

Aus der Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Plastische Chirurgie

(Prof. Dr. med. W. Lehmann)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Die Wirkung des selektiven
Androgenrezeptor-Modulators Ligandrol
auf das Knochengewebe der Tibia am
osteoporotischen Rattenmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Max Stefan Müller-Reiter

aus

Würzburg

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in Prof. Dr. med. S. Sehmisch

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. rer. nat. H. Jarry

Prüfungskommission

Referent/in Prof. Dr. med. S. Sehmisch

Ko-Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. H. Jarry

Drittreferent/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: 13.04.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Die Wirkung des selektiven Androgenrezeptor-Modulators Ligandrol auf das Knochengewebe der Tibia am osteoporotischen Rattenmodell“ 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:

Müller-Reiter M, Komrakova M, Hoffmann DB, Lehmann W, Schilling AF, Sehmisch S (2017): Wirkung des selektiven Androgenrezeptor-Modulators (SARM) Ligandrol auf das Knochengewebe am osteoporotischen Rattenmodell. Vortrag im Rahmen des Deutschen Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2017), Berlin, 24.10.2017-27.10.2017

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Knochen	4
1.1.1 Aufbau des Knochens	4
1.1.2 Die Zellen des Knochens.....	6
1.1.3 Molekularbiologische Knochenmarker.....	11
1.2 Osteoporose.....	14
1.2.1 Einteilung und Pathogenese der Osteoporose	14
1.2.2 Klinik der Osteoporose.....	15
1.2.3 Diagnostik der Osteoporose.....	16
1.2.4 Aktuelle Therapie der Osteoporose	17
1.3 Selektive Androgenrezeptor-Modulatoren (SARMs)	22
1.3.1 Ligandrol – LGD 4033.....	24
2 Material und Methoden	26
2.1 Versuchsablauf.....	26
2.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung	27
2.3 Ligandrol – Wahl der Dosierung und Anwendung	28
2.4 Ovariectomie.....	29
2.5 Obduktion der Versuchstiere und Aufbereitung der Knochen.....	30
2.6 3D-Knochenanalyse.....	31
2.6.1 Schritt 1 – Durchführung der Scans.....	32
2.6.2 Schritt 2 – Bearbeitung des Kalibrierungsphantoms	32
2.6.3 Schritt 3 – Einstellung der Phantomwerte und Zuschnitt der Tibiametaphyse.....	32
2.6.4 Schritt 4 – Berechnung des Volumens und der Dichte.....	33
2.7 2D-Knochenanalyse.....	36
2.7.1 Schritt 1 – Erstellen zweidimensionaler Schnitte	36
2.7.2 Schritt 2 – Detektion kortikaler und trabekulärer Knochenanteile.....	36
2.8 Biomechanischer Bruchtest	38
2.8.1 Schritt 1 – Vorbereitung des Drei-Punkte-Bruchtests	38
2.8.2 Schritt 2 – Lagekorrektur und Durchführung der metaphysären Fraktur	39
2.8.3 Validierung.....	40
2.8.4 Messparameter und Interpretation des Kraft-Weg-Diagramms.....	41
2.9 Molekularbiologische Analyse.....	42
2.9.1 RNA-Isolation	42
2.9.2 Synthese von cDNA	44

2.9.3	Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR).....	45
2.10	Statistik.....	47
3	Ergebnisse.....	48
3.1	Tiergewichte.....	48
3.2	Futtermittelaufnahme und Liganddosis.....	49
3.3	Uterusgewicht.....	51
3.4	3D-Analyse.....	51
3.4.1	Kortikalisdichte (BMD).....	51
3.4.2	Kortikalisvolumen.....	51
3.4.3	Kortikalisfläche.....	52
3.4.4	Dichte Kortikalis + Trabekel (BMD).....	53
3.4.5	Volumen Kortikalis + Trabekel.....	53
3.4.6	Trabekeldichte (BMD).....	53
3.4.7	Trabekelvolumen.....	54
3.4.8	Gesamtdichte (BMD).....	54
3.4.9	Gesamtvolumen.....	54
3.4.10	BV/TV – <i>bone volume / tissue volume</i>	55
3.5	2D-Analyse.....	56
3.5.1	Kortikalisfläche.....	56
3.5.2	Kortikalisdicke.....	56
3.5.3	Trabekelfläche.....	57
3.5.4	Knochenflächendichte Trabekel.....	57
3.5.5	Anzahl der Trabekelkreuzungen.....	58
3.5.6	Dichte der Trabekelkreuzungen.....	58
3.5.7	Trabekeldicke.....	58
3.5.8	<i>Bone marrow area</i>	60
3.5.9	<i>Cross-sectional area</i>	60
3.6	Biomechanischer Bruchtest.....	61
3.6.1	Streckgrenze – <i>yield load</i>	61
3.6.2	Maximalkraft – F_{\max}	61
3.6.3	Elastizität – <i>stiffness</i>	62
3.7	Molekularbiologische Analyse.....	63
3.7.1	RANK-Ligand.....	63
3.7.2	Osteoprotegerin – OPG.....	63
3.7.3	<i>Tartrate-resistant acid phosphatase</i> – TRAP.....	64
3.7.4	Osteocalzin – OC.....	64
3.7.5	Estrogenrezeptor α – ER α	64
3.7.6	Androgenrezeptor – AR.....	64
3.7.7	Alkalische Phosphatase – AP.....	65
3.8	Gesamtübersicht der Ergebnisse.....	66

4	Diskussion	69
4.1	Diskussion der Versuchstiergewichte, der Futteraufnahme und der Liganddosis.....	69
4.2	Uterusgewicht und Gewebeselektivität.....	71
4.3	3D-Analyse.....	71
4.4	2D-Analyse.....	73
4.5	Biomechanischer Bruchtest.....	75
4.6	Molekularbiologische Untersuchung.....	77
4.7	Schlussfolgerung.....	79
5	Zusammenfassung	81
6	Anhang	83
7	Literaturverzeichnis	89

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von Ligandrol (LGD-4033)	24
Abbildung 2: Darstellung der Funktion zur BMD-Berechnung aus den Grauwerten	34
Abbildung 3: Initiale Darstellung	34
Abbildung 4: <i>Region of interest</i> (ROI) der Tibiametaphyse	34
Abbildung 5: Periostaler Rand der Kortikalis (A1)	34
Abbildung 6: Darstellung des Grauerthistogramms mit typischem <i>peak</i> durch Luft bei geringen Röntgenschwächungswerten	35
Abbildung 7: Darstellung des Grauerthistogramms mit herausgeschnittenem <i>peak</i> durch Luft und eingestellten kortikalen Grenzwerten	35
Abbildung 8: Darstellung der grün markierten Kortikalis bei eingestellten Grenzwerten	35
Abbildung 9: Darstellung der Schnittbilderstellung	37
Abbildung 10: Darstellung des Knochenschnitts nach Adjustierung der Helligkeit und des Kontrasts	37
Abbildung 11: Detektion des gesamten Knochens (Kortikalis + Trabekel)	37
Abbildung 12: Mit dem <i>graphic pad</i> umrandeter periostaler Rand der Kortikalis	37
Abbildung 13: Mit dem <i>graphic pad</i> umrandete Trabekelfläche bzw. endostaler Rand der Kortikalis	37
Abbildung 14: Darstellung des Probeknochens im Aluminiumblock	39
Abbildung 15: Darstellung der Tibia bei Kompression auf die Vorderkante nach exakter Lagekorrektur	39
Abbildung 16: Tibia nach Entfernung der Epiphyse	40
Abbildung 17: Durchschnittliche Tiergewichte im Verlauf des Versuchs	49
Abbildung 18: Durchschnittliche Futteraufnahme im Verlauf des Versuchs	50
Abbildung 19: Tägliche Ligandrolsdosis in mg/kg KG im Verlauf des Versuchs	50
Abbildung 20: Darstellung des Uterusgewichts bei Versuchsende	51
Abbildung 21: Darstellung der mittleren Kortikalisdichte (BMD)	52
Abbildung 22: Darstellung des mittleren Kortikalisvolumens	52
Abbildung 23: Darstellung der Kortikalisfläche	52
Abbildung 24: Darstellung der mittleren Dichte von Kortikalis + Trabekel (BMD)	53
Abbildung 25: Darstellung des mittleren Volumens von Kortikalis + Trabekel	53
Abbildung 26: Darstellung der mittleren Trabekeldichte (BMD)	54
Abbildung 27: Darstellung des mittleren Trabekelvolumens	54
Abbildung 28: Darstellung der mittleren Gesamtdichte (BMD)	55
Abbildung 29: Darstellung des Gesamtvolumens	55
Abbildung 30: Darstellung von BV/TV	55
Abbildung 31: Darstellung der mittleren Kortikalisfläche	56
Abbildung 32: Darstellung der mittleren Kortikalisdicke	56
Abbildung 33: Darstellung der mittleren Trabekelfläche	57
Abbildung 34: Darstellung der mittleren trabekulären Knochenflächendichte	57
Abbildung 35: Darstellung der Anzahl der Trabekelkreuzungen (absolut)	59
Abbildung 36: Darstellung der Dichte der Trabekelkreuzungen	59
Abbildung 37: Darstellung der Trabekeldicke	59
Abbildung 38: Darstellung der mittleren <i>bone marrow area</i>	60
Abbildung 39: Darstellung der mittleren <i>cross-sectional area</i>	60

Abbildung 40: Darstellung der Streckgrenze – <i>yield load</i>	61
Abbildung 41: Darstellung der Maximalkraft – F_{\max}	62
Abbildung 42: Darstellung der Elastizität – <i>stiffness</i>	62
Abbildung 43: Genexpression des RANK-Liganden.....	63
Abbildung 44: Genexpression von Osteoprotegerin.....	63
Abbildung 45: Genexpression der <i>tartrate-resistant acid phosphatase</i>	64
Abbildung 46: Genexpression von Osteocalzin.....	65
Abbildung 47: Genexpression des Estrogenrezeptors α	65
Abbildung 48: Genexpression des Androgenrezeptors.....	65
Abbildung 49: Genexpression der alkalischen Phosphatase.....	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Produktinformation Ligandrol (LGD-4033).....	24
Tabelle 2: Einteilung der Versuchsgruppen.....	27
Tabelle 3: Dosisauswahl anderer Studien am ovariectomierten Rattenmodell.....	29
Tabelle 4: Darstellung der Scanparameter.....	31
Tabelle 5: Darstellung der Grenzen und Grenzwerte der computertomographischen Auswertung.....	34
Tabelle 6: Darstellung der Parameter der 2D-Knochenanalyse.....	38
Tabelle 7: Genspezifischer Probenansatz für die qRT-PCR.....	46
Tabelle 8: Temperaturprogramm der qRT-PCR.....	46
Tabelle 9: Zusammenfassende Übersicht der 3D-Analyse.....	66
Tabelle 10: Zusammenfassende Übersicht der 2D-Analyse.....	67
Tabelle 11: Zusammenfassende Übersicht des Biomechanischen Bruchtests.....	67
Tabelle 12: Zusammenfassende Übersicht der Molekularbiologischen Analyse.....	68
Tabelle 13: Zusammenfassende Übersicht des Uterusgewichts.....	68
Tabelle A1: Zusammenfassung der mittleren Tiergewichte im Verlauf des Versuchs.....	83
Tabelle A2: Zusammenfassende Darstellung der durchschnittlichen Futteraufnahme.....	84
Tabelle A3: Zusammenfassung der täglichen Ligandrolldosis in mg/kg KG.....	85
Tabelle A4: Darstellung des Uterusgewichts.....	85
Tabelle A5: Zusammenfassung der Ergebnisse der 3D-Analyse.....	86
Tabelle A6: Zusammenfassung der Ergebnisse der 2D-Analyse.....	87
Tabelle A7: Zusammenfassung der Ergebnisse des biomechanischen Bruchtests.....	88
Tabelle A8: Zusammenfassung der Ergebnisse der molekularbiologischen Analyse.....	88

Abkürzungsverzeichnis

β_2 -MG	Beta-2-Microglobulin
AP	Alkalische Phosphatase
AR	Androgenrezeptor
BMD	<i>Bone mineral density</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BV/TV	<i>Bone volume / tissue volume</i> oder <i>bone volume density</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DHT	5 α -Dihydrotestosteron
DXA	<i>Dual-energy X-ray absorptiometry</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DVO	Dachverband Osteologie e.V.
E2	17 β -Estradiol
ER α	Östrogenrezeptor alpha
ESCEO	<i>European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
F _{max}	Maximalkraft
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HSC	<i>Haematopoietic stem cell</i>
IL	Interleukin
IOF	<i>International Osteoporosis Foundation</i>
LGD	Ligandrol
LH	Luteinisierendes Hormon
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MAR	<i>Mineral apposition rate</i>
MSC	<i>Mesenchymal stem cell</i>
OPG	Osteoprotegerin
OVX	Ovariectomie
PTH	Parathormon
qCT	Quantitative Computertomographie
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RANKL	<i>Receptor activator of NF-κB ligand</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
SARMs	Selektive Androgenrezeptor-Modulatoren
SERMs	Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren
TRAP	<i>Tartrate-resistant acid phosphatase</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

1 Einleitung

'*Bone is everybody's business*' (Bartl 2010 S. IX). Das belegen epidemiologische Zahlen über die systemische Skeletterkrankung Osteoporose sowohl in Deutschland als auch in Europa. Alarmierend ist die prognostizierte steigende Tendenz der Fallzahlen und der damit verbundenen Kosten (Hadji et al. 2013; Hernlund et al. 2013).

In der 2013 veröffentlichten *Bone Evaluation Study*, basierend auf der Auswertung von vorliegenden Krankenkassen-Routinedaten, wurde die Prävalenz der Osteoporose bei Frauen und Männern über 50 Jahre in Deutschland mit 14% angegeben. Besonders Frauen über 50 Jahre waren von Osteoporose betroffen (Prävalenz 24%). Bei hochgerechnet 5,2 Millionen betroffenen Frauen wurde konstatiert, dass jede vierte Frau über 50 Jahre in Deutschland an Osteoporose erkrankt war (Hadji et al. 2013). In der EU wird die Prävalenz der Osteoporose bei Frauen über 50 Jahre mit 22,1% angegeben, was einer geschätzten Anzahl von 22 Millionen Frauen entspricht (Hernlund et al. 2013).

Weltweit werden etwa 8,9 Millionen Frakturen durch eine Osteoporose verursacht, was ca. 1000 osteoporosebedingten Frakturen pro Stunde entspricht (Johnell und Kanis 2006). Daher wird die sozioökonomische Bedeutung der Osteoporose in Zukunft bei einer immer älter werdenden Gesellschaft stetig zunehmen. So schätzte in 2005 die *International Osteoporosis Foundation* (IOF) die direkten Kosten durch osteoporosebedingte Frakturen auf 32 Milliarden Euro pro Jahr (Kanis und Johnell 2005); Kosten, die voraussichtlich bis 2025 auf 38,5 Milliarden Euro ansteigen werden (Ström et al. 2011).

Aufgrund der Verschiebung der Alterspyramide mit immer mehr älteren Menschen und damit zunehmender Prävalenz der Osteoporose suchen viele Forschergruppen nach einer verbesserten Therapie dieser „Volkserkrankung“.

Bisher verfolgt die pharmakologische Therapie der Osteoporose zwei Ansätze: zum einen die Reduktion der Knochenresorption, zum anderen die Stimulation der Knochenformation. Alle bisher verfügbaren Medikamente zur Therapie der postmenopausalen Osteoporose sind – mit Ausnahme von Parathormon (PTH) und dessen Analogon Teriparatide – anti-resorptive Medikamente (Silva und Bilezikian 2011). Die osteoanabolen Parathormone sind jedoch nur subkutan applizierbar, in ihrer Therapiedauer beschränkt und mit Bisphosphonaten – dem aktuellen Goldstandard der Osteoporose-Therapie – nicht erfolgreich kombinierbar (Vajda et al. 2009a). Hier liegt der Ansatz der vorliegenden Dissertation. Oral verfügbare, osteoanabole selektive Androgenrezeptor-Modulatoren (kurz SARMs) könnten diese Lücke schließen.

Die Therapie mit Androgenen bei Frauen zeigte bei vielen Krankheitsbildern bereits vielversprechende Ergebnisse. So konnte belegt werden, dass Androgene als Monotherapie oder in Kombination mit Östrogenen positiv auf die Flush-Symptomatik nach chirurgischer Ovariectomie sowie auf die Libido und Osteoporose bei postmenopausalen Frauen wirken (Henneman und Wallach 1957; Sherwin und Gelfand 1984; Bolour und Braunstein 2005).

Bei postmenopausalen Frauen mit metastasiertem Mammakarzinom konnte durch die adjuvante Gabe eines Androgens das Ansprechen einer antiöstrogenen Hormontherapie verbessert und der Progress der Erkrankung verzögert werden (Ingle et al. 1991). Des Weiteren zeigten Androgene bei Frauen positive Auswirkungen im Fall von Muskelverlust, der durch chronische Erkrankungen wie HIV, COPD und terminales Nierenversagen bedingt wurde. Dem enormen therapeutischen Potenzial der Androgentherapie bei Frauen steht jedoch eine Reihe von Nebenwirkungen und ein Mangel an Studienergebnissen gegenüber, die den Einsatz von Androgenen bei Frauen weitestgehend verhindern (Negro-Vilar 1999; Jordan 2013).

Androgene haben wichtige Auswirkungen auf den Knochen sowohl bei Männern als auch bei Frauen (Abu et al. 1997). So konnte beispielsweise das anabole Steroid Nandrolone zu einem signifikanten Stopp von Knochenverlust und einem Anstieg der Knochendichte bei postmenopausalen Frauen mit Fraktur führen. Limitierend war auch hier ein erhöhtes Nebenwirkungsprofil mit Anstieg des kardiovaskulären Risikos, der Adipositas, Virilisierung und Lebertoxizität (Di Renzo et al. 1994; Johnston und Ward 2015). Ferner weisen Frauen mit Hirsutismus und folglich gesteigertem Androgenspiegel (z. B. beim polyzystischen Ovar-Syndrom) eine erhöhte Knochendichte auf (Dagogo-Jack et al. 1997). Ob diese Effekte auf den Knochen direkt durch die Aktivierung des Androgenrezeptors ausgelöst werden oder durch Aromatisierung zu Östrogenen bleibt unklar (Vanderschueren et al. 2004).

Jedoch gibt es Studien, die bei Frauen eine direkte Androgenwirkung auf den Knochen postulieren, da Androgenrezeptoren in osteoblastischen Zellen des weiblichen Knochens nachgewiesen werden konnten (Colvard et al. 1989; Abu et al. 1997). Auch in der Tibiametaphyse weiblicher Ratten, welche in dieser Arbeit untersucht wurde, konnte die Existenz des Androgenrezeptors bewiesen werden (van der Eerden et al. 2002). Nach dem Erfolg der selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs), stellt die selektive Stimulation des Androgenrezeptors im weiblichen Knochen einen weiteren interessanten Therapieansatz der Osteoporose dar.

Die Entdeckung der SARMs eröffnet nun die Möglichkeit eines anabolen Effekts auf Muskel und Knochen ohne androgene Nebenwirkungen (Virilisierung, Hepatotoxizität, Fettstoffwechselstörungen, uterine Hyperproliferationen) bei gleichzeitig einfacher oraler Applikation (Bhasin und Jasuja 2009; Narayanan et al. 2018). Die kombinierte osteo- und myoanabole Wirkung der SARMs machen diese Gruppe von Wirkstoffen zu einem vielversprechenden Kandidaten für die Therapie der postmenopausalen Osteoporose, da sie nicht nur die Knochenintegrität wiederherstellen, sondern auch die körperliche Konstitution des Patienten verbessern sollen (Bhasin und Jasuja 2009). Die zusätzlich myoanabole Wirkkomponente der SARMs ist bisher einzigartig in der Therapie der postmenopausalen Osteoporose und besonders vorteilhaft, da eine verbesserte körperliche Konstitution die Zahl der Frakturen mindern könnte, die bei osteoporotischen Patienten nach Stürzen auftreten (Gao und Dalton 2007; Jordan 2013).

Als Grundlage für die Untersuchung der Ligandrolwirkung in diesem Versuch diente das osteoporotische Rattenmodell. Die chirurgische Kastration weiblicher Ratten eignet sich zur Evaluation der Wirkung von Sexualhormonen bzw. Medikamenten auf den osteoporotischen Knochen, da die dadurch induzierten Knochenveränderungen – besonders am trabekulären Knochen – den Veränderungen des postmenopausalen, osteoporotischen Knochens ähneln (Kharode et al. 2008).

Somit ist das ovariectomierte Rattenmodell exzellent darin die wichtigen Merkmale des Östrogenmangels auf den Knochen sowie die Wirkung von Medikamenten auf Letzteren nachzuahmen (Jee und Yao 2001). Dies begründet die Akzeptanz der ovariectomierten Ratten als Tiermodell in der Osteoporoseforschung (Kalu 1991). Darüber hinaus hält die Richtlinie der *Food and Drug Administration* (FDA) das osteoporotische Tiermodell für grundlegend, um neue Wirkstoffe für die Therapie und Prävention der Osteoporose in präklinischen Studien zu untersuchen (Thompson et al. 1995).

Die in dieser Arbeit untersuchte proximale Tibiametaphyse zeichnet sich nach Östrogen-depletion durch einen besonders schnellen Verlust von Trabekelknochen aus und ist damit prädestiniert für die Erforschung einer möglichen osteoanabolen Wirkung von SARMS auf den osteoporotischen Knochen (Jee und Yao 2001).

Erste präklinische Studien konnten die osteoanabole Wirkung verschiedener SARMS am osteoporotischen Knochen weiblicher Ratten bereits belegen (Hanada et al. 2003; Kearbey et al. 2007; Vajda et al. 2009; Furuya et al. 2012; Hoffmann et al. 2018). Das in dieser Arbeit untersuchte SAMR Ligandrol (LGD-4033) wurde bereit in einer Phase-II-Studie an gesunden Männern getestet. Ziel dieser Studie war neben der Bewertung der Verträglichkeit und Pharmakodynamik, die Wirkung von LGD-4033 auf die fettfreie Körpermasse (*lean body mass*) zu untersuchen (Basaria et al. 2013). Wissenschaftlich publizierte Ergebnisse zur Wirkung von LGD-4033 auf den Knochenstoffwechsel bei ovariectomierten Ratten sind bisher nicht bekannt.

Ziel der Disserationsarbeit war die Beantwortung der Frage, ob LGD-4033 osteoanabol auf die osteoporotische Tibiametaphyse weiblicher Ratten wirkt und ob eine Dosisabhängigkeit in der Wirkung von Ligandrol nachzuweisen ist. Durch detaillierte Knochenanalysen galt es diese Fragestellungen zu beantworten.

1.1 Knochen

Der Knochen ist ein meisterliches Bauwerk. Durch funktionsangepasste Knochengometrie, belastungsabhängige Mischung aus kompaktem und spongiösem Knochen sowie lamellärer Strukturierung des Knochengewebes kann ein hohes Maß an Belastbarkeit bei möglichst niedrigem Gesamtgewicht erreicht werden. Das knöcherne Skelett besteht aus 210 Knochen und macht mit 10 kg etwa 15% des Körpergewichts aus. Zusammen mit dem Knorpelgewebe bildet der Knochen das Stützgewebe des Körpers und bietet für einen Teil der Organe Schutz vor äußeren Einflüssen. Des Weiteren bildet der Knochen zusammen mit Bändern und Gelenken den passiven Bewegungsapparat. Der Knochen bietet nicht nur die Hüllstruktur für das blutbildende Knochenmark, sondern steht durch zelluläre Interaktion in enger Verbindung mit der Hämatopoese. In weiterer Funktion dient der Knochen als Mineraldepot zur Regulation der Kalziumhomöostase. Neueste Erkenntnisse verweisen zusätzlich auf eine endokrine Funktion des Knochengewebes durch das von Osteoblasten produzierte Osteocalzin. Somit ist der Knochen ein gut durchblutetes und stoffwechselaktives Organ, das permanenten Umbauvorgängen (*remodelling*) unterworfen ist. Hierfür notwendig ist eine enge Kommunikation zwischen den Knochenzellen unter Kontrolle von lokalen und systemischen Faktoren (Bartl 2010; Drenckhahn 2008; Fukumoto und Martin 2009)

1.1.1 Aufbau des Knochens

Makroskopisch werden die langen, röhrenförmigen Knochen der Extremitäten (Röhrenknochen, *Ossa longa*) in Diaphyse, Epiphyse und Metaphyse gegliedert. Zwischen der mit hyalinem Gelenknorpel überzogenen Epiphyse und dem Knochenschaft (Diaphyse) liegt die trichterförmige Metaphyse. Im wachsenden Knochen befindet sich zwischen Epiphyse und Metaphyse die knorpelige Epiphysenfuge, Ort des Längenwachstums. Außerdem unterscheidet man Spongiosa und Kompakta. Epiphyse und Metaphyse bestehen hauptsächlich aus spongiösem Knochen, einem Gitternetzwerk aus Knochenbälkchen (Trabekeln), die sich je nach Druck- oder Zugbelastung organisieren (trajektorielle Ausrichtung). Die trabekulären Zwischenräume sind mit blutbildendem Knochenmark (rotes Knochenmark) oder Fettgewebe (gelbes Knochenmark) gefüllt. Die äußere Wand des Knochens wird durch eine homogene Rindenschicht (Kortikalis) gebildet (Drenckhahn 2008).

Die extrazelluläre Matrix des Knochengewebes besteht aus einer organischen und anorganischen Komponente. Der organische Bestandteil besteht zu 90% aus Kollagen Typ 1. Nicht-kollagene Proteine der organischen Knochenmatrix (10%) sind Osteocalzin, Osteonectin, Osteopontin, Fibronectin, Bone Sialoprotein, Thrombospondin sowie verschiedene Proteoglykane. Die anorganische Mineralsubstanz besteht hauptsächlich aus Hydroxyapatit-Kristallen ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$). In geringen Mengen befinden sich Kalzium-

carbonat (CaCO_3) und Kalziumhydrogenphosphat (CaHPO_4) sowie Anionen (u. a. Fluorid, Zitat) und Kationen (u. a. Magnesium, Eisen, Zink, Kupfer, Strontium, Blei) in der mineralisierten Knochenmatrix (Drenckhahn 2008; Florencio-Silva et al. 2015). Die Kollagenfibrillen bilden zusammen mit den organischen Matrixproteinen ein Gerüst, in das sich die anorganischen Kristalle aufgrund ihrer hohen Affinität zu Kollagenmolekülen einlagern können (Florencio-Silva et al. 2015). Die Verbundstruktur aus anorganischen Mineralkristallen und organischen Kollagenfibrillen wird oft mit der Zwei-Phasen-Komponente des Stahlbetons verglichen. Die Kombination aus druckfesten Mineralkristallen und zugelastischem Kollagen machen den Knochen biegefest (Bartl 2019; Lüllmann-Rauch und Asan 2015).

Nach der Anordnung der extrazellulären Matrix werden Geflecht- und Lamellenknochen unterschieden. Geflechtknochen bildet sich während der Knochenentwicklung sowie der Frakturheilung und ist charakterisiert durch die fehlende Organisation der Kollagenfasern. Durch konzentrische Anordnung der Kollagenfasern zu Knochenlamellen entsteht biomechanisch hochwertiger Lamellenknochen. Lediglich in der Anordnung der Knochenlamellen unterscheiden sich Kortikalis und Spongiosa. Die Knochenlamellen der Spongiosa sind flächig angeordnet und die Osteozyten werden durch Gefäße des Knochenmarks mittels Diffusion versorgt. Die Kompakta hingegen ist in kreisförmigen oder ovalen Osteonen (Havers-Systeme) organisiert. Osteone setzen sich aus konzentrisch angeordneten Lamellen zusammen, die sich wie ein Schraubengewinde um einen zentralen Kanal (Havers-Kanal) anordnen. In diesen Kanälen befinden sich Havers-Gefäße, die von Gefäßästen der *Vasa nutriticia* gespeist werden. Querverbindungen zwischen den longitudinal verlaufenden Havers-Kanälen werden als Volkmann-Kanäle bezeichnet. Die Nerven folgen den Blutgefäßen in die Havers- und Volkmann-Kanäle. Zwischen den Osteonen befinden sich Schaltlamellen. An der Grenze zu Endost und Periost umfassen parallel angeordnete Lamellen (innere und äußere Generallamelle) die gesamte Zirkumferenz des Knochens (Drenckhahn 2008; Lüllmann-Rauch und Asan 2015).

Innere Knochenoberflächen sowie der Havers-Kanal werden durch Endost ausgekleidet. Dieses besteht hauptsächlich aus Deckzellen (*bone-lining cells*) und einer dünnen Schicht aus nicht-mineralisierten Kollagenfibrillen. Äußere Knochenoberflächen werden von vaskularisiertem und innerviertem Periost bedeckt, welches sich aus einem inneren *Stratum osteogenicum* und einem äußeren *Stratum fibrosum* zusammensetzt. Das *Stratum osteogenicum* enthält chondrogene und osteogene Vorläuferzellen, die Umbau-, Reparaturmaßnahmen (Kallusbildung) sowie Dickenwachstum ermöglichen. Vom bindegewebigen *Stratum fibrosum* strahlen Kollagenfibrillen (*Fibrae perforantes*, Sharpey-Fasern) in die Kortikalis ein, welche die Knochenhaut fest mit der Kortikalis verbinden (Drenckhahn 2008; Lüllmann-Rauch und Asan 2015).

1.1.2 Die Zellen des Knochens

Zu den Zellen des Knochens gehören Osteoblasten, Osteozyten und endostale Saumzellen, die sich von mesenchymalen Stammzellen ableiten sowie Osteoklasten, die zum mononukleären Phagozytensystem (MPS) gehören und dementsprechend aus hämatopoetischen Stammzellen hervorgehen. Die Integrität des menschlichen Skeletts sowie die damit verbundene Knochenmasse ist abhängig von einem empfindlichen Gleichgewicht zwischen Knochenformation durch die Zellen der osteoblastären Zelllinie und der Knochenresorption durch Osteoklasten. Dieses Gleichgewicht sieht sich im Laufe des Lebens mechanischen, hormonellen und genetischen Veränderungen ausgesetzt. Um die Balance zwischen Auf- und Abbau gewährleisten zu können, ist eine Kommunikation der Zellen untereinander auf autokrinen und parakrinen Wegen sowie die Reaktionsfähigkeit auf systemische Hormone unerlässlich. Eine Disbalance zwischen osteoblastärer Knochenformation und Resorption durch Osteoklasten resultiert in skelettalen Anomalien, die durch zu geringe Knochenmasse (Osteoporose) oder durch gesteigerte Knochenmasse (Osteopetrosis) gekennzeichnet sind (Manolagas 2000; Drenckhahn 2008; Walsh 2015).

1.1.2.1 Osteoblastogenese und Osteoklastogenese

Genau wie die anderen Zellen des Bindegewebes (Chondrozyten, Adipozyten, Myo- und Fibroblasten) entstehen Osteoblasten aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen (MSC), die auf die Expression spezifischer Gene und Signalkaskaden angewiesen sind, um zu reifen Osteoblasten zu differenzieren. Besonders wichtig in den ersten Schritten der Osteoblastogenese sind die BMPs (*bone morphogenetic proteins*) und der Wnt-Signalweg, die die Entwicklung von MSCs zu Osteoprogenitorzellen vorantreiben. Die BMPs stimulieren die Expression eines Osteoblasten-spezifischen Transkriptionsfaktors (Runx2 alias Osf2 oder Cbfa1), der die Osteoprogenitorzellen zu Präosteoblasten überführt und wiederum deren Entwicklung zu aktiven Osteoblasten positiv beeinflusst, indem weitere Transkriptionsfaktoren (z. B. Col1A1, Alp, BSP) hochreguliert werden und die Expression von Genen aktiviert wird, die Kollagen Typ I, Osteopontin, Bone Sialoprotein und Osteocalzin exprimieren. (Manolagas 2000; Capulli et al. 2014). Die Bedeutung von Runx2 zeigen Versuche mit Runx-0-Mäusen, die eine fehlende Entwicklung von Osteoblasten aufweisen (Komori et al. 1997). Präosteoblasten und reife Osteoblasten sind charakterisiert durch eine hohe Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) und einer aktiven Sekretion von Matrixproteinen (Lüllmann-Rauch und Asan 2015).

Osteoklasten leiten sich von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) ab und folgen dabei einer ganzen Reihe von Differenzierungsschritten bis der reife, mehrkernige Osteoklast entsteht. Die HSC entwickelt sich zu einer gemeinsamen myeloischen Vorläuferzelle, aus der entweder Vorläuferzellen für Erythrozyten bzw. Megakaryozyten oder Vorläuferzellen für Granulozyten bzw. Makrophagen entstehen. Aus Letzterer

entwickeln sich die Osteoklasten. Diese Vorläuferzellen werden als *granulocyte-macrophage colony forming unit* bezeichnet (CFU-GM). Zu diesem frühen Differenzierungsschritt tragen Transkriptionsfaktoren (u. a. PU.1, MITF, c-FOS) und Zytokine (z. B. M-CSF) bei, die die Proliferation der Vorläuferzellen stimulieren und deren Apoptose verhindern. PU.1 reguliert die Transkription des RANK-Gens in den Vorläuferzellen und schafft dadurch die Voraussetzung für die spätere Interaktion mit dem RANK-Liganden, einem essentiellen Schritt der Osteoklastendifferenzierung. Das Zytokin M-CSF, was u. a. von Osteoblasten und Zellen des Knochenmarkstromas produziert wird, stimuliert die Proliferation und das Überleben der Vorläuferzellen durch die Bindung und Aktivierung des c-FMS-Rezeptors. Ein weiterer Differenzierungsschritt wird durch die RANKL/RANK-Interaktion eingeleitet. Durch die Bindung des RANK-Liganden an den RANK-Rezeptor der Vorläuferzellen werden Adaptermoleküle wie TRAF-6 aktiviert, die wiederum in der Lage sind MAPK-Signalwege zu aktivieren. Diese MAPK-Signalwege führen alle zur Translokation von differenzierungsfördernden Transkriptionsfaktoren (u. a. c-fos, c-Jun, und NFATc) in den Zellkern. Des Weiteren wird durch die RANKL-Bindung die Apoptose der Zellen verhindert (Soysa et al. 2012). Die so entstandenen mononukleären Zellen exprimieren schon für Osteoklasten typische Moleküle wie den Vitronectinrezeptor ($\alpha_v\beta_3$), TRAP, den Kalzitoninrezeptor und Metalloproteinasen und zeigen knochenresorbierende Aktivität (Miyamoto und Suda 2003).

Die Fusion mehrerer Osteoklasten zu vielkernigen Zellen ist ein weiterer essentieller Schritt zur Formation von effizient resorbierenden Osteoklasten. Auch hier initiiert die Rezeptorbindung von RANKL die Genexpression von Chemokinen (z. B. MCP-1, RANTES), deren chemotaktische Signale die Fusion von Osteoklasten bedingen. Des Weiteren induziert RANKL via NFATc1 die Expression von fusionsfördernden Molekülen wie Atp6v02 und DC-STAMP. Der letzte Schritt im Differenzierungsprozess der Osteoklasten beinhaltet die Aktivierung der nun mehrkernigen Zelle durch Polarisierung der Zellmembran. Es entsteht eine Faltensaummembran (*ruffled border*), die der Matrix zugewandt ist und eine ringförmige Haftzone enthält, die die Erosionslakune von dem Extrazellularraum trennt (Yavropoulou und Yovos 2008).

1.1.2.2 Funktionen der Zellen

Eine wichtige Funktion der Osteoblasten ist die Synthese und das Sezernieren der organischen Bestandteile der Knochenmatrix sowie deren Mineralisierung. Sie dienen damit der Knochenneubildung. Die organischen Bestandteile bestehen aus kollagenen Proteinen (hauptsächlich Kollagen Typ 1), nicht-kollagenen Proteinen wie Osteocalzin, Osteonectin, Osteopontin und Proteoglykanen wie Decorin und Biglycan. Die in den Knochenneubildungszonen gebildete unverkalkte Matrix wird als Osteoid bezeichnet (Gratzl 2004; Drenckhahn 2008). An den Osteoidgrenzen reihen sich die Osteoblasten palisadenförmig auf und sind durch Adhärenskontakte (Cadherin 11, N-Cadherin), Nexus

(Connexin 43) und Occludenskontakte (*Maculae occludentes*) miteinander verbunden (Drenckhahn 2008). Im weiteren Verlauf wird die neu produzierte Matrix verkalkt, indem Hydroxyapatit-Kristalle aus Kalzium und anorganischem Phosphat zwischen die Kollagenfibrillen gelagert werden. Die Mineralisierung erhöht die Dichte des Knochens, verändert jedoch nicht das Volumen. Das Volumen wird durch die Menge an gebildeter Knochenmatrix determiniert. Eine wichtige Rolle in der Knochenmineralisierung spielen Matrixvesikel, die sich von der Membran der Osteoblasten lösen. In den Matrixvesikeln werden die Hydroxyapatit-Kristalle geformt. Für die Akkumulation von Kalzium in den Vesikeln sorgen Kalzium-bindende Phospholipide (Phosphatidylserin), Proteine (Calbindin_{9k}), das Bone Sialoprotein sowie ein Kalziumkanal (Annexin). Das anorganische Phosphat wird durch einen Natrium/Phosphat-Transporter in den Matrixvesikeln akkumuliert. Wird durch die Akkumulation von Kalzium und anorganischem Phosphat der Löslichkeitspunkt für CaPO₄ überschritten, fallen Hydroxyapatit-Kristalle innerhalb der Vesikel aus. Diese Hydroxyapatit-Kristalle verlassen die Matrixvesikel und lagern sich zwischen die Kollagenfibrillen ein. Entscheidend im Verlauf der Mineralisierung ist die Funktion der alkalischen Phosphatase. Sie hydrolisiert anorganisches Pyrophosphat, welches die Bildung von Hydroxyapatit inhibiert, zu anorganischen Phosphat. Das Verhältnis von inhibierendem Pyrophosphat und Phosphat wird als wesentlicher Faktor in der Knochenmineralisierung angesehen. Das bestätigt das Krankheitsbild der Hypophosphatasie, bei der sich durch eine defekte alkalische Phosphatase eine verminderte Knochenmineralisierung zeigt (Manolagas 2000; Orimo 2010).

Eine weitere wichtige Funktion der Osteoblasten ist die Regulation der Osteoklastogenese. Um das Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und Resorption zu gewährleisten, bedarf es nicht nur systemischer Faktoren, sondern vor allem der Interaktion zwischen Osteoblasten und knochenresorbierenden Osteoklasten auf parakrinem Weg. So gewährleisten Osteoblasten durch das Sezernieren des Monozytenkolonien-stimulierenden Faktors (M-CSF), der an den cFms-Rezeptor der Osteoklasten bindet, deren Differenzierung und Proliferation (Capulli et al. 2014). Des Weiteren synthetisieren die Osteoblasten neben Osteozyten und Zellen des Immunsystems den *receptor activator of NF-κB ligand* (RANKL), der an den RANK-Rezeptor von Vorläuferzellen der Osteoklasten bindet und die Fusion bzw. die Differenzierung von Präosteoklasten zu reifen Osteoklasten vorantreibt. Inhibierend auf die Osteoklastendifferenzierung wirkt das von Osteoblasten produzierte Osteoprotegerin (OPG), das ebenfalls den RANK-Liganden binden kann und so den RANKL/RANK-Signalweg unterbindet. So unterliegt die korrekte Osteoklastogenese dem Verhältnis zwischen RANKL und OPG. Beides Faktoren, die von Osteoblasten gebildet werden. Weitere parakrine Faktoren, die von Osteoblasten gebildet werden und positiv auf die Osteoklastogenese wirken sind das *parathyroid hormone-related protein* (PTHrP), IL-1β, IL-6 und der Tumornekrosefaktor α (Manolagas 2000; Capulli et al. 2014).

Wie Studien von Karsenty und Ferron (2012) zeigen, können Osteoblasten endokrin tätig sein und andere Organsysteme beeinflussen. Hier spielt vor allem Osteocalzin eine wichtige Rolle, das in seiner nicht-decarboxylierten Form endokrin auf das Pankreas, Fettgewebe und den Hoden wirken kann. In seiner nicht-decarboxylierten Form verliert Osteoklazin seine hohe Affinität zu Hydroxyapatit und kann gelöst vom Knochen endokrin wirken. (Capulli et al. 2014).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Untergruppe der Osteoblasten (*spindle-shaped* N-cadherin+/CD45 Osteoblasten – SNO) Einfluss auf die Regulation der hämatopoetischen Stammzellen hat. Sie haben die Funktion, die *long-term HSCs* in einem stillgelegten Status zu behalten. Man spricht hier von der sog. Osteoblasten-Nische (Calvi et al. 2003).

Osteozyten sind mehr als nur stillgelegte Osteoblasten, die in die verkalkte Knochenmatrix eingebaut werden. Über ihre Zellfortsätze, die sich in den Knochenkanälchen befinden, sind sie in Kontakt mit anderen Osteozyten, endostalen Saumzellen und osteozytären Osteoblasten, um die metabolische Aktivität des Knochens und die Weiterleitung von Signalen zu koordinieren. Verbunden sind die Zellfortsätze durch Nexus (Connexin 43). Ernährt werden die eingemauerten Zellen durch Diffusion aus dem flüssigkeitsgefüllten Spaltraum zwischen den osteozytären Fortsätzen und der Kanalikuluswand (Drenckhahn 2008). So geht von den Osteozyten ein funktionelles Synzytium aus, das sich über die Osteoblasten und Zellen des Knochenmarks bis hin zu den endothelialen Zellen der Gefäße ausbreitet (Manolagas 2000). Eine wichtige Funktion, die den Osteozyten zugesprochen wird, ist das Umwandeln von mechanischen Stimuli in biochemische Signale. So kann die Differenzierung und Funktion von Osteoblasten und Osteoklasten beeinflusst und der Knochenaufbau und die Resorption auf mechanische Signale anpassen werden (Capulli et al. 2014). Des Weiteren wird angenommen, dass Osteozyten durch die Sekretion von Sclerostin den Knochenaufbau inhibieren können. Sclerostin hemmt die Funktion und Differenzierung von Osteoblasten, indem es um die Bindung von BMPs an deren Rezeptoren konkurriert und so deren positive Wirkung auf Osteoblasten supprimiert (Winkler et al. 2003). Auch auf die Differenzierung von Osteoklasten können Osteozyten regulatorisch eingreifen. So stimuliert die Apoptose von Osteozyten, wie sie in der postmenopausalen Phase oder bei Mikrofrakturen des Knochens vorkommt, die Formation von Osteoklasten (Komori 2013). Sich in Apoptose befindende Osteozyten exprimieren den RANK-Liganden in erhöhtem Maße, was ebenfalls zu einer gesteigerten Osteoklastendifferenzierung beiträgt (Kogianni et al. 2008; Al-Dujaili et al. 2011). Dadurch dass Osteozyten den Großteil aller Knochenzellen ausmachen, wurden schon früh erste Hypothesen zur periostozytären Osteolyse aufgestellt, die den Osteozyten eine wichtige Rolle im Mineralhomöostase einräumt (Baud 1962). Neuere Studien konnten zeigen, dass Osteozyten mineralisierten Knochen mit ähnlichen Mechanismen wie Osteoklasten resorbieren können (Qing et al. 2012) und dabei eine positiv

Aktivität der *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP) zeigen. Einem Knochenmarker, der eigentlich den Osteoklasten zugeschrieben wird (Bianco et al. 1988).

Die flachen endostalen Saumzellen (*lining cells*) liegen einer dünnen Schicht (ca. 1-2 μm) von nicht-mineralisierter Matrix auf und bilden so einen kontinuierlichen Zellverband auf den Trabekeln und der inneren Oberfläche der Kortikalis, den sog. Matrixsaum. Da Osteoklasten in ihrer Funktion als knochenresorbierende Zellen nicht an den Matrixsaum binden können, wird den endostalen Saumzellen eine Funktion in der Knochenresorption zugesprochen. Durch das Sezernieren von Kollagenasen können sie den Matrixsaum auflösen und Osteoklasten den Zugang zur mineralisierten Matrix ermöglichen (Drenckhahn 2008). Endostale Saumzellen stammen von Osteoblasten ab, die ihre knochenaufbauende Funktion eingestellt haben. Des Weiteren könnten die endostalen Saumzellen durch die Verbindung mit Osteozyten in der Lage sein, *homing*-Signale für Osteoklasten zu senden und damit die Knochenresorption zu initiieren (Manolagas 2000).

Die wichtigste Aufgabe der Osteoklasten ist die Demineralisierung und Resorption der verkalkten Knochenmatrix. Damit haben sie eine entscheidende Funktion in der Kalziumfreisetzung und den Umbauprozessen am Knochen. Im spongiösen Knochen befinden sich die Osteoklasten im Bereich der Erosionslakunen (auch Howship-Lakunen). Im kompakten Knochen befinden sich die resorbierenden Zellen in der kegelförmigen Spitze der Erosionstunnel (Drenckhahn 2008). Die Osteoklasten sind reich an Lysosomen sowie Mitochondrien und besitzen neben dem endoplasmatischen Retikulum einen gut entwickelten Golgi-Apparat (Gratzl 2004). Aktive, resorbierende Osteoklasten sind im Gegensatz zu ruhenden Zellen polarisiert. Man unterscheidet eine lakunäre Membran von der basolateralen Membranoberfläche. Gekennzeichnet ist die lakunäre Membran durch zahlreiche Microplacae, die den Faltensaum (*ruffled border*) bilden. Zwischen der glatten, basolateralen Membran und dem Faltensaum sind die Osteoklasten über eine Haftzone mit der Knochenmatrix verbunden. Man spricht hier von einem fokalen Zellsubstratkontakt vom Typ der Podosomen. Ausgebildet wird er von Integrinadhäsionsmolekülen ($\alpha_v\beta_3$), die an Bestandteile der Knochenmatrix (Osteopontin, Bone Sialoprotein) und über Adaptor- und Signalmoleküle (Talin, α -Actinin, Vinculin) am Aktinfilamentgerüst der Haftzone binden. Letztere ist arm an Organellen und wird daher auch als *clear zone* bezeichnet. Wichtig für die Demineralisierung ist ein niedriger pH-Wert in der Erosionslakune, der durch H^+ -ATPasen und Chloridkanäle in der Faltensaummembran erreicht wird. Durch Exozytose gelangen lysosomale Enzyme (u. a. TRAP und Kathepsin K) in die Erosionslakune. Lysosomale Proteasen sowie Metalloproteasen bauen Kollagen und Proteoglykane der demineralisierten Matrix ab (Drenckhahn 2008).

1.1.3 Molekularbiologische Knochenmarker

Spezifische molekularbiologische Knochenmarker geben Aufschluss über die Umbauvorgänge am Knochen. Dabei können die Faktoren entweder dem Knochenaufbau oder der Knochenresorption zugeordnet werden (Kini und Nandeesh 2012).

1.1.3.1 TRAP

Tartrate-resistant acid phosphatase ist ein lysosomales Enzym, welches von Osteoklasten durch Exozytose in die Erosionslakune freigesetzt wird und zur Familie der sauren Phosphatasen gehört. Das Isoenzym Typ 5 wurde in Osteoklasten gefunden (Drenckhahn 2008; Kini und Nandeesh 2012). TRAP wird daher genutzt, um Osteoklasten zu detektieren und gilt als Marker der Knochenresorption (Manolagas 2000).

1.1.3.2 Osteocalzin

Osteocalzin gilt als Marker der Knochenneubildung und wird von Osteoblasten produziert (Bartl 2010). Osteocalzin ist der häufigste Bestandteil der organischen, nicht-kollagenen Knochenmatrix (Florencio-Silva et al. 2015). Die Synthese ist abhängig von aktivem Vitamin D (1,25-Dihydroxycholecalciferol) und die Funktion ist abhängig von der Vitamin K-abhängigen Carboxylierung (Kini und Nandeesh 2012). So hat die carboxylierte Form von Osteocalzin eine hohe Affinität zu den Hydroxylapatit-Kristallen der Knochenmatrix, wohingegen die nicht-decarboxylierte Form diese Affinität verliert und endokrin auf verschiedene Gewebe wirken kann (Florencio-Silva et al. 2015).

1.1.3.3 RANKL

Receptor activator of NF- κ B ligand gehört zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) und ist durch die Bindung an den RANK-Rezeptor von Vorläuferzellen der Osteoklasten an deren Differenzierung zu reifen Zellen maßgeblich beteiligt. RANKL wird im Knochen primär von Osteoblasten gebildet und fördert die Fusion von Osteoklasten zu mehrkernigen Zellen, die Freisetzung von osteoklastischen Vorläuferzellen in die Zirkulation und die Mobilisation von hämatopoetischen Stammzellen aus Knochenmarksnischen. Durch letztere Funktion wird durch die RANKL/RANK-Interaktion eine Brücke zwischen Knochenremodelling und Hämatopoese geschlagen (Boyce und Xing 2008). Neben Osteoblasten sind Zellen des Knochenmarkstromas und Zellen des Immunsystems (z. B. aktivierte T-Zellen) in der Lage RANKL zu produzieren. Gefördert wird die Expression des Liganden u. a. durch 1,25-Dihydroxycholecalciferol, PTH, PTHrP, gp130, IL-1, IL-6 und IL-11. RANKL dient als Marker für Knochenresorption (Manolagas 2000).

1.1.3.4 OPG

Das Glykoprotein Osteoprotegerin gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren und besitzt die Fähigkeit den RANK-Liganden zu binden. Damit unterbindet OPG die RANK/RANKL-Interaktion und wirkt inhibierend auf die Rekrutierung, Proliferation und Aktivierung der Osteoklasten (Simonet et al. 1997; Manolagas 2000). Im Knochen wird OPG von Osteoblasten synthetisiert und wirkt protektiv auf die Knochenmasse (Boyce und Xing 2008). OPG induziert die Apoptose von Osteoklasten und wirkt damit antiresorptiv (Li et al. 2015). Unregelmäßigkeiten im Verhältnis zwischen OPG und RANKL führen zu pathologischen Knochenveränderungen. So zeigen Patienten mit partieller Deletion im OPG-Gen einen erhöhten Knochenumbau, Osteopenie und ein erhöhtes Frakturrisiko (Whyte et al. 2002). Die knochenprotektive Wirkung von Östrogenen wird u. a. durch eine Stimulation der OPG-Expression ausgeübt. Dadurch erhöht sich das Verhältnis zwischen OPG/RANKL, was zu einer Suppression der Osteoklasten führt (Blair et al. 2007).

1.1.3.5 Alkalische Phosphatase

Das Enzym alkalische Phosphatase hydrolysiert Phosphor-säureester in alkalischer Umgebung (pH 8-10) und ist mittels GPI-Anker an der Membran von Osteoblasten fixiert. Der AP wird eine wichtige Rolle in der Knochenmineralisierung zugeschrieben, indem das Enzym Pyrophosphat hydrolysiert und damit einen Inhibitor der Hydroxyapatitformation ausschaltet (Harris 1990; Orimo 2010).

1.1.3.6 Estrogenrezeptor α

Östrogene sind sowohl bei Männern als auch bei Frauen in fast allen Geweben an physiologischen Mechanismen beteiligt und sind im Knochen verantwortlich für den Erhalt der Knochendichte. Verminderte Östrogenwirkung im Knochen bildet die Grundlage für die postmenopausale Osteoporose, die mit verminderter Knochendichte und erhöhtem Frakturrisiko einhergeht (Khalid und Krum 2016). Immunhistochemisch ist der Estrogenrezeptor α in Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten nachgewiesen worden (Bord et al. 2001). Estrogenrezeptoren gehören zu der Familie der DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren (Nakamura et al. 2007). Die Aktivierung des Estrogenrezeptors α stimuliert die Expression des Fas-Liganden in Osteoblasten, was wiederum durch parakrine Signale die Apoptose der Osteoklasten induziert (Parikka et al. 2005). Des Weiteren wird die Transkription der Matrix-Metalloprotease 3 (MMP-3) hochreguliert, welche den Fas-Liganden spaltet und damit in eine lösliche Form überführt. Der lösliche Fas-Ligand ist ebenfalls notwendig für die Apoptose der Osteoklasten (Garcia et al. 2013).

1.1.3.7 Androgenrezeptor

Der Androgenrezeptor (AR) gehört zur Familie der Kernrezeptoren. Wie bei den anderen Sexualhormonrezeptoren (z. B. ER α und β), handelt es sich beim AR um ein DNA-bindendes Protein, das nach Kontakt mit seinem Liganden seine Konformation ändert und so aus dem Zytosol in den Zellkern gelangt. Dort wird die Expression AR-regulierter Zielgene aktiviert (Vanderschueren et al. 2004). Anders als beim ER, bei dem es zwei Isoformen gibt (ER α und β) hat man beim Menschen nur ein AR-Gen identifiziert. Zu den endogenen Androgenen, die den AR aktivieren, gehören Testosteron und DHT (Gao und Dalton 2007). Colvard et al. (1989) konnten den AR erstmals in menschlichen Osteoblasten nachweisen. Durch die hohe Expression des AR in Osteoblasten am Ort des Knochenremodellings wird diesem Rezeptor eine wichtige Rolle in der Osteoblastenfunktion zugeschrieben (Abu et al. 1997). Durch Aktivierung des Androgenrezeptors werden Osteoblasten zur Proliferation und zur Produktion von alkalischer Phosphatase angeregt (van der Eerden et al. 2002).

In Osteoklasten konnte die Expression des AR lediglich in Tiermodellen gezeigt werden. In menschlichen Osteoklasten (*in vivo*) konnte die Existenz nicht zweifelsfrei bewiesen werden (Steffens et al. 2015). Synthetische Androgene zeigen abhängig vom Gewebe und dessen zellulärer Zusammensetzung ein breites Wirkungsspektrum von vollständigem Agonismus bis hin zu komplettem Antagonismus am Androgenrezeptor (Schmidt et al. 2010).

1.2 Osteoporose

Der Dachverband Osteologie e.V. (DVO) hat in der DVO-Leitlinie für Osteoporose von 2017 das Krankheitsbild folgendermaßen definiert:

„Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine mikroarchitektonische Verschlechterung des Knochengewebes charakterisiert ist, mit einem konsekutiven Anstieg der Knochenfragilität und der Neigung zu Frakturen. Sind bereits Frakturen als Folge der Osteoporose aufgetreten, liegt eine manifeste Osteoporose vor.“(DVO 2017, S. 3)

Eine weitere Definition der *World Health Organisation* (WHO), die 1994 in Genf erarbeitet wurde, bezieht sich auf den Parameter der Knochendichte (BMD). Sie besagt, dass eine Osteoporose dann vorliegt, wenn die Knochendichte (BMD) 2,5 oder mehr Standardabweichungen vom Mittelwert einer 20-29-jährigen Frau abweicht. Die Standardabweichung vom Mittelwert der maximalen Knochendichte (*peak bone mass*) einer 20-29-jährigen Frau wird als T-Score bezeichnet. Bei einem T-Score von -1 spricht man von einer Osteopenie. Die Knochendichte steht im Zentrum der Diagnosestellung und konnte in einer Reihe von prospektiven Studien als wichtigster Parameter im Zusammenhang mit Frakturen – eine klinische Folge der Osteoporose – ermittelt werden (Kanis 2002; Bartl 2010; Herold 2015).

1.2.1 Einteilung und Pathogenese der Osteoporose

Anhand der Ursachen, die zu einer Osteoporose führen, lässt sich die systemische Skeletterkrankung in eine primäre und eine sekundäre Form einteilen. Zu der primären Osteoporose gehört die idiopathische Osteoporose junger Menschen, die postmenopausale Osteoporose (auch Typ-I Osteoporose) sowie die senile Osteoporose (auch Typ-II Osteoporose) (Herold 2015). Die primäre Osteoporose macht in etwa 95%, die sekundäre Form der Osteoporose etwa 5% der Fälle aus. Jedoch sind 20% der osteoporosebedingten Frakturen auf sekundäre Ursachen zurückzuführen (Bartl 2010). Die sekundäre Osteoporose wird induziert durch endokrine Ursachen (z. B. Hypogonadismus, Hyperthyreose, Hyperparathyreoidismus, Hyperkortisolismus, Diabetes mellitus), durch hämatologische bzw. onkologische Erkrankungen (z. B. Multiples Myelom, Polyzythämia vera, chronisch myeloische Leukämie, Knochenmetastasen), durch Erkrankungen der Leber, der Nieren und des Gastrointestinaltrakts (z. B. Malabsorptionssyndrom, Morbus Crohn, primär biliäre Zirrhose, chronische Niereninsuffizienz), durch Medikamente (Langzeittherapie mit Glukokortikoiden, Protonenpumpeninhibitoren, Aromatasehemmern, Antiepileptika) und durch Immobilisation. Zu den hereditären Erkrankungen, die mit einer Osteoporose assoziiert sind, gehören die Osteogenesis imperfecta, das Ehlers-Danlos-Syndrom, das Marfan-Syndrom und die Homozysteinurie. Eine weitere Einteilung bezieht sich auf den metabolischen Knochenumsatz. Hier wird die *high turnover*-Osteoporose (Verlust von

Knochenmasse durch gesteigerten Umbau) von einer *low-turnover*-Osteoporose unterschieden (Verlust von Knochenmasse durch reduzierten Umbau) (Bartl 2010; Herold 2015).

Einer Osteoporose können folgende pathogenetische Mechanismen zu Grunde liegen: ein Nichterreichen der optimalen Knochenmasse während der Wachstumsphase sowie eine Disbalance zwischen Knochenformation und Knochenresorption (Raisz 2005; Sandhu und Hampson 2011). Entscheidende Faktoren sind dabei die Rekrutierung knochenaufbauender und resorbierender Zellen (Osteoblasto-, Osteoklastogenese) und die Zeit, die ihnen zur Verfügung steht, bevor sie in Apoptose gehen. Diese beiden Faktoren werden maßgeblich von Sexualhormonen beeinflusst, weshalb Letztere eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Osteoporose spielen. Eine verminderte Östrogensynthese steigert sowohl die Osteoblastogenese als auch die Osteoklastogenese, da die Hemmung von Östrogen auf differenzierungsfördernde Zytokine vermindert wird. Des Weiteren verkürzt der Mangel an Östrogenen die Lebenszeit von Osteoblasten und verlängert die der Osteoklasten. Ein Östrogenmangel stimuliert also die Rekrutierung beider Zelllinien, jedoch führt die verlängerte Lebenszeit der Osteoklasten verglichen mit der Lebenszeit der Osteoblasten zu einem Ungleichgewicht zwischen Knochenabbau und Knochenaufbau. Die verlängerte Lebenszeit von Osteoklasten erklärt auch die tieferen Resorptionslakunen und die Perforationen des trabekulären Netzwerks, die mit einer postmenopausalen Osteoporose assoziiert sind. Weitere wichtige Faktoren in der Pathogenese der Osteoporose sind das Alter und Glukokortikoide. Mit zunehmendem Alter ist sowohl die Osteoblastogenese als auch die Osteoklastogenese verlangsamt. Im Verlauf fällt die Knochenformation hinter die Knochenresorption zurück. Als Ursache für die so entstehende Disbalance zwischen Knochenauf- und abbau wird eine gesteigerte Adipogenese angesehen. Vorläuferzellen des Knochenmarks differenzieren sich im Alter eher in Adipozyten als in Osteoblasten. Ein Überschuss an Glukokortikoiden geht einher mit einer verminderten Knochenformation und einer im Vergleich dazu gesteigerten Knochenresorption (Manolagas 2000; Raisz 2005).

1.2.2 Klinik der Osteoporose

Die Osteoporose ist ein „stillter Dieb“ und bleibt lange Zeit symptomlos. Erst nach Osteoporose-assoziierten Frakturen treten die eigentlichen Symptome auf. Dazu gehört die Verschlechterung der Lebensqualität, die mit akuten und chronischen Schmerzen, Immobilität sowie Kyphosierung der Brustwirbelsäule einhergeht. Darüber hinaus zählen die Minderung der Körpergröße durch Sinterungsfrakturen der Wirbel und die soziale Vereinsamung dazu. Die Höhenminderung der Wirbel kann zum schmerzhaften Basstrap-Syndrom führen, bei dem es zu Berührungen der Dornfortsätze kommt (Bartl 2010).

Eine verminderte Lebensqualität konnte für Osteoporose-assoziierten Wirbelfrakturen bewiesen werden (Cockerill et al. 2004; Borgström et al. 2006). Auch Osteoporose-assoziierte

Hüftfrakturen haben wesentlichen Einfluss auf das Wohlbefinden der Betroffenen. 10-20% der zuvor selbstständig Lebenden waren nach Frakturereignis auf Hilfe in einem Altersheim angewiesen (MacNabb et al. 2016). Eine Verschlechterung der Lebensqualität bei Osteoporose ohne Fraktur konnte bisher nicht belegt werden (Wilson et al. 2012).

1.2.3 Diagnostik der Osteoporose

Im Zentrum der Basisdiagnostik steht die Knochenmineraldichte (*bone mineral density* – BMD). Die Knochendichtemessung ist nicht nur Grundlage für die operationale Definition der Osteoporose (WHO), sondern gibt prognostische Information über das Frakturrisiko und wird als Verlaufparameter unter Therapie herangezogen (Kanis et al. 2013). Methode der Wahl ist dabei die DXA-Methode (*dual-energy X-ray absorptiometry*), bei der zwei Strahlen unterschiedlicher Intensität durch den Knochen geschickt werden. Aus der Menge der Strahlung, die durch den Knochen absorbiert wird bzw. hindurchgelangt, kann die Knochendichte errechnet werden. Sie wird als Flächen- oder Volumendichte (g/cm^2 bzw. g/cm^3) angegeben und an der LWS, dem proximalen Gesamtfemur sowie am Femurhals ermittelt (Bartl 2010; Herold 2015).

Die DXA-Methode ist nach Leitlinien der WHO, ESCEO, IOF und DVO die einzige Standardmethode, die das Krankheitsbild definieren und eine Therapieindikation stellen kann (Bartl 2010). Zur weiteren Basisdiagnostik nach DVO-Leitlinie gehören eine Anamnese mit klinischer Befunderhebung durch körperliche Untersuchung, eine Röntgenbildgebung und eine Labordiagnostik. Indiziert ist eine solche Osteoporose-Diagnostik bei einer Wahrscheinlichkeit für osteoporotische Frakturen von $\geq 20\%/10$ Jahre sowie unabhängig vom Frakturrisiko bei Frauen ≥ 70 Jahre und Männern ≥ 80 Jahre. (DVO 2017).

Eine gezielte Anamnese und klinische Befunderhebung dient der Lokalisations- und Intensitätsbestimmung frakturbedingter Schmerzen, umfasst den Ausschluss einer sekundären Osteoporose und ermöglicht die Beurteilung von Kraft und Koordination zur Evaluation einer möglichen Sturzneigung (DVO 2017). Wichtiges Augenmerk der klinischen Untersuchung sollte auf einer Abnahme der Körpergröße, Haltung, Beweglichkeit und Klopfschmerzhaftigkeit der Wirbelsäule sowie auf der Beurteilung des Muskeltonus liegen. Konventionelle Röntgenaufnahmen spielen keine Rolle in der Frühdiagnostik der Osteoporose, sind jedoch sehr wertvoll zur Erfassung von Wirbelkörperfrakturen und zum Ausschluss relevanter Differentialdiagnosen wie degenerativ-entzündliche Gelenkerkrankungen, Osteomalazie, maligne Knochenläsionen und Fluorose (Bartl 2010). Nach aktueller Leitlinie gehören ein Blutbild mit CRP und BSG sowie die Bestimmung von Serumkalzium, Serumphosphat, Kreatinin-Clearance, AP, γ -GT und TSH zum Basislabor. In Einzelfällen sollte die Bestimmung von 25-Hydroxyvitamin D3, Testosteron und Knochenumbaumarkern in Betracht gezogen werden (DVO 2017).

1.2.4 Aktuelle Therapie der Osteoporose

Die dargestellten Möglichkeiten zur Therapie der Osteoporose beziehen sich primär auf die postmenopausale Osteoporose der Frau mit einem DXA T-Score $\leq -2,5$, da letzterer Wert Einschlusskriterium in Therapiestudien gewesen ist, die die Effizienz von Osteoporosemedikamenten nachgewiesen haben (DVO 2017). Ziele einer therapeutischen Intervention sind die Verbesserung der Knochendichte, der Knochenqualität und des Knochenumbaus, um osteoporotische Frakturen bzw. Folgefrakturen zu vermeiden. Ein vermindertes Frakturrisiko geht einher mit einer geminderten Komorbidität und einer Verbesserung der physischen und psychischen Gesamtsituation des Patienten. Für die Umsetzung dieser Ziele bedarf es eines umfassenden Behandlungskonzepts, welches die Minimierung von Risikofaktoren, den Ausschluss sekundärer Ursachen der Osteoporose sowie eine pharmakologische Intervention beinhaltet (Bartl 2010).

Generelle, nicht pharmakologische Therapiemaßnahmen bestehen aus Förderung der Mobilität, Sturzvermeidung und einem gesundheitsorientierten Lebensstil bei knochenbewusster Ernährung (Bartl 2010; Kanis et al. 2013). Randomisierte, kontrollierte Studien konnten die Wirksamkeit körperlicher Aktivität auf eine erhöhte BMD und ein vermindertes Frakturrisiko bei postmenopausalen Frauen zeigen (Gregg et al. 1998; Howe et al. 2011). Eine Sturzprophylaxe beinhaltet eine kritische Auseinandersetzung mit sturzfördernden Medikamenten (z. B. Antidepressiva, Neuroleptika, Benzodiazepine, Sedativa und Antihypertonika) und eine Visuskontrolle (Herold 2015). Ein gesundheitsbewusster Lebensstil in Bezug auf das Osteoporosemanagement zielt vor allem auf die ausreichende Aufnahme von Vitamin D und Kalzium sowie das Vermeiden von Untergewicht und Rauchen ab (Sandhu und Hampson 2011). Nach DVO-Leitlinie wird eine tägliche Vitamin D-Zufuhr von 800-1000 IE sowie eine tägliche Zufuhr von 1000 mg Kalzium empfohlen. Besonders wichtig ist diese Supplementierung bei einer Therapie mit antiresorptiven Medikamenten (DVO 2017). In einer Metaanalyse konnte durch die Supplementierung von Kalzium und Vitamin D ein positiver Effekt auf das Frakturrisiko und die BMD gezeigt werden (Tang et al. 2007).

Eine pharmakologische Intervention ist indiziert bei niedrigtraumatischen Wirbelkörperfrakturen oder bei niedrigtraumatischen proximalen Femurfrakturen mit einem T-Score von $< -2,0$. Darüber hinaus bei Unterschreitung eines T-Scores, der mit einem 10-Jahres-Frakturrisiko für Wirbelkörper- und proximale Femurfrakturen $> 30\%$ assoziiert ist. Eine weitere Indikation stellt eine Therapie mit oralen Glukokortikoiden (täglich $> 7,5\text{mg}$) bei einem T-Score $< -1,5$ dar, die für drei oder mehr Monate geplant ist. Unterschiedliche Risikofaktoren (z. B. Diabetes mellitus Typ 1, Rheumatoide Arthritis) rechtfertigen einen Therapiebeginn schon bei höheren DXA-Werten (DVO 2017).

Die Medikamente der Osteoporose-Therapie lassen sich nach Art und Weise ihrer Wirkung in anti-resorptive oder osteoanabole Substanzen einteilen. Anti-resorptiv wirken Bisphosphonate, selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs), Denosumab und Östrogene. Eine osteoanabole Wirkung geht von Parathormon (PTH), Teriparatid, Strontiumranelat sowie von Androgenen aus (Bartl 2010).

1.2.4.1 Bisphosphonate

Für die Therapie in Deutschland zugelassene Bisphosphonate sind Alendronat, Risedronat, Etidronat, Ibandronat und Zolendronat (Bartl 2010). Diese Gruppe von Präparaten bildet derzeit den Goldstandard der Osteoporose-Therapie (Pérez-Castrillón et al. 2010). Studien konnten zeigen, dass die tägliche Gabe von 10 mg oder die wöchentliche Gabe von 70 mg Alendronat die Inzidenz vertebraler und extravertebraler Frakturen um 50% senkt (Lieberman et al. 1995; Black et al. 1996). Ebenfalls zeigte sich eine signifikante Zunahme der Knochendichte an Wirbelsäule und Hüfte nach oraler Gabe von Alendronat (Schnitzer et al. 2000). Ähnlich signifikante Verbesserungen des vertebralen und extravertebralen Frakturrisikos wurden bei einer täglichen oralen Einnahme von 5 mg Risedronat beschrieben (Adachi et al. 2005; Boonen et al. 2005). Bisphosphonate sind Analoga des Pyrophosphats und sind in der Lage mit hoher Affinität an Hydroxyapatit des Knochens zu binden. Bevorzugt findet man die Ablagerung der Bisphosphonate in den Resorptionslakunen, wo sie von Osteoklasten aufgenommen werden und deren resorptive Aktivität hemmen. Intrazellulär aufgenommene Bisphosphonate hemmen die Farnesylpyrophosphat-Synthase des Mevalonsäurestoffwechsels. Des Weiteren wird eine Protonen-ATPase gehemmt. Diese Veränderungen führen zur Inaktivierung (Verlust der *ruffled border*) und Apoptose der knochenresorbierenden Zellen (Bartl 2010; Reszka 2010). Zu den möglichen Nebenwirkungen gehören eine Ösophagitis, eine Akute-Phase-Reaktion nach intravenöser Gabe und Kiefernekrosen. Letztere kommt sehr selten vor (in 1/100.000 Fällen) und äußert sich fast ausschließlich bei immunsupprimierten Tumorpatienten (Kanis et al. 2013). Dennoch haben emotional geführte Diskussionen über diese Nebenwirkung dazu beigetragen, dass die Verschreibung von anti-resorptiven Medikamenten in diversen Ländern zurückgegangen ist. Und das, obwohl das Risiko-Nutzen-Verhältnis von Bisphosphonaten deutlich positiv ausfällt (Kanis et al. 2014; Solomon et al. 2014).

1.2.4.2 Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren – SERMs

Zu den anti-resorptiv wirkenden SERMs mit nachgewiesener Senkung des vertebralen Frakturrisikos bei postmenopausalen Frauen gehören Bazedoxifen und Raloxifen (DVO 2017). In der MORE-Studie (*Multiple Outcomes of Raloxifen Evaluation*) konnte gezeigt werden, dass sich unter Raloxifen das Risiko für das Erstauftreten von Wirbelkörperfrakturen verglichen mit einer Kontrollgruppe fast halbierte (Ettinger et al. 1999). In einer Subgruppe

von Hochrisikopatientinnen (T-Score $\geq -3,0$ plus vertebrale Fraktur) konnte für Bazedoxifen auch ein gesenktes Risiko für extravertebrale Frakturen gezeigt werden (Silverman et al. 2012). SERMs wirken selektiv auf Östrogenrezeptoren des Knochens, wo sie die Aktivität von Osteoklasten supprimieren. Keine Wirkung wird an Östrogenrezeptoren im Brustgewebe oder der Gebärmutter erzielt (Bartl 2010). Darüber hinaus reduziert sich unter Raloxifen das Risiko an Brustkrebs zu erkranken, weshalb SERMs besonders bei Osteoporose-Patientinnen mit erhöhtem Mammakarzinomrisiko indiziert sind. Abzuwägen sind diese Vorteile gegenüber einem leicht erhöhten Risiko für venöse Thrombembolien (Barrett-Connor et al. 2006).

1.2.4.3 Parathormon – PTH

Das Parathormon ist elementar für die Kalziumhomöostase und steigert bei Bedarf die Konzentration von Kalzium im Blut durch die Kalziumfreisetzung aus dem Knochen, einer gesteigerten Rückresorption von Kalzium in der Niere bei gleichzeitig gesteigerter Ausscheidung von Phosphat sowie durch eine gesteigerte Synthese von Kalzitriol (Bartl 2010). Eine signifikante Reduktion des vertebralen und extravertebralen Frakturrisikos sowie eine Steigerung der Knochendichte konnte für das PTH-Fragment Teriparatid (PTH 1-34) gezeigt werden (Neer et al. 2001). Für das humane rekombinante PTH (PTH 1-84) konnte eine Reduktion von Wirbelkörperfrakturen nachgewiesen werden (Greenspan et al. 2007). Die osteoanabole Wirkung wird durch eine intermittierende Gabe von PTH erreicht, indem 100 µg PTH 1-84 oder 20 µg Teriparatid pro Tag subkutan appliziert werden. Durch eine geminderte Apoptoserate steigt die Zahl der aktiven Osteoblasten, was zu einer gesteigerten Knochenmasse führt und die Knochenfestigkeit durch Verbesserung sowohl trabekulärer als auch kortikaler Knochenstrukturen anhebt (Bartl 2010; Kanis et al. 2013). Die maximale Therapiedauer mit Teriparatid beträgt 24 Monate (DVO 2017). Häufigste Nebenwirkungen, die mit dieser osteoanabolen Therapie assoziiert sind, sind Übelkeit, Glieder- und Kopfschmerzen sowie Schwindel (Herold 2015).

1.2.4.4 Denosumab

Hierbei handelt es sich um einen humanen monoklonalen Antikörper, der an den RANK-Liganden bindet und dessen Interaktion mit dem RANK-Rezeptor unterbindet (Kanis et al. 2013). Durch die verminderte Osteoklastendifferenzierung wirkt Denosumab antiresorptiv. Bei einer subkutanen Gabe von 60 mg alle sechs Monate über drei Jahre konnte bei postmenopausalen Frauen eine gesunkene Inzidenz für vertebrale und extravertebrale Frakturen und eine gestiegene Knochendichte gezeigt werden (Cummings et al. 2009).

1.2.4.5 Strontiumranelat

Strontiumranelat besitzt einen dualen Wirkmechanismus und beeinflusst sowohl Knochenformation als auch Knochenresorption. Über Kation-Sensing-Rezeptoren wirkt Strontiumranelat stimulierend auf Präosteoblasten und die Kollagensynthese reifer Osteoblasten und hemmend auf die Differenzierung und Resorptionsaktivität von Osteoklasten (Bartl 2010). In einer placebokontrollierten, randomisierten Doppelblindstudie über fünf Jahre konnte gezeigt werden, dass Strontiumranelat das relative Risiko für vertebrale und extravertebrale Frakturen deutlich senkt. Untersucht wurden Frauen in der Menopause mit einer diagnostizierten Osteoporose (Reginster et al. 2005). Eine Langzeitstudie über acht Jahre am gleichen Patientenkollektiv bestätigte, dass die Knochendichte (BMD) durch Strontiumranelat weiter anstieg und zeigte ein weiterhin reduziertes Risiko für vertebrale und extravertebrale Frakturen (Reginster et al. 2009). Aufgrund dieser Studienergebnisse wurde Strontiumranelat zwischenzeitlich zur Prävention und Behandlung der postmenopausalen Osteoporose eingesetzt (Bartl 2010). Bis ein Rote-Hand-Brief für Protelos (Strontiumranelat) veröffentlicht wurde, in dem vor einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkte unter Therapie mit Strontiumranelat gewarnt wurde (Bartl und Bartl 2015). Im August 2017 wurde dann der Vertrieb des Medikaments Protelos durch die Firma Servier eingestellt (Springer Medizin 2018).

1.2.4.6 Hormonersatztherapie – HRT

Östrogene reduzieren den gesteigerten Knochenabbau postmenopausaler Frauen und erhalten die Knochenmasse unabhängig von Therapiedauer und Alter der Patientin. Östrogene wirken knochenprotektiv durch Hemmung der Osteoklastenaktivität, durch Stimulation der osteoblastären Kollagensynthese, durch eine gesteigerte Ausschüttung von Kalzitinin sowie durch eine gesteigerte gastrointestinale Kalziumresorption. Des Weiteren werden zentralnervöse Funktionen verbessert und dadurch mögliche Fallneigungen reduziert sowie die Durchblutung des Knochens gesteigert (Bartl 2010). Eine Studie der *Women's Health Initiative* (WHI) konnte zeigen, dass eine HRT das Risiko vertebraler und extravertebraler Frakturen signifikant senkt. Jedoch stehen dem ein gesteigertes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und Brustkrebs gegenüber (Cauley et al. 2003). Aufgrund des Nebenwirkungsprofils sollte eine HRT auf klimakterische Beschwerden unmittelbar nach Beginn der Menopause beschränkt sein und nur kurze Zeit andauern (Bartl 2010).

1.2.4.7 Neue Therapieansätze

Einen vielversprechenden, osteoanabolen Therapieansatz bietet die Inhibition von Sclerostin durch monoklonale Antikörper (Romosozumab, Blosozumab und BPS804). Das Glykoprotein Sclerostin wird hauptsächlich von Osteozyten produziert und inhibiert den Wnt/ β -Catenin-abhängigen Signalweg durch die Bindung an *low-density lipoprotein receptor-related protein 5 und 6* (LPR 5/6) (Li et al. 2005). In der Wnt-Signalkaskade wird über die Bindung von Wnt an den *frizzled-receptor* und LPR 5/6 die Aktivität der Glykogen Synthase Kinase 3β gehemmt, welche normalerweise den Abbau von β -Catenin fördert (Krishnan et al. 2006; MacNabb et al. 2016). Erhöhtes β -Catenin induziert im Zellkern die Transkription von osteoanabolen Genen (z. B. Runx2, Osteocalzin) durch die Bindung von *T-cell factor/lymphoid enhancer binding factors* (Tef/Lef) (MacNabb et al. 2016). Sowohl in präklinischen als auch in Phase I- und II-Studien konnte die vielversprechende Wirkung von Antikörpern gegen Sclerostin nachgewiesen werden. Im osteoporotischen Tiermodell konnte sowohl das trabekuläre Knochenvolumen (BV/TV) als auch die trabekuläre Knochendichte (BMD) von ovariektomierten Tieren wiederhergestellt werden (Li et al. 2009). In Phase II-Studien konnten sowohl für Romosozumab als auch für Blosozumab ein signifikanter Anstieg der Knochendichte (BMD) im Femur und Wirbelsäule im osteoporotischen Patientenkollektiv – verglichen mit deren Ausgangswerten – erzielt werden (McClung et al. 2014; Recker et al. 2015). Der Anstieg bei der monatlichen Gabe von 210 mg Romosozumab übertraf sogar die Wirkung von Alendronate und Teriparatide (McClung et al. 2014). Ergebnisse von Phase III-Studien stehen noch aus.

Eine weitere vielversprechende Therapieoption der postmenopausalen Osteoporose stellt der Kathepsin K-Inhibitor Odanacatip dar (Isabel et al. 2011). Kathepsin K ist eine lysosomale Cysteinprotease, die in Osteoklasten exprimiert wird und durch den Abbau von Kollagen I und II eine entscheidende Rolle im Knochenremodelling spielt (Pérez-Castrillón et al. 2010). In einer präklinischen Studie am ovariektomierten Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Odanacatib den Verlust der Knochendichte (BMD) ähnlich gut verhindert wie Alendronate und die Knochendichte auf die eines intakten Knochens anhebt (Pennypacker et al. 2011). In einer Phase I-Studie konnte eine signifikante Abnahme von Markern der Knochenresorption gegenüber der Placebo-Gruppe festgestellt werden. Im Vergleich zu anderen antiresorptiven Wirkstoffen blieben die Marker der Knochenformation unverändert (Stoch et al. 2009). Ziel einer Phase II-Studie war es, die Veränderungen der Knochendichte (BMD) zu untersuchen. Hier konnte eine dosisabhängige Steigerung der BMD an allen gemessenen Knochen gezeigt werden. Darüber hinaus eine signifikante Reduktion der Resorptionsmarker bei einer wöchentlichen Gabe von 50 mg (Bone et al. 2010). 16.000 postmenopausale Frauen wurden in einer Phase III-Studie untersucht. Diese wurde jedoch abgebrochen, nachdem bereits in einer Interim-Analyse eine signifikante Reduktion des Frakturrisikos erreicht werden konnte (Chapurlat 2015).

1.3 Selektive Androgenrezeptor-Modulatoren (SARMs)

Selektive Androgenrezeptor-Modulatoren werden anhand ihrer chemischen Struktur und ihrem Verhalten gegenüber Enzymen (5 α -Reduktase, Aromatase) in steroidale und nicht-steroidale SARMs eingeteilt. Die ersten steroidalen SARMs entstanden um 1940 durch die Modifikation des Testosteronmoleküls. Durch die 17 α -Alkylsubstitution konnte zum einen die Halbwertszeit von Testosteron verlängert, zum anderen eine orale Bioverfügbarkeit erreicht werden. Durch das Entfernen der 19-Methylgruppe (19-Nortestosteron, auch Nandrolone) und die Substitution der 7 α -Methylgruppe konnte die anabole Wirksamkeit erhöht werden. Nandrolone ist zwar weniger anfällig für die Enzymwirkung der Aromatase, wird jedoch durch die 5 α -Reduktase in ein weniger potentes Androgen umgewandelt. Eine weitere Verlängerung der Wirkung *in vivo* wurde durch die Esterifizierung der 17 β -Hydroxylgruppe (Testosteron-Enthate) erzielt. Potentielle Nebenwirkungen sind jedoch Hepatotoxizität und ein erniedrigtes HDL im Plasma (Bhasin und Jasuja 2009).

Dalton et al. (1998) berichteten erstmalig von einem nicht-steroidalen Wirkstoff, der keine herkömmliche Steroidstruktur jedoch hohe Bindungsaffinität am Androgenrezeptor aufweist. Nicht-steroidale SARMs sind keine Substrate der CYP 19-Aromatase und der 5 α -Reduktase und können somit nicht in Östrogene oder 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt werden. Sie wirken als reiner Agonist am Androgenrezeptor in Geweben wie Knochen und Muskeln (*anabolic tissue*), jedoch nur als Partialagonist in Geweben wie Uterus und Prostata (*androgenic tissue*) (Bhasin und Jasuja 2009). Darüber hinaus sind nicht-steroidale SARMs nicht an der Hypophyse wirksam und induzieren dadurch im Vergleich zu DHT keine Inhibition der LH- und FSH-Freisetzung (Kearbey et al. 2007). Yin et al. (2003) beschrieben erstmals die Gewebeselektivität von SARMs, indem sie die Wirkung von Propionamid (SARM) und Testosteron am orchiektomierten Rattenmodell verglichen. Die durch Orchiektomie atrophierte Prostata und *Musculus levator ani* wurden beide durch Testosteron wiederaufgebaut, wohingegen Propionamid die Prostata geringfügig und den Muskel ebenfalls vollständig wiederaufbaute. Dies zeigt, dass bei SARMs zwischen anaboler (Muskel) und androgener (Prostata) Aktivität unterschieden werden kann. Die Androgentherapie bei Frauen zeigte in vielen Fällen Erfolge, scheiterte jedoch an unerwünschten Nebenwirkungen (z. B. Virilisierung), die bei höheren Konzentrationen auftreten (Jordan 2013). Deswegen war das Hauptziel in der Entwicklung der nicht-steroidalen SARMs die Minimierung androgener Nebenwirkungen durch verbesserte Gewebeselektivität ohne dabei die anabole Wirkung auf Muskeln und Knochen zu beeinträchtigen (Gao und Dalton 2007). Das große therapeutische Potential der SARMs zeigt sich in einer möglichen Anwendung bei postmenopausaler Osteoporose, Glukokortikoid-induzierter Osteoporose und alters- oder krankheitsbedingter Sarkopenie (z. B. bei HIV und Krebserkrankungen) (Negro-Vilar 1999; Gao und Dalton 2007). Besonders interessant für die Therapie der postmenopausalen Osteoporose ist der sowohl myoanabole als auch osteoanabole Wirkansatz der SARMs. Frauen verlieren ca. 4% ihrer Muskelmasse innerhalb

der ersten drei Jahre nach Beginn der Menopause (Aloia et al. 1991). Da Muskeln essentiell für die mechanische Belastung des Knochens sind und diese wiederum zum Erhalt der Knochenmasse beitragen, ermöglichen SARMS einen synergistischen Effekt durch Muskel- und Knochenaufbau in der Therapie der postmenopausalen Osteoporose (Jordan 2013). Des Weiteren können durch eine verbesserte körperliche Konstitution der Patienten Stürze vermieden werden – eine der Hauptursachen der hohen Morbidität bei Osteoporosepatienten (Crepaldi et al. 2007).

Die Wirkung unterschiedlicher SARMS wurde bereits in präklinischen Studien am ovariectomierten Rattenmodell evaluiert. Hanada et al. (2003) verglichen die Wirkung von S-40503 mit der von DHT und 17β -Estradiol am Femur von OVX-Ratten. Hier zeigte sich ein besonders starker Anstieg der kortikalen Knochendichte (BMD) durch S-40503, wohingegen die trabekuläre Knochendichte (BMD) im Vergleich zur ovariectomierten Kontrollgruppe nicht signifikant verändert wurde. Die durch S-40503 gesteigerte MAR (*periosteal mineral apposition rate*) am kortikalen Knochen spiegelte sich in signifikant verbesserten Parametern der Biomechanik wider. Kearby et al. (2007) verglichen die dosisabhängige Wirkung von S-4 (Andarine) mit der von DHT sowie die Wirkung von S-4 zusammen mit dem Antiandrogen Bicalutamide bei OVX-Ratten. Außerdem wurde die Wirkung von S-4 auf den intakten Knochen evaluiert. Auch hier konnte gezeigt werden, dass durch S-4 besonders die Parameter der Kortikalis und die Biomechanik bei OVX-Ratten positiv beeinflusst werden. Fehlende Veränderungen bei gleichzeitiger Gabe des Antiandrogens Bicalutamide bestätigten die Wichtigkeit des Androgenrezeptors für die Veränderungen am Knochen. Neben der osteoanabolen Wirksamkeit wurde eine antiresorptive Wirkung von S-4 diskutiert, da die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen zu Osteoklasten durch S-4 gehemmt wurde. Vajda et al. (2009a) diskutierte ebenfalls eine antiresorptive Wirkung des SARMS LGD-3033 und konnte in seiner präklinischen Studie mit OVX-Ratten ebenfalls anabole Aktivität an der Kortikalis und verbesserte biomechanische Parameter nachweisen. Darüber hinaus konnten bei gleichzeitiger Gabe eines Bisphosphonats (LGD 3033 + Alendronate) additive Effekte erzielt werden. Dies ist von besonderer Relevanz, da die Kombination von osteoanabolem PTH mit einem Bisphosphonat keine zusätzliche Wirksamkeit auf den Knochen zeigen konnte (Black et al. 2003).

1.3.1 Ligandrol – LGD 4033

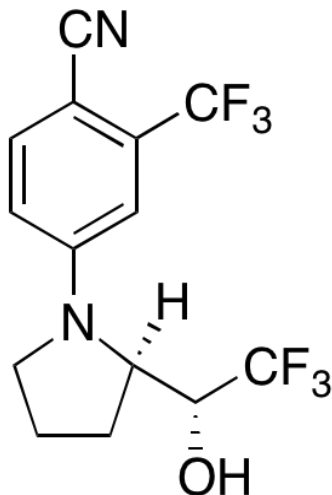


Abbildung 1: Strukturformel von Ligandrol (LGD-4033); mit freundlicher Genehmigung von Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln, Deutschland

Tabelle 1: Produktinformation Ligandrol (LGD-4033); mit freundlicher Genehmigung von Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln, Deutschland

Produktname	LGD-4033
CAS-Nummer	1165910-22-4
Summenformel	<u>C₁₄H₁₂F₆N₂O</u>
Molekulargewicht	338,25 g/mol
IUPAC-Name	4-[(2R)-2-[(1R)-2, 2, 2-Trifluoro-1-hydroxyethyl]-1-pyrrolidiny]-2-(trifluoromethyl)-benzonitrile
Reinheit	> 98%

Das in dieser Studie untersuchte Ligandrol (LGD-4033 auch VK-5211) wurde bereits an gesunden Männern in einer Phase I-Studie getestet. Hauptziel dieser Studie war es, die Sicherheit, Verträglichkeit und Pharmakokinetik von LGD-4033 zu evaluieren. Während der placebokontrollierten klinischen Studie zeigten sich keine durch LGD-4033 verursachten Nebenwirkungen. Des Weiteren zeigte sich bei einer biologische Halbwertszeit von 24-36 Stunden eine dosisabhängige Steigerung der fettfreien Körpermasse (*lean body mass*) bei den mit Ligandrol behandelten Personen. Aufgrund signifikant erniedrigter HDL-Werte im Plasma unter LGD-4033 wurde hinsichtlich der Risiko-Nutzen-Abwägung für einen zeitlich begrenzten Einsatz plädiert (z. B. bei Tumorkachexie oder Muskelverlust nach Fraktur)

(Basaria et al. 2013). Dementsprechend befindet sich LGD-4033 aktuell in einer Phase II-Studie, in der die Veränderung der Muskelmasse bei Patienten untersucht werden, die sich von einer operativ versorgten Hüftfraktur erholen. Andere Ergebnisse in Bezug auf Lebensqualität, Sicherheit und Pharmakokinetik werden ebenfalls analysiert (*ClinicalTrials.gov* Identifizier: NCT02578095).

Die meisten präklinischen und klinischen Studien haben den Effekt von Ligandrol auf die Muskulatur untersucht, ohne dabei den Knochen detailliert zu analysieren. Die Wirkung von LGD-4033 auf den Knochen (Femur und Wirbel) – mit Verweis auf ein Kongressposter – wurde bisher nur auf der Internetseite der *Viking Therapeutics, Inc.* publiziert. Dieses berichtet über einen positiven Effekt von LGD-4033 auf biomechanische Parameter und Knochenmineraldichte, die mittels DXA-Messung am Rattenmodell bestimmt wurde (Vajda et al. 2009b).

Ein weiteres spannendes Einsatzgebiet von Ligandrol – neben der Osteoporose-Therapie – stellt das High-Tech-Doping dar. Durch die selektiv anabole Wirkung ist Ligandrol geradezu prädestiniert für den Missbrauch im Leistungssport. Darüber hinaus lassen sich SARMs mit den herkömmlichen Dopingtests nur bedingt nachweisen (Striegel und Simon 2007).

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsablauf

Die Dauer des Versuchs umfasste 14 Wochen. Als Versuchstiere dienten 75 weibliche Ratten vom Rattenstamm Sprague Dawley, die zu Beginn der Studie drei Monate alt waren. Eingeteilt wurden die 75 Tiere in fünf Gruppen á 15 Tiere (Tab. 2).

In der ersten Versuchswoche wurden die Gruppen OVX, 0,04 mg, 0,4 mg und 4 mg ovariectomiert und damit die Grundlage für eine sich entwickelnde Osteoporose geschaffen. Gruppe Non OVX diente als Kontrollgruppe und wurde dementsprechend nicht operiert.

Nachdem sich durch die Hormonkarenz eine Osteoporose bei den Versuchstieren ausgebildet hatte, begann neun Wochen nach Ovariectomie die Behandlung mit dem Wirkstoff Ligandrol.

Die Ratten der Gruppe OVX wurden nicht mit Ligandrol behandelt und entsprachen damit dem unbehandelten, osteoporotischen Knochen. In den drei verbliebenen Gruppen wurden unterschiedlich hohe Dosen des Wirkstoffs Ligandrol gewählt (OVX + 0,04 mg/kg KG; OVX + 0,4 mg/kg KG; OVX + 4mg/kg KG). Durch dieses Studiendesign sollte eine mögliche dosisabhängige Wirkung von Ligandrol auf den osteoporotischen Knochen erforscht werden.

Ligandrol wurde den Versuchstieren oral mit dem Futter zugeführt. Die Therapie mit Ligandrol betrug insgesamt fünf Wochen.

Nach Woche 14 wurde der Versuch beendet und die Tibiae für die weiteren Untersuchungen entnommen und präpariert. Die linke Tibia wurde jeweils biomechanisch und computertomographisch im Bereich der Tibiametaphyse analysiert. Die computertomographischen Aufnahmen der Knochen ermöglichten eine dreidimensionale Dichte- und Volumenanalyse sowie eine zweidimensionale Evaluation des Trabekelnetzwerks. Die biomechanische Analyse wurde in einer Materialprüfmaschine durchgeführt, wobei die Knochen metaphysär gebrochen wurden. Die rechte Tibia wurde jeweils molekularbiologisch auf die Expression knochenspezifischer Gene untersucht.

Für das Versuchsvorhaben zu neuartigen Strategien der Osteoporose-Therapie mit selektiven Androgenrezeptor-Modulatoren (SARMs) war vor Versuchsbeginn die Genehmigung vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit zur Durchführung von Tierversuchen nach §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes erteilt worden.

Tabelle 2: Einteilung der Versuchsgruppen

Gruppe	Bezeichnung	Behandlung	Anzahl d. Tiere
1	Non OVX	keine	n = 15
2	OVX	Nur Ovariectomie	n = 15
3	0,04 mg	OVX + 0,04 mg/kg KG Ligandrol*	n = 15
4	0,4 mg	OVX + 0,4 mg/kg KG Ligandrol*	n = 13
5	4 mg	OVX + 4 mg/kg KG Ligandrol*	n = 14

*Behandlung mit Ligandrol neun Wochen nach Ovariectomie für fünf Wochen; Applikation *per os*

2.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Für diese Studie wurden 75 weibliche Ratten vom Rattenstamm Sprague Dawley verwendet, die zum Zeitpunkt der Ovariectomie drei Monate alt waren und im Durchschnitt 233 g wogen. Die Versuchstiere wurden bei der Firma Janvier Labs (Saint-Berthevin, Frankreich) gekauft.

Während der gesamten Versuchszeit wurden die Tiere in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen gehalten und gepflegt. Für vier Ratten stand jeweils ein spezieller Makrolon-Käfig Typ IV zur Verfügung. Der zirkadiane Schlaf-Wach-Rhythmus wurde durch ein automatisches An- und Ausschalten des Lichts in einem Abstand von zwölf Stunden simuliert und die Raumtemperatur bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55% auf 20°C gehalten. Die Versorgung der Tiere fand durch Mitarbeiter des unfallchirurgischen Labors statt, die die Tiere gefüttert, gewogen und umgesetzt haben.

Pro Woche bekamen die Tiere 1500 g sojafreies Futter (ssniff SM R/M, 10 mm-Pellets, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) sowie demineralisiertes Wasser, was den Tieren zur freien Verfügung stand. Das Restfutter wurde wöchentlich gewogen und wieder auf 1500 g aufgefüllt, sodass die durchschnittliche Futter- bzw. Ligandrolaufnahme pro Tier kontrolliert werden konnte. Der Wirkstoff Ligandrol wurde den Pellets im Vorfeld in passender Dosierung beigemischt.

Zwei Versuchstiere aus der 0,4-mg-Gruppe starben während der Narkose im Rahmen der Ovariectomie. Eine Ratte der Gruppe 4 mg wurde leblos in ihrem Käfig aufgefunden

(Ursache ungeklärt), sodass 72 der 75 Tiere in die Studie eingeschlossen wurden. Jede Ratte wurde mit einem Transponder (Firma Uno, Zevenaar, Niederlande) versehen, damit Verwechslungen der Gruppenzugehörigkeit ausgeschlossen werden konnten.

2.3 Ligandrol – Wahl der Dosierung und Anwendung

Das in der Studie verwendete Ligandrol wurde von der Firma Hölzel Diagnostika Handels GmbH (Köln, Deutschland) bezogen (siehe auch 1.3.1). Die Wahl der Firma Hölzel erfolgte zufällig. Es handelte sich nicht um bezahlte Auftragsforschung.

Die mit Ligandrol behandelten Versuchsgruppen bekamen den Wirkstoff in jeweils zehnfach erhöhter Dosierung, um eine dosisabhängige Wirkungsbeziehung zwischen den unterschiedlichen Gruppen zu erforschen (0,04 mg, 0,4 mg, 4 mg – Tab. 2).

Es wurde ein durchschnittliches Tiergewicht von 350 g pro Tier bei Versuchsplanung angenommen. Bei einer Konzentration von 0,04 mg/kg KG pro Tag musste jedem Tier 0,014 mg Ligandrol pro Tag gefüttert werden ($0,35 \text{ kg} * 0,04 \text{ mg/kg KG}$). Die Ligandrolbehandlung wurde für 35 Tage durchgeführt. Es wurde angenommen, dass jede Ratte pro Tag 25 g Futter zu sich nimmt. Für die 0,04-mg-Gruppe bedeutete das bei einer Gruppengröße von 15 Tieren, dass 7,35 mg Ligandrol mit 13,125 kg Basisdiät bzw. 8,4 mg Ligandrol mit 15 kg Basisdiät gemischt wurden ($0,014 \text{ mg} * 15 \text{ Tiere} * 35 \text{ Tage} = 7,35 \text{ mg}$). Dementsprechend wurde für die 0,4-mg-Gruppe 84 mg Ligandrol mit 15 kg Basisdiät gemischt. Für die 4-mg-Gruppe wurden 840 mg mit 15 kg Basisdiät gemischt. Die Herstellung dieser Spezialdiäten wurde von der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Deutschland) übernommen. Durch das wöchentliche Protokollieren des Tiergewichts und des Restfutters konnte die orale Wirkstoffaufnahme kontrolliert werden.

Bei der Auswahl der Dosierung orientierte man sich an bisherigen Forschungsergebnissen im Bereich der selektiven Androgenrezeptor-Modulatoren (SARMs). So konnte in einer placebokontrollierten Doppelblindstudie (Phase II) zum Wirkstoff GTX-24 (Enobosarm) ein höchstsignifikanter Anstieg der fettfreien Körpermasse (*lean body mass*) bei einer täglichen Dosis von 3 mg im Vergleich zur Placebo-Gruppe festgestellt werden ($p < 0,001$; 3 mg vs. Placebo; *mean weight* 72 kg) (Dalton et al. 2011).

Bei einem durchschnittlichen Gewicht von 72 kg entspricht die tägliche Dosis von 3 mg etwa 40 µg/kg KG bzw. 0,04 mg/kg KG. Diese Dosis wurde in diesem Forschungsprojekt als die niedrigste Dosis gewählt. Andere Studien von SARMs am ovariektomierten Rattenmodell zeigten eine ähnliche Dosiswahl bei ihren Versuchsgruppen (Kearbey et al. 2007; Vajda et al. 2009a; Furuya et al. 2012) (Tab. 3). LGD-4033 wurde bereits in einer klinischen Studie an gesunden Männern auf seine Verträglichkeit getestet. Bei ebenfalls oraler Einnahme wurden tägliche Dosen von 0,1 mg, 0,3 mg und 1 mg gewählt (Basaria et al. 2013).

Tabelle 3: Dosisauswahl anderer Studien am ovariectomierten Rattenmodell

Autor	SARMs	Dosis
Furuya et al. (2012)	S-101479	0,1, 0,3, 1, 3, 10 mg/kg
Vajda et al. (2009a)	LGD-3303	3 mg/kg
Kearbey et al. (2007)	S-4 (Andarine)	0,1, 0,3, 0,5, 0,75, 1, 3 mg/kg

2.4 Ovariectomie

Um den Versuchstieren durch Hormonkarenz eine Osteoporose zu induzieren, wurden 60 der 75 Ratten chirurgisch ovariectomiert. Zu Beginn wurden die Versuchstiere durch eine inhalative Narkose mit Isofluran sediert und relaxiert. Der Zugang zu den Eierstöcken unterhalb des Rippenbogens wurde rasiert sowie desinfiziert. Es erfolgte ein ca. 1,5 cm langer Hautschnitt in der Medianen über dem Lendenwirbelbereich. Danach wurde im subkutanen Gewebe beidseits nach latero-distal bis zur Bauchmuskulatur stumpf präpariert. Diese wurde zusammen mit dem Peritoneum ca. 1 cm weit eröffnet, sodass das Ovar und die Tuben der Ratten dargestellt werden konnten. Der Eileiter wurde samt Gefäßen abgeklemmt und mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl 4-0, RB-1 plus, 70 cm, Fa.Johnson&Johnson, Wien, Österreich) legiert. Das Ovar konnte danach oberhalb der Ligatur mit einem Skalpell entfernt werden. Nach Zurückverlagerung der Uterushörner wurde das Peritoneum und die muskuläre Bauchdecke mit Vicryl-Nahtmaterial und die Haut mit Klammern (*Michel wound brackets* 7,5 x 1,75 mm, Gebrüder Martin GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) verschlossen. Es folgte eine weitere Desinfektion des Operationszugangs. Der Eingriff wurde auf der kontralateralen Seite wiederholt und die Ratten damit beidseits ovariectomiert. Dann wurden die Ratten in einen vorgewärmten Käfig gelegt und bis zum Erwachen beobachtet. Das Analgesie-Protokoll, das von einer Tierärztin der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE, Göttingen) ausgearbeitet wurde, sah die intraoperative Gabe von Rimadyl (5 mg/kg KG s. c.) vor. Ein subkutan injiziertes NaCl-Depot von 3 ml sollte einem Flüssigkeitsverlust vorbeugen. Des Weiteren wurde den Versuchstieren am ersten postoperativen Tag Rimadyl (5 mg/kg KG s. c.) zur Schmerzlinderung appliziert. Die Ovariectomie weiblicher Ratten ist in der Arbeitsgruppe ein etabliertes Verfahren und in der hier beschriebenen Weise schon in vorherigen Versuchen durchgeführt worden (Weidemann 2014; Ammon 2015; Kling 2016).

2.5 Obduktion der Versuchstiere und Aufbereitung der Knochen

Nach 14 Versuchswochen waren die verbliebenen 72 Versuchstiere mittels inhalativer CO₂-Narkose sediert worden, bevor die Dekapitation in einer dafür speziell gefertigten Vorrichtung durchgeführt wurde. Vor der Obduktion wurde das Gewicht eines jeden Tieres protokolliert.

Das sich anschließende Sezieren der Versuchstiere gliederte sich in mehrere Arbeitsschritte bei denen Uterus, Muskeln (*M. gastrocnemius*, *M. soleus*, *M. longissimus*), Lendenwirbel sowie beide Femora und beide Tibiae entnommen und die Knochen grob von Synostosen, Muskel und Bindegewebe befreit wurden. Muskeln, Lendenwirbel und Femora wurden im Rahmen anderer Promotionsarbeiten gesammelt und untersucht. Die linken Tibiae wurden vorerst in 5 ml-Röhrchen (Sarstedt AG & Co, Nürnberg, Deutschland) gesammelt und mit NaCl befeuchtet. Anschließend wurden sie bei -20°C im Labor der Unfallchirurgie eingefroren. Die rechten Tibiametaphysen wurden für die molekularbiologische Untersuchung sofort nach Entnahme vom restlichen Knochen abgeknipst, von Weichteilresten entfernt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Für die biomechanische und computertomographische Analyse wurden die linken Tibiae zu einem späteren Zeitpunkt feinsäuberlich von Geweberesten freipräpariert und die Fibulae entfernt.

2.6 3D-Knochenanalyse

Für das Generieren der computertomographischen Scans diente das Quantum FX microCT des Herstellers *Caliper Sciences* (Hopkinton, Massachusetts, USA). Durch dieses microCT konnten die Knochen hochaufgelöst und dreidimensional dargestellt werden, bei gleichzeitig geringer Strahlenbelastung (durchschnittlich 15 mGy pro Scan).

Während eines Scanvorgangs trifft die Röntgenstrahlung nach Durchleuchtung des Untersuchungsknochens auf eine Szintillatorschicht, an der die eintreffende Energie in sichtbares Licht umgewandelt wird. Des Weiteren werden Lichtphotonen von einer Sensormatrix erfasst und das Strahlenprofil für die weitere Bildverarbeitung genutzt. Folgende Scanparameter wurden für die Durchführung der Scans definiert (Tab. 4):

Tabelle 4: Darstellung der Scanparameter

Scan-Parameter	Wert + Einheit
Anzahl d. Projektionen	3600
Röhrenspannung	70 kVp
Röhrenstrom	200 μ A
<i>Field of view</i> (FOV)	20 x 20 mm ²
Scanzeit	2 Minuten
Scanmodus	Vollrotation (360°)
Effektive Voxelgröße	40 x 40 x 40 μ m ³
<i>Frame rate</i> des Detektors	30 Hz
Bildmatrix	512 x 512
Datenpräsentation	16 bit

Die dreidimensionale Analyse der Versuchsknochen erfolgte durch die Software 3D-OsteoAnalyse. Durch das Computerprogramm konnten die dreidimensionalen Knochen-scans zur Darstellung gebracht werden und das Volumen und die Dichte für die bestimmten Gewebsabschnitte (Kortikalis, Trabekel, Kortikalis + Trabekel, Weichteilgewebe) berechnet werden.

2.6.1 Schritt 1 – Durchführung der Scans

Zu Beginn wurde eine Aufwärmphase von 15 Minuten für das Gerät vorgesehen, um eine gleichmäßige Bestrahlungsintensität zu gewährleisten und um die Röhre durch plötzliches Ausschalten nicht zu beschädigen. Für eine sichere Positionierung wurden die Knochen auf einem strahlendurchlässigen Schaumstoffstück gelagert und gescannt. Neben dem Knochen wurde auch ein Kalibrierungsphantom gescannt. In einem Testscan in niedriger Auflösung wurde die Darstellung der Tibiametaphyse und des Phantoms überprüft, bevor ein Scan in hoher Auflösung durchgeführt wurde. Mit Hilfe eines Algorithmus konnte aus dem ermittelten Datensatz eine 3D-Rekonstruktion der Knochen erstellt werden. Die Anfertigung der 3D-Knochenscans wurde freundlicherweise durch Mitarbeiter des unfallchirurgischen Labors übernommen.

2.6.2 Schritt 2 – Bearbeitung des Kalibrierungsphantoms

Für jeden Knochen wurde durch das Programm 3D-OsteoAnalyze ein Grauwertistogramm erstellt, bei dem auf der x-Achse die Röntgenschwächungswerte und auf der y-Achse die Anzahl der Bildpunkte, die in den entsprechenden Grauwertebereich fallen, dargestellt wurde. Da die Röntgenschwächungswerte ein Maß für die relative Elektronendichte eines Materials sind, können sie nicht direkt in eine Massendichte umgerechnet werden. Deshalb wurde neben den Versuchsknochen ein Phantom (QRM, Bayern) mit fünf Kammern, welche mit Hydroxyapatit befüllt waren, gescannt. Diese Phantomkammern bekannter Dichte dienten als Referenzwerte für die Umrechnung der Grauwerte (*gray value* – GVal) in Massendichten (BMD). Die Massendichte wurde somit mittels folgender Umrechnungsgleichung aus den Grauwerten berechnet:

$$\text{BMD (g/cm}^3\text{)} = m * \text{GVal} + b$$

Dabei wurde die Steigung m und der Wert b für jedes Phantom berechnet, bevor Dichte und Volumen für die unterschiedlichen Gewebsabschnitte berechnet werden konnten (Abb. 2).

2.6.3 Schritt 3 – Einstellung der Phantomwerte und Zuschnitt der Tibiametaphyse

Zu Beginn wurde der CT-Scan im Programm 3D-OsteoAnalyze aufgerufen. In dreidimensionaler Darstellung zeigten sich pro Datei zwei Tibiae mit dazugehörigem Phantom in festgelegter Anordnung, um eine Verwechslung der Versuchsknochen auszuschließen (Abb. 3). Über die Funktion *density calibration* wurden die zuvor berechneten Phantomwerte (m , b) für den jeweiligen Knochenscan in die Umrechnungsgleichung (siehe Schritt 1 – Abb. 1) eingetragen. Schließlich wurde der zu untersuchende Bereich der Tibiametaphyse durch einen standardisierten Messrahmen (*region of interest* - ROI) ausgeschnitten (Abb. 4). Als Ausgangspunkt für diesen diente der Übergang zwischen Tibiaplateau und metaphysärer Vorderkante. Von diesem Ausgangspunkt ging man 1,5 und 3,5 mm nach

distal, um den 2 mm langen Messrahmen an der Metaphyse festzulegen. Dieser durch den Messrahmen bestimmte Bereich der Tibia wurde ebenfalls ausgeschnitten (Abb.4). An diesem ausgeschnittenen Bereich (ROI) wurde zuerst die distal gelegene Kortikalisfläche analysiert, indem der periostale (A_1) und der endostale (A_2) Rand des distalen Knochenendes umrandet wurde und die Flächen voneinander abgezogen wurden (A_1-A_2) (Abb. 5). Die Fläche A_1 entspricht der gesamten Querschnittsfläche (*cross-sectional area*). Die Fläche A_2 entspricht der *bone marrow area*. Diese beiden Parameter (*cross-sectional area*, *bone marrow area*) wurden nachträglich erhoben, um die Ligandrolwirkung auf die Kortikalis weiter zu differenzieren. Hiermit konnte die Frage geklärt werden, ob sich die Kortikalis durch Kontraktion der *bone marrow area* oder durch Expansion der Gesamtquerschnittsfläche (*cross-sectional area*) verbreitert hat. Obwohl die beiden Parameter in der 3D-Analyse erhoben wurden, werden sie im Zusammenhang mit den anderen zweidimensionalen Parametern diskutiert und dementsprechend mit den Ergebnissen der 2D-Analyse im Ergebnisteil dargestellt.

2.6.4 Schritt 4 – Berechnung des Volumens und der Dichte

Im Folgenden wurde ein Grauwerthistogramm des ausgeschnittenen Metaphysenabschnitts (ROI) erstellt. Das typische Histogramm zeigte einen *peak* bei geringen Röntgenschwächungswerten, was im CT registrierter Luft entsprach (Abb. 6). Um nur den Knochen untersuchen zu können wurde die Luft aus dem Histogramm herausgeschnitten. In diesem neuen Histogramm (Abb. 7) konnten nun die unterschiedlichen Gewebsteile farblich detektiert werden, indem die Grenzen auf der x-Achse (Röntgenschwächungswerte) verschoben wurden. Für sechs Knochen (jeweils drei aus der Gruppe Non OVX und drei aus der Gruppe OVX) wurden im Vorfeld die Grenzen für Kortikalis, Trabekel und Weichteilgewebe visuell eingestellt. Dabei wurden die Grenzen so eingestellt, dass nur das jeweilige Gewebe grün detektiert wurde (Abb. 8). Für jeden Gewebebereich wurde der durchschnittliche Grenzwert aus den sechs Knochen berechnet und im Folgenden bei jedem Versuchsknochen angewandt (Tab. 5).

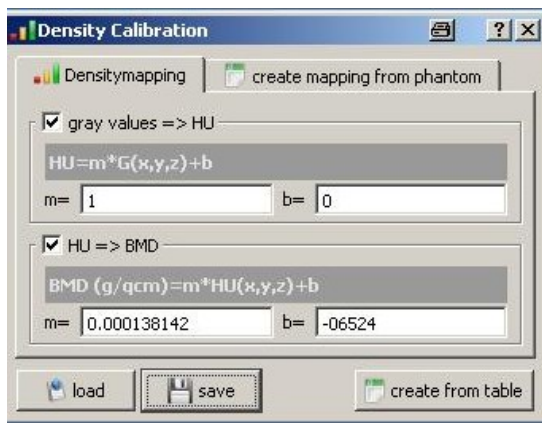


Abbildung 2: Darstellung der Funktion zur BMD-Berechnung aus den Grauwerten; m - und b -Wert für das entsprechende Phantom sind eingefügt

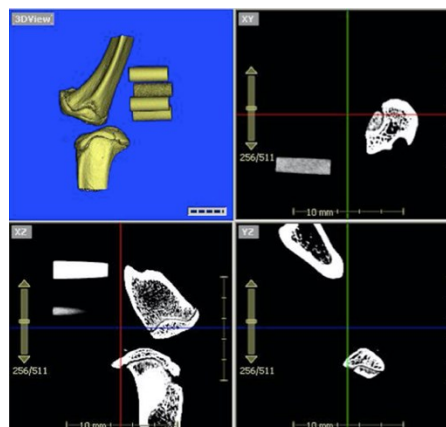


Abbildung 3: Initiale Darstellung; im blauen Fenster: Tibia eins oben, Tibia zwei unten, Phantom oben rechts

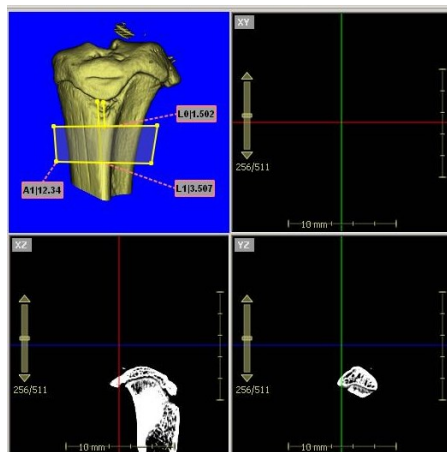


Abbildung 4: *Region of interest* (ROI) der Tibiametaphyse; gelber Messrahmen definiert die ROI

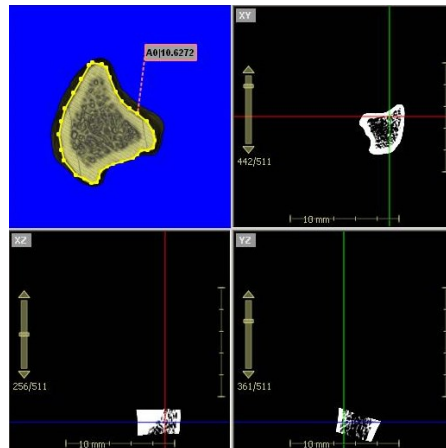


Abbildung 5: Periostaler Rand der Kortikalis (A1) gelb umrandet; Knochen um 90° gedreht, Ansicht von kaudal

Tabelle 5: Darstellung der Grenzen und Grenzwerte der computertomographischen Auswertung

Grenzen	Grenzwerte
Kortikalis max.	Auf x-Achse maximal nach rechts
Kortikalis min. / Trabekel max.	0,9442
Trabekel min / Weichteil max.	0,3848
Weichteil min.	Visuelle Einstellung

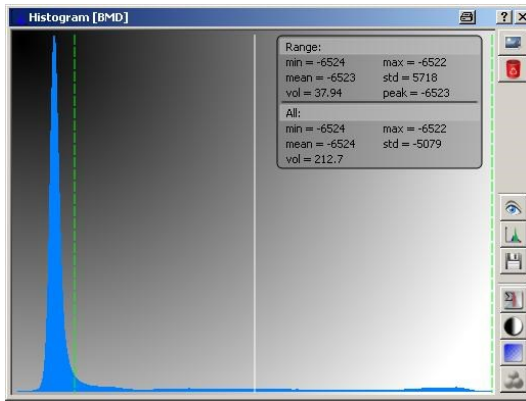


Abbildung 6: Darstellung des Grauwertistogramms mit typischem *peak* durch Luft bei geringen Röntgenschwächungswerten

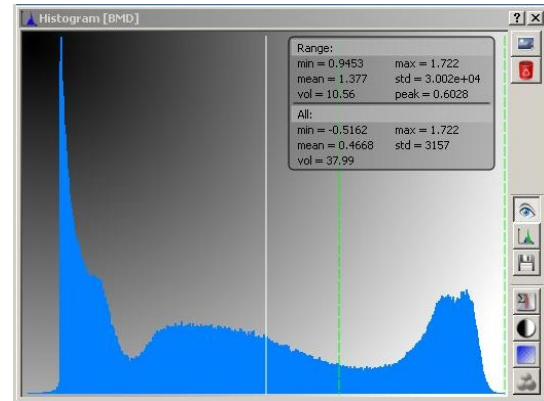


Abbildung 7: Darstellung des Grauwertistogramms mit herausgeschnittenem *peak* durch Luft und eingestellten kortikalen Grenzwerten

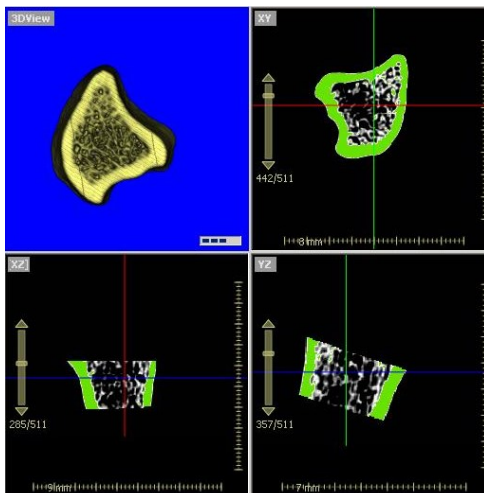


Abbildung 8: Darstellung der grün markierten Kortikalis bei eingestellten Grenzwerten

Die Dichte (BMD in g/cm^3) wurden für die Kortikalis, Kortikalis + Trabekel, Trabekel, Weichteilgewebe und den gesamten Knochen mittels Umrechnungsgleichung aus den Grauwerten (y-Achse) innerhalb der festgelegten Grenzen (x-Achse) berechnet. Darüber hinaus wurden für die unterschiedlichen Gewebe das Volumen (mm^3) bestimmt. Bei eingestellten Grenzen wurden die beiden Messparameter für jeden Gewebereich bestimmt und in einem Excel-Dokument zusammengetragen.

2.7 2D-Knochenanalyse

Um die Wirkung von Ligandrol auf den Knochen weiter untersuchen zu können, wurden zweidimensionale Schnitte im Bereich der Metaphyse durchgeführt. Ziel dieser Methode war es neben kortikalen Parametern besonders die Beschaffenheit des Trabekelnetzwerks in den unterschiedlichen Versuchsgruppen zu untersuchen.

2.7.1 Schritt 1 – Erstellen zweidimensionaler Schnitte

Dies konnte durch das Programm 3D-OsteoAnalyse mit der Funktion *create slices* realisiert werden. Insgesamt wurden im Bereich der Metaphyse zehn Schnitte pro Knochen (*slice count*) mit einer Dicke von 0,001 mm (*thickness*) gefertigt. Der Abstand der Schnitte untereinander betrug 0,1 mm bei einer Matrix von 1024 Pixeln. Um bei allen Tibiae die gleiche Stelle der Metaphyse standardisiert schneiden zu können, wurde der erste Schnitt am Übergang des knorpeligen Tibiaplateaus zur metaphysären Vorderkante gewählt (Abb. 9). Darüber hinaus wurden für die Schnitte die maximale Helligkeit im Histogramm des jeweiligen Knochens eingestellt. Diese Einstellung beruhte auf Erfahrungswerten und ermöglichte eine bessere Darstellung und Quantifizierung der Trabekel in der darauffolgenden Auswertung. Auf diese Art und Weise wurden bei allen Versuchsknochen zehn zweidimensionale Schnittbilder erstellt.

2.7.2 Schritt 2 – Detektion kortikaler und trabekulärer Knochenanteile

Die Darstellung und Auswertung der zweidimensionalen Schnitte erfolgte mit der Software MetaMorph (Firma Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland). Für jeden Knochen wurden jeweils drei zweidimensionale Schnittbilder analysiert. Dafür wurden die ersten drei der zehn angefertigten Schnitte ausgewählt.

Zu Beginn wurde über die Funktion *adjust digital contrast* die Helligkeit (*brightness*) auf 0% und der Kontrast auf 50% eingestellt. Auch diese Einstellungen beruhten auf Erfahrungswerten (Abb. 10). In einem weiteren Schritt wurde der gesamte Knochen (Kortikalis + Trabekel) farblich detektiert und durch das Programm registriert. Hierbei wurde vor allem auf eine genaue Detektion der Trabekel sowie deren Kreuzungen geachtet (Abb. 11). Danach schloss sich das Umranden von Kortikalis- und Trabekelfläche an. Dies wurde mit Hilfe eines *graphic pads* gemacht, auf dem mit einem Stift der periostale und endostale Rand der Kortikalis nachgefahren werden konnte (Abb. 12, Abb. 13). Das Programm errechnete aus den markierten und umrandeten Flächen die in Tabelle 6 aufgeführten Parameter.

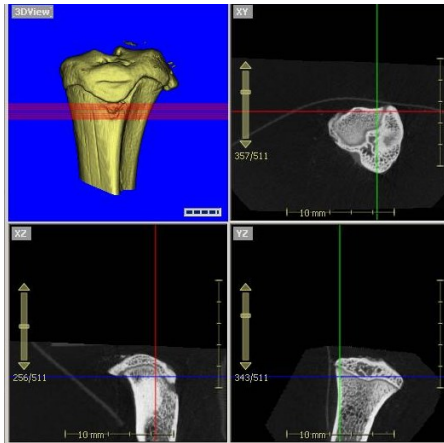


Abbildung 9: Darstellung der Schnittbilderstellung; Schnittbildebenen in rot dargestellt

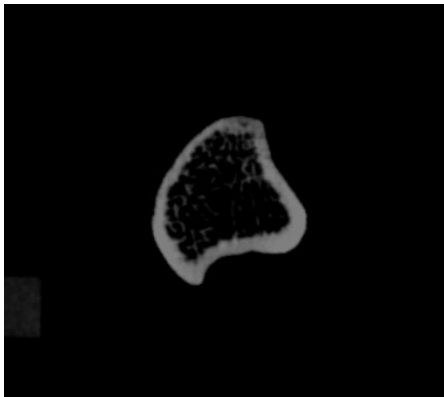


Abbildung 10: Darstellung des Knochenschnitts nach Adjustierung der Helligkeit und des Kontrasts



Abbildung 11: Detektion des gesamten Knochens (Kortikalis + Trabekel)

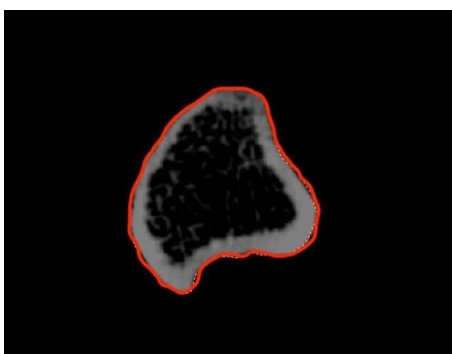


Abbildung 12: Mit dem *graphic pad* umrandeter periostaler Rand der Kortikalis

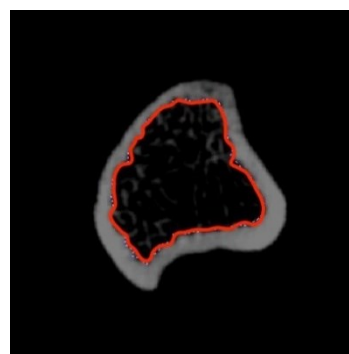


Abbildung 13: Mit dem *graphic pad* umrandete Trabekelfläche bzw. endostaler Rand der Kortikalis

Tabelle 6: Darstellung der Parameter der 2D-Knochenanalyse

Parameter	Einheit
Kortikalisfläche	mm ²
Kortikalisdicke	mm
Trabekelfläche	mm ²
Knochenflächendichte Trabekel	%
Anzahl der Trabekelkreuzungen	n
Dichte der Trabekelkreuzungen	n/mm ²
Trabekeldicke	mm

2.8 Biomechanischer Bruchtest

Für die biomechanische Analyse wurde eine Zwick-Materialprüfmaschine vom Typ 145660 Z020/TND (Zwick/Roell, Ulm, Germany) verwendet. Hierbei wurde ein Drei-Punkte-Bruchtest für Tibiae angewandt, der in dem Labor der Unfallchirurgie entwickelt wurde. Ziel dieser Entwicklung war das standardisierte Herbeiführen metaphysärer Tibiafrakturen zur Evaluation der Osteoporose (Stürmer et al. 2006).

2.8.1 Schritt 1 – Vorbereitung des Drei-Punkte-Bruchtests

Da die Knochen bei -20°C eingefroren und gelagert wurden, musste jeder Knochen vor Versuchsbeginn für 15 min aufgetaut werden. Während des Bruchtests wurde der bearbeitete Knochen konstant befeuchtet. Als Halterung für die Tibia diente ein speziell angefertigter Aluminiumblock, in den die Tibia eingelegt werden konnte. Das proximale Ende des Tibiaplateaus passte sich in eine konkave Rundung ein, sodass beide Tibiakondylen dem Aluminiumblock auflagen. Durch die s-förmige Beschaffenheit der Tibia befand sich der dritte Auflagepunkt am distalen Ende des Knochens (Malleolengabel). Um ein Kippen der Tibia in der Transversalachse zu verhindern, konnte der Knochen zwischen zwei Stellschrauben befestigt werden. Jedoch wurde stets darauf geachtet, dass ein Verschieben in longitudinaler Achse gewährleistet blieb (Abb. 14).

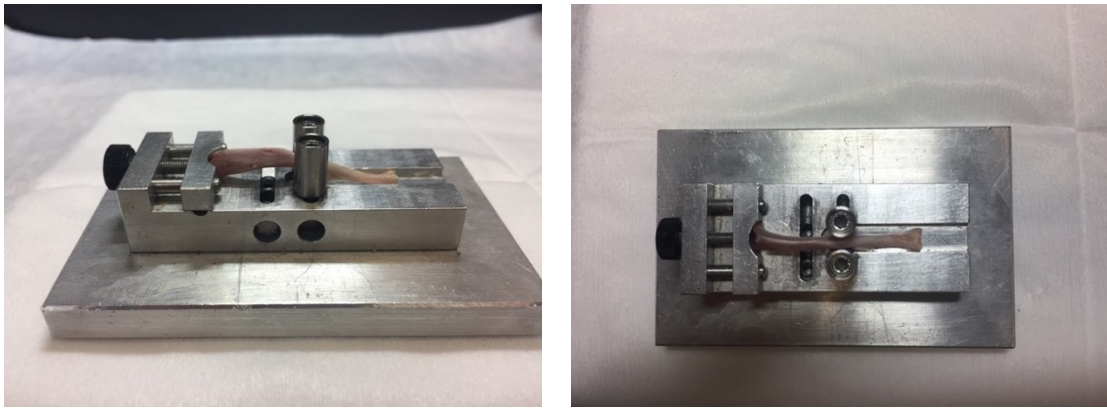


Abbildung 14: Darstellung des Probeknochens im Aluminiumblock; Schrauben verhindern das Kippen des Knochens bei erhaltener Beweglichkeit in longitudinaler Richtung; links in Seitenansicht, rechts in Ansicht von kranial

2.8.2 Schritt 2 – Lagekorrektur und Durchführung der metaphysären Fraktur

Kompression auf die Vorderkante der Tibiametaphyse wurde durch einen eingekerbten Rollenstempel ausgeübt, der mit einer kontinuierlichen Geschwindigkeit von 50 mm/min vertikal auf die Knochenvorderkante drückte. Um die Bruchstelle bzw. die Kompression des Stempels final beurteilen zu können, wurde die Tibia bei einer durch den Stempel aufgewendeten Kraft von 1 Newton (N) fixiert. Erst nach Bestätigung der korrekten Stempelposition, übte der Stempel mit kontinuierlicher Geschwindigkeit weiter Druck auf die Metaphyse aus (Abb. 15). Der Versuch endete mit dem metaphysären Bruch der Tibia oder einem Druckabfall ≥ 25 N, der als bruchäquivalent angenommen wurde.



Abbildung 15: Darstellung der Tibia bei Kompression auf die Vorderkante nach exakter Lagekorrektur

Die biomechanische Analyse wurde mit dem Programm testXpert durchgeführt, welches die einwirkende Kraft (N) und den Weg des Stempels in einem Kurvendiagramm (Kraft-Weg-Diagramm) darstellte.

2.8.3 Validierung

Um ein standardisiertes Brechen der Tibiae und den korrekten Umgang mit der Materialprüfmaschine zu gewährleisten, wurden zehn Knochenpaare zur Validierung bearbeitet und die Ergebnisse ausgewertet. Diese Knochenpaare stammten von weiblichen Ratten, die nicht Teil des Versuchs waren. Ziel der Validierung war es, die Abweichung zwischen der linken und rechten Tibia eines Knochenpaares für die zu messenden Parameter unter 10% zu halten.

Das Längenwachstum der Röhrenknochen von Menschen und Ratten geschieht durch epiphysäres Wachstum (enchondrale Ossifikation). Untersuchungen der Wachstumsfuge bei weiblichen Sprague Dawley Ratten zeigten, dass die Wachstumsfuge vom sechsten bis zum 18. Monat knöchern überbaut wird und somit das Längenwachstum mit der Zeit sistiert (Martin et al. 2003). Somit war die tibiale Wachstumsfuge der Versuchstiere zu Versuchsende (Tiere waren 6,5 Monate alt) noch nicht vollständig verknöchert. Während der Bearbeitung der Validierungsknochen fiel auf, dass die Epiphyse durch den zunehmenden Druck auf die Metaphyse zuerst abgesprengt und dies durch den daraus resultierenden Druckabfall fälschlicherweise als Bruchereignis registriert wurde. Ebenfalls änderte sich dadurch die Kontaktstelle an der metaphysären Vorderkante, was zu verwackelten Kurvendiagrammen führte. Dieses Phänomen wurde bei einem großen Teil der Validierungsknochen beobachtet. Somit war ein standardisiertes Brechen der Knochen unmöglich. Deswegen wurde im Folgenden die Epiphyse abpräpariert, sodass die Tibiae auf den verknöcherten Anteilen der Kondylen auflagen (Abb. 16). Sowohl die s-förmige Beschaffenheit des Knochens als auch das Prinzip des Drei-Punkte-Bruchtests konnten durch diese Modifikation beibehalten werden. Dadurch konnte ein regelmäßiger Kurvenverlauf im Kraft-Weg-Diagramm und Ergebnisse mit zufriedenstellender Abweichung generiert werden.



Abbildung 16: Tibia nach Entfernung der Epiphyse

2.8.4 Messparameter und Interpretation des Kraft-Weg-Diagramms

Die biomechanische Analyse diente dazu, die Elastizität (*stiffness*), die Streckgrenze (*yield load*) und die Maximalkraft (F_{\max}) der einzelnen Knochen zu bestimmen und zwischen den fünf Versuchsgruppen zu vergleichen.

Dabei zeigte sich ein typischer Kurvenverlauf im Kraft-Weg-Diagramm. Nachdem die korrekte Position der Vorderkante unter dem Rollstempel bei einer Vorkraft von 1 N bestätigt wurde, stieg die Kurve des Kraft-Weg-Diagramms stetig an. Dies ist der Bereich der elastischen Deformation, bei der es zur reversiblen Verformung des Knochens kommt. Dann nahm die Steigung der Kurve etwas ab und erreichte ihre Maximalkraft (F_{\max}). Dies ist der Bereich der plastischen Deformation, bei der erste Mikrofrakturen im trabekulären Netzwerk zur irreversiblen Verformung des Knochens führen. Zwischen den beiden Kurvenverläufen befindet sich die Streckgrenze (*yield load*), die den Übergang zwischen elastischer (reversibler) und plastischer (irreversibler) Verformung darstellt (Stürmer et al. 2006; Cole und van der Meulen 2010).

2.8.4.1 Elastizität – *stiffness*

Die Elastizität wird über die Steigung im Bereich der elastischen Deformation berechnet. Es wurde der Quotient aus der Kraft (F) und Weg (s) an jeweils zwei Punkten bestimmt, an denen die Kurve den steilsten Verlauf genommen hatte.

$$\text{Elastizität} = \frac{(F_2 - F_1)}{(s_2 - s_1)}; \text{Einheit N/mm}$$

2.8.4.2 Streckgrenze – *yield load*

Die Streckgrenze (*yield load*) ist definiert als der Punkt, an dem die elastische Deformation des Knochens in eine plastische Deformation übergeht. Im Bereich dieses Übergangs wurde eine Regressionsgerade und die Standardabweichung bestimmt. Als Streckgrenze wird dann der Punkt definiert, an dem die Steigung (*stiffness*) um mehr als das Zweifache einer Standardabweichung abgenommen hat (Stürmer et al. 2006). Die Streckgrenze (*yield load*) wird in Newton (N) angegeben.

2.8.4.3 Maximalkraft – F_{\max}

Die Maximalkraft ist die größte Kraft, die der Knochen standhalten kann. Nach F_{\max} nimmt die Kraft so lange ab, bis der Knochen frakturiert ist. Die Maximalkraft (F_{\max}) wird in Newton angegeben.

2.9 Molekularbiologische Analyse

Bei der molekularbiologischen Analyse wurde die Wirkung von Ligandrol auf die Expression knochenspezifischer Gene untersucht. Dazu wurde die Ribonukleinsäure (RNA) aus den Knochen isoliert und gereinigt (2.9.1), die Konzentration der RNA durch UV-Photometrie gemessen, komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) synthetisiert (2.9.3) und mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) quantifiziert (2.9.4).

2.9.1 RNA-Isolation

Um die RNA aus den Knochenproben zu isolieren, wurde das RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) genutzt. Inhalt des Kits waren RNeasy Mini *spin columns*, *collection tubes* (1.5 ml, 2 ml), Buffer RLT, Buffer RW1, Buffer RPE (*concentrated buffer*) und RNase-freies Wasser. Zusätzlich zu dem Kit wurde für das Homogenisieren der Probe der QIAshredder (Firma Qiagen, Hilden, Germany) verwendet. Eine wichtige Voraussetzung für die Aufreinigung der RNA war das sofortige Einfrieren der Knochen in flüssigem Stickstoff nach Entnahme sowie die weitere Lagerung bei -70°C . Die RNA-Isolation wurde gemäß den Herstelleranweisungen durchgeführt (Qiagen 2012). Die RNA-Isolation wurde bei Raumtemperatur mit Ethanol-gewaschenen Handschuhen durchgeführt. Die Proben und die Schüttelbehälter (Teflon-Gefäß und Kugel) wurden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.9.1.1 Schritt 1 – Pulverisierung der Knochen

Zuerst wurde der Knochen im Mörser grob zerkleinert, um die Knochenfragmente dann in den Schüttelbehälter zu geben. Das Teflon-Gefäß mit Kugel wurde im Micro-Dismembrator bei einer Schwingungsfrequenz von 2500 rpm geschüttelt. Für jede Tibia wurde ein neuer Schüttelbehälter verwendet. Durch die damit induzierte Sprengung von Zellwänden und Plasmamembranen wurde die RNA in der Probe freigesetzt wurde.

2.9.1.2 Schritt 2 – Homogenisierung der Probe

Das Knochenpulver (zwei Spatelspitzen) wurde in ein Eppendorf-Cup gefüllt und mit 350 μl Lysepuffer (Buffer RTL + β -Mercaptoethanol) vermischt. Diese Suspension wurde dann auf die Shredder-Säule pipettiert (QIAshredder *homogenizer*, Qiagen) und zwei Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde nach Zentrifugation vorsichtig mit einer Pipette entnommen und in ein neues Eppendorf-Cup gefüllt. Das entstandene Pellet wurde verworfen.

2.9.1.3 Schritt 3 – Zugabe von Ethanol und Aufreinigung der RNA

Dem Filtrat wurde 350 μl Ethanol (70%) hinzugegeben, um optimale Bedingungen für selektive RNA-Bindung an die Membran der RNeasy-Säule (RNeasy *spin column*, Qiagen) zu schaffen. Die mit Ethanol versetzte Flüssigkeit wurde dann auf die RNeasy-Säule pipettiert und 15 Sekunden bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die RNA konnte so an die Membran der RNeasy-Säule binden. Dann wurden 700 μl Waschpuffer (Buffer RW1) auf die RNeasy-Säule pipettiert und wieder 15 Sekunden bei 12000 rpm zentrifugiert. Auch hier wurde der Durchfluss verworfen. Die RNeasy-Säule wurde dann vorsichtig in ein neues Eppendorf-Cup überführt und darauffolgend zweimal mit 500 μl RPE-Puffer gewaschen. Das erste Mal wurde für 15 Sekunden bei 12000 rpm zentrifugiert; das zweite Mal wurde für zwei Minuten bei 12000 rpm trocken zentrifugiert.

Die RNA wurde durch das Pipettieren von 35 μl RNase-freiem Wasser und Zentrifugation (60 Sekunden bei 12000 rpm) aus der Membran eluiert. Die herausgelöste RNA wurde dann sofort auf Eis bzw. in flüssigen Stickstoff gelegt und bei -70°C eingefroren.

2.9.1.4 Schritt 4 – UV-Photometrie

Ziel der UV-Photometrie war es, die Konzentration der unterschiedlichen RNA-Proben zu messen. Das UV-Photometer (GeneRay, Biometra, Göttingen, Deutschland) wurde kalibriert, indem die Extinktion von reinem Wasser bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen wurde. Diese gemessene Extinktion wurde als Nullwert für die Folgemessungen festgelegt. Darauffolgend wurden jeweils 6 μl der eluierten RNA eingesetzt und deren Extinktion gemessen. Das Umstellen des Lambert-Beer-Gesetzes ermöglicht bei bekannter Schichtdicke d und bekanntem Extinktionskoeffizienten ϵ das Berechnen der Konzentration c (Lange und Vejdelek 1987; Bruhn et al. 2011). Durch dieses quantitative Analyseverfahren konnte festgestellt werden wieviel RNA in den jeweiligen Proben vorhanden war. Konzentrationsunterschiede wurden durch Verdünnung ausgeglichen.

2.9.2 Synthese von cDNA

Mit Hilfe des Enzyms Reverse-Transkriptase kann aus dem RNA-Einzelstrang, der hier als Matrize dient, ein DNA-Doppelstrang synthetisiert werden. Diese DNA wird als cDNA bezeichnet und besitzt im Gegensatz zur ursprünglichen eukaryotischen DNA keine Introns, da als Ausgangssubstanz eine schon prozessierte RNA dient. Diese Methode ermöglicht Informationen auf RNA-Einzelsträngen nach Synthese in cDNA mittels PCR gezielt zu amplifizieren und auszuwerten (Cooper und Hausman 2015). Für die Arbeitsschritte wurde das Herstellerprotokoll orientierend herangezogen (Promega 2016).

2.9.2.1 Schritt 1 – Lösen der RNA-Sekundärstrukturen und Primer-Anlagerung

Zu Beginn wurde der Probenansatz (14 μ l) erstellt, indem zu 10 μ l RNA (100 ng) 1 μ l Random Primer (Gibco, Nr. 48190-011, 3 μ g/ μ l; 1:30 verdünnt) und 3 μ l RNase-freies Wasser hinzugegeben wurden. Dieser Probenansatz wurde dann gevortext, kurz bei 10000 rpm zentrifugiert und für 10 min bei 70°C in einem Thermoblock (LabCycler, SensoQuest GmbH, Göttingen, Deutschland) inkubiert.

2.9.2.2 Schritt 2 – cDNA-Doppelstrangsynthese

Nach Entnahme aus dem Thermoblock wurden die Proben nochmals kurz zentrifugiert (10000 rpm) und zu jeder Probe (14 μ l) wurde ein Master-Mix (6 μ l) aus jeweils 4 μ l Reaktionspuffer, 1 μ l dNTP-Mix (Invitrogen Nr. 18427-013, 10 mM) und 1 μ l des Enzyms Reverse-Transkriptase (M-MLV Reverse-Transkriptase, RNASE H minus *point mutant*, Promega Nr. M3682) hinzugegeben. Dann wurde das neue Probengemisch (20 μ l) gevortext, kurz zentrifugiert (10000 rpm) und im Thermoblock einem speziellen Inkubationszyklus unterzogen. Um gleiche Startbedingungen für alle Proben zu schaffen, wurde jede Probe für 10 min bei 22°C behandelt. Darauf folgend wurde die Arbeitstemperatur des Enzyms Reverse-Transkriptase eingestellt (50 min bei 42°C). Um die Arbeit des Transkriptionenzyms zu stoppen, wurde die Probe in einem letzten Schritt für 10 min bei 95°C inkubiert. Nach der cDNA-Synthese wurde die Probe sofort auf Eis gelegt und bei 10000 rpm kurz zentrifugiert. Dann konnte die neu gewonnene cDNA bei -20°C eingefroren werden.

2.9.3 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Die Amplifikation der cDNA bei der quantitative Echtzeit-PCR beruht auf den Grundsätzen der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion, bei der der DNA-Doppelstrang aufgespalten wird, sich Primer anlagern und die Einzelstränge komplementär durch die Polymerase ergänzt werden. Zusätzlich können die amplifizierten Genprodukte durch angelagerten Fluoreszenzfarbstoff in Echtzeit quantifizieren werden. Der fluoreszierende Farbstoff interkaliert mit dem DNA-Doppelstrang, sodass die Intensität der Fluoreszenz proportional mit der Menge der gebildeten DNA ansteigt. Der quantitative Endpunkt der qRT-PCR ist der CT-Wert bzw. CP-Wert (*threshold cycle* bzw. *crossing point*). Er ist definiert als die Zyklenzahl der PCR, an der das Fluoreszenzsignal der Probe einen gewissen Schwellenwert übersteigt. Damit wird sichergestellt, dass sich die PCR in der exponentiellen Phase der Amplifikation befindet. Durch eine Schmelzkurvenanalyse wird gewährleistet, dass nur das gewünschte Gen und keine weiteren Sequenzen in die Fluoreszenzmessung miteingegangen sind. Die relative Genexpression wird über die Delta-Delta-CT-Methode (auch *comparative CT method*) berechnet, indem die Expression des Zielgens gegen ein Referenzgen normalisiert wird (Holzapfel und Wickert 2007; Schmittgen und Livak 2008).

2.9.3.1 Schritt 1 – Ansatz für die qRT-PCR

Für die anstehenden Zyklen qRT-PCR wurde für jede Probe ein Ansatz aus cDNA, genspezifischem *ready-to-use*-Primer von Qiagen (QuantiTect® Primer Assays, Hilden, Germany), Wasser und SYBR-Green Supermix (i^{Taq}™ Universal SYBR-Green Supermix, Bio-Rad Laboratories, USA) vorbereitet. Die Primer waren spezifisch für folgende Gene: β 2-MG, AP, AR, ER α , OC, OPG, RANKL und TRAP. Der SYBR-Green Supermix beinhaltet die *hot-start* i^{Taq} DNA-Polymerase, den SYBR-Green I Farbstoff, dNTPs, MgCl₂, Stabilisatoren, *enhancer* und ein Gemisch aus Farbstoffen (u. a. ROX und Flurescein). Für jedes Gen wurde eine spezifische Menge an cDNA für den qRT-PCR-Ansatz verwendet (Tab. 7). Diese spezifische Menge an cDNA wurde mit 1 μ l an genspezifischen Primern, 9 μ l Wasser und 10 μ l SYBR-Green Supermix gemischt. Für jede Gruppe (Non OVX, OVX, 0,04 mg, 0,4 mg, 4 mg) wurden jeweils zehn Ansätze hergestellt und genspezifisch untersucht (Tab. 7).

2.9.3.2 Schritt 2 – Durchführung der qRT-PCR

Die jeweils 50 Ansätze aus Schritt 1 wurden auf eine PCR-Platte pipettiert und in einem RT-PCR-System analysiert (Biorad, C1000 *thermal cycler*, CFX96 *real-time* System). Neben den Ansätzen mit den cDNA Proben wurden pro Platte fünf Negativkontrollen untersucht. Diese beinhalteten ebenfalls den genspezifischen Primer und den SYBR-Green Supermix, jedoch wurde statt der cDNA Wasser eingesetzt. Für die qRT-PCR ist folgendes

Temperaturprogramm verwendet worden: im ersten Zyklus wurden die Proben für 5 min von Raumtemperatur auf 95°C erhitzt, um die *hot-start* DNA-Polymerase zu aktivieren. Dieser Zyklus erfolgte ein Mal. Die nächsten beiden Schritte dienten der Denaturierung und Primer-Anlagerung mit Amplifikation. Die Denaturierung erfolgte bei 95°C für zehn Sekunden. Die Primer-Anlagerung mit Amplifikation erfolgte bei 60°C für 30 Sekunden. Diese beiden Schritte wurden insgesamt 40 Mal wiederholt. Im letzten Schritt wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierbei wurde die Temperatur von 65°C auf 95°C schrittweise erhöht. Jede fünf Sekunden wurde die Temperatur um 0,5°C gesteigert (Tab. 8).

Tabelle 7: Genspezifischer Probenansatz für die qRT-PCR

Gen	cDNA	Wasser	SYBR-Green	Primer
β ₂ -MG	2 µl (10 ng)	9 µl	10 µl	1 µl
OC	4 µl (20 ng)	9 µl	10 µl	1 µl
AP	4 µl (20 ng)	9 µl	10 µl	1 µl
OPG	4 µl (20 ng)	9 µl	10 µl	1 µl
RANKL	5 µl (25 ng)	9 µl	10 µl	1 µl
AR	4 µl (20 ng)	9 µl	10 µl	1 µl
ERα	5 µl (25 ng)	9 µl	10 µl	1 µl
TRAP	5 µl (25 ng)	9 µl	10 µl	1 µl

Tabelle 8: Temperaturprogramm der qRT-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
Aktivieren der DNA-Polymerase	RT - 95°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	10 sec	40
<i>Annealing</i> und Amplifikation	60°C	30 sec	40
Schmelzkurvenanalyse	65°C - 95°C	0,5°C / 5 sec	1

2.9.3.3 Schritt 3 – Berechnung der relativen Genexpression

Für jede genspezifische qRT-PCR wurde ein Protokoll erstellt, indem die CT-Werte für jede Probe berechnet wurden. Diesen CT-Werten wurde der jeweilige CT-Wert des Referenzgens abgezogen (= Delta-CT). Als Referenzgen wurde β_2 -Mikroglobulin (β_2 -MG) verwendet. Die finale Berechnung der relativen Genexpression erfolgte über die Delta-Delta-CT Methode (Holzapfel und Wickert 2007):

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ Behandlung} - \Delta CT \text{ Kontrolle} = (\Delta CT \text{ Zielgen} - \Delta CT \text{ Referenzgen } \beta_2\text{-MG}) - (\Delta CT \text{ intaktes Kontrollgen} - \Delta CT \text{ Referenzgen } \beta_2\text{-MG})$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

2.10 Statistik

Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Ergebnisse in Form von Säulendiagrammen erfolgte durch das Programm GraphPad Prism (Version 5.01, GraphPad Software, San Diego, USA). Es wurden die Mittelwerte samt Standardabweichung zwischen den Versuchsgruppen verglichen und mögliche Signifikanzen durch eine *one-way* ANOVA und den Tukey-Kramer *post-hoc* Test ermittelt. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

Alle in diesem Versuch erlangten Ergebnisse werden nach gleichem System im Folgenden dargestellt. In Säulendiagrammen werden die Mittelwerte der fünf unterschiedlichen Versuchsgruppen samt Standardabweichung miteinander verglichen. Signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) werden mit einem Sternchen (*) markiert. Des Weiteren wurden zwischen hochsignifikanten ($**p < 0,01$) und höchstsignifikanten Ergebnissen ($***p < 0,001$) unterschieden. Um Signifikanzen zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen übersichtlich darstellen zu können, wurden diese wie folgt markiert:

a = Signifikanz zwischen Non OVX und allen übrigen Gruppen

b = Signifikanz gegenüber Non OVX

c = Signifikanz gegenüber OVX

d = Signifikanz gegenüber 0,04 mg

e = Signifikanz gegenüber 0,4 mg

Neben der graphischen Darstellung werden die Ergebnisse in Übersichtstabellen (Mittelwert \pm Standardabweichung) im Anhang dargestellt. Am Ende des Ergebnisteils befindet sich eine Gesamtübersicht der wichtigsten Ergebnisse.

3.1 Tiergewichte

Alle Gruppen, die zu Beginn des Versuchs ovariectomiert wurden (OVX, 0,04 mg, 0,4 mg, 4 mg), zeigten ab Woche zwei ein signifikant erhöhtes Durchschnittsgewicht gegenüber Non OVX (Abb. 17, Tab. A1). Bis auf eine kurzzeitige Stagnation in der Non-OVX-Gruppe in der zehnten und elften Versuchswoche kam es in allen Gruppen zu einem stetigen Anstieg des durchschnittlichen Körpergewichts im Verlauf des Versuchs. Ein besonders starker Gewichtsanstieg verzeichnete sich bei OVX, 0,04 mg, 0,4 mg und 4 mg in der zweiten und dritten Woche nach Ovariectomie. Die mit Ligandrol behandelten Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede gegenüber OVX. Auch zwischen den unterschiedlichen Ligandrol dosierungen ergaben sich keine signifikanten Veränderungen im Körpergewicht. Die größte Körpergewichtszunahme wurde in der 4-mg-Gruppe erzielt.

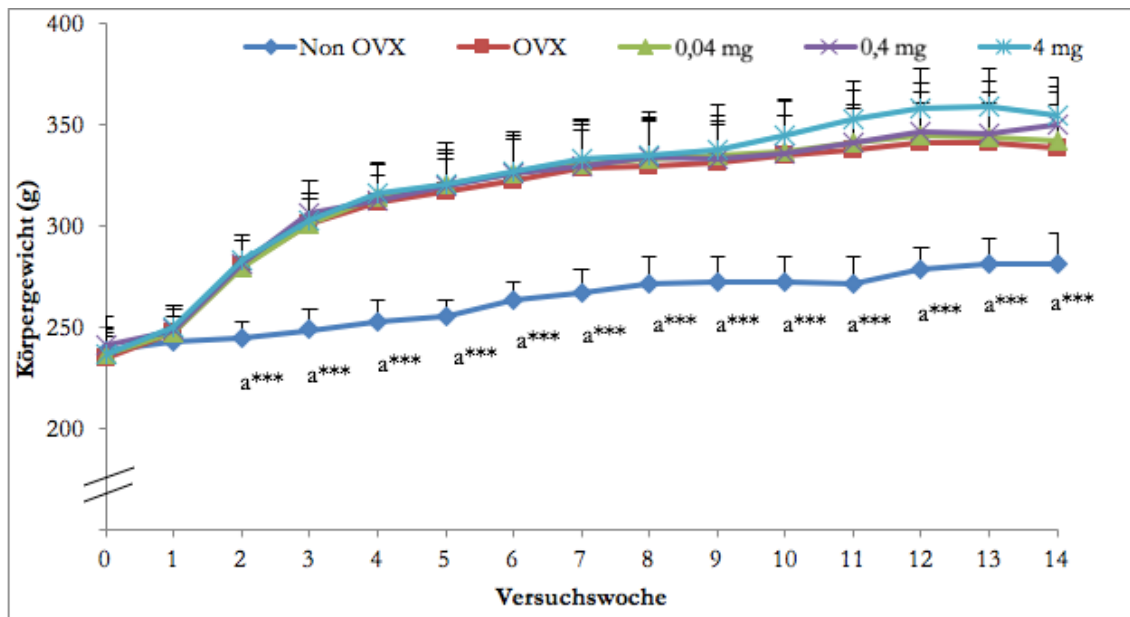


Abbildung 17: Durchschnittliche Tiergewichte mit oberer Standardabweichung im Verlauf des Versuchs; a = Non OVX vs. alle übrigen Gruppen; *** $p < 0,001$

3.2 Futteraufnahme und Ligandrol dosis

Im Verlauf der durchschnittlichen Futteraufnahme pro Tag pro Tier zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Non-OVX-Gruppe und allen übrigen Gruppen ab dem Ende der zweiten Versuchswoche bis zum Ende der siebten Versuchswoche. In den darauffolgenden zwei Versuchswochen wurden keine signifikanten Unterschiede in der Futteraufnahme sichtbar. In der zehnten und zwölften Woche unterschied sich die Futteraufnahme der Non-OVX-Gruppe und der mit Ligandrol behandelten Gruppen signifikant, ohne signifikanten Unterschied zwischen Non OVX und OVX. In der elften Versuchswoche zeigte sich nur ein signifikanter Unterschied zwischen der Non-OVX-Gruppe und der OVX-Gruppe. Nach Einführung der oralen Ligandrol-Diät (Versuchswoche zehn bzw. nach neun Wochen) kam es zu einem Abfall der Futteraufnahme in den Gruppen 0,04 mg, 0,4 mg und 4 mg. Ein leichter Abfall zeigte sich auch in der Non-OVX- und OVX-Gruppe. Gegen Ende des Versuchs stabilisierte sich die durchschnittliche Futteraufnahme wieder (Abb. 18, Tab. A2).

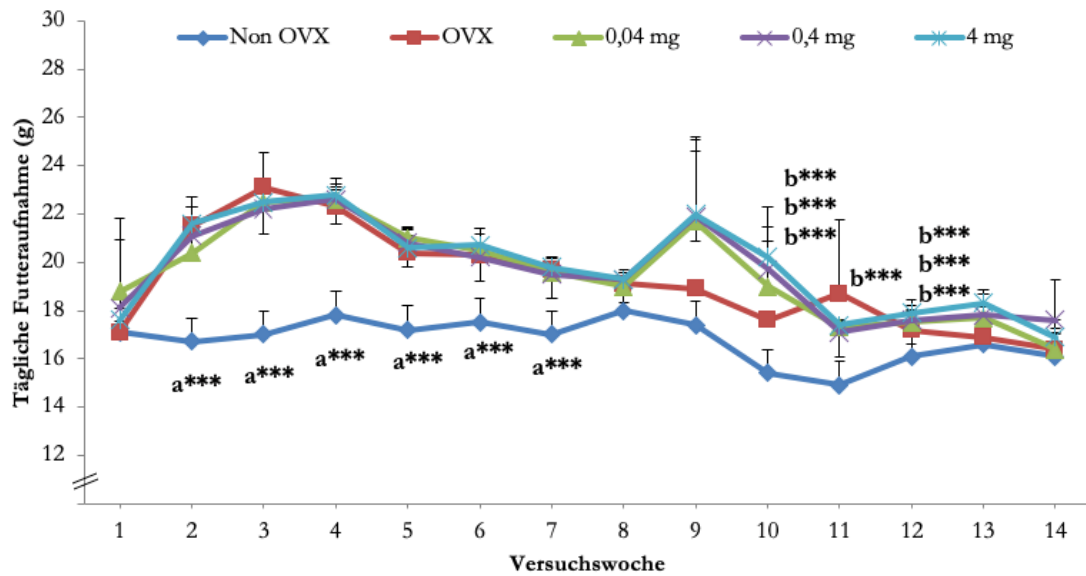


Abbildung 18: Durchschnittliche Futteraufnahme im Verlauf des Versuchs; a = Non OVX vs. alle übrigen Gruppen, b = signifikant gegenüber Non OVX; *** $p < 0,001$

Bei Betrachtung der durchschnittlichen Ligandrolaufnahme pro Tier pro Tag (mg/kg KG) zeigte sich in allen Versuchsgruppen zu Beginn ein leichter Abfall der durchschnittlichen Ligandrolaufnahme. Im weiteren Verlauf stabilisierte sich die durchschnittliche Ligandrolaufnahme (Abb. 19, Tab. A3). Die Berechnung der eingenommenen Dosis (mg/kg KG) zeigte, dass die bei der Planung des Versuchs festgelegten Dosen an Ligandrol (0,04 mg/kg KG, 0,4 mg/kg KG, 4 mg/kg KG) nicht erreicht wurden. Im Schnitt wurden in der 0,04-mg-Gruppe 0,029 mg/kg KG, in der 0,4-mg-Gruppe 0,29 mg/kg KG und in der 4-mg-Gruppe 2,87 mg/kg KG eingenommen.

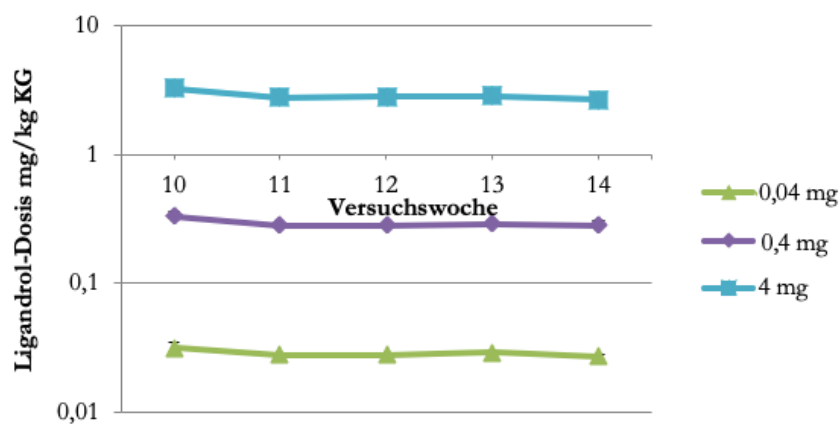


Abbildung 19: Tägliche Ligandrol-Dosis in mg/kg KG im Verlauf des Versuchs; in logarithmischer Auftragung

3.3 Uterusgewicht

Das Uterusgewicht zu Versuchsende war in der Non-OVX-Gruppe signifikant höher als in allen anderen Versuchsgruppen. Keinen Unterschied gab es zwischen den Uterusgewichten der Gruppen OVX, 0,04 mg und 0,4 mg. Die 4-mg-Gruppe zeigte gegenüber OVX und den beiden anderen mit Ligandrol behandelten Gruppen (0,04 mg, 0,4 mg) ein signifikant erhöhtes Uterusgewicht zu Versuchsende (Abb. 20, Tab. A4). Jedoch wurden Gewichtswerte der Non-OVX-Gruppe nicht erreicht und blieben im Vergleich zu dieser signifikant erniedrigt.

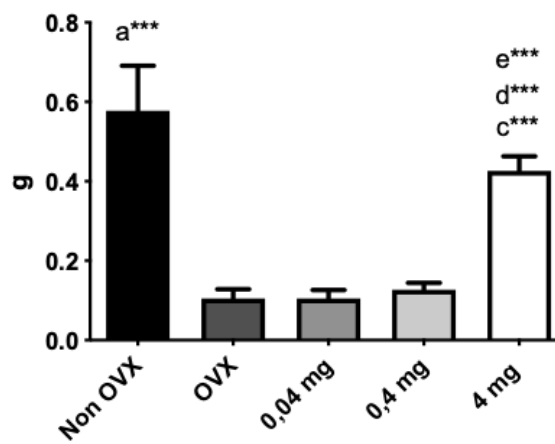


Abbildung 20: Darstellung des Uterusgewichts bei Versuchsende; a = Non OVX vs. alle übrigen Gruppen, c = signifikant gegenüber OVX, d = signifikant gegenüber 0,04 mg, e = signifikant gegenüber 0,4 mg; *** $p < 0,001$

3.4 3D-Analyse

3.4.1 Kortikalisdichte (BMD)

Bei der mittleren Kortikalisdichte (BMD) konnten sowohl nach Ovariectomie (Non OVX vs. OVX) als auch durch die Ligandrolbehandlung keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt werden (Abb. 21, Tab. A5)

3.4.2 Kortikalisvolumen

Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich beim mittleren Volumen der Kortikalis. Eine steigende Tendenz gegenüber Non OVX und OVX zeigte sich bei 0,4 mg und 4 mg, ohne jedoch signifikant belegt werden zu können (Abb. 22, Tab. A5).

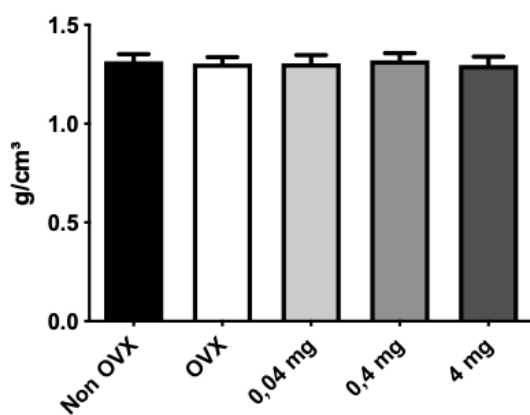


Abbildung 21: Darstellung der mittleren Kortikalisdichte (BMD)

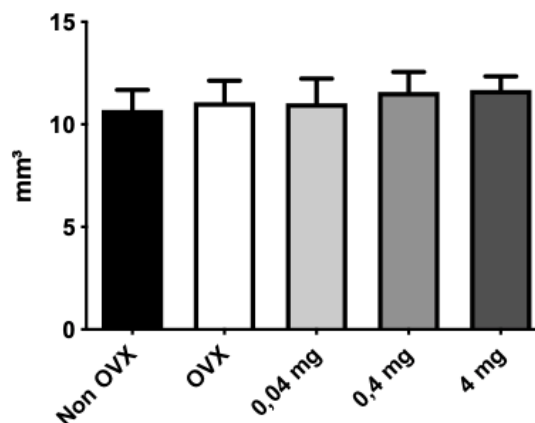


Abbildung 22: Darstellung des mittleren Kortikalisvolumens

3.4.3 Kortikalisfläche

Der intakte Knochen (Non OVX) zeigte eine signifikant geringere Kortikalisfläche gegenüber der OVX-Gruppe und den mit Ligandrol behandelten Gruppen (0,04 mg, 0,4 mg, 4 mg). Zwischen den Gruppen 0,04 mg, 0,4 mg und 4 mg ließ sich eine steigende Tendenz feststellen. Einen signifikanten Anstieg der Kortikalisfläche gab es zwischen OVX und der 4-mg-Gruppe (Abb. 23, Tab. A5).

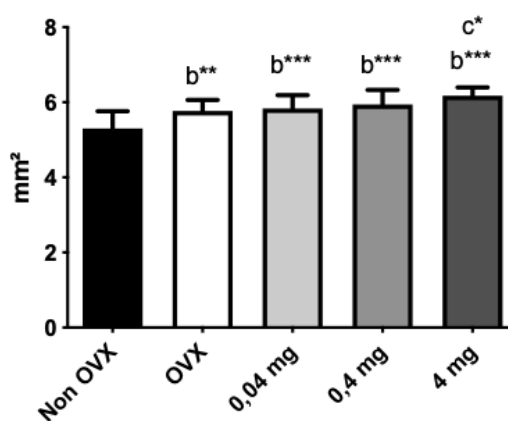


Abbildung 23: Darstellung der Kortikalisfläche; b = signifikant gegenüber Non OVX, c = signifikant gegenüber OVX; ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05

3.4.4 Dichte Kortikalis + Trabekel (BMD)

Bei der mittleren Dichte von Kortikalis + Trabekel konnte nach Ovariectomie ein signifikanter Anstieg der Knochendichte in den Gruppen OVX, 0,04 mg, 0,4 mg und 4 mg gegenüber der Non-OVX-Gruppe festgestellt werden. Unter Ligandroltherapie zeigten sich keine Veränderungen gegenüber OVX (Abb. 24, Tab. A5)

3.4.5 Volumen Kortikalis + Trabekel

Beim Volumen von Kortikalis + Trabekel stellten sich signifikante Veränderungen zwischen dem intakten Knochen (Non OVX) und allen übrigen Versuchsgruppen dar. Die Ligandroltherapie zeigte in den beiden Versuchsgruppen mit höherer Dosierung (0,4 mg, 4 mg) einen tendenziellen Volumenzuwachs. Signifikante Veränderungen unter Ligandrol konnten jedoch nicht festgestellt werden (Abb. 25, Tab. A5).

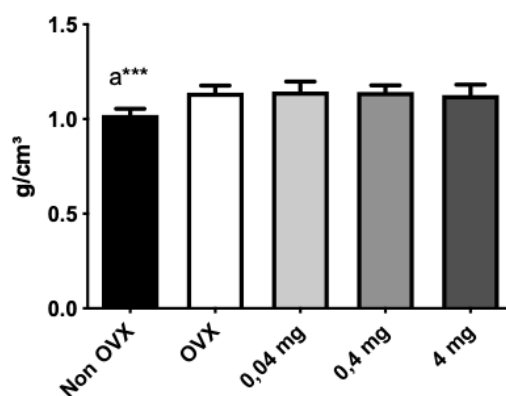


Abbildung 24: Darstellung der mittleren Dichte von Kortikalis + Trabekel (BMD); a = Non OVX vs. alle übrigen Gruppen; ***p<0,001

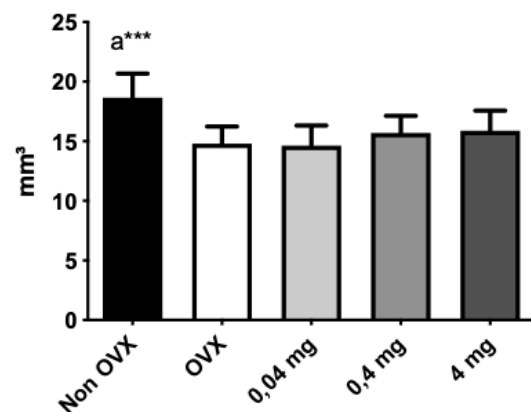


Abbildung 25: Darstellung des mittleren Volumens von Kortikalis + Trabekel; a = Non OVX vs. alle übrigen Gruppen; ***p<0,001

3.4.6 Trabekeldichte (BMD)

Es konnte kein Anstieg der mittleren Trabekeldichte unter Ligandroltherapie gezeigt werden. Jedoch stieg die mittlere Trabekeldichte der OVX-Gruppe sowie der mit Ligandrol behandelten Gruppen (0,04 mg, 0,4 mg, 4 mg) im Vergleich zur intakten Non-OVX-Gruppe signifikant an (Abb. 26, Tab. A5).

3.4.7 Trabekelvolumen

Die Non-OVX-Gruppe wies im Vergleich zu allen anderen Gruppen ein signifikant höheres Trabekelvolumen auf. Alle ovariectomierten Gruppen waren gegenüber Non OVX signifikant vermindert (Abb. 27, Tab. A5). Die Ligandrolbehandlung zeigte keine signifikante Veränderung des Trabekelvolumens gegenüber der OVX-Gruppe. Es zeigte sich lediglich eine dosisabhängige Tendenz der Volumensteigerung gegenüber OVX bei den beiden höchsten Ligandrol dosierungen (0,4 mg, 4 mg).

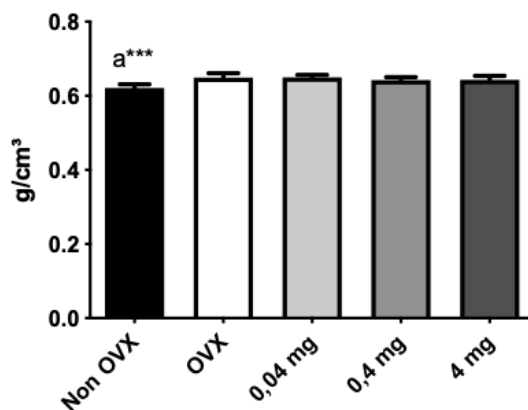


Abbildung 26: Darstellung der mittlere Trabekeldichte (BMD); a = Non OVX vs. alle übrigen Gruppen; ***p<0,001

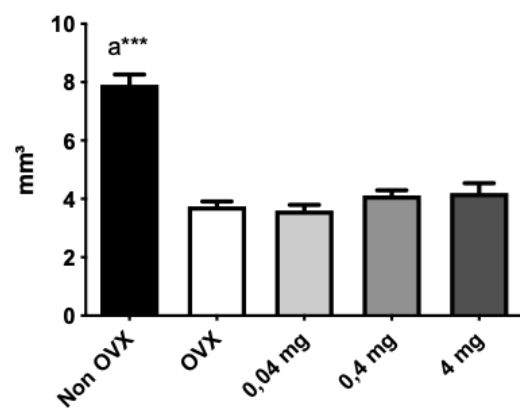


Abbildung 27: Darstellung des mittleren Trabekelvolumens; a = Non OVX vs. alle übrigen Gruppen; ***p<0,001

3.4.8 Gesamtdichte (BMD)

Bei der Analyse der mittleren Gesamtdichte konnte kein signifikanter Unterschied zwischen allen Untersuchungsgruppen gefunden werden. Sowohl die Ovariectomie als auch die Therapie mit Ligandrol führte zu keiner signifikanten Veränderung der mittleren Gesamtdichte (Abb. 28, Tab. A5)

3.4.9 Gesamtvolumen

Hinsichtlich des mittleren Gesamtvolumens zeigte sich eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Abnahme des Gesamtvolumens zwischen Non OVX und OVX. Die mittlere Ligandrol dosierung (0,4 mg) zeigte einen signifikanten Anstieg des Gesamtvolumens gegenüber der OVX-Gruppe (Abb. 29, Tab. A5) Unter höchster Ligandrol dosierung (4 mg) zeigte sich zwar eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Steigerung des Gesamtvolumens im Vergleich zur OVX-Gruppe.

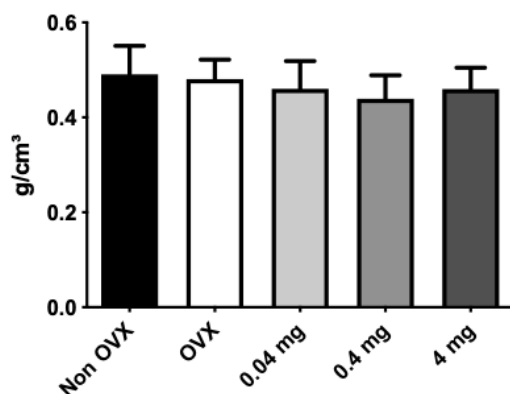


Abbildung 28: Darstellung der mittleren Gesamtdichte (BMD)

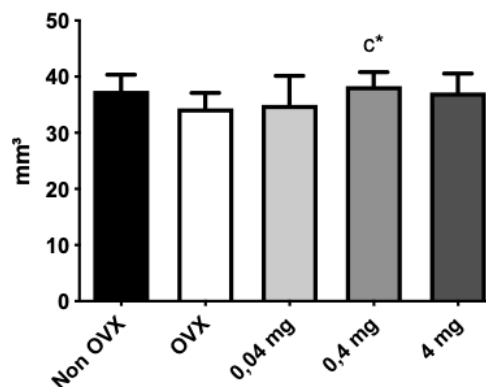


Abbildung 29: Darstellung des Gesamtvolumens; c = signifikant gegenüber OVX; * $p < 0,05$

3.4.10 BV/TV – bone volume / tissue volume

Die Non-OVX-Gruppe zeigte gegenüber allen anderen Versuchsgruppen ein signifikant erhöhtes BV/TV (Abb. 30, Tab. A5). Die ovariektomierten Gruppen (OVX, 0,04 mg, 0,4 mg, 4 mg) wiesen ein signifikant verringertes BV/TV auf. Es konnte durch Ligandrol kein signifikanter Anstieg des BV/TV gegenüber OVX erzielt werden.

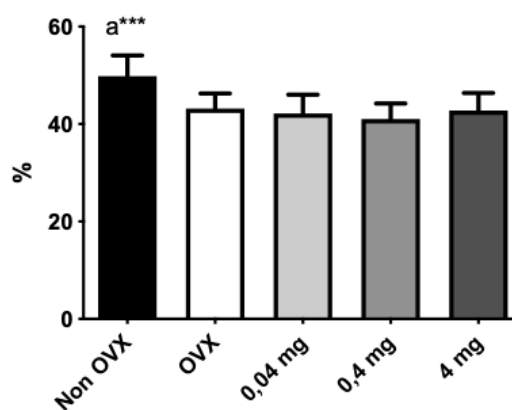


Abbildung 30: Darstellung von BV/TV; a = Non OVX vs. alle übrigen Gruppen; *** $p < 0,001$

3.5 2D-Analyse

3.5.1 Kortikalisfläche

Es konnte ein signifikanter Anstieg der Kortikalisfläche in den mit Ligandrol behandelten Versuchsgruppen gegenüber der Non-OVX-Gruppe gezeigt werden. Darüber hinaus war der Anstieg der Kortikalisfläche in der 0,4-mg-Gruppe und 4-mg-Gruppe signifikant im Vergleich zur OVX-Gruppe. Keinen signifikanten Unterschied gab es zwischen Non OVX und OVX. Die Gruppen 0,4 mg und 4 mg zeigten einen signifikanten Anstieg gegenüber der 0,04-mg-Gruppe (Abb. 31, Tab. A6)

3.5.2 Kortikalisdicke

Die OVX-Gruppe sowie die mit Ligandrol behandelten Gruppen (0,04 mg, 0,4 mg, 4 mg) wiesen gegenüber der Non-OVX-Gruppe eine signifikant dickere Kortikalis auf. Jede Ligandrol-Dosis steigerte die Kortikalisdicke im Vergleich zur OVX-Gruppe signifikant. Die niedrigste Dosis (0,04 mg) steigerte die Kortikalisdicke signifikant ($p < 0,05$), die höheren Ligandrol-Dosen (0,4 mg, 4 mg) hoch- bzw. höchstsignifikant ($p < 0,01$, $p < 0,001$) (Abb. 32, Tab. A6).

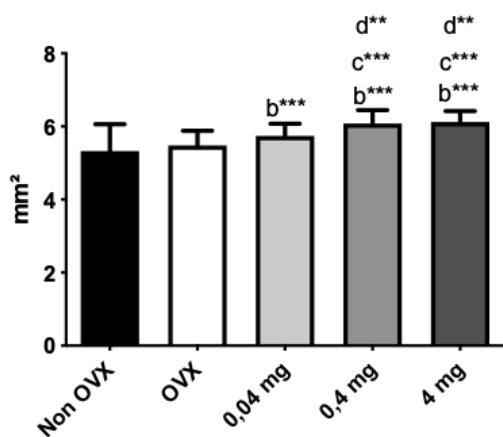


Abbildung 31: Darstellung der mittleren Kortikalisfläche; b = signifikant gegenüber Non OVX, c = signifikant gegenüber OVX, d = signifikant gegenüber 0,04 mg; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$

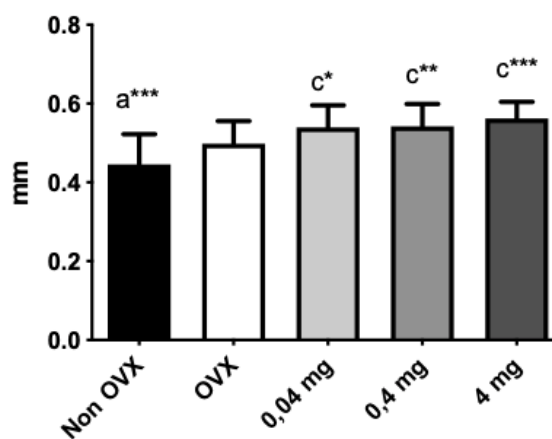


Abbildung 32: Darstellung der mittleren Kortikalisdicke; a = Non OVX vs. alle übrigen Gruppen, c = signifikant gegenüber OVX; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

3.5.3 Trabekelfläche

Bei den Ergebnissen der mittleren Trabekelflächen konnten ein signifikanter Unterschied zwischen dem intakten Knochen (Non OVX) und allen übrigen Gruppen gezeigt werden. Die OVX-Gruppe wies die niedrigste Trabekelfläche auf (Abb. 33, Tab. A6). Einen signifikanten Anstieg gegenüber der OVX-Gruppe stellte sich in der 4-mg-Gruppe dar. Eine steigende Tendenz gegenüber der OVX-Gruppe war auch bei niedrigeren Ligandrosen (0,04 mg, 0,4 mg) sichtbar, jedoch ohne signifikanten Nachweis.

3.5.4 Knochenflächendichte Trabekel

In der Analyse der mittleren trabekulären Knochenflächendichte zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Non OVX und den übrigen Versuchsgruppen. Der größte Unterschied zeigte sich zwischen Non OVX und der OVX-Versuchsgruppe bei einem Dichteunterschied der Mittelwerte von 33,37% (43,48% vs. 10,10%; Tab. A6). Zwischen der OVX-Gruppe und den Gruppen 0,04 mg und 0,4 mg zeigte sich eine ansteigende Tendenz ohne Signifikanz. Nur die 4-mg-Gruppe stieg in ihrer trabekulären Flächendichte signifikant im Vergleich zur OVX-Gruppe an (Abb. 34).

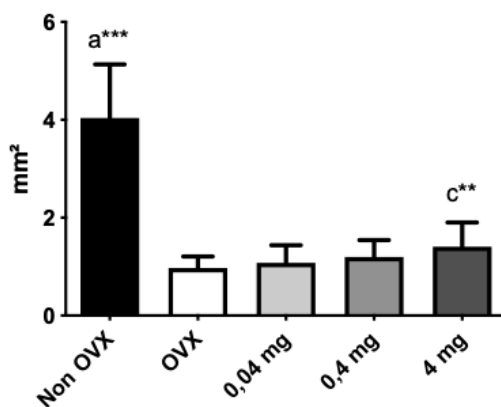


Abbildung 33: Darstellung der mittleren Trabekelfläche; a = Non OVX vs. alle übrigen Gruppen, c = signifikant gegenüber OVX; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$

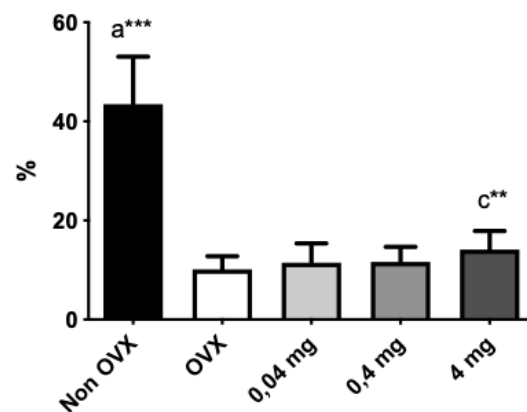


Abbildung 34: Darstellung der mittleren trabekulären Knochenflächendichte; a = Non OVX vs. alle übrigen Gruppen, c = signifikant gegenüber OVX; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$

3.5.5 Anzahl der Trabekelkreuzungen

Bei allen ovariectomierten Gruppen (OVX, 0,04 mg, 0,4 mg, 4 mg) konnte gegenüber der Non-OVX-Gruppe ein signifikanter Abfall der Anzahl der Trabekelkreuzungen festgestellt werden. Der größte Unterschied zeigte sich wieder zwischen Non OVX und OVX bei einer Differenz der Mittelwerte von 28,53 (Tab. A6). Unter Ligandroltherapie konnte ein kontinuierlicher Anstieg bei steigender Dosis tendenziell gezeigt werden, ohne diesen Anstieg bei den Gruppen 0,04 mg und 0,4 mg signifikant belegen zu können. Einzig die höchste Ligandrolldosis (4 mg) konnte einen signifikanten Anstieg gegenüber der OVX-Gruppe und der 0,04-mg-Gruppe aufzeigen (Abb. 35).

3.5.6 Dichte der Trabekelkreuzungen

In der Analyse der Dichte der Trabekelkreuzungen (n/mm^2) konnte ein signifikanter Abfall zwischen der Non-OVX- und der OVX-Gruppe gezeigt werden. Bei steigender Ligandrolldosis stieg die Dichte der Trabekelkreuzungen an, was in einem signifikanten Dichteanstieg der 0,4-mg- und 4-mg-Gruppe gegenüber der OVX-Gruppe sichtbar wurde (Abb. 36). Die 4-mg-Gruppe wies die höchste Dichte der Trabekelkreuzungen unter den mit Ligandrol behandelten Versuchsgruppen auf und unterscheidet sich nicht signifikant von der Non-OVX-Gruppe (Tab. A6). Ebenfalls signifikant war der Zuwachs der höchsten Ligandrolldosis im Vergleich zur niedrigsten Dosis (0,04 mg vs. 4 mg).

3.5.7 Trabekeldicke

Bei der mittleren Trabekeldicke zeigte sich eine signifikante Abnahme der Gruppen OVX, 0,04 mg, 0,4 mg und 4 mg gegenüber der Non-OVX-Gruppe (Abb. 37). Der niedrigste Mittelwert wurde in der OVX-Gruppe gemessen (Tab. A6). Durch die Gabe von Ligandrol konnte keine signifikante Steigerung der Trabekeldicke erreicht werden.

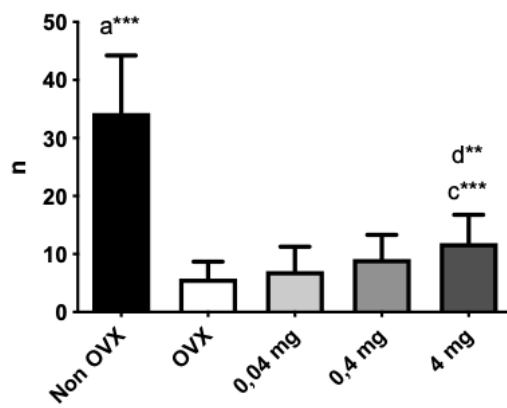


Abbildung 35: Darstellung der Anzahl der Trabekelkreuzungen (absolut); a = Non OVX vs. alle übrigen Gruppen, c = signifikant gegenüber OVX, d = signifikant gegenüber 0,04 mg; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$

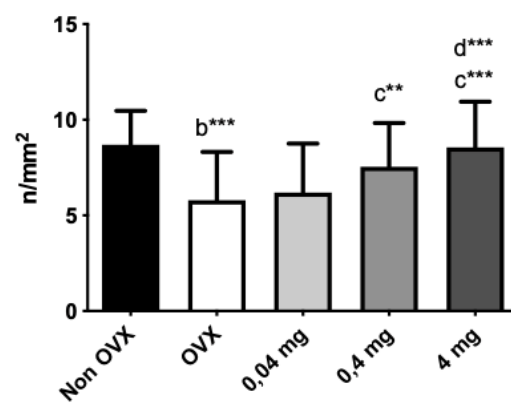


Abbildung 36: Darstellung der Dichte der Trabekelkreuzungen; b = signifikant gegenüber Non OVX, c = signifikant gegenüber OVX, d = signifikant gegenüber 0,04 mg; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$

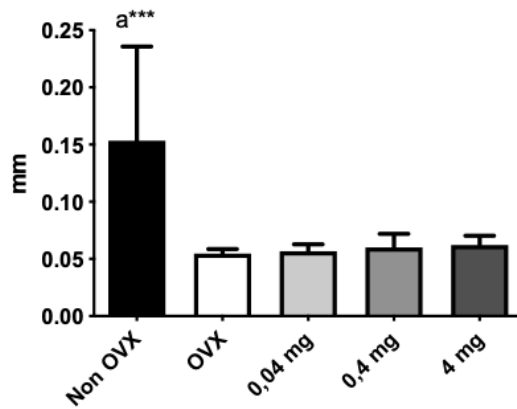


Abbildung 37: Darstellung der Trabekeldicke; a = Non OVX vs. alle übrigen Gruppen; *** $p < 0,001$

3.5.8 Bone marrow area

Bei der mittleren *bone marrow area* der unterschiedlichen Gruppen zeigten sich keine Unterschiede. Sowohl Ovariectomie als auch Ligandroltherapie bewirkten keine signifikanten Veränderungen (Abb. 38, Tab. A6).

3.5.9 Cross-sectional area

Bei der mittleren Gesamtquerschnittsfläche (*cross-sectional area*) zeigte sich eine tendenzielle Steigerung zwischen dem intakten Knochen (Non OVX) und der OVX-Gruppe. Ebenfalls zeigten die mit Ligandrol behandelten Versuchsgruppen (0,04 mg, 0,4 mg, 4 mg) eine tendenzielle Steigerung der *cross-sectional area* gegenüber der OVX-Gruppe (Abb. 39, Tab. A6). Signifikant angestiegene Mittelwerte zeigten die Gruppen 0,4 mg und 4 mg gegenüber der Non-OVX-Gruppe.

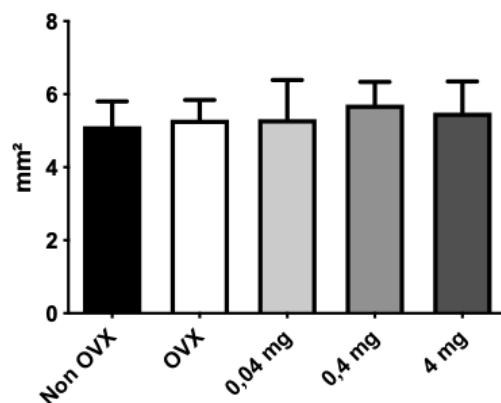


Abbildung 38: Darstellung der mittleren *bone marrow area*

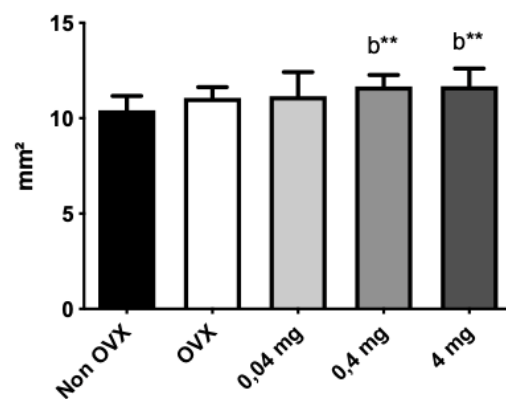


Abbildung 39: Darstellung der mittleren *cross-sectional area*; b = signifikant gegenüber Non OVX; **p<0,01

3.6 Biomechanischer Bruchtest

3.6.1 Streckgrenze – *yield load*

Hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,01$) hinsichtlich der Streckgrenze zeigten sich zwischen dem intakten Knochen (Non OVX) und der OVX-Gruppe. Unter Ligandroltherapie kam es zu keiner Veränderung der Streckgrenze im Vergleich zur OVX-Gruppe. Die mit Ligandrol behandelten Versuchsgruppen (0,04 mg, 0,4 mg, 4 mg) zeigten eine höchstsignifikant verminderte Streckgrenze im Vergleich zur Non-OVX-Gruppe (Abb. 40, Tab. A7).

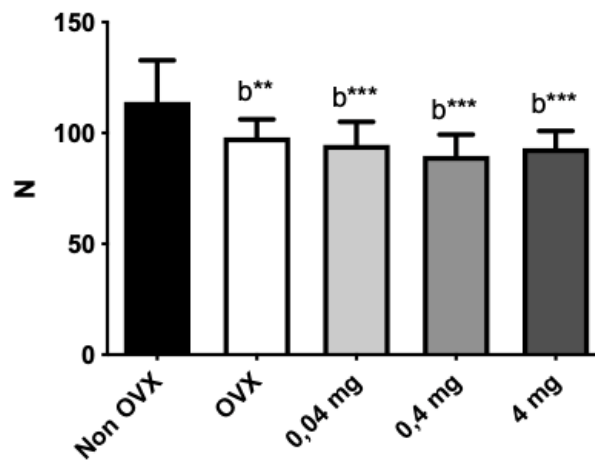


Abbildung 40: Darstellung der Streckgrenze – *yield load*; b = signifikant gegenüber Non OVX; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$

3.6.2 Maximalkraft – F_{\max}

Hochsignifikant unterschieden sich die Mittelwerte der Maximalkraft zwischen Non OVX und OVX ($p < 0,01$). Gegenüber den mit Ligandrol behandelten Versuchsgruppen (0,04 mg, 0,4 mg, 4 mg) unterschied sich der intakte Knochen (Non OVX) höchstsignifikant (** $p < 0,001$). Durch die Ligandrolbehandlung zeigten sich keine signifikanten Veränderungen gegenüber der OVX-Gruppe (Abb. 41, Tab. A7).

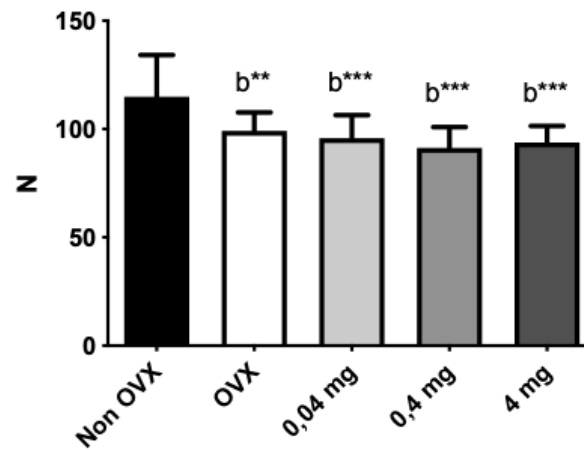


Abbildung 41: Darstellung der Maximalkraft – F_{\max} ; b = signifikant gegenüber Non OVX; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$

3.6.3 Elastizität – *stiffness*

Die mittlere Elastizität des intakten Knochens (Non OVX) unterschied sich signifikant von der OVX-Gruppe ($p < 0,05$). Zwischen der OVX-Gruppe und den mit Ligandrol behandelten Gruppen (0,04 mg, 0,4 mg, 4 mg) konnte kein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden. Hochsignifikant ($p < 0,01$) vermindert war die Elastizität der Gruppen 0,04 mg, 0,4 mg und 4 mg im Vergleich zur Non-OVX-Gruppe (Abb. 42, Tab. A7).

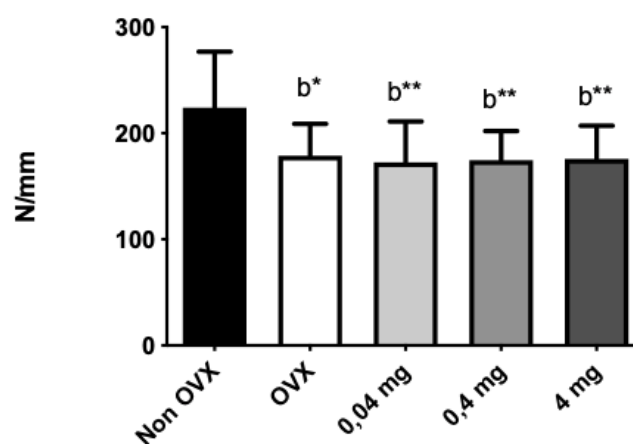


Abbildung 42: Darstellung der Elastizität – *stiffness*; b = signifikant gegenüber Non OVX; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

3.7 Molekularbiologische Analyse

3.7.1 RANK-Ligand

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Non OVX und OVX nachgewiesen werden. Es zeigte sich in der OVX-Gruppe lediglich ein tendenzieller Anstieg gegenüber Non OVX. Die höchste durchschnittliche Genexpression des RANK-Liganden wurde in der OVX-Gruppe bestimmt ($1,526 \pm 0,7648$, Tab. A8). Des Weiteren zeigte sich ein dosisabhängiger Abfall der Genexpression in den mit Ligandrol behandelten Versuchsgruppen (0,04 mg, 0,4 mg, 4 mg). Eine signifikant verminderte Genexpression im Vergleich zu OVX zeigte sich bei 4 mg (Abb. 43).

3.7.2 Osteoprotegerin – OPG

Keine signifikanten Unterschiede konnten in der Genexpression von Osteoprotegerin gezeigt werden. Der höchste Wert wurde in der 0,04-mg-Gruppe gemessen ($1,370 \pm 0,4677$, Tab. A8). Die Mittelwerte der Gruppen Non OVX, 0,4 mg und 4 mg sind auf ähnliche Werte gesunken (Abb. 44). Der niedrigste Wert wurde bei 4 mg erreicht ($0,9343 \pm 0,3353$, Tab. A8).

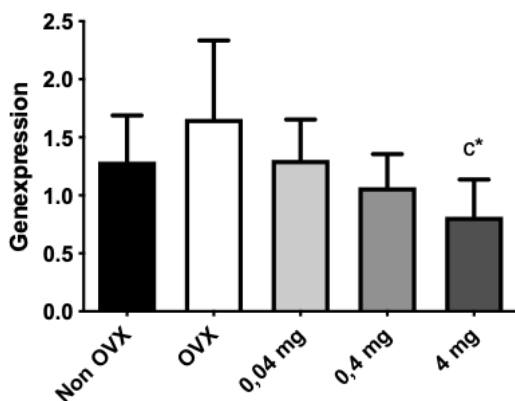


Abbildung 43: Genexpression des RANK-Liganden; c = signifikant gegenüber OVX; * $p < 0,05$

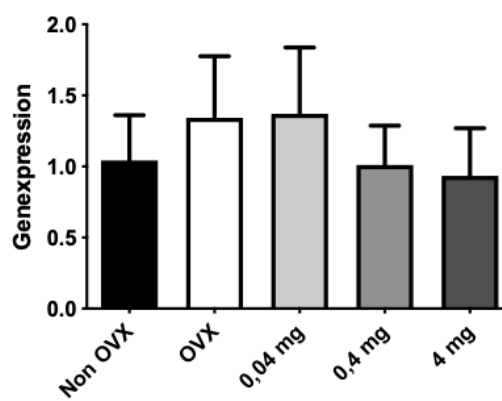


Abbildung 44: Genexpression von Osteoprotegerin

3.7.3 Tartrate-resistent acid phosphatase – TRAP

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen hinsichtlich der Genexpression der TRAP gezeigt werden (Abb. 45, Tab. A8).

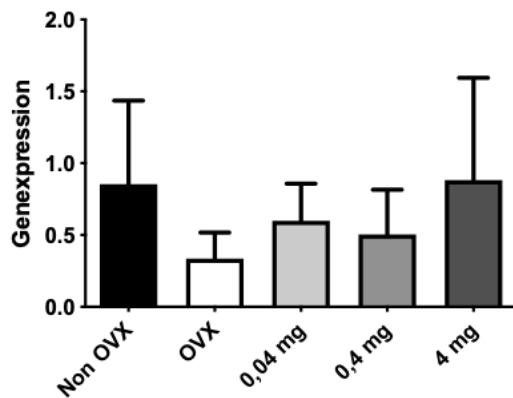


Abbildung 45: Genexpression der TRAP

3.7.4 Osteocalzin – OC

Der höchste Mittelwert der relativen Genexpression von Osteocalzin wurde bei 4 mg ermittelt ($1,103 \pm 1,164$, Tab. A8) und war damit leicht erhöht im Vergleich zu Non OVX ($1,075 \pm 0,8694$, Tab. A8). Der niedrigste Mittelwert zeigte sich in der OVX-Gruppe ($0,2672 \pm 0,1708$, Tab. A8). Es zeigte sich ein tendenziell dosisabhängiger Anstieg in den Gruppen 0,04 mg, 0,4 mg und 4 mg, der jedoch nicht signifikant bewiesen werden konnte (Abb.46).

3.7.5 Estrogenrezeptor α – ER α

Der höchste Mittelwert der Genexpression wurde in der Non-OVX-Gruppe bestimmt ($0,002030 \pm 0,001723$, Tab. A8). Eine Abnahme der Mittelwerte zeigte sich in allen übrigen Gruppen. Bei 4 mg wurde der niedrigste Mittelwert bestimmt ($0,001207 \pm 0,0004685$, Tab. A8). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gezeigt werden (Abb. 47).

3.7.6 Androgenrezeptor – AR

Die Unterschiede in den Mittelwerten zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen wurden als nicht signifikant gewertet (Abb. 48). Der höchste Mittelwert wurde in der Non-

OVX-Gruppe erzielt ($0,8205 \pm 0,2240$, Tab. A8). Der niedrigste Wert in der 4-mg-Gruppe ($0,5489 \pm 0,2080$, Tab. A8).

3.7.7 Alkalische Phosphatase – AP

Bei der Genexpression der alkalischen Phosphatase zeigten sich zwischen allen Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede. Es zeigte sich die Tendenz eines dosisabhängigen Abfalls zwischen den Gruppen 0,04 mg, 0,4 mg und 4 mg (Abb. 49). Der niedrigste Mittelwert wurde bei 4 mg gemessen ($1,077 \pm 0,7717$, Tab. A8).

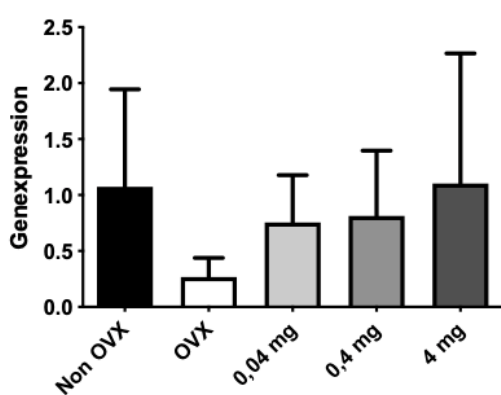


Abbildung 46: Genexpression von Osteocalzin

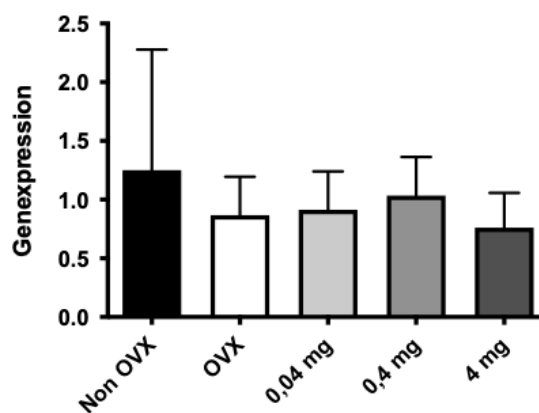


Abbildung 47: Genexpression des Estrogenrezeptors α

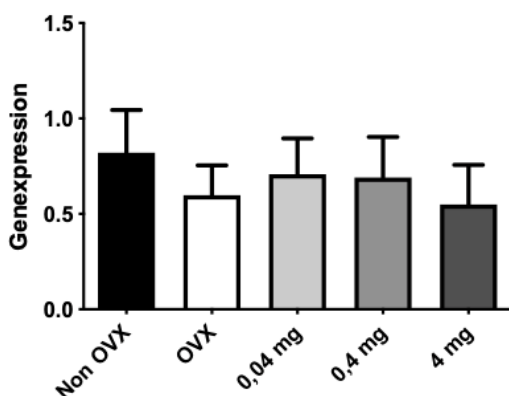


Abbildung 48: Genexpression des Androgenrezeptors

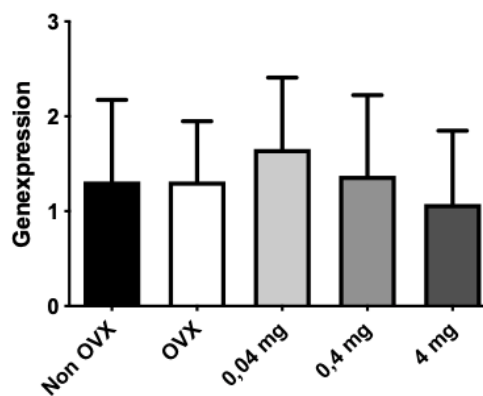


Abbildung 49: Genexpression der alkalischen Phosphatase

3.8 Gesamtübersicht der Ergebnisse

In der Gesamtübersicht der Ergebnisse wurde die Unterschiede zwischen dem intakten Knochen (Non OVX) und dem unbehandelten, osteoporotischen Knochen (OVX) zusammengefasst. Des Weiteren wurden die Veränderungen durch unterschiedliche Dosen von Ligandrol auf den osteoporotischen verglichen (OVX vs. Ligandrol). Signifikante Unterschiede werden mit einem Doppelpfeil ($\uparrow\uparrow/\downarrow\downarrow$), tendenzielle Veränderungen mit einem einfachen Pfeil (\uparrow/\downarrow) versehen.

Tabelle 9: Zusammenfassende Übersicht der 3D-Analyse

<i>3D – Analyse</i>	OVX vs. Ligandrol			
	OVX vs. Non OVX	0,04 mg vs. OVX	0,4 mg vs. OVX	4 mg vs. OVX
Kortikalis BMD (g/cm ³)	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow
Kortikalis Volumen (mm ³)	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\uparrow	\uparrow
Kortikalisfläche (mm ²)	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow$
Kortikalis + Trabekel BMD (g/cm ³)	$\uparrow\uparrow$	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow
Kortikalis + Trabekel Volumen (mm ³)	$\downarrow\downarrow$	\leftrightarrow	\uparrow	\uparrow
Trabekel BMD (g/cm ³)	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow
Trabekelvolumen (mm ³)	$\downarrow\downarrow$	\leftrightarrow	\uparrow	\uparrow
Gesamtdichte (g/cm ³)	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\downarrow	\leftrightarrow
Gesamtvolumen (mm ³)	\leftrightarrow	\leftrightarrow	$\uparrow\uparrow$	$\downarrow\downarrow$
BV/TV (%)	$\downarrow\downarrow$	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow

$\uparrow\uparrow/\downarrow\downarrow$ signifikante Veränderung, \uparrow/\downarrow Tendenz, \leftrightarrow keine Veränderung

Tabelle 10: Zusammenfassende Übersicht der 2D-Analyse

<i>2D - Analyse</i>	OVX vs. Ligandrol			
	OVX vs. Non OVX	0,04 mg vs. OVX	0,4 mg vs. OVX	4 mg vs. OVX
Kortikalisfläche (mm ²)	↔	↑	↑↑	↑↑
Kortikalisdicke (mm)	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
Trabekelfläche (mm ²)	↓↓	↑	↑	↑↑
Knochenflächendichte Trabekel (%)	↓↓	↑	↑	↑↑
Anzahl Trabekelkreuzungen (n)	↓↓	↑	↑	↑↑
Dichte Trabekelkreuzungen (n/mm ²)	↓↓	↑	↑↑	↑↑
Trabekeldicke (mm)	↓↓	↔	↑	↑
<i>Bone marrow area</i> (mm ²)	↔	↔	↔	↔
<i>Cross-sectional area</i> (mm ²)	↑	↔	↑	↑

↑↑/↓↓ signifikante Veränderung, ↑/↓ Tendenz, ↔ keine Veränderung

Tabelle 11: Zusammenfassende Übersicht des Biomechanischen Bruchtests

<i>Biomechanischer Bruchtest</i>	OVX vs. Ligandrol			
	OVX vs. Non OVX	0,04 mg vs. OVX	0,4 mg vs. OVX	4 mg vs. OVX
Streckgrenze – <i>yield load</i> (N)	↓↓	↔	↔	↔
Maximalkraft – F_{\max} (N)	↓↓	↔	↔	↔
Elastizität – <i>stiffness</i> (N/mm)	↓↓	↔	↔	↔

↑↑/↓↓ signifikante Veränderung, ↑/↓ Tendenz, ↔ keine Veränderung

Tabelle 12: Zusammenfassende Übersicht der Molekularbiologischen Analyse

Molekularbiologische Analyse Parameter	OVX vs. Ligandrol			
	OVX vs. Non OVX	0,04 mg vs. OVX	0,4 mg vs. OVX	4 mg vs. OVX
RANK-Ligand	↑	↓	↓	↓↓
Osteoprotegerin	↔	↔	↔	↔
TRAP	↔	↔	↔	↔
Osteocalzin	↓	↑	↑	↑
Estrogenrezeptor α	↔	↔	↔	↔
Androgenrezeptor	↔	↔	↔	↔
Alkalische Phosphatase	↔	↔	↔	↔

↑↑/↓↓ signifikante Veränderung, ↑/↓ Tendenz, ↔ keine Veränderung

Tabelle 13: Zusammenfassende Übersicht des Uterusgewichts

Parameter	OVX vs. Ligandrol			
	OVX vs. Non OVX	0,04 mg vs. OVX	0,4 mg vs. OVX	4 mg vs. OVX
Uterusgewicht (g)	↓↓	↔	↔	↑↑

↑↑/↓↓ signifikante Veränderung, ↑/↓ Tendenz, ↔ keine Veränderung

4 Diskussion

Zur Einordnung der in diesem Versuch erlangten Ergebnisse dienen u. a. präklinische Studien anderer SARMs am ovariectomierten Rattenmodell (Hanada et al. 2003; Kearbey et al. 2007; Vajda et al. 2009a; Furuya et al. 2012). Dabei sei darauf hingewiesen, dass es sich bei den verschiedenen SARMs um unterschiedlich modifizierte Moleküle handelt, die je nach Arbeitsgruppe von unterschiedlichen Herstellern bezogen wurden. Die Ergebnisse anderer Studien werden orientierend für die Diskussion herangezogen. Ein direkter Vergleich der Potenz und Selektivität der unterschiedlichen SARMs erweist sich als schwierig, obwohl sich einige SARMs dank vielversprechender Ergebnisse in präklinischen Studien schon in Phase I oder II von klinischen Studien befinden. Grund dafür ist die Tatsache, dass viele der Daten von Pharmaunternehmen generiert wurden und bisher unveröffentlicht blieben (Bhasin und Jasuja 2009; Narayanan et al. 2018).

4.1 Diskussion der Versuchstiergewichte, der Futteraufnahme und der Liganddosis

Im Verlauf des Versuchs zeigte sich eine stetige Gewichtszunahme aller Versuchstiere. Diese stetige Körpergewichtszunahme bei drei Monate alten Ratten, die in den ersten Monaten kontinuierlich wachsen und freien Zugang zu Futter hatten, war zu erwarten (Kalu 1999). Es kam zu einem steilen Anstieg des Körpergewichts aller ovariectomierten Tiere (OVX, 0,04 mg, 0,4 mg, 4 mg), was zu signifikanten Unterschieden gegenüber Non OVX nach zwei Versuchswochen führte. Dieser signifikante Unterschied blieb bis Versuchsende bestehen. Ein solcher Verlauf der Versuchstiergewichte zeigte sich schon in anderen Studien am ovariectomierten Rattenmodell (Komrakova et al. 2015; Komrakova et al. 2016; Hoffmann et al. 2018). Eine signifikante Gewichtszunahme nach Ovariectomie konnte auch in detaillierten Langzeitstudien bei OVX-Ratten beobachten werden (Wronski et al. 1989) und ist ein bekanntes Phänomen aus vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe (Komrakova et al. 2009; Komrakova et al. 2010). Ebenfalls zeigte sich eine signifikant erhöhte Futteraufnahme der ovariectomierten Tiere (OVX, 0,04 mg, 0,4 mg, 4 mg vs. Non OVX) innerhalb der ersten sieben Versuchswochen. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Ovariectomie und der damit verursachte Östrogenabfall die Nahrungsaufnahme und somit das Körpergewicht signifikant erhöhen (Butera 2010). Im Einklang damit steht die erhöhte Prävalenz von Gewichtszunahme bei postmenopausalen Frauen (Svendsen et al. 1995). Eine weitere Ursache für das erhöhte Körpergewicht bei den ovariectomierten Ratten könnte eine verminderte nächtliche Aktivität sein (Izumo et al. 2012). In dieser Studie waren die Versuchstiere zwar einem zirkadianem Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt, Veränderungen in der nächtlichen Aktivität konnten jedoch nicht objektiviert und valide gemessen werden.

Die Ligandroltherapie blieb ohne Einfluss auf das Körpergewicht (vs. OVX). Vajda et al. (2009a) zeigten für den Wirkstoff LGD-3303 einen signifikanten Zuwachs des Körpergewichts gegenüber OVX. Kearbey et al. (2007) konnten das nur für die höchste Dosierung (3 mg) des SARMS S-4 (Andarine) bestätigen. Das SARM Ostarine zeigte keine Gewichtszunahme der behandelten Tiere gegenüber OVX (Hoffmann et al. 2018). Diese unterschiedlichen Ergebnisse implizieren, dass die Gewichtszunahme vom verwendeten Medikament und dessen Wirkung auf das Skelettmuskelwachstum bzw. die fettfreie Körpermasse (*lean body mass*) abhängig ist.

Während der oralen Ligandroltherapie zeigten sich nur in Versuchswoche zehn und zwölf signifikant erhöhte Futterraufnahmen der Versuchstiere (0,04 mg, 0,4 mg, 4 mg) gegenüber Non OVX. Keine signifikanten Unterschiede in der Futterraufnahme waren zwischen den mit Ligandrol behandelten Gruppen und OVX auszumachen. Damit scheint Ligandrol die tägliche Futterraufnahme nicht signifikant zu beeinflussen. Stellenweise aufgetretene Signifikanzen zwischen den Gruppen könnten externen Faktoren der Tierhaltung zugeschrieben werden, die nicht objektivierbar sind. Des Weiteren zeigten sich keine signifikanten Veränderungen in der Futterraufnahme zwischen den mit Ligandrol gefütterten Gruppen im Verlauf der Therapie. Dies spiegelte sich in den konstant aufgenommenen Ligandroidosen während der fünfwöchigen Therapie wider.

Die angestrebten Ligandroidosen von 0,04 mg/kg KG; 0,4 mg/kg KG und 4 mg/kg KG wurden bei oraler Wirkstoffapplikation über das Futter fast erreicht. Ein Grund für die etwas niedrigeren Dosen war die bei Versuchsplanung angenommene durchschnittliche Futterraufnahme von 25 g pro Tier pro Tag. Diese Menge an Futterraufnahme wurde während der Ligandroltherapie in keiner Woche erreicht. Ausgleichend wirkte jedoch das zu hoch angenommene Durchschnittsgewicht von 350 g pro Tier. Tiergewicht und tägliche Futterraufnahme bildeten die Grundlage für die Menge an Wirkstoff, die dem Futter im Vorfeld beigemischt wurden. Als Orientierung für das bei Versuchsplanung angenommene Durchschnittsgewicht von 350 g pro Tier und die Futterraufnahme von 25 g pro Tier pro Tag dienten andere Studien der Arbeitsgruppe, die mit dem gleichen Rattenstamm (Sprague Dawley) gearbeitet haben (Komrakova et al. 2015; Komrakova et al. 2016; Komrakova et al. 2018).

Dennoch konnte die zehnfache Dosissteigerung zwischen den Versuchsgruppen zur Evaluation einer dosisabhängigen Wirkung erhalten werden. Darüber hinaus gaben mehrere präklinische Untersuchungen mit verschiedenen SARMS an, ähnliche Dosierungen verwendet zu haben (Kearbey et al. 2007; Vajda et al. 2009a; Furuya et al. 2012).

4.2 Uterusgewicht und Gewebeselektivität

Selektive Androgenrezeptor-Modulatoren (SARMs) versprechen eine Aktivierung des Androgenrezeptors in anabolen Geweben wie Muskel- und Knochengewebe ohne dabei unerwünschte Nebenwirkungen bei Frauen (z. B. Virilisierung) hervorzurufen. Sie sind damit gewebe selektiv. Unerwünschte Androgenwirkungen auf den Fettstoffwechsel, die Leberenzyme, kardiovaskuläre Risikofaktoren sowie das Größenwachstum der Prostata bzw. des Uterus sollen vermieden werden (Negro-Vilar 1999).

Um den Erfolg der Ovariectomie nachweisen zu können und die gewebe selektive Wirkung von Ligandrol zu evaluieren, wurde das Uterusgewicht der Versuchstiere am Versuchsende gemessen. Des Weiteren ließen sich an Veränderungen des Uterusgewichts die gewebe selektive Wirkung von Ligandrol beurteilen. Im Uterusgewebe konnten Androgenrezeptoren nachgewiesen werden, ohne deren Rolle im weiblichen Zyklus genau erklären zu können (Horie et al. 1992).

In diesem Versuch zeigte sich ein signifikanter Abfall des Uterusgewichts durch Ovariectomie, was deren Erfolg bestätigte. Bei niedrigen Ligandrol Dosen (0,04 mg, 0,4 mg) blieb das Uterusgewicht verglichen mit OVX unverändert. Die höchste Dosis (4 mg) zeigte jedoch einen signifikanten Anstieg des Uterusgewichts im Vergleich zur OVX-Gruppe und den anderen Therapiegruppen. Eine andere präklinische Studie mit einem SARM beschrieb ebenfalls ein erhöhtes Uterusgewicht bei höheren Dosierungen (3 mg, 10 mg). Jedoch wurden in dieser Studie zusätzlich zum Gewicht histologische Veränderungen am Endometrium und Myometrium untersucht. Hier konnten bei den mit SARMs behandelten Versuchsgruppen im Gegensatz zu der mit DHT behandelten Versuchsgruppe keine suspekten Veränderungen am Endometrium festgestellt werden. Außerdem fiel die Gewichtszunahme des Uterus bei den SARMs-Gruppen deutlich geringer aus als bei DHT (Furuya et al. 2012).

Dennoch muss die Gewebeselektivität von Ligandrol in der 4-mg-Gruppe kritisch betrachtet werden, da die Gewichtszunahme des Uterus bzw. die Uterushyperplasie eine ernstzunehmende Nebenwirkung ist und das Risiko für neoplastische Veränderungen sowie Endometriose birgt. Sicher werden weitere Untersuchungen des Gewebes notwendig sein, um die Ligandrolwirkung auf den Uterus vollständig zu evaluieren. Gleichwohl könnte dies eine dosislimitierende Nebenwirkung darstellen.

4.3 3D-Analyse

Die DXA-Methodik ist der Goldstandard zur Bestimmung der Knochendichte beim Menschen (Newton et al. 2003; Bartl 2010). Die Sensitivität des Geräts und die Positionierung der kleinen Tiere stellt jedoch ein Problem der Dichteanalyse mittels DXA im Tierversuch dar (Kearbey et al. 2007). Die in diesem Versuch verwendete quantitative

Computertomographie ermittelt die Knochendichte (mg/cm^3) im dreidimensionalen Raum (Voxel) und ermöglicht im Gegensatz zur zweidimensionalen Messung der Knochendichte (mg/cm^2) eine Unterscheidung zwischen kortikalem und trabekulärem Knochen (Adler 2010). Die Differenzierung zwischen Kortikalis und Trabekel ist wichtig, da beide unterschiedlich auf hormonelle Einflüsse reagieren (Chan et al. 2015).

Dennoch wurde die DXA-Methodik zur Bestimmung der Knochendichte in vielen anderen präklinischen Studien mit SARMs verwendet. Hier wurden der BMC (*bone mineral content*) und die AREA (*projected bone area*) gemessen und daraus der BMD (*bone mineral density*) berechnet ($\text{BMD} = \text{BMC}/\text{AREA}$) (Hanada et al. 2003; Kearbey et al. 2007; Furuya et al. 2012). Diese Berechnung der BMD stellt in der Arbeit mit Androgenen im Gegensatz zu der Arbeit mit antiresorptiven Wirkstoffen ein Problem dar, da sich bei Androgenen die Knochenfläche (AREA) durch eine Verbreiterung der Kortikalis verändert. Antiresorptive Therapien hingegen verändern die Größe des Knochens nicht, sondern verändern hauptsächlich das Knochenvolumen. Hier würde die BMD-Bestimmung aus BMC und AREA im Gegensatz zur Arbeit mit Androgenen keine Limitation darstellen (Furuya et al. 2012).

In diesem Versuch zeigte sich die Kortikalisdichte (BMD) sowohl durch Ovariectomie als auch durch Ligandroltherapie unbeeinflusst. Hanada et al. (2003) sowie Furuya et al. (2012) konnten mit anderen SARMs eine signifikante Steigerung der kortikalen Knochendichte gegenüber dem osteoporotischen Knochen und dem unbehandelten Kontrollknochen erzielen. Die Diskrepanz zu diesen Ergebnissen könnte sich zum einen durch die unterschiedlichen Methoden der BMD-Messung (qCT vs. DXA; mg/cm^3 vs. mg/cm^2), zum anderen durch unterschiedlich lange Applikationszeiträume des SARMs (fünf Wochen vs. zwölf Wochen) erklären lassen. Auch Kearbey et al. (2007) konnten mit dem SARM S-4 (Andarine) eine signifikante Zunahme der Kortikalisdichte (BMD) gegenüber OVX feststellen. Die BMD wurde in diesem Fall ebenfalls mit der quantitativen Computertomographie gemessen. Den Unterschied zu diesem Ergebnis könnte eine sehr lange Therapiedauer (120 Tage) mit S-4 erklären. Des Weiteren wurde das SARM den Ratten täglich subkutan appliziert (vs. orale Aufnahme).

Beim Kortikalisvolumen zeigten die höheren Ligandrosen (0,4 mg, 4 mg) eine tendenzielle Steigerung. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der unter Ligandrol signifikant angestiegenen Kortikalisfläche und der signifikant gestiegenen Kortikalisdicke der 2D-Analyse. Somit bestätigen auch die Kortikalisparameter der 3D-Auswertung eine positive Wirkung von Ligandrol auf die periostale Knochenformation. Die Stimulation der periostalen Knochenformation am osteoporotischen Rattenmodell mit weiblichen Tieren wurde für andere SARMs wie LGD 3303, S-101479, S-40503 und S-4 (Andarine) ebenfalls beschrieben (Hanada et al. 2003; Kearbey et al. 2007; Vajda et al. 2009a; Furuya et al. 2012).

Der trabekuläre Knochen hat im Vergleich zur Kortikalis einen höheren Knochenumsatz (*bone turnover*) und ist daher sensibler gegenüber hormonellen Einflüssen und Immobilisation (Hanada et al. 2003; Kini und Nandeesh 2012). Ähnlich wie bei Menschen, hat der

Östrogenmangel bei Ratten gravierendere Auswirkungen auf den trabekulären Knochen als auf die Kortikalis (Hogan et al. 2000). Das bestätigte das Ergebnis des Trabekelvolumens. Hier zeigte sich nach Ovariectomie ein signifikant reduziertes Volumen, welches nur durch die beiden höchsten Ligandrosen (0,4 mg, 4 mg) tendenziell – jedoch nicht signifikant – erhöht wurde. Ein signifikant verringertes BV/TV nach Ovariectomie bestätigte die Wirkung der Hormonkarenz, die sich besonders in den ersten Monaten (*rapid bone loss phase*) stark auf das Trabekelnetz auswirkt (Hogan et al. 2000). Bei der Trabekeldichte (BMD) konnte genau wie bei BV/TV und dem Trabekelvolumen keine signifikante Verbesserung durch Ligandroltherapie gegenüber OVX erzielt werden. Hanada et al. (2003) stellten mit dem SARM S-40503 ebenfalls keine signifikante Veränderung der Trabekeldichte (BMD) bei OVX-Ratten fest. Hier wurde eine ähnlich kurze Therapiedauer (acht Wochen) wie in diesem Versuch (fünf Wochen) gewählt. Andere SAMRs-Studien konnten jedoch eine signifikante Wirkung auf den trabekulären Knochen zeigen (Kearbey et al. 2007; Vajda et al. 2009a; Furuya et al. 2012). Längere Applikationszeiträume könnten auch hier den Unterschied erklären (Kearbey et al. 2007: 120 Tage; Vajda et al. 2009a und Furuya et al. 2012 je zwölf Wochen).

Gemeinsam ist jedoch allen hier genannten Studien, dass die Wirkung von SAMRs auf die Kortikalis deutlich ausgeprägter ist als auf den trabekulären Knochen und SAMRs deshalb primär die periostale Knochenformation stimulieren. (Hanada et al. 2003; Kearbey et al. 2007; Vajda et al. 2009a; Furuya et al. 2012). Dies bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit.

4.4 2D-Analyse

Die zweidimensionalen Schnittbilder, die aus den CT-Scans generiert wurden, eignen sich neben der Untersuchung kortikaler Parameter (Dicke, Flächendichte) besonders gut für die Analyse des Trabekelnetzwerks. Schon in vielen vorherigen Studien dieser Arbeitsgruppe wurde diese Methode verwendet, um Veränderungen durch unterschiedliche Wirkstoffe auf die Knochen- und Frakturheilung zu untersuchen (Kolios et al. 2009; Stürmer et al. 2009; Komrakova et al. 2010; Saul et al. 2017). Das Trabekelnetzwerk reagiert besonders schnell und sensibel auf hormonelle Einflüsse mit einem veränderten Knochenremodelling. Die erhöhte Frakturanfälligkeit des osteoporotischen Knochens nur am Verlust der Knochenmasse festzumachen, wäre zu einfach. Von besonderer Bedeutung ist auch die Größe und Orientierung der Trabekel sowie deren Verbindungen untereinander (Parfitt et al. 1983). Cole und van der Meulen (2010) beschreiben neben der Knochendichte zwei weitere Faktoren, die ausschlaggebend für die Integrität des Knochens sind: die Materialeigenschaften (*material properties*) und die Mikroarchitektur des Knochens. Letztere wurde in der 2D-Analyse dieser Studie untersucht. Viele präklinische Studien mit anderen SAMRs beleuchteten diesen Aspekt der Knochenintegrität bisher nicht. Hier wurde lediglich

die Knochendichte mittels Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DXA) untersucht (Hanada et al. 2003; Kearbey et al. 2007; Vajda et al. 2009a).

Bei der Analyse der zweidimensionalen Schnitte zeigte sich nach Ovariectomie eine deutliche Abnahme sowohl der absoluten Anzahl der Trabekelkreuzungen (n) als auch der Dichte der Trabekelkreuzungen (n/mm^2). Diese drastische Abnahme der Trabekelparameter nach der Ovariectomie ist konsistent mit Ergebnissen anderer Studien am ovariectomierten Rattenmodell (Chen et al. 1995; Yamaura et al. 1996). Die Ligandroltherapie initiierte eine dosisabhängige osteoanabole Wirkung auf diese beiden Parameter mit signifikanten Anstiegen unter höchster Dosierung. Somit konnte die höchste Ligandrolldosis (4 mg) die Knotenpunkte zwischen den Trabekeln, die beim osteoporotischen Knochen aufgelöst sind und zu einem erhöhten Frakturrisiko führen (Bartl 2010), teilweise wiederherstellen und damit die Knochenintegrität verbessern. Eine vollständige Regeneration des Trabekelnetzwerks wie beim gesunden Knochen (Non OVX) konnte jedoch nicht erreicht werden.

Die Trabekelfläche (mm^2) und trabekuläre Knochenflächendichte (%) nahmen nach Ovariectomie ebenfalls signifikant ab und bestätigen damit die Ergebnisse von Chen et al. (1995) und Yamaura et al. (1996). Die osteoanabole Wirkung der höchsten Ligandrolldosis (4 mg) auf die oben genannten Parameter der Trabekelarchitektur (Anzahl und Dichte der Trabekelkreuzungen) spiegelte sich dementsprechend auch in einer signifikant angestiegenen Trabekelfläche und trabekulären Knochenflächendichte wider.

Auf den ersten Blick verwunderlich ist die Tatsache, dass die Trabekelfläche unter 4 mg signifikant anstieg, das Trabekelvolumen (3D-Analyse) jedoch nur tendenziell wuchs. Wegweisend könnte neben den unterschiedlichen Auswertungsmethoden (3D vs. 2D) die mittlere Trabekeldicke sein. Diese nahm nach Ovariectomie signifikant ab, konnte jedoch selbst unter höchster Ligandrolldosis nicht signifikant gesteigert werden.

Die anabole Wirkung von nicht-steroidalen SARMs auf die Kortikalis, die schon in anderen SARMs-Studien am ovariectomierten Rattenmodell beschrieben wurde (Hanada et al. 2003; Kearbey et al. 2007), konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Bei Kearbey et al. (2007) zeigte sich durch das SARM Andarine (S-4) eine signifikante Zunahme der Kortikalisdicke im Vergleich zu OVX. Dieser anabole Effekt auf die Kortikalisdicke gegenüber OVX konnte in dieser Arbeit für jede Ligandrolldosis bestätigt werden und spiegelte sich auch in einer signifikant vergrößerten Kortikalisfläche wider (0,4 mg und 4 mg vs. OVX).

Die signifikante Verbesserung dieser Kortikalisparameter gegenüber OVX und die damit einhergehende Verbreiterung des Knochens zeigt einen weiteren interessanten Therapieansatz von Ligandrol, um der erhöhten Frakturanfälligkeit des osteoporotischen Knochens entgegenzuwirken: Das Massenträgheitsmoment (*moment of inertia*) aus der Biomechanik besagt, dass die Biegekraft, in unserem Fall die eines Knochens, in vierter Potenz vom Radius bzw. der Distanz zur neutralen Achse abhängig ist (Seeman 2003; Cole und van der Meulen 2010). Die Verdickung des Knochens unter Ligandrol vergrößert den

Radius bzw. die Distanz zur neutralen Achse und in Folge dessen das Massenträgheitsmoment bzw. die Biegekraft.

Auch durch Ovariectomie wurde die Kortikalisdicke signifikant gegenüber Non OVX gesteigert. Dieses Ergebnis lässt sich dadurch erklären, dass der Östrogenmangel ebenfalls stimulierend auf die periostale Knochenformation wirkt. Dieser Mechanismus versucht den gesteigerten Verlust von endokortikalem Knochen bei Osteoporose zu kompensieren (Seeman 2003). Vanderschueren et al. (2004) beschreiben ebenfalls eine Stimulation der periostalen Knochenformation nach Ovariectomie bei weiblichen Ratten.

Die Kortikalisdicke wird bestimmt durch periostale Expansion oder durch die Reduktion der endokortikalen Oberfläche. Somit ist die Kortikalisdicke das Resultat der Wachstumsvorgänge an diesen beiden Oberflächen und abhängig von unterschiedlichen regulierenden Faktoren (Seeman 1999). Um nun die Hypothese, dass Ligandrol die periostale Knochenformation stimuliert zu bekräftigen, wurde die *bone marrow area* (Fläche endokortikal) mit der *cross-sectional area* (Gesamtquerschnittsfläche) verglichen. Fehlende Veränderungen der *bone marrow area* und eine tendenzielle Vergrößerung der *cross-sectional area* unter Ligandroltherapie lassen darauf schließen, dass sich der Knochen bei Ligandrol durch periostales Wachstum und nicht durch Reduktion der endokortikalen Fläche verbreitert. Um dies zweifelsfrei zu bestätigen, wäre sicher eine histomorphometrische Knochenanalyse sinnvoll gewesen, die in diesem Versuch jedoch nicht durchgeführt wurde. Ergebnisse aus einer anderen Studie mit einem SARM (S-40503) untermauern jedoch diese Hypothese. Hier wurde die MAR (*mineral apposition rate*) an der periostalen Oberfläche des Femurs von weiblichen Tieren bestimmt, die unter SARM-Applikation im Vergleich zu OVX signifikant gesteigert wurde (Hanada et al. 2003). Die durch das SARM Andarine (S-4) signifikant gesteigerte periostale Zirkumferenz lässt sich ebenfalls mit dieser Hypothese in Einklang bringen (Kearbey et al. 2007).

4.5 Biomechanischer Bruchtest

Ein Kennzeichen der Osteoporose ist ein erhöhtes Frakturrisiko aufgrund einer verminderten Knochenfestigkeit. Am osteoporotischen Rattenmodell ist der biomechanische Bruchtest eine wichtige Untersuchung, um die mechanischen Eigenschaften des Knochens und eine potentielle frakturpräventive Wirkung eines Medikaments zu evaluieren (Kalu 1999). In anderen SARM-Studien wurde der Bruchtest oft an der Diaphyse des Knochens durchgeführt (Hanada et al. 2003; Kearbey et al. 2007; Furuya et al. 2012). Auch wenn der osteoporotische Knochen normalerweise nicht an der Diaphyse frakturiert, gibt es Argumente, die für den Bruchtest an der Diaphyse sprechen. Durch diesen Bruchtest lassen sich Aussagen über ein wirkstoffinduziertes *cortical steal*-Phänomen treffen und es kann untersucht werden, ob periostale Knochenformation die biomechanischen Eigenschaften beeinflusst (Kalu 1999).

Dennoch treten osteoporotische Veränderungen des Knochens hauptsächlich am Trabekelnetzwerk der Metaphyse auf. Vor allem im Rattenmodell ist die Tibiametaphyse prädisponiert für die Entwicklung einer Osteoporose (Stürmer et al. 2006). Chen et al. (2008) konnten zudem zeigen, dass der Drei-Punkte-Bruchtest der Metaphyse gegenüber dem der Diaphyse sensitiver auf Veränderungen durch Ovariectomie reagiert und deshalb geeigneter ist für die Untersuchung biomechanischer Veränderungen am Knochen. Stürmer et al. (2006) stufen den metaphysären Drei-Punkte-Bruchtest als hochsensibel ein, um hormonelle und wirkstoffinduzierte Einflüsse auf die Frakturanfälligkeit des osteoporotischen Knochens zu untersuchen.

Bei allen Parametern der Biomechanik zeigten sich keine signifikanten Veränderungen durch Ligandrol. Für den menschlichen Knochen konnte gezeigt werden, dass die Knochengröße und die Knochenquerschnittsfläche (*cross-sectional area*) die Knochenfestigkeit zu 70-80% vorhersagen können. Darüber hinaus wurde eine verringerte Kortikalisdicke mit einem erhöhtem Frakturrisiko assoziiert (Augat und Schorlemmer 2006). Obwohl Ligandrol sowohl die Kortikalisdicke signifikant als auch die *cross-sectional area* tendenziell steigerte, konnten keine positiven Auswirkungen auf die biomechanischen Eigenschaften des hier untersuchten Knochens erzielt werden.

Auch hier bestätigt sich: „*size isn't everything*“ (van der Meulen et al. 2001). Sicher spielt die Größe des Knochens eine wichtige Rolle, nichtsdestotrotz scheinen viele weitere Faktoren entscheidend für die biomechanischen Eigenschaften des Knochens zu sein. Cole und van der Meulen beschreiben drei Faktoren, die wesentlich für die Knochenfestigkeit sind: erstens die Knochenmasse (BMC, BV/TV), zweitens die geometrische Verteilung des Knochens (Trabekelarchitektur) und drittens die Materialeigenschaften des Knochens, was die Zusammensetzung des Knochengewebes aus organischen und anorganischen Bestandteilen beinhaltet (Cole und van der Meulen 2010). In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Ovariectomie starken Einfluss auf BV/TV und die Trabekelarchitektur hat und die Veränderungen groß genug waren, um die biomechanischen Eigenschaften des Knochens signifikant zu verschlechtern. Denn sowohl die Maximalkraft, die Streckgrenze als auch die Elastizität des Knochens zeigten sich nach OVX signifikant vermindert. Da sich die trabekuläre Gesamtfläche (*bone marrow area*) nach Ovariectomie nicht signifikant veränderte und die Kortikalisdicke sogar zunahm, scheint die Verminderung der Knochenfestigkeit nach Ovariectomie primär durch eine verschlechterte Integrität des Trabekelknochens bedingt zu sein (Seidlová-Wuttke et al. 2006).

Letztendlich lässt sich konstatieren, dass die osteoanabole Wirkung von Ligandrol auf die Kortikalis und die signifikante Steigerung einzelner Trabekelparameter nicht ausreicht, um die biomechanische Festigkeit des hier untersuchten Knochens zu verbessern.

Andere Studien konnten jedoch eine signifikante Verbesserung der Knochenfestigkeit im biomechanischen Bruchtest zwischen den mit SARMS behandelten Gruppen und OVX feststellen. Jedoch wird die Vergleichbarkeit dadurch eingeschränkt, dass in all diesen Studien

der Bruchtest an der Diaphyse durchgeführt wurde. Da osteoporotische Veränderungen eher das Trabekelnetzwerk betreffen und die Diaphyse primär aus kortikalem Knochen besteht, lassen sich so die – im Gegensatz zu diesem Versuch – fehlenden Unterschiede zwischen Non OVX und OVX in diesen Studien erklären. Längere Applikationszeiträume und die Tatsache, dass die Stimulation der periostalen Knochenformation sich besonders an der Diaphyse auswirkt (hauptsächlich kortikaler Knochen), könnten die signifikanten Verbesserungen zwischen OVX und den SARMS-Gruppen in diesen Studien erklären (Hanada et al. 2003; Kearbey et al. 2007; Vajda et al. 2009a; Furuya et al. 2012). Hoffmann et al. (2018) konnten für das SARM Ostarine ebenfalls keine signifikante Verbesserung der Biomechanik zeigen. Auch hier wurde es für möglich gehalten, dass ein längerer Applikationszeitraum (hier wurde ebenfalls nur fünf Wochen therapiert) die Biomechanik positiv beeinflussen könnte.

Bei der Evaluation der Biomechanik in präklinischen Studien wird der Knochen isoliert betrachtet. Verbesserte Knochenparameter, besonders die der Kortikalis, werden oftmals herangezogen, um Verbesserungen der Biomechanik durch SARMS zu erklären. Dies wird den SARMS jedoch nicht im vollen Umfang gerecht. Denn ein SARM wie Ligandrol wirkt sowohl anabol auf den Knochen als auch auf den Skelettmuskel. Aufgrund dieses synergistischen Wirkansatzes muss bei der Evaluation der frakturpräventiven Wirkung von SARMS auch die Veränderungen am Skelettmuskel betrachtet werden. Denn eine verbesserte körperliche Konstitution, die mit einer möglichen Sturzreduktion und einer erhöhten Mobilität einhergeht, ist für die Frakturprävention nicht außer Acht zu lassen (Kearbey et al. 2009). Somit lässt sich der Erfolg einer frakturpräventiven Wirkung mit Ligandrol nicht alleine am biomechanischen Bruchtest festmachen, sondern muss in weiteren klinischen Studien in der Zusammenschau mit der körperlichen Konstitution bewertet werden.

4.6 Molekularbiologische Untersuchung

Der Knochen als metabolisch aktives Gewebe ist durch die enge Verbindung zwischen Resorption und Formation ständig neuen Umbauprozessen ausgesetzt. Ist das Gleichgewicht zwischen Ab- und Aufbau gestört, kommt es wie im Fall der Osteoporose zu einem Verlust von Knochenmasse, welcher durch bildgebende bzw. osteodensitometrische Verfahren beurteilt werden kann. Im Gegensatz zu diesen eher statischen Messungen gibt die Analyse der molekularbiologischen Knochenmarkern Aufschluss über die Dynamik des metabolischen Ungleichgewichts. Veränderungen der Knochenmarker können ein spezifisches Krankheitsbild nicht definieren, sondern spiegeln lediglich den Knochenmetabolismus wider. Daher sollten osteodensitometrische und molekularbiologische Verfahren in der Diagnostik und Beurteilung einer Osteoporose nicht gegenüberstellend, sondern immer im Zusammenhang betrachtet werden (Seibel et al. 1999; Seibel 2005).

Für Menschen konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus Knochendichtemessung und biochemischen Knochenmarkern die Spezifität für Frakturvorhersagen signifikant verbessert ohne dabei die Sensitivität zu beeinträchtigen (Garnero et al. 1998). Eine Herausforderung bei der Einordnung der Ergebnisse stellen die unterschiedlichen Methoden dar, mit denen der metabolische Knochenumbau am Rattenmodell untersucht wird (Lelovas et al. 2008). So werden in vielen präklinischen Studien die Knochenmarker im Serum untersucht (Rissanen et al. 2008; Yoon et al. 2012), wohingegen andere die Menge an genspezifischer mRNA (Northern Blot-Analyse) quantifizieren (Davey et al. 2000; Davey und Morris 2004; Li et al. 2015). In dieser Arbeit wurde die relative Genexpression gegenüber einem Referenzgen (β_2 -MG) mittels quantitativer Echtzeit-PCR gemessen. Diese Methodik wurde schon in vorherigen Studien der Arbeitsgruppe erfolgreich verwendet (Seidlová-Wuttke et al. 2006; Komrakova et al. 2010).

Signifikant vermindert gegenüber OVX zeigte sich die relative Genexpression von RANKL bei höchster Ligandoldosis (4 mg). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Ligandrol 4 mg eine hemmende Wirkung auf die Differenzierung und Funktion der Osteoklasten hatte und somit zusätzlich antiresorptiv wirkte. Für DHT, welches genau wie Ligandrol nicht aromatisierbar ist und somit nur am Androgenrezeptor wirkt, konnte bereits eine resorptionshemmende Wirkung bei ovariectomierten Ratten festgestellt werden (Tobias et al. 1994). Die bisherigen Studien mit anderen SARMS zeigten sich uneinig über eine mögliche antiresorptive Wirkung. Kearbey et al. (2007) konnten eine Hemmung der Osteoklastendifferenzierung *in vitro* durch das SARM S-4 (Andarine) feststellen und postulierten eine sowohl osteoanabole als auch antiresorptive Wirksamkeit. Hanada et al. (2003) zweifelten an der antiresorptiven Wirkung von SARMS *in vivo*, da S-40503 keine signifikanten Verbesserungen am Trabekelknochen erzielte.

Es ist bekannt, dass sowohl die Marker der Knochenformation als auch die Knochenmarker der Resorption nach Ovariectomie ansteigen (Sims et al. 1996; Davey et al. 2000). Dies zeigte sich in dieser Arbeit für RANKL und OPG, wenn auch nicht signifikant. Das Verhältnis von OPG und RANKL spielt eine entscheidende Rolle für die Differenzierung der Osteoklasten und somit für das Gleichgewicht im Knochenmetabolismus (Li et al. 2015). OPG wirkt protektiv gegen den Knochenabbau, der durch eine erhöhte Osteoklastenaktivität ausgelöst wird (Simonet et al. 1997). Unter Ligandroltherapie konnte kein Anstieg der OPG-Genexpression gezeigt werden.

Die relative Genexpression des typischen Osteoklastenmarkers TRAP zeigte sich in der OVX-Gruppe tendenziell vermindert. Rissanen et al. (2008) stellten nach OVX ebenfalls einen Abfall fest. Sie beschreiben TRAP als einen Marker für die Osteoklastenzahl und nicht als Marker der Osteoklastenaktivität. Nach Ovariectomie ist die Knochenmasse und somit die absolute Anzahl an Osteoklasten vermindert, obwohl die Aktivität der vorhandenen Osteoklasten erhöht ist (Rissanen et al. 2008). Der tendenzielle Anstieg von TRAP unter Ligandroltherapie lässt sich also dadurch erklären, dass die osteoanabole Wirkung von

Ligandrol die Knochenmasse und somit auch die Zahl der vorhandenen Osteoklasten gesteigert hat.

Der Knochenmarker Osteocalzin wird als spezifischer Marker der Osteoblastenfunktion angesehen (Seibel 2005). Die relative Genexpression des Knochenmarkers Osteocalzin hat nach Ovariectomie gegenüber Non OVX deutlich abgenommen und durch die Ligandroltherapie einen tendenziellen Anstieg erfahren. Da die Veränderungen nicht signifikant waren, lässt sich vermuten, dass durch die osteoanabole von Ligandrol sowohl die Knochenmasse und somit die Zahl an Osteoblasten gesteigert als auch die Funktion der Osteoblasten stimuliert wurde.

Die relative Genexpression der alkalischen Phosphatase, des Androgenrezeptors und des Estrogenrezeptors α ergaben bei fehlenden Signifikanzen keine neuen Hinweise auf eine Veränderung des Knochenmetabolismus. Fehlende Signifikanzen zwischen den Versuchsgruppen, trotz ausreichender Tieranzahl pro Gruppe, könnten den hohen Standardabweichungen zugeschrieben werden.

4.7 Schlussfolgerung

Grundlage für die Erforschung der Ligandrolwirkung auf die osteoporotische Tibiametaphyse war ein stimmiges experimentelles Tiermodell. Dieses bestätigte sich in einem drastisch abgenommenen Uterusgewicht nach Ovariectomie sowie in signifikanten Unterschieden in der Knochenqualität zwischen Non OVX und OVX.

Es konnte sowohl am kortikalen als auch am trabekulären Knochen eine dosisabhängige osteoanabole Wirkung durch die Ligandroltherapie nachgewiesen werden.

Obwohl die Trabekeldichte und das Trabekelvolumen durch Ligandrol nicht signifikant verbessert wurden, weisen ein dosisabhängiger Anstieg der Anzahl und der Flächendichte der Trabekelkreuzungen auf einen selektiven therapeutischen Effekt von Ligandrol auf den Trabekelknochen hin.

Plakativ lassen sich die Veränderungen durch Ligandrol auf das Trabekelnetzwerk als „Spinnennetz statt Fischernetz“ beschreiben. Der gesunde Knochen (Non OVX) weist dicke Trabekel mit zahlreich ausgebildeten Trabekelkreuzungen auf, die einer kräftigen Netzstruktur ähneln. Diese hat sich beim osteoporotischen Knochen (OVX) fast vollständig aufgelöst. Die Ligandroltherapie schaffte es, diese Trabekelkreuzungen zu regenerieren und damit die Verzweigungen der Trabekel zu verbessern. Jedoch schaffte es die fünfwöchige Ligandroltherapie nicht die Trabekeldicke wiederherzustellen. Somit ähnelte der Trabekelknochen unter Ligandroltherapie eher einem Spinnennetz als einem kräftigen Fischernetz. Dies erklärt auch, warum trotz Anstieg der Trabekelkreuzungen das Trabekelvolumen nicht signifikant gestiegen ist.

Die Hauptwirkung von Ligandrol in der Therapie der Osteoporose scheint in der Stimulation der periostalen Knochenformation zu liegen. Damit stehen die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse im Einklang mit den Erkenntnissen aus anderen SARMS-Studien, die ebenfalls die osteoanabole Wirkung auf den kortikalen Knochen hervorheben (Hanada et al. 2003; Kearbey et al. 2007; Vajda et al. 2009a; Furuya et al. 2012).

Ligandrol stimuliert eindeutig die Knochenformation. Offen bleibt jedoch die Fragen nach einer möglichen antiresorptiven Wirkung. Einerseits spricht eine signifikant verminderte Genexpression des RANK-Liganden dafür, andererseits hätte sich eine antiresorptive Wirkung deutlicher am Trabekelknochen zeigen müssen. Nachweislich antiresorptive Hormone und Wirkstoffe (z. B. Östrogen, Bisphosphonate) zeigen im Rattenmodell deutlichere Verbesserungen gegenüber dem osteoporotischen Knochen (Hanada et al. 2003; Furuya et al. 2012). Ligandrol hingegen konnte nur einen Teil der Trabekelparameter signifikant verbessern.

Trotz der osteoanabolen Wirkung auf die Kortikalis, konnte keine Verbesserung der Biomechanik erreicht werden. Dies zeigt, dass bei dem metaphysären Bruchtest nicht nur der kortikale Knochen ausschlaggebend für die Bruchfestigkeit ist, sondern der Trabekelknochen ebenfalls Einfluss auf die Biomechanik hat. Neben der Verbesserung der Kortikalisparameter reichte der partiell osteoanabole Effekt am Trabekelknochen nicht aus, um eine Verbesserung der Frakturanfälligkeit zu erzielen. Hierbei spielte sicher die Therapiedauer eine entscheidende Rolle. Studien, die eine signifikant verbesserte Biomechanik des Knochens zeigen konnten, wählten im Vergleich zu dieser Studie deutlich längere Interventionszeiträume (Hanada et al. 2003; Kearbey et al. 2007; Vajda et al. 2009a; Furuya et al. 2012).

Letztendlich bestätigen die Ergebnisse die Wirksamkeit einer selektiven Androgentherapie bei weiblichen Tieren und unterstreichen das Potenzial von Ligandrol zukünftig eine Rolle in der Therapie der postmenopausalen Osteoporose zu spielen. Kritisch jedoch muss die Gewebeselektivität betrachtet werden, da die höchste Ligandrol-Dosis zu einem signifikanten Anstieg des Uterusgewichts führte. Des Weiteren scheint die Wirkpotenz und das primär auf die Kortikalis gerichtete Wirkspektrum für die Monotherapie der postmenopausalen Osteoporose nicht auszureichend zu sein. Vielmehr zeigten Kombinationstherapien mit antiresorptiven Medikamenten (Bisphosphonate oder SERM plus SARM) additive Effekte gegenüber der Monotherapie mit nur einem der beiden Präparate (Vajda et al. 2009a; Furuya et al. 2012). Dieser additive Effekt in Kombination mit einem Bisphosphonat konnte für andere osteoanabolen Wirkstoffe (z. B. PTH) bisher nicht nachgewiesen werden (Black et al. 2003).

5 Zusammenfassung

Bei einer immer älter werdenden Gesellschaft wird die Anzahl der an Osteoporose erkrankten Frauen in den nächsten Jahren weiter zunehmen. Durch die steigenden Fallzahlen und die damit verbundenen Kosten wird auch die sozioökonomische Bedeutung der systemischen Skeletterkrankung wachsen. Als Alternative zu den antiresorptiv wirkenden Bisphosphonaten wird nach osteoanabolen Wirkstoffen geforscht. Der Einsatz von Androgenen zur Therapie der postmenopausalen Osteoporose wurde bisher durch ein ausgeprägtes Nebenwirkungsspektrum begrenzt. Von der Therapie mit selektiven Androgenrezeptor-Modulatoren (SARMs) verspricht man sich eine sowohl osteoanabole als auch myoanabole Wirkung ohne dabei die typischen androgenen Nebenwirkungen bei Frauen (z. B. Virilisierung) hervorzurufen. Damit folgen sie dem Beispiel der selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) und stellen einen neuen hoffnungsvollen Therapieansatz der postmenopausalen Osteoporose dar. Vielversprechende Versuchsergebnisse anderer Arbeitsgruppen unterstreichen das Potenzial der SARMs. Die Verträglichkeit von Ligandrol wurde bereits an gesunden männlichen Probanden getestet. Ziel der hier durchgeführten Studie war die Erforschung einer dosisabhängigen Wirkung von Ligandrol auf die osteoporotische Tibiametaphyse weiblicher Ratten.

Weibliche Sprague Dawley Ratten ($n=75$), die zu Versuchsbeginn drei Monate alt waren, wurden in fünf Gruppen ($n=15$) eingeteilt. Die Gruppe Non OVX diente als gesunde Kontrollgruppe und wurde keiner Intervention unterzogen. Die Gruppe OVX wurde nur ovariectomiert und diente als osteoporotische Kontrolle. Die übrigen Gruppen wurden ebenfalls ovariectomiert, jedoch zusätzlich einer Ligandroltherapie unterzogen. Nach neun Wochen, in denen sich eine Osteoporose bei den ovariectomierten Ratten ausbilden konnte, wurde den Therapiegruppen Ligandrol in unterschiedlichen Dosen (0,04 mg, 0,4 mg, 4 mg) für fünf Wochen oral verabreicht. Nach 14 Wochen wurde der Versuch wie geplant beendet. Es schloss sich eine computertomographische Untersuchung und ein biomechanischer Bruchtest der linken Tibiae an. Gefolgt von einer Analyse der Expression knochenspezifischer Gene der rechten Tibiae.

Die Anzahl und Dichte der Trabekelkreuzungen, die Kortikalis- und Trabekeldicke und die Flächen von Kortikalis und Trabekel wurden anhand von CT-Schnittbildern analysiert. Des Weiteren konnten die Dichte (BMD) und das Volumen der unterschiedlichen Gewebsabschnitte sowie der relative Knochenanteil vom Gesamtgewebe (BV/TV) untersucht werden. Der biomechanische Bruchtest überprüfte Veränderungen der Frakturanfälligkeit, indem die Maximalkraft, Steifigkeit und Elastizität gemessen wurden. Bei der molekularbiologischen Analyse wurde die Genexpression verschiedener Knochenmarker untersucht, die Aufschluss über die Wirkung von Ligandrol auf das Knochenremodelling ergaben.

Ausgewertet wurden die Daten durch das Programm GraphPrism mittels Tukey-Test. Das Signifikanzniveau wurde bei $p<0,05$ festgelegt.

Die Ovariectomie führte zu einer signifikanten Reduktion aller biomechanischen Parameter, des Trabekelvolumens und der BV/TV. Die Ligandroltherapie konnte hier keine Verbesserung bewirken. Ebenfalls blieb die Trabekeldichte (BMD) von einer Ligandroltherapie unbeeinflusst. Sowohl OVX als auch die Therapie hatten keinen Einfluss auf die Dichte und das Volumen der Kortikalis. Weitere Parameter der Kortikalis (Kortikalisdicke, Kortikalisfläche) konnten jedoch durch Ligandrol signifikant verbessert werden. Eine dosisabhängige Ligandrolwirkung gegenüber dem osteoporotischen Knochen zeigte sich bei der Anzahl und Flächendichte der Trabekelkreuzungen. Darüber hinaus wurde die Genexpression des RANK-Liganden durch 4 mg Ligandrol signifikant vermindert. Die höchste Ligandrol-dosis (4 mg) führte zu einer signifikanten Zunahme des Uterusgewichts (vs. OVX). Das Uterusgewicht der gesunden Kontrollgruppe (Non OVX) wurde durch die Therapie jedoch nicht erreicht.

Der Erfolg der Ovariectomie wurde durch eine signifikant verschlechterte Knochenqualität der OVX-Gruppe gegenüber Non OVX sowie durch ein signifikant gesunkenes Uterusgewicht nach OVX bestätigt. Die Ergebnisse zeigten, dass Ligandrol seine osteoanabole Wirksamkeit primär am kortikalen Knochen ausübte. Darüber hinaus konnte Ligandrol die Anzahl und Dichte der Trabekelkreuzungen dosisabhängig steigern, was auch für eine selektive therapeutische Wirkung auf den Trabekelknochen spricht. Dieser partielle Effekt auf das Trabekelnetzwerk und die osteoanabole Stimulation der Kortikalis durch Ligandrol reichten jedoch nicht aus, um die Biomechanik des Knochens signifikant zu verbessern. Eine im Gegensatz zu Vergleichsstudien geringe Therapiedauer von fünf Wochen könnte eine Erklärung dafür sein. Die Frage nach einer möglichen antiresorptiven Wirkkomponente von Ligandrol konnte nicht eindeutig geklärt werden. Die signifikante Steigerung des Uterusgewichts unter der höchsten Ligandrol-dosis (4 mg) erfordert eine kritische Bewertung des therapeutischen Einsatzes bei Frauen. Für die Zukunft vielversprechend erweist sich die Kombinationstherapie aus SARMs und Bisphosphonaten.

6 Anhang

Tabelle A1: Zusammenfassung der mittleren Tiergewichte im Verlauf des Versuchs; pro Woche in Gramm (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Versuchs- woche	Non OVX	OVX	0,04 mg	0,4 mg	4 mg
0	239,2 \pm 10,9	235,0 \pm 10,7	237,0 \pm 12,2	240,5 \pm 14,5	236,6 \pm 10,5
1	242,7 \pm 8,2	248,2 \pm 8,3	248,5 \pm 11,0	249,4 \pm 12,4	249,8 \pm 10,9
2	244,6 \pm 8,3 (a***)	281,1 \pm 11,9	280,0 \pm 13,1	281,6 \pm 13,6	283,1 \pm 12,8
3	248,6 \pm 9,6 (a***)	301,1 \pm 13,4	301,1 \pm 14,7	307,2 \pm 30,5	303,4 \pm 13,4
4	253,4 \pm 10,6 (a***)	312,1 \pm 13,5	314,9 \pm 16,9	313,1 \pm 17,7	315,6 \pm 14,6
5	256,3 \pm 8,4 (a***)	316,9 \pm 16,5	321,0 \pm 20,3	319,9 \pm 17,5	321,7 \pm 15,0
6	263,7 \pm 9,4 (a***)	323,1 \pm 21,7	326,3 \pm 21,3	326,0 \pm 17,4	326,5 \pm 15,9
7	266,9 \pm 11,7 (a***)	329,0 \pm 22,6	331,2 \pm 22,1	333,6 \pm 18,4	332,9 \pm 17,3
8	272,1 \pm 13,5 (a***)	329,9 \pm 22,5	332,7 \pm 24,1	333,6 \pm 18,3	335,1 \pm 18,7
9	273,0 \pm 13,3 (a***)	332,3 \pm 21,7	335,4 \pm 24,9	333,4 \pm 19,2	337,6 \pm 17,4
10	272,5 \pm 11,8 (a***)	335,0 \pm 20,4	337,4 \pm 26,0	336,4 \pm 18,6	344,9 \pm 17,1
11	272,3 \pm 13,0 (a***)	338,6 \pm 20,1	340,9 \pm 26,2	341,4 \pm 18,9	353,3 \pm 19,3
12	278,6 \pm 11,1 (a***)	341,1 \pm 20,0	344,7 \pm 26,1	346,9 \pm 19,0	358,4 \pm 19,6
13	281,7 \pm 12,4 (a***)	340,7 \pm 20,0	343,5 \pm 27,6	346,4 \pm 20,4	359,4 \pm 19,4
14	282,5 \pm 14,8 (a***)	338,7 \pm 20,5	342,1 \pm 27,4	350,4 \pm 16,3	355,2 \pm 19,4

a = Non OVX vs. alle übrigen Gruppen; ***p<0,001

Tabelle A2: Zusammenfassende Darstellung der durchschnittlichen Futteraufnahme; pro Tier pro Tag in Gramm (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Versuchs- woche	Non OVX	OVX	0,04 mg	0,4 mg	4 mg
1	17,1 \pm 0,77	17,1 \pm 0,48	18,8 \pm 3,01	18,1 \pm 2,84	17,6 \pm 0,85
2	16,7 \pm 0,62 (a***)	21,5 \pm 0,8	20,4 \pm 2,31	21,1 \pm 0,76	21,6 \pm 0,7
3	17,0 \pm 1,24 (a***)	23,1 \pm 1,43	22,5 \pm 0,55	22,2 \pm 0,7	22,5 \pm 0,65
4	17,8 \pm 0,81 (a***)	22,3 \pm 0,85	22,6 \pm 0,65	22,6 \pm 0,39	22,8 \pm 0,67
5	17,2 \pm 0,40 (a***)	20,4 \pm 0,99	21,0 \pm 0,46	20,8 \pm 0,31	20,6 \pm 0,76
6	17,5 \pm 1,0 (a***)	20,3 \pm 1,11	20,5 \pm 0,67	20,2 \pm 0,18	20,7 \pm 0,7
7	17,0 \pm 0,65 (a***)	19,7 \pm 0,55	19,6 \pm 0,55	19,5 \pm 0,34	19,8 \pm 0,174
8	18,0 \pm 1,46	19,1 \pm 0,38	19,0 \pm 0,59	19,3 \pm 0,27	19,3 \pm 0,4
9	17,4 \pm 1,00	18,9 \pm 0,25	21,7 \pm 2,89	21,9 \pm 3,2	22,0 \pm 3,17
10	15,4 \pm 1,43	17,6 \pm 0,08	19,0 \pm 1,86 (b***)	19,7 \pm 1,77 (b***)	20,2 \pm 2,11 (b***)
11	14,9 \pm 0,60	18,7 \pm 3,05 (b***)	17,3 \pm 0,24	17,1 \pm 0,54	17,4 \pm 0,22
12	16,1 \pm 0,35	17,2 \pm 0,77	17,5 \pm 0,69 (b***)	17,6 \pm 0,46 (b***)	17,9 \pm 0,54 (b***)
13	16,6 \pm 0,39	16,9 \pm 1,77	17,7 \pm 0,45	17,8 \pm 0,39	18,3 \pm 0,56
14	16,1 \pm 0,87	16,4 \pm 0,89	16,4 \pm 0,60	17,6 \pm 1,70	16,9 \pm 0,70

a = Non OVX vs. alle übrigen Gruppen, b = signifikant gegenüber Non OVX; ***p<0,001

Tabelle A3: Zusammenfassung der täglichen Liganddosis in mg/kg KG; (Mittelwerte \pm Standardabweichung)

Versuchswoche	0,04 mg	0,4 mg	4 mg
10	0,032 \pm 0	0,329 \pm 0,03	3,29 \pm 0,34
11	0,028 \pm 0	0,280 \pm 0,01	2,77 \pm 0,03
12	0,028 \pm 0	0,283 \pm 0,01	2,80 \pm 0,09
13	0,029 \pm 0	0,288 \pm 0,01	2,85 \pm 0,09
14	0,027 \pm 0	0,281 \pm 0,03	2,66 \pm 0,11
Durchschnitt	0,028 \pm 0	0,283 \pm 0,03	2,80 \pm 0,09

Tabelle A4: Darstellung des Uterusgewichts; (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Parameter	Non OVX	OVX	0,04 mg	0,4 mg	4 mg
Uterus- gewicht in g	0,578 \pm 0,113 (a***)	0,105 \pm 0,023	0,105 \pm 0,021	0,127 \pm 0,018	0,426 \pm 0,037 (c***, d***, e***)

a = Non OVX vs. alle übrigen Gruppen, c = signifikant gegenüber OVX, d = signifikant gegenüber 0,04 mg, e = signifikant gegenüber 0,4 mg; ***p<0,001

Tabelle A5: Zusammenfassung der Ergebnisse der 3D-Analyse; (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Parameter	Non OVX	OVX	0,04 mg	0,4 mg	4 mg
Kortikalis-dichte BMD (g/cm ³)	1,316 \pm 0,035	1,304 \pm 0,032	1,306 \pm 0,041	1,321 \pm 0,035	1,296 \pm 0,043
Kortikalis-volumen (mm ³)	10,71 \pm 0,97	11,08 \pm 1,05	11,03 \pm 1,20	11,58 \pm 0,98	11,68 \pm 0,66
Kortikalis-fläche (mm ²)	5,302 \pm 0,460	5,770 \pm 0,294 (b**)	5,838 \pm 0,350 (b***)	5,945 \pm 0,387 (b***)	6,179 \pm 0,220 (b***, c*)
Dichte Kortikalis + Trabekel BMD (g/cm ³)	1,022 \pm 0,032 (a***)	1,140 \pm 0,037	1,146 \pm 0,052	1,144 \pm 0,035	1,127 \pm 0,056
Volumen Kortikalis + Trabekel (mm ³)	18,66 \pm 2,01 (a***)	14,80 \pm 1,44	14,64 \pm 1,68	15,70 \pm 1,43	15,88 \pm 1,70
Trabekel-dichte BMD (g/cm ³)	0,621 \pm 0,010 (a***)	0,649 \pm 0,012	0,650 \pm 0,007	0,642 \pm 0,008	0,643 \pm 0,011
Trabekel-volumen (mm ³)	7,916 \pm 1,340 (a***)	3,743 \pm 0,670	3,606 \pm 0,730	4,121 \pm 0,641	4,204 \pm 1,245
Gesamt-dichte BMD (g/cm ³)	0,491 \pm 0,060	0,481 \pm 0,041	0,460 \pm 0,060	0,439 \pm 0,050	0,460 \pm 0,050
Gesamt-volumen (mm ³)	37,47 \pm 2,89	34,34 \pm 2,77	34,96 \pm 5,19	38,31 \pm 2,51 (c*)	37,19 \pm 3,36
BV/TV (%)	49,83 \pm 4,25 (a***)	43,16 \pm 3,10	42,20 \pm 3,85	41,03 \pm 3,20	42,79 \pm 3,60

a = Signifikanz zwischen Non OVX und allen übrigen Gruppen, b = signifikant gegenüber Non OVX, c = signifikant gegenüber OVX; ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05

Tabelle A6: Zusammenfassung der Ergebnisse der 2D-Analyse; (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Parameter	Non OVX	OVX	0,04 mg	0,4 mg	4 mg
Kortikalisfläche (mm ²)	5,33 \pm 0,74	5,48 \pm 0,40	5,74 \pm 0,33 (b***)	6,08 \pm 0,37 (b***, c***, d**)	6,12 \pm 0,30 (b***, c***, d**)
Kortikalisdicke (mm)	0,45 \pm 0,08 (a***)	0,50 \pm 0,057	0,54 \pm 0,06 (c*)	0,54 \pm 0,06 (c**)	0,56 \pm 0,04 (c***)
Trabekelfläche (mm ²)	4,04 \pm 1,10 (a***)	0,97 \pm 0,24	1,08 \pm 0,36	1,20 \pm 0,35	1,41 \pm 0,50 (c**)
Knochenflächen-dichte Trabekel (%)	43,48 \pm 9,58 (a***)	10,10 \pm 2,65	11,46 \pm 3,93	11,62 \pm 3,04	14,14 \pm 3,73 (c**)
Anzahl der Trabekelkreuzungen (absolut)	34,31 \pm 9,92 (a***)	5,78 \pm 2,92	7,07 \pm 4,18	9,15 \pm 4,18	11,90 \pm 4,87 (c***, d**)
Flächen-dichte der Trabekelkreuzungen (n/mm ²)	8,69 \pm 1,78	5,79 \pm 2,53 (b***)	6,20 \pm 2,56	7,55 \pm 2,29 (c**)	8,56 \pm 2,38 (c***, d***)
Trabekel-dicke (mm)	0,15 \pm 0,08 (a***)	0,05 \pm 0	0,06 \pm 0	0,06 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01
<i>Bone marrow area</i> (mm ²)	5,12 \pm 0,68	5,30 \pm 0,54	5,32 \pm 1,08	5,72 \pm 0,62	5,50 \pm 0,85
<i>Cross-sectional area</i> (mm ²)	10,42 \pm 0,74	11,07 \pm 0,56	11,16 \pm 1,26	11,66 \pm 0,60 (b**)	11,68 \pm 0,93 (b**)

a = Signifikanz zwischen Non OVX und allen übrigen Gruppen, b = signifikant gegenüber Non OVX, c = signifikant gegenüber OVX, d = signifikant gegenüber 0,04 mg; ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05

Tabelle A7: Zusammenfassung der Ergebnisse des biomechanischen Bruchtests; (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Parameter	Non OVX	OVX	0.04mg	0.4mg	4mg
Streckgrenze (N)	114,10 \pm 18,68	98,11 \pm 8,10 (b**)	94,63 \pm 10,40 (b***)	89,72 \pm 9,62 (b***)	93,17 \pm 7,79 (b***)
Maximalkraft (N)	115,0 \pm 19,17	99,14 \pm 8,50 (b**)	95,83 \pm 10,66 (b***)	91,26 \pm 9,66 (b***)	93,80 \pm 7,70 (b***)
Elastizität (N/mm)	224,2 \pm 52,81	179,0 \pm 29,96 (b*)	172,6 \pm 38,47 (b**)	174,6 \pm 27,55 (b**)	176,0 \pm 31,23 (b**)

b = signifikant gegenüber Non OVX; ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05

Tabelle A8: Zusammenfassung der Ergebnisse der molekularbiologischen Analyse; (Mittelwert \pm Standardabweichung)

	Non OVX	OVX	0,04 mg	0,4 mg	4 mg
RANKL	1,292 \pm 0,398	1,526 \pm 0,765	1,304 \pm 0,348	1,071 \pm 0,284	0,816 \pm 0,320 (c*)
OPG	1,043 \pm 0,317	1,343 \pm 0,433	1,370 \pm 0,468	1,012 \pm 0,275	0,934 \pm 0,335
TRAP	0,853 \pm 0,583	0,336 \pm 0,181	0,598 \pm 0,259	0,504 \pm 0,311	0,882 \pm 0,712
OC	1,075 \pm 0,869	0,267 \pm 0,171	0,756 \pm 0,422	0,813 \pm 0,584	1,103 \pm 1,164
ER α	1,250 \pm 1,028	0,867 \pm 0,104	0,914 \pm 0,327	1,035 \pm 0,330	0,761 \pm 0,295
AR	0,821 \pm 0,224	0,598 \pm 0,156	0,708 \pm 0,188	0,691 \pm 0,213	0,549 \pm 0,208
AP	1,314 \pm 0,859	1,314 \pm 0,636	1,657 \pm 0,752	1,374 \pm 0,850	1,077 \pm 0,772

c = signifikant gegenüber OVX; *p<0,05

7 Literaturverzeichnis

- A Phase II, Randomized, Double-Blind, Parallel Group, Placebo- Controlled, Multi-Center Study to Explore the Efficacy, Safety and Tolerability of VK5211 in Subjects With Acute Hip Fracture. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02578095.
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02578095>; abgerufen am 06.12.2019
- Abu EO, Horner A, Kusec V, Triffitt JT, Compston JE (1997): The Localization of Androgen Receptors in Human Bone. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 3493–3497
- Adachi JD, Rizzoli R, Boonen S, Li Z, Meredith MP, Chesnut CH (2005): Vertebral fracture risk reduction with risedronate in post-menopausal women with osteoporosis: a meta-analysis of individual patient data. *Aging Clin Exp Res* 17, 150–156
- Adler RA (Hrsg.): Osteoporosis: Pathophysiology and Clinical Management. 2. Auflage; Humana Press, Totowa 2010
- Al-Dujaili SA, Lau E, Al-Dujaili H, Tsang K, Guenther A, You L (2011): Apoptotic osteocytes regulate osteoclast precursor recruitment and differentiation in vitro. *J Cell Biochem* 112, 2412–2423
- Aloia JF, McGowan DM, Vaswani AN, Ross P, Cohn SH (1991): Relationship of menopause to skeletal and muscle mass. *Am J Clin Nutr* 53, 1378–1383
- Ammon J-C: Auswirkung der vertikalen Ganzkörpervibration unterschiedlicher Frequenzen auf die Muskulatur im osteoporotischen Rattenmodell. Med. Diss. Göttingen 2015
- Augat P, Schorlemmer S (2006): The role of cortical bone and its microstructure in bone strength. *Age Ageing* 35, ii27–ii31
- Barrett-Connor E, Mosca L, Collins P, Geiger MJ, Grady D, Kornitzer M, McNabb MA, Wenger NK, Raloxifene Use for The Heart (RUTH) Trial Investigators (2006): Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 355, 125–137
- Bartl R: Osteoporose: Prävention, Diagnostik, Therapie. 4. Auflage; Thieme, Stuttgart 2010
- Bartl R, Bartl C (2015): Aktuelle Osteoporoseprophylaxe und -therapie. *Internist (Berl)* 56, 1445–1457
- Basaria S, Collins L, Dillon EL, Orwoll K, Storer TW, Miciek R, Ulloor J, Zhang A, Eder R, Zientek H et al. (2013): The safety, pharmacokinetics, and effects of LGD-4033, a novel nonsteroidal oral, selective androgen receptor modulator, in healthy young men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 68, 87–95
- Baud CA (1962): Morphologie et structure inframicroscopique des ostéocytes. *Acta Anat* 51, 209–225
- Bhasin S, Jasuja R (2009): Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs) as Function Promoting Therapies. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12, 232–240
- Bianco P, Ballanti P, Bonucci E (1988): Tartrate-resistant acid phosphatase activity in rat osteoblasts and osteocytes. *Calcif Tissue Int* 43, 167–171

- 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. *Lancet* 348, 1535–1541
- Black DM, Greenspan SL, Ensrud KE, Palermo L, McGowan JA, Lang TF, Garnero P, Bouxsein ML, Bilezikian JP, Rosen CJ, PaTH Study Investigators (2003): The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 349, 1207–1215
- Blair JM, Zheng Y, Dunstan CR (2007): RANK ligand. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 1077–1081
- Bolour S, Braunstein G (2005): Testosterone therapy in women: a review. *Int J Impot Res* 17, 399–408
- Bone HG, McClung MR, Roux C, Recker RR, Eisman JA, Verbruggen N, Hustad CM, DaSilva C, Santora AC, Ince BA (2010): Odanacatib, a cathepsin-K inhibitor for osteoporosis: a two-year study in postmenopausal women with low bone density. *J Bone Miner Res* 25, 937–947
- Boonen S, Laan RF, Barton IP, Watts NB (2005): Effect of osteoporosis treatments on risk of non-vertebral fractures: review and meta-analysis of intention-to-treat studies. *Osteoporos Int* 16, 1291–1298
- Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J (2001): Estrogen Receptors α and β Are Differentially Expressed in Developing Human Bone. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2309–2314
- Borgström F, Zethraeus N, Johnell O, Lidgren L, Pönzer S, Svensson O, Abdon P, Ornstein E, Lunsjö K, Thorngren KG et al. (2006): Costs and quality of life associated with osteoporosis-related fractures in Sweden. *Osteoporos Int* 17, 637–650
- Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R (2010): Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 25, 1468–1486
- Boyce BF, Xing L (2008): Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 473, 139–146
- Bruhn HD, Junker R, Schäfer H, Schreiber S (Hrsg.): *LaborMedizin: Indikationen, Methodik und Laborwerte Pathophysiologie und Klinik*. 3. Auflage; Schattauer, Stuttgart 2011
- Butera PC (2010): Estradiol and the control of food intake. *Physiol Behav* 99, 175–180
- Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR et al. (2003): Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841–846
- Capulli M, Paone R, Rucci N (2014): Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Arch Biochem Biophys* 561, 3–12
- Cauley JA, Robbins J, Chen Z, Cummings SR, Jackson RD, LaCroix AZ, LeBoff M, Lewis CE, McGowan J, Neuner J et al. (2003): Effects of Estrogen Plus Progestin on Risk of Fracture and Bone Mineral Density: The Women’s Health Initiative Randomized Trial. *JAMA* 290, 1729–1738

- Chan JJ, Cupples LA, Kiel DP, O'Donnell CJ, Hoffmann U, Samelson EJ (2015): QCT Volumetric Bone Mineral Density and Vascular and Valvular Calcification: The Framingham Study. *J Bone Miner Res* 30, 1767–1774
- Chapurlat RD (2015): Odanacatib: a review of its potential in the management of osteoporosis in postmenopausal women. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 7, 103–109
- Chen MM, Yeh JK, Aloia JF (1995): Effect of ovariectomy on cancellous bone in the hypophysectomized rat. *J Bone Miner Res* 10, 1334–1342
- Chen T, Chen M, Yao X, Long W, Chen H, Li L (2008): [A new three-point bending test for bone biomechanical properties of rat's tibia]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 25, 341–345
- Cockerill W, Lunt M, Silman AJ, Cooper C, Lips P, Bhalla AK, Cannata JB, Eastell R, Felsenberg D, Gennari C et al. (2004): Health-related quality of life and radiographic vertebral fracture. *Osteoporos Int* 15, 113–119
- Cole JH, van der Meulen MCH: Biomechanics of Bone. In: Adler RA (Hrsg.): *Osteoporosis: Pathophysiology and Clinical Management*. Humana Press, Totowa 2010, 157–179
- Colvard DS, Eriksen EF, Keeting PE, Wilson EM, Lubahn DB, French FS, Riggs BL, Spelsberg TC (1989): Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 854–857
- Cooper GM, Hausman RE (Hrsg.): *The Cell: A Molecular Approach*. 7. Auflage; Sinauer Associates, Sunderland 2015
- Crepaldi G, Romanato G, Tonin P, Maggi S (2007): Osteoporosis and body composition. *J Endocrinol Invest* 30, 42–47
- Cummings SR, Martin JS, 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* 361, 756–765
- Dagogo-Jack S, al-Ali N, Qurttom M (1997): Augmentation of bone mineral density in hirsute women. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 2821–2825
- Dalton JT, Mukherjee A, Zhu Z, Kirkovsky L, Miller DD (1998): Discovery of nonsteroidal androgens. *Biochem Biophys Res Commun* 244, 1–4
- Dalton JT, Barnette KG, Bohl CE, Hancock ML, Rodriguez D, Dodson ST, Morton RA, Steiner MS (2011): The selective androgen receptor modulator GTx-024 (enobosarm) improves lean body mass and physical function in healthy elderly men and postmenopausal women: results of a double-blind, placebo-controlled phase II trial. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2, 153–161
- Davey RA, Morris HA (2004): Effects of dihydrotestosterone on osteoblast gene expression in osteopenic ovariectomized rats. *Endocr Res* 30, 361–368
- Davey RA, Hahn CN, May BK, Morris HA (2000): Osteoblast gene expression in rat long bones: effects of ovariectomy and dihydrotestosterone on mRNA levels. *Calcif Tissue Int* 67, 75–79
- Di Renzo GC, Coata G, Cosmi EV, Melis GB, Maietta L, Volpe A (1994): Management of postmenopausal osteoporosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 56, 47–53

- Drenckhahn D (Hrsg.): Benninghoff, Drenckhahn, Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1; 17. Auflage; Urban & Fischer, München 2008
- DVO (2017): Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Männern ab dem 60. Lebensjahr und bei postmenopausalen Frauen. S3-Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V. https://www.dv-osteologie.org/dvo_leitlinien/dvo-leitlinie-2017; abgerufen am 11.07.2019
- 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* 282, 637–645
- Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS (2015): Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* 2015, 421746
- Fukumoto S, Martin TJ (2009): Bone as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 20, 230–236
- Furuya K, Yamamoto N, Ohyabu Y, Makino A, Morikyu T, Ishige H, Kuzutani K, Endo Y (2012): The novel non-steroidal selective androgen receptor modulator S-101479 has additive effects with bisphosphonate, selective estrogen receptor modulator, and parathyroid hormone on the bones of osteoporotic female rats. *Biol Pharm Bull* 35, 1096–1104
- Gao W, Dalton JT (2007): Expanding the therapeutic use of androgens via selective androgen receptor modulators (SARMs). *Drug Discov Today* 12, 241–248
- Garcia AJ, Tom C, Guemes M, Polanco G, Mayorga ME, Wend K, Miranda-Carboni GA, Krum SA (2013): ER α signaling regulates MMP3 expression to induce FasL cleavage and osteoclast apoptosis. *J Bone Miner Res* 28, 283–290
- Garnero P, Dargent-Molina P, Hans D, Schott AM, Bréart G, Meunier PJ, Delmas PD (1998): Do Markers of Bone Resorption Add to Bone Mineral Density and Ultrasonographic Heel Measurement for the Prediction of Hip Fracture in Elderly Women? The EPIDOS Prospective Study. *Osteoporos Int* 8, 563–569
- Gratzl (Hrsg.): Histologie. 6. Auflage; Springer, Heidelberg 2004
- Greenspan SL, Bone HG, Ettinger MP, Hanley DA, Lindsay R, Zanchetta JR, Blosch CM, Mathisen AL, Morris SA, Marriott TB, Treatment of Osteoporosis with Parathyroid Hormone Study Group (2007): Effect of recombinant human parathyroid hormone (1-84) on vertebral fracture and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 146, 326–339
- Gregg EW, Cauley JA, Seeley DG, Ensrud KE, Bauer DC (1998): Physical activity and osteoporotic fracture risk in older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Ann Intern Med* 129, 81–88
- 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 Arztebl Int* 110, 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* 26, 1563–1569
- Harris H (1990): The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin Chim Acta* 186, 133–150
- Henneman PH, Wallach S (1957): A review of the prolonged use of estrogens and androgens in postmenopausal and senile osteoporosis. *AMA Arch Intern Med* 100, 715–723
- 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. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos* 8, 136
- Herold G: *Innere Medizin* 2016. Herold, Köln 2015
- 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* 37, 243–255
- Hogan HA, Ruhmann SP, Sampson HW (2000): The mechanical properties of cancellous bone in the proximal tibia of ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 15, 284–292
- Holzapfel B, Wickert L (2007): Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biol Unserer Zeit* 37, 120–126
- Horie K, Takakura K, Imai K, Liao S, Mori T (1992): Immunohistochemical localization of androgen receptor in the human endometrium, decidua, placenta and pathological conditions of the endometrium. *Hum Reprod* 7, 1461–1466
- Howe TE, Shea B, Dawson LJ, Downie F, Murray A, Ross C, Harbour RT, Caldwell LM, Creed G (2011): Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev* 2011, CD000333
- Ingle JN, Twito DI, Schaid DJ, Cullinan SA, Krook JE, Mailliard JA, Tschetter LK, Long HJ, Gerstner JG, Windschitl HE (1991): Combination hormonal therapy with tamoxifen plus fluoxymesterone versus tamoxifen alone in postmenopausal women with metastatic breast cancer. An updated analysis. *Cancer* 67, 886–891
- Isabel E, Mellon C, Boyd MJ, Chauret N, Deschênes D, Desmarais S, Falguyret J-P, Gauthier JY, Khougaz K, Lau CK et al. (2011): Difluoroethylamines as an amide isostere in inhibitors of cathepsin K. *Bioorg Med Chem Lett* 21, 920–923
- Izumo N, Ishibashi Y, Ohba M, Morikawa T, Manabe T (2012): Decreased voluntary activity and amygdala levels of serotonin and dopamine in ovariectomized rats. *Behav Brain Res* 227, 1–6
- Johnell O, Kanis JA (2006): An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 17, 1726–1733

- Johnston BD, Ward WE (2015): The ovariectomized rat as a model for studying alveolar bone loss in postmenopausal women. *Biomed Res Int* 2015, 635023
- Jordan VC (Hrsg.): *Estrogen Action, Selective Estrogen Receptor Modulators and Women's Health: Progress and Promise*. Imperial College Press, London 2013
- Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15, 175–191
- Kalu DN: Animal Models of the Aging Skeleton In: Rosen CJ, Glowacki J, Bilezikian JP (Hrsg.): *The Aging Skeleton*. Academic Press, San Diego 1999, 37–50
- Kanis JA (2002): Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet* 359, 1929–1936
- Kanis JA, Johnell O (2005): Requirements for DXA for the management of osteoporosis in Europe. *Osteoporos Int* 16, 229–238
- 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* 24, 23–57
- Kanis JA, Svedbom A, Harvey N, McCloskey EV (2014): The osteoporosis treatment gap. *J Bone Miner Res* 29, 1926–1928
- Karsenty G, Ferron M (2012): The contribution of bone to whole-organism physiology. *Nature* 481, 314–320
- Kearbey JD, Gao W, Narayanan R, Fisher SJ, Wu D, Miller DD, Dalton JT (2007): Selective Androgen Receptor Modulator (SARM) Treatment Prevents Bone Loss and Reduces Body Fat in Ovariectomized Rats. *Pharm Res* 24, 328–335
- Kearbey JD, Gao W, Fisher SJ, Wu D, Miller DD, Dalton JT (2009): Effects of Selective Androgen Receptor Modulator (SARM) Treatment in Osteopenic Female Rats. *Pharm Res* 26, 2471–2477
- Khalid AB, Krum SA (2016): Estrogen receptors alpha and beta in bone. *Bone* 87, 130–135
- Kharode YP, Sharp MC, Bodine PVN (2008): Utility of the ovariectomized rat as a model for human osteoporosis in drug discovery. *Methods Mol Biol* 455, 111–124
- Kini U, Nandeesh BN: Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. In: Fogelman I, Gnanasegaran G, van der Wall H (Hrsg.): *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*. Springer, Berlin 2012, 29–57
- Kling JH: Einfluss des Lipoxygenaseinhibitors Baicalein in unterschiedlicher Dosierung auf den Skelettmuskel der ovariektomierten Ratte. *Med. Diss. Göttingen* 2016
- Kogianni G, Mann V, Noble BS (2008): Apoptotic Bodies Convey Activity Capable of Initiating Osteoclastogenesis and Localized Bone Destruction. *J Bone Miner Res* 23, 915–927
- Kolios L, Sehmisch S, Daub F, Rack T, Tezval M, Stuermer KM, Stuermer EK (2009): Equol but not genistein improves early metaphyseal fracture healing in osteoporotic rats. *Planta Med* 75, 459–465

- Komori T (2013): Functions of the osteocyte network in the regulation of bone mass. *Cell Tissue Res* 352, 191–198
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M et al. (1997): Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755–764
- Komrakova M, Werner C, Wicke M, Nguyen BT, Sehmisch S, Tezval M, Stuermer KM, Stuermer EK (2009): Effect of daidzein, 4-methylbenzylidene camphor or estrogen on gastrocnemius muscle of osteoporotic rats undergoing tibia healing period. *J Endocrinol* 201, 253–262
- Komrakova M, Stuermer EK, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmisch S, Tezval M, Daub F, Martens T, Witzhausen P et al. (2010): Effect of human parathyroid hormone hPTH (1-34) applied at different regimes on fracture healing and muscle in ovariectomized and healthy rats. *Bone* 47, 480–492
- Komrakova M, Weidemann A, Dullin C, Ebert J, Tezval M, Stuermer KM, Sehmisch S (2015): The Impact of Strontium Ranelate on Metaphyseal Bone Healing in Ovariectomized Rats. *Calcif Tissue Int* 97, 391–401
- Komrakova M, Hoffmann DB, Nuehnen V, Stueber H, Wassmann M, Wicke M, Tezval M, Stuermer KM, Sehmisch S (2016): The Effect of Vibration Treatments Combined with Teriparatide or Strontium Ranelate on Bone Healing and Muscle in Ovariectomized Rats. *Calcif Tissue Int* 99, 408–422
- Komrakova M, Fiebig J, Hoffmann DB, Kricshek C, Lehmann W, Stuermer KM, Sehmisch S (2018): The Advantages of Bilateral Osteotomy Over Unilateral Osteotomy for Osteoporotic Bone Healing. *Calcif Tissue Int* 103, 80–94
- Krishnan V, Bryant HU, MacDougald OA (2006): Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 116, 1202–1209
- Lange B, Vejdeck ZJ: *Photometrische Analyse*. Wiley-VCH, Weinheim 1987
- Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA (2008): The Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research. *Comp Med* 58, 424–430
- Li CW, Liang B, Shi XL, Wang H (2015): *Opg/Rankl* mRNA dynamic expression in the bone tissue of ovariectomized rats with osteoporosis. *Genet Mol Res* 14, 9215–9224
- Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE, Wu D (2005): Sclerostin Binds to LRP5/6 and Antagonizes Canonical Wnt Signaling. *J Biol Chem* 280, 19883–19887
- Li X, Ominsky MS, Warmington KS, Morony S, Gong J, Cao J, Gao Y, Shalhoub V, Tipton B, Haldankar R et al. (2009): Sclerostin Antibody Treatment Increases Bone Formation, Bone Mass, and Bone Strength in a Rat Model of Postmenopausal Osteoporosis. *J Bone Miner Res* 24, 578–588
- Liberman UA, Weiss SR, Bröll J, Minne HW, Quan H, Bell NH, Rodriguez-Portales J, Downs RW, Dequeker J, Favus M (1995): Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. The Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group. *N Engl J Med* 333, 1437–1443

- Lüllmann-Rauch R, Asan E: Taschenlehrbuch Histologie. 5. Auflage; Thieme, Stuttgart 2015
- MacNabb C, Patton D, Hayes JS (2016): Sclerostin Antibody Therapy for the Treatment of Osteoporosis: Clinical Prospects and Challenges. *J Osteoporos* 2016, 6217286
- Manolagas SC (2000): Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21, 115–137
- Martin EA, Ritman EL, Turner RT (2003): Time course of epiphyseal growth plate fusion in rat tibiae. *Bone* 32, 261–267
- McClung MR, Grauer A, Boonen S, Bolognese MA, Brown JP, Diez-Perez A, Langdahl BL, Reginster J-Y, Zanchetta JR, Wasserman SM et al. (2014): Romosozumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 370, 412–420
- Miyamoto T, Suda T (2003): Differentiation and function of osteoclasts. *Keio J Med* 52, 1–7
- Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y et al. (2007): Estrogen Prevents Bone Loss via Estrogen Receptor α and Induction of Fas Ligand in Osteoclasts. *Cell* 130, 811–823
- Narayanan R, Coss CC, Dalton JT (2018): Development of selective androgen receptor modulators (SARMs). *Mol Cell Endocrinol* 465, 134–142
- Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsmann 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* 344, 1434–1441
- Negro-Vilar A (1999): Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs): A Novel Approach to Androgen Therapy for the New Millennium. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 3459–3462
- Newton JL, Kenny RA, Frearson R, Francis RM (2003): A prospective evaluation of bone mineral density measurement in females who have fallen. *Age Ageing* 32, 497–502
- Orimo H (2010): The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch* 77, 4–12
- Parfitt AM, Mathews CH, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS (1983): Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. *J Clin Invest* 72, 1396–1409
- Parikka V, Peng Z, Hentunen T, Risteli J, Elo T, Väänänen HK, Härkönen P (2005): Estrogen responsiveness of bone formation in vitro and altered bone phenotype in aged estrogen receptor- α -deficient male and female mice. *Eur J Endocrinol* 152, 301–314
- Pennypacker BL, Duong LT, Cusick TE, Masarachia PJ, Gentile MA, Gauthier J-Y, Black WC, Scott BB, Samadfar R, Smith SY, Kimmel DB (2011): Cathepsin K inhibitors prevent bone loss in estrogen-deficient rabbits. *J Bone Miner Res* 26, 252–262
- Pérez-Castrillón JL, Pinacho F, De Luis D, Lopez-Menendez M, Dueñas Laita A (2010): Odanacatib, a New Drug for the Treatment of Osteoporosis: Review of the Results in Postmenopausal Women. *J Osteoporos* 2010, 401581

- Promega (2016): M-MLV-Reverse Transcriptase Protocol.
<https://www.promega.de/products/pcr/rt-pcr/m-mlv-reverse-transcriptase/?catNum=M1701>, abgerufen am 08.02.2018
- Qiagen (2012): RNeasy® Mini Handbook; 4. Auflage. <http://www.bea.ki.se/documents/EN-RNeasy%20handbook.pdf>, abgerufen am 17.02.2018
- Qing H, Ardeshirpour L, Divieti Pajevic P, Dusevich V, Jähn K, Kato S, Wysolmerski J, Bonewald LF (2012): Demonstration of osteocytic perilacunar/canalicular remodeling in mice during lactation. *J Bone Miner Res* 27, 1018–1029
- Raisz LG (2005): Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* 115, 3318–3325
- Recker RR, Benson CT, Matsumoto T, Bolognese MA, Robins DA, Alam J, Chiang AY, Hu L, Krege JH, Sowa H et al. (2015): A Randomized, Double-Blind Phase 2 Clinical Trial of Bloszumab, a Sclerostin Antibody, in Postmenopausal Women with Low Bone Mineral Density. *J Bone Miner Res* 30, 216–224
- Reginster JY, Seeman E, Vernejoul D, C M, Adami S, Compston J, Phenekos C, Devogelaer JP, Curiel MD, Sawicki A et al. (2005): Strontium Ranelate Reduces the Risk of Nonvertebral Fractures in Postmenopausal Women with Osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) Study. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 2816–2822
- Reginster JY, Bruyère O, Sawicki A, Roces-Varela A, Fardellone P, Roberts A, Devogelaer JP (2009): Long-term treatment of postmenopausal osteoporosis with strontium ranelate: Results at 8 years. *Bone* 45, 1059–1064
- Reszka AA: Bisphosphonate Mechanisms of Action. In: Adler RA (Hrsg.): *Osteoporosis: Pathophysiology and Clinical Management*. Humana Press, Totowa 2010, 443–468
- Rissanen JP, Suominen MI, Peng Z, Halleen JM (2008): Secreted tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a Marker of osteoclast number in human osteoclast cultures and the rat ovariectomy model. *Calcif Tissue Int* 82, 108–115
- Sandhu SK, Hampson G (2011): The pathogenesis, diagnosis, investigation and management of osteoporosis. *J Clin Pathol* 64, 1042–1050
- Saul D, Gleitz S, Nguyen HH, Kosinsky RL, Sehmisch S, Hoffmann DB, Wassmann M, Menger B, Komrakova M (2017): Effect of the lipoxigenase-inhibitors baicalein and zileuton on the vertebra in ovariectomized rats. *Bone* 101, 134–144
- Schmidt A, Kimmel DB, Bai C, Scafonas A, Rutledge S, Vogel RL, McElwee-Witmer S, Chen F, Nantermet PV, Kasparcova V et al. (2010): Discovery of the Selective Androgen Receptor Modulator MK-0773 Using a Rational Development Strategy Based on Differential Transcriptional Requirements for Androgenic Anabolism Versus Reproductive Physiology. *J Biol Chem* 285, 17054–17064
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008): Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protocols* 3, 1101–1108

- Schnitzer T, Bone HG, Crepaldi G, Adami S, McClung M, Kiel D, Felsenberg D, Recker RR, Tonino RP, Roux C et al. (2000): Therapeutic equivalence of alendronate 70 mg once-weekly and alendronate 10 mg daily in the treatment of osteoporosis. Alendronate Once-Weekly Study Group. *Aging (Milano)* 12, 1–12
- Seeman E: Genetic Determinants of the Population Variance in Bone Mineral Density. In: Rosen CJ, Glowacki J, Bilezikian JP (Hrsg.): *The Aging Skeleton*. Academic Press, San Diego 1999, 77–94
- Seeman E (2003): Periosteal bone formation—a neglected determinant of bone strength. *N Engl J Med* 349, 320–323
- Seibel MJ (2005): Biochemical Markers of Bone Turnover Part I: Biochemistry and Variability. *Clin Biochem Rev* 26, 97–122
- Seibel MJ, Robins SP, Gundberg CM: Biochemical Dynamics. In: Rosen CJ, Glowacki J, Bilezikian JP (Hrsg.): *The Aging Skeleton*. Academic Press, San Diego 1999, 277–299
- Seidlová-Wuttke D, Stürmer KM, Stürmer EK, Sehmisch S, Wuttke W (2006): Contrasting effects of estradiol, testosterone and of a black cohosh extract on density, mechanical properties and expression of several genes in the metaphysis of the tibia and on fat tissue of orchidectomized rats. *Maturitas* 55, S64–S74
- Sherwin BB, Gelfand MM (1984): Effects of parenteral administration of estrogen and androgen on plasma hormone levels and hot flushes in the surgical menopause. *Am J Obstet Gynecol* 148, 552–557
- Silva BC, Bilezikian JP (2011): New approaches to the treatment of osteoporosis. *Annu Rev Med* 62, 307–322
- Silverman SL, Chines AA, Kendler DL, Kung AWC, Teglbjærg CS, Felsenberg D, Mairon N, Constantine GD, Adachi JD, Bazedoxifene Study Group (2012): Sustained efficacy and safety of bazedoxifene in preventing fractures in postmenopausal women with osteoporosis: results of a 5-year, randomized, placebo-controlled study. *Osteoporos Int* 23, 351–363
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T et al. (1997): Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89, 309–319
- Sims NA, Morris HA, Moore RJ, Durbridge TC (1996): Increased bone resorption precedes increased bone formation in the ovariectomized rat. *Calcif Tissue Int* 59, 121–127
- Solomon DH, Johnston SS, Boytsov NN, McMorrow D, Lane JM, Krohn KD (2014): Osteoporosis medication use after hip fracture in U.S. patients between 2002 and 2011. *J Bone Miner Res* 29, 1929–1937
- Soysa NS, Alles N, Aoki K, Ohya K (2012): Osteoclast formation and differentiation: an overview. *J Med Dent Sci* 59, 65–74
- Springer Medizin (2017): Strontiumranelat: Produktionsstopp ab August 2017. *Orth Unfallchir* 7, 77–77

- Steffens JP, Coimbra LS, Rossa C, Kantarci A, van Dyke TE, Spolidorio LC (2015): Androgen receptors and experimental bone loss – An in vivo and in vitro study. *Bone* 81, 683–690
- Stoch SA, Zajic S, Stone J, Miller DL, van Dyck K, Gutierrez MJ, De Decker M, Liu L, Liu Q, Scott BB et al. (2009): Effect of the cathepsin K inhibitor odanacatib on bone resorption biomarkers in healthy postmenopausal women: two double-blind, randomized, placebo-controlled phase I studies. *Clin Pharmacol Ther* 86, 175–182
- Ström O, Borgström F, Kanis JA, Compston J, Cooper C, McCloskey EV, Jönsson B (2011): Osteoporosis: burden, health care provision and opportunities in the EU. *Arch Osteoporos* 6, 59–155
- Striegel H, Simon P (2007): Doping. *Internist* 48, 737–742
- 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* 21, 89–96
- Stürmer EK, Sehmisch S, Tezval M, Tezval H, Rack T, Boekhoff J, Wuttke W, Herrmann TRW, Seidlova-Wuttke D, Stuermer KM (2009): Effect of testosterone, raloxifene and estrogen replacement on the microstructure and biomechanics of metaphyseal osteoporotic bones in orchietomized male rats. *World J Urol* 27, 547–555
- Svendsen OL, Hassager C, Christiansen C (1995): Age- and menopause-associated variations in body composition and fat distribution in healthy women as measured by dual-energy X-ray absorptiometry. *Metab Clin Exp* 44, 369–373
- Tang BM, Eslick GD, Nowson C, Smith C, Bensoussan A (2007): Use of calcium or calcium in combination with vitamin D supplementation to prevent fractures and bone loss in people aged 50 years and older: a meta-analysis. *Lancet* 370, 657–666
- Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ (1995): FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 17, 125S-133S
- Tobias JH, Gallagher A, Chambers TJ (1994): 5 alpha-Dihydrotestosterone partially restores cancellous bone volume in osteopenic ovariectomized rats. *Am J Physiol* 267, E853-859
- Vajda EG, Hogue A, Griffiths KN, Chang WY, Burnett K, Chen Y, Marschke K, Mais DE, Pedram B, Shen Y et al. (2009a): Combination treatment with a selective androgen receptor modulator q(SARM) and a bisphosphonate has additive effects in osteopenic female rats. *J Bone Miner Res* 24, 231–240
- Vajda EG, Marschke K, van Oeveren A, Zhi L, Chang WY, López FJ, Meglason MD (2009b): LGD-4033 builds muscle and bone with reduced prostate activity and may be beneficial in age-related frailty. Posterpräsentation im Rahmen des 62nd Annual Meeting of the Gerontology Society of America, Atlanta, 19.-21.11.2009
- van der Eerden BCJ, van Til NP, Brinkmann AO, Lowik CWGM, Wit JM, Karperien M (2002): Gender differences in expression of androgen receptor in tibial growth plate and metaphyseal bone of the rat. *Bone* 30, 891–896

- van der Meulen MC, Jepsen KJ, Mikić B (2001): Understanding bone strength: size isn't everything. *Bone* 29, 101–104
- Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C (2004): Androgens and Bone. *Endocr Rev* 25, 389–425
- Walsh JS (2015): Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. *Surgery* 33, 1–6
- Weidemann A: Der Einfluss von Strontiumranelat auf die Frakturheilung osteopener Ratten. Med. Diss. Göttingen 2014
- Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, Jones JL, Podgornik MN, McAlister WH, Mumm S (2002): Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med* 347, 175–184
- Wilson S, Sharp CA, Davie MWJ (2012): Health-related quality of life in patients with osteoporosis in the absence of vertebral fracture: a systematic review. *Osteoporos Int* 23, 2749–2768
- Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K et al. (2003): Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J* 22, 6267–6276
- Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintrón M (1989): Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int* 45, 360–366
- Yamaura M, Nakamura T, Tsurukami H, Hijioka A, Narusawa K, Ohnishi H, Ohta T, Hosoda K (1996): Local bone turnover in the metaphysis of the proximal tibia and the lumbar vertebra during the early periods after ovariectomy in rats. *Calcif Tissue Int* 58, 52–59
- Yavropoulou MP, Yovos JG (2008): Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 8, 204–216
- Yin D, Gao W, Kearbey JD, Xu H, Chung K, He Y, Marhefka CA, Veverka KA, Miller DD, Dalton JT (2003): Pharmacodynamics of Selective Androgen Receptor Modulators. *J Pharmacol Exp Ther* 304, 1334–1340
- Yoon K-H, Cho D-C, Yu S-H, Kim K-T, Jeon Y, Sung J-K (2012): The Change of Bone Metabolism in Ovariectomized Rats : Analyses of MicroCT Scan and Biochemical Markers of Bone Turnover. *J Korean Neurosurg Soc* 51, 323–327

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Wolfgang Lehmann für die Möglichkeit meine Promotionsarbeit in seiner Abteilung durchführen zu können.

Ferner gilt mein Dank Prof. Dr. med. Arndt Schilling, der als Leiter des Bereichs Forschung und Entwicklung der Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Plastische Chirurgie neue Impulse setzen konnte und für die Diskussion meiner Ergebnisse jederzeit erreichbar war.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Hubertus Jarry bedanken, der mit seinen kritischen Anmerkungen zur Qualität der Promotionsarbeit erheblich beigetragen hat.

Zu großem Dank bin ich Ramona Castro-Machguth verpflichtet, die für mich Ansprechpartnerin für jegliche Fragen bezüglich der praktischen Umsetzung des Versuchs gewesen ist. Ebenfalls möchte ich Frau Annette Witt für die Unterstützung im Labor danken.

Ganz besonders möchte ich Frau Dr. rer. nat. Marina Komrakova für die Korrektur meiner schriftlichen Ausarbeitung danken. Ihre ständige Erreichbarkeit und Expertise im Gebiet der Osteoporose haben erheblich zum Gelingen meines Promotionsvorhabens beigetragen.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Stephan Schmisch, dessen gut organisierte Arbeitsgruppe mir den reibungslosen Verlauf des Promotionsvorhabens ermöglicht hat. Vielen Dank für die zielorientierte Beantwortung meiner Fragen.

Lebenslauf

Am 9. Mai 1993 wurde ich, Max Stefan Müller-Reiter, als Sohn von Dr. med. Stefan Müller-Reiter und Dr. med. Cornelia Müller-Reiter in Würzburg geboren.

Von 1999 bis 2003 besuchte ich die Grundschule Süd in Lauda. In den darauffolgenden neun Jahren setzte ich meine schulische Ausbildung am Martin-Schleyer-Gymnasium in Lauda fort, an dem ich im Jahr 2012 die allgemeine Hochschulreife erlangte.

Zum Sommersemester 2013 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August Universität in Göttingen mit Teilstudienplatz auf. Hier absolvierte ich die ersten drei Semester des vorklinischen Studienabschnitts, bis ich im Wintersemester 2014 einen Vollstudienplatz an der Justus-Liebig-Universität in Gießen erhielt. Dort legte ich im März 2015 den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note gut ab. Im Wintersemester 2015 wechselte ich zurück an die Universität Göttingen und führte das Medizinstudium im zweiten klinischen Semester fort. So konnte ich im März 2016 mein Promotionsvorhaben im Labor der Unfallchirurgie, Orthopädie und Plastischen Chirurgie beginnen. Im Oktober 2018 wurde der Zweite Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note gut abgeschlossen. Im November 2019 wurde der Dritte Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note sehr gut abgeschlossen.

Mein Praktisches Jahr absolvierte ich in Würzburg, Sydney (Australien) und Göttingen.