR)

Der Androgenrezeptor (AR) gehört zu der größten Familie von DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren, den sogenannten nukleären Rezeptoren. AR sind ubiquitär exprimiert und somit an vielen kritischen biologischen Vorgängen im menschlichen Körper beteiligt. Sie werden durch Bindung ihres Liganden, also der Androgene, aktiviert und gelangen dann in den Zellkern. Hier können sie die Transkription von Genen entweder aktivieren oder unterdrücken und somit Einfluss auf die Zelldifferenzierung nehmen. Der Androgen/AR-Komplex kann auch über einen schnellen, nicht DNA-abhängigen Signalweg agieren, indem sekundäre Botenstoffe aktiviert werden, die eine Enzymkaskade in Gang setzen können (Estrada et al. 2003; Rana et al. 2014).

Die Androgenrezeptoren bestehen aus vier strukturellen Domänen: der Ligandenbindenden Domäne(LBD), der DNA-bindenden Domäne (DBD), der N-Terminalen Domäne (NTD) und der Lysin-reichen Domäne zwischen LBD und DBD, welche die nuclear localization sequence (NLS) enthält (Gao et al. 1996; Narayanan et al. 2008). An die LBD binden die Androgene und führen so über eine Konformationsänderung des Rezeptors zu dessen Aktivierung. In der NTD ist die activation function (AF-1) enthalten, welche eine zentrale Rolle in der AR-Aktivierung und auch Funktion spielt. Die NTD ist eine wichtige Transaktivierungsdomäne des Androgenrezeptors und eine Deletion des AF-1 führt zu einem relevantem Verlust an Rezeptorfunktion (Gao et al. 1996; Alen et al. 1999). Die DBD ist, wie der Name bereits impliziert, dafür verantwortlich, dass der Rezeptor an das sogenannte androgen responsive element der DNA bindet, eine spezifische Abfolge von Nukleotiden (Narayanan et al. 2008). Die NLS vermittelt den Import des Rezeptors in den Zellkern. Eine Deletion dieses Signals zieht einen Verlust an transkriptionaler Aktivität nach sich (Gao et al. 1996).

Ein Beweis für die Rolle des AR in der männlichen Skeletthomöostase ließ sich durch Experimente mit AR-Knockout-Mäusen und orchiektomierten Mäusen ableiten, in denen es zu einer erhöhten Knochenresorption im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen kam (Sinnesael et al. 2012). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in Experimenten mit weiblichen AR-Knockout-Mäusen dargelegt (Määttä et al. 2013). Der Verlust der AR-Funktion resultiert vor allem in einem Abbau der trabekulären Knochenmasse (Määttä et al. 2013; Vanderschueren et al. 2014). Jedoch ließ sich in den Osteoblasten des kortikalen Knochens eine stärkere AR-Expression detektieren, als in denen des trabekulären Knochens (Kasperk C et al. 1997). Generell zeigen sich zwischen Männern und Frauen allerdings keine Unterschiede in der Expression von AR in Knochenzellen, vor allem nicht in den Wachstumszonen der Epiphyse (Carrascosa et al. 1990; Abu et al. 1997), wo sie in der frühen Pubertät das longitudinale Wachstum stimulieren und in der späten Pubertät den Epiphysenfugenschluß vermitteln (Clarke und Khosla 2009). AR ist sowohl in reifen Osteoblasten und Osteozyten stark exprimiert, als auch in vitro in epiphysealen Chondrozyten und anderen Knorpelzellen (Carrascosa et al. 1990; Abu et al. 1997; Vanderschueren et al. 2014). Sowohl in humanen Osteoklasten als auch in Tierversuchen

konnten keine direkten AR-vermittelten Effekte auf Osteoklasten nachgewiesen werden (Abu et al. 1997; Määttä et al. 2013; Wu et al. 2019), weshalb man davon ausgeht, dass ein Großteil der Androgen-Wirkung auf Osteoklasten und Knochenresorption von Zellen aus osteoblastischer Zelllinie vermittelt werden (Weinstein et al. 1997; Almeida et al. 2017; Wu et al. 2019).

#### 1.4.3 Nicht-steroidale Androgenrezeptor-Modulatoren

Die vorteilhaften anabolen Effekte der Androgene auf den Knochen möchte man sich in der Osteoporosetherapie gerne zu Nutze machen. Die einfache Substitution von Steroidhormonen ist allerdings mit einer Vielzahl an Nebenwirkungen verbunden, da nicht nur die gewünschte anabole Komponente der Androgene ihre Wirkung zeigt, sondern auch androgene Effekte. In Männern können anabole Steroide durch Störung des natürlichen hormonellen Regelkreises zu verminderter Fertiliät, testikulärer Atrophie, Prostatahypertrophie, Priapismus und Gynäkomastie führen (Wemyss-Holden et al. 1994; Maravelias et al. 2005). Bei Frauen verursachen sie eine Virilisierung, mit teils irreversiblen Veränderungen am Körper (Maravelias et al. 2005). Anabole Steroide wirken zudem lebertoxisch, aterosklerotisch, begünstigen thrombembolische Ereignisse und führen zu Verhaltensauffälligkeiten und psychischen Störungen (Maravelias et al. 2005; van Amsterdam et al. 2010). Um die genannten Nebenwirkungen zu vermeiden und trotzdem die anabolen Resultate am Knochen zu bewirken, ist es also wichtig, eine Dissoziation zwischen den anabolen und androgenen AR-vermittelten Effekten der Steroidhormone zu erzielen (Mohler et al. 2009). Die meisten bis heute entwickelten selektiven Androgenrezeptor-Modulatoren (SARMs) zeigen eben diese Eigenschaft: sie wirken nicht steroidal und gewebsspezifisch als AR-Ligand (Gao und Dalton 2007; Kearbey et al. 2007). Strukturell können SARMs in 4 Gruppen klassifiziert werden: die Arylpropionamide, die bizyklischen Hydantonine, die Quinolinone und die Tetrahydroquinolin-Analoga (Chen et al. 2005) (Abb. 1). Allen Gruppen gemeinsam ist, dass sie kein Substrat für die Aromatase oder 5a-Reduktase darstellen und als nicht-steroidale selektive Androgen-Rezeptor-Modulatoren (SARMs) anabole Wirkung auf Muskel und Knochen und teilweise androgene Wirkung auf die Prostata haben (Chen et al. 2005). Aus diesen Gruppen ist die Forschung mit Arylpropionamide und Quinolinonen am weitesten fortgeschritten. Die restlichen Gruppen wurde auf Grund von Toxizität, fehlender Wirksamkeit in präklinischen Studien oder anderen unbekannten Gründen nicht weiter untersucht (Narayanan et al. 2018). Die wichtigsten klinischen Kandidaten der Arylpropionamide sind S-4/Andarine und Enobosarm/Ostarine, die der Quinolinone LGD2226 und LGD2941 (Narayanan et al.

2018). Die Quinolinone zeigten in präklinischen Studien eine gute Gewebespezifität und eine mit dem natürlichen Hormon DHT vergleichbare Aktivierung des AR (Edwards et al. 1998). Rosen und Negro-Vilar (2002) demonstrierten in einer Studie mit LGD2226, dass nach 16-wöchiger Applikation von LGD2226 in orchiektomierten Ratten eine Zunahme von Knochenmasse-und stärke im Vergleich zu den Kontrollen zu messen war. Trotz guter präklinischer Studienergebnisse wurde die Entwicklung von LGD2226 von dem produzierenden pharmazeutischen Unternehmen nicht weiter fortgesetzt. Ein neu entwickeltes Molekül, LGD2941, befindet sich aktuell in einer Phase-1 Studie, zu der zu diesem Zeitpunkt noch keine Daten, welche Rückschlüsse auf die Weiterentwicklung der Quinolinone zulassen würden, vorliegen (Narayanan et al. 2018). Die Arylpropionamide sind in der Forschung etwas weiter fortgeschritten. So konnte S-4/Andarine in ovarektomierten und orchiektomierten Ratten die Knochenmasse und -stärke im Vergleich zu intakten Kontrollen beibehalten und zeigte eine höhere Wirksamkeit als DHT (Gao et al. 2005; Kearbey et al. 2007). Enobosarm hat in präklinischen Studien sowohl einen anabolen als auch antiresorptiven Effekt am Knochen gezeigt. Des Weiteren konnte in einer doppelblind, placebo-kontrollierten Studie nachgewiesen werden, dass Enobosarm die fettfreie Masse und Muskelfunktion bei älteren Männern und postmenopausalen Frauen verbessern konnte (Dalton et al. 2011). SARMs haben sich also sowohl in präklinischen als auch klinischen Studien als ein vielversprechendes Medikament für Erkrankungen erwiesen, welche eine osteoanabole Therapie erforderlich machen (Narayanan et al. 2008).



Abbildung 1: Beispielhafte Vertreter der vier strukturellen Gruppen der SARMs; eigene Zeichnung

#### 1.4.4 Enobosarm/Ostarine

Enobosarm (C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>) (Abb.2) entwickelt von der Firma GTx Inc <sup>®</sup> (Memphis, TN, USA), auch und im folgenden Ostarine genannt, zählt zu den vielversprechendsten und klinisch bis dato am besten erforschten Vertretern der Arylpropionamide unter den SARMs (Narayanan et al. 2018).



Abbildung 2: Enobosarm; eigene Zeichnung

Nicht-Steroidale Androgen-Rezeptor-Modulatoren der Gruppe der Arylpropionamide wurden erstmals 1998 beschrieben. Die chemische Verbindung der Arylpropionamide ähnelt der des Bicalutamid, einem nicht-steroidalem, selektiven Antiandrogen, welches in der Behandlung von Prostatakarzinomen eingesetzt wird und durch kompetetive Bindung des AR die androgenen Effekte zu unterdrücken vermag. Durch strukturelle Modifizierung des Bicalutamid gelang es, eine höhere Bindungsaffinität zum AR, sowie eine agonistische Wirkung an diesem zu erzielen (Dalton et al. 1998; Bohl et al. 2005; Duke et al. 2011). Ostarine hat sich in der Gruppe der Arylpropionamide als der SARM mit dem günstigsten Sicherheitsprofil und einer vorteilhaften Pharmakokinetik erwiesen. Es zeigt eine enantioselektive Affinität zum AR und ähnelt in seiner Potenz und Effizienz der des DHT, ohne eine androgene Wirkung zu zeigen. Die effektive und selektive Aktivität von Ostarine in anabolem Gewebe zeigt sich bereits bei einer Dosis von 0,03 mg pro Tag, was auf die hohe anabole Potenz der Verbindung hinweist (Kim et al. 2005). Hierbei zeigt es sich gleichzeitig bemerkenswert selektiv gegenüber dem AR und neben einer schwachen antagonistischen Wirkung am Progesteronrezeptor keine weiteren Kreuzreaktionen mit anderen nukleären Hormonrezeptoren (Jones et al. 2013).

In tierexperimentellen Studien mit ovar- und orchiektomierten Ratten konnte demonstriert werden, dass Ostarine sowohl die Muskelmasse als auch die Knochenfestigkeit erhöht und somit einen dualen Ansatz zur Osteoporosetherapie bietet (Hanada et al. 2003; Gao et al. 2005; Kearbey et al. 2007; Jones et al. 2013; Narayanan et al. 2018; Hoffmann et al. 2019; Komrakova et al. 2019). Im Gegensatz zu der bei Osteoporose häufig eingesetzten antiresorptiven Therapie, welche einen weiteren Knochenabbau zu verhindern vermag, ist Ostarine in der Lage die Knochenmasse und –festigkeit zu erhöhen (Narayanan et al. 2018).

#### 1.5 Hypothese und Fragestellung

In mehreren vorangegangenen Studien konnte ein osteoanaboler Effekt der SARMs auf den osteoporotischen Knochen sowie eine Steigerung der Muskelmasse nachgewiesen werden (Kearbey et al. 2007; Narayanan et al. 2018; Hoffmann et al. 2019; Henkies 2020). Unsere Hypothese war es, dass sich die osteoanabole Wirkung der SARMs auch direkt auf die durch Osteoporose beeinträchtigte Knochenheilung positiv auswirken würde. Eine beschleunigte Frakturheilung und verbesserte Mobilisation könnte zu einer Reduktion der Mortalität und Morbidität bei dem von Osteoporose betroffenen Patientenklientel nach eingetretenem Frakturereignis beitragen. Eine Steigerung der Muskelkraft würde sich zudem indirekt positiv auf die Frakturheilung auswirken. Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Osteoporosemodell die ovarektomierte Ratte (Kalu 1991) gewählt, welche ein etabliertes Modell der häufigsten Osteoporoseform - der postmenopausalen Osteoporoseist. Das Ziel war es, durch die Untersuchung der metaphysären Frakturheilung an den Rattentibiae eine objektivierte Aussage bezüglich der Qualität und Dynamik der Frakturheilung im osteoporotischen Knochen unter Ostarine-Behandlung zu treffen.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

Tabelle 1: Tiere und Tierhaltung

Tiere und Tierhaltungsmaterialien	Bezugsquelle
Makrolon Typ IV Käfig	Tecniplast, Hohenpeißenberg, Deutschland
Sojafreies Futter sniff S/M, 10 mm Pellets	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
Weibliche Ratten des Stammes Sprague- Dawley	Winkelmann, Borchen, Deutschland

Tabelle 2: Operationsmaterialien

Operationsmaterial	Bezugsquelle
Hautklammern Michel wound brackets	Gebrüder Martin GmbH und Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Kortikalisschrauben, 1,2 mm Durchmesser, 5,6 und 7 mm Länge	Stryker, Selzach, Schweiz
Nadelhalter	Fuhrmann GmbH, Much, Deutschland
Osteotomie-Säge OT 7 Piezosurgery	Mectron Mediacal Technology, Carasco, Italien
Pinzetten, anatomisch	Fuhrmann GmbH, Much, Deutschland
Rasierer	Aesculap Suhl GmbH, Suhl, Deutschland
Skalpell	pfm medical, Köln, Deutschland
Vicrylfäden 4.0	Ethicon, Johnson & Johnson, Nordstedt, Deutschland

5-Loch-Leibinger-Platte aus Titan, (57-	Stryker, Selzach, Schweiz
05140 XS Transfixationsplatte in T-	
Form 90°)	

### Tabelle 3: Medikamente

Medikamente	Bezugsquelle
Buprenorphin (0,3 mg/ml Temgesic®)	RB Pharmaceuticals Limited, Berkshire, England
Carprofen (Rimadyl®)	Zoetis Schweiz GmbH, Zürich, Schweiz
Desinfektionsmittel Braunvidon	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Enobosarm/Ostarine (Reinheit >98%)	Biochempartner Co. Ltd. Shanghai, China
Ketamin (10 g/100 ml)	MEDISTAR Arzneimittelvertrieb GmbH, Ascheberg, Deutschland
Natriumchlorid 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Perphenazin (Decentan®)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylazin (20 mg/ml Xylariem® )	Riemser Arzneimittel AG, Greifswald, Deutschland

### Tabelle 4: Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
Alizarinkomplexon	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calcein-Grün	Roth, Karslruhe, Deutschland
Eukitt® Eindeckmedium	Kilder, Freiburg, Deutschland
Methylmetacrylsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Tetracyclinhydrochlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylenol-Orange Tetranatrium	Roth, Karlsruhe, Deutschland

### Tabelle 5: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte- und Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Analyseautomat für klinische Chemie	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Auflicht-Fluoreszenz-Stereomakroskop Leica MZ 7-5 mit FluoCombi III	Leica, Bensheim, Deutschland
Computerprozessor IntelPentium 4, 2.6 GHz	Intel, Santa Clara, Kalifornien, USA
Einmalkanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Innenlochsäge Leica SP 1600 Sägemikroton	Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland
Kaltlichtlampe Leica KL 1500 LCD	Leica, Bensheim, Deutschland
Kamera Leica DC 490F auf Auflichtmakroskop	Leica, Bensheim, Deutschland
Kleintier-Micro-CT QuantumFX µicroCT	CaliperLifeScience, Hopkinton, MA, USA
Objektträger	Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rollrandflaschen	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Werkstoffprüfmaschine Typ 145660	Zwick/Roell, Ulm, Deutschland
Zentrifugen-Gefäße 5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 6: Software und Programme

Software und Programme	Hersteller
Excel MS Office 2010	Microsoft, Redmond, Washington, USA
GraphPad Prism Version 5.0	GraphPad Software Inc., La Jolla, Kalifornien, USA
MetaMorph Microscopy Automation & Image Analysis Software	Molecular Devices LLC, Sunnyvale, Kalifornien, USA
testXpert Software	Zwick/Roell, Ulm, Deutschland
3DOsteoAnalyzer Software	Kommerziell erwerbliche Version: Scry v. 06 software, Kuchel & Sautter UG, Bad Teinach-Zavelstein, Deutschland (Saul et al. 2016; Albers et al. 2018)

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Versuchsablauf

Der Versuch wurde in einem Zeitraum von 14 Wochen mit insgesamt 63 weiblichen Ratten des Stammes Sprague-Dawley (Fa. Winkelmann, Borchen, Deutschland) gestartet, welche in 5 Gruppen à 12 bis 13 Tiere randomisiert wurden. Am Anfang des Versuches stand die Ovarektomie der Ratten, um bei den weiblichen Tieren durch Östrogenentzug osteoporotische Veränderungen an den Knochen zu induzieren. Nach 8 Wochen, wenn sich am Knochen der Ratten der erwünschte osteopene bzw. osteoporotische Zustand eingestellt hatte, der mit dem von postmenopausalen Frauen vergleichbar ist (Kalu 1991), wurden die Tiere einer weiteren Operation unterzogen. Es wurde eine bilaterale, metaphysäre Osteotomie durchgeführt, gefolgt von einer Osteosynthese beider Tibiae.

Während des gesamten Versuches bekamen die Ratten ausschließlich eine Spezialdiät in Form von sojafreiem Futter (ssniff SM R/M, 10mm Pellets, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Während zwei (OVX, NON-OVX) der fünf Gruppen als Kontrollgruppe dienten und ausschließlich sojafreies Futter bekamen, wurde dem Futter der übrigen drei Versuchsgruppen (OS 0,04, OS 0,4 und OS 4) Ostarine (OS) (Reinheit > 98%, Biochempartner Co. Ltd ®, Shanghai, China), ein selektiver Androgen-RezeptorModulator (SARM), in verschiedenen Konzentrationen unmittelbar nach der Osteotomie über 5 Wochen beigemischt (s. Tab. 7)

Um die Neuformation des Knochens und die etwaige Wirkung von OS auf die Frakturheilung und Knochenstruktur besser nachvollziehen zu können, wurden den Ratten in bestimmten Abständen Fluorochrome subkutan appliziert (Tab. 10 & Abb. 18).

5 Wochen nach der Osteotomie endete der Versuch mit der Enthauptung und Obduktion der Tiere. Nach der Obduktion wurden die Tibiae freipräpariert und geputzt, um daran anschließend biomechanische, morphologische und histologische Untersuchungen an den gänzlich gesäuberten Tibiae durchzuführen.

Versuchsgruppe	Behandlung
NON-OVX	Osteotomie+Plattenosteosynthese, sojafreies Futter
OVX	Ovarektomie, Osteotomie+Plattenosteosynthese, sojafreies Futter
OS 0,04	Ovarektomie, Osteotomie+Plattenosteosynthese Sojafreies Futter + Ostarine ( 0,04 mg/kg KG)
OS 0,4	Ovarektomie, Osteotomie+Plattenosteosynthese, sojafreies Futter + Ostarine ( 0,4 mg/kg KG)
OS 4	Ovarektomie, Osteotomie+Plattenosteosynthese, sojafreies Futter + Ostarine ( 4 mg/ kg KG)

Tabelle 7: Behandlung der verschiedenen Versuchsgruppen

#### 2.2.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Die 63 weiblichen Sprague-Dawley Ratten (Fa. Winklemann, Borchen, Deutschland) wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen gehalten. Hier wurden die Ratten in Makrolon® Typ IV–Käfigen gehalten, in welchen sich bis zu 4 Tiere gleichzeitig befanden. Die Käfige wurden regelmäßig gereinigt.

Ein Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch eine sich alle 12 Stunden abwechselnde Beleuchtung geschaffen. Die Temperatur betrug konstant 20 °C und die relative Luftfeuchtigkeit 55%

Zu Versuchsbeginn betrug das durchschnittliche Körpergewicht der Ratten 252,89 g (229 – 265 g). Das Gewicht der Ratten sowie der Verbrauch des Spezialfutters (ssniff SM, R/M, 10mm Pellets; ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) wurden wöchentlich gewogen und dokumentiert. Das Futter wurde wieder aufgefüllt, um so zum einen die

durchschnittliche Nahrungsaufnahme pro Tier als auch die durchschnittliche Aufnahme des dem Futter beigemischten Ostarine pro Tier zu errechnen. Während des gesamten Versuches starben insgesamt 12 Tiere an der verabreichten Narkose.

#### 2.2.3 Ovarektomie

Um eine Osteoporose durch Östrogenentzug hervorzurufen, wurden bei den 56 Versuchstieren der Gruppen OVX, OS 0,04, OS 0,4 und OS 4 die Ovarien entfernt. Im Vorfeld der Ovarektomie wurden die drei Monate alten Tiere zunächst durch eine CO<sub>2</sub>-Narkose sediert. Daraufhin bekamen die Ratten einmal Rimadyl in einer Konzentration von 5 mg/kg KG subcutan sowie Ketamin (Konzentration: 100 mg/kg KG) und Xylazin (Konzentration: 7 mg/ kg KG) intraperitoneal gespritzt.

Direkt vor dem operativen Eingriff wurden alle Tiere gewogen und anschließend das Operationsgebiet bilateral lateral unter dem Rippenbogen freirasiert. Dann wurde zunächst ein paravertebraler Hautschnitt getätigt, das Retroperitoneum eröffnet und von hier weiter in die Tiefe bis zum Peritoneum präpariert. Dieses wurde wiederum eröffnet um anschließend die Uteri und Ovarien samt der versorgenden Strukturen darzustellen. Zur Durchführung der Ovarektomie wurde der Eierstock an der Tuba uterina abgeklemmt, diese durch einen Faden ligiert und anschließend wurde das Ovar scharf abgetrennt. Nach dem Erreichen und der Sicherstellung einer Bluttrockenheit wurde das Peritoneum und die Muskeln mit 4.0 Vicrylfäden (Ethicon, Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland) und die Haut mit Klammern (Michel wound brackets 7,5 x 1,75 mm, Gebrüder Martin GmbH und Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) wieder verschlossen. Mit der kontralateralen Seite wurde genauso verfahren (Trautmann 2014; Weidemann 2014).

Ferner wurde jedem Tier intraoperativ ein individualisierter Transponder in den Nacken platziert, um die Identifikation während des Versuchsverlaufes zu ermöglichen. Postoperativ wurde allen Tieren 3 ml 0,9 % Kochsalzlösung als Depot subcutan appliziert, um eine Dehydratation vorzubeugen. Hiernach wurden die Ratten bis zum Erwachen in einen durch eine Wärmeplatte gewärmten Käfig gelegt und beobachtet. (Trautmann 2014; Komrakova et al. 2015)

Bei diesem Eingriff starben sieben Versuchstiere, weshalb der Versuch mit 56 Tieren fortgesetzt wurde.

#### 2.2.4 Osteotomie und Osteosynthese

8 Wochen nach der Ovarektomie, wenn davon auszugehen ist, dass eine Osteoporose, ähnlich der, welche bei postmenopausalen Frauen auftreten kann, induziert ist (Kalu 1991), wurden die Ratten aller Gruppen einem weiteren operativen Eingriff, der Osteotomie mit anschließender Osteosynthese, unterzogen (Stuermer et al. 2010; Komrakova et al. 2018) Die Narkose wurde weitestgehend analog zu jener der Ovarektomie durchgeführt, allerdings wurde zusätzlich noch Buprenorphin (0,1 mg/kg KG) subcutan injiziert.

Um einen adäquaten Zugang zum Operationsgebiet zu gewährleisten, wurden die Tiere an den Hinterläufen rasiert (Abb. 3) und der Bereich desinfiziert. Anschließend wurde mit einem Skalpell ein circa 3 cm langer Hautschnitt über der medio-ventralen Tibia getätigt und die Beugemuskulatur unter Schonung des Periost scharf abgesetzt (Brandsch 2012). Die zukünftige Osteotomielinie wurde circa 7 mm distal des Tibiaplateaus markiert. Nun wurde eine 5-Loch-Leibinger-Platte aus Titan (57-05140 XS Titanfixationsplatte in T-Form 90°, Stryker Trauma, Selzach, Schweiz) auf die freipräparierte ventrale Tibiakante aufgelegt. Diese wurde manuell befestigt, und zwar so, dass die beiden proximalen Schraubenlöcher der Platte auf Höhe der Tibia-Epiphyse unter der Wachstumsfuge lagen. Durch das am weitesten proximal gelegene Plattenloch wurde zunächst ein Schraubenkanal vorgebohrt und die Platte dann mit einer Schraube leicht fixiert. Dieser Vorgang wurde mit dem am distalsten gelegenen Plattenloch wiederholt. Zwei Schraubenkanäle distal sowie proximal wurden vorgebohrt, die jedoch zunächst nicht mit Schrauben bestückt wurden. Anschließend wurde das angebrachte Osteosynthesematerial zeitweise aus dem Operationsgebiet geschoben (Abb. 4). So konnte der Operateur unter Weichteilschonung per gepulstem Ultraschall (OT 7 Piezosurgery®, Mectron Medical Technology, Carasco, Italien) den Knochen senkrecht zur Längsachse der Tibia osteotomieren (Abb. 4). Anschließend wurde die Leibinger-Platte proximal mit zwei 7 mm 1.1er-Schrauben und distal mit einer 4 mm und einer 5 mm 1.1er-Schraube in den hierfür vorgebohrten Kanälen refixiert (Abb. 5). Durch die Vorbohrungen der Schraubenlöcher und die daraus folgende determinierte Lage der Platte auf der Tibia wird eine genaue Reposition der Frakturenden geschaffen. Der Osteotomiespalt von 0,5 mm entspricht dem verwendeten Piezosurgery®-Sägeblatt (Trautmann 2014; Weidemann 2014).

Die Beugemuskulatur wurde reponiert und mit einem 4.0 Vicrylfaden (Ethicon, Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland) wieder vernäht (Abb. 6), die Haut geklammert (Michel wound brackets, 7 x 1,75 mm, Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen,

Deutschland) und die Operationswunde abschließend desinfiziert (Braunovidon®, Bayer, Leverkusen, Deutschland) (Abb. 7).

Der Eingriff wurde an der kontralateralen Seite wiederholt (Weidemann 2014).

Den Tieren wurde analog zum postoperativen Vorgehen bei der Ovarektomie ein 3 ml Depot an isotoner Kochsalzlösung subcutan gespritzt. Zur Analgesie wurde außerdem noch Decentan (4 mg/kg KG) s.c. verabreicht

Die Tiere wurden anschließend in einen vorgewärmten Käfig gelegt und bis zum Erwachen beobachtet. Um auch im weiteren Verlauf eine relative Schmerzfreiheit der Tiere zu erreichen, applizierte man den Ratten am OP-Tag einmalig Buprenorphin (0,1mg/kg KG, s.c.), am ersten postoperativen Tag bekamen sie einmalig Rimadyl (5 mg/kg KG, s.c.)+ Buprenorphin (0,1mg/kg KG, s.c.) und ab dem zweiten bis einschließlich vierten Tag wurde nur noch einmal täglich Rimadyl (5 mg/kg KG, s.c.) gegeben.

Bei diesem Eingriff haben insgesamt fünf Tiere die Narkose nicht überlebt. Der Versuch wurde mit 51 Tieren weitergeführt.





Abbildung 3: Rasur Abbildung 4: Osteotomiespalt Hinterläufe zur Ope vorbereitung


Abbildung 5: 5-Loch-Leibinger-Platte mit vier Schrauben



Abbildung 6: Vernähte und reponierte Beugemuskulatur



Abbildung 7: Desinfizierte und geklammerte Operationswunde

## 2.2.5 Behandlung und Ostarine-Verabreichung

Nach der Durchführung der Ovarektomie und der Osteotomie wurde der Versuch mit den 51 verbliebenden Ratten fortgesetzt. Es waren 10 Versuchstiere in der Gruppe NON-OVX und 9 in der Gruppe OVX. In den Gruppen OS 0,04 und OS 4 befanden sich jeweils 11 Versuchstiere und in OS 0,4 10 Versuchstiere. Dem Futter der Gruppen OS 0,04, OS 0,4 und OS 4 wurde Ostarine in verschiedenen Konzentrationen beigemischt (Tab. 7). Durch wöchentliches Wiegen der Versuchstiere und des Futterverbrauchs konnte man die durchschnittliche Nahrungsaufnahme und somit Ostarine-Dosierung in Gramm pro Versuchstier pro Tag ermitteln und auf eine wöchentliche Dosis hochgerechnet werden, welche unter der beabsichtigten Dosis lag.

### 2.2.6 Obduktion und Präparation

Fünf Wochen nach der Ostetotomie wurden die Versuchstiere mittels Dekapitation getötet. Davor wurden die Ratten nochmals gewogen und anschließend mit einer tiefen CO<sub>2</sub>-Narkose sediert. Die Dekapitation wurde mit einer Guillotine ausgeführt und das austretende Blut für spätere Serumanalysen aufgefangen. Die Tibiae wurden anschließend behutsam und unter Schonung der dünnen Fibulae aus dem Knie- und oberen Sprunggelenk exartikuliert. Man entfernte einen großen Anteil des Weichgewebes des Unterschenkels, die restlose Freipräparation und Entfernung des Osteosynthesematerials fand zu einem späteren Zeitpunkt statt. Von jedem Tier wurde zufällig eine der zwei Tibiae für molekulare Untersuchungen genutzt wurde, deren Analyse und Auswertung nicht Inhalt der vorliegenden Arbeit sind. Die Tibiae wurden bis zu den im Folgenden beschrieben Untersuchungen in 5 ml Röhrchen bei -20 °C gelagert. Neben den Tibiae wurden den Ratten außerdem noch die Uteri entnommen und gewogen. Auch bestimmte Muskeln, Femura und Wirbelkörper wurden entnommen. Diese werden in gesonderten Arbeiten analysiert (Hoffmann et al. 2019).

#### 2.2.7 Serumanalyse

Die Serumanalysen wurden in der Abteilung für klinische Chemie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt. Zur Analyse der Alkalischen Phosphatase (AP) bediente man sich eines klinisch-chemischen Analyseautomaten der Firma Roche (Roche/ Hitachi, 904/911/912/917 MODULAR P/ MODULAR D, Gerät ACN: 158, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Die AP-Werte wurden mithilfe eines standardisierten Farbtestes ermittelt. Durch die photometrische Bestimmung des Reaktionsproduktes p-Nitrophenol der AP, das sich proportional zur Aktivität der AP verhält, kann der Analyseautomat durch einen Umrechnungsfaktor die Konzentration der AP berechnen und gibt diese dann in U/l an. (Brandsch 2012)

### 2.2.8 Biomechanische Untersuchung

#### 2.2.8.1 Durchführung der Untersuchung

Ziel der biomechanischen Untersuchung war es, Unterschiede hinsichtlich der Elastizität und Streckgrenzen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nachzuweisen. Um diese bediente Unterschiede prägnant darstellen zu können, man sich einer Werkstoffprüfmaschine (Typ 145660, Z020/TND Zwick/Roell, Ulm, Deutschland). Dazu wurden die Tibiae auf einer speziell für diese Art der Untersuchung angefertigten Trägerplatte so positioniert, dass die ventrale Seite der Tibiae nach oben zeigte (Abb. 8) und die Kraftübertragung ca. 1 mm unterhalb des Osteotomiespaltes senkrecht zur ventralen Tibia ansetzen konnte. Die Werkstoffprüfmaschine wurde über das Programm testXpert ® (Zwick/Roell, Ulm, Deutschland) angesteuert, welches in einem Diagramm die Kraft gegen die zurückgelegte Wegstrecke aufzeichnet.

Vor Untersuchungsbeginn wurden die zu untersuchenden Tibiae vollständig aufgetaut. Um eine Austrocknung der Knochen zu vermeiden, wurden diese stets mit isotoner Kochsalzlösung angefeuchtet. Zur biomechanischen Untersuchung wurden aus allen Gruppen nur die Tibiae verwendet, welche während der Frakturheilung harten Kallus gebildet hatten. Tibiae mit weichem Kallus oder keinem Kallus konnten bei dieser Untersuchung nicht benutzt werden. Die Trägerplatte ist ein Aluminiumblock, in welchen zwei senkrecht zueinanderstehende Furchen eingefräst sind. Neben der longitudinalen Furche sind vier Schrauben angebracht, welche ein seitliches Verrutschen durch individuelle Anpassung verhindern sollen. Die Kondylen der Tibia liegen in der horizontal zur Längsachse der Tibia stehenden Furche, die distale Tibia in der längs zur Tibia verlaufenden Furche. So positioniert und stabilisiert wird sichergestellt, dass die Tibiae sich während der Kraftübertragung nur longitudinal ausdehnen können. Die so positionierte Tibia wird auf der Trägerplatte in der Werkstoffprüfmaschine platziert. Zur Kraftübertragung diente ein abermals speziell für diese Art der Untersuchung gefertigter Rollenstempel mit einer zirkulären Nut, welche ca. 1 mm unterhalb des Osteotomiespaltes ansetzte. Die ventrale Tibiakante sollte direkt in der Nut liegen (Abb. 9). Der Rollenstempel wurde nun herabgesenkt und eine Vorkraft von 1 N erzeugt. Die Position der Tibia wurde nun abermals kontrolliert und wenn nötig korrigiert. Anschließend wurde die biomechanische Untersuchung gestartet, indem sich der Rollenstempel kontinuierlich mit einer Geschwindigkeit von 5 mm/min absenkte und somit zunehmend Kraft auf die eingelegte Tibia ausübte. Die aufgewandte Kraft wurde alle 0,1 mm gemessen und in einem Kraft-Weg-Diagramm aufgezeichnet. Da es nicht das Ziel der Untersuchung war, einen erneuten Bruch der Tibia herbeizuführen, galt es dies zu verhindern. Daher kam es zum automatischen Abbruch der Kraftübertragung, wenn sich der lineare Kurvenverlauf des Kraft-Weg-Diagrammes größer als 2 mm veränderte oder aber ein Kraftabfall von größer als 2 N registriert wurde.

Um die Anzahl der Messfehler durch den Untersucher möglichst gering zu halten, wurde im Vorfeld zu dem Test eine Validierung mit zehn linken und zehn rechten nicht osteotomierten Rattentibiae durchgeführt. Lagen in diesen Messungen die Abweichungen zwischen den erhobenen Daten unter 10%, konnte mit dem Test von osteotomierten Tibiae begonnen werden. (Stürmer et al. 2006; Weidemann 2014)



Abbildung 9: Korrekte Positionierung der Tibia auf der Trägerplatte



Abbildung 8: Aufsetzen der Nut an der ventralen Tibiakante

## 2.2.8.2 Biomechanische Untersuchung

Die Auswertung der biomechanischen Untersuchung erfolgte durch die Analyse der aufgezeichneten Kraft-Weg-Diagramme mit Hilfe von Microsoft Excel (MS Office 2010). Diese zeigen einen typischen Kurvenverlauf, welcher sich in drei verschiedene Phasen einteilen lässt. In der ersten Phase kommt es zur elastischen Deformation und der Kurvenverlauf ist linear. Die Dehnung der Tibia ist noch reversibel. Der Übergang der elastischen in die plastische Deformation markiert den Beginn der zweiten Phase und wird auch als Streckgrenze oder *yield load* bezeichnet. In dieser Phase ist der Kurvenverlauf nicht mehr linear. Es kommt zu einer plastischen Verformung des trabekulären Knochens, welche irreversibel sind, aber die Struktur nicht schädigen. Diese Phase endete mit dem Erreichen der maximalen Kraft (F<sub>max</sub>).

## 2.2.9 Messparameter

## 2.2.9.1 Elastizität

Die Elastizität beschreibt die Fähigkeit der reversiblen Verformung der jeweils untersuchten Tibiae und stellt sich im Kraft-Weg-Diagramm als linearer Kurvenanstieg dar. Sie wird in N/mm angegeben. (Brandsch 2012; Trautmann 2014; Weidemann 2014)

#### 2.2.9.2 Streckgrenze (yield load)

Die Streckgrenze, oder auch vield load, ist der Punkt, an dem es zum Übergang von der elastischen in die plastische Deformation des Knochens kommt und die Kurve im Kraft-Weg-Diagramm nicht mehr linear verläuft. Ermittelt wurde dieser mit Hilfe einer Regressionsgeraden und deren Standardabweichungen, welche aus den Daten des linearen Kurvenanteils der jeweiligen Tibiae berechnet wurde. Als Streckgrenze definiert ist jener Punkt, an welchem es zu einem Steigungsabfall der Kurve, also einer Abnahme der Elastizität um mehr als zwei Standardabweichungen kam (Stürmer et al. 2006). Die Streckgrenze wird in Nangegeben. (Stürmer et al. 2006; Brandsch 2012; Trautmann 2014)

#### 2.2.9.3 Maximalkraft (F<sub>max</sub>)

Unter Maximalkraft ( $F_{max}$ ) versteht man die Kraft, welche die Tibia gerade noch tragen kann, ohne zu brechen. Sie stellt den höchsten Punkt der Kurve dar und wird in N angegeben. (Stürmer et al. 2006; Weidemann 2014)

#### 2.2.10 Mikro-Computertomographie

## 2.2.10.1 Scan der Tibiae

Die Tibiae wurden in einem Kleintier-Micro-CT (QuantumFX µicroCT, CaliperLifeScience, Hopkinton, Massachusetts, USA) gescannt. Um ein Verrutschen während des Scans zu vermeiden wurden die Tibiae einzeln auf einem mit Schaumstoff ausgekleideten Probenhalter platziert. Jeder Aufnahme wurde ein Dichtephantom beigefügt, welches für die spätere Kalibrierung und Auswertung der Scans essentiell war. Nachdem das Gerät aufgewärmt war, wurden die im Scan-Protokoll festgelegten Scan-Parameter (Tab. 8) eingestellt und waren somit für jede Aufnahme identisch. Anschließend wurde der Probenhalter samt Tibia und Phantom auf einem Probentisch gesetzt und in den Röntgenzylinder geschoben. Mittels Live-Scan konnte man die Position der Tibia auf dem Bildschirm des Gerätes kontrollieren und gegebenenfalls korrigieren. War die Position korrekt, wurde der Scan gestartet und die automatisch entstandenen 3D-Rekonstruktionen der gescannten Tibia in der vorher angelegten Datenbank unter der jeweiligen Versuchstiernummer gespeichert (Weber 2019).

Scan-Parameter	Verwendeter Wert & Einheit
Röhrenspannung	70 kV
Röhrenstromstärke	200 µA
Scan-Zeit	2 Minuten
Rotation	360 °
Projektionen	3600
Field of views (FOV)	$20 \ge 20 \text{ mm}^2$
Pixel Matrix	512
Effektive Voxelgröße	$40 \ge 40 \ge 40 \ge 40 \ \mu m^3$

Tabelle 8: Parameter des Scan-Protokolls für die Anfertigung von 3D-CT-Scansmit QuantumFX µicroCT

#### 2.2.10.2 Auswertung der Mikro-CT-Scans

Zur Auswertung der 3D-Scans bediente man sich des eigens hierfür entwickelten Programmes 3DOsteoAnalyzer. Das Programm ermöglicht es, die importierten Scans sowohl in 2D als auch in 3D darzustellen und sie hinsichtlich ihrer Knochendichte zu analysieren und die Knochenvolumina zu messen (Komrakova et al. 2015; Komrakova et al. 2018) Nach dem Import des jeweiligen Scans in die Software wurde zunächst das Kalibrierungsphantom von dem eigentlichen Scan der Tibia isoliert.

Da die Röntgenabschwächung ein Maß für die Elektronendichte des Materials ist, jedoch nicht für die Massendichte, war der Einsatz dieses Phantoms für die Dichteberechnung der Knochen unabdingbar (Valencia et al. 2006). Die 5 Kammern des Phantoms beinhalteten Materialien, deren Dichte bekannt war und jeweils ein Äquivalent, bspw. zu Knochen darstellte. Durch das von dem Phantom erstellte Grauwert-Histogramm (Abb. 10) konnte man nun den bekannten Dichten der Materialien (0,2 g/cm<sup>3</sup>, 0,4 g/cm<sup>3</sup>, 0,6g/cm<sup>3</sup>, 0,8 g/cm<sup>3</sup>, 1 g/cm<sup>3</sup>) manuell die jeweiligen Grauwerte der einzelnen Peaks des Grauwerthistogramms zuordnen. Sie wurden in eine Tabelle eingetragen und daraus eine Ausgleichsgerade bestimmt. Lief diese gegen 1, konnte man die eingetragenen Daten zur weiteren Analyse verwenden. So war es möglich in der späteren Analyse durch die Grauwerte auf die jeweilige Dichte des untersuchten Gewebes zu schließen. Dieser Schritt wurde vor jeder Scanauswertung wiederholt.

Nachdem also die jeweiligen Grauwerte für die bestimmten Dichten festgelegt waren, wurde die Analyse des eigentlichen Scans fortgesetzt. Da nicht der gesamte Knochen analysiert werden sollte, sondern nur der für die Fragestellung relevante Teil direkt um den Osteotomiespalt, wurde ein Messrahmen über eben diesen Bereich gelegt (Abb. 11). Dieser maß in Breite und Tiefe jeweils 9 mm, in der Höhe 3 mm, also vom Osteotomiespalt jeweils 1,5 mm nach proximal und distal gehend. Alle außerhalb des Messrahmens liegenden Tibiaanteile wurden entfernt (Abb. 12) (Komrakova et al. 2018).



# Abbildung 10: Grauwerthistogramm des Kalibrierungsphantoms



Abbildung 12: Position des Meßrahmens; Gruppe OS 0,04



Abbildung 11: Meßrahmen nach Entfernen der restlichen Tibiaanteile; Gruppe OS 0,04

Von dem übriggebliebenen Messbereich wurde nun wiederrum ein Grauwert-Histogramm erstellt. In diesem stellten sich auf der x-Achse die zunehmende Röntgenabschwächung und auf der y-Achse die Anzahl der sich dort befindenden Bildpunkte dar. Das bedeutete, dass von links nach rechts die Röntgenabschwächung und somit auch die Mineralisierung des Knochens, zunahm. Es ergab sich ein typisches viergipfliges Histogramm. Der erste Gipfel entsprach der Röntgenabschwächung durch die Luft, weswegen er ausgeblendet wurde. In dem zur weiteren Auswertung verbliebenen Histogramm waren nun drei Peaks zu sehen (Abb. 13). Diese entsprachen von links nach rechts (also mit zunehmender Mineralisierung) dem Weichteilgewebe, dem Kallus und der Kortikalis. Um nun Knochendichte und Knochenvolumina messen zu können, wurden zunächst drei Tibiae aus der Gruppe NON-OVX und drei Tibiae aus der Gruppe OVX mit jeweils gut abzugrenzenden Peaks untersucht. Hier wurden zunächst den jeweiligen Peaks manuell ein oberer und ein unterer Schwellenwert zugeordnet und notiert. In der 2D- Darstellung der CT-Aufnahmen färbte sich der im Grauwert-Histogramm eingegrenzte Bereich grün, womit sich auch eine visuelle Kontrolle ergab (Abb 14). Aus den so ermittelten Grenzwerten wurde ein Mittelwert errechnet, welcher dann als definierter unterer Schwellenwert für die jeweiligen Grauwertbereiche Weichteil (Abb. 13, a), Kallus (Abb. 13, b) und Kortikalis (Abb. 13, c) eingesetzt und in der durchgeführten Untersuchung für alle Tibiae angewandt wurde. Die Software errechnete für jeden, mit den definierten unteren

Schwellenwerten eingestellten Bereich, mittlere Dichte und Volumina, welche in eine Excel-Tabelle übertragen und gespeichert wurden. (Weidemann 2014; Weber 2019)



Abbildung 13: Grauwerthistogramm nach Ausblenden der Luft; a = Weichteile; b = Kallus; c = Kortikalis; Gruppe NON-OVX



Abbildung 14: 2D-Betrachtung des im Grauwerthistogramm grün eingefärbten, eingegrenzten Bereich der Kortikalis; Gruppe NON-OVX

## 2.2.10.3 Messparameter der Micro-CT-Untersuchung

Die in der Micro-CT-Untersuchung erhobenen Daten betrafen zum einen die in g/cm<sup>3</sup> angegebene Knochendichte, also die Dichte von Weichteil, ossärem Kallus und Kortikalis, sowie die Gesamtdichte und zum anderen die in mm<sup>3</sup> angegebenen Knochenvolumina von Weichteil, ossärem Kallus und Kortikalis, sowie auch hier das Gesamtvolumen. Schlussendlich wurde auch die bone volume fraction (BV/TV) bestimmt und in Prozent angegeben. Die BV/TV berechnet sich mittels nachfolgender Formel:

$$BV/TV (\%) = \frac{Knochenvolumen}{Gesamtvolumen} * 100$$

Wobei sich hier das Knochenvolumen als Summe aus Kortikalis- und ossärem Kallusvolumen ergab. Die Berechnungsgrundlage der übrigen bereits genannten Parameter ist der folgenden Tabelle (Tab. 9) zu entnehmen.

Tabelle 9: Messparameter	und deren B	erechnungsgrund	dlage in der	Micro-CT
Untersuchung (	Trautmann 2	2014)		

Messparameter & Einheit	Berechnungsgrundlage			
Kallusdichte in g/cm <sup>3</sup>	Dichte des ossären Kallusanteils am Knochen			
Kortikalisdichte in g/cm <sup>3</sup>	Dichte des Kortikalen Anteils am Knochen			
Weichteildichte in g/cm <sup>3</sup>	Dichte des Weichgewebeanteils am Knochen			
Gesamtvolumen in mm <sup>3</sup>	Summe aus Kallus-, Kortikalis und Weichteilvolumen			
Kallusvolumen in mm <sup>3</sup>	Volumen des ossären Kallusanteils am Knochen			
Kortikalisvolumen in mm <sup>3</sup>	Volumen des Kortikalisanteils am Knochen			

Weichteilvolumen in mm <sup>3</sup>	Volumen des Weichteilanteils am Knochen
BV/TV gesamt in %	Anteil des Knochenvolumens am Totalvolumen
ossärer Kallusanteil am Gesamtkallus in %	Anteil des ossären Kallus am Kallusvolumen

### 2.2.11 Histologische Untersuchung

## 2.2.11.1 Mikroradiographie

#### 2.2.11.1.1 Fertigung der histologischen Schnitte und der Mikroradiographien

Für die histologischen Untersuchungen wurden die Tibiae zunächst entwässert und entfettet. Um dies zu erreichen, legte man die Knochen für eine bestimmte Zeit in einer an Stärke zunehmenden Alkoholreihe ein um sie dann in einem Alkohol-Methylmethacrylsäuregemisch und schließlich nur noch in Methylmethacrylsäure (MMA) einzulegen. Dies geschah in folgender Reihenfolge: vier Tage in 70% igem Ethanol, 3 Tage in 80% igen Ethanol, 8 Tage in 96% igem Ethanol, drei Tage in einem 96% igem Ethanol-MMA-Gemisch in einer 1:1 Konzentration und abschließend drei Tage in reinem MMA. Danach wurden die einzelnen Tibiae zur endgültigen Aushärtung für drei Wochen in 40 ml-Rollrandflaschen gegeben, welche mit einem Gemisch aus 1000 ml MMA, 200 ml Dibutylphtalat und 29 g Benzylperoxid aufgefüllt wurden. Die nach ca. drei Wochen in den MMA-Blöcken ausgehärteten Tibiae wurden aus den Rollrandflaschen gelöst und mit Hilfe einer Innenlochsäge (Leica SP 1600 Sägemikroton, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) wurden 150 µm dicke Schnitte angefertigt. Dabei verlief die Schnittrichtung sagittal durch die Tibiae. Zur späteren Auswertung wurden drei aufeinanderfolgende Schnitte aus der Tibiamitte gewählt. Zur Fertigung der Mikroradiographien galt es die Schnitte mit einem Faxitron-Röntgengerät (Modell-Nr. 43855A, Faxitron X-Ray system, Hewlett-Packard, San Diego, USA) auf Kodak Professional Film (KODAK INDUSTREX SR45 Film ISO 9002, Rochester, USA) zu bringen. Der Röntgenvorgang wurde mit einer Röhrenspannung von 10 kV, einer Stromstärke von 0,3 mA und einer Belichtungszeit von drei Minuten durchgeführt. Alle Aufnahmen wurden beschriftet und aufbewahrt. (Trautmann 2014; Weidemann 2014; Weber 2019)

## 2.2.11.1.2 Digitalisierung der Mikroradiographien

Um die Auswertung zu ermöglichen, mussten die Mikroradiographien zunächst digitalisiert werden. Die Bilder wurden durch das Leica Stereomakroskop (Leica MZ 7-5, Bensheim, Deutschland) betrachtet und mittels einer an diesem angebrachten Kamera (Leica DC 300F, Bensheim, Deutschland) auf den Computer (IntelPentium 4, 2.6 GHz) übertragen. Als Lichtquelle für das Makroskop diente eine Kaltlichtlampe (Leica KL 1500 LCD, Bensheim, Deutschland). Die technischen Einstellungen für Makroskop, Kamera und Software, die sich in diversen Vorversuchen als ideal zeigten, wurden einheitlich gehalten.

So wurde am Makroskop ein 1,0er Objektiv verwendet und der Schalter für die Blendenöffnung auf die Position B gesetzt. Dabei ist Position A die kleinste und Position E die größtmögliche Blendenöffnung. Somit wurde eine mäßige Helligkeit der Bilder bei einer 10-fachen Vergrößerung erreicht. Die Betriebstemperatur lag konstant bei 3000 K. Die Auswertung wurde stets in einem abgedunkelten Raum durchgeführt, um etwaige Verfälschungen durch zusätzliches artifizielles Licht zu vermeiden. Einer Verfälschung durch den Untersucher wurde vorgebeugt, indem die Reihenfolge, in welcher die Schnitte digitalisiert und ausgewertet wurden, willkürlich stattfand.

Alle Mikroradiographien wurden auf gleiche Weise unter dem Makroskop positioniert, und zwar so, dass der proximale Tibiaanteil oben, der distale unten sowie der ventrale (plattennahe) Anteil links und der dorsale (plattenferne) rechts zu finden war. Die Aufnahmen wurden zunächst als Live-Bild in der Software MetaMorph<sup>®</sup> (MetaMorph<sup>®</sup> Microscopy Automation & Image Analysis Software, Molecular Devices LLC, Sunnyvale, Kalifornien, USA) angezeigt. Nun konnte gegebenenfalls noch hinsichtlich Schärfe, Kontrast oder Position nachjustiert und der Schnitt auf Auswertbarkeit überprüft werden. Das bedeutete die Tibia bezüglich des Vorhandenseins einer Kortikalis zu überprüfen. Schnitten, die gar keine oder gar zu große Kortikalisflächen aufwiesen, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Somit konnte es nicht zu einer Verfälschung der Werte kommen. Wenn eine gute Einstellung gefunden war und nichts gegen die Verwendung des Schnittes sprach, wurde die Aufnahme importiert und stand somit zur Auswertung bereit (Trautmann 2014; Weidemann 2014).

## 2.2.11.1.3 Auswertung der Mikroradiographien

#### Arbeitsschritt 1: Graudetektion

Nach Import des Bildes wurde zunächst eine Ziellinie über dem Osteotomiespalt justiert und ebenfalls ein genormter Messrahmen, der 1,5 mm in jede Richtung maß, auf die Tibia gelegt. Dann wurde eine Graudetektion am Knochen durchgeführt. Alle von der Software als Knochen erkannten Strukturen wurden automatisch grün eingefärbt. Eine Nachdetektion durch den Untersucher stellte sicher, dass alle Knochenstrukturen erfasst wurden, wobei hier darauf hinzuweisen bleibt, dass eine leichte Überdetektion erlaubt war (Trautmann 2014; Weidemann 2014).

Arbeitsschritt 2: Flächendefinition

Im nächsten Arbeitsschritt wurden die einzelnen Knochenanteile definiert. Man umrandete zunächst den gesamten Knochen manuell auch über den definierten Messrahmen hinaus, wobei abgesprengte Knochenanteile außenvorgelassen wurden. Anschließend wurden jeweils getrennt voneinander folgende Tibiaanteile konturiert und damit definiert: die Kortikalisfläche ventral (plattennah) proximal und distal, Kortikalisfläche (plattenfern) proximal und distal. Es wurde fortgefahren mit der Kallusfläche. Diese wurde ventral, endostal und dorsal umrandet (Abb. 15). Die Software gab jeden einzelnen Arbeitsschritt vor und verhinderte auch eine versehentliche doppelte Auswahl eines Bereiches. Korrekturen konnten stets bei noch nicht geschlossener Umrandung vorgenommen werden.



Abbildung 15: Flächendetektion einer Mikroradiographie; Kortikalisfläche: a = ventral,proximal; b = ventral,distal; c = dorsal,proximal; d = dorsal,distal; Kallusfläche: e = ventral; f = endostal, g = distal; Gruppe OVX

Arbeitsschritt 3: Dickenbestimmung der Knochenstrukturen

Nachdem die Flächen festgelegt waren, konnte man mit der Bestimmung der Knochendicken fortfahren. Die Knochendickenbestimmung wurde mittels Vektoren, welche über den zu bestimmenden Bereich gelegt wurden, durchgeführt. Auch hier gab die Software jeden Arbeitsschritt vor. Als erstes wurde die Kortikalisdicke bestimmt. Es wurden 5 Vektoren senkrecht zur Längsachse der Tibia über die osteotomienahe Kortikalis gelegt, und zwar jeweils über die distale Kortikalis der ventralen wie auch der dorsalen Tibia (Abb. 16). Die Vektoren durften die eigentliche Kortikalis durchaus überragen, da



Abbildung 16: Beispielhafte Darstellung der Vektorenmarkierung der dorso-distalen Kortikalis einer Mikroradiographie; Gruppe OVX



durch die vorangegangene Flächendetektion der Kortikalis der Messbereich klar definiert war und die Software nur die Länge der Vektoren in die Berechnung mit einfließen ließ, die

auch tatsächlich über der Kortikalis lagen. Um die Kallusdicke zu bestimmen wurden, ähnlich wie bei der Kortikalisdickenbestimmung, mehrere Vektoren senkrecht zur Längsachse der Tibia über den ventralen und anschließend über den dorsalen Kallusanteil der Tibia gelegt (Abb. 17). Auch hier wurde von der Software nur die Vektorenlänge zur



er dem im Vorfeld definierten Bereich rchmesser bestimmt, indem abermals ite Breite der Tibia gelegt wurden. Die otomiespaltes und dann distal des in der Berechnung nur die als Alle Ergebnisse wurden gespeichert 014; Weidemann 2014)

### 2.2.11.1.4 Messparameter der Mikroradiographie

Kortikalis- und Kallusdicke der ventralen und dorsalen Tibia, sowie der Knochendurchmesser proximal und distal des Frakturspaltes, alle werden in mm angegeben, wurden als arithmetisches Mittel aus den fünf über die jeweiligen Bereiche gelegten Vektoren berechnet, aus welchem sich die jeweilige durchschnittliche Dicke bzw. der durchschnittliche Durchmesser ergab.

Die Kortikalis- und Kallusdichte wird in % angegeben und zeigt den jeweiligen prozentualen Anteil des Knochens an den definierten Flächen. Es wurden folgende Flächen definiert: Kortikalisdichte ventral und dorsal, Kallusdichte ventral, endostal und dorsal.

Abbildung 17: Beispielhafte Darstellung der Vektorenmarkierung zur Berechnung der Kallusdicke; orange = ventraler Kallusanteil; hellblau = dorsaler Kallusanteil; Gruppe OVX

#### 2.2.11.1.5 Validierung

Die Vielzahl der manuell durchzuführenden Arbeitsschritte und auch die visuelle Überprüfung machen diese Datenerhebung stark Untersucherabhängig. Daher wurden die morphometrischen Untersuchungen alle von einem einzigen Untersucher durchgeführt, um etwaige untersucherabhängige Messschwankungen zu vermeiden. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde durch im Vorfeld wiederholte Auswertung von drei willkürlich ausgewählten Schnitten gewährleistet. Diese durften in ihren Ergebnissen nicht mehr als  $\pm 10\%$  von den jeweiligen Mittelwerten abweichen. Erst wenn dies erreicht war, wurde mit der eigentlichen Untersuchung fortgefahren.

#### 2.2.11.2 Polychrome Sequenzmarkierung

#### 2.2.11.2.1 Prinzip und Zielsetzung der polychromen Sequenzmarkierung

Um die Kinetik der Frakturheilung besser betrachten und analysieren zu können bedient man sich der polychromen Sequenzmarkierung. Diese erlaubte es, durch Applikation von Fluorochromen zu verschiedenen Zeitpunkten, den dynamischen Prozess der Frakturheilung analog festzuhalten und messbar zu machen. So wurden den lebenden Ratten zu verschiedenen festgelegten Zeitpunkten vier verschiedene Fluorochrome subkutan injiziert (gemäß Rahn 1976) (Abb. 18; Tab 10). Folgende Fluorochrome, oder auch Fluoreszenzfarbstoffe, wurden verwendet: Xylenol-Orange Tetranatriumsalz (XO), Calcein-Grün (CG), Alizarinkomplexon (AK) und Tetracyclinhydrochlorid (TC) (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Farbstoffe wurden vor Applikation in einer der Tabelle 4 zu entnehmenden Konzentration in isotoner Kochsalzlösung (TC) oder aber in destilliertem Wasser (XO, CG, AK) gelöst. Die applizierten Fluoreszenzfarbstoffe bildeten mit Kalzium Chelatkomplexe, welche im Zuge der Mineralisierung des neugebildeten Knochens in diesen eingebaut wurden und fluoreszierende Banden bildeten. Auf Grund der festgelegten Applikationszeitpunkte konnte man jeder Bande sowohl einen Zeitpunkt in der Frakturheilung zuordnen als auch auf Lokalisation und Konzentration des neugebildeten Knochens schließen. (Trautmann 2014; Weidemann 2014)

Fluorochrom	Zeitpunkt der Applikation /	Dosierung in mg/kg	Dosierung
	Färbungszeitraum seit Osteotomie	Körpergewicht	in ml
	(in Tagen)		
XO	13. Tag / 1 13.	90	0,5
CG	20. Tag/ 1420.	10	0,3
АК	28. Tag/ 2128.	30	0,5
ТС	36. Tag / 2936. (Obduktion)	25	0,5

Tabelle 10: Zeitpunkte der Applikation und Dosierung der Fluochrome



Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf der Frakturheilung und Applikationszeitpunkte der Fluorochrome zur polychromen Sequenzmarkierung

### 2.2.11.2.2 Digitalisierung der polychromen Sequenzmarkierung

Die wie in 2.9.1.1 beschrieben hergestellten histologischen Schnitte wurden mit Eukitt® (Fa. Kilder, Freiburg, Deutschland) auf Objektträgern fixiert. Die so aufbereiteten Schnitte wurden dann nacheinander mit Hilfe des Leica Auflicht-Fluoreszenz-Stereomakroskops (Leica MZ 7-5; mit FluoCombi III, Bensheim, Deutschland) unter Verwendung von Blaulicht untersucht. Als zusätzliche Lichtquelle des Makroskops diente noch eine Quecksilberhöchstdruck-Lampe, welche eine Leistung von 100 Watt hatte. Die Bilder wurden, nach adäquater Positionierung und Beurteilung hinsichtlich ihrer Auswertbarkeit, mit Hilfe der am Makroskop angebrachten Kamera (Leica DC 490F, Bensheim, Deutschland) auf den Computer (IntelPentium 4, 2,6 GHz) übertragen. Auch bei diesem Vorgehen wurden standardisierte Einstellungen gewählt. So wurden die Schnitte mit einem 1,6er-Objektiv 16fach vergrößert. Durch einen Anregungsfilter im Wellenlängenbereich von 450 - 490 nm konnte die beabsichtigte Fluorochromanregung durch das eingesetzte Blaulicht erreicht werden. So fluoreszierten die eingesetzten Fluorochrome wie folgt: XO orange, CG grün, AK rot und TC gelb. Die Belichtungszeit wurde individuell je nach Schnittdicke, welche aus technischen Gründen minimal variieren konnten, eingestellt und lag zwischen 9-12 s. Die entstandenen Bilder wurden auf dem Computer übertragen, benannt und gespeichert. Anschließend konnte man die gespeicherten Bilder in die Software MetaMorph<sup>®</sup> (MetaMorph<sup>®</sup> Microscopy Automation & Image Analysis Software, Molecular Devices LLC, Sunnyvale, Kalifornien, USA) importieren und analysieren. (Trautmann 2014; Weidemann 2014)

#### 2.2.11.2.3 Auswertung der polychromen Sequenzmarkierung

#### Arbeitsschritt 1: Flächendefinition

Die initialen Arbeitsschnitte verhalten sich bei der Flächendefinition analog zu der Mikroradiograhie. Nach Umrandung des ganzen Knochens wurden die folgenden Kortikalisflächen nacheinander definiert: Kortikalisfläche ventral proximal und distal, sowie die Kortikalisflächen dorsal proximal und distal. Zur Identifizierung der Kortikalis machte man sich den Umstand zu Nutze, dass in der Kortikalis weniger Umbauprozesse stattgefunden hatten als im osteotomienahen Kallus. Daher stellte sich die Kortikalis im Gegensatz zum Kallus weniger bis nicht fluoreszierend dar (Abb. 19-21). Waren die Kortikalisflächen determiniert, fuhr man fort die einzelnen Kallusflächen festzulegen. Es wurde nacheinander der ventrale, der dorsale und der endostale Kallus umfahren und somit definiert. Auch hier wurde durch Software eine versehentliche Doppelauswahl eines Bereiches vermieden. (Trautmann 2014; Weidemann 2014; Weber 2019)

Arbeitsschritt 2: Definition der Fluorochrom-markierten Flächen

verschieden fluoreszierenden Areale Hier galt es nun die den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffen zuzuordnen. Unter der Blaulichtfluoreszenz stellten sich die Fluorochrom-markierten Kallusflächen wie folgt dar: XO zeigte sich orange, CG grün, AK rot und TC fluoreszierte gelb. Auch zu erwähnen ist, dass die Areale, welche durch XO angefärbt wurden, meist nur sehr klein und die von CG-markierten Arealen umschlossen waren. Daher wurden die XO-markierten Bereiche zu den CG-markierten Arealen gerechnet. Also fand schlussendlich eine quantitative Analyse der CG- (Abb. 19), AK-(Abb. 20) und TC- markierten Areale (Abb. 21) statt. Durch die in Arbeitsschritt 1 beschriebene Flächendefinition, konnte die Software die verschiedenen umkreisten Fluoreszenzareale den jeweiligen Kallusflächen zuordnen und somit deren Anteil an der Kallusfläche, sei es ventral, endostal, dorsal oder die Gesamtkallusfläche, berechnen. Alle Ergebnisse wurden gespeichert und in eine Excel-Tabelle übertragen. (Trautmann 2014; Weidemann 2014)







Abbildung 19: Beispielhafte CG-Markierung; Gruppe OS 0,04

Abbildung 20: Beispielhafte AK-Markierung; Gruppe OS 0,04

Abbildung 21: Beispielhafte TC-Markierung; Gruppe OS 0,04

## 2.2.11.2.4 Messparameter der polychromen Sequenzmarkierung

Die durch die polychrome Sequenzmarkierung erhobenen Daten werden in Tab. 11 dargestellt. Es wurde der Gesamtkallus jeweils ventral, endostal und dorsal gemessen, sowie die Fluorochrom-markierten Flächen in den jeweiligen Kallusflächen.

Messparameter & Einheit	Berechnungsgrundlage
Kallus ventral	
Gesamtkallusfläche in mm <sup>2</sup>	Absolutfläche des ventralen Kallus
CG – Fläche in mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche der CG-markierten Areale im ventralen Kallus
AK – Fläche in mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche der AK-markierten Areale im ventralen Kallus
TC-Fläche in mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche der TC-markierten Areale
	im ventralen Kallus
Messparameter & Einheit	Berechnungsgrundlage
Kallus endostal	
Gesamtkallusfläche in mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche des endostalen Kallus
CG- Fläche in mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche der CG-markierten Areale im endostalen Kallus
Messparametere & Einheit	Berechnungsgrundlage
AK- Fläche in mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche der AK-markierten Areale im endostalen Kallus
TC- Fläche in mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche der TC-markierten Areale im endostalen Kallus
Kallus dorsal	
Gesamtkallusfläche in mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche des dorsalen Kallus
CG-Fläche in mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche der CG-markierten Areale im dorsalen Kallus
AK- Fläche in mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche der AK-markierten Areale im dorsalen Kallus

Tabelle 11: Messparameter der polychromen Sequenzmarkierung

TC- Fläche in mm <sup>2</sup>	Absolute Fläche der TC-markierten Areale im dorsalen Kallus
Gesamtkallusfläche total in mm <sup>2</sup>	Absolute Kallusfläche (ventral, endostal und dorsal) in mm <sup>2</sup>

## 2.2.11.2.5 Validierung

Alle Auswertungen wurden von einem Untersucher durchgeführt. Vor der eigentlichen Auswertung der Tibiae wurden an drei randomisiert ausgewählten Schnitten zunächst mehrfach eine Auswertung vollzogen und anschließend die Ergebnisse verglichen. Wichen diese weniger als  $\pm$  10% von den jeweiligen Mittelwerten ab, konnte mit dem eigentlichen Versuch begonnen werden.

## 2.2.12 Statistik

Die Ergebnisse aller Untersuchungen wurden statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt. Hierfür wurde die Software *GraphPad Prism* (Version 5.0a, GraphPad Software, Inc., Januar 2008, La Jolla, CA, USA) benutzt. Es wurde ein Vergleich des Mittelwertes  $\pm$  der Standardabweichung zwischen den einzelnen Gruppen für jeden einzelnen Messparameter angefertigt. Um eine Signifikanz der erhobenen Daten zwischen den Gruppen festzustellen wurde zunächst eine Varianzanalyse (one-way ANOVA) und anschließend eine post-hoc-Analyse mit dem Tukey-Kramer-Test durchgeführt. Für alle Ergebnisse galt dabei als Signifikanzniveau p < 0,05. (Trautmann 2014; Weidemann 2014)

### 3 Ergebnisse

Im Folgenden werden alle Ergebnisse in Tabellen oder Abbildungen zusammengefasst. Die signifikanten Unterschiede wurden wie folgt gekennzeichnet:

Tabelle 12: Kennzeichnung der signifikanten Unterschiede

Kennzeichnung	Bedeutung			
a	signifikant zu NON-OVX			
b	signifikant zu OVX			
с	signifikant zu OS 0,04			
d	signifikant zu OS 0,4			
e	signifikant zu allen ovarektomierten Gruppen			
*	p< 0,05 (signifikant)			
**	p< 0,01 (hoch signifikant)			
***	p< 0,001 (höchst signifikant)			

## 3.1 Körpergewicht

Vor der Ovarektomie (OVX), also zu Beginn des Versuches, war kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen festzustellen. Das durchschnittliche Gewicht der Versuchstiere lag bei 248,74 g. An dem direkt vor der Durchführung der Osteotomie gemessenen Gewicht der Tiere ließ sich eine deutliche Gewichtszunahme in allen Gruppen erkennen (Tab. 13). Vor allem aber in den Gruppen der ovarektomierten Tiere, OVX, OS 0,04, OS 0,4 und OS 4, konnte eine höchst signifikante Gewichtszunahme im Vergleich zu NON-OVX ermittelt werden (Tab. 13). Im weiteren Verlauf bis zur Tötung kam es zu einer weiteren Zunahme des Gewichtes in allen Gruppen, wobei die höchst signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Gewichtes zwischen den ovarektomierten (OVX, OS 0,04, OS 0,4, OS 4) und nicht ovarektomierten (NON-OVX)

Tieren weiterhin bestanden. OS-Behandlungen haben keinen Effekt auf das Körpergewicht gezeigt (Hoffmann et al. 2019)

Parameter	NON-OVX	OVX	OS 0,04	OS 0,4	OS 4
Gewicht vor	247,7±	253,3±	245,2±	248,6±	248,9±
OVX (g)	4,24	9,18	8,65	9,40	7,03
Gewicht vor	301,5±	372,1±	360,3±	358,6±	351,0±
Osteotomie (g)	23,78	15,95 (a***)	21,81(a***)	24,41(a***)	25,28(a***)
Gewicht vor	307,2±	376,6±	368,9±	389,7±	385,3±
Tötung (g)	29,12	19,18 (a***)	23,91(a***)	32,43(a***)	25,14(a***)

Tabelle 13: Körpergewichte der Versuchstiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Versuchs (Mittelwerte ± Standardabweichungen)

a = signifikant zu NON-OVX; \*\*\* = p< 0,001

## 3.2 Futter- und Wirkstoffaufnahme

Die Futteraufnahme zeigte sich in der Gruppe NON-OVX im Vergleich zu den ovarektomierten Gruppen in den Wochen 2 bis einschließlich Woche 5 signifikant erniedrigt (Abb. 22). Des Weiteren fällt auf, dass nach Woche 8, also nach der Osteotomie, ein Einbruch der Futteraufnahme in allen Gruppen zu verzeichnen war. Im weiteren Verlauf kam es zu keinen weiteren signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen. Hinsichtlich der täglichen Wirkstoffaufnahme der Tiere zeigt sich, dass die in diesem Versuch beabsichtigte Dosis in nahezu allen Gruppen nicht ganz erreicht wurde (s. Tab. 14 & Tab. 15). Ein signifikanter Unterschied der Dosisaufnahme während der Behandlungsdauer mit Ostarine zwischen den Ostarine-therapierten Gruppen zeigte sich nicht.



Abbildung 22: Futteraufnahme im zeitlichen Verlauf (Mittelwerte $\pm$  Standardabweichungen); e = signifikant zu allen ovarektomierten Gruppen; \* = p< 0,05

Tabelle 14: Tägliche Wirkstoffaufnahme in mg/kg KG in den Ostarine-behandelten Gruppen OS 0,04, OS 0,4 und OS 4 über den Behandlungszeitraum (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen in mg/kg KG) (Komrakova et al. 2019)

Tägliche	Woche 9	Woche 10	Woche 11	Woche 12	Woche 13	Mittelwert
Wirkstoffaufnahme						± SD
in mg/kg KG						
OS 0.04	0,01±	0,03±	0,03±	0,03±	0,03±	$0,03\pm 0,007$
030,04	0,004	0,001	0,001	0,002	0,002	
05.04	0,16±	0,28±	0,3±	0,34±	0,35±	$0,3\pm 0,07$
03 0,4	0,008	0,008	0,008	0,004	0,009	
05.4	1,56±	2,9±	3,1±	3,4±	3,8±	$3\pm 0,8$
034	0,22	0,07	0,1	0,1	0,3	
		1		1	1	

	8 8	, ,				
Wirkstoffaufnahme in mg/Tag/Ratte	Woche 9	Woche 10	Woche 11	Woche 12	Woche 13	Mittelwert ± SD
OS 0,04	0,006±	0,01±	0,011±	0,012±	0,012±	0,01±
	0,0012	0,0005	0,0005	0,0007	0,0006	0,002
OS 0,4	0,054±	0,099±	0,11±	0,13±	0,14±	0,11±
	0,002	0,002	0,003	0,001	0,003	0,03
OS 4	0,51±	1±	1,12±	1,26±	1,4±	1,07±
	0,06	0,02	0,1	0,03	0,14	0,31

Tabelle 15: Tägliche Wirkstoffaufnahme in mg/Tag/Ratte in den Ostarine-behandelten Gruppen OS 0,04, OS 0,4 und OS 4 über den Behandlungszeitraum (Mittelwerte ± Standardabweichung in mg/Tag/Ratte) (Henkies 2020)

## 3.3 Uterusgewicht

Das Gewicht der am Versuchsende entnommenen Uteri war in allen ovarektomierten Tieren im Vergleich zu den Tieren der Gruppe NON-OVX signifikant niedriger (Abb. 23; Tab. 16, Hoffmann et al. 2019). Das Uterusgewicht in den Gruppen OS 0,4 und OS 4 war allerdings, im Vergleich zu den Gruppen OVX und OS 0,04, signifikant höher (Abb. 23; Tab. 16)



Abbildung 23: Das Uterusgewicht am Versuchsende

(Mittelwerte ± Standardabweichungen); a= signifikant zu NON-OVX; b=signifikant zu OVX; c= signifikant zu OS 0,04; \*\*\*=p<0,001

Tabelle 16: Uterusgewicht am Versuchsende

Parameter	NON-OVX	OVX	OS 0,04	OS 0,4	OS 4
Uterusgewicht	0,52±0,10	0,10±0,03	0,11±0,03	0,33±0,06	0,39±0,06
(g)		(a***)	(a***)	(a***)	(a***)
				(b***)	(b***)
				(c***)	(c***)

(Mittelwerte ± Standardabweichungen)

a= signifikant zu NON-OVX; b= signifikant zu OVX; c= signifikant zu OS 0,04 \*\*\* = p< 0,001

## 3.4 Alkalische Phosphatase im Serum

Hinsichtlich der Blutuntersuchung zeigt sich in der Gruppe OS 4 ein erhöhter AP-Serumspiegel gegenüber den Gruppen NON-OVX und OS 0,04 (Abb. 24, Hoffmann et al. 2019). Eine Signifikanz lässt sich allerdings nur für Gruppe OS 4 zu den Gruppen NON-OVX und OS 0,04 feststellen (Tab. 17)



Abbildung 24: Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen); a= signifikant zu NON-OVX; c = signifikant zu OS 0,04; \*\*\* = p< 0,001; \*\* = p<0,01

Parameter	NON-OVX	OVX	OS 0,04	OS 0,4	OS 4
Alkalische	92,50	135,0	104,7	141,4	168,3
Phosphatase	± 22,04	± 38,42	± 25,92	± 54,92	± 49,37
(U/l)					(a***)
					(c**)

Tabelle 17: AP-Spiegel im Serum (Mittelwerte ± Standardabweichungen)

a = signifikant zu NON-OVX; c = signifikant zu OS 0,04; \*\*\* = p< 0,001; \*\* = p<0,01

## 3.5 Biomechanische Untersuchung

In der biomechanischen Testung konnte festgestellt werden, dass sich weder in der Elastizität noch in der Streckgrenze oder in der Maximalkraft signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ergaben (Tab. 18). Hierbei ist allerdings die geringe Anzahl der Tibiae zu beachten, welche sich in der Gruppe OVX (n=3) überhaupt zur biomechanischen Auswertung eigneten. So konnten in der Gruppe OVX nur 30 % der Tibiae zur Untersuchung benutzt werden, da nur hier harter Kallus gebildet wurde. In den Ostarine-therapierten Gruppen sowie in der Gruppe NON-OVX wurde hingegen bei 60 – 70 % eine Bildung von hartem Kallus beobachtet (siehe Tab. 19).

Parameter	NON-OVX	OVX	OS 0,04	OS 0,4	OS 4
Elastizität (N/mm)	38,82 + 19.48	25,59 + 6 37	31,46 + 17.83	20,25 + 6,512	31,05 + 11,23
Streckgrenze (N)	22,72	13,06	25,26	22,03	25,76
	± 7,82	± 0,16	± 12,66	± 8,75	± 14,16
Maximalkraft	23,31	14,25	29,17	26,53	28,95
(N)	± 7,56	± 1,13	± 20,54	± 17,67	± 20,40

Tabelle 18: Biomechanische Parameter (Mittelwerte ± Standardabweichungen)

Parameter	NON- OVX	OVX	OS 0,04	OS 0,4	OS 4
Anzahl der Ratten	10	9	11	10	11
Kein Kallus	3 (30 %)	2 (22,22%)	1 (9,1%)	1 (10%)	0
(n der Tibiae (%))					
Weicher Kallus	0	4 (44,44%)	3 (27,3%)	2 (20%)	3 (27,3%)
(n der Tibiae (%))					
Harter Kallus	7 (70%)	3 (33,33%)	7 (63,6%)	7 (70%)	8 (72,2%)
(n der Tibiae (%))					

Tabelle 19: Qualitative Analyse der Versuchstibiae vor der biomechanischen Testung

### 3.6 Mikro-CT

In der Mikro-CT-Untersuchung wurden verschiedene Knochenstrukturen der Tibiae betrachtet und näher untersucht. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 20 zusammengefasst. Der prozentuale Anteil des Knochenvolumens am Gesamtvolumen war in NON-OVX signifikant höher als in den übrigen Versuchsgruppen (Tab. 20). Auch der ossäre Anteil des Kallus am Gesamtkallus zeigte sich in der Gruppe NON-OVX signifikant höher als in den anderen Gruppen. Die Kallusdichte war in der Gruppe OVX signifikant niedriger als in der Gruppe NON-OVX. Währenddessen waren bezüglich der Kortikalisdichte keine signifikanten Unterschiede zu detektieren. Bei der Weichteildichte zeigte sich ein Unterschied von OS 4 zu OVX, da in ersterer eine relevant höhere Weichteildichte zu messen war (Tab. 20). Hinsichtlich des Volumens ließ sich nur bezüglich des Weichteilvolumens in der Gruppe OS 0,4 ein hoch signifikanter Unterschied zu der Gruppe NON-OVX feststellen (Tab. 20).

Parameter	NON-OVX	OVX	OS 0,04	OS 0,4	OS 4
Kallusdichte	0,69	0,60	0,62	0,62	0,64
(g/cm <sup>3</sup> )	± 0,05	$\pm$ 0,06 (a*)	$\pm 0,06$	$\pm 0,02$	$\pm$ 0,04
Kortikalisdichte	1,17	1,10	1,12	1,17	1,14
(g/cm <sup>3</sup> )	± 0,13	± 0,14	± 0,13	± 0,05	± 0,09
Weichteildichte	0,11	0,09	0,12	0,10	0,13
(g/cm <sup>3</sup> )	± 0,04	± 0,02	$\pm 0,02$	± 0,02	± 0,02 (b**)
Gesamtvolumen	120,8	122,8	118,1	161,0	121,2
(mm <sup>3</sup> )	± 21,47	± 18,36	± 30,80	± 46,33	± 35,89
Kallusvolumen	74,44	56,87	54,21	70,59	53,52
(mm <sup>3</sup> )	± 21,36	± 13,12	± 17,41	± 22,00	± 17,16
Kortikalisvolumen	17,47	13,70	19,80	17,09	22,58
(mm <sup>3</sup> )	± 2,5	± 7,72	± 8,27	± 7,97	± 13,85
Weichteilvolumen	28,60	48,96	44,10	58,69	45,68
(mm <sup>3</sup> )	± 5,14	± 12,60	± 15,18	± 15,53 (a**)	± 23,75
BV/TV gesamt	77,31	57,93	62,93	55,41	63,44
(%)	$\pm$ 8,56	$\pm$ 7,48 (a***)	$\pm$ 6,53 (a***)	$\pm$ 8,90 (a***)	±11,25 (a***)
Anteil des ossären	71,17	53,93	55,32	49,72	56,46
Kallus am Gesamtkallus (%)	± 8,25	$\pm$ 6,85(a***)	± 4,66 (a***)	$\pm$ 7,64(a***)	$\pm$ 9,93(a**)
Ocsantikands (70)					

Tabelle 20: MikroCT- Parameter (Mittelwerte ± Standardabweichungen)

a= signifikant zu NON-OVX; b= signifikant zu OVX; \*= p < 0.05; \*\*=p < 0.01; \*\*\*=p < 0.001

## 3.7 Mikroradiographie und polychrome Sequenzmarkierung

In der histologischen Betrachtung wurde das Augenmerk in der mikroradiographischen Untersuchung (Abb. 25B-29B) auf Kallus- und Kortikalisdicke und –dichte gelegt. Hier zeigte sich, dass ventral (also plattennah) die distale Kortikalisdicke in OS 4 signifikant größer war als in NON-OVX und OVX (Tab. 21). Auch in der Kallusdichte dorsal (plattenfern) konnte in OS 4 eine, im Vergleich zu OVX maßgeblich höhere Dichte festgestellt werden (Tab. 21). Bei der ventralen Kallusdichte zeigte sich allerdings in der Gruppe OS 0,4 ein signifikanter Unterschied zu NON-OVX. Die prozentuale Kallusdichte war in OS 0,4 geringer als in NON-OVX. Auch bei der endostalen Kallusdichte konnte in der Gruppe OS 4 ein signifikant höherer prozentualer Kallusanteil als in Gruppe OS 0,4 verzeichnet werden. In den übrigen Gruppen konnten hinsichtlich der restlichen Parameter keine relevanten Abweichungen ermittelt werden.

Durch die polychrome Sequenzmarkierung ließ sich eine signifikant größere CG-markierte Kallusfläche dorsal in Gruppe OS 4 im Vergleich zu OVX (Abb. 26A; Tab.22) nachweisen. Auch die Gesamtkallusfläche dorsal zeigte sich im Vergleich zu OVX und OS 0,04 signifikant erhöht. Die Gesamtkallusfläche der Gruppen OVX und OS 0,04 waren im Vergleich zu NON-OVX signifikant vermindert (Tab. 22). Die Gesamtkallusfläche ventral zeigte sich in Gruppe OS 0,4 (Abb. 28A, Tab. 21) im Vergleich zu NON-OVX (Abb. 25A, Tab. 22) signifikant verringert. Des Weiteren konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.





Abbildung 25: Repräsentative Bilder der Gruppe NON-OVX; A= polychrome Sequenzmarkierung; B= Mikroradiographie

B

B



Abbildung 26: Repräsentative Bilder Sequenzmarkierung; B= Mikroradiographie



der Gruppe OVX; A= polychrome





Abbildung 27: Repräsentative Bilder der Gruppe OS 0,04; A= polychrome Sequenzmarkierung; B = Mikroradiographie



Abbildung 28: Repräsentative Bilder der Gruppe OS 0,4; A= polychrome Sequenzmarkierung; B= Mikroradiographie

B



Abbildung 29: Repräsentative Bilder Sequenzmarkierung; B= Mikroradiographie



der Gruppe OS 4; A= polychrome

Parameter	NON- OVX	OVX	OS 0,04	OS 0,4	OS 4
Kortikalisdicke ventral (mm)	0,26 ± 0,13	0,23 ± 0,12	0,30 ± 0,10	0,30 ± 0,11	$0,36 \pm 0,12$ ( $a^*$ ) ( $b^{**}$ )
Kortikalisdicke dorsal (mm)	0,37	0,34	0,32	0,37	0,33
	± 0,15	± 0,07	± 0,08	± 0,11	± 0,11
Kortikalisdichte ventral (%)	98,62	96,19	92,19	96,40	96,83
	± 2,744	± 3,66	± 18,58	± 4,45	± 5,15
Kortikalisdichte dorsal (%)	98,93	97,48	97,09	97,54	96,35
	± 1,43	± 2,89	± 2,61	± 4,95	± 6,35
Kallusdicke ventral (mm)	0,28	0,26	0,22	0,19	0,23
	± 0,23	± 0,15	± 0,16	± 0,15	± 0,17
Kallusdicke dorsal (mm)	0,57	0,70	0,53	0,57	0,55
	± 0,31	± 0,26	± 0,27	± 0,33	± 0,43
Kallusdichte ventral (%)	70,93 ± 11,42	65,71 ± 18,25	63,45 ± 12,20	59,32 ± 17,62 (a*)	59,97 ± 14,40
Kallusdichte dorsal (%)	69,09 ± 17,39	57,94 ± 11,17	65,01 ± 11,64	67,61 ± 18,73	73,18 ± 13,72 (b **)
Kallusdichte endostal (%)	51,95 ± 16,48	45,75 ± 18,73	50,21 ± 17,96	45,38 ± 21,30	60,78 ± 17,47 (d*)
Knochendurchmesser proximal (mm)	3,97	4,43	4,21	4,47	4,05
	± 0,67	± 0,44	± 0,64	± 0,76	±0,90

Tabelle 21: Ergebnisse der Mikroradiographie (Mittelwerte ± Standardabweichungen)

a= signifikant zu NON-OVX; b= signifikant zu OVX; d=signifikant zu OS 0,4; \* = p< 0,05; \*\*= p< 0,01

Parameter	NON-OVX	OVX	OS 0,04	OS 0,4	OS 4
Kallus Ventral (mm²)	0,99	0,69	0,45	0,40	0,74
Gesamtkallusfläche	± 0,87	± 0,61	± 0,47	$\pm$ 0,53 (a*)	± 0,73
CG-Fläche	0,41	0,32	0,19	0,15	0,41
	± 0,64	± 0,30	± 0,21	$\pm 0,18$	$\pm 0,63$
AK-Fläche	0,27	0,18	0,11	0,13	0,11
	$\pm 0,26$	$\pm$ 0,28	$\pm 0,18$	$\pm$ 0,20	$\pm 0,13$
TC-Fläche	0,24	0,18	0,15	0,12	0,23
	$\pm$ 0,20	± 0,19	± 0,17	± 0,19	$\pm$ 0,15
Kallus endostal (mm²)	3,26	2,81	2,40	2,81	2,56
Gesamtkallusfläche	± 0,85	± 1,16	± 0,75	± 1,66	± 1,30
CG-Fläche	1,74	1,29	1,18	1,31	1,38
	$\pm 0,86$	± 1,00	± 0,60	$\pm 0,98$	$\pm 0,98$
AK-Fläche	0,87	0,91	0,69	0,92	0,57
	± 0,64	$\pm 0,43$	± 0,39	$\pm 0,59$	$\pm 0,52$
TC-Fläche	0,61	0,56	0,60	0,70	0,62
	$\pm 0,30$	± 0,30	± 0,30	± 0,33	± 0,44
Kallus dorsal (mm <sup>2</sup> )	1,95	1,39	1,44	2,01	2,49
Gesamtkallusfläche	± 1,09	$\pm$ 0,48	± 0,71	± 1,32	$\pm$ 1,62 (b*)(c*)
CG-Fläche	1,26	0,71	0,90	0,98	1,34
	$\pm 0,72$	± 0,44	± 0,58	$\pm 0,88$	± 0,82 (b*)
AK-Fläche	0,36	0,44	0,34	0,52	0,47
	± 0,29	± 0,26	± 0,28	$\pm 0,54$	± 0,44
TC-Fläche	0,34	0,23	0,24	0,48	0,48
	± 0,29	± 0,17	± 0,20	$\pm 0,58$	± 0,46
Gesamtkallus total	6,39	4,48	4,29	5,22	5,78
(mm <sup>2</sup> )	$\pm$ 1,61	$\pm 0,98$	± 1,39	± 2,11	$\pm 2,41$
		(a*)	(a**)		

Tabelle 22: Ergebnisse der polychromen Sequenzmarkierung; CG =Calcein-Grün; AK=Alizarinkomplexon, TC = Tetrahydrochlorid (Mittelwerte ± Standardabweichungen)

a= signifikant zu NON-OVX; b= signifikant zu OVX; c= signifikant zu OS 0,04;; \* = p<0,05; \*\* = p< 0,01

#### 4 Diskussion

Osteoporose stellt eine nicht zu unterschätzende Gefahr für die Gesundheit und damit einhergehend für die Lebensqualität der immer älter werdenden Gesellschaft dar und ist eine große Bürde für unser Gesundheitssystem. Hier sind besonders die stationären Behandlungen von Osteoporose-assoziierten Frakturen sowie deren Nachsorge eine große finanzielle Belastung. Oft führen die erlittenen Frakturen zu chronischen Schmerzen, funktionaler Einschränkung oder zum Tode (Dennison und Cooper 2000). Um Mortalität und auch Kosten zu senken, ist es wichtig, die beeinträchtigte Frakturheilung bei Osteoporose-Patienten dahingehend zu unterstützen, dass eine schnelle Mobilisation und eine damit einhergehende Senkung der Mortalität der Patienten möglich sind. Seit einiger Zeit sind hier selektive Androgenrezeptor-Modulatoren Gegenstand der Forschung zu Therapiemöglichkeiten von Osteoporose und Sarkopenie. Der osteoanabole Effekt der SARMs, welchen man sich in der Osteoporose-Therapie zu Nutzen machen möchte, scheint durch die hohe Expression von Androgen-Rezeptoren in reifen Osteoblasten und auch Osteozyten vermittelt zu werden (Abu et al. 1997). Kearbey et al. (2007) sowie Rosen und Negro-Vilar (2002) konnten in experimentellen Studien feststellen, dass verschiedene SARMs einen positiven Effekt auf die Erhaltung der Knochenmasse und -festigkeit haben, sowie eine anabole Aktivität auf Muskeln ausüben. In einer klinischen Phase II Studie wurde insbesondere in der Behandlung mit Ostarine, einem der wichtigsten klinischen Vertreter der SARMs, eine Steigerung der Muskelkraft und des -volumens in einem gesunden Patientenklientel nachgewiesen (Narayanan et al. 2018). Jones et al. (2013) konnten in mit Ostarine-therapierten und ovarektomierten Ratten die Knochendichte verglichen mit Placebo-therapierten, ovarektomierten Gruppen erhöhen und die femorale Belastbarkeit erhalten werden, welche mit der der nicht ovarektomierten Gruppen vergleichbar war. Da SARMs die Induktion der Osteoblastogenese fördern und die der Osteoklastogenese inhibieren (Kearbey et al. 2007), stellt sich die Frage, ob sich diese Effekte auch positiv auf die metaphysäre Frakturheilung in einem osteoporotischen Knochen auswirken können.

## 4.1 Metaphysäres Frakturmodell und Osteoporosemodell

Im klinischen Alltag machen metaphysäre Frakturen, wie zum Beispiel ein Bruch des distalen Radius oder des proximalen Femurs, einen Großteil aller Frakturen aus. Vor allem osteoporotische Frakturen ereignen sich vorwiegend an den Metaphysen der langen Röhrenknochen, begünstigt durch den konsekutiven Abbau der trabekulären Spongiosastruktur. Trotz dieser Tatsache gibt es nur wenige Studien und Modelle, die Frakturheilung an dieser anatomischen Lokalisation untersuchen (Nozaka et al. 2008; Stuermer et al. 2010; Histing et al. 2012; Komrakova et al. 2018). In der Metaphyse ist die direkte Frakturheilung vorherrschend, bei welcher sich im Frakturspalt neuer Knochen ausbildet und keine oder nur geringe Kallusbildung zu beobachten ist (Jarry und Uhthoff 1971). Ein diaphysärer Bruch hingegen, welcher meist durch flexible Osteosynthesen stabilisiert wird, verheilt indirekt und es bildet sich typischerweise ein Frakturkallus (Claes et al. 2011). Experimentelle Studien zur Frakturheilung wurden hauptsächlich am diaphysären Knochen durchgeführt (Habermann et al. 2010; Li et al. 2010; Histing et al. 2011), ungeachtet der untergordneten klinischen Relevanz, besonders in Bezug auf die durch Osteoporose beeinträchtigte Frakturheilung der vorwiegend betroffenen Metaphysen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine metaphysäre Osteotomie und eine ventral an der Tibia liegende Osteosynthese gewählt, die noch minimale Bewegungen zulassen. Daher kommt es trotz der metaphysären direkten Frakturheilung nur zu geringer periostalen Kallusbildung (Stuermer et al. 2010; Komrakova et al. 2018). Dieses Verfahren wurde an ovarektomierten Ratten angewendet. Die ovarektomierte Ratte ist ein etabliertes Osteoporosemodell, das im Vergleich zu humanen Knochen ähnliches Verhalten im Knochenauf- und -abbau, bei der Frakturheilung und dem Ansprechen auf Hormone und medikamentöse Interventionen zeigt (Kalu 1991; Frost und Jee 1992). Dieses Modell hat sich bereits in mehreren Studien als zweckmäßig erwiesen, in welchen unter anderem die Wirkung von Östrogen und Alendronat, Östrogen und Raloxifen, Teriparatid oder Strontiumranelat auf die Frakturheilung untersucht wurde (Kolios et al. 2010; Komrakova et al. 2010; Stuermer et al. 2010; Komrakova et al. 2015). In dieser Arbeit wurde eine Frakturheilungszeit von 5 Wochen gewählt. Dies entspricht der frühen und mittleren Phase der Frakturheilung, in der es zu Knochenneubildung und Frakturspaltüberbrückung kommt (Komrakova et al. 2010) und welche bei osteoporotischem Knochen beeinträchtigt ist (Namkung-Matthai et al. 2001).

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

#### 4.2.1 Körpergewicht und Uterusgewicht

Das Körpergewicht der Ratten war zu Beginn des Versuches in allen Gruppen gleich. Über die gesamte Laufzeit des Versuches war neben der zu erwartenden Gewichtszunahme begründet durch das Wachstum der jungen Ratten eine deutlich stärkere Gewichtszunahme bei ovarektomierten Tieren der Gruppen OVX, OS 0,04, OS 0,4 und OS 4 zu beobachten. Hier kam es in den Versuchswochen 2 bis 5 auch zu einer signifikant erhöhten Futteraufnahme im Vergleich zu der Gruppe NON-OVX. Die gesteigerte Futteraufnahme und stärkere Gewichtszunahme in den ovarektomierten Gruppen lässt sich mit der Östrogen-Defizienz nach Ovarektomie erklären, welches einerseits das Essverhalten der Ratten beeinflußt und die Futteraufnahme erhöht (Butera 2010) und zudem die Bildung von abdominalen Fett fördert und somit auch eine Gewichtszunahme provoziert (Wade et al. 1985). Wade (1972) und Kadi et al. (2002) erklärten die zusätzliche Gewichtszunahme der ovarektomierten Ratten auch mit ihrer verminderten körperlichen Aktivität im Vergleich zu den nicht ovarektomierten Tieren. Da diese Beobachtungen auf eine Östrogen-Defizienz in den Ratten zurückzuführen ist, spricht die Gewichtszunahme für eine erfolgreiche Ovarektomie. Auch anhand der signifikant leichteren Uterusgewichte aller ovarektomierten Versuchsgruppen (OVX, OS 0,04, OS 0,4 und OS 4) gegenüber der schein-operierten, nicht ovarektomierten Gruppe (NON-OVX), ist davon auszugehen, dass die Entfernung der Eierstöcke erfolgreich war. Allerdings ist hier zu bemerken, dass in den Gruppen OS 0,4 und OS 4 gegenüber den Gruppen OVX und OS 0,04 ein deutlich höheres Uterusgewicht festzustellen war. Das lässt sich mit dem Vorhandensein der AR am Uterus erklären (Takeda et al. 1990; Gur und Timurkaan 2016). Takeda et al. (1990) konnten mit mono- und polyklonalen Antikörpern immunohistochemisch zwar nur eine schwache AR-Expression im Myometrium und in den Stromazellen der Uteri nachweisen, sowie eine fast nicht vorhandene Expression im Endometrium und an den Drüsenzellen, dennoch kann hier von einem dosisabhängigen anabolen Effekt von Ostarine auf die glatten Muskelzellen des Myometrium ausgegangen werden. Zu untersuchen bleibt, inwiefern sich hieraus etwaige unerwünschte Arzneimittelwirkungen entwickeln können und, wenn dem so sein sollte, wie diese sich vermeiden lassen.

Bezüglich der Futteraufnahme ist hinzuzufügen, dass es zu einem Einbruch dieser in der neunten Woche kam, also direkt nach der Osteotomie. Dies konnte in allen Gruppen beobachtet werden und kann mit der postoperativen Mobilitätseinschränkung, bedingt durch postoperative Schmerzen und Nachwirkungen der Narkose, erklärt werden. Bis Woche dreizehn nimmt die Futteraufnahme wieder konstant zu, wobei sie jedoch leicht unter der Menge bleibt, welche vor der Osteotomie aufgenommen wurde. Die erreichten Dosen in den Gruppen OS 0,4 (durchschnittliche Dosierung:  $0,3\pm0,07$  mg pro KG) und OS 4 (durchschnittliche Dosierung :  $3\pm0,8$  mg pro Tag) sind mit den Dosierungen der
Studie mit ovarektomierten Ratten von Jones et al. (2013) vergleichbar. In dieser Studie wurde mit Ostarine-Dosierungen von 0,1 mg bis 3 mg pro Tag pro ovarektomierter Ratte eine Steigerung der BMD nachgewiesen. Bei einer Dosierung von 3 mg pro Tag konnten ovarektomie-induzierte Veränderungen der Mikrostruktur des Knochens sogar ganz verhindert werden (Jones et al. 2013). Kearbey et al. (2007) zeigte in einer Studie ebenfalls in ovarektomierten Ratten und unter Therapie mit dem SARM Andarine eine signifikante Steigerung der BMD, eine Verbesserung der Knochenfestigkeit und einen positiven Einfluß auf den kortikalen Knochen. Auch in unserem Tierversuch konnte unter Ostarine-Therapie eine gesteigerte BMD und erhöhte Mineralisation der Femora und der Lendenwirbelkörper in den Gruppen OS 0,4 und OS 4 im Vergleich zu OVX, sowie ein positiver Effekt auf den trabekulären und kortikalen Knochen der Femora, nachgewiesen werden (Hoffmann et al. 2019).

#### 4.2.2 Alkalische Phosphatase

Die knochenspezifische alkalische Phosphatase (AP) ist ein hoch spezifischer Marker für Knochenumsatz, der von den Osteoblasten sezerniert wird. Der AP-Spiegel im Serum korreliert positiv mit der Osteoblastenaktivität und infolgedessen auch mit dem Knochenaufbau (Kaplan 1972). In OS 4 ließ sich ein höchst signifikant erhöhter AP-Serumspiegel feststellen zu NON-OVX und ein hoch signifikanter Serumspiegel zu OS 0,04 (Hoffmann et al. 2019). Dies lässt auf eine signifikant höhere Osteoblastenaktivität in OS 4 schließen. Kang et al. (2008) zeigten in einer Studie mit AR-Knockout-Mäusen, dass das Signal zur Enzymproduktion von AP AR-vermittelt ist. Auf Grund dessen kann angenommen werden, dass Ostarine in der Dosis 4 mg/kg KG den AR aktiviert und somit durch eine verstärkte AP-Synthese den Knochenaufbau begünstigt.

## 4.2.3 Biomechanische Testung

Die biomechanische Testung dient der Untersuchung der Knochenfestigkeit und elastizität. Hier zeigte sich in der Analyse aller Ergebnisse, dass in der Gruppe OVX nur eine geringe Anzahl (n=3) der untersuchten Tibiae überhaupt zur biomechanischen Untersuchung geeignet waren, da hier kaum harter Kallus gebildet wurde, im Gegensatz zu den restlichen Gruppen (jeweils n=7). Dies kann bereits als positiver Effekt von Ostarine auf die Frakturheilung interpretiert werden. Alle untersuchten Parameter zeigten keine Signifikanzen, dennoch fällt auf, dass in den mit Ostarine therapierten Gruppen OS 0,04, OS 0,4 und OS 4 im Vergleich zu NON-OVX die Elastizität und Streckgrenze nicht wesentlich voneinander abweichen. Im Gegensatz dazu waren in der Gruppe OVX alle Parameter vermindert. Dies lässt sich mit den Beobachtungen von Kearbey et al. (2007) vereinbaren, der ähnliche positive Effekte des SARMs S-4 auf die Biomechanik von Femora in ovarektomierten Ratten nachweisen konnte. Unter Ostarine-Therapie zeigten die in diesem Versuchsdurchlauf getesteten intakten Femora keine Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften im Vergleich zu OVX. Knochenfestigkeit und – elastizität der Wirbelkörper hingegen konnte in den Gruppen OS 0,04 und OS 0,4 zwar nicht signifikant, aber dennoch leicht verbessert werden verglichen mit der untherapierten, ovarektomierten Gruppe (Hoffmann et al. 2019). In orchiektomierten Ratten konnte bereits gezeigt werden, dass die Knochenfestigkeit unter SARMs-Therapie mit LGD2226 mit der gesunden Kontrollgruppe vergleichbar ist (Rosen und Negro-Vilar 2002). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Behandlung mit Ostarine während der Knochenheilung einen positiven Effekt auf die Stabilität der Fraktur und die Qualität des neugebildeten Knochens hat.

# 4.2.4 Mikro-CT

In der Mikro-CT-Untersuchung wurden verschiedene Knochenstrukturen der Tibia um den Osteotomiespalt ausgewertet. Hier fällt auf, dass sich signifikante Unterschiede in der bone volume fraction (BV/TV) und der Gesamtknochendichte zeigen, welche in der Gruppe NON-OVX signifikant höher waren als in den ovarektomierten Gruppen (OVX, OS 0,04, OS 0,4 und OS 4). Dies lässt sich durch den Knochenmasseverlust erklären, den die ovarektomierten Tiere auf Grund der Östrogendefizienz erlitten (Jones et al. 2013). Während Hoffmann et al. (2019) in intakten Femora der Ostarine-therapierten ovarektomierten Ratten und Gao et al. (2005) bei Andarine-therapierten orchiektomierten Ratten eine signifikant erhöhte Knochendichte des Femurs im Vergleich zu nicht therapierten, ovar- bzw. orchiektomierten Ratten messen konnten, ließ sich dieser Effekt von Ostarine auf die Knochendichte im Osteotomiebereich im osteoporotischen Knochen in diesem Versuch nicht nachweisen.

Bei den in diesem Versuch gemessenen Kortikalisdichten und -volumina zeigten sich zwar keine Signifikanzen, jedoch war in allen Ostarine-therapierten Gruppen eine im Vergleich zu der OVX-Gruppe erhöhte Kortikalisdichte und ein erhöhtes Kortikalisvolumen im Bereich des Frakturspaltes festzustellen, was auf einen osteoprotektiven Effekt von Ostarine auf den kortikalen Knochen hindeutet, welchen Hoffmann et al. (2019) ebenfalls in intakten Femura und Wirbelkörpern nachweisen konnten. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen aus den Studien von Jones et al. (2013), Kearbey et al. (2007) und Hanada et al. (2003), in welchen ein anaboler Effekt von Ostarine und Andarine auf den kortikalen Knochen der osteoporotischen, aber nicht osteotomierten Ratte festgestellt wurde. Dieser anabole Effekt kann auf das vermehrte Vorhandensein des AR in den Osteoblasten des kortikalen Knochens (Kasperk C et al. 1997) zurückgeführt werden, welche durch Ostarine stimuliert werden. Allerdings fällt auf, dass in der Gruppe OS 0,4 das Volumen des weichen Kallus, signifikant höher war als in NON-OVX. Die Weichteildichte zeigte sich in OS 4 signifikant höher als in OVX. Ostarine scheint in der Gruppe OS 0,4 und OS 4 die Bildung des Weichkallus stärker stimuliert zu haben, was mit einer durch Ostarine ARvermittelten verstärkten Expression von Typ I-Kollagen erklärt werden kann (Vanderschueren et al. 2004). Unter Berücksichtigung der Kortikalisdichte und des -volumens sowie den Ergebnissen der biomechanischen Testung, welche eine mit der nicht ovarektomierten Gruppe Vergleichbare Stabilität des Frakturknochens zeigte, ist davon auszugehen, dass auch in den Gruppen OS 0,4 und OS 4 die Qualität des neugebildeten Knochens mit der Gruppe NON-OVX zu vergleichen ist.

#### 4.2.5 Histologische Untersuchung

Die histologische Untersuchung umfasst die mikroradiographische Untersuchung, in der das Augenmerk auf Dicke und Dichte des Kallus bzw. der Kortikalis gerichtet wurde und die polychrome Sequenzmarkierung, durch welche die Kinetik des Knochenaufbaus im Frakturspalt beurteilt werden konnte.

### 4.2.5.1 Mikroradiographie

Bei Betrachtung der Mikroradiographien fiel auf, dass in allen Ostarine-behandelten Gruppen eine erhöhte ventrale, also plattennahe, Kortikalisdicke zu messen war. In der Gruppe OS 4 konnte überdies ein signifikanter Unterschied zu NON-OVX und ein hochsignifikanter Unterschied zu OVX verzeichnet werden. Dies lässt wieder auf eine Dosisabhängige Stimulation des AR schließen. Da dorsal, bzw. plattenfern, keine bemerkenswerten Unterschiede zwischen allen Gruppen hinsichtlich der Kortikalisdicke zu finden waren, kann angenommen werden, dass das Einbringen des Osteosynthesematerials an der ventralen Tibiakante einen verstärkten Aufbau der Kortikalis stimuliert hat. Die Kallusdicke hingegen ist in allen Gruppen auf der dorsalen Seite der Tibia höher als auf der ventralen. Das kann durch die dorsal noch stattgefundenen Mikrobewegungen erklärt werden, welche ventral durch die fest stabilisierende Osteosynthese weitestgehend unterbunden wurden (Komrakova et al. 2009). Die in diesem Versuch gemessene Kallusdichte ist in OS 0,4 ventral signifikant niedriger als in NON-OVX. Auch endostal ist in OS 0,4 eine im Vergleich zu den restlichen Gruppen verminderte Kallusdichte festzustellen. Dies spricht für eine geringe Mineralisierung des neugebildeten Kallus, die sich in OS 0,4 auch in der MikroCT-Untersuchung zeigte. Währenddessen zeigte sich in OS 4 eine zu OVX signifikant erhöhte dorsale Kallusdichte. Auch endostal ist in OS 4 eine signifikant erhöhte Kallusdichte als in OS 0,4 festzustellen, was auf eine fortgeschrittene endostale Frakturheilung in dieser Gruppe schließen lässt. Dies zeigt einen positiven Effekt von der höheren Dosis (OS 4) des Ostarines auf die Frakturheilung des osteoporotischen Knochens. Bezüglich der Kortikalisdichte konnte kein nennenswerter Unterschied gefunden werden.

# 4.2.5.2 Polychrome Sequenzmarkierung

Dass Ostarine einen anabolen Effekt auf den osteoporotische Knochen hat, wurde bereits in anderen Studien gezeigt (Gao et al. 2005; Kearbey et al. 2007; Jones et al. 2013, und konnte sich auch in diesem Tierversuch durch die Untersuchung der Femora und Wirbel (Hoffmann et al. 2019) sowie durch die Mikroradiographie der Tibia bestätigen. Mithilfe der polychromen Sequenzmarkierung galt es nun zu beurteilen, inwiefern Ostarine die Kinetik des Knochenaufbaus modellieren kann (Weidemann 2014). Eine signifikant reduzierte Gesamt-Kallusfläche in der Gruppe OVX im Vergleich zu NON-OVX, wie sie in anderen Studien beobachtet wurde (Namkung-Matthai et al. 2001), konnte hier bestätigt werden. In der Gruppe OS 4 konnte an der dorsalen Tibia eine signifikant erhöhte CGmarkierte Kallusfläche nachgewiesen werden als in der Gruppe OVX, wobei in der Gruppe OS 0,04 die dorsale Kallusbildung mit der der Gruppe OVX vergleichbar war (Komrakova et al. 2019). So kann man annehmen, dass es in der Gruppe OS 4 zu einer Dosisabhängigen verstärkten Kallusbildung am dorsalen Knochen in den ersten 20 Tagen nach Osteotomie gekommen ist, welche mit der Gruppe NON-OVX zu vergleichen ist. Die signifikant erhöhte dorsale Gesamtkallusfläche in der Gruppe OS 4 lässt auf eine die Frakturheilung begünstigende, osteoanabole Wirkung von Ostarine schließen. Allerdings gilt es hier zu berücksichtigen, dass eine generell verstärkte Kallusbildung an der dorsalen Tibia auf Grund der hier stattfindenden Mikrobewegungen zu erwarten ist, welche ventral auf Grund der Osteosynthese unterbunden werden (Komrakova et al. 2009). Die sich in der Gruppe OVX zeigende signifikant verringerte Gesamtkallusfläche im Vergleich zu NON-OVX kann auf die verzögerte Knochenheilung des osteoporotischen Knochens zurückgeführt werden (Meyer et al. 2001; Lu et al. 2005). In OS 4 konnten in der frühen Frakturheilung an der dorsalen Tibia mit NON-OVX vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Berücksichtigt man bei der Ergebnisbetrachtung der polychromen

Sequenzmarkierung auch die Ergebnisse der biomechanischen Untersuchung, welche belegen, dass die biomechanischen Eigenschaften in allen Ostarine-behandelten Gruppen auf vergleichbarem Niveau wie die der Gruppe NON-OVX sind, ist davon auszugehen, dass der neugebildete Kallus qualitativ mit dem der gesunden Kontrolltiere zu vergleichen ist. Dies deutet abermals auf eine die Frakturheilung fördernde Wirkung von Ostarine, besonders in den Dosierung OS 4, hin (Komrakova et al. 2019).

# 4.3 Schlussfolgerung

Ostarine hat sowohl auf den osteoporotischen Knochen (Hoffmann et al. 2019) als auch auf die Frakturheilung einen positiven Effekt. Die besten Ergebnisse wurden hier in der Gruppe der höchsten Dosierung von Ostarine, OS 4, gefunden. So konnten im Vergleich zu OVX Gesamtkallusfläche und –dichte dorsal signifikant gesteigert werden. Auch die frühe Frakturheilung wurde in der Gruppe OS 4 im Vergleich zu OVX beschleunigt. Daneben wurden Knochenfestigkeit und -elastizität nach Fraktur hier wieder auf ein Niveau gehoben, welches nicht signifikant aber mit dem der gesunden Knochen aus der Gruppe der nicht ovarektomierten Tiere vergleichbar war. In OS 4 zeigten sich verglichen mit NON-OVX und OVX ein gesteigertes Kortikalisvolumen und eine größere ventrale Kortikalisdicke. Die in der polychromen Sequenzmarkierung in OS 4 gezeigte Steigerung der endostalen Gesamtkallusfläche mit ähnlicher Heilungskinetik wie in NON-OVX kann als positiver Einfluss von Ostarine gewertet werden, welcher die durch die Osteoporose verzögerte Frakturheilung beschleunigt bzw. die Qualität des Frakturkallus auf ein mit im gesunden Knochen gebildeten Kallus vergleichbares Niveau hebt.

Auf Grund der verbesserten Knochenqualität im Osteotomiebereich, welche hier belegt wurde, ist die Therapie einer osteoporotischen Fraktur mit Ostarine durchaus in Betracht zu ziehen. Auch die anabole Wirkung auf die Skelettmuskulatur, welche sich auch in unserem Tierversuch durch verstärkte Kapillarisierung und gesteigerte Aktivität metabolischer Enzyme im Muskel zeigte (Henkies 2020), könnte einen indirekten positiven Effekt auf die Knochenheilung haben. Obwohl noch weitere Untersuchungen bezüglich der genauen Wirkweise von Ostarine am Knochen, und anderen Geweben, insbesondere in Anbetracht der gesteigerten Uterusgewichte, durchgeführt werden sollten, präsentiert sich ein potentes Medikament zur Therapie der Osteoporose und Verbesserung der Frakturheilung in einem osteoporotischen Knochen.

#### 5 Zusammenfassung

Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, welche weltweit eine enorme Belastung für Patienten und Gesundheitssysteme darstellt. Sie bedingt ein erhöhtes Frakturrisiko und erschwert dann die frühe Frakturheilung und die späte Kallusmineralisation, wodurch die Neubildung eines Knochens von minderer Qualität bedingt wird. Daher ist es notwendig, neben optimalen Osteosynthesen zur Frakturstabilisation, auch die medikamentösen Möglichkeiten auszuschöpfen, um den Reparaturprozess des durch Krankheit beeinträchtigten Knochens zu optimieren und zu beschleunigen. In mehreren Studien konnte bereits ein positiver Effekt der selektiven Androgen-Rezeptor-Modulatoren (SARMs), insbesondere von Ostarine (Enobosarm, GTx-024, MK-2866) als klinisch bis dato am besten erforschten SARM, auf den osteoporotischen Knochen festgestellt werden Hierbei wurde die Wirkung auf die Frakturheilung bislang jedoch noch nicht untersucht. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss von Ostarine auf die metaphysäre, Frakturheilung im Osteoporosemodell der ovarektomierten Ratte bewerten zu können.

Der Versuch wurde mit drei Monate alten Ratten gestartet, welche auf fünf Gruppen á 12 bis 13 Tiere randomisiert verteilt wurden. Eine Gruppe wurde unbehandelt gelassen (NON-OVX), die anderen 4 Gruppen wurden ovarektomiert und nach acht Wochen, wenn eine Osteoporose induziert war, wurde eine bilaterale, metaphysäre Osteotomie der Tibiae bei allen Versuchstieren durchgeführt, welche mittels Plattenosteosynthese stabilisiert wurde. Nach Osteotomie bekamen drei der vier ovarektomierten Versuchsgruppen oral Ostarine (OS; Reinheit > 98%, Biochempartner Co. Ltd ®, Shanghai, China) verabreicht, indem dieser in verschiedenen Konzentrationen (OS 0,04 = 0.04 mg/kg Körpergewicht (KG); OS 0.4 = 0.4 mg/kg Körpergewicht (KG) und OS 4 = 4mg/kg Körpergewicht (KG)) dem Futter beigemischt wurde. Körpergewicht und Futteraufnahme wurde wöchentlich dokumentiert. Fünf Wochen nach der Osteotomie wurde die Knochenheilung untersucht. Die Tibiae wurden biomechanischen und histomorphologischen Untersuchungen sowie einer MikroCT-Analyse unterzogen. Die Uteri wurden gewogen und Serum für die Analyse der Alkalische Phosphatase (AP) wurde aufbewart. Alle erhobenen Daten wurden anschließend statistisch mittels Varianzanalyse und post-hoc Tukey-Kramer Test ausgewertet (p < 0.05).

Nach Ovarektomie zeigte sich in allen Gruppen mit ovarektomierten Tieren eine stärkere Gewichtszunahme als in der Gruppe NON-OVX. Die erhöhte Futteraufnahme in den ovarektomierten Gruppen OVX, OS 0,04, OS 0,4 und OS 4 lässt sich durch die Östrogendefizienz begründen, welche durch verschiedene Faktoren zu einem erhöhten Körpergewicht führt.

Die Uteri in den ovarektomierten Gruppen zeigten sich signifikant leichter als in NON-OVX, was für eine erfolgreiche Ovarektomie spricht. In der Gruppe OS 0,4 und OS 4 war das durchschnittliche Uterusgewicht höher als in OVX. Dies deutet auf einen Androgen-Rezeptor-vermittelten Effekt von Ostarine auf die glatten Muskelzellen der Uteri hin.

Die in OS 4 signifikant erhöhten AP-Serumspiegel im Vergleich zu NON-OVX und OVX deuten auf einen Ostarine-vermittelte verstärkte Stimulation der Osteoblastenaktivität und somit erhöhten Knochenaufbau hin.

Ostarine vermochte es in der Gruppe OS 4, verglichen mit der Gruppe OVX, nachweislich die Gesamtknochendichte und dorsal die Gesamtkallusdichte und Kallusfläche zu steigern und somit die frühe Frakturheilung zu verbessern. Des Weiteren wirkte Ostarine anabol auf die Kortikalis. Die biomechanischen Eigenschaften des Frakturknochens in den Ostarine-therapierten Gruppen waren mit denen der Gruppe NON-OVX zu vergleichen.

Zusammenfassend führte die Behandlung mit der höchsten Ostarine-Dosierung in Gruppe OS 4 zur einer verbesserten frühen Frakturheilung, während diese Effekte sich in den Gruppen mit niedriger Ostarine-Dosierung, OS 0,4 und OS 0,04 , weniger zeigten. Ostarine könnte ein potentes Medikament zur Therapie der Osteoporose und zur Verbesserung der Frakturheilung in einem osteoporotischen Knochen darstellen. Allerdings sind weitere Untersuchungen bezüglich der Nebenwirkungen, insbesondere in Anbetracht der gesteigerten Uterusgewichte, anzustreben.

# 6 Literaturverzeichnis

Abrahamsen B (2010): Adverse effects of bisphosphonates. Calcif Tissue Int 86, 421-435

Abrahamsen B, van Staa T, Ariely R, Olson M, Cooper C (2009): Excess mortality following hip fracture: a systematic epidemiological review. Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA <u>20</u>, 1633–1650

Abu EO, Horner A, Kusec V, Triffitt JT, Compston JE (1997): The Localization of Androgen Receptors in Human Bone. J Clin Endocrinol Metab <u>82</u>, 3493–3497

Albers J, Markus MA, Alves F, Dullin C (2018): X-ray based virtual histology allows guided sectioning of heavy ion stained murine lungs for histological analysis. Sci Rep <u>8</u>, 7712

Alen P, Claessens F, Verhoeven G, Rombauts W, Peeters B (1999): The Androgen Receptor Amino-Terminal Domain Plays a Key Role in p160 Coactivator-Stimulated Gene Transcription. Mol Cell Biol <u>19</u>, 6085–6097

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 <u>97</u>, 135–187

Amin S, Achenbach SJ, Atkinson EJ, Khosla S, Melton LJ (2014): Trends in fracture incidence: a population-based study over 20 years. J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res <u>29</u>, 581–589

Araujo AB, Esche GR, Kupelian V, O'Donnell AB, Travison TG, Williams RE, Clark RV, McKinlay JB (2007): Prevalence of symptomatic androgen deficiency in men. J Clin Endocrinol Metab <u>92</u>, 4241–4247

Aspenberg P, Genant HK, Johansson T, Nino AJ, See K, Krohn K, García-Hernández PA, Recknor CP, Einhorn TA, Dalsky GP, et al. (2010): Teriparatide for acceleration of fracture repair in humans: a prospective, randomized, double-blind study of 102 postmenopausal women with distal radial fractures. J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res <u>25</u>, 404–414

Bartl R: Osteoporose: Prävention, Diagnostik, Therapie. 4. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag KG 2011

Bartl R: Klinische Osteologie. 4.; Georg Thieme Verlag KG 2014

Bellido T, Jilka RL, Boyce BF, Girasole G, Broxmeyer H, Dalrymple SA, Murray R, Manolagas SC (1995): Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor. J Clin Invest <u>95</u>, 2886–2895

Betancourt M, Wirfel KL, Raymond AK, Yasko AW, Lee J, Vassilopoulou-Sellin R (2003): Osteosarcoma of bone in apatient with primary hyperparathyroidism: a case report. J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res <u>18</u>, 163–166

Black DM, Rosen CJ (2016): Clinical Practice. Postmenopausal Osteoporosis. N Engl J Med <u>374</u>, 254–262

Black DM, Cummings SR, Karpf DB, Cauley JA, Thompson DE, Nevitt MC, Bauer DC, Genant HK, Haskell WL, Marcus R, et al. (1996): Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. Fracture Intervention Trial Research Group. Lancet Lond Engl <u>348</u>, 1535–1541

Black DM, Thompson DE, Bauer DC, Ensrud K, Musliner T, Hochberg MC, Nevitt MC, Suryawanshi S, Cummings SR, Fracture Intervention Trial (2000): Fracture risk reduction with alendronate in women with osteoporosis: the Fracture Intervention Trial. FIT Research Group. J Clin Endocrinol Metab <u>85</u>, 4118–4124

Bohl CE, Miller DD, Chen J, Bell CE, Dalton JT (2005): Structural basis for accommodation of nonsteroidal ligands in the androgen receptor. J Biol Chem <u>280</u>, 37747–37754

Boonen S, Lips P, Bouillon R, Bischoff-Ferrari HA, Vanderschueren D, Haentjens P (2007): Need for additional calcium to reduce the risk of hip fracture with vitamin d supplementation: evidence from a comparative metaanalysis of randomized controlled trials. J Clin Endocrinol Metab <u>92</u>, 1415–1423

Brandsch T (2012): Einfluss der intermittierenden PTH-Applikation (hPTH 1-34) auf die Frakturheilung des metaphysären Knochens der orchiektomierten Ratte.

Butera PC (2010): Estradiol and the control of food intake. Physiol Behav 99, 175-180

Cao Y, Mori S, Mashiba T, Westmore MS, Ma L, Sato M, Akiyama T, Shi L, Komatsubara S, Miyamoto K, Norimatsu H (2002): Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res <u>17</u>, 2237–2246

Carrascosa A, Audi L, Ferrandez MA, Ballabriga A (1990): Biological effects of androgens and identification of specific dihydrotestosterone-binding sites in cultured human fetal epiphyseal chondrocytes. J Clin Endocrinol Metab <u>70</u>, 134–140

Cauley JA, Norton L, Lippman ME, Eckert S, Krueger KA, Purdie DW, Farrerons J, Karasik A, Mellstrom D, Ng KW, et al. (2001): Continued breast cancer risk reduction in postmenopausal women treated with raloxifene: 4-year results from the MORE trial. Multiple outcomes of raloxifene evaluation. Breast Cancer Res Treat <u>65</u>, 125–134

Cauley JA, Danielson ME, Jammy GR, Bauer DC, Jackson R, Wactawski-Wende J, Chlebowski RT, Ensrud KE, Boudreau R (2017): Sex Steroid Hormones and Fracture in a Multi-ethnic Cohort of Women: The Women's Health Initiative Study (WHI). J Clin Endocrinol Metab <u>102</u>, 1538-1547

Chen J, Kim J, Dalton JT (2005): Discovery AND Therapeutic Promise OF Selective Androgen Receptor Modulators. Mol Interv <u>5</u>, 173–188

Chen JR, Bellido T, Han L, Di Gregorio GB, Jilka RL, Manolagas SC (2001): Genderindependent induction of murine osteoclast apoptosis in vitro by either estrogens or nonaromatizable androgens. J Bone Miner Res <u>16</u>, 159-159

Cheung WH, Miclau T, Chow SKH, Yang FF, Alt V (2016): Fracture healing in the osteoporotic bone. Injury <u>46</u>, 21-26

Chlebowski RT, Kuller LH, Prentice RL, Stefanick ML, Manson JE, Gass M, Aragaki AK, Ockene JK, Lane DS, Sarto GE, et al. (2009): Breast Cancer after Use of Estrogen plus Progestin in Postmenopausal Women. N Engl J Med <u>360</u>, 573–587

Chrischilles EA (1991): A Model of Lifetime Osteoporosis Impact. Arch Intern Med 151, 2026

Claes L, Reusch M, Wolfram U, Göckelmann M, Ignatius A (2011): Modelle der metaphysären Frakturheilung. Osteologie <u>20</u>, 29–33

Clarke BL, Khosla S (2009): Androgens and Bone. Steroids 74, 296-305

Compston J (2018): Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. Endocrine 61, 7-16

Compston JE, Seeman E (2006): Compliance with osteoporosis therapy is the weakest link. Lancet Lond Engl <u>368</u>, 973–974

Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis (1993) Am J Med <u>94</u>, 646–650

Cooper C, Wickham C, Coggon D (1990): Sedentary work in middle life and fracture of the proximal femur. Br J Ind Med <u>47</u>, 69–70

Cosman F (2008): Parathyroid hormone treatment for osteoporosis. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes <u>15</u>, 495–501

Cremers S, Drake MT, Ebetino FH, Bilezikian JP, Russell RGG (2019): Pharmacology of bisphosphonates. Br J Clin Pharmacol <u>85</u>, 1052–1062

Cummings SR, Melton LJ (2002): Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. The Lancet <u>359</u>, 1761–1767

Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, Delmas P, Zoog HB, Austin M, Wang A, et al. (2009): Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. N Engl J Med <u>361</u>, 756–765

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 <u>2</u>, 153–161

Davies GC, Huster WJ, Lu Y, Plouffe L, Lakshmanan M (1999): Adverse events reported by postmenopausal women in controlled trials with raloxifene. Obstet Gynecol <u>93</u>, 558–565

Davis SR, Wahlin-Jacobsen S (2015): Testosterone in women--the clinical significance. Lancet Diabetes Endocrinol <u>3</u>, 980–992

Delmas PD, Ensrud KE, Adachi JD, Harper KD, Sarkar S, Gennari C, Reginster J-Y, Pols HAP, Recker RR, Harris ST, et al. (2002): Efficacy of raloxifene on vertebral fracture risk reduction in postmenopausal women with osteoporosis: four-year results from a randomized clinical trial. J Clin Endocrinol Metab <u>87</u>, 3609–3617

Dennison E, Cooper C (2000): Epidemiology of osteoporotic fractures. Horm Res <u>54 Suppl 1</u>, 58–63

Donovan JL (1995): Patient decision making. The missing ingredient in compliance research. Int J Technol Assess Health Care <u>11</u>, 443–455

Drake MT, Cremers SCLM (2010): Bisphosphonate therapeutics in bone disease: the hard and soft data on osteoclast inhibition. Mol Interv <u>10</u>, 141–152

Duke CB, Jones A, Bohl CE, Dalton JT, Miller DD (2011): Unexpected binding orientation of bulky-B-ring anti-androgens and implications for future drug targets. J Med Chem <u>54</u>, 3973–3976

DVO-Leitlinie 2017 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen und bei Männern.Dachverband Osteologie e.V.; https://www.dv-osteologie.org/dvo\_leitlinien/dvo-leitlinie-2017;

Edwards JP, West SJ, Pooley CLF, Marschke KB, Farmer LJ, Jones TK (1998): New nonsteroidal androgen receptor modulators based on 4-(trifluoromethyl)-2(1H)-pyrrolidino[3,2-g]quinolinone. Bioorg Med Chem Lett <u>8</u>, 745–750

Eisenberger A, Westhoff C (2014): Hormone replacement therapy and venous thromboembolism. J Steroid Biochem Mol Biol <u>142</u>, 76–82

Elbers JM, Asscheman H, Seidell JC, Gooren LJ (1999): Effects of sex steroid hormones on regional fat depots as assessed by magnetic resonance imaging in transsexuals. Am J Physiol <u>276</u>, E317-325

Epstein S (2006): Update of current therapeutic options for the treatment of postmenopausal osteoporosis. Clin Ther <u>28</u>, 151–173

Estrada M, Espinosa A, Müller M, Jaimovich E (2003): Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. Endocrinology <u>144</u>, 3586–3597

Ettinger B, Black DM, Nevitt MC, Rundle AC, Cauley JA, Cummings SR, Genant HK (1992): Contribution of vertebral deformities to chronic back pain and disability. J Bone Miner Res <u>7</u>, 449–456

Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, Christiansen C, Delmas PD, Zanchetta JR, Stakkestad J, et al. (1999): Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. JAMA <u>282</u>, 637–645

Fini M, Salamanna F, Veronesi F, Torricelli P, Nicolini A, Benedicenti S, Carpi A, Giavaresi G (2012): Role of obesity , alcohol and smoking on bone health. Front Biosci Elite Ed <u>4</u>, 2686–2706

Fink HA, Milavetz DL, Palermo L, Nevitt MC, Cauley JA, Genant HK, Black DM, Ensrud KE (2005): What Proportion of Incident Radiographic Vertebral Deformities Is Clinically Diagnosed and Vice Versa? J Bone Miner Res <u>20</u>, 1216–1222

Finkelstein JS, Hayes A, Hunzelman JL, Wyland JJ, Lee H, Neer RM (2003): The effects of parathyroid hormone, alendronate, or both in men with osteoporosis. N Engl J Med <u>349</u>, 1216–1226

Finkelstein JS, Wyland JJ, Leder BZ, Burnett-Bowie S-AM, Lee H, Jüppner H, Neer RM (2009): Effects of teriparatide retreatment in osteoporotic men and women. J Clin Endocrinol Metab <u>94</u>, 2495–2501

Flanagan AM, Chambers TJ (1991): Inhibition of bone resorption by bisphosphonates: interactions between bisphosphonates, osteoclasts, and bone. Calcif Tissue Int <u>49</u>, 407–415

Freemantle N, Satram-Hoang S, Tang E-T, Kaur P, Macarios D, Siddhanti S, Borenstein J, Kendler DL (2012): Final results of the DAPS (Denosumab Adherence Preference Satisfaction) study: a 24-month, randomized, crossover comparison with alendronate in postmenopausal women. Osteoporos Int <u>23</u>, 317–326

Frost HM, Jee WS (1992): On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. Bone Miner <u>18</u>, 227–236

Ganz DA, Bao Y, Shekelle PG, Rubenstein LZ (2007): Will my patient fall? JAMA 297, 77-86

Gao T, Marcelli M, McPhaul MJ (1996): Transcriptional activation and transient expression of the human androgen receptor. J Steroid Biochem Mol Biol <u>59</u>, 9–20

Gao W, Dalton JT (2007): Expanding the therapeutic use of androgens via selective androgen receptor modulators (SARMs). Drug Discov Today <u>12</u>, 241–248

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 <u>146</u>, 4887–4897

Gosch M, Kammerlander C, Neuerburg C (2019): Osteoporose – Epidemiologie und Versorgungsqualität. Z Für Gerontol Geriatr <u>52</u>, 408–413

Greiner SH, Wildemann B, Back DA, Alidoust M, Schwabe P, Haas NP, Schmidmaier G (2008): Local application of zoledronic acid incorporated in a poly(D,L-lactide)-coated implant accelerates fracture healing in rats. Acta Orthop <u>79</u>, 717–725

Gur FM, Timurkaan S (2016): Immunohistochemical localization of androgen receptors in female mole rat (Spalax leucodon) tissues. Biotech Histochem Off Publ Biol Stain Comm <u>91</u>, 472–479

Habermann B, Kafchitsas K, Olender G, Augat P, Kurth A (2010): Strontium ranelate enhances callus strength more than PTH 1-34 in an osteoporotic rat model of fracture healing. Calcif Tissue Int <u>86</u>, 82–89

Hadji P, Klein S, Gothe H, Häussler B, Kless T, Schmidt T, Steinle T, Verheyen F, Linder R (2013): The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. Dtsch Arzteblatt Int <u>110</u>, 52–57

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 <u>26</u>, 1563–1569

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 J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA <u>18</u>, 77–84

Heaney RP, Draper MW (1997): Raloxifene and estrogen: comparative bone-remodeling kinetics. J Clin Endocrinol Metab <u>82</u>, 3425–3429

Hegde V, Jo JE, Andreopoulou P, Lane JM (2016): Effect of osteoporosis medications on fracture healing. Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA <u>27</u>, 861–871

Henkies D (2020): Der Einfluss des selektiven Androgenrezeptor- Modulators Enobosarm auf die Skelettmuskulatur im Modellorganismus der osteoporotischen Ratte.

Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, McCloskey EV, Jönsson B, Kanis JA (2013): Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. Arch Osteoporos <u>8</u>, 1-115

Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke MW, Wehner T, Bindl R, et al. (2011): Small animal bone healing models: Standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. Bone <u>49</u>, 591–599

Histing T, Klein M, Stieger A, Stenger D, Steck R, Matthys R, Holstein JH, Garcia P, Pohlemann T, Menger MD (2012): A new model to analyze metaphyseal bone healing in mice. J Surg Res <u>178</u>, 715–721

Hoffmann DB, Komrakova M, Pflug S, von Oertzen M, Saul D, Weiser L, Walde TA, Wassmann M, Schilling AF, Lehmann W, Sehmisch S (2019): Evaluation of ostarine as a selective androgen receptor modulator in a rat model of postmenopausal osteoporosis. J Bone Miner Metab <u>37</u>, 243–255

Jarry L, Uhthoff HK (1971): Differences in healing of metaphyseal and diaphyseal fractures. Can J Surg J Can Chir <u>14</u>, 127–135

Johnell O, Kanis JA (2006): An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA <u>17</u>, 1726–1733

Johnell O, Kanis JA, Black DM, Balogh A, Poor G, Sarkar S, Zhou C, Pavo I (2004): Associations between baseline risk factors and vertebral fracture risk in the Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Study. J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res <u>19</u>, 764– 772

Jones A, Coss CC, Steiner MS, Dalton JT (2013): An overview on selective androgen receptor modulators: Focus on enobosarm. Drugs Future <u>38</u>, 309

Jørgensen NR, Schwarz P (2011): Effects of Anti-osteoporosis Medications on Fracture Healing. Curr Osteoporos Rep <u>9</u>, 149–155

Jung A, Bisaz S, Fleisch H (1973): The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals. Calcif Tissue Res <u>11</u>, 269–280

Kadi F, Karlsson C, Larsson B, Eriksson J, Larval M, Billig H, Jonsdottir IH (2002): The effects of physical activity and estrogen treatment on rat fast and slow skeletal muscles following ovariectomy. J Muscle Res Cell Motil <u>23</u>, 335

Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner <u>15</u>, 175–191

Kang H-Y, Shyr C-R, Huang C-K, Tsai M-Y, Orimo H, Lin P-C, Chang C, Huang K-E (2008): Altered TNSALP expression and phosphate regulation contribute to reduced mineralization in mice lacking androgen receptor. Mol Cell Biol <u>28</u>, 7354–7367

Kanis JA (1994): Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA <u>4</u>, 368–381

Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltaev N (1994): The diagnosis of osteoporosis. J Bone Miner Res <u>9</u>, 1137–1141

Kanis JA, Borgstrom F, Laet CD, Johansson H, Johnell O, Jonsson B, Oden A, Zethraeus N, Pfleger B, Khaltaev N (2005): Assessment of fracture risk. Osteoporos Int <u>16</u>, 581–589

Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, De Laet C, Eisman JA, Fujiwara S, Kroger H, McCloskey EV, Mellstrom D, et al. (2005): Smoking and fracture risk: a meta-analysis. Osteoporos Int <u>16</u>, 155–162

Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Oden A, Melton LJ, Khaltaev N (2008): A reference standard for the description of osteoporosis. Bone <u>42</u>, 467–475

Kanis JA, Burlet N, Cooper C, Delmas PD, Reginster J-Y, Borgstrom F, Rizzoli R, European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) (2008): European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA <u>19</u>, 399–428

Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Cooper C, Rizzoli R, Reginster J-Y (2013): European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. Osteoporos Int <u>24</u>, 23–57

Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Reginster J-Y (2019): European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. Osteoporos Int <u>30</u>, 3–44

Kaplan MM (1972): Alkaline phosphatase. N Engl J Med 286, 200-202

Kaptoge S, Armbrecht G, Felsenberg D, Lunt M, O'Neill TW, Silman AJ, Reeve J, EPOS Study Group (2004): When should the doctor order a spine X-ray? Identifying vertebral fractures for osteoporosis care: results from the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS). J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res <u>19</u>, 1982–1993

Kasperk C, Fitzsimmons R, Strong D, Mohan S, Jennings J, Wergedal J, Baylink D (1990): Studies of the mechanism by which androgens enhance mitogenesis and differentiation in bone cells. J Clin Endocrinol Metab <u>71</u>, 1322–1329

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 <u>61</u>, 464–473

Kasperk CH, Wakley GK, Hierl T, Ziegler R (1997): Gonadal and adrenal androgens are potent regulators of human bone cell metabolism in vitro. J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res <u>12</u>, 464–471

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 <u>24</u>, 328–335 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 Off J Am Soc Bone Miner Res <u>22</u>, 1479–1491

Kim J, Wu D, Hwang DJ, Miller DD, Dalton JT (2005): The para substituent of S-3-(phenoxy)-2hydroxy-2-methyl-N-(4-nitro-3-trifluoromethyl-phenyl)-propionamides is a major structural determinant of in vivo disposition and activity of selective androgen receptor modulators. J Pharmacol Exp Ther <u>315</u>, 230–239

Kim TJ, Koo KC (2020): Pathophysiology of Bone Loss in Patients with Prostate Cancer Receiving Androgen-Deprivation Therapy and Lifestyle Modifications for the Management of Bone Health: A Comprehensive Review. Cancers <u>12</u>, 1529

Klotzbuecher CM, Ross PD, Landsman PB, Abbott TA, Berger M (2000): Patients with prior fractures have an increased risk of future fractures: a summary of the literature and statistical synthesis. J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res <u>15</u>, 721–739

Kolios L, Hoerster AK, Sehmisch S, Malcherek MC, Rack T, Tezval M, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, Stuermer KM, Stuermer EK (2010): Do Estrogen and Alendronate Improve Metaphyseal Fracture Healing When Applied as Osteoporosis Prophylaxis? Calcif Tissue Int <u>86</u>, 23–32

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 <u>201</u>, 253–262

Komrakova M, Stuermer EK, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmisch S, Tezval M, Daub F, Martens T, Witzenhausen 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 <u>47</u>, 480–492

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 <u>97</u>, 391–401

Komrakova M, Fiebig J, Hoffmann DB, Krischek C, Lehmann W, Stuermer KM, Sehmisch S (2018): The Advantages of Bilateral Osteotomy Over Unilateral Osteotomy for Osteoporotic Bone Healing. Calcif Tissue Int <u>103</u>, 80–94

Komrakova M, Furtwängler J, Hoffmann DB, Lehmann W, Schilling AF, Sehmisch S (2019): The Selective Androgen Receptor Modulator Ostarine Improves Bone Healing in Ovariectomized Rats. Calcif Tissue Int <u>106</u>, 147-157 Kousteni S, Chen JR, Bellido T, Han L, Ali AA, O'Brien CA, Plotkin L, Fu Q, Mancino AT, Wen Y, et al. (2002): Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids. Science 298, 843–846

Lee JS, LaCroix AZ, Wu L, Cauley JA, Jackson RD, Kooperberg C, Leboff MS, Robbins J, Lewis CE, Bauer DC, Cummings SR (2008): Associations of serum sex hormone-binding globulin and sex hormone concentrations with hip fracture risk in postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab <u>93</u>, 1796–1803

Lems WF, Paccou J, Zhang J, Fuggle NR, Chandran M, Harvey NC, Cooper C, Javaid K, Ferrari S, Akesson KE (2021): Vertebral fracture: epidemiology, impact and use of DXA vertebral fracture assessment in fracture liaison services. Osteoporos Int <u>32</u>, 399–411

Leu C-T, Luegmayr E, Freedman LP, Rodan GA, Reszka AA (2006): Relative binding affinities of bisphosphonates for human bone and relationship to antiresorptive efficacy. Bone <u>38</u>, 628–636

Li YF, Luo E, Feng G, Zhu SS, Li JH, Hu J (2010): Systemic treatment with strontium ranelate promotes tibial fracture healing in ovariectomized rats. Osteoporos Int <u>21</u>, 1889–1897

Lu C, Miclau T, Hu D, Hansen E, Tsui K, Puttlitz C, Marcucio RS (2005): Cellular basis for agerelated changes in fracture repair. J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc <u>23</u>, 1300–1307

Määttä JA, Büki KG, Ivaska KK, Nieminen-Pihala V, Elo TD, Kähkönen T, Poutanen M, Härkönen P, Väänänen K (2013): Inactivation of the androgen receptor in bone-forming cells leads to trabecular bone loss in adult female mice. BoneKEy Rep <u>2</u>

Manolagas SC (2000): Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocr Rev <u>21</u>, 115–137

Maravelias C, Dona A, Stefanidou M, Spiliopoulou C (2005): Adverse effects of anabolic steroids in athletes. A constant threat. Toxicol Lett <u>158</u>, 167–175

Melton LJ (2000): Who has osteoporosis? A conflict between clinical and public health perspectives. J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res <u>15</u>, 2309–2314

Meyer RA, Tsahakis PJ, Martin DF, Banks DM, Harrow ME, Kiebzak GM (2001): Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc <u>19</u>, 428–435

Miller PD (2008): Safety of parathyroid hormone for the treatment of osteoporosis. Curr Osteoporos Rep <u>6</u>, 12–16

Mohler ML, Bohl CE, Jones A, Coss CC, Narayanan R, He Y, Hwang DJ, Dalton JT, Miller DD (2009): Nonsteroidal Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs): Dissociating the Anabolic and Androgenic Activities of the Androgen Receptor for Therapeutic Benefit. J Med Chem <u>52</u>, 3597–3617

Mundy GR (2002): Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. Nat Rev Cancer <u>2</u>, 584–593

Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Hao Lin J, Maastricht S, Swain M, Mason RS, Murrell GA, Diwan AD, Diamond T (2001): Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. Bone <u>28</u>, 80–86

Narayanan R, Mohler ML, Bohl CE, Miller DD, Dalton JT (2008): Selective androgen receptor modulators in preclinical and clinical development. Nucl Recept Signal <u>6</u>, e010

Narayanan R, Coss CC, Dalton JT (2018): Development of Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs). Mol Cell Endocrinol <u>465</u>, 134–142

Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, et al. (2001): Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. N Engl J Med <u>344</u>, 1434–1441

Nevitt MC, Ettinger B, Black DM, Stone K, Jamal SA, Ensrud K, Segal M, Genant HK, Cummings SR (1998): The association of radiographically detected vertebral fractures with back pain and function: a prospective study. Ann Intern Med <u>128</u>, 793–800

Niethard, Fritz Uwe, Joachim P, Biberthaler, Peter: Duale Reihe-Orthopädie und Unfallchirurgie. Georg Thieme Verlag KG 2014

Nozaka K, Miyakoshi N, Kasukawa Y, Maekawa S, Noguchi H, Shimada Y (2008): Intermittent administration of human parathyroid hormone enhances bone formation and union at the site of cancellous bone osteotomy in normal and ovariectomized rats. Bone <u>42</u>, 90–97

Nuti R, Brandi ML, Checchia G, Di Munno O, Dominguez L, Falaschi P, Fiore CE, Iolascon G, Maggi S, Michieli R, et al. (2019): Guidelines for the management of osteoporosis and fragility fractures. Intern Emerg Med <u>14</u>, 85–102

Office of the Surgeon General (US): Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General (Reports of the Surgeon General). Office of the Surgeon General (US), Rockville (MD) 2004

Orcel P (2005): Prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis in 2005. Jt Bone Spine Rev Rhum <u>72</u>, 461–465

Pfeilschifter J (2001): Hormonsubstitution und SERM in der Prophylaxe und Therapie der postmenopausalen Osteoporose. Orthop <u>30</u>, 462–472

Pfeilschifter J (2009): [Osteoporosis--current diagnostics and therapy]. Med Klin Munich Ger 1983 <u>104</u>, 632-641-643

Raaben M, Redzwan S, Augustine R, Blokhuis TJ (2018): COMplex Fracture Orthopedic Rehabilitation (COMFORT) - Real-time visual biofeedback on weight bearing versus standard training methods in the treatment of proximal femur fractures in the elderly: study protocol for a multicenter randomized controlled trial. Trials <u>19</u>

Rahn B (1976): The fluorochrome sequence labeling of the bone.

Rana K, Davey RA, Zajac JD (2014): Human androgen deficiency: insights gained from androgen receptor knockout mouse models. Asian J Androl <u>16</u>, 169–177

Reginster JY, Bruyere O, Audran M, Avouac B, Body JJ, Bouvenot G, Brandi ML, Gennari C, Kaufman JM, Lemmel EM, et al. (2000): Do estrogens effectively prevent osteoporosis-related fractures? The Group for the Respect of Ethics and Excellence in Science. Calcif Tissue Int <u>67</u>, 191–194

Riggs BL, Melton LJI (1986): Involutional Osteoporosis. N Engl J Med 314, 1676-1686

Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ (2006): Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res <u>12</u>, 6222s–6230s

Rosen J, Negro-Vilar A (2002): Novel, non-steroidal, selective androgen receptor modulators (SARMs) with anabolic activity in bone and muscle and improved safety profile. J Musculoskelet Neuronal Interact <u>2</u>, 222–224

Ross PD (1996): Osteoporosis: Frequency, Consequences, and Risk Factors. Arch Intern Med 156, 1399–1411

Ross PD, Davis JW, Epstein RS, Wasnich RD (1991): Pre-existing fractures and bone mass predict vertebral fracture incidence in women. Ann Intern Med <u>114</u>, 919–923

Ross S, Samuels E, Gairy K, Iqbal S, Badamgarav E, Siris E (2011): A meta-analysis of osteoporotic fracture risk with medication nonadherence. Value Health J Int Soc Pharmacoeconomics Outcomes Res <u>14</u>, 571–581

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SAA, Howard BV, Johnson KC, et al. (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA <u>288</u>, 321–333

Roux C, Priol G, Fechtenbaum J, Cortet B, Liu-Léage S, Audran M (2007): A clinical tool to determine the necessity of spine radiography in postmenopausal women with osteoporosis presenting with back pain. Ann Rheum Dis <u>66</u>, 81–85

Saag KG, Emkey R, Schnitzer TJ, Brown JP, Hawkins F, Goemaere S, Thamsborg G, Liberman UA, Delmas PD, Malice MP, et al. (1998): Alendronate for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis Intervention Study Group. N Engl J Med <u>339</u>, 292–299

Sambrook P, Cooper C (2006): Osteoporosis. The Lancet 367, 2010-2018

Saul D, Kling JH, Kosinsky RL, Hoffmann DB, Komrakova M, Wicke M, Menger B, Sehmisch S (2016): Effect of the Lipoxygenase Inhibitor Baicalein on Muscles in Ovariectomized Rats. J Nutr Metab <u>2016</u>, 1–14

Schapira D (1990): Alcohol abuse and osteoporosis. Semin Arthritis Rheum 19, 371-376

Schoene D, Wu SM-S, Mikolaizak AS, Menant JC, Smith ST, Delbaere K, Lord SR (2013): Discriminative ability and predictive validity of the timed up and go test in identifying older people who fall: systematic review and meta-analysis. J Am Geriatr Soc <u>61</u>, 202–208

Shelly W, Draper MW, Krishnan V, Wong M, Jaffe RB (2008): Selective estrogen receptor modulators: an update on recent clinical findings. Obstet Gynecol Surv <u>63</u>, 163–181

Sherrington C, Whitney JC, Lord SR, Herbert RD, Cumming RG, Close JCT (2008): Effective exercise for the prevention of falls: a systematic review and meta-analysis. J Am Geriatr Soc <u>56</u>, 2234–2243

Silbernagel S, Lang F: Taschenatlas Pathophysiologie. 3. Auflage; Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2009

Sinnesael M, Claessens F, Laurent M, Dubois V, Boonen S, Deboel L, Vanderschueren D (2012): Androgen receptor (AR) in osteocytes is important for the maintenance of male skeletal integrity: Evidence from targeted AR disruption in mouse osteocytes. J Bone Miner Res <u>27</u>, 2535–2543

Stuermer EK, Sehmisch 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 <u>395</u>, 163–172

Stürmer EK, Seidlová-Wuttke D, Sehmisch S, Rack T, Wille J, Frosch KH, Wuttke W, Stürmer KM (2006): 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 Off J Am Soc Bone Miner Res <u>21</u>, 89–96

Takeda H, Chodak G, Mutchnik S, Nakamoto T, Chang C (1990): Immunohistochemical localization of androgen receptors with mono- and polyclonal antibodies to androgen receptor. J Endocrinol <u>126</u>, 17–25

Tanaka S, Kuroda T, Saito M, Shiraki M (2013): Overweight/obesity and underweight are both risk factors for osteoporotic fractures at different sites in Japanese postmenopausal women. Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA <u>24</u>, 69–76

Tetsunaga T, Tetsunaga T, Nishida K, Tanaka M, Sugimoto Y, Takigawa T, Takei Y, Ozaki T (2017): Denosumab and alendronate treatment in patients with back pain due to fresh osteoporotic vertebral fractures. J Orthop Sci Off J Jpn Orthop Assoc <u>22</u>, 230–236

Tosteson ANA, Grove MR, Hammond CS, Moncur MM, Ray GT, Hebert GM, Pressman AR, Ettinger B (2003): Early discontinuation of treatment for osteoporosis. Am J Med <u>115</u>, 209–216

Trautmann LM (2014): Einfluss der vertikalen Ganzkörpervibration verschiedener Frequenzen auf die Frakturheilung der osteoporotischen Ratte.

Vahle JL, Sato M, Long GG, Young JK, Francis PC, Engelhardt JA, Westmore MS, Linda Y, Nold JB (2002): Skeletal changes in rats given daily subcutaneous injections of recombinant human parathyroid hormone (1-34) for 2 years and relevance to human safety. Toxicol Pathol <u>30</u>, 312–321

Valencia R, Stuermer EK, Dullin C, Herrmann KP, Kluever I, Zaroban A, Sehmisch S, Funke M, Knollmann F (2006): Erste Erfahrungen mit einem Flächendetektor-Volumen-CT (fpVCT) in der experimentellen Osteoporosediagnostik am Kleintiermodell. Radiol <u>46</u>, 893–900

van Amsterdam J, Opperhuizen A, Hartgens F (2010): Adverse health effects of anabolicandrogenic steroids. Regul Toxicol Pharmacol RTP <u>57</u>, 117–123

Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C (2004): Androgens and bone. Endocr Rev <u>25</u>, 389–425

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 <u>35</u>, 906–960

Villa P, Moruzzi MC, Lassandro AP, Leoni F, Di Nardo F, De Waure C, Scambia G, for Lazio-GISMO group (2013): Glucocorticoid therapy as a significant risk factor for osteoporosis and fractures in an Italian postmenopausal population. Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol <u>29</u>, 678–682

Wade GN (1972): Gonadal hormones and behavioral regulation of body weight. Physiol Behav <u>8</u>, 523–534

Wade GN, Gray JM, Bartness TJ (1985): Gonadal influences on adiposity. Int J Obes <u>9 Suppl 1</u>, 83–92

Weber M (2019): Der Einfluss von Baicalein auf die metaphysäre Frakturheilung im Osteoporosemodell der Ratte.

Weidemann A (2014): Der Einfluss von Strontiumranelat auf die Frakturheilung osteopener Ratten.

Weinstein RS (2012): Glucocorticoid-Induced Osteoporosis and Osteonecrosis. Endocrinol Metab Clin North Am <u>41</u>, 595–611

Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC (1997): The effects of androgen deficiency on murine bone remodeling and bone mineral density are mediated via cells of the osteoblastic lineage. Endocrinology <u>138</u>, 4013–4021

Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC (1998): Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. J Clin Invest <u>102</u>, 274–282

Wemyss-Holden SA, Hamdy FC, Hastie KJ (1994): Steroid abuse in athletes, prostatic enlargement and bladder outflow obstruction--is there a relationship? Br J Urol <u>74</u>, 476–478

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 <u>479</u>, 159–169

Zaheer S, LeBoff M, Lewiecki EM (2015): Denosumab for the treatment of osteoporosis. Expert Opin Drug Metab Toxicol <u>11</u>, 461–470

2019 ISCD Official Positions - Adult - International Society for Clinical Densitometry (ISCD); https://www.iscd.org/official-positions/2019-iscd-official-posotions-adult

# Danksagung

Ich möchte mich bei dem ehemaligen Leiter der Klinik, Herrn Prof. Dr. med. Klaus-Michael Stürmer, sowie bei dem aktuellen Leiter, Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Lehmann für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und plastische Chirurgie, zu schreiben, bedanken.

Ich bedanke mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Stephan Sehmisch für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit und die schnelle Korrektur.

Ein besonderer Dank gebührt Dr. rer. nat. Marina Komrakova für die stetige Unterstützung, den konstruktiven Austausch und die permanente Erreichbarkeit während der Entstehung dieser Arbeit.

Sehr bedanken möchte ich mich auch bei Ramona Castro-Machmuth und Annette Witt, für den immer freundlichen Empfang und die geduldige Einarbeitung in das Labor. Die so geschaffene Arbeitsatmosphäre motivierte sehr.

Des Weiteren bedanke ich mich bei PD Dr. sc. hum. Christian Dullin, für die Möglichkeit Daten mit dem MikroCT erheben und auswerten zu können.

Abschließend möchte ich mich noch bei meiner Schwester Frau Dr. Elisabeth Furtwängler und bei Herrn Dr. Maximilian Deutsch für die Hilfe und Unterstützung bei der Korrektur dieser Arbeit bedanken.